

Rodrigo Martinez

“EFEITO DOS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS E  
DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO FATOR DE  
CRESCIMENTO EPIDERMAL NA ONTOGÊNESE  
CEREBELAR”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS



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

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Rodrigo Martinez**

**“EFEITO DOS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS E DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL NA ONTOGÊNESE CEREBELAR”**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ, como pré-requisito para obtenção do grau de doutor em ciências.**

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia Celular, do Departamento de Anatomia – ICB/UFRJ, sob a orientação da professora Flávia Carvalho Alcantara Gomes e com os auxílios concedidos pelo CNPq, FAPERJ e SBEM.**

**Rio de Janeiro**

**Fevereiro**

**2008**

**MARTINEZ, Rodrigo.**

**Efeito dos hormônios tireoideanos e da via de sinalização do Fator de Crescimento Epidermal na ontogênese cerebelar. Rio de Janeiro, UFRJ, Instituto de Biofísica, 2008.**

**XIV, 115f.**

**Tese: Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia)**

**1. Hormônios tireoideanos 2. Cerebelo 3. Fator de crescimento epidermal  
4. Astrócitos**

**I. Universidade Federal do Rio de Janeiro - IBCCF<sup>o</sup>**

**II. Título**

## **Agradecimentos**

Há cerca de dez anos entrei pelo corredor do departamento de anatomia em busca de um estágio de iniciação científica. Na ocasião, encontrei no Prof. Vivaldo Moura Neto uma extrema confiança e generosidade em aceitar um aluno de um curso tão, digamos assim, “impopular” dentro do ambiente de pesquisa básica como o meu e não apenas isso, confiar-me uma série de funções extremamente importantes desde então. Sou ainda obrigado a apontar que o referido professor foi também para mim um exemplo de extrema humildade e amizade.

Logo em seguida, tive a sorte de trabalhar com a Profa. Flávia Gomes, que se mostrou uma pessoa extremamente competente, sincera e que me orientou em muito mais coisas do que “apenas” nessa tese de doutorado. Posso inclusive dizer que foi uma das pessoas mais importantes para a formação do profissional que sou hoje em dia. Sou extremamente grato não apenas pela sua imensa paciência e tolerância com os horários e estilo de vida absurdamente irregulares que a minha profissão me impõe, mas também por toda a ajuda dada ao longo da minha formação.

Durante todo o tempo necessário para a elaboração dessa tese, encontrei ainda imenso apoio entre as pessoas do departamento de anatomia, incluindo aí em especial os muitos colegas de bancada, que somando trocas de meio, lavagens de anticorpos e tarefas afins, tornaram factível boa parte desses trabalhos. Fico extremamente feliz de ver que a maior parte desses meus “colaboradores anônimos” permanece em nosso ambiente com esperanças de crescer dentro da universidade.

Já ingresso no programa de Pós-Graduação, pude verificar pela convivência com os professores e alunos desse instituto, que a Biofísica é uma grande família e que terei o apoio dos seus componentes toda vez que for necessário. Espero poder ainda por muito tempo frequentar pelo menos as conferências de quarta-feira e quem sabe um dia, apresentar uma delas (sonhar não custa nada!).

Tudo isso também só pôde ser possível graças a todo o apoio que tive de minha família e daqueles que trabalham comigo fora do ambiente de pesquisa. Agradeço muito aos meus mestres que me ensinaram a minha profissão e que até hoje se dispõem a atender telefonemas nos horários e dias mais inusitados em busca de algum tipo de orientação, aceitando a sua profissão como o sacerdócio de que ela realmente se constitui.

Afinal de contas, como posso agradecer a todas essas pessoas? Acho que uma lista interminável de nomes não equivale a tentar ser com os meus atuais colegas de bancada ou profissão, alunos e residentes, tão generoso, amigo e leal quanto todas essas pessoas foram comigo por todo esse longo período que resumi.

**Abreviaturas:**

**BDNF** – Fator neurotrófico derivado de cérebro, do inglês, *Brain-Derived Neurotrophic Factor* ;

**BLBP** – Proteína ligante de lipídio cerebral, do inglês, *Brain Lipid-Binding Protein*.

**BrdU** - 5-bromo-2´deoxiuridina;

**CDK** – Cinase dependente de ciclina, do inglês, *Cyclin-Dependent Kinase*;

**EGF** – Fator de crescimento epidermal, do inglês, *Epidermal Growth Factor*;

**EGFR** – Receptor para o fator de crescimento epidermal, do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*;

**EGL** – Camada granular externa, do inglês, *External Granular Layer*;

**GFAP** – Proteína acídica fibrilar glial, do inglês, *Glial Fibrillar Acidic Protein*;

**GLAST** – Transportador glial de l-glutamato/l-aspartato, do inglês, *L-Glutamate/L-Aspartate Glial Transporter* ;

**HT** – Hormônio tireoidiano;

**IGL** – Camada granular interna, do inglês, *Internal Granular Layer*;

**MAP-kinase** – Proteína cinase ativada por mitógeno, do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinase*;

**T3** – 3,5,3´-triodo-l-tironina;

**T4** – Tiroxina;

**r-T3** – T3 reverso, 3, 5´, 3´-triodo-L-tironina;

**MCC** – Meio condicionado por astrócitos controle;

**MCT3** – Meio condicionado por astrócitos tratados por T3

**NT3** – Neurotrofina 3;

**NT4/5** – Neurotrofina 4/5;

**PI3K**– Fosfatidil-inositol 3-cinase, do inglês, *Phosphatidylinositol 3-kinase*;

**PKA** – Proteína cinase A, do inglês, *Protein Kinase A*;

**SNC** - Sistema nervoso central;

**Shh** – *Sonic hedgehog*

**STAT** – Transdutores de sinal e ativadores da via de transcrição, do inglês, *Signal Transducers and Activators of Transcription Pathway*;

**TGF $\alpha$**  - Fator de crescimento transformante alfa, do inglês, *Transforming Growth Factor  $\alpha$* ;

**TGF $\beta$**  - Fator de crescimento transformante beta, do inglês, *Transforming Growth Factor  $\beta$* ;

**TNF $\beta$**  - Fator de necrose tumoral beta, do inglês, *Tumor Necrosis Factor  $\beta$* ;

**TR** – Receptor para hormônio da tireóide, do inglês, *Thyroid Hormone Receptor*;

**TRE** – Elemento responsivo ao hormônio da tireóide, do inglês, *Thyroid Hormone Response Element*;

**Resumo:**

Ao longo do desenvolvimento do cerebelo, diversos eventos celulares envolvendo o tipo neuronal mais numeroso desse órgão, os neurônios granulares, se sucedem a momentos distintos da vida embrionária e pós-natal precoce. Dentre esses eventos, destacam-se a proliferação, migração e finalmente a diferenciação dessas células. Todas essas etapas são dramaticamente afetadas em quadros de ausência de hormônio tireoideano, sugerindo-se assim um papel-chave desse hormônio em regular esses eventos celulares. Apesar disso, poucas são as evidências favorecedoras de um mecanismo direto de ação hormonal sobre o desenvolvimento dessas células, postulando-se assim que mecanismos indiretos possam ter destaque. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da glia em modular os efeitos desse hormônio sobre as três diferentes etapas do desenvolvimento cerebelar descritas. Utilizando-se abordagens de culturas de células dissociadas, verificamos que astrócitos cerebelares tratados com o hormônio secretam o fator de crescimento epidermal, o qual por meio da ativação da via de proteína cinase A promove a proliferação celular (Anexo 1). O mesmo fator solúvel está envolvido também em uma promoção da migração dos neurônios granulares e na radialização da glia de Bergmann, como pôde ser comprovado *in vitro* por ensaios com cultivo de explantes e, *in vivo*, através de ensaios de injeção de fatores. Na promoção da migração celular, a via de sinalização envolvida é a de proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK). Finalmente, o mesmo fator secretado por astrócitos cerebelares tem efeito autócrino sobre essas células e promove a secreção de proteínas de matriz extracelular, as quais promovem a diferenciação das células granulares por estímulo à sua neuritogênese (Anexo 2). Nossos achados reforçam as evidências favoráveis à uma ação indireta dos hormônios tireoideanos sobre o desenvolvimento cerebelar e evidenciam novas funções da glia nesse órgão.



**Abstract:**

During cerebellar development, several cellular processes involving the most numerous cell type of this organ, the granular neurons, take place at distinct moments of embryonic and early post-natal life. Among these processes, the most important are cellular proliferation, migration and finally differentiation. All these steps are dramatically affected on hypothyroid states, which suggests that this hormone has a key role in regulating these cellular processes. In spite of this, there are few evidences favoring a direct mechanism of action of this hormone on the development of these cells, and therefore, an indirect action hypothesis is postulated. The main objective of this work was to investigate the role of glia in modulating the effects of this hormone at the three different steps described of cerebellar development. By using dissociated cell cultures, we verified that cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone secrete the epidermal growth factor, which promotes cellular proliferation by activating the A kinase pathway. The same soluble factor is also involved on a promotion of granular neuronal migration and Bergmann glia radialization, as could be seen *in vitro* by explant and *in vivo*, by growth factors injection assays. On the cellular migration activation, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) is the signaling pathway involved. Finally, the same factor secreted by astrocytes has an autocrine effect over these cells and promotes the secretion of extracellular matrix proteins, which promote granular cell differentiation by stimulating neuriteogenesis. Our findings reinforce the evidences in favor of an indirect action of thyroid hormones on cerebellar development and demonstrate new functions of the glia on this organ.

<b>Sumário</b>	<b>Página</b>
<b>1 Introdução: O Cerebelo.</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Anatomia, histologia, fisiologia e embriologia cerebelares</b>	<b>1</b>
1.1.1 Anatomia	1
1.1.2 Histologia	4
1.1.3 Fisiologia	6
1.1.4 Morfogênese cerebelar	8
1.1.4.1 O primórdio cerebelar	8
1.1.4.2 A proliferação na camada granular externa	9
1.1.4.3 A migração granular tangencial – A glia de Bergmann como principal auxiliar:	9
<b>1.2 O desenvolvimento cerebelar e o hormônio da tireóide</b>	<b>16</b>
1.2.1 O hormônio da tireóide x desenvolvimento cerebelar	16
1.2.2 Mecanismos moleculares da ação hormonal	18
<b>1.3 Os astrócitos e o hormônio da tireóide</b>	<b>21</b>
<b>1.4 O Fator de crescimento epidermal (EGF)</b>	<b>24</b>
<b>2 Objetivos</b>	<b>28</b>
3 Materiais e métodos	29
3.1 Cultura primária de astrócitos	29
3.2 Cultura de glia de Bergmann	29
3.3 Culturas primárias de neurônios e co-culturas	30
3.4 Tratamento com T3 e EGF	31
3.5 Preparo do meio condicionado (MC)	31
3.6 Ensaio de anticorpos neutralizantes e de inibição de vias de sinalização	31
3.7 Culturas de explantes	32

3.8	Ensaio de injeção de fatores <i>in vivo</i>	33
3.9	Imunocitoquímica	33
3.10	Análise morfométrica dos neurônios, contagem de células e análise estatística	35
3.11	Ensaio de viabilidade com azul de Trypan	35
3.12	Ensaio de apoptose	35
3.13	Incorporação e detecção do bromodeoxiuridil	36
3.14	Análise da migração neuronal <i>in vivo</i>	36
3.15	Análise da migração neuronal <i>in vitro</i>	37
3.16	Análise da morfologia da glia de Bergmann	37
<b>4</b>	<b>Resultados:</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Primeira parte: ASTRÓCITOS E EGF COMO MODULADORES DA PROLIFERAÇÃO DE PRECURSORES GRANULARES:</b>	<b>38</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Astrócitos tratados com T3 aumentam a população neuronal</b>	<b>38</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Astrócitos tratados com T3 não modulam a viabilidade neuronal</b>	<b>39</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Astrócitos tratados com T3 promovem o aumento na população neuronal através da indução da proliferação neuronal</b>	<b>41</b>
<b>4.1.4</b>	<b>A proliferação neuronal induzida pela co-cultura com astrócitos previamente tratados com T3 (CoT3) é secundária ao estímulo à entrada dos precursores neuronais no ciclo de divisão celular</b>	<b>43</b>
<b>4.1.5</b>	<b>A proliferação neuronal induzida por T3 é mimetizada por EGF e envolve a ativação de tirosina-cinases</b>	<b>44</b>
<b>4.1.6</b>	<b>A proliferação neuronal induzida por T3 é mediada pela via de PKA</b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b>Segunda parte: ASTRÓCITOS E EGF COMO MODULADORES DA MIGRAÇÃO DE NEURÔNIOS GRANULARES</b>	<b>47</b>

<b>4.2.1</b>	<b>Astrócitos cerebelares tratados por T3 promovem a migração neuronal <i>in vitro</i>, através da secreção de fatores solúveis</b>	<b>47</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Astrócitos cerebelares tratados por T3 promovem a migração neuronal através da secreção de EGF</b>	<b>48</b>
<b>4.2.3</b>	<b>EGF promove a migração neuronal através da ativação da via de sinalização de MAPK</b>	<b>51</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Astrócitos cerebelares tratados por T3 promovem o desenvolvimento da glia de Bergmann através da secreção de EGF</b>	<b>52</b>
<b>4.2.5</b>	<b>A glia de Bergmann expressa receptores para EGF</b>	<b>56</b>
<b>4.2.6</b>	<b>EGF promove a radialização da glia de Bergmann através da ativação da via de sinalização de MAPK</b>	<b>57</b>
<b>4.2.7</b>	<b>EGF promove a migração de células granulares no período pós-natal <i>in vivo</i></b>	<b>59</b>
<b>4.3</b>	<b>Terceira parte: ASTRÓCITOS E EGF COMO MODULADORES DA DIFERENCIAÇÃO DE NEURÔNIOS GRANULARES</b>	<b>61</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Astrócitos cerebelares tratados com T3 promovem o crescimento neurítico</b>	<b>61</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Astrócitos cerebelares tratados com T3 promovem a arborização neuronal</b>	<b>63</b>
<b>4.3.3</b>	<b>A neuritogênese induzida por astrócitos tratados por T3 é mediada indiretamente</b>	<b>64</b>
<b>4.3.4</b>	<b>A neuritogênese induzida por astrócitos tratados por T3 é mediada por proteínas de matriz extracelular</b>	<b>69</b>
<b>4.3.5</b>	<b>EGF modula a expressão de laminina e fibronectina através das vias de sinalização MAPK e PI3-K</b>	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>74</b>
<b>5.1</b>	<b>Astrócitos como moduladores da proliferação de precursores granulares</b>	<b>74</b>

<b>5.2</b>	<b>Astrócitos como moduladores da migração de neurônios granulares</b>	<b>80</b>
<b>5.3</b>	<b>Astrócitos como moduladores da neuritogênese cerebelar</b>	<b>87</b>
<b>5.4</b>	<b>Um modelo final para o papel de EGF como um modulador dos efeitos de T3 no desenvolvimento cerebelar</b>	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusões</b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>Referências</b>	<b>99</b>

<b>Lista de Figuras e Tabelas:</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> <i>Anatomia do cerebelo</i>	2
<b>Figura 2:</b> <i>Lobos e lóbulos do cerebelo</i>	3
<b>Figura 3:</b> <i>Histologia do córtex cerebelar do adulto</i>	6
<b>Figura 4:</b> <i>Os circuitos do cerebelo</i>	8
<b>Figura 5:</b> <i>A morfogênese cerebelar em roedores</i>	15
<b>Figura 6:</b> <i>O receptor de EGF e vias de sinalização ativadas</i>	26
<b>Figura 7:</b> <i>Astrócitos cerebelares tratados com T3 aumentam a população neuronal</i>	39
<b>Tabela 1:</b> <i>Efeito do meio condicionado astrocitário e da cocultura na sobrevivência de neurônios granulares</i>	40
<b>Figura 8:</b> <i>Astrócitos tratados com T3 não modulam a apoptose neuronal</i>	41
<b>Figura 9:</b> <i>O co-cultivo de neurônios com astrócitos tratados com T3 induz a proliferação neuronal</i>	42
<b>Figura 10:</b> <i>O cocultivo de precursores neuronais com astrócitos tratados com T3 induz a proliferação neuronal</i>	43
<b>Figura 11:</b> <i>Efeito da inibição de tirosinas-quinase sobre a proliferação neuronal</i>	45
<b>Figura 12:</b> <i>A proliferação neuronal induzida por T3 é mediada por PKA</i>	46
<b>Figura 13:</b> <i>Astrócitos cerebelares tratados com T3 promovem a migração neuronal pela secreção de EGF</i>	49
<b>Figura 14:</b> <i>Efeito dos fatores de crescimento, EGF e TGF<math>\beta</math>1 na migração neuronal cerebelar</i>	50
<b>Figura 15:</b> <i>EGF promove a migração neuronal através da ativação da via de MAPK</i>	52
<b>Figura 16:</b> <i>O meio condicionado por astrócitos cerebelares tratados com T3 promove a maior extensão das fibras de glia de Bergmann</i>	54
<b>Figura 17:</b> <i>Astrócitos cerebelares tratados por T3 promovem a radialização da glia de Bergmann através da secreção de EGF</i>	55
<b>Figura 18:</b> <i>A glia de Bergmann expressa receptores para EGF</i>	57
<b>Figura 19:</b> <i>EGF promove o alongamento da glia de Bergmann através da ativação da via de MAPK</i>	58
<b>Figura 20:</b> <i>EGF promove a migração de células granulares no período pós-natal in vivo</i>	60
<b>Figura 21:</b> <i>Astrócitos tratados com T3 promovem o crescimento neurítico.</i>	62
<b>Figura 22:</b> <i>Astrócitos cerebelares tratados com T3 promovem a arborização neuronal</i>	63
<b>Figura 23:</b> <i>Efeito de EGF na neuritogênese cerebelar</i>	66
<b>Figura 24:</b> <i>Efeito da inibição da via de sinalização de EGF no crescimento neurítico induzido por astrócitos tratados por T3</i>	67
<b>Figura 25:</b> <i>O meio condicionado por astrócitos tratados com T3 não aumenta o comprimento total e número de neuritos</i>	68
<b>Figura 26:</b> <i>T3 e EGF modulam a produção de proteínas de matriz extracelular por astrócitos</i>	70
<b>Figura 27:</b> <i>Efeitos dos inibidores de vias de sinalização no crescimento neurítico induzido por EGF</i>	72
<b>Figura 28:</b> <i>Efeito dos inibidores de vias de sinalização na síntese de proteínas da MEC por astrócitos induzida por EGF</i>	73
<b>Figura 29:</b> <i>Um modelo para as diferentes ações de EGF e astrócitos sobre três etapas do desenvolvimento cerebelar</i>	97

## **1 Introdução: O Cerebelo.**

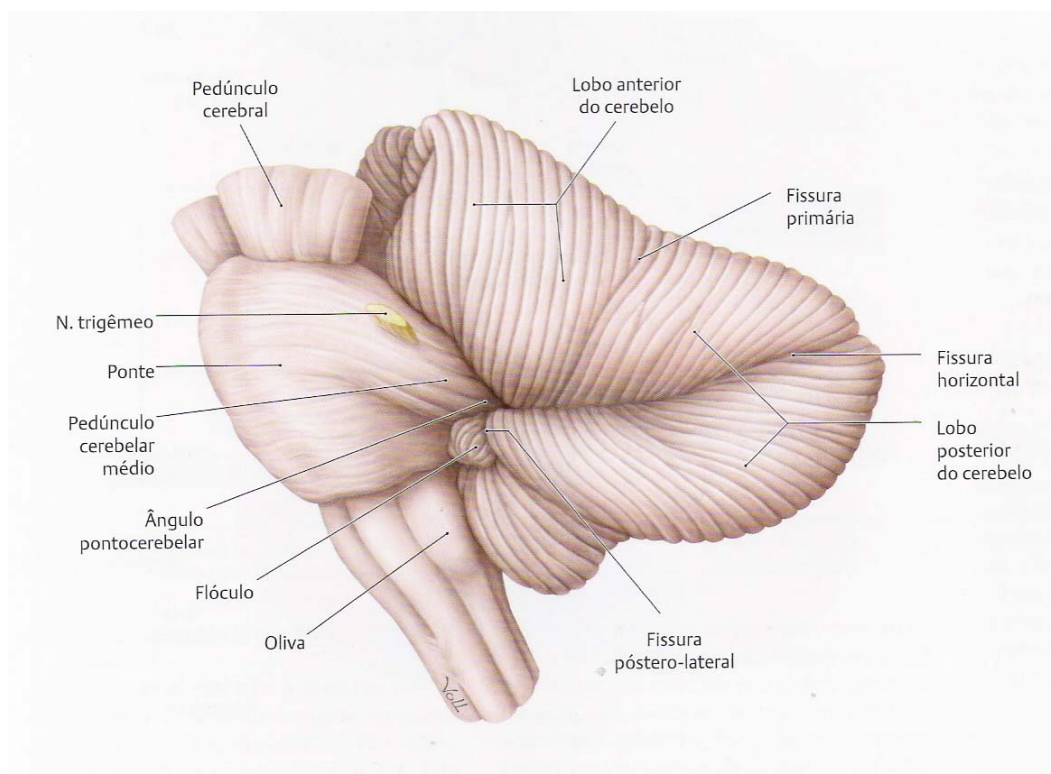
O Sistema Nervoso Central (SNC) é composto por uma série de estruturas dotadas de notáveis características morfológicas e funcionais. O cerebelo é o foco central dessa tese por ser uma das estruturas mais afetadas em quadros de hipotireoidismo (Takahashi et al., 2008; Koibuchi et al., 2003). Nosso trabalho constitui-se em apenas uma das muitas vertentes de estudo desse órgão, que recentemente se mostrou ter funções muito além das que lhe foram inicialmente atribuídas, tendo hoje papel sabidamente importante em atividades relacionadas à inteligência, cognição, aprendizado e memória, além de ser sede de doenças prevalentes como o meduloblastoma (Scelfo et al., 2008; Pritchard & Olson, 2008; Ben-Yehudah et al., 2007; Morales & Hatten, 2006).

### **1.1 Anatomia, histologia, fisiologia e embriologia cerebelares:**

#### **1.1.1 Anatomia:**

Localizado no interior da caixa craniana, e repousando no assoalho da sua fossa posterior, o cerebelo é um órgão interposto entre o tronco cerebral e os lobos occipitais do cérebro, estando separado dessas estruturas respectivamente pela tenda do cerebelo e pelo quarto ventrículo (**Figura 1**). Seu peso aproximado é de 140g e a proporção de seu tamanho, comparado com o cérebro é de aproximadamente 1:8 no adulto e 1:20 na criança. Anatomicamente é dividido em dois hemisférios e uma porção ímpar mediana denominada vermis. Sua superfície, denominada córtex, apresenta sulcos pronunciados, denominados fissuras, as quais delimitam os lobos desse órgão. Cada lobo será finalmente subdividido por

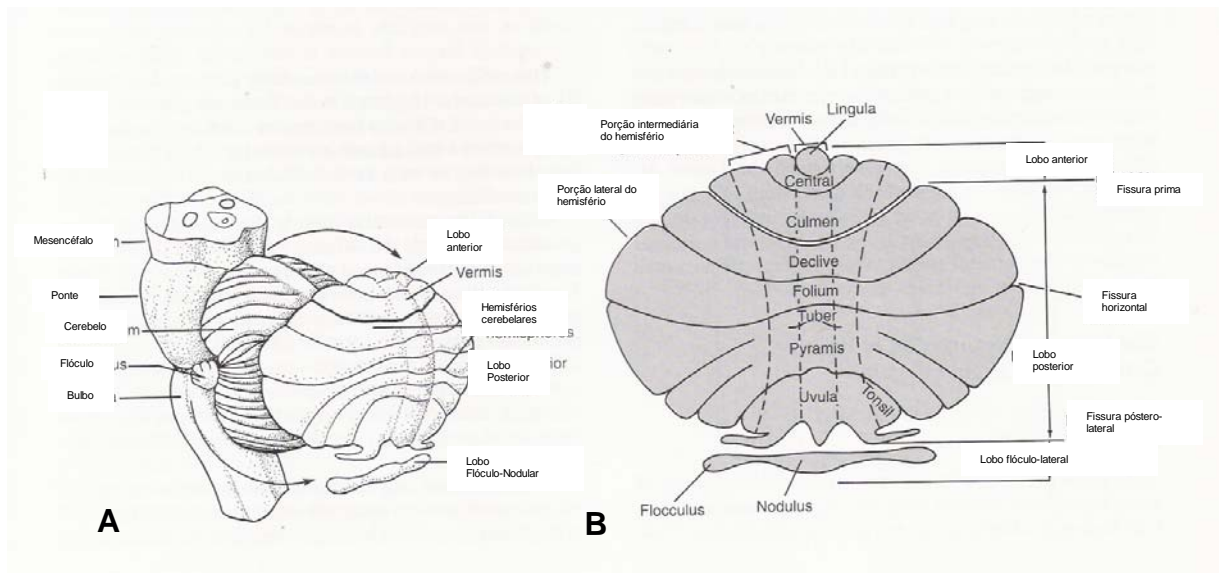
sulcos menos pronunciados que determinam que o aspecto final da sua superfície seja constituído por numerosas cristas paralelas denominadas folhas cerebelares (Gray & Goss 1988). Pela análise de sua estrutura interna, verificamos que o cerebelo possui uma camada externa de substância cinzenta (o córtex) e uma massa interna de substância branca, o corpo medular do cerebelo, na qual se encontram alojados os seus quatro núcleos: denteado, emboliforme, fastigial e globoso, que correspondem a grupamentos celulares de fundamental importância para a fisiologia do órgão. A substância branca consiste em fibras próprias e fibras de projeção que passam através de estruturas que conectam o cerebelo ao restante do sistema nervoso central (SNC), os pedúnculos cerebelares superior, médio e inferior, que apresentam conexões diretas com mesencéfalo, ponte e bulbo, respectivamente (**Figura 1**).



**Figura 1:** *Anatomia do cerebelo.* O cerebelo é reproduzido de forma tridimensional, evidenciando suas folhas, fissuras e a sua localização posterior ao tronco cerebral. Os núcleos cerebelares são estruturas compostas por substância cinzenta que se localizam em grupamentos no interior da substância branca. Adaptado de Schüncke et al., 2007.



A complexidade da foliação do cerebelo varia entre as espécies, sendo esse órgão composto por dez lobos em humanos e no rato (Corrales et al., 2006). Os lobos recebem denominações distintas nos hemisférios e no vérmis e a cada lobo no vérmis correspondem dois nos hemisférios. Essas denominações são comumente substituídas por numerações em trabalhos científicos. Além da divisão anatômica, o cerebelo pode ser submetido à uma divisão ontogenética ou a uma divisão filogenética, à qual corresponde uma divisão funcional. Ambas divisões consistem-se em conjuntos de lóbulos originando os lobos (**Figura 2**). A classificação ontogenética separa os conjuntos específicos de lóbulos de acordo com o seu desenvolvimento, e sendo assim, esse órgão seria dividido nos lobos flóculo-nodular e o corpo do cerebelo, divididos entre si pela fissura póstero-lateral (a primeira a surgir). O corpo do cerebelo seria posteriormente dividido pela fissura prima em lobos anterior e posterior. A divisão filogenética será melhor abordada no capítulo relacionado à fisiologia do órgão.



**Figura 2:** *Lobos e lóbulos do cerebelo.* De uma forma didática, a forma tridimensional do cerebelo pode de ser esquematizada em um plano único (A). O cerebelo é composto por uma série de lóbulos e conjuntos específicos desses são agrupados em lobos, havendo assim 3 grandes lobos divididos pelas fissuras póstero-lateral e prima. Adaptado de Ghez, 2003.

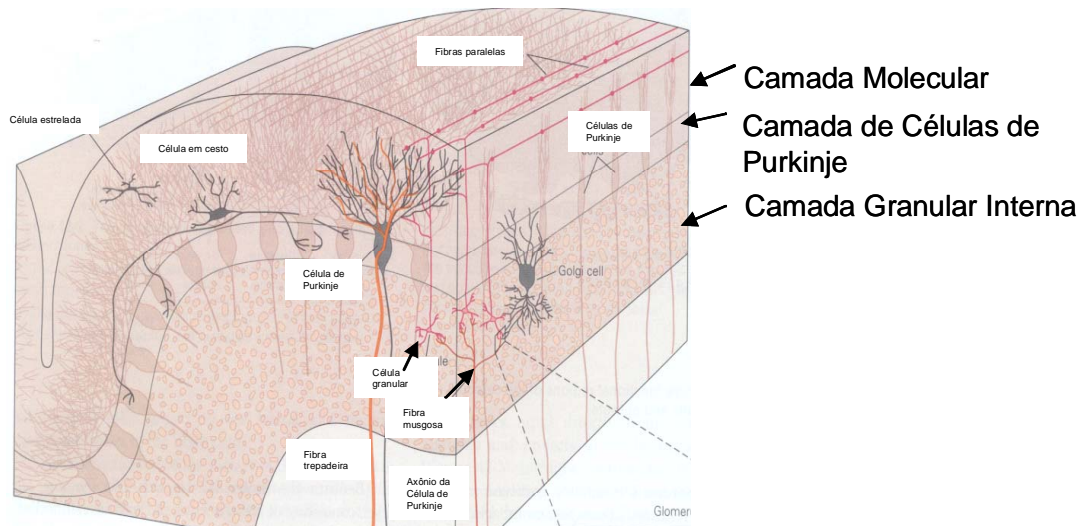
### 1.1.2 Histologia:

A organização do córtex cerebelar em mamíferos e aves adultos segue um padrão celular bastante ordenado, que determina a formação de 3 camadas celulares: *camada molecular*, *camada de células de Purkinje* e *camada granular interna* (do inglês, *Internal Granular Layer*, IGL), nesta ordem, da superfície externa para a interna (**Figura 3**). A camada molecular é caracterizada por baixa densidade celular e alta densidade sináptica, e nela encontramos basicamente interneurônios, compostos pelas células estreladas e células em cesto, além de axônios desses tipos celulares. Além disso, para essa camada projetam-se os axônios das células granulares, os quais assumem a posição de fibras paralelas, correndo ao longo do eixo da folha cerebelar, e que realizam sinapses com os dendritos das células de Purkinje. Na camada de células de Purkinje, além de interneurônios específicos, as células em candelabro, destacam-se os grandes corpos celulares dos neurônios de Purkinje, os quais se dispõem lado a lado em direção vertical. A partir da sua porção superior, seus dendritos estendem-se para a camada molecular formando amplas arborizações. Da sua porção inferior, encontramos seus axônios, os quais se dirigem para os núcleos cerebelares e são os únicos axônios de neurônios corticais do cerebelo que se entendem para além do córtex cerebelar. Já na camada granular interna, encontram-se os numerosos neurônios granulares, os quais são células esféricas, providas de curtos dendritos e que se constituem no grupamento de neurônios mais numeroso do cerebelo (Ghez, 2003). Nessa camada, há também dois subtipos de neurônios: as células de Lugaro e de Golgi.

Além dos neurônios, o cerebelo é caracterizado também pela presença de células astrogliais, subdivididas nos astrócitos e na glia de Bergmann. Os astrócitos estão presentes na substância branca (astrócitos do tipo fibroso) e na camada granular interna (predominantemente astrócitos do tipo protoplasmático), tendo importante função de fontes tróficas para os neurônios granulares. A glia de Bergmann constitui-se em um subtipo de célula glial de morfologia unipolar cujos corpos celulares estão localizados ao redor dos neurônios de Purkinje e cujos prolongamentos estendem-se até a superfície pial, tendo função primordial em eventos migratórios, como será melhor abordado adiante (Yamada & Watanabe, 2002; Morte et al., 2004; Manzano et al., 2007).

As aferências para o córtex cerebelar constituem-se em dois tipos de fibras: As fibras trepadeiras que se originam dos núcleos olivares inferiores e estabelecem sinapses diretas com os dendritos dos neurônios de Purkinje, formando as espículas dendríticas, no compartimento dendrítico proximal da camada molecular e as fibras musgosas, uma população de axônios que surge de diversos núcleos da medula espinhal, do tronco cerebral e dos núcleos cerebelares profundos, e que atingem primariamente as células granulares na IGL, as quais, por sua vez, emitem seus axônios que compõem as fibras paralelas, que fazem sinapse com diversos dendritos dos neurônios de Purkinje e com os dendritos dos interneurônios inibitórios do cerebelo, na camada molecular.

O padrão celular descrito acima é repetido ao longo de todo o córtex cerebelar, à exceção da densidade de células unipolares em escova, que são mais numerosas nos lóbulos ventrais do que dorsais (Mugnaini & Floris, 1994).



**Figura 3:** *Histologia do córtex cerebelar do adulto.* Nesse estágio da vida, o córtex cerebelar é composto por 3 camadas: a camada molecular, a camada de células de Purkinje e a camada granular. Notar a arborização exuberante dos dendritos de Purkinje. Os axônios dessas células comunicam-se com os núcleos cerebelares. Adaptado de Ghez, 2003.

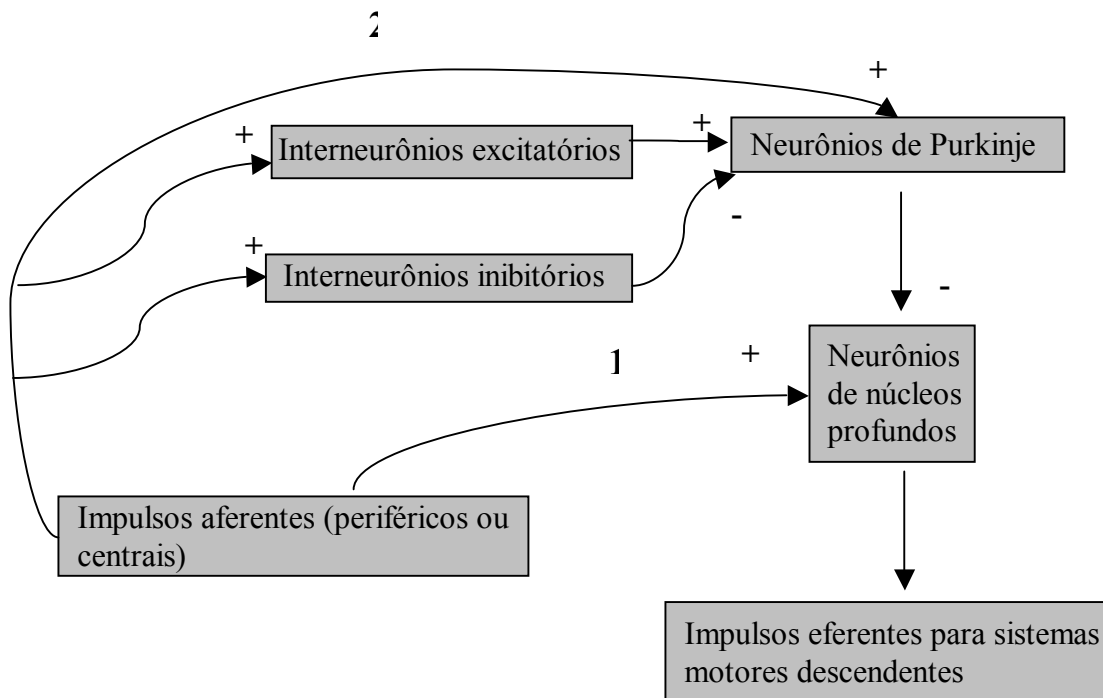
### 1.1.3 Fisiologia:

Embora o cerebelo represente apenas 10% do volume cerebral total, ele contém mais da metade dos neurônios cerebrais. Fisiologicamente, sua estrutura neuronal está envolvida tradicionalmente em processos de regulação do movimento e da postura. Tal regulação é cumprida a partir de ajustes nos impulsos eferentes dos principais sistemas motores descendentes do cérebro. Desta forma, o cerebelo recebe informações a respeito de planos de movimento de estruturas envolvidas com a programação e a execução do movimento (exemplo: córtex motor e pré-motor) e ao mesmo tempo recebe informações a respeito da “performance” motora a partir do “feedback” que surge da periferia durante o movimento. Assim, através da comparação entre essas informações (intenção x movimento efetivo), o cerebelo realiza os ajustes necessários no movimento realizado (Ghez, 2003).

Indivíduos com lesões cerebelares já na idade adulta possuem alterações na coordenação dos membros, na movimentação ocular, no equilíbrio e diminuição no tônus muscular (Ferrarin et al., 2005).

Tais funções desempenhadas pelo cerebelo só são possíveis a partir da estrutura dos circuitos internos do cerebelo (**Figura 4**): O *circuito primário* é composto por uma alça formada pelos impulsos aferentes (vindos do restante do SNC pelas fibras musgosas e trepadeiras) em conexão direta com os núcleos cerebelares profundos, que em resposta a esses enviam sinais para áreas motoras do SNC. Esse circuito primário é modulado pelo córtex cerebelar, o qual recebe os mesmos impulsos das fibras aferentes, via sinapses com as células granulares ou diretamente com os neurônios de Purkinje, os quais enviam resposta inibitória para os núcleos profundos do cerebelo. A partir dos núcleos profundos do cerebelo, saem as fibras eferentes para diversas estruturas do SNC (Cholley et al., 1989; Teune et al., 2000)

Conforme citado previamente, o cerebelo pode ser dividido no que diz respeito às suas características funcionais. Desta forma, o lobo flóculo-nodular corresponde funcionalmente à porção do órgão que apresenta conexões com o sistema vestibular, tendo papel em funções de equilíbrio e posição do animal, e é denominado arquicerebelo. O lobo anterior, juntamente com dois lóbulos presentes no lobo posterior, a pirâmide e a úvula, correspondem ao paleocerebelo, que possui conexões predominantemente com a medula espinhal, tendo função predominantemente na regulação do tônus muscular e postura. O restante do órgão é denominado neocerebelo, que se relaciona com o controle de movimentos finos e tem conexões com o córtex cerebral.



**Figura 4:** *Os circuitos do cerebelo.* A fisiologia cerebelar é resumidamente esquematizada por dois circuitos internos: o circuito primário (1) é constituído por uma alça formada pelos impulsos aferentes se comunicando diretamente com os núcleos cerebelares, os quais por sua vez retornam os sinais através das suas vias eferentes. O circuito secundário (2) envolve a modulação dos impulsos aferentes pelos interneurônios excitatórios e inibitórios e pelos neurônios de Purkinje. Adaptado de Ghez, 2003.

#### 1.1.4 Morfogênese cerebelar:

##### 1.1.4.1 O primórdio cerebelar:

A complexa estrutura cerebelar desenvolve-se no embrião a partir do tubo neural, do terço mais caudal do mesencéfalo (que origina as porções mais craniais do vérmis cerebelar) e dos dois terços mais craniais do rombencéfalo (rh1 – que origina as porções mais mediais dos hemisférios cerebelares e rh2 – que origina as porções mais laterais dos hemisférios cerebelares), em uma zona de transição denominada “constricção ístmica”. O neuroepitélio ventricular origina diretamente os interneurônios, os neurônios nucleares e de Purkinje, sendo esses dois últimos tipos os mais precocemente formados (em cerca de 11 dias embrionários no camundongo). Parte desses tipos celulares, em especial os interneurônios da camada

molecular, deixam o neuroepitélio ventricular ainda como neuroblastos e seguem os seus programas de diferenciação ainda durante a sua migração para o córtex, em um processo denominado divisão intersticial (Sotelo 2004) e localizam-se abaixo da EGL primitiva. A localização adequada desses tipos celulares requer a expressão de alguns sinais de posicionamento celular como a reelina, molécula expressa na margem interna da EGL necessária para o alinhamento das células de Purkinje pós-migratórias (Miyata et al., 1997).

#### 1.1.4.2 A proliferação na camada granular externa:

Ao contrário das demais regiões do SNC, onde a maior parte da proliferação neuronal ocorre no neuroepitélio primitivo ventricular, para a formação do cerebelo, grande parte dos precursores neuronais migra precocemente a partir de uma estrutura denominada lábio rômboide, na parte livre do rombencéfalo por um trajeto tangencial e cobre, com cerca de 15 dias embrionários em roedores, toda a superfície do primórdio cerebelar, formando um centro secundário de neurogênese denominado camada granular externa (EGL – do inglês, “External Granular Layer”, **Figura 5A**), localizado em uma porção mais periférica do tubo neural, onde ocorre intensa proliferação neuroblástica. Essa migração tangencial é caracterizada pelo uso pelas células em migração, de eixos dos próprios neurônios vizinhos, sendo denominada migração neuronofílica, em contraposição à migração gliofílica envolvendo a glia radial que descreveremos adiante. Ao contrário da proliferação no neuroepitélio ventricular, a proliferação que ocorre na EGL é majoritariamente neonatal, e resulta na formação de células granulares pós-mitóticas que se localizam na região mais interna da EGL (também denominada camada granular interna pré-migratória).

#### 1.1.4.3 A migração granular tangencial – A glia de Bergmann como principal auxiliar:

A partir da EGL, esses precursores migram com o auxílio de células não neuronais diferenciadas denominadas glia de Bergmann (**Figura 5B**), entre o 3º e o 30º dia pós-natal em roedores, para uma região mais interna, atravessando a camada molecular, dando então origem à IGL do adulto (**Figura 5A**). Esse processo culmina aproximadamente no 21º dia pós natal no desaparecimento da EGL (Altman & Bayer, 1985). Para o início da migração, cada neurônio granular estende um prolongamento protoplasmático composto por um cone de crescimento, o qual se dirige à substância branca em um trajeto vertical, e o núcleo celular segue o trajeto do cone de crescimento uma vez que esse último alcance a camada molecular. A combinação desses processos resulta na migração desse tipo celular, com o núcleo apresentando movimento saltatório e assíncrono em relação ao movimento contínuo do cone de crescimento (Hatten et al., 1984). Durante essa migração, os axônios dos neurônios granulares estabelecem-se na camada molecular, originando as fibras paralelas. Esses eventos são acompanhados pela diferenciação progressiva das células de Purkinje, processo esse que se inicia com o aparecimento das extensões peri-somáticas e pela formação de uma rede de fibras trepadeiras ao redor do corpo dos neurônios de Purkinje. Após isso, há formação dos neuritos apicais dessas células, e esses se ramificam formando uma rede de dendritos na camada molecular (Neveu & Arenas, 1996). Durante o processo migratório há, portanto, íntimo contato entre o neurônio e a glia de Bergmann, e diversos ligantes foram caracterizados como participantes dessa interação, incluindo astrotactina, neuregulina e  $\beta$ 1-integrina (Anton et al., 1996; Edmondson et al., 1988; Fishell & Hatten, 1991; Fishman & Hatten, 1993). A astrotactina é uma proteína expressa amplamente em regiões do SNC onde há grande migração neuronal. O bloqueio na sua expressão provoca diminuição importante na capacidade dos neurônios granulares em se aderirem à glia, o que, por sua vez, provoca apoptose de células granulares e desenvolvimento precário das células de Purkinje (Adams et



al., 2002). De forma semelhante, o bloqueio de integrinas é capaz de inibir a migração de neurônios em sistemas específicos (Fishman & Hatten, 1993), e depósitos de laminina foram detectados ao longo das fibras da glia de Bergmann durante o período migratório (Liesi & Risteli, 1989). Os gangliosídeos são glicoesfingolípídeos contendo ácido siálico que se constituem em um importante grupo de moléculas portadoras de carboidratos, sendo ricamente presentes em superfícies externas de membranas. Durante a migração dos neurônios granulares há expressão por ambos os tipos celulares desse gangliosídeo e o bloqueio imunológico dessa interação é inibitório para a migração (Santiago et al., 2001 e 2004). Durante a migração granular, os neuroblastos expressam neuregulina e a glia de Bergmann seu receptor, erbB4, e o bloqueio desses receptores leva a um bloqueio da migração celular (Rio et al., 1997). A migração granular torna-se bastante prejudicada também na deleção condicional do receptor da proteína solúvel Notch, Jagged 1, evidenciando mais um exemplo da pluralidade de moléculas que orquestram o fenômeno migratório granular no cerebelo (Weller et al., 2006). A EGL é, portanto, uma estrutura dedicada exclusivamente à geração de neurônios granulares, como evidenciado por estudos que usaram a metodologia de embriões quiméricos (Alvarez Otero et al., 1993).

Há clara interdependência dos diferentes subtipos celulares para a ocorrência normal dos processos descritos. Mutantes nos quais foram produzidas perturbações na localização (*reeler*) ou no número (*staggerer*) de células de Purkinje são caracterizados por diminuições intensas na população de neurônios granulares e na sua taxa de proliferação. Aparentemente, esse controle da proliferação granular pelas células de Purkinje é, ao menos parcialmente, explicado pela secreção de fatores solúveis como a molécula *Sonic Hedgehog* (Shh) por essas células. Shh tem efeito mitógeno marcante sobre as células granulares e o uso de anticorpos neutralizantes de Shh nessa fase promove diminuição importante na proliferação das células

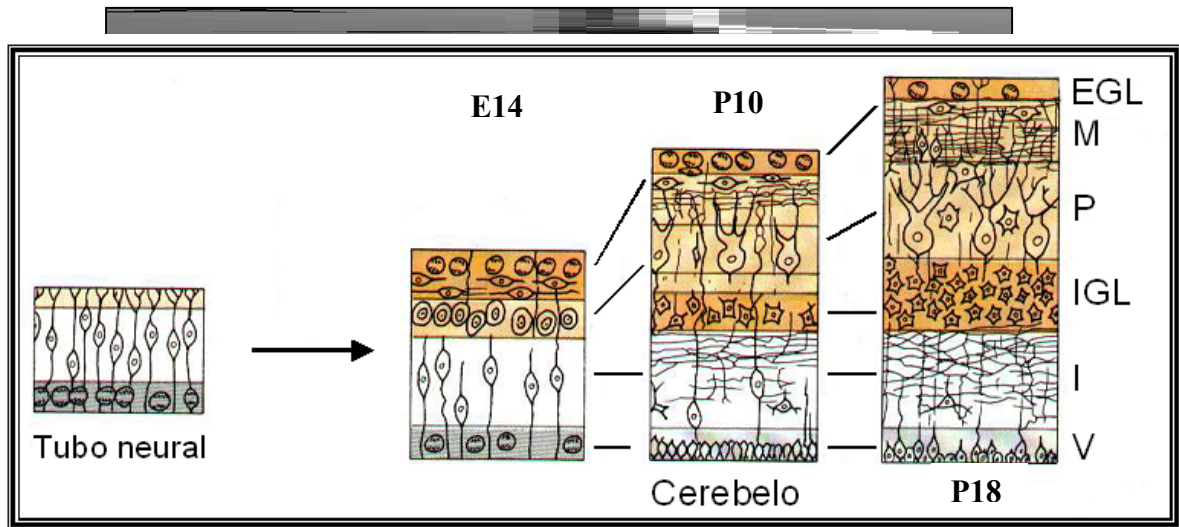
da EGL, enquanto que a adição de Shh exógeno resulta em proliferação prolongada da EGL (Dahmane & Ruiz-i-Altaba, 1999). Da mesma forma, o pleno desenvolvimento dos neurônios de Purkinje, em especial da sua rede dendrítica na camada molecular, depende da formação adequada dos neurônios granulares, como se depreende da observação de animais onde a população de neurônios granulares é severamente depletada (Crepel et al., 1980). Mais recentemente, foram identificados fatores solúveis secretados por neurônios granulares, como Wnt-7a, com papel comprovado na maturação de fibras neurais da camada molecular (Hall et al., 2000; Morales & Hatten, 2006).

No processo de diferenciação das células granulares, a expressão de moléculas de matriz extracelular tem papel regulatório. Na porção mais proliferativa da EGL (subcamada mais externa), há maior expressão de laminina e seus receptores, e neurônios granulares cultivados em laminina respondem mais intensamente à proliferação induzida por Shh. Na porção pré-migratória (subcamada mais interna), por sua vez, há maior expressão de vitronectina e seus receptores e neurônios granulares cultivados em vitronectina respondem a Shh com diferenciação celular (Pons et al., 2001).

As diferentes taxas de proliferação celulares nas camadas cerebelares resultam na formação das folhas cerebelares, de forma que há uma correlação temporal entre a expansão da EGL e o aumento no número de fissuras cerebelares. Da mesma forma, o nível de expressão de moléculas relacionadas à proliferação de neurônios granulares, como as envolvidas na via de sinalização de Shh, está diretamente relacionado ao grau de foliação no cerebelo. A formação das fissuras é um processo ordenado e, aparentemente, geneticamente programado (Corrales et al., 2006). O processo de foliação se completa em até 3 semanas no rato.

Uma atenção especial deve ser dada às células que guiam a migração dos diferentes tipos neuronais ao longo do desenvolvimento cerebelar: A glia de Bergmann é um tipo especializado de glia cerebelar que provê um arcabouço para a migração e posicionamento espacial para neurônios cerebelares em desenvolvimento. Células com esta função específica são encontradas durante o desenvolvimento em diversas estruturas do SNC e são conhecidas coletivamente por glia radial. Descritas inicialmente como envolvidas na migração neuronal e geração de astrócitos, sabe-se hoje que as células de glia radial são os principais precursores neuronais do córtex cerebral (Noctor et al., 2002; Malatesta et al., 2000). Nos mamíferos, a grande maioria das células da glia radial desaparece, permanecendo apenas alguns vestígios em algumas áreas específicas onde elas adaptam-se às necessidades locais e condições espaciais, como é o caso da glia de Bergmann no cerebelo. Nesse caso específico, essas células tornam-se astrócitos unipolares e têm localização de seus corpos celulares ao redor dos corpos das células de Purkinje (Yamada & Watanabe, 2002), estendendo prolongamentos celulares – fibras de Bergmann, que atravessam a camada molecular e terminam na superfície pial. Essas células no adulto expressam as proteínas de filamento intermediário GFAP (do inglês – *Glial Fibrillary Acidic Protein* – Proteína Acídica Fibrilar Glial) e vimentina (Bignami & Dahl, 1973; Schnitzer et al., 1981; Boloventá et al., 1984). Outro importante marcador celular é o transportador de glutamato GLAST (Transportador Glial de L-glutamato/L-aspartato, do inglês, *L-Glutamate/L-Aspartate Glial Transporter*), que é seletivamente expresso por todas as células da glia radial durante o desenvolvimento (Shibata et al., 1996 e 1997) e tem expressão reduzida nos astrócitos em geral, porém aumentada nas células da glia de Bergmann do adulto, servindo, portanto, como uma ferramenta para identificação desse tipo celular no animal adulto (Yamada et al., 2000). Durante a migração neuronal, o filamento vertical da célula granular estabelece íntimo contato com a fibra vertical

da glia de Bergmann, e para isso, a combinação entre moléculas desses dois tipos celulares é fundamental. A glia radial expressa durante a migração dos neurônios granulares diversos marcadores como RC1, RC2, nestina e BLBP (proteína ligadora de lipídeo cerebral, do inglês, *Brain Lipid Binding Protein*). Uma vez cessada a migração granular, há desaparecimento da expressão de nestina, por exemplo. As células migratórias parecem influenciar a diferenciação da glia radial: a glia de Bergmann madura pode transformar-se em glia que expressa nestina na presença de enxertos de neurônios embrionários (Soriano et al., 1997). Essa modulação do fenótipo glial pode, ao menos parcialmente, ser explicada pela expressão de moléculas como a neuregulina pelas células granulares em migração. A ativação de receptores de neuregulina na glia de Bergmann induz o seu fenótipo característico (Rio et al., 1997). No processo de migração são também importantes as moléculas de adesão celular, e anticorpos bloqueadores contra diversas dessas moléculas, tais como N-CAM e L1/Ng-CAM provocaram supressões parciais na migração de neurônios granulares (Lindner et al., 1983).



A

**Figura 5:** *A morfogênese cerebelar em roedores:* o desenvolvimento do cerebelo inicia-se a partir do metencéfalo (A) e é marcado pela migração precoce dos precursores granulares para um centro secundário de neurogênese denominado camada granular externa (EGL). Nessa camada, os precursores proliferam e posteriormente migram para a camada granular interna (IGL). A migração dos precursores neuronais (seta preta) se dá utilizando-se as fibras da glia radial (seta branca) como trilhos (B). EGL: camada granular externa; M: camada molecular; P: camada de neurônios de Purkinje; IGL: camada granular interna; I: Substância branca; V: zona ventricular; A: Modificado de Gilbert, 2000; B: Modificado de Anton et al., 1997.

## **1.2 O desenvolvimento cerebelar e o hormônio da tireóide:**

### 1.2.1 O hormônio da tireóide x desenvolvimento cerebelar:

Conforme descrito no início deste trabalho, todas as etapas do desenvolvimento cerebelar são claramente dependentes do hormônio da tireóide (Koibuchi et al., 2003). Essa conclusão pode ser obtida a partir dos trabalhos de análise de animais hipotireóideos, onde se verifica diversos déficits no desenvolvimento desse órgão (Takahashi et al., 2008). No hipotireoidismo, grande parte das etapas do desenvolvimento cerebelar aparentam estar retardadas e ineficazes. Dentre os trabalhos envolvendo hipotireoidismo e cerebelo, podemos destacar alguns:

Lauder e colaboradores (Lauder et al., 1974) caracterizaram bem o processo de prolongamento no tempo de permanência da EGL e retardo no crescimento cortical nos animais hipotireóideos congênitos. Tais alterações traduzem-se em um retardo na maximização da razão entre as áreas cortical e subcortical, bem como um retardo no processo de foliação, o que resultou finalmente na formação de um número maior de fissuras as quais, porém, possuíam uma profundidade menor. Tais autores analisaram também os mesmos parâmetros no hipertireoidismo congênito, tendo descrito um desaparecimento prematuro da EGL nesses animais, bem como um crescimento cortical reduzido e uma maximização precoce da razão entre as áreas corticais e subcorticais. Isso resultou em uma interrupção precoce do processo de foliação e em um número reduzido de fissuras as quais, porém, tinham profundidade normal. Esses dados foram recentemente comprovados utilizando-se técnicas mais elaboradas de análise (Takahashi et al., 2008).

Nicholson e Altman (Nicholson & Altman, 1972) descreveram uma redução no tamanho e um aumento na densidade dos corpos celulares nos neurônios cerebelares em animais hipotireóideos, o que é assumido como sinônimo de desenvolvimento retardado dessas células.

Pesetsky (Pesetsky, 1973) revê em seu trabalho de 1973 importantes alterações no cerebelo de animais hipotireóideos, notadamente um “déficit” no desenvolvimento de células de Purkinje e na sua sinaptogênese. Além disso, ele é pioneiro em atentar para deficiências na neuroglia: astrócitos na IGL e na substância branca apresentando pobreza relativa nos processos radiais, característica essa que se manteve mesmo em períodos tardios da vida animal. Por outro lado, a aparência das células da glia de Bergmann não estava alterada. Na mesma linha, Clos e Legrand (1973) descreveram uma redução na área total das camadas granular interna e de Purkinje, associada a um aumento na densidade das células dessas camadas.

Associada às deficiências morfológicas observadas no cerebelo hipotireóideo, essa estrutura apresenta elevada morte celular, em parte explicada pelo aumento na expressão do gene pro-apoptótico Bax e uma regulação suprimida de genes anti-apoptóticos, como Bcl-2 e Bcl-xL (Singh et al., 2003).

Da mesma forma que a ausência do hormônio provoca severos déficits no desenvolvimento celular, o tratamento hormonal está associado a dramáticas mudanças no perfil celular, com reestabelecimento da migração granular em poucos dias do início do tratamento (Takahashi et al., 2008). O hormônio é capaz também de promover arborização de neurônios de Purkinje em um mecanismo possivelmente direto de ação hormonal (Heuer & Mason 1993).

### 1.2.2 Mecanismos moleculares da ação hormonal:

A glândula tireóide tem como principais produtos de sua secreção a tiroxina (T4) e a 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T3), em uma proporção de aproximadamente 80% do primeiro. O T4 pode ser entendido como pró-hormônio de baixa afinidade aos receptores do hormônio e com maior meia-vida plasmática. É convertido nos tecidos periféricos em T3 através da reação de desiodação em seu resíduo 5'. Essa reação é catalizada por enzimas denominadas desiodases, que se dividem em subtipos com propriedades enzimáticas e afinidades distintas. As desiodases D1 e D2 convertem T4 em T3, enquanto a desiodase D3 cataliza a remoção dos resíduos de iodo na posição 5, ou anel interno, levando à formação do T3 reverso (rT3), com afinidade desprezível aos receptores de hormônio tireoideano (HT). A ação das desiodases pode ser entendida como uma forma de regulação da atividade e níveis hormonais e está alterada em condições de deficiência de HTs. Outras formas de regulação da atividade hormonal incluem a própria regulação do eixo hipotálamo-hipofisário por sistema de *feedback* e a regulação negativa da expressão dos receptores de HT, que envolve mecanismos transcricionais e pós-transcricionais (Chen et al., 2003; Flamant et al., 2007).

O hormônio da tireóide atua primariamente nos tecidos através de sua ação sobre os seus receptores nucleares (TR), os quais são representantes da superfamília dos receptores nucleares. As diferentes isoformas de TRs são produtos de transcrições distintas dos genes THRA e THRB, os quais são homólogos celulares do oncogene *v-erb A*. Esses genes originam as isoformas TR $\alpha$ 1, 2 e 3, TR $\beta$ 1, 2 e 3, TR $\Delta\alpha$  1 e 2 e TR $\Delta\beta$ 3, das quais TR $\alpha$ 2 e 3 e TR $\Delta\alpha$  1 e 2 não têm capacidade de ligação aos HTs não sendo consideradas como TRs propriamente ditos (Casas et al., 2006). A forma TR $\beta$ 2



aparentemente encontra-se localizada especificamente na pituitária, cóclea e cérebro. TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 são amplamente distribuídos. TR $\Delta\beta$ 3 possui capacidade de ligação ao HT mas não possui domínio de ligação ao DNA, possuindo papel de potente antagonista *in vitro*. TR $\beta$ 3 e TR $\Delta\beta$ 3 só foram até o momento, isolados em ratos (Flamant et al., 2006).

Os TRs possuem em comum, além de um sítio de ligação ao hormônio, um outro sítio de ligação a seqüências específicas do DNA denominadas elementos de resposta ao hormônio da tireóide (do inglês – “thyroid hormone response element” – TRE). Esses sítios são, em geral, seqüências contidas em regiões promotoras de genes. A ligação dos TRs aos TREs ocorre independentemente da presença do hormônio. De uma forma geral, a ligação do hormônio ao TR leva à ativação ou repressão gênica através da modulação dos TREs (Basset et al., 2006).

A construção de animais com mutações específicas em TRs distintos revelou importantes informações a respeito do papel específico de cada uma dessas isoformas. Previamente a esses trabalhos, assumia-se que a deleção no receptor deveria levar a conseqüências similares às da ausência do hormônio. Essa suposição só se comprovou em algumas estruturas específicas do SNC como a retina e a cóclea, enquanto que, para a maior parte do SNC, o fenótipo dos animais nocaute (KO) para os TRs é muito mais brando do que o encontrado no hipotireoidismo (Bernal et al., 2007). Nesse contexto, a deleção de TR $\alpha$ 1 não provocou alterações no desenvolvimento cerebelar, a despeito desse ser o receptor responsável pelo controle da migração granular. A explicação para esses achados está na hipótese de uma ação de repressão negativa independente de ligante exercida por TR $\alpha$ 1 (Morte et al., 2002). De fato, essa hipótese pôde ser melhor explorada com a construção de mutantes dominantes negativos de TRs. O mutante dominante negativo para TR $\beta$ 1 apresentou diversas características da morfologia

cerebelar semelhantes às dos animais hipotireóideos, tais como grande deficiência na diferenciação de neurônios de Purkinje (Bernal et al, 2007). Em um trabalho de outro grupo, um mutante dominante negativo, sem capacidade de ligação de HTs, para TR $\beta$  apresentou diminuições importantes na sua massa total cerebelar, e no tamanho das camadas de células de Purkinje e molecular. Verificou-se também uma redução importante na arborização e quantidade dos neurônios de Purkinje (Hashimoto et al., 2001).

Diferentes tipos de TRs foram encontrados no cerebelo de animais em desenvolvimento. Sendo assim, TR $\alpha$  foi descrito como sendo primariamente expresso por células granulares e TR $\beta$  por células de Purkinje (Bradley et al., 1992; Strait et al., 1991). Recentemente, no entanto, Heuer e Mason demonstraram que a arborização das células de Purkinje é dramaticamente alterada em ausência de TR $\alpha$  funcional nessas células (Heuer & Mason, 2003).

Embora seja bem descrita a expressão de TRs no cerebelo e a ação direta de T3 sobre os tipos celulares, diversas evidências sugerem a ação indireta do hormônio promovendo o desenvolvimento das células cerebelares. Essa hipótese é reforçada pela observação de que embora T3 influencie diversos eventos do desenvolvimento cerebelar, poucos são os genes regulados diretamente pelo hormônio. Além disso, sabe-se que o desenvolvimento do SNC é modulado por diversos fatores neurotróficos, tais como BDNF (Fator neurotrófico derivado de cérebro), NT3 (Neurotrofina 3), NT4/5 (Neurotrofina 4/5) os quais atuam em suas células-alvo através de receptores tirosina-cinase. Essas neurotrofinas possuem importantes papéis em fenômenos como diferenciação, sinaptogênese, crescimento axonal e dentrítico. A relação entre expressão de neurotrofinas e sua regulação por T3 foi descrita por Figueiredo e colaboradores (Figueiredo et al., 1993). Esses autores sugeriram que pelo menos em parte, a ação de

T3 sobre o desenvolvimento do SNC poderia ser mediada por fatores intermediários como as neurotrofinas. No hipotireoidismo cerebelar há alterações seletivas no padrão de expressão de neurotrofinas e de seus receptores: no cerebelo, Neveu e Arenas (Neveu & Arenas, 1996) verificaram uma diminuição na expressão de BDNF (do inglês – “Brain-derived neurotrophic factor”, fator de crescimento neurotrófico derivado de cérebro) e NT3 (do inglês – “Neurotrophin 3”, neurotrofina 3) porém sem diminuição na expressão de seus receptores. A administração de BDNF aumentou a sobrevivência dos neurônios na IGL e a de NT3, além de ter o mesmo efeito de BDNF sobre a sobrevivência neuronal, também promoveu a diferenciação de neurônios na EGL e de células de Purkinje. Por outro lado, outros trabalhos não evidenciaram efeitos significativos de BDNF ou do bloqueio da via de sinalização deste fator sobre crescimento dendrítico de células de Purkinje (Heuer & Mason, 2003).

Em conjunto, esses dados demonstram que apesar do hormônio da tireóide ter papel relevante na morfogênese cerebelar, os mecanismos moleculares envolvidos nesses eventos ainda não estão completamente elucidados.

### **1.3 Os astrócitos e o hormônio da tireóide:**

Os astrócitos são células não-neuronais do tipo glial constituintes do tecido nervoso (Kimelberg, 2004). Suas funções específicas vêm sendo a cada dia mais ampliadas, a partir do conceito inicial de células meramente estruturais (Virchow, 1846) até às funções de suporte à neurogênese (Lim & Alvarez-Buylla, 1999), fonte de fatores tróficos como FGF (Fator de crescimento de fibroblastos, do inglês, “Fibroblast Growth Factor”), TGF (Fator de crescimento transformante, do inglês, “Transforming growth factor” e EGF (Connor & Dragunow, 1998; Gomes et al., 1999; de Sampaio et

al.,2002), auxílio na migração neuronal (Hatten, 2002) e formação de sinapses (Nägler et al., 2001; Pfrieger & Barres, 1997 ). A zona subventricular é um exemplo de região do SNC onde a interação neurônio-glia foi bem caracterizada: Os astrócitos dessa região fornecem suporte à proliferação de precursores neuronais e à sua posterior diferenciação em neuroblastos em um processo que envolve o contato direto célula-célula (Lim & Alvarez-Buylla, 1999).

A modulação da morfogênese astrocitária pelo hormônio da tireóide foi demonstrada previamente *in vitro* (Trentin et al, 1995; Trentin & Moura-Neto, 1995). O tratamento de culturas astrocitárias com T3 produz alterações morfológicas em astrócitos derivados de hemisfério cerebral de ratos neonatos. O mesmo tratamento promove a proliferação de astrócitos cerebelares (Trentin et al., 1995). Esses efeitos são reproduzidos, em período ainda mais curto de observação, por meio condicionado (MCT3) por estes astrócitos tratados por T3 em uma nova cultura astrocitária. Essa observação final levanta a hipótese de que o efeito final de T3 sobre a glia, ao menos nos fenômenos descritos, parece ser indireto. Além desse fenômeno citado, demonstrou-se que T3 é capaz de modular outros aspectos da morfogênese astrocitária como a organização da proteína de filamento intermediário, GFAP, e da proteína de matriz extracelular, fibronectina (Trentin & Moura Neto, 1995). O hipotireoidismo está associado a uma deficiência no processo de maturação dos astrócitos cerebelares, os quais apresentam expressão prolongada de moléculas de citoesqueleto características de células imaturas, como vimentina (Manzano et al., 2007). Ainda nessa linha, foi demonstrado que o hormônio da tireóide regula outra função astrocitária: a organização e deposição extracelular de laminina (Farwell & Dubord-Tomasetti, 1999), uma importante proteína de matriz extracelular do SNC, o que potencialmente influencia o desenvolvimento desse sistema uma vez que a laminina tem papel-chave em fenômenos

de migração neuronal, formação de sinapses e sobrevivência celular (Reichardt & Tomaselli, 1991). Nos últimos anos, com o crescimento das atribuições dadas às células astrocíticas no desenvolvimento do SNC, os astrócitos vêm sendo apontados como potenciais mediadores das ações neuronais de T3.

O meio condicionado de astrócitos cerebelares recém-natos possui poderoso efeito mitogênico sobre progenitores neuronais embrionários provenientes da mesma estrutura (Gomes et al., 1999). Tal efeito mitogênico é devido à presença de fatores solúveis como EGF (do inglês, *Epidermal Growth Factor*, Fator de crescimento epidermal), TNF $\beta$  (do inglês, *Tumor Necrosis Factor  $\beta$* , Fator de necrose tumoral  $\beta$ ) e FGF (do inglês, *Fibroblast Growth Factor* Fator de crescimento de fibroblasto, Trentin et al., 2001). Em conjunto, esses dados sugerem que os astrócitos sejam potenciais mediadores das ações de T3 no desenvolvimento cerebelar através da secreção de fatores de crescimento.

Outros achados reforçam a hipótese de uma ação indireta de T3 mediada por EGF sobre a proliferação cerebelar: a expressão do receptor para o fator de crescimento epidermal (EGFR) está bastante diminuída em animais hipotireóides cuja proliferação da EGL está alterada. Da mesma forma, a expressão desse receptor é maior em neurônios pré-migratórios da EGL do cerebelo em desenvolvimento e diminui nos neurônios pós-migratórios da IGL (Carrasco et al., 2003). Esses dados em conjunto podem sugerir que EGF e seus receptores estejam envolvidos na modulação da proliferação e migração de precursores cerebelares da EGL por T3. Sendo os astrócitos uma fonte de EGF no cerebelo, acreditamos estar aí uma possível explicação para um mecanismo indireto de T3 sobre o desenvolvimento cerebelar, sugerindo-se uma ação primária do hormônio sobre a glia.

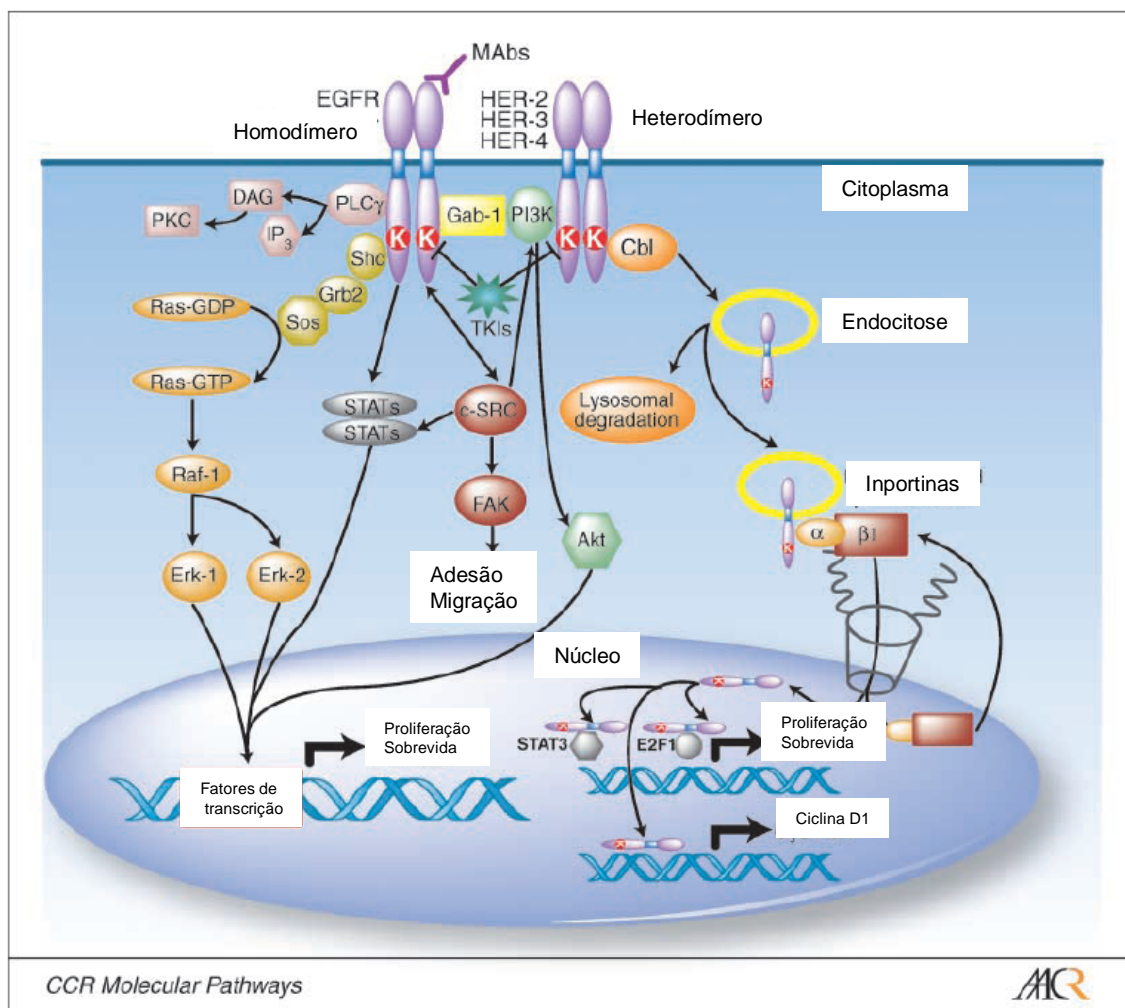
#### 1.4 O Fator de crescimento epidermal (EGF):

O Fator de Crescimento Epidermal (EGF) é um polipeptídeo da mesma família de TGF $\alpha$  (do inglês – “Transforming Growth Factor  $\alpha$ ” - fator de crescimento transformante  $\alpha$ ), dos fatores de crescimento de Poxvirus e da Anfiregulina, tendo em comum com esses a alta afinidade para o receptor de EGF (EGFR), e a estrutura molecular. Seu receptor faz parte de uma família de receptores tirosina-cinase que inclui três outros membros (erbB2/HER-2, erbB3/HER-3 e erbB4/HER-4), os quais apresentam estrutura similar de proteína de membrana com um domínio de ligante extracelular, uma região transmembrana curta e um domínio intracelular constituído por uma tirosina-cinase que é ativada classicamente pela ocupação do sítio extracelular pelo ligante, que promove uma mudança conformacional no ectodomínio do receptor, permitindo a sua dimerização e autofosforilação de diversos resíduos de tirosina na sua porção COOH-terminal. EGFR pode também ser ativado pela superexpressão do seu receptor (que ocorre freqüentemente em linhagens tumorais) ou mesmo por ativações independentes de ligante secundárias a deleções no seu domínio extracelular. A partir da fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor, expõem-se sítios de ancoragem para proteínas citoplasmáticas contendo domínios de homologia Src 2 e de ligação a fosfotirosinas. A ligação dessas proteínas pode iniciar a sinalização intracelular por diversas vias (Scaltriti & Baselga, 2006; **Figura 6**). É sabido que a atividade de tirosina-cinase está diretamente relacionada com a regulação da proliferação celular. O tratamento de células intactas com EGF produz um aumento na formação de fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina no EGFR, e a etapa fundamental para a transdução de sinal por EGFR parece ser a ativação da atividade de tirosina-cinase do

receptor. A partir dessa ativação, 5 substratos da tirosina-cinase de EGFR são descritos: Fosfolipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1); Fosfatidil Inositol-3 cinase (PI-3 cinase); GAP, MAP-cinase e raf-cinase (Carpenter & Cohen, 1990). Dentre as vias de sinalização de EGF, a ativação de Raf-MEK-MAP é a mais classicamente descrita, sendo a via envolvida na maior parte dos fenômenos descritos secundariamente a partir da ativação desse receptor, e em especial na regulação da proliferação e sobrevivência celulares. A partir da fosforilação de EGFR há ligação do complexo formado por proteínas adaptadoras Grb2 e Sos a sítios específicos do receptor. Essa ligação permite a mudança conformacional de Sos, tornando-a capaz de recrutar Ras-GDP, o que resulta na ativação de Ras (Ras-GTP). Ras-GTP ativa então Raf-1, que fosforila as proteínas-cinases ativadas por mitógeno (MAPK). MAPK tem a propriedade de translocar-se para o núcleo, onde então tem a capacidade de fosforilar e ativar diversos fatores de transcrição.

Outras vias alternativas podem ser ativadas a partir da fosforilação de EGFR. Por exemplo, a via de fosfatidilinositol 3-cinase(PI3K)/Akt é ativada por dimerização do receptor com o receptor da mesma família HER-3 e envolve a enzima dimérica composta por uma subunidade regulatória p85, responsável pela ancoragem a sítios específicos de receptor erbB e uma subunidade catalítica p110, que gera um segundo mensageiro fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. Esse último é responsável pela fosforilação de ativação da proteína serina/treonina cinase Akt. Essa via é mais envolvida em fenômenos de crescimento celular, resistência à apoptose, invasão e migração (Vivanco & Sawyers, 2002). A via de fosfolipase C também pode ser ativada pela interação direta da proteína fosfolipase C $\gamma$  com EGFR, o que ultimamente leva à hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-difosfato originando inositol 1,2,5-trifosfato, que possui papel na liberação de cálcio intracelular e 1,2-diacilglicerol, o qual é um cofator para a ativação da proteína cinase C. Há ainda evidências apontando a ativação de vias

como aquelas envolvendo transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs – do inglês, “Signal Transducers and activators of transcription”), Src-cinases e a via de proteína cinase A (PKA) (Bromberg, 2002; Ciardiello & Tortora, 1998).



**Figura 6:** O receptor de EGF e vias de sinalização ativadas: O receptor de membrana de EGF (EGFR) é uma proteína transmembrana com um domínio intracelular constituído por uma tirosina-cinase (K). A ocupação do sítio extracelular por ligante acarreta na homo ou heterodimerização do receptor, fosforilação de resíduo de tirosina e recrutamento de proteínas intracelulares, com a conseqüente ativação de diversas vias de sinalização intracelulares. Após a ligação, o receptor pode ser internalizado e então degradado por lisossomos ou translocar-se para o núcleo, onde pode atuar como fator de transcrição (Adaptado de Scaltriti & Baselga, 2006).



O fator de crescimento epidermal é responsável por diversos fenômenos no SNC, tais como proliferação e diferenciação de progenitores neuronais ou neurônios pós-mitóticos e células gliais (Fricker-Gates et al., 2000, Yamada et al., 1997). O receptor para EGF foi identificado em diversas regiões do SNC embrionário ou adulto, incluindo aí, além do próprio cerebelo, outras regiões como córtex frontal e hipocampo (Yamada et al., 1997; Danielsen & Maihle, 2002).

Diversas evidências falam a favor de um papel central de EGF no desenvolvimento cerebelar: Seroogy e colaboradores (Seroogy et al.; 1995) identificaram a presença de grande concentração de RNAm para EGFR na EGL de animais recém-natos, sobretudo na porção mais interna (pré-migratória) dessa camada, havendo posteriormente uma diminuição na intensidade dessa marcação em neurônios da IGL. No adulto, a intensidade da marcação apresentou um declínio importante, o que sugere um papel de EGF ou de outros ligantes de EGFR em fenômenos relacionados ao desenvolvimento de precursores neuronais no cerebelo como, por exemplo, na proliferação e migração dessas células entre as duas camadas granulares.

Da mesma forma, a secreção de EGF por astrócitos cerebelares é influenciada por T3 (Gomes et al., 1999), podendo-se incluir esse fator na família de moléculas liberadas em resposta ao estímulo hormonal e justamente por isso candidatas a mediadoras dos efeitos de T3 sobre o desenvolvimento desse órgão. EGF mostrou ser molécula potencialmente relevante para o desenvolvimento neuronal e os neurônios granulares apresentam expressão relevante de EGFR. Da mesma forma, astrócitos e neurônios são em muitos diferentes contextos do desenvolvimento do SNC subtipos celulares com funções complementares. Sendo assim, propomos um eventual mecanismo pelo qual os astrócitos mediarão os efeitos de T3 sobre o desenvolvimento dos neurônios cerebelares tendo EGF como molécula intermediária desse processo.

## 2. Objetivos:

**2.1 Geral:** Analisar o papel dos astrócitos como mediadores da ação do hormônio da tireóide no desenvolvimento do cerebelo.

### 2.2 Específicos:

2.2.1 Analisar o papel dos astrócitos na neuritogênese, proliferação, morte e migração de neurônios cerebelares induzidas pelo hormônio da tireóide *in vitro*;

2.2.2 Caracterizar a participação de moléculas solúveis ou de matriz extracelular envolvidas nos eventos observados;

2.2.3 Identificar as vias de sinalização intracelulares envolvidas na proliferação e neuritogênese de neurônios cerebelares induzidas pelo hormônio da tireóide;

2.2.4 Analisar o efeito de EGF e/ou astrócitos na migração cerebelar *in vitro* e *in vivo*;

2.2.5 Analisar o efeito de EGF e/ou do meio condicionado astrocitário na morfogênese da glia de Bergmann *in vitro* e *ex vivo* em animais normais e hipotireóides;

### **3 Materiais e métodos:**

#### **3.1 Cultura primária de astrócitos:**

Culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir de cerebelos de ratos Wistar recém-natos (Biotério do departamento de anatomia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) conforme o procedimento previamente descrito (Martinez & Gomes, 2002 – **Anexo1**). Após terem sido decapitados, seus cerebelos foram removidos e suas meninges cuidadosamente retiradas. Os tecidos foram lavados em tampão salina fosfato (PBS-Glicose: 8% de NaCl; 5,36% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,4% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,9% de KCl com glicose a 0,6%) e dissociados mecanicamente, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, em células únicas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Invitrogene), suplementado com o nutriente F-12 e 10% de soro fetal bovino (Invitrogene). A densidade de plaqueamento utilizada foi de  $3 \times 10^5$  células por poço de 16mm de diâmetro e de  $4 \times 10^6$  células por garrafa de 25cm<sup>3</sup>. As culturas foram incubadas à 37<sup>0</sup>C em uma atmosfera com ar a 95% umedecido e CO<sub>2</sub> 5%. O meio de cultura foi trocado 24h depois e subseqüentemente a cada 3 dias até as culturas atingirem a confluência, o que geralmente ocorre após 7-10 dias.

#### **3.2 Cultura de glia de Bergmann:**

Para obtenção de culturas predominantemente compostas por glia de Bergmann, utilizou-se o protocolo previamente descrito por Cambray-Deakin (Cambray-Deakin, 1996). Para isso, cerebelos de animais com sete dias pós-nascidos foram dissecados e suas meninges removidas, após o que os tecidos foram fragmentados em pequenos pedaços e finalmente expostos a tampão contendo 0,003g/mL de BSA, 0,014M de glicose, 0,075M de MgSO<sub>4</sub> e 0,25mg/mL de tripsina por 15 min à 37°C. Posteriormente,

a atividade de tripsina foi inibida com soro fetal bovino e os tecidos foram centrifugados a 500 g por 30 segundos. Na fase seguinte, os tecidos foram dissociados mecanicamente em células isoladas com uma pipeta Pasteur em um tampão contendo 0,003g/mL de BSA, 0,014M de glicose e 0,081M de MgSO<sub>4</sub>. Essa suspensão celular foi então centrifugada por 10 minutos a 250 g através de um outro tampão formador de gradiente para separação das subpopulações celulares, contendo 0,043g/mL de BSA, 0,014M de glicose e 0,075M de MgSO<sub>4</sub>. O precipitado foi então ressuspensão em meio Neurobasal suplementado com 2% de B27 (Invitrogene) e 25.000 células foram plaqueadas por poço em placas de 96 poços, previamente revestidas com poliornitina (1,5 µg/ml). As culturas foram mantidas no meio citado acima à 37<sup>0</sup>C em uma atmosfera com ar a 95% umedecido e CO<sub>2</sub> a 5%. Após 24 horas de cultivo, o meio foi trocado de acordo com as diferentes condições de tratamento descritas adiante. Esse protocolo originou cultura mista composta majoritariamente por células GFAP e beta-tubulina III positivas em uma razão 3:7. Quase todas as células GFAP-positivas exibiram o fenótipo típico de glia radial e apresentaram marcação por imunocitoquímica positiva para anticorpos anti-GLAST, como esperado para subtipos de glia de Bergmann (Yamada et al. 2002).

### **3.3 Culturas primárias de neurônios e co-culturas:**

Culturas neuronais foram preparadas a partir de cerebelos derivados de embriões de ratos Wistar de 19 dias (E19) como já descrito previamente (Martinez & Gomes, 2002, **Anexo 1**). As células foram dissociadas dos cerebelos e  $1 \times 10^5$  células plaqueadas em lamínulas previamente tratadas com poliornitina (1.5µg/mL, MW 41,000, Sigma) em meio condicionado (descrito no item 3.5). Para ensaios de co-cultura, os neurônios foram plaqueados sobre monocamadas gliais tratadas ou não previamente com T3,

como descrito no item 3.4). As co-culturas foram mantidas por 24 horas em meio DMEM F-12 sem soro, à 37°C, numa atmosfera úmida de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.4 Tratamento com T3 e EGF:**

Após atingirem a confluência, as culturas gliais foram lavadas extensivamente com DMEM/F12 isento de soro e incubadas por mais 24h em meio sem soro. Após esse período, as células foram tratadas com 50nM de 3-3'-5 triiodo-L-tironina (T3, Sigma) e/ou 10ng/mL de EGF (Invitrogene) em DMEM/F12 por 3 dias. As culturas controle foram mantidas em DMEM-F12 sem soro com trocas de meio equivalentes às tratadas com T3/EGF. As culturas foram mantidas nas condições já descritas de temperatura e ambiente.

#### **3.5 Preparo do meio condicionado (MC):**

O meio condicionado foi preparado como previamente descrito (Martinez & Gomes, 2002, **Anexo 1**). Após o terceiro dia de tratamento com T3, as culturas foram mantidas por dois dias sem troca de meio e o meio condicionado foi coletado. As culturas não tratadas (controle) foram submetidas a trocas de meio equivalentes às tratadas, como dito anteriormente. Posteriormente, o meio centrifugado a 500g por 10 minutos foi usado imediatamente ou armazenado em alíquotas à -20°C para uso posterior. O meio condicionado por astrócitos previamente tratados por T3 (MCT3) foi demonstrado ser desprovido de T3 por radioimunoensaio, como já descrito previamente (Trentin et al., 1995).

#### **3.6 Ensaios de anticorpos neutralizantes e de inibição de vias de sinalização:**

Para ensaios com anticorpos neutralizantes, o meio condicionado astrocitário ou o meio Neurobasal acrescido de EGF foram pré-incubados com o anticorpo neutralizante anti-EGF (Santa Cruz, CA, 10 µg/mL) por 2 horas à 37°C. Após isso, esses meios foram usados no cultivo das culturas nas condições descritas adiante.

Para os ensaios usando inibidores de vias de sinalização, após atingirem a confluência, as monocamadas de astrócitos foram tratadas simultaneamente com T3 ou EGF nas concentrações já descritas e inibidores específicos das vias de sinalização por 3 dias, de acordo com o protocolo já descrito para o tratamento hormonal. De forma a prevenir uma ação direta dos inibidores sobre os neurônios nos ensaios de co-culturas, o meio contendo os inibidores foi trocado imediatamente antes do plaqueamento dos neurônios e as co-culturas foram mantidas por 24 horas. Alternativamente, para ensaios de inibição de vias em culturas neuronais, de glia de Bergmann ou de explantes, os inibidores foram adicionados ao meio de cultivo dos neurônios. Os seguintes inibidores foram usados: PD98059, inibidor específico da MAPK (50µM); Genisteína, inibidor de tirosinas-quinase (2,5µM); LY294002, inibidor específico da PI3K (5µM); bis-tirosfostina, um inibidor potente e específico do receptor de EGF (EGFR) (500nM); KT5720, um inibidor específico da proteína quinase-A (400nM); Staurosporina, inibidor de proteína quinase C (1nM). Todos os inibidores foram comprados de Calbiochem (La Jolla, CA) e dissolvidos em metil-sulfóxido (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, Sigma).

### **3.7 Culturas de explantes:**

As culturas de explantes foram realizadas conforme o protocolo previamente descrito (Hockberger et al., 1987). Cerebelos obtidos de ratos Wistar de 7 dias pós-nascidos tiveram suas meninges removidas e foram em seguida fragmentados em pedaços de cerca de 1 mm de diâmetro, os quais foram plaqueados no centro de placas

de cultura de 96 poços, previamente revestidas com poli-L-lisina (peso molecular = 389.000; 20µg/mL) e laminina (40µg/mL - Invitrogene). Os explantes foram deixados por 40 minutos na presença de mínima quantidade de meio, de forma a permitir adesão adequada dos mesmos ao substrato e, após isso, foram cobertos com meio de cultura Neurobasal acrescido do suplemento B27 apenas ou: 1) na presença de EGF (10ng/mL), 2) de TGF-β (10ng/mL), 3) em presença dos inibidores de vias de sinalização descritos adiante, ou na presença de meio condicionado por astrócitos. Após isso, as culturas foram mantidas nas mesmas condições descritas para as culturas astrocíticas primárias.

### **3.8 Ensaios de injeção de fatores *in vivo*:**

Para ensaios de injeção de fatores de crescimento *in vivo*, animais de sete dias pós-natal receberam 2 injeções em dias consecutivos de EGF (100ng/mL) ou salina na cisterna magna e simultaneamente injeções intra-peritoneais do análogo de timidina 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU; Sigma, 50mg/Kg, dissolvido em NaOH a 0,007%) a cada 12 horas por 2 dias consecutivos. Após 60 horas da primeira injeção, os animais foram anestesiados e perfundidos com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1M em pH 7,4. Seus cerebelos foram então removidos, crioprotégidos por imersão em sacarose a 20% em tampão fosfato e então processados em criostato em secções de 10 µm, que foram coletadas em lâminas revestidas por poli-L-lisina, para posterior marcação por imunohistoquímica.

### **3.9 Imunocitoquímica:**

A técnica de imunocitoquímica utilizada foi a descrita por Gomes e colaboradores (1999). As células foram lavadas e fixadas por 3 minutos (para marcação de proteínas de matriz extracelular) ou por 20 minutos (para marcação de proteínas de citoesqueleto)

com paraformaldeído 4%, sacarose 4% (Reagen Quimibrás Indústrias Químicas SA, Rio de Janeiro, RJ). Posteriormente, as células foram lavadas extensivamente com PBS, permeabilizadas com PBS Triton X-100 0,2% por cinco minutos (para marcação de proteínas de citoesqueleto). Para ensaios onde a peroxidase seria revelada, a atividade endógena de peroxidase foi abolida com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% por 15 minutos seguida de extensas lavagens com PBS. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS/BSA 5% ou soro normal de cabra 10% por 30 minutos. As células foram incubadas por 12 horas à 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti  $\beta$ -tubulina III feito em camundongo (Promega Co, Madison, WI; diluição 1:1000); anti-BrdU feito em rato (Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, NY; diluição 1:500); anti GFAP feito em camundongo (Promega Co, Madison, WI; diluição 1:100); anti EGFR feito em coelho (Santa Cruz, Santa Cruz, CA; diluição 1:50) anti-caspase-3 ativada feito em rato (Cell Signaling, Beverly, MA; diluição 1:50); anti-laminina feito em coelho (Sigma, diluição 1:30) e anti-fibronectina feito em coelho (Dako, Carpinteria, CA, diluição 1:200). Após a reação com os anticorpos primários, as células foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente com anticorpos secundários conjugados apropriados: anti-IgG de coelho conjugado a Cy3 (Sigma, diluição 1:3000); anti-IgG de rato conjugado a Cy3 (Sigma, diluição 1:5000) e anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Amersham, plc diluição 1:200). A atividade de peroxidase foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (Sigma). Os controles negativos foram criados através da omissão dos anticorpos primários durante o processo. As preparações foram montadas em N-propil galacto diluído em Xilol a 20% no caso dos ensaios de fluorescência e, no caso dos ensaios com peroxidase, as amostras foram desidratadas em um gradiente de etanol e as lamínulas montadas em Entellan (Merck).



### **3.10 Análise morfométrica dos neurônios, contagem de células e análise estatística:**

Os neurônios marcados com o anticorpo anti- $\beta$ -tubulina III foram fotografados em microscópio Nikon (Nikon Eclipse TE300). Os números de neuritos e o seu comprimento total foram analisados pelo software Sigma Scan Pro (Jandel Scientific). O comprimento total de neuritos foi quantificado através da soma das medidas de todos os neuritos de um dado neurônio. Neurônios aneuríticos foram quantificados como zero de neuritogênese. Em cada experimento (pelo menos 3 experimentos independentes foram feitos), cerca de 100 neurônios por poço, englobando campos escolhidos aleatoriamente, foram analisados. Os dados foram armazenados, e as análises estatística e gráfica foram feitas através do uso do software Microsoft Excel versão 7.0.

Em ensaios de contagem do número de células, as culturas foram marcadas com os anticorpos de interesse e as células positivamente marcadas foram contadas em microscópio Nikon. Pelo menos 5 campos foram contados por poço. Os experimentos foram feitos em triplicata e cada resultado representa a média de pelo menos 3 experimentos independentes. A análise estatística foi feita por ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey quando  $p < 0,05$ .

### **3.11 Ensaio de viabilidade com azul de Trypan:**

Após 2 e 24 horas, as co-culturas de astrócitos e neurônios ou apenas culturas de neurônios foram incubadas na presença de solução de azul de Trypan a 0,4% em PBS por 1 minuto, e o número de células viáveis foi quantificado. Pelo menos cinco campos por poço foram contados. Os experimentos foram feitos em triplicata.

### **3.12 Ensaio de apoptose:**

As coculturas de astrócitos e neurônios e as culturas puras de neurônios foram marcadas por imunocitoquímica com o anticorpo contra o marcador de apoptose caspase ativa-3, como já descrito acima. Pelo menos cinco campos foram contados por poço. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.13 Incorporação e detecção do bromodeoxiuridil:**

As coculturas de astrócitos e neurônios foram incubadas por 2 ou 24h na presença de 1µg/mL de 5-bromo-2'deoxiuridina (BrdU; Sigma). A detecção do BrdU nas culturas ou nos tecidos foi realizada conforme descrito previamente (Gomes et al., 1999). Após a incubação com BrdU, as células e os tecidos foram fixados com paraformaldeído à 4% por 20 min. Após isso, foram lavados duas vezes com água destilada e depois incubados duas vezes com HCl à 50°C por 15 minutos. Posteriormente, as preparações foram lavadas duas vezes com tampão borato a 0,1M por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas três vezes com PBS e marcadas com os anticorpos anti-BrdU e, em certos casos, com anti-β-tubulina III (como descrito acima para imunocitoquímica) e no caso dos tecidos, uma incubação com DAPI foi realizada por 30 minutos. Os tecidos foram então visualizados em microscópio Nikon. Nas culturas, o índice mitótico foi obtido através da contagem da percentagem de células marcadas com os dois anticorpos simultaneamente em relação ao número total de células marcadas positivamente para β-tubulina III.

### **3.14 Análise da migração neuronal *in vivo*:**

Nos cortes histológicos, as células migratórias foram quantificadas como sendo as células marcadas positivamente para BrdU nas camadas do córtex cerebelar localizadas internamente à EGL. O número de células foi comparado entre as diferentes

situações para cada lóbulo cerebelar separadamente, tendo-se em vista as diferentes taxas de mitose entre esses lobos.

### **3.15 Análise da migração neuronal *in vitro*:**

Nos ensaios de explantes, a migração foi avaliada pela observação das preparações em microscopia de contraste de fase. A migração neuronal foi quantificada como o raio máximo de migração dos neurônios a partir das bordas do explante. Em cada explante, quatro raios de migração foram quantificados, correspondendo cada um deles a um quarto da circunferência do explante. Para ensaios de cinética, os mesmos explantes foram fotografados em intervalos de tempo definidos e seguindo o mesmo protocolo.

### **3.16 Análise da morfologia da glia de Bergmann:**

Nas culturas isoladas de glia de Bergmann, a extensão dos prolongamentos gliais das células de glia individualizadas foi tomada a partir da mensuração do comprimento máximo de cada célula, entre as extremidades dos dois processos celulares mais extensos. Pelo menos 100 células foram quantificadas em cada situação.

## **4 Resultados:**

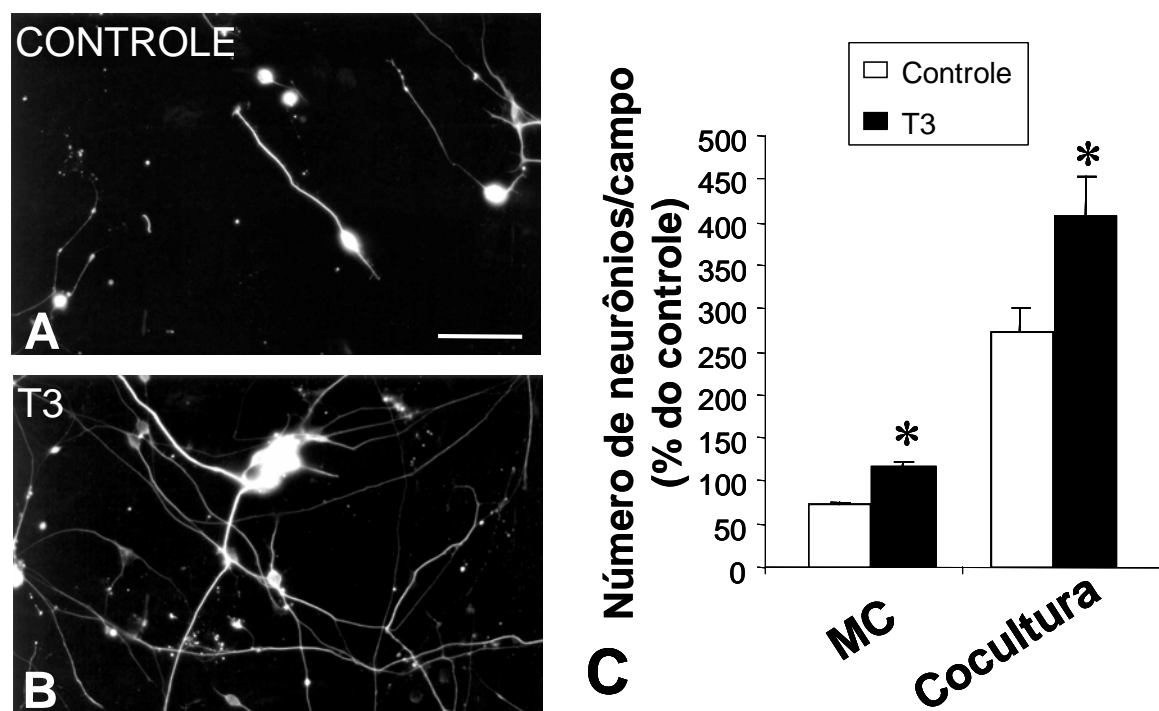
### **4.1 Primeira parte: ASTRÓCITOS E EGF COMO MODULADORES DA PROLIFERAÇÃO DE PRECURSORES GRANULARES:**

Esses resultados foram publicados no artigo *Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase a pathway* em anexo (**Anexo 1**) nessa tese.

#### **4.1.1 Astrócitos tratados com T3 aumentam a população neuronal:**

Conforme citado previamente, astrócitos cerebelares tratados com T3 induzem a proliferação de precursores cerebelares (Gomes et al. 1999). Esse efeito é mediado por fatores solúveis secretados pelos astrócitos em resposta ao estímulo hormonal. O contato celular é capaz de modular a proliferação em diversos sistemas celulares (Frost et al., 1999; Garcion et al., 2001; Haack & Hynes, 2001), sendo assim optamos por investigar o papel desse contato nesse evento. Para isso, os precursores neuronais cerebelares foram cultivados sobre monocamada astrocitária tratada previamente com T3. Após 24 horas, o número total de neurônios foi quantificado. O cultivo dos neurônios cerebelares sobre a monocamada tratada com T3 provocou um aumento na população neuronal de cerca de 60%, uma magnitude semelhante àquela observada quando do cultivo dos neurônios em MCT3 apenas (**Figura 7**). Por outro lado, o número absoluto de neurônios nos ensaios de cocultura demonstrou-se muito superior (quatro vezes o valor) aos dos ensaios com meio condicionado. Esses resultados

sugerem que o contato neurônio-astrocítico poderia cooperar com os fatores solúveis astrocitários no efeito proliferativo sobre os precursores neuronais.



**Figura 7:** Astrócitos cerebelares tratados com T3 aumentam a população neuronal. Neurônios cerebelares obtidos a partir de ratos E19 foram cultivados por 24 horas sobre monocamadas astrocitárias controle (controle; A) e tratadas com hormônio (T3; B) ou em meio condicionado derivado dessas células. Posteriormente, o número de células  $\beta$ -Tubulina III-positivas foi quantificado (C). A co-cultura ou o MCT3 promoveram grande aumento na população neuronal. Uma densidade maior de neurônios foi vista em monocamadas previamente tratadas com T3 (B). \*  $P < 0,001$ . A barra de calibração corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.2 Astrócitos tratados com T3 não modulam a viabilidade neuronal:

Com base nos resultados obtidos acima, duas hipóteses poderiam ser formuladas para o aumento na população neuronal induzido por astrócitos: 1) aumento na proliferação, através do qual os precursores neuronais seriam induzidos à proliferação, ou, alternativamente; 2) aumento na sobrevivência neuronal. De forma a avaliar essas hipóteses, a viabilidade celular foi analisada por ensaios com azul de trypan, e a

proliferação através da incorporação e detecção do análogo de timidina, BrdU e a morte celular por imunocitoquímica para caspase-3 ativada.

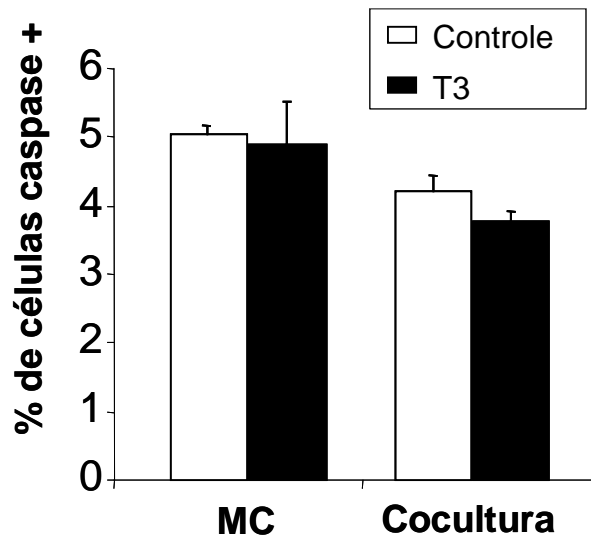
Os ensaios com azul de trypan nas culturas não demonstraram diferenças significativas de viabilidade entre os neurônios cultivados sobre astrócitos tratados ou não com T3 após 2 ou 24 horas de cultivo (**Tabela 1**). Um resultado similar foi obtido com neurônios cultivados na presença de meio condicionado. De forma a excluir completamente a modulação da morte neuronal como um mecanismo do aumento da população neuronal induzido por astrócitos, foi avaliado o número de células expressando caspase-3 ativada (um marcador de apoptose) após 24 horas de cultura. Conforme demonstrado na **Figura 8**, não houve diferença no número de neurônios marcados positivamente para caspase-3 ativada nas diferentes situações de cultivo, após 24 horas de cultura. Em todas as situações observamos aproximadamente 5% de células marcadas para caspase 3 ativada.

Esses dados, analisados em conjunto, sugerem que, ao menos em 24 horas de cultura, o principal evento envolvido no aumento da população neuronal (seja em situações de co-cultura quanto também em situações de cultivo no meio condicionado), não é a modulação da sobrevivência neuronal.

**Tabela 1:** *Efeito do meio condicionado astrocitário e da cocultura na sobrevivência de neurônios granulares*

	2 horas	24 horas
MCC	84% $\pm$ 10	68% $\pm$ 9
MCT3	83% $\pm$ 7	69% $\pm$ 5
CoC	71% $\pm$ 4	82% $\pm$ 3
CoT3	69% $\pm$ 7	85% $\pm$ 4

Neurônios cerebelares obtidos a partir de ratos E19 foram mantidos por 2 ou 24 horas em meio condicionado de astrócitos tratados (MCT3) ou não (MCC) com T3, ou sobre monocamadas astrocitárias tratadas (CoT3) ou não (CoC) com T3. A viabilidade celular foi avaliada a partir da coloração com azul de Trypan. Cinco campos foram contados por poço em cada experimento. Cada dado representa a média de três experimentos independentes realizados em triplicata (média e desvio padrão).  $P > 0,05$  para MCC-MCT3 e para CoC-CoT3, de acordo com o teste T de Student.

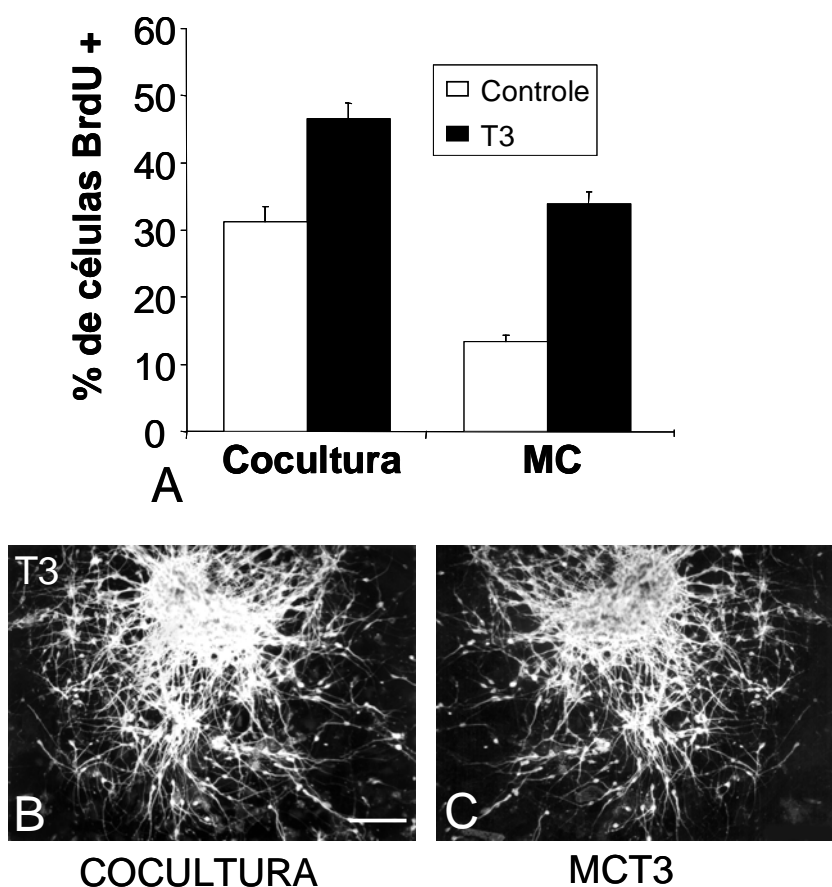


**Figura 8:** *Astrócitos tratados com T3 não modulam a apoptose neuronal.* Neurônios cerebelares obtidos a partir de ratos E19 foram cultivados por 24 horas sobre monocamadas astrocitárias tratadas ou não com hormônio ou em presença de meio condicionado astrocitário apenas. Posteriormente, as células com marcação positiva para caspase-3 ativada foram quantificadas. O número de células apoptóticas foi semelhante em todas as condições ( $P > 0,05$ ).

#### 4.1.3 Astrócitos tratados com T3 promovem o aumento na população neuronal através da indução da proliferação neuronal:

De forma a avaliar a proliferação neuronal, foram realizados ensaios de incorporação de BrdU. Como demonstrado na **Figura 9A**, observamos um aumento de 16% no número de células BrdU-positivas em co-culturas de neurônios sobre monocamadas astrocitárias após 24h. Enquanto MCT3 elevou a proliferação neuronal cerca de 2,6 vezes, o contato com astrócitos tratados com T3 elevou essa população em 1,5 vezes. Todavia, na situação controle, a incorporação de BrdU demonstrou ser 3 vezes mais elevada nas co-culturas (31%) do que no cultivo em MCC (13%). O cultivo

dos neurônios sobre monocamadas astrocitárias potencializou a proliferação induzida por MCT3 (47% X 34%). É interessante notar que, nas duas condições os neurônios apresentaram clara tendência à formação de aglomerados celulares (**Figuras 9B e C**), uma condição previamente associada à atividade proliferativa (Freire et al., 2002). Esses dados em conjunto demonstram que: 1) a co-cultura por si só já promove a proliferação neuronal e, 2) o contato celular aumenta a proliferação induzida por MCT3.



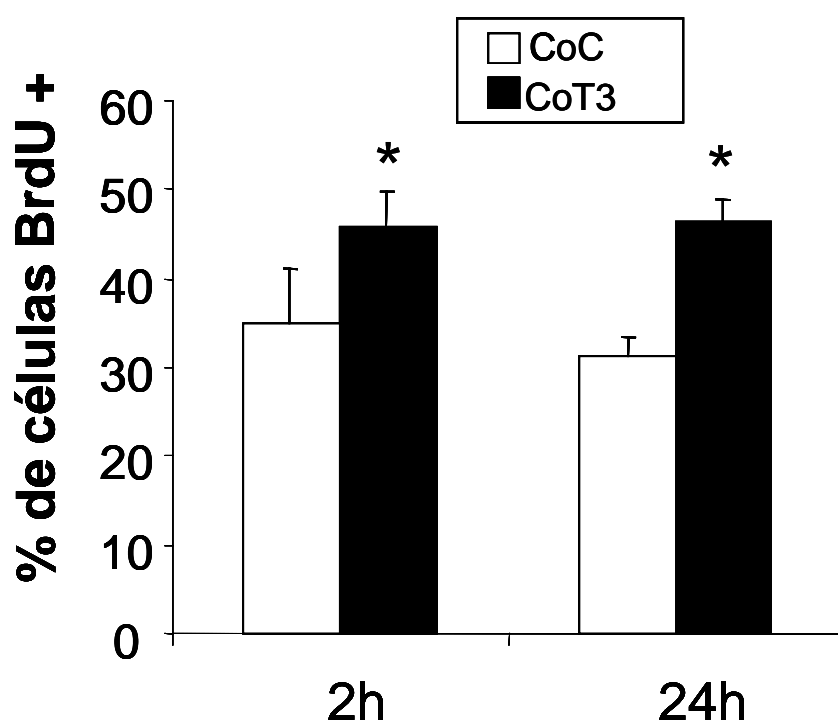
**Figura 9:** O co-cultivo de neurônios com astrócitos tratados com T3 induz a proliferação neuronal. Neurônios cerebelares obtidos a partir de ratos E19 foram cultivados por 24 horas sobre monocamadas astrocitárias tratadas (T3) ou não (controle) com T3, ou em meio condicionado na presença de BrdU (1 µg/mL). Após isso, as células foram fixadas e submetidas a imunomarcação dupla para  $\beta$ -tubulina III e BrdU. Cinco campos foram contados por cada poço do experimento. Cada barra representa a média de três experimentos independentes realizados em triplicata; \*P < 0,001). A: O co-cultivo de neurônios e astrócitos e o MC induziram a proliferação neuronal. Notar a formação de *clusters* neuronais nas situações de co-cultivo com astrócitos tratados com T3 (B) e no cultivo em MCT3 (C). Escala = 50 µm.



#### 4.1.4 A proliferação neuronal induzida pela co-cultura com astrócitos previamente tratados com T3 (CoT3) é secundária ao estímulo à entrada dos precursores neuronais no ciclo de divisão celular:

O estímulo proliferativo induzido por CoT3 em 24 horas de cultura poderia ser resultado de dois diferentes fenômenos sobre a população precursora neuronal: 1) estímulo à entrada dessas células no ciclo de divisão celular ou, alternativamente; 2) promoção da sobrevivência dos precursores proliferativos. De forma a discriminar essas hipóteses, a proliferação e a viabilidade celulares foram avaliadas em um momento precoce de cultura, após 2 horas. Nessas condições, já verificamos um aumento de 20% na proliferação neuronal, avaliado pela incorporação de BrdU (**Figura 10**), que não foi acompanhado por uma modulação na viabilidade celular (**Tabela 1**). Resultados semelhantes foram encontrados em ensaios de cultivo em meio condicionado apenas (dados não mostrados).

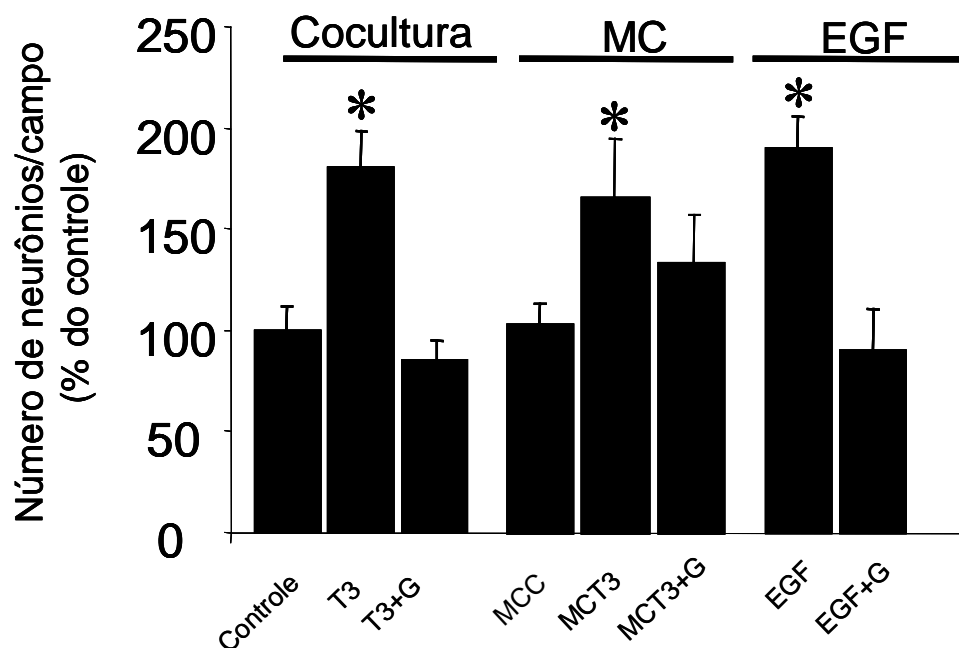
Esses resultados sugerem que a proliferação induzida por MCT3 e pela co-cultura se dá por um estímulo à entrada dos precursores neuronais no ciclo de divisão celular e não por um aumento na viabilidade desses precursores.



**Figura 10:** *O cocultivo de precursores neuronais com astrócitos tratados com T3 induz a proliferação neuronal.* Precusores cerebelares obtidos a partir de ratos E19 foram cultivados por 2 ou 24 horas sobre monocamadas astrocitárias controle ou tratadas previamente com T3 (T3), na presença de BrdU (1 µg/mL). Posteriormente, as células foram fixadas e submetidas à marcação dupla para β-tubulina III e BrdU. Cinco campos foram contados por poço do experimento. Cada barra representa a média de três experimentos independentes realizados em triplicata \*P < 0,001. Notar o aumento na incorporação de BrdU após 2 horas de cultura sobre monocamadas tratadas com T3.

#### **4.1.5 A proliferação neuronal induzida por T3 é mimetizada por EGF e envolve a ativação de tirosina-cinases:**

Astrócitos cerebelares tratados por T3 induzem a proliferação neuronal predominantemente através da secreção de EGF (Gomes et al. 1999), cuja ação é mediada pela ativação de um receptor de membrana que tem como passo fundamental a auto-fosforilação de seus resíduos de tirosina-cinase. Desta forma, avaliamos o papel do contato celular nesse evento através do uso do inibidor geral de tirosinas-cinase, genisteína. Conforme evidenciado na **Figura 11**, a adição de EGF (10ng/mL) a neurônios em cocultura mimetizou os efeitos de MCT3 ou de astrócitos tratados com T3 no aumento da população neuronal. A adição de genisteína às diferentes condições reverteu completamente o efeito de T3 ou do MCT3 (**Figura 11**), não observamos efeito da genisteína nas situações controle (dados não mostrados). Em conjunto, esses dados sugerem um papel primordial da via de tirosina-cinase na proliferação neuronal induzida tanto nas situações de cultivo em MCT3 apenas, quanto nas situações de cocultura.

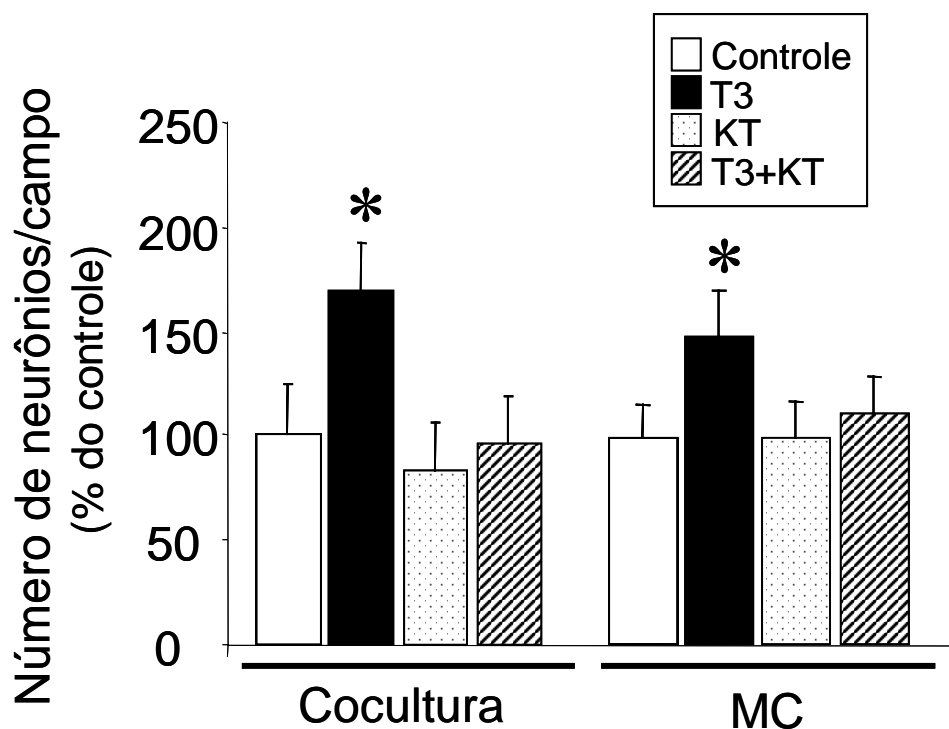


**Figura 11:** Efeito da inibição de tirosinas-cinase sobre a proliferação neuronal. Precursores neuronais cerebelares obtidos a partir de ratos E19 foram cultivados na presença de MCT3 ou sobre monocamadas astrocitárias tratadas previamente com T3 ou em presença de EGF (10 ng/mL) apenas ou simultaneamente com o inibidor de tirosina-cinase genisteína (2,5  $\mu$ M). Após 24 horas de cultura, as células marcadas positivamente para  $\beta$ -tubulina III foram quantificadas. Notar que a adição de genisteína inibiu completamente o incremento no número de neurônios promovido por EGF, MCT3 ou pelos astrócitos tratados com T3. Esses inibidores não apresentaram efeito sobre as culturas-controle. \*  $P < 0,05$ .

#### 4.1.6 A proliferação neuronal induzida por T3 é mediada pela via de PKA:

Previamente, foi demonstrado que a proliferação induzida por MCT3 é potencializada pela ativação da via de PKA (Gomes et al., 1999). Esses resultados todavia não implicam totalmente essa via no processo, uma vez que não se demonstrou a esse tempo se a inibição dessa via seria também inibitória para a proliferação induzida por MCT3/EGF. Sendo assim, ensaios utilizando o inibidor da via de PKA, KT5720 (400nM), evidenciaram que o bloqueio na ativação dessa via inibiu completamente a proliferação neuronal induzida por MCT3 ou por astrócitos tratados com T3 (**Figura**

12). Esses resultados implicam, portanto, a mesma via de sinalização, isto é, a via de PKA, na proliferação induzida por MCT3 ou pelo contato celular.



**Figura 12:** A proliferação neuronal induzida por T3 é mediada por PKA. Neurônios cerebelares E19 foram cultivados na presença de MCT3 ou sobre monocamadas astrocíticas previamente tratadas com T3 apenas ou na presença do inibidor de PKA KT5720 (400 nM para MCT3 e 10  $\mu$ M para co-culturas). Após 24 horas de cultura, as células  $\beta$ -tubulina III positivas foram quantificadas. Notar que a adição do inibidor de PKA inibiu completamente o efeito dos astrócitos tratados com T3 ou de MCT3 no incremento no número de neurônios. Nenhum dos inibidores teve efeito significativo sobre as culturas controle. \* P < 0,05.

## 4.2 Segunda parte: ASTRÓCITOS E EGF COMO MODULADORES DA MIGRAÇÃO DE NEURÔNIOS GRANULARES:

Nessa parte, objetivamos estudar o parâmetro de migração neuronal cerebelar e a radialização da glia de Bergmann, bem como avaliar a eventual modulação pelos astrócitos desse fenômeno.

### 4.2.1 Astrócitos cerebelares tratados por T3 promovem a migração neuronal *in vitro*, através da secreção de fatores solúveis:

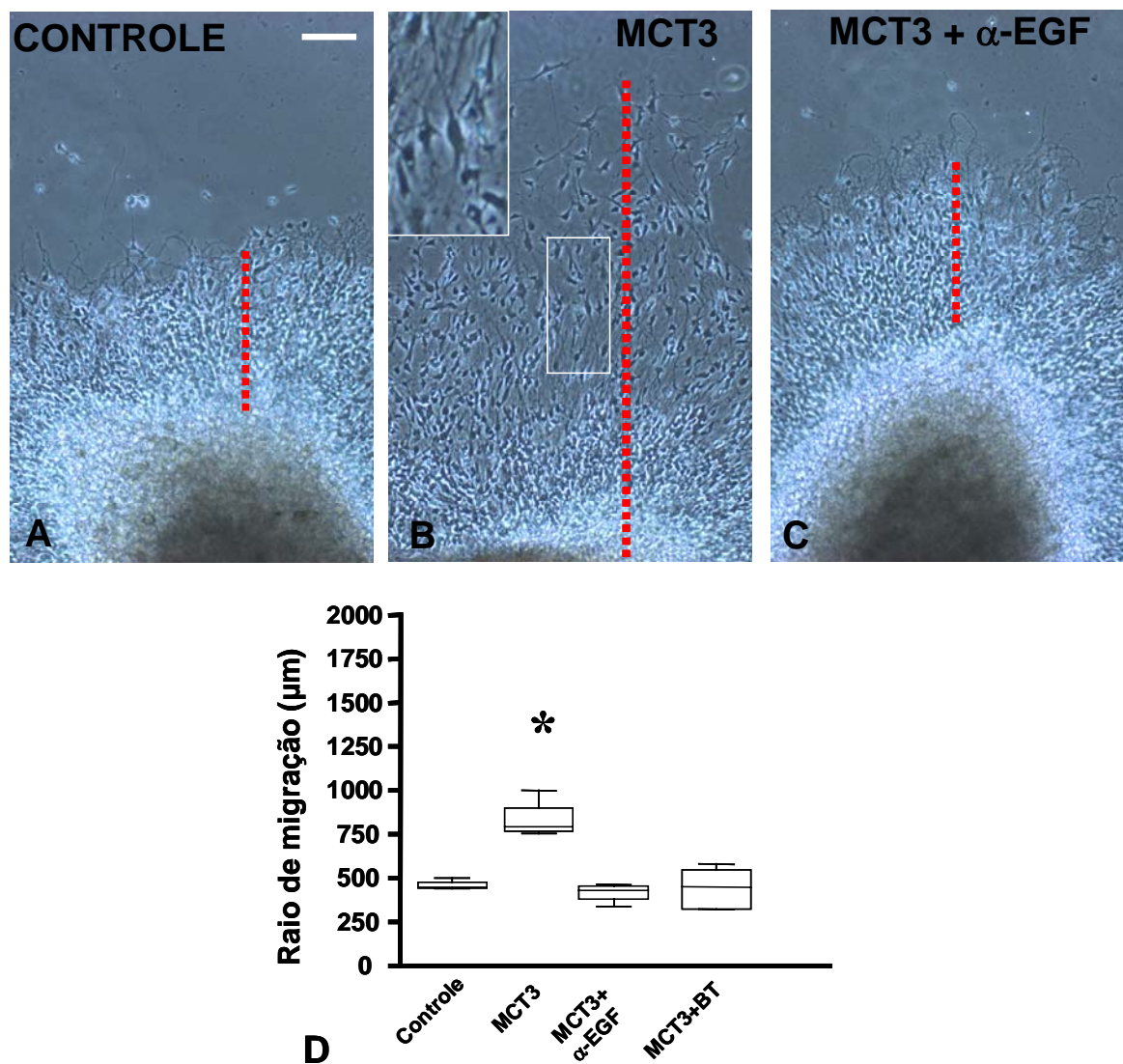
A migração de neurônios granulares no período pós-natal é um fenômeno crítico da morfogênese desse órgão, e que está severamente afetado no hipotireoidismo congênito (Lauder et al., 1974). Neurônios pré-migratórios da EGL expressam intensamente EGFR, e essa expressão só se torna menos significativa após essas células atingirem a IGL (Seroogy et al., 1995). Nossas evidências de que astrócitos tratados por T3 sintetizam EGF, juntamente com o fato de que essa molécula modula a migração neuronal em outras estruturas do SNC (Caric et al., 2001), nos levaram a investigar o papel de EGF e dos astrócitos como mediadores dos efeitos de T3 na migração cerebelar. Para isso, explantes cerebelares derivados de animais com sete dias pós-natais foram cultivados na presença de meio condicionado por astrócitos tratados ou não com T3 em um substrato de laminina, e o raio de migração neuronal foi aferido em diferentes tempos de cultivo. Os neurônios granulares cultivados em meio controle migraram cerca de 500µm a partir do explante em 48 horas, em um padrão semelhante ao observado na migração *in vivo*, seguindo fibras gliais radiais (Santiago et al., 2001). Quando cultivados na presença de MCT3, verificou-se um incremento importante (65 % - **Figura 13**, comparar **A** com **B** e medidas em **D**) na migração neuronal após 24 horas de

cultivo em MCT3, sugerindo, portanto que os fatores solúveis secretados por astrócitos cerebelares modulam esse parâmetro do desenvolvimento cerebelar.

#### **4.2.2 Astrócitos cerebelares tratados por T3 promovem a migração neuronal através da secreção de EGF:**

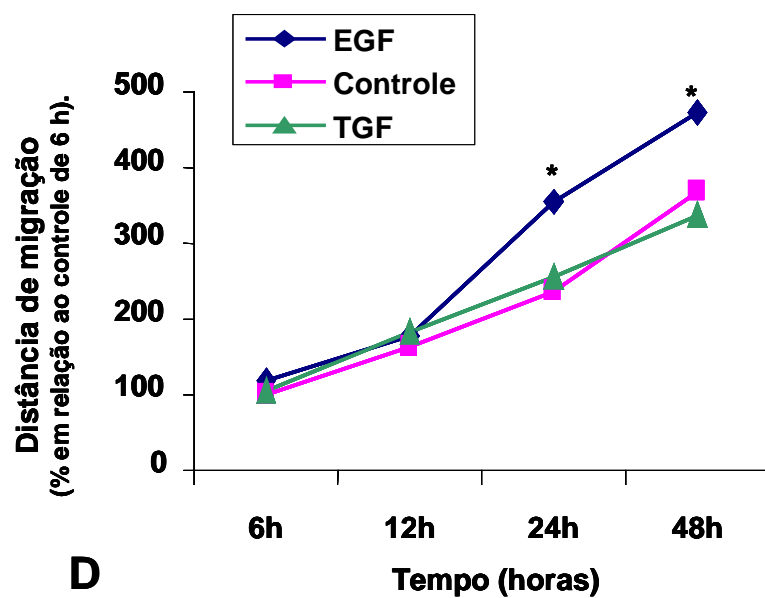
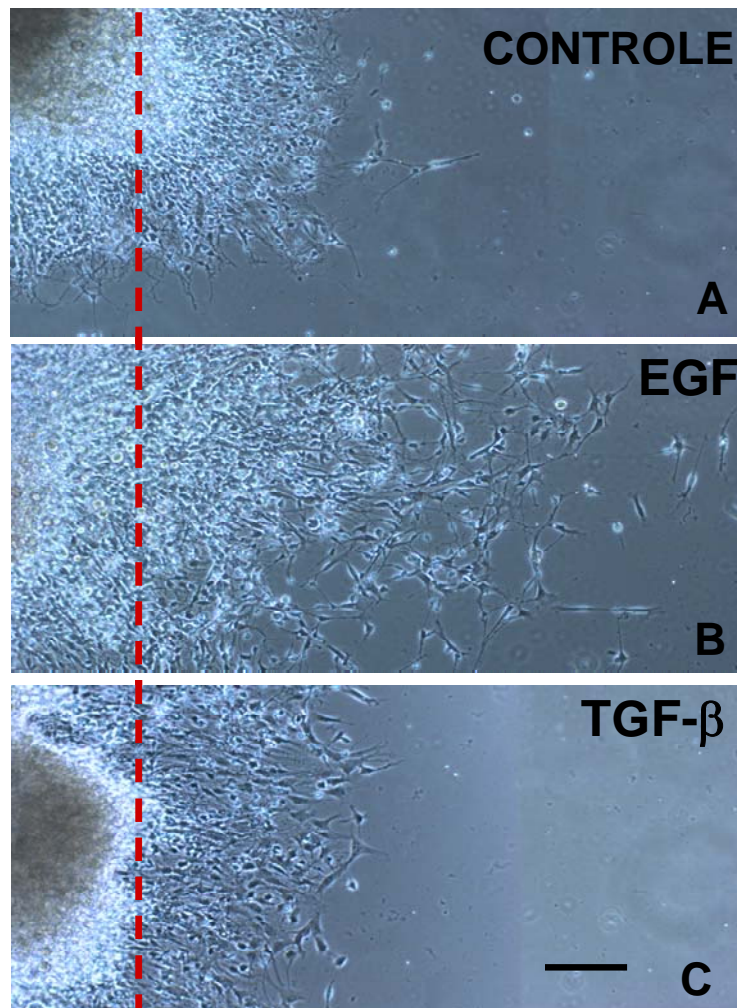
A partir dos dados observados previamente, procurou-se avaliar se, dentre os fatores solúveis presentes em MCT3, EGF seria o responsável pelo efeito migratório observado. Para isso, o MCT3 foi pré-incubado com anticorpo neutralizante para EGF ou com um inibidor específico da ativação de EGFR, bis-tirfostina (500nM). Como podemos observar na **Figura 13 (C e D)**, ambas moléculas foram igualmente eficazes em abolir o efeito migratório promovido por MCT3, sugerindo o papel primordial desse fator na promoção da migração neuronal.

Ainda corroborando os dados acima, o cultivo de explantes cerebelares na presença de EGF (10ng/mL) promoveu incremento na migração cerebelar similar ao promovido por MCT3, e já perceptível em 24 horas de cultura, conforme evidenciado por ensaios de cinética (**Figura 14A, B e D**). Poucos são os fatores de crescimento identificados como promotores de migração no SNC. Recentemente, o Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF- $\beta$ , do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*) foi demonstrado que induz a migração neuronal em córtex cerebral de roedores (Siegenthaler & Miller, 2004). Como pode ser observado na **Figura 14 (C e D)**, TGF $\beta$ 1 (10ng/mL) não foi capaz de induzir um incremento na migração cerebelar em nenhum dos intervalos de tempo estudados, o que reforça a especificidade do fenômeno observado em relação a EGF.



**Figura 13:** *Astrócitos cerebelares tratados com T3 promovem a migração neuronal pela secreção de EGF.* Explantes cerebelares obtidos a partir de ratos com 7 dias pós-nascidos foram plaqueados em superfícies previamente tratadas com poli-L-lisina e laminina na presença de meio condicionado astrocitário (MCC, A), meio condicionado de astrócitos previamente tratados com T3 (MCT3, B) ou deste último pré-incubado com anticorpo neutralizante para EGF (MCT3 +  $\alpha$ -EGF) ou do inibidor de EGFR, bis-tirfostina (MCT3 + BT). O detalhe em B destaca o padrão morfológico típico de neurônios migratórios. Após 48 horas, o raio máximo de migração foi aferido pela visualização dos explantes por microscopia de contraste de fase. A pré-incubação de MCT3 com anticorpo neutralizante para EGF ou bis-tirfostina inibiu o incremento

observado na migração neuronal. D: Análise quantitativa da distância máxima de migração neuronal de diversos explantes nas diferentes condições. \*  $P < 0,05$ . A barra de calibração corresponde a  $100\mu\text{m}$ .

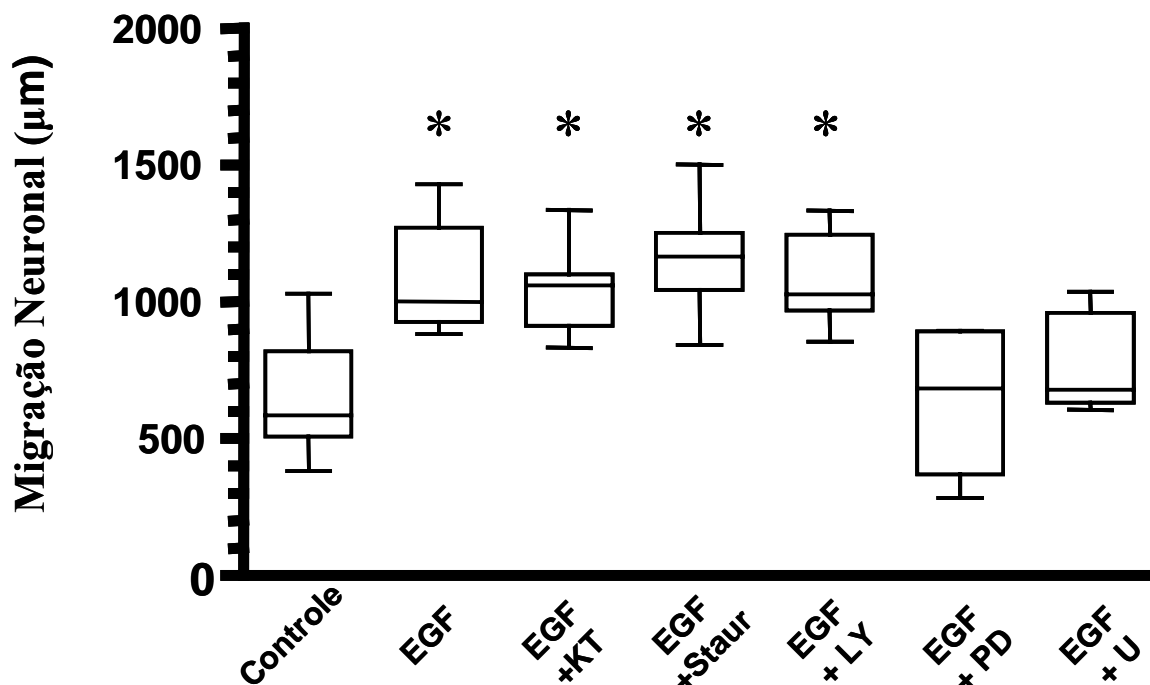




**Figura 14:** *Efeito dos fatores de crescimento, EGF e TGF $\beta$ 1 na migração neuronal cerebelar.* Explantes cerebelares obtidos de ratos com 7 dias pós-nascidos foram plaqueados e cultivados por 48h sobre superfícies previamente tratadas com poli-L-lisina e laminina na presença de meio de cultura neurobasal apenas (A) ou acrescido dos fatores solúveis EGF (B; 10ng/mL) ou TGF- $\beta$  (C; 10ng/mL). O raio máximo de migração de cada explante foi aferido pela visualização dos explantes por microscopia de contraste de fase em diferentes tempos de cultura . D: Análise quantitativa da distância máxima de migração neuronal de diversos explantes nas diferentes condições. \* P < 0,05. Apenas EGF induziu a migração de neurônios granulares. A barra de calibração corresponde a 100 $\mu$ m.

#### **4.2.3 EGF promove a migração neuronal através da ativação da via de sinalização de MAPK:**

A via de sinalização pela qual EGF induz a migração nesse modelo foi investigada através do emprego de diferentes inibidores de vias de sinalização conhecidas. Para isso, culturas de explantes cerebelares foram mantidas por 48 horas em presença de EGF e dos seguintes inibidores: PD98059 e U0126, inibidores específicos da MAPK (50 e 10 $\mu$ M, respectivamente); LY294002, inibidor específico da PI3K (5 $\mu$ M); KT5720, um inibidor específico da proteína cinase-A (400nM); Staurosporina, inibidor de proteína cinase C (1nM). Conforme evidenciado na **Figura 15**, a migração induzida por EGF só foi abolida quando empregados separadamente dois diferentes inibidores da via de MAPK. Esses dados sugerem, portanto, que EGF induz a migração neuronal cerebelar através da ativação da via de MAPK.



**Figura 15:** EGF promove a migração neuronal através da ativação da via de MAPK. Explantes cerebelares obtidos de ratos com 7 dias pós-nascidos foram plaqueados sobre superfícies previamente tratadas com poli-L-lisina e laminina na presença de meio de cultura neurobasal apenas (Controle) ou acrescido de EGF (EGF; 10ng) e diversos inibidores de vias de sinalização. Após 48 horas de cultivo, o raio máximo de migração de cada explante foi aferido pela visualização dos explantes por microscopia de contraste de fase. \*  $P < 0,05$ . PD98059 e U0126, inibidores específicos da MAPK (50 e 10 $\mu$ M, respectivamente); LY294002, inibidor específico da PI3K (5 $\mu$ M); KT5720, inibidor específico da proteína cinase-A (400nM); Staurosporina, inibidor de proteína cinase C (1nM).

#### 4.2.4 Astrócitos cerebelares tratados por T3 promovem o desenvolvimento da glia de Bergmann através da secreção de EGF:

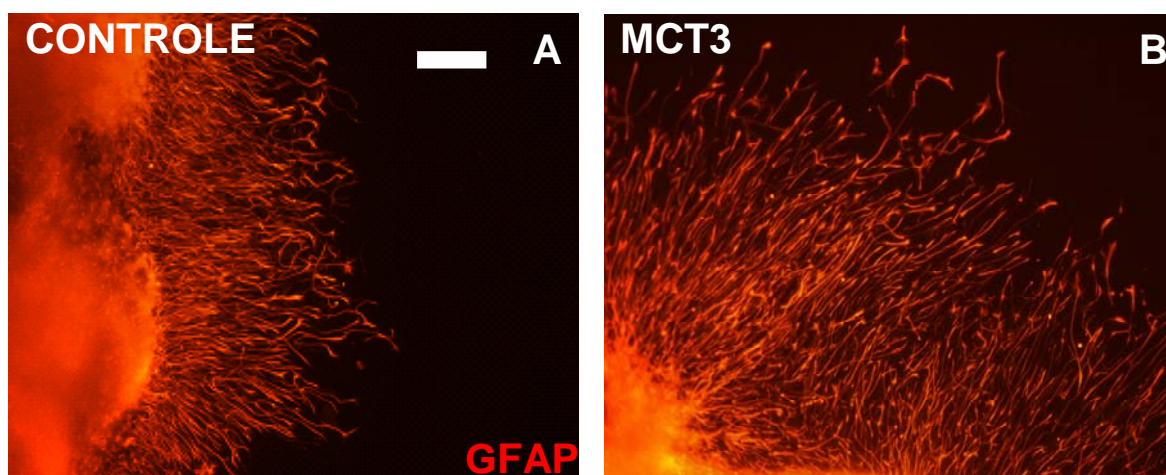
A glia de Bergmann possui papel primordial nos fenômenos migratórios dos neurônios granulares no período pós natal (Yamada & Watanabe, 2002). Essa capacidade migratória é dependente da morfologia radial desse subtipo celular,

característica esta que é perdida parcialmente quando cessado o período migratório no cerebelo (Yamada & Watanabe, 2002). A importância dessa morfologia é reforçada pela demonstração de que a capacidade migratória da glia de Bergmann adulta pode ser resgatada pela indução do fenótipo radial (Soriano et al. 1997). Sendo assim, procuramos avaliar se o mesmo mecanismo pelo qual o meio condicionado astrocitário promove a migração cerebelar está também envolvido na modulação da morfologia da glia de Bergmann. Para isso, avaliamos o fenótipo desse subtipo glial considerando a extensão dos prolongamentos celulares como um parâmetro de desenvolvimento dessas células.

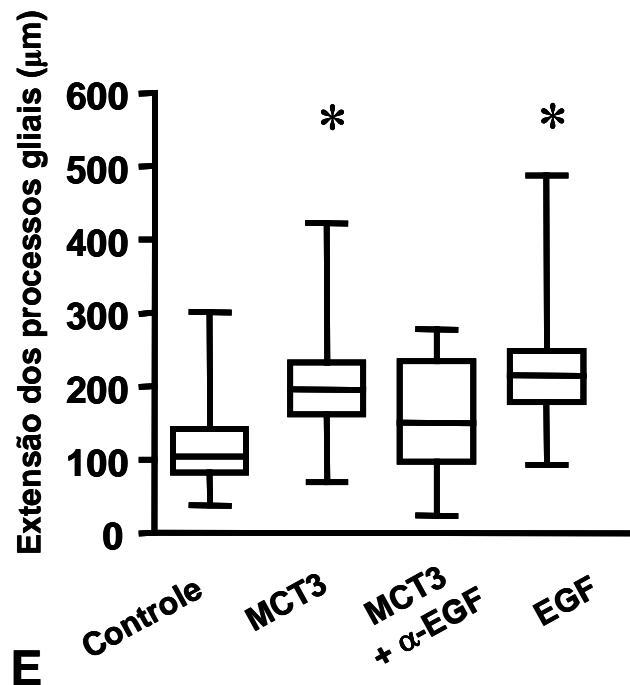
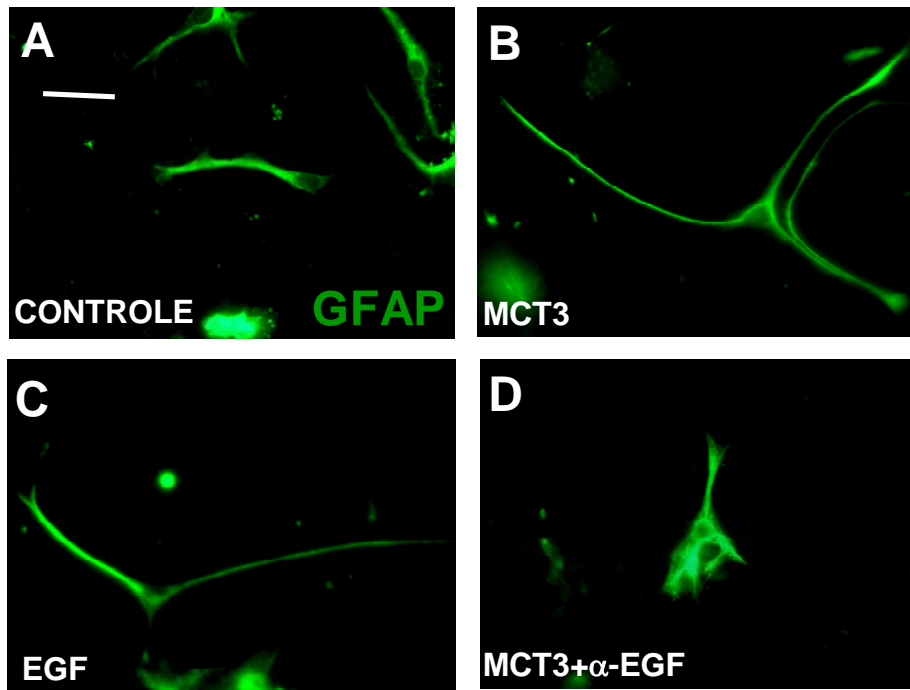
Como podemos observar na **Figura 16**, verificamos uma maior extensão dos prolongamentos gliais que se projetam a partir dos explantes cerebelares cultivados em MCT3 (**Figura 16B**). A hipótese de que MCT3 promoveria a extensão desses prolongamentos pôde ser melhor testada com o uso de um modelo de cultura celular, no qual o fato das células encontrarem-se dissociadas, favoreceu um estudo individualizado das mesmas (**Figura 17**). Utilizando-se esse modelo, verificou-se que enquanto em situações controle a maior parte das células com morfologia radial estendiam prolongamentos em torno de 100µm de tamanho total, o cultivo de células gliais em MCT3 promoveu um aumento na extensão dos prolongamentos gliais, em cerca de 90% (**Figura 17A, B e E**). Esses dados sugerem, portanto que astrócitos cerebelares tratados com T3 promovem o desenvolvimento da glia de Bergmann através da secreção de fatores solúveis.

Procuramos em seguida avaliar se o efeito promovido por MCT3 seria secundário a EGF, fator sabidamente presente nesse meio e principal responsável pela maioria dos fenômenos observados até o momento promovidos pelo meio condicionado. Para isso, utilizamos ensaios de inibição com anticorpos neutralizantes contra EGF.

Como podemos observar na **Figura 17D**, a pré-incubação de MCT3 com anticorpo neutralizante para EGF aboliram a capacidade desse meio em promover a extensão dos prolongamentos gliais. Em conjunto, esses dados demonstram que EGF é o principal mediador da radialização da glia de Bergmann no nosso modelo e sugerem fortemente que esse deva ser o mecanismo de ação pelo qual esse fator indiretamente promova a migração neuronal.



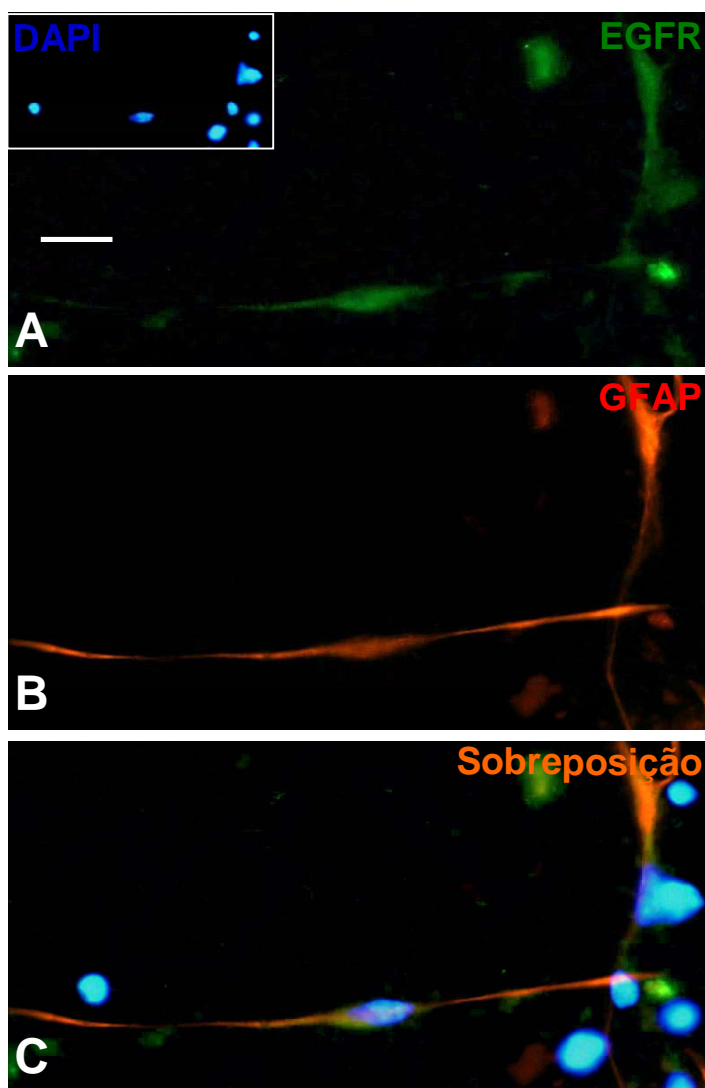
**Figura 16:** *O meio condicionado por astrócitos cerebelares tratados com T3 promove a maior extensão das fibras de glia de Bergmann.* Explantes cerebelares obtidos de ratos de 7 dias pós-nascidos foram plaqueados sobre superfícies previamente tratadas com poli-L-lisina e laminina na presença de meio de cultura neurobasal apenas (**A**, Controle) ou acrescido de MCT3 (**B**). Após 48 horas de cultivo, os explantes foram fixados e submetidos à imunocitoquímica para a proteína de citoesqueleto GFAP. A visualização dos explantes em microscopia de fluorescência revelou maior extensão dos prolongamentos gliais nos explantes cultivados em MCT3. A barra de calibração corresponde a 100 $\mu$ m.



**Figura 17:** *Astrócitos cerebelares tratados por T3 promovem a radialização da glia de Bergmann através da secreção de EGF.* Culturas de células dissociadas enriquecidas do subtipo glial de Bergmann foram realizadas a partir de cerebelos de ratos de 7 dias pós-nascidos. As células foram então cultivadas na presença de meio condicionado por astrócitos tratados (B, MCT3) ou não (A, MCC) com T3 ou na presença de EGF (C, 10ng/mL) ou MCT3 pré-incubado com anticorpo neutralizante para EGF (D, MCT3 + α-EGF). Subseqüentemente, as culturas foram fixadas e submetidas à imunocitoquímica para GFAP. E: Quantificação da extensão máxima dos prolongamentos gliais (μm \* P <0,05). EGF e MCT3 induzem um alongamento dos prolongamentos gliais. A barra de calibração corresponde a 50μm. Os dados são apresentados como mediana e quartis.

#### 4.2.5 A glia de Bergmann expressa receptores para EGF:

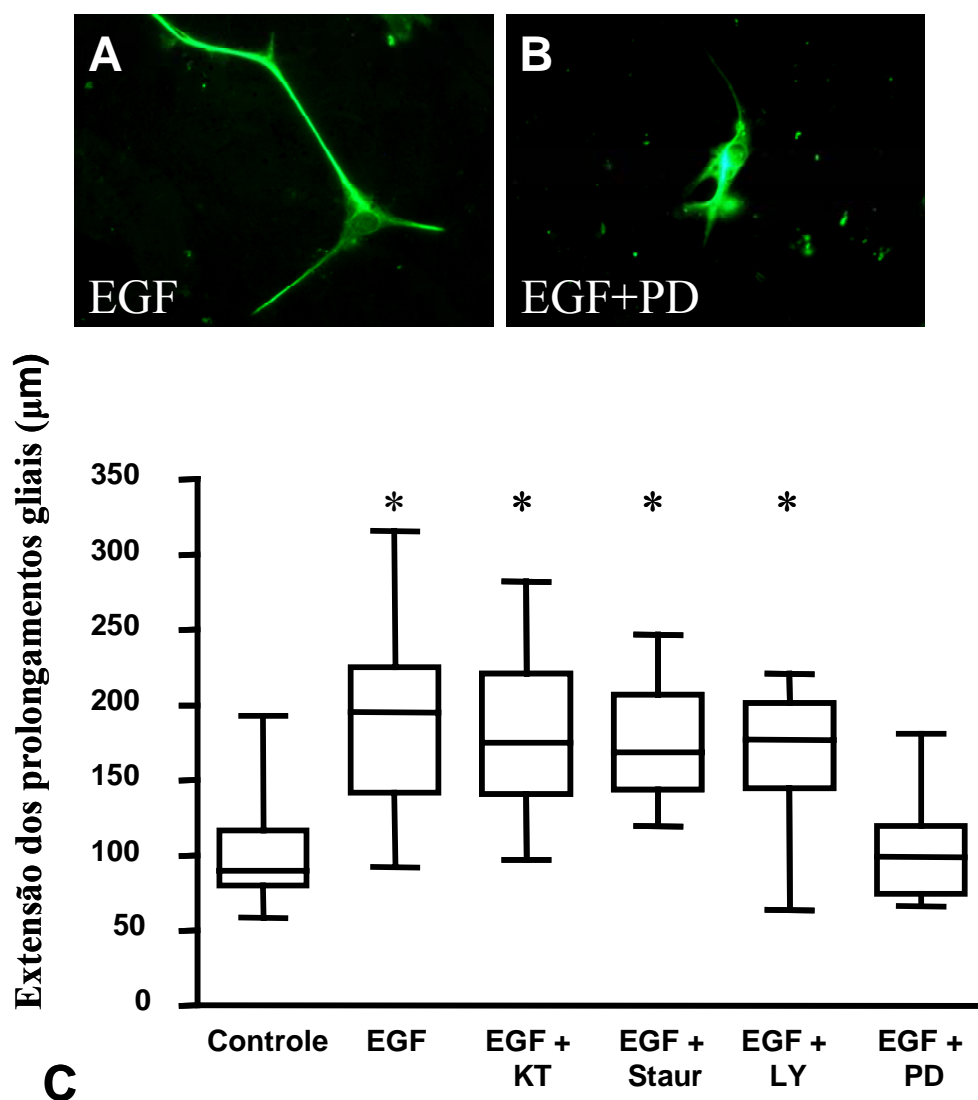
A observação de que os efeitos de MCT3 sobre a glia de Bergmann se dão via EGF encorajou-nos a avaliar a expressão de EGFR por este tipo celular. A análise por imunocitoquímica das células gliais dissociadas evidenciou a expressão típica de EGFR em uma distribuição predominantemente puntiforme, típica de receptores de membrana (**Figura 18**). Observamos ainda a intensa expressão de EGFR pelos neurônios granulares (dados não mostrados), dado corroborado por estudos prévios que analisaram a expressão desse receptor no cerebelo pós-natal (Seroogy et al., 1995). O fato da glia de Bergmann expressar EGFR *in vitro* sugere que essas células possam ser potenciais alvos da ação de EGF durante o desenvolvimento cerebelar.



**Figura 18:** *A glia de Bergmann expressa receptores para EGF.* Culturas de células dissociadas enriquecidas de subtipo glial de Bergmann foram preparadas a partir de cerebelos de ratos de 7 dias pós-nascidos. Após 24 horas de cultivo, as células foram fixadas com paraformaldeído e submetidas à imunocitoquímica para EGFR (**A**) e GFAP (**B**). A observação das preparações revelou marcação pontual típica do receptor (**A**). **B**: Marcação com GFAP comprova a origem glial do tipo celular. **C**: Sobreposição. A barra de calibração corresponde a 20 $\mu$ m. O inserto em **A** mostra a marcação com o corante nuclear DAPI.

#### **4.2.6 EGF promove a radialização da glia de Bergmann através da ativação da via de sinalização de MAPK:**

A via de sinalização pela qual EGF promove o prolongamento dos prolongamentos gliais foi investigada com o uso de diversos inibidores de vias de sinalização. Para isso, culturas de células dissociadas compostas majoritariamente por células gliais e neurônios granulares foram cultivadas na presença de EGF e os inibidores de vias de sinalização PD98059, inibidor específico da MAPK (50 $\mu$ M); LY294002, inibidor específico da PI3K (5 $\mu$ M); KT5720, inibidor específico da proteína cinase-A (400nM); Staurosporina, inibidor de proteína cinase C (1nM). Conforme evidenciado na **Figura 19**, apenas o inibidor da ativação da via de sinalização MAPK foi capaz de abolir o efeito produzido por EGF. Em presença de PD98059, a célula glial assumiu uma morfologia típica de astrócito (**Figura 19B**). Em todas as outras condições, a glia de Bergmann manteve a radialização induzida por EGF (dados não mostrados). Esses dados evidenciam que a mesma via envolvida no processo de migração neuronal (**Figura 15**) é também a empregada no aumento da extensão dos prolongamentos gliais, e sugerem que esses dois processos estejam relacionados.



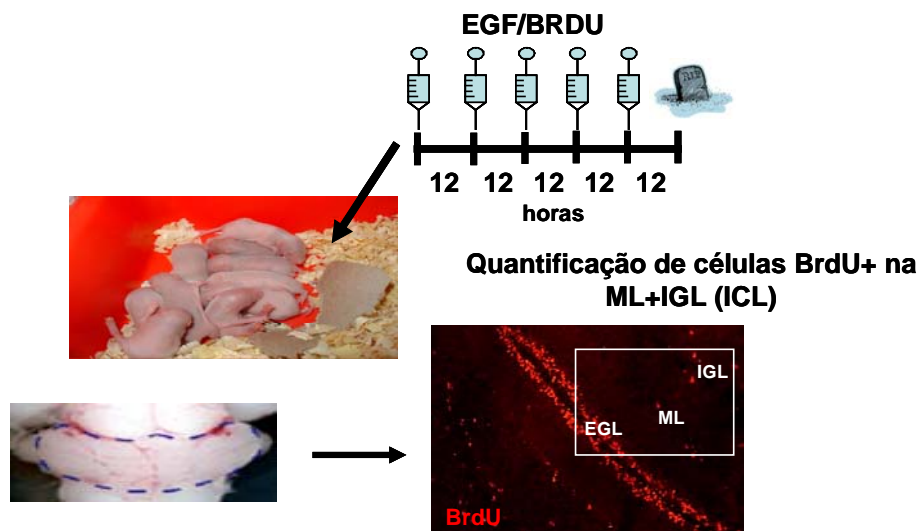
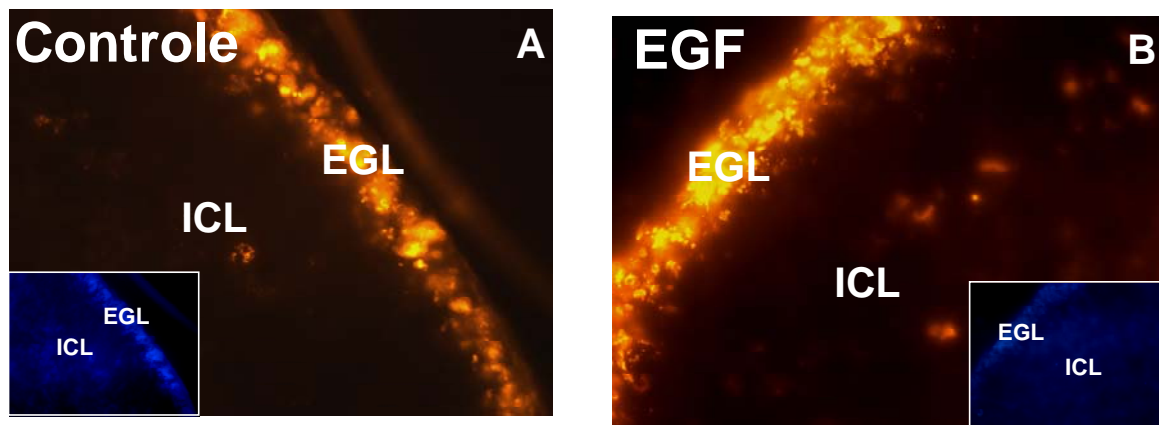
**Figura 19:** EGF promove o alongamento da glia de Bergmann através da ativação da via de MAPK. Culturas de células dissociadas enriquecidas de subtipo glial de Bergmann foram preparadas a partir de cerebelos de ratos de 7 dias pós-nascidos. Após 24 horas de cultivo em meio de cultura Neurobasal, as células foram tratadas com EGF (10ng/mL) acrescido de diversos inibidores de vias de sinalização, por 48h. E + PD (EGF e PD98059, inibidor específico da MAPK, 50 $\mu\text{M}$ ); E + LY (EGF e LY294002, inibidor específico da PI3K 5 $\mu\text{M}$ ); E + KT (EGF e KT5720, inibidor específico da proteína cinase-A, 400nM); E+Staur (EGF e Staurosporina, inibidor de proteína cinase C, 1nM). Subseqüentemente, as culturas foram fixadas e submetidas a imunocitoquímica para GFAP e a extensão máxima dos prolongamentos gliais foi quantificada (C) ( $\mu\text{m}$  \*  $P < 0,05$ ). O inibidor da via de MAPK aboliu completamente a habilidade de EGF em induzir a extensão dos prolongamentos gliais (B).



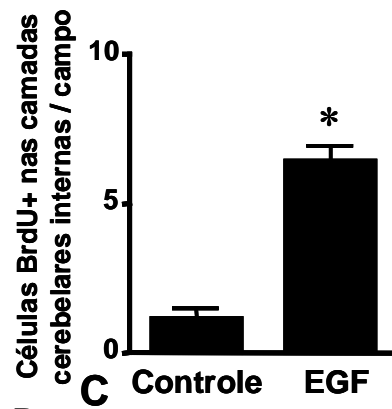
#### 4.2.7 EGF promove a migração de células granulares no período pós-natal *in vivo*:

A migração de células granulares da EGL para a IGL no período pós-natal é dramaticamente afetada pela ausência do HT. Com base nos nossos resultados obtidos em ensaios de explantes, procuramos avaliar o papel de EGF na migração de neurônios granulares no período pós-natal em um modelo *in vivo*, modificado da partir de um protocolo já descrito (Santiago et al., 2004).

Conforme evidenciado na **Figura 20**, a injeção de EGF (100ng/mL) no espaço subaracnóide por dois dias consecutivos aumentou drasticamente (4 vezes o controle) o número de células granulares migratórias, definidas aqui como número de células BrdU-positivas localizadas em camadas mais internas à EGL, dado que corrobora os nossos ensaios *in vitro*.



**C**



**D**

**Figura 20:** *EGF promove a migração de células granulares no período pós-natal in vivo.* Ratos de sete dias pós-nascidos foram submetidos a duas injeções na cisterna magna de salina (A, Controle) ou EGF (B, 100ng/mL) em dias subsequentes, e simultaneamente a injeções intraperitoneais de BrdU a cada 12 horas (C). Decorridas 60 horas a partir da primeira injeção, os animais foram perfundidos com paraformaldeído e seus cerebelos submetidos a secções sagitais seguidas de imunocitoquímica para BrdU. O número de células BrdU-positivas nas camadas mais internas à EGL (i.e., células migratórias) foi quantificado (D). Observamos um incremento de quatro vezes no número de células migratórias após o tratamento com EGF.

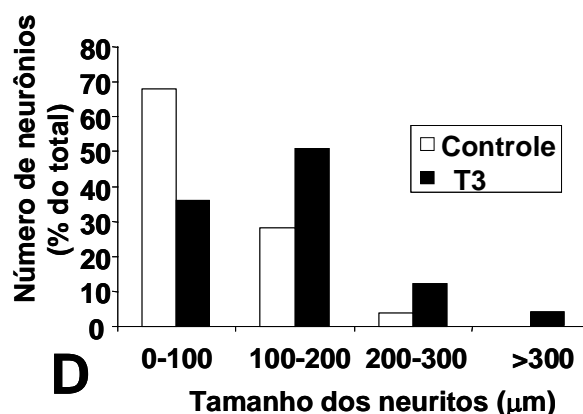
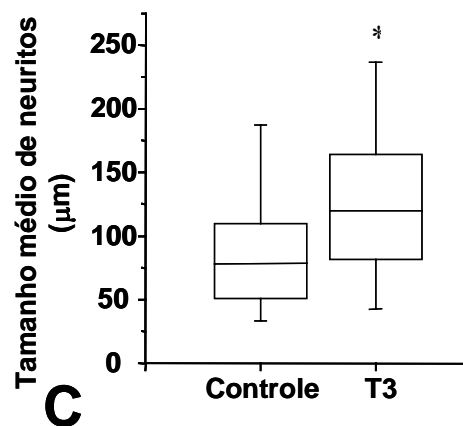
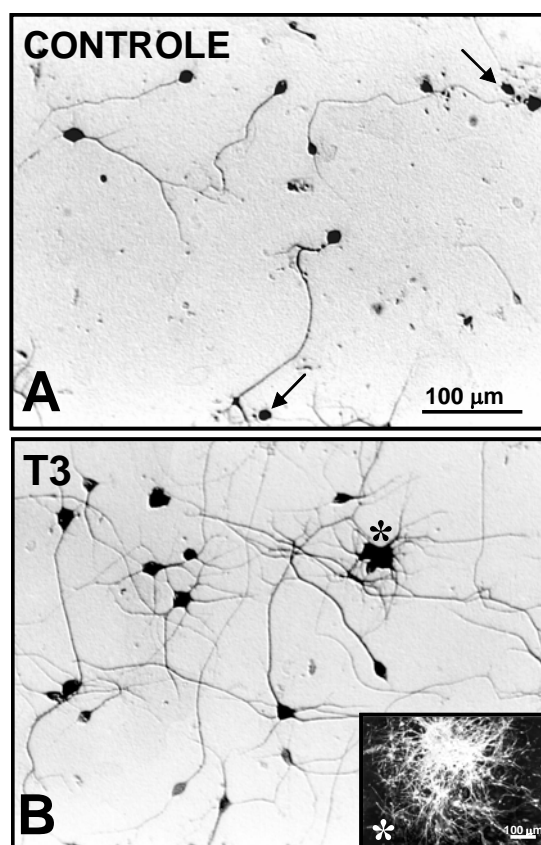
### **4.3 Terceira parte: ASTRÓCITOS E EGF COMO MODULADORES DA DIFERENCIAÇÃO DE NEURÔNIOS GRANULARES:**

A terceira parte dessa seção se dedica ao estudo do estímulo de T3 sobre o processo de diferenciação dos neurônios granulares mediada por astrócitos. Os dados aqui apresentados foram publicados no artigo *Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins*, presente na seção de anexos dessa obra (**Anexo 2**).

#### **4.3.1 Astrócitos cerebelares tratados com T3 promovem o crescimento neurítico:**

Decorrido o processo de migração, após atingirem a IGL, os neurônios granulares diferenciam-se, em um processo que resultará por fim na complexa rede de arborização neuronal característica dessa camada (Sotelo, 2004) e cuja arquitetura é o fundamento básico para que a função cerebelar transcorra corretamente (Ghez, 2003). A arborização das células granulares é também severamente afetada no hipotireoidismo congênito (Clos & Legrand, 1973). Por outro lado, os astrócitos são reconhecidamente importantes substratos para o crescimento axonal *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, procuramos avaliar um eventual papel dos astrócitos em mediar os efeitos de T3 nessa etapa do desenvolvimento cerebelar, tomando como parâmetro de diferenciação a neuritogênese granular, isto é, crescimento e arborização de neuritos de neurônios cerebelares cultivados sobre monocamadas astrocitárias tratadas com T3. Para isso, neurônios cerebelares derivados de ratos embrionários de 19 dias (E19) foram plaqueados sobre monocamadas astrocitárias tratadas previamente com T3. Após 24 horas, as células foram marcadas com imunoglobulina contra o marcador neuronal, beta tubulina III e o comprimento e número total de neuritos foram quantificados. Essa

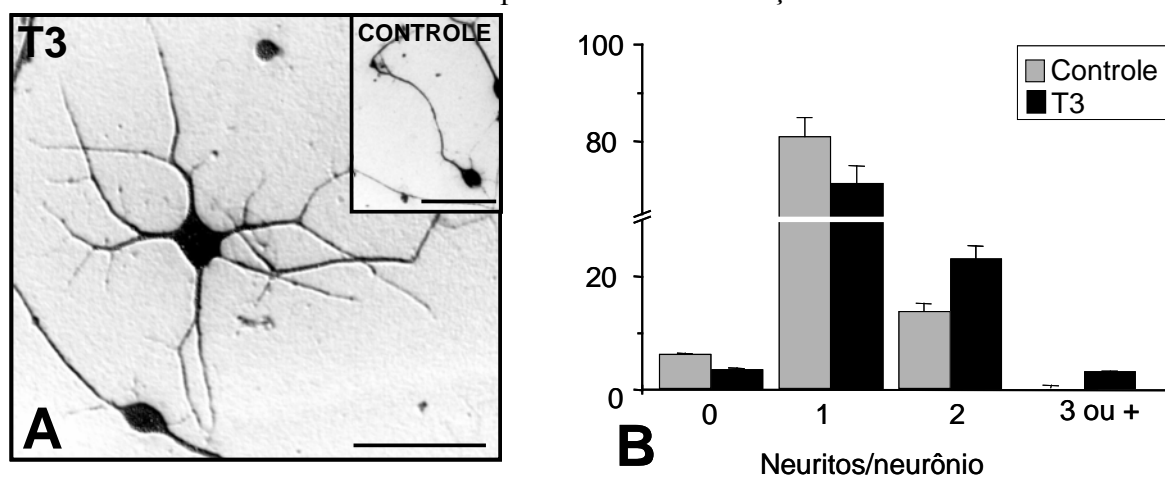
análise evidenciou uma clara diferença entre neurônios plaqueados sobre as monocamadas astrocíticas submetidas ou não ao tratamento hormonal (**Figura 21**). Nós observamos um aumento de cerca de 40 a 60% no comprimento total dos neuritos dos neurônios plaqueados sobre monocamadas astrocíticas tratadas com T3 (**Figura 21C**). Na situação de tratamento prévio com T3, a maioria dos neurônios apresentou neuritos com tamanho médio entre 100 e 200 $\mu\text{m}$ , enquanto que a maioria dos plaqueados sobre astrócitos controle apresentou tamanho médio entre 0 a 100 $\mu\text{m}$ . Uma diferença importante foi observada quando se quantificou neurônios com tamanhos maiores de neuritos (200  $\mu\text{m}$  ou mais). Enquanto 13% dos neurônios apresentaram esse padrão de neuritogênese na situação de cultura previamente tratada com T3, apenas 4% dos plaqueados sobre astrócitos-controle apresentaram neuritos entre 200 e 300 $\mu\text{m}$ . Neuritos maiores que 300 $\mu\text{m}$  raramente foram observados na situação controle (**Figura 21D**).



**Figura 21:** *Astrócitos tratados com T3 promovem o crescimento neurítico.* Neurônios cerebelares obtidos a partir de ratos E19 foram cultivados por 24 horas sobre monocamadas tratadas (B) ou não (A) com T3. Após isso, as células foram fixadas e submetidas à imunocitoquímica para  $\beta$ -tubulina III para posterior análise do comprimento total dos neuritos (C e D). Em todos os casos, pelo menos 100 neurônios escolhidos de forma aleatória foram observados. O tratamento hormonal levou a intenso aumento no tamanho médio neurítico. Setas em (A) evidenciam neurônios aneuríticos, os quais foram frequentemente encontrados nessa condição. Uma densidade maior de neurônios com neuritos mais longos foi vista na condição de pré-tratamento dos astrócitos com T3 (B). Uma significância estatística foi observada em todos os grupos ( $P < 0,05$ ). A escala corresponde a 50  $\mu$ m.

#### 4.3.2 Astrócitos cerebelares tratados com T3 promovem a arborização neuronal:

A análise da morfologia neuronal revelou um aumento dramático no número de neuritos das células plaqueadas sobre astrócitos tratados previamente com T3. Como mostrado na **Figura 22**, houve uma diminuição de cerca de 50% no número de neurônios desprovidos de neuritos nessas condições. Além do mais, nessa mesma situação houve também um aumento no número de neurônios com dois ou mais neuritos e um subgrupo de células apresentou 3 ou mais neuritos. Esses dados evidenciam que astrócitos cerebelares tratados com T3 promovem a arborização neuronal.



**Figura 22:** *Astrócitos cerebelares tratados com T3 promovem a arborização neuronal.* Neurônios cerebelares obtidos a partir de ratos E19 foram cultivados por 24 horas sobre monocamadas tratadas (A) ou não (inserto da foto) com T3. Após isso, as células foram fixadas e submetidas à imunocitoquímica para  $\beta$ -tubulina III, e o número de neuritos foi obtido a partir de contagem de pelo menos 100 neurônios escolhidos aleatoriamente em cada condição (B). Uma rede neurítica complexa foi frequentemente observada nos neurônios plaqueados sobre astrócitos previamente tratados com T3. A significância estatística foi observada para todos os grupos ( $P < 0,05$ ). Escala corresponde a 25  $\mu$ m.

### 4.3.3 A neuritogênese induzida por astrócitos tratados por T3 é mediada

#### indiretamente:

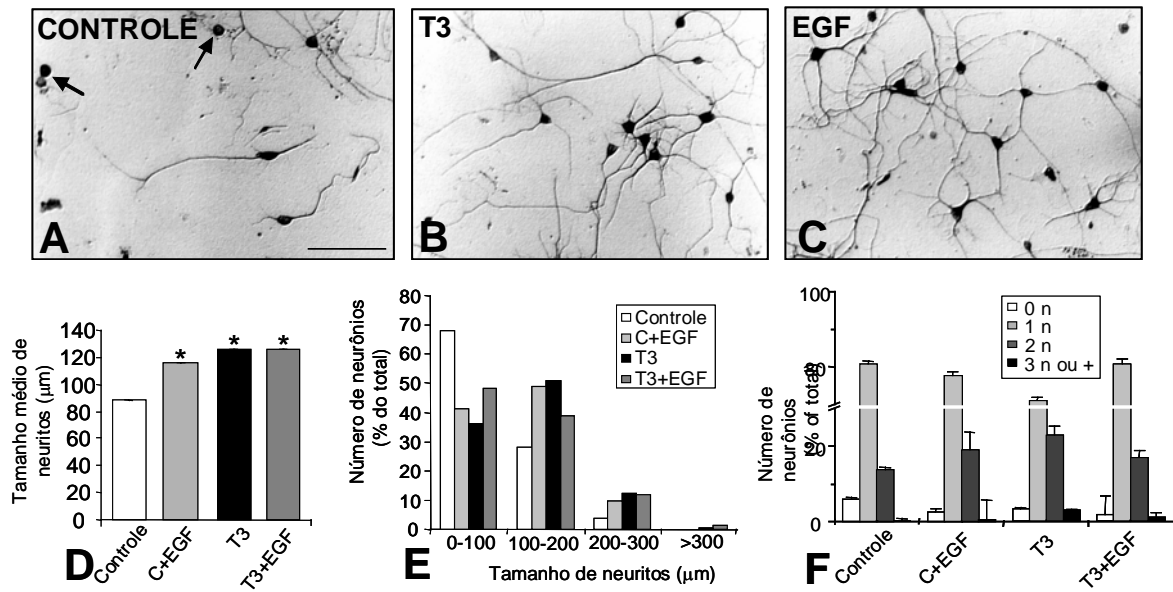
De forma a avaliar se o efeito observado na neuritogênese cerebelar seria secundário a uma ação do EGF astrocitário, culturas astrocitárias foram tratadas com EGF, T3 ou ambos, conforme descrito previamente. Após o tratamento, neurônios embrionários foram plaqueados sobre as diferentes monocamadas astrocitárias, e o número e comprimento total de neuritos foram analisados (**Figura 23**).

O tratamento dos astrócitos com EGF induziu crescimento neurítico semelhante ao observado no tratamento com T3 (**Figuras 23D e E**). As análises quantitativas revelaram que, nessa condição, houve um aumento significativo no tamanho médio de neuritos. A maioria dos neurônios cultivados sobre astrócitos tratados com EGF estendeu neuritos com tamanho médio entre 100 e 200  $\mu\text{m}$  (**Figura 23E**). Da mesma forma que na situação de tratamento prévio com T3, o número de neurônios apresentando neuritos entre 200 a 300  $\mu\text{m}$  foi expressivo (**Figura 23E**). Nessa mesma situação, o número de neuritos por neurônio foi significativamente aumentado: de forma análoga ao tratamento prévio com T3, houve uma redução de cerca de 50% no número de neurônios aneuríticos e um aumento de cerca de 40% no número de neurônios com dois neuritos (**Figura 23F**). Ainda corroborando a semelhança entre os dois diferentes tratamentos, neurônios com 3 ou mais prolongamentos, virtualmente ausentes nas culturas controle, foram vistos comumente na situação de tratamento prévio com EGF (**Figura 23F**). O tratamento com EGF e T3 simultaneamente não aumentou o número de neuritos ou seu tamanho total.

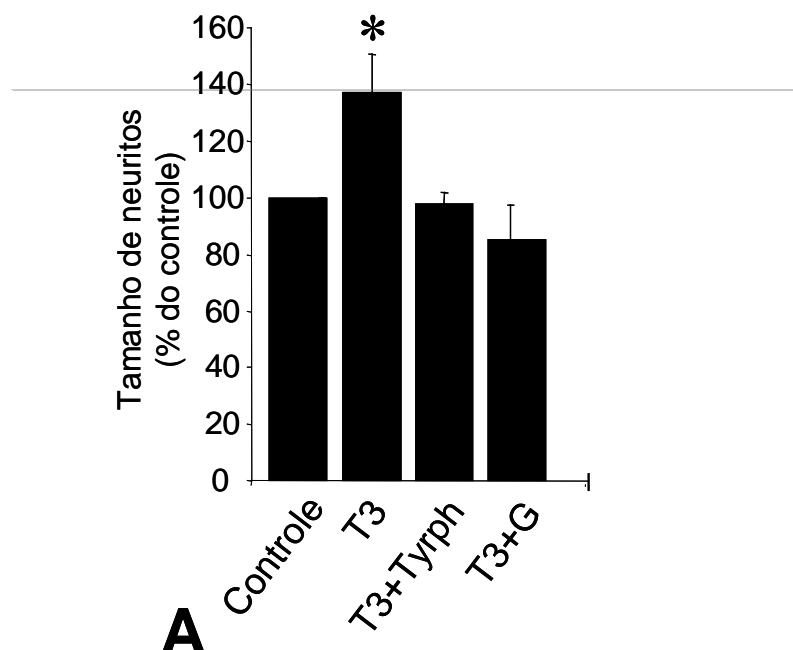
Com o objetivo de caracterizar de forma plena EGF como um intermediário dos efeitos de T3 na modulação da neuritogênese, a atividade de EGF foi bloqueada com genisteína e tirfostina, dois inibidores da ativação de EGFR. Sendo assim, os astrócitos

foram tratados simultaneamente com T3 e genisteína ou tirforstina. Após o tratamento, os neurônios cerebelares foram cultivados sobre a monocamada astrocitária e o número e tamanho total de neuritos foram analisados após 24 horas de cultivo. Como visto na **Figura 24**, o tratamento com qualquer uma dessas drogas simultaneamente ao T3 afetou de forma significativa a neuritogênese induzida pelo hormônio. Quando administradas isoladamente em ausência do tratamento hormonal, os inibidores não afetaram o crescimento neurítico (dados não mostrados). Na condição do tratamento com essas drogas, foi visto um incremento no número de neurônios com neuritos curtos (0 a 100  $\mu\text{m}$ ), seguido por um decréscimo importante no número de neurônios com prolongamentos mais longos (100 a 200 $\mu\text{m}$ ). Resultados similares foram obtidos com o tratamento simultâneo com EGF e as drogas descritas (dados não mostrados). Da mesma forma, o número de neurônios aneuríticos sofreu importante acréscimo quando do tratamento de astrócitos com T3 e as duas drogas. Nessas condições, houve também decréscimo no número de neurônios mais arborizados (**Figura 24**). Esses dados evidenciam o papel de EGF como um intermediário dos efeitos de T3 na neuritogênese induzida por astrócitos.

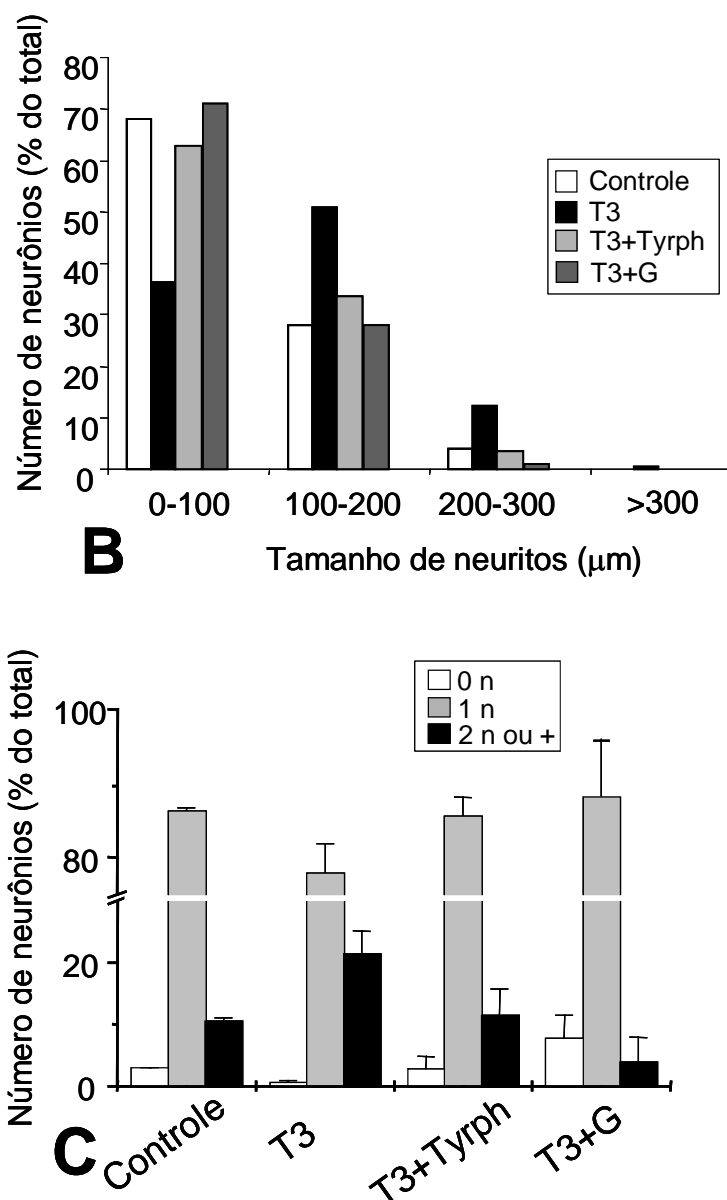
De forma a discriminar entre uma ação direta ou indireta de EGF na neuritogênese, neurônios embrionários foram cultivados agora na presença de MCT3, sabidamente rico em EGF. Após 24 horas, o tamanho total e número de neuritos foram avaliados de forma análoga à previamente descrita. Como se vê na **Figura 25**, o cultivo de neurônios em MCT3 não promoveu incremento significativo em nenhum dos dois parâmetros da neuritogênese avaliados, em comparação com MCC. Esses dados indicam que o EGF derivado dos astrócitos em resposta ao tratamento com T3 não está implicado diretamente na modulação da neuritogênese cerebelar.



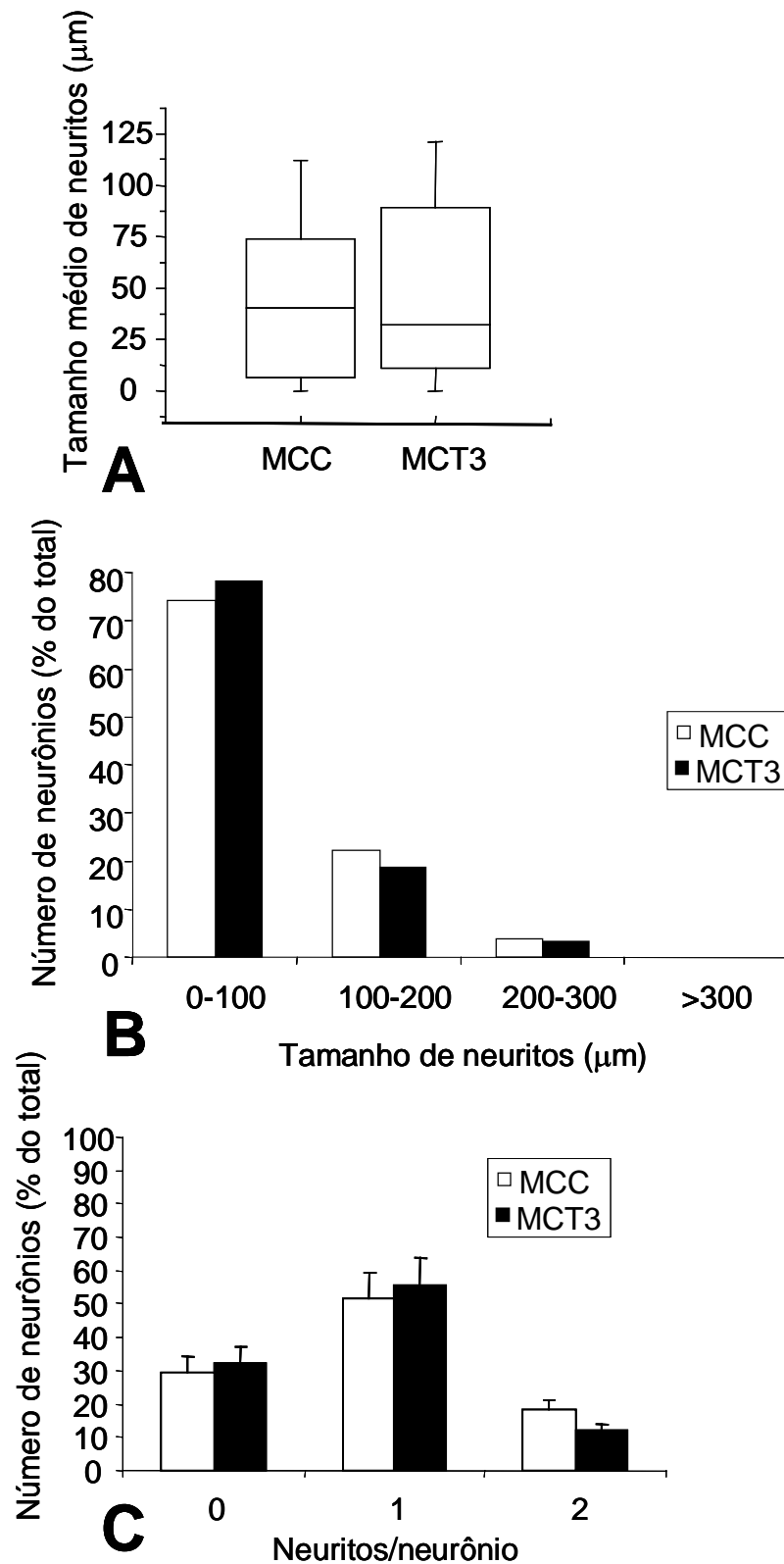
**Figura 23:** Efeito de EGF na neuritogênese cerebelar. neurônios cerebelares obtidos a partir de ratos E19 foram cultivados sobre monocamadas astrocitárias tratadas (B) ou não (A) com T3 ou com EGF (C) (10 ng/ml), ou em por ambos. As culturas foram mantidas por 24 horas antes de uma quantificação do tamanho total de neuritos (D) e número de neuritos por neurônio (E). O tratamento das culturas astrocitárias com EGF aumentou significativamente a permissividade dessas células para a neuritogênese. Setas em A indicam neurônios aneuríticos. \* $P < 0,0001$ . Escala corresponde a 50 μm.







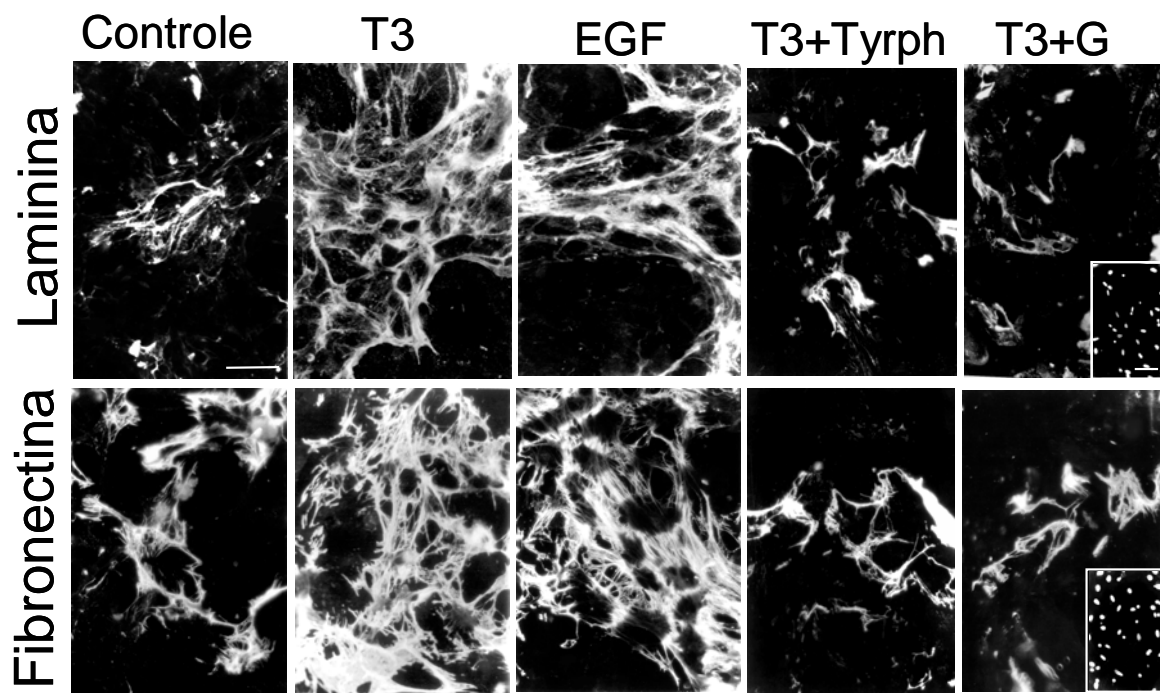
**Figura 24:** Efeito da inibição da via de sinalização de EGF no crescimento neurítico induzido por astrócitos tratados por T3: Neurônios cerebelares obtidos a partir de ratos E19 foram cultivados sobre monocamadas astrocitárias tratadas previamente com T3 apenas ou simultaneamente na presença do inibidor de tirosina cinase, genisteína (2,5 μM) (T3 + G) ou do inibidor específico de EGFR, tirfostina (500 nM) (T3 + Tyrph). O meio contendo o inibidor foi trocado por meio sem o inibidor imediatamente antes do plaqueamento dos neurônios. Após 24 horas de cultivo, o tamanho médio de neuritos (A e B) e o número de neuritos por neurônio foram analisados.  $P < 0,0001$ ; n; neuritos. A adição de genisteína ou tirfostina inibiu completamente o efeito dos astrócitos tratados com T3 no número e tamanho total de neuritos.



**Figura 25:** O meio condicionado por astrócitos tratados com T3 não aumenta o comprimento total e número de neuritos. Neurônios cerebelares obtidos de ratos E19 foram mantidos por 24 horas na presença de meio condicionado por astrócitos tratados (MCT3) ou não (MCC) por T3. Após isso, as células marcadas para  $\beta$ -tubulina III foram analisadas, de forma que o tamanho total de neuritos (A e B) e o número médio de neuritos por neurônio (C) foram quantificados em pelo menos 100 neurônios escolhidos aleatoriamente por situação. MCT3 não afetou o número e o tamanho total de neuritos. Nenhum dos grupos analisados apresentou significância estatística ( $P > 0,05$  para todos os grupos).

#### **4.3.4 A neuritogênese induzida por astrócitos tratados por T3 é mediada por proteínas de matriz extracelular:**

Uma vez demonstrado que os efeitos de T3 sobre a neuritogênese não são decorrentes de uma ação direta de MCT3 sobre os neurônios, sugeriu-se que tais efeitos poderiam se dar por um mecanismo indireto, envolvendo a secreção de moléculas adicionais pelos astrócitos e envolvendo obrigatoriamente o contato dos neurônios com a monocamada astrocitária. Tendo em vista que o crescimento neurítico no SNC é primariamente dependente da expressão de proteínas de matriz extracelular (MEC), procuramos avaliar o eventual envolvimento da modulação de duas proteínas da MEC sabidamente permissivas ao crescimento neurítico, laminina e fibronectina no fenômeno observado. Desta forma, foi realizada a imunomarcação das monocamadas astrocitárias para laminina e fibronectina. Como evidenciado na **Figura 26**, ambas as proteínas mostraram expressão amplamente elevada após os tratamentos com T3 e EGF. Enquanto nas culturas controle a expressão dessas proteínas mostrou-se restrita a certos grupos celulares, nas culturas tratadas a expressão dessas proteínas mostrou-se mais uniforme e distribuída amplamente (**Figura 26**). A marcação foi predominantemente extracelular, com fibras espessas. O tratamento das culturas com T3 e genisteína ou tirfostina, simultaneamente, provou um decréscimo na expressão dessas proteínas, evidenciando novamente que EGF é um intermediário dos efeitos de T3 sobre a modulação dessas proteínas de MEC. A adição dessas drogas às culturas controle não promoveu alterações no padrão de expressão dessas proteínas. Em conjunto, os dados sugerem que o principal mecanismo pelo qual EGF modula os efeitos de T3 sobre a neuritogênese seja a modulação de proteínas da MEC.



**Figura 26:** *T3 e EGF modulam a produção de proteínas de matriz extracelular por astrócitos.* Culturas astrocíticas cerebelares tratadas com EGF (10 ng/ml) ou T3 (50 nM) foram submetidas à imunocitoquímica para as proteínas de matriz extracelular laminina (painel superior) e fibronectina (painel inferior). EGF e T3 contribuíram igualmente para o incremento na expressão dessas proteínas pelos astrócitos. A adição de genisteína (T3+G) ou tirfostina (T3+Tyrph) reverteu fortemente esse fenômeno. Os inserts em “T3+G” evidenciam a marcação nuclear com 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para uma cultura tratada com T3 e genisteína, em um aspecto equivalente ao observado em todas as demais condições. As escalas correspondem a 100  $\mu$ m.

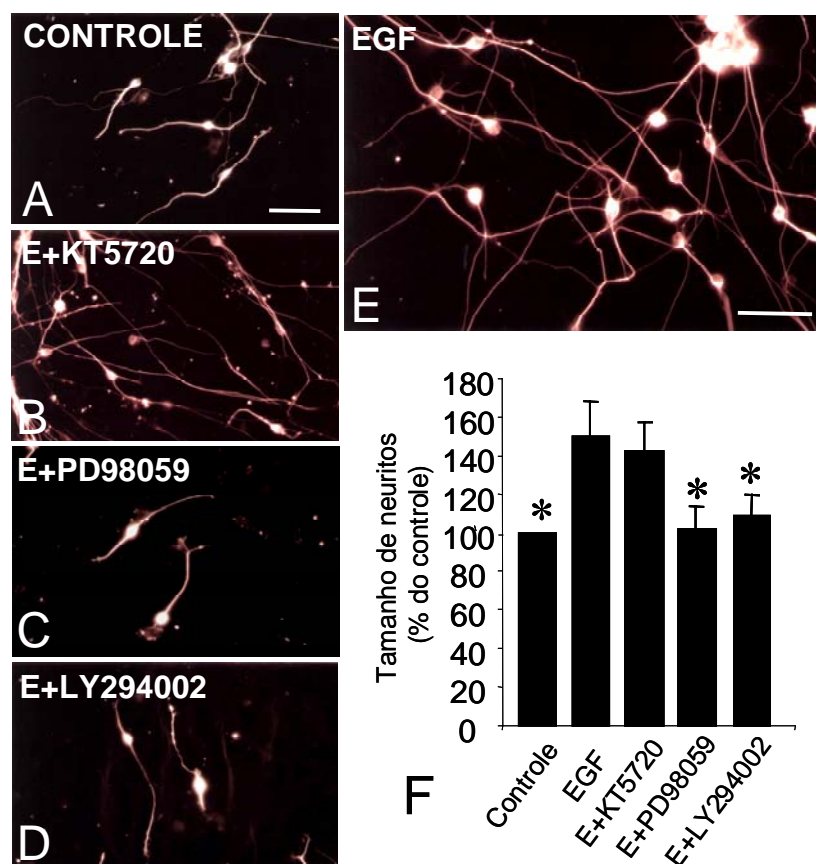
#### 4.3.5 EGF modula a expressão de laminina e fibronectina através das vias de sinalização MAPK e PI3-K:

Procuramos investigar quais vias de sinalização estariam envolvidas nos fenômenos de neuritogênese e de modulação de expressão de proteínas de matriz extracelular observados, uma vez que diferentes vias de sinalização podem ser

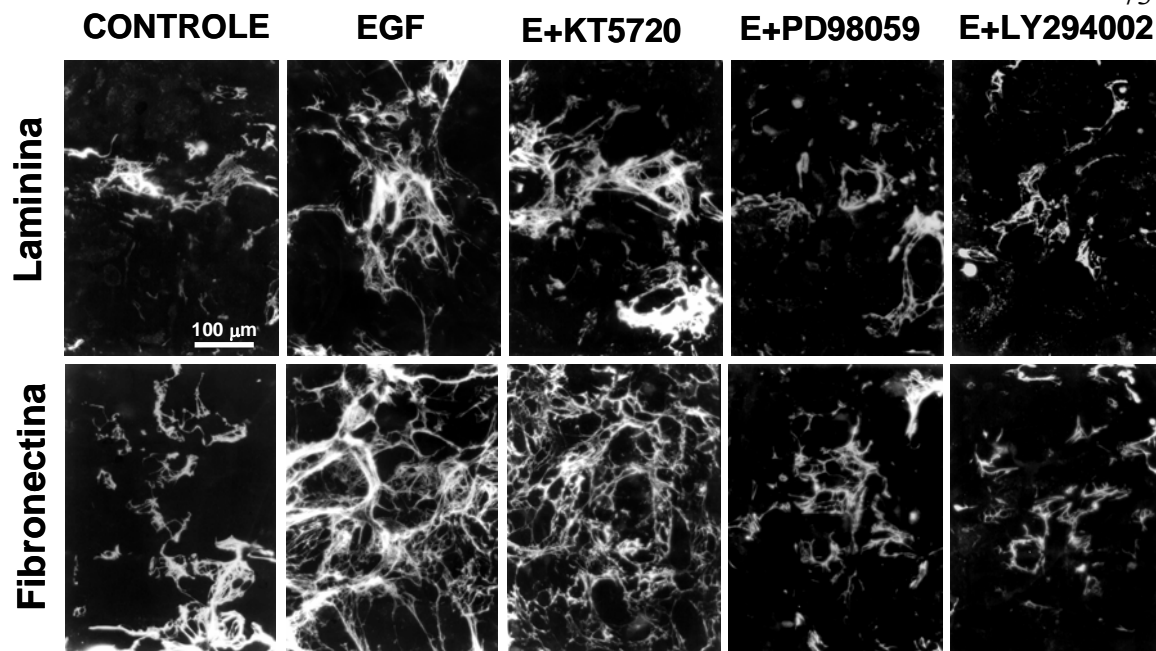
desencadeadas a partir da ativação de EGFR (Scaltriti & Baselga, 2006), estando associadas a respostas celulares diferenciadas. Para isso, culturas astrocíticas preparadas segundo o mesmo protocolo descrito para os demais experimentos foram tratadas com EGF e simultaneamente com diversos inibidores de vias de sinalização distintas por 3 dias. Após esse período, neurônios embrionários foram cultivados sobre as monocamadas astrocíticas por 24 horas, tendo o meio de cultivo sido trocado como forma de evitar uma ação direta dos fatores e inibidores sobre essas células, e após isso as culturas foram fixadas, marcadas com anticorpo anti beta-tubulina-III e o tamanho total de neuritos avaliado de acordo com o mesmo protocolo descrito acima. Nessas condições, PD98059, um inibidor seletivo da MAPK, bloqueou completamente a neuritogênese induzida por EGF (**Figura 27**). Resultados semelhantes foram obtidos com o emprego de LY294002, um inibidor específico da via de PI3K. O inibidor específico de PKA, KT5720, por sua vez, não bloqueou os efeitos de EGF na neuritogênese. Nenhum inibidor teve efeito sobre as culturas astrocíticas controle (dados não mostrados). Ensaio com azul de Trypan não apontaram efeitos tóxicos dessas drogas sobre as células (dados não mostrados).

Em seguida, de forma a relacionar ainda mais a neuritogênese induzida por EGF com a expressão de proteínas da MEC, culturas astrocíticas tratadas com EGF e com os mesmos inibidores de vias de sinalização descritos acima foram fixadas e marcadas por imunocitoquímica para laminina e fibronectina (**Figura 28**). De forma concordante com os dados acima, PD98059 e LY294002 atenuaram dramaticamente a expressão de proteínas de MEC induzida por EGF. A inibição da via de PKA por KT5720 não perturbou esse incremento na expressão dessas proteínas promovido por EGF. Esses dados reforçam a estreita relação entre a modulação por EGF da neuritogênese e da

expressão de proteínas de MEC e demonstram o envolvimento das vias de MAPK e PI3K nesse processo.



**Figura 27:** Efeitos dos inibidores de vias de sinalização no crescimento neurítico induzido por EGF. Neurônios cerebelares obtidos a partir de ratos E19 foram cultivados sobre monocamadas astrocítárias-controle (A) ou previamente tratadas com EGF (10ng/mL) (E) ou em combinação com os inibidores de PKA, KT5720 (400nM) (E + KT5720; B), MAPK, PD 98059 (50  $\mu$ M) (E + PD98059; C), e PI3K, LY294002 (5  $\mu$ M) (E + LY294002). O meio contendo os inibidores foi trocado por um isento desses antes do plaqueamento neuronal. Após 24 horas de cocultura, as células foram submetidas à imunocitoquímica para  $\beta$ -tubulina III (A-E), e o tamanho médio de neuritos foi analisado (F). A neuritogênese induzida por EGF foi abolida pelos inibidores de MAPK e PI3K, PD 98059 e LY294002, respectivamente, enquanto que o inibidor de PKA, KT5720 não teve efeito sobre a neuritogênese. \*  $P < 0,001$  em comparação com EGF. As escalas correspondem a 100  $\mu$ m.



**Figura 28:** *Efeito dos inibidores de vias de sinalização na síntese de proteínas da MEC por astrócitos induzida por EGF.* Culturas astrocitárias foram tratadas com EGF e os diferentes inibidores de vias de sinalização. Após os tratamentos, as culturas foram marcadas por imunocitoquímica para as proteínas da MEC, laminina e fibronectina. O estímulo à expressão dessas proteínas por EGF foi inibido pelos inibidores de MAPK e PI3K, PD 98059 e LY294002, respectivamente, enquanto que o inibidor de PKA, KT5720 não teve esse efeito. Os insertos em “E+LY294002” evidenciam a marcação nuclear com 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para uma cultura tratada com EGF e LY294002, em um aspecto equivalente ao observado em todas as demais condições. As escalas correspondem a 100  $\mu$ m.

## 5 Discussão:

### 5.1 Astrócitos como moduladores da proliferação de precursores granulares:

Durante o desenvolvimento do cerebelo, a proliferação dos precursores neuronais na EGL é um processo influenciado por diversos fatores, e que ocorre em um sítio e intervalo de tempo restritos. Após atingirem a maturidade, os precursores migram para uma camada mais profunda do córtex cerebelar, onde o programa de proliferação cessa (**Figura 29A**, Choi et al., 2005). Essa característica do desenvolvimento desse órgão, dos diferentes fenômenos celulares ocorrerem em sítios e momentos diferentes, é uma das razões para se utilizar de forma tão freqüente o cerebelo como um modelo de estudo de fenômenos mais gerais do SNC (Sotelo, 2004). Além do mais, essa estrutura é caracterizada por uma quantidade relativamente reduzida de tipos celulares, os quais podem em parte ser dissociados entre si por modelos experimentais diversos, como culturas de camadas específicas, cultivo sobre fatias, ou culturas de células dissociadas seguidas de separação fracionada dos tipos celulares (Wang et al., 2007; Choi et al., 2005; Manzini et al., 2007).

Com relação ao nosso tema de estudo, o cerebelo é um modelo ainda mais próximo do ideal, por ser uma das estruturas mais severamente afetadas nos modelos de hipotireoidismo congênito. De forma resumida, a falta de hormônio tireoideano durante o desenvolvimento cerebelar acarreta em déficits severos na proliferação de precursores granulares na EGL, resultando em uma camada de espessura reduzida, déficits na migração dos precursores neuronais, resultando em uma permanência da EGL no adulto, deficiências na diferenciação dos neurônios de uma forma geral, acarretando em uma redução na arborização da camada molecular (Takahashi et al., 2008). Há



conseqüências sobre processos gerais como a redução no peso total do cerebelo e prejuízos à sua foliação. De forma análoga, o hipertireoidismo acelera o processo migratório na EGL resultando em um desaparecimento precoce dessa camada. Nessa condição há também uma redução no processo de foliação (Lauder et al., 1974).

Em nosso primeiro conjunto de resultados evidenciamos o papel de astrócitos cerebelares em induzirem a proliferação dos precursores granulares a partir do estímulo de T3. Esse fenômeno se dá através do efeito do EGF secretado por essas células em resposta ao hormônio, e é potencializado pelo contato celular, tendo o envolvimento da via de PKA para a sua efetivação. Isso foi demonstrado através da comparação das proliferações neuronais observadas no cultivo dos precursores granulares sobre monocamadas astrocitárias tratadas ou não com T3 ou na presença do meio condicionado por esses astrócitos apenas. Nessas condições pudemos verificar o intenso efeito proliferativo decorrente do tratamento prévio dos astrócitos com T3, e também como o contato dos precursores com a monocamada astrocitária potencializou o incremento populacional observado.

Quando comparado com o modelo de cultivo de neurônios isolados, no nosso modelo de co-cultura os neurônios apresentam novas formas de interação, incluindo aí em especial o contato com ligantes de matriz extracelular através de receptores de membrana, como as integrinas. A ativação de integrinas está associada à ativação de vias de sinalização intracelulares, incluindo aí a cinase-ligada à integrina (ILK), as quais suscitam por si mesmas efeitos proliferativos. Animais knockout (KO) para Integrinas ou para ILK apresentam distúrbios severos na proliferação granular (Blaess et al., 2004; Mills et al., 2006), fato esse que enfatiza o papel do contato celular sobre o desenvolvimento pleno dessas células. Além do mais, o contato das proteínas da MEC com as integrinas tem papel em modificar as respostas aos fatores de crescimento em

diversos sistemas celulares. Desta forma, a ativação de integrinas possui efeito sinérgico ao dos fatores de crescimento sobre a fosforilação de ERK em modelo de cultura de fibroblastos (Miyamoto et al., 1996), a ativação da integrina  $\alpha v \beta 3$  pela tenascina-C favorece o crescimento de células de músculo liso induzido por EGF (Jones et al., 1997) e a ativação de integrinas é capaz por si só de ativar EGFR e desencadear em uma série de fenômenos decorrentes dessa ativação (Moro et al., 1998). Da mesma forma, a ligação da integrina  $\alpha 6 \beta 1$  mostrou-se capaz de potencializar os efeitos de neuregulina como um fator promotor de sobrevivência de oligodendrócitos (Colognato et al., 2002). Ainda reforçando esses dados, a subunidade  $\alpha 2$  da laminina se mostrou capaz de aumentar a sobrevivência de oligodendrócitos em resposta ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Frost et al., 1999). Os mecanismos desse tipo de interação não foram plenamente caracterizados, mas provavelmente envolvem interações entre as vias de sinalização ativadas pelas integrinas e os receptores para os fatores de crescimento, tal como evidenciado no modelo de PDGF como indutor da proliferação de fibroblastos (Schneller et al., 1997).

No nosso modelo de cocultura, observamos um incremento na população neuronal ao fim do período de 24 horas de observação. Esse aumento foi atribuído a um estímulo à proliferação de precursores neuronais, como comprovado por ensaios de proliferação celular. Concluímos aí que o contato celular por si só é um indutor da proliferação desses precursores neuronais. Esses dados são corroborados por estudos que evidenciam a ativação de integrinas como um evento desencadeador da transcrição de proteínas relacionadas à progressão no ciclo celular, como as ciclinas (D'Amico et al., 2000). O hormônio tireoideano se mostrou um indutor da expressão de ciclina D2 na EGL, em um mecanismo provavelmente envolvendo mais de um tipo celular, já que essa expressão não foi estimulada pelo tratamento hormonal em animais com mutações

tanto em TR $\alpha$  quanto em TR $\beta$  (Poguet et al., 2003). Da mesma forma, nossos dados revelam que T3 induz a secreção de EGF por astrócitos, e já se evidenciou que os precursores neuronais da EGL expressam níveis elevados de EGFR (Seroogy et al., 2005). EGF possui potente efeito mitótico sobre esses precursores. Esses dados reforçam a hipótese de que T3 exerça seus efeitos sobre a proliferação da EGL por um mecanismo indireto, que envolve astrócitos e EGF (**Figura 29A**). Na EGL, por sua vez, todas essas evidências sugerem que o efeito mitótico de EGF poderia ser mais intenso sobre os precursores em contato mais íntimo com substratos de laminina, com conseqüente ativação subsequente de integrinas. Esse poderia ser o caso da porção mais marginal da EGL que está em contato com a laminina subpial (**Figura 29A**), e onde de fato a taxa proliferativa é mais intensa (Pons et al., 2001). Todavia, outros fenômenos podem ser co-responsáveis pelo incremento populacional observado, tais como uma maior adesão das células ao substrato ou mesmo um favorecimento à especificação neural, uma vez que, ao menos em outros sistemas, como na zona subventricular e córtex cerebral, os astrócitos se mostraram como indutores da diferenciação celular em neurônios, em um processo que depende do contato celular (Lim & Alvarez-Buylla et al., 1999; Spohr et al., 2008). Observamos também que os mesmos fenômenos responsáveis pelo incremento populacional observado no cultivo dos neurônios em meio condicionado (isto é, estímulo à proliferação de precursores neuronais sem modificação de sua sobrevivência, envolvimento de EGF, ativação da via de PKA) estão também presentes nas condições de contato celular (isto é, nos ensaios de co-cultura). Assim, o contato celular atuaria em sinergia com EGF. Essa sinergia poderia ser secundária à potencialização da resposta dos precursores a EGF.

Do ponto de vista molecular, esse fenômeno poderia ser decorrente da propriedade das proteínas da MEC de aumentarem a autofosforilação de EGFR, como já

demonstrado em diversos modelos celulares (Cybulsky et al., 1994, Miyamoto et al., 1996; Jones et al., 1997; Yarwood & Woodgett, 2001), e, portanto, estimulando uma via de sinalização já ativada na condição de cultivo dos neurônios em meio condicionado. Isso poderia também ser decorrente da ativação de outras vias de sinalização, uma vez que a ligação de integrinas à laminina promove a proliferação dos precursores granulares através da ligação a *Sonic Hedgehog* (Shh), um potente indutor da proliferação de células granulares (Pons et al., 2001; Blaess et al., 2004).

A ativação de EGFR resulta na ativação de diferentes vias de sinalização. Dados prévios demonstravam a potencialização dos fenômenos proliferativos de MCT3 pelo ativador da adenilato-ciclase forskolina, sugerindo o papel da via de PKA nos fenômenos proliferativos suscitados por esse meio condicionado (Gomes et al., 1999). Nossos dados comprovam as hipóteses a respeito do envolvimento dessa via nos fenômenos observados, uma vez que os ensaios envolvendo o inibidor de PKA, KT5720, aboliram completamente o incremento populacional induzido por MCT3. Classicamente, a via de PKA não está envolvida na proliferação induzida por EGF. Entretanto, alguns trabalhos envolvendo respostas celulares a EGF demonstram uma sinergia entre PKA e outras vias, como a de MAPK e PKC (Hilborn et al., 1997). Da mesma forma, uma interação entre EGFR e PKA envolvendo a proteína adaptadora Grb2 e a ativação secundária de MAPK já foi proposta em modelos de células tumorais (Tortora et al., 1997; Ciardiello & Tortora, 1998). Desta forma, embora nossos resultados não eliminem a participação de outras vias de sinalização na proliferação celular induzida por EGF, eles demonstram claramente o envolvimento da via de PKA.

A despeito do potente efeito sobre a proliferação neuronal demonstrado por EGF, outros fatores solúveis já se mostraram extremamente importantes para a proliferação de células granulares. O exemplo mais citado é o de Shh, o qual é

considerado o principal mitógeno dessas células e cuja expressão afeta diretamente não apenas a sua proliferação (Dahmane & Ruiz-i-Altaba, 1999), como também processos considerados relacionados com a taxa de proliferação dos neurônios granulares, como a foliação cerebelar (Corrales et al., 2006). Sabe-se, todavia que a proliferação dos precursores granulares está afetada no hipotireoidismo e da mesma forma a foliação cerebelar, sendo assim, seria de extrema relevância se avaliar uma eventual modulação da expressão de Shh pelos hormônios tireoideanos. Sendo Shh apontado como o principal mitógeno dos neurônios granulares, os severos déficits proliferativos encontrados no hipotireoidismo devem de alguma forma ser decorrentes de modulações na expressão desse fator ou então na modificação da resposta celular ao mitógeno. Uma interação entre EGF e Shh deve ser também investigada, e pode ser por si só o ponto de intersecção entre os nossos achados a respeito do intenso efeito proliferativo de EGF e os dados da literatura a respeito do desenvolvimento normal das células granulares. O hormônio tireoideano afeta diretamente um importante parâmetro do desenvolvimento das células de Purkinje, o desenvolvimento dendrítico (Heuer & Mason, 2003). Sendo esse subtipo celular o principal sítio secretor de Shh, é de se esperar que a disponibilidade desse fator solúvel esteja também reduzida na ausência do hormônio. Da mesma forma, as semaforinas e seus receptores parecem ter algum papel no processo proliferativo da EGL, uma vez que há intensa expressão de Plexina B2 na EGL embrionária e deleções no gene dessa proteína acarretam em grandes reduções na proliferação da EGL embrionária e no processo de foliação cerebelar (Deng et al., 2007; Friedel et al., 2007). Em sendo esses achados similares aos encontrados no hipotireoidismo congênito, uma modulação da expressão de semaforinas ou de seus receptores por T3 deve ser também investigada.

Concluimos que diversas evidências da literatura corroboram nossos achados e auxiliam na construção de um modelo no qual grande parte dos efeitos proliferativos desencadeados pelo hormônio tireoideano podem ser secundários à secreção de EGF por astrócitos. Os efeitos finais dessa molécula seriam influenciados por diversos fatores presentes na EGL, incluindo aí proteínas de matriz extracelular e outros fatores solúveis que podem sofrer modulação da expressão por T3 ou ter os seus efeitos alterados de acordo com a disponibilidade de EGF no meio.

## **5.2 Astrócitos como moduladores da migração de neurônios granulares:**

A migração dos neurônios granulares foi o parâmetro avaliado em seguida. Conforme revisto, a migração da camada granular externa em direção à camada granular interna é um fenômeno pós-natal (**Figura 29B**), influenciado e dependente de diversos fatores como moléculas solúveis como Netrina-1 e Semaforinas, moléculas de superfície celular como N-CAM, gangliosídeos e astrotactina, fatores solúveis como neuregulinas, moléculas de matriz extracelular como laminina e o auxílio de outros tipos celulares, em especial da glia de Bergmann (Zhou et al., 2007; Lindner et al., 1983; Santiago et al., 2001 e 2004; Rio et al., 1997) além de ser fortemente afetada pela ausência do hormônio tireoideano (Lauder et al., 1974; Poguet et al., 2003; Takahashi et al., 2008). A reposição hormonal é capaz de reverter esse quadro, e o HT pode de forma direta estimular a migração granular (Farwell et al., 2005), mas há inúmeros indícios de que outros fatores que não a simples ação direta do hormônio sobre os neurônios granulares possam estar envolvidos. Por exemplo, modificações na expressão do TR presente em células granulares não afetam o processo migratório descrito (Morte et al., 2004). Da mesma forma, períodos curtos de tratamento hormonal não afetam a

migração granular pós-natal (Poguet et al., 2004) e um tratamento mais longo parece ser necessário para que a migração seja restabelecida (Takahashi et al., 2004), evidenciando que o mecanismo envolvido deve exigir agentes intermediários. Até mesmo o fenômeno migratório exercido diretamente em modelos de explantes cerebelares é mais lento e de magnitude muito inferior ao observado por nós, referentes às ações de EGF, como discutiremos a seguir (Farwell et al. 2005).

Sendo assim, evidenciamos como os fatores solúveis de astrócitos cerebelares tratados com T3 podem estimular a migração de neurônios granulares. Inicialmente, demonstramos como o meio condicionado por esses astrócitos é capaz de aumentar o raio de migração neuronal de explantes cerebelares. Esse fenômeno é mimetizado por EGF e não é reproduzido por outro fator, TGF- $\beta$ , o qual é sabidamente promotor de migração no córtex cerebelar (Siegenthaler & Miller, 2004). Esses efeitos de MCT3 são abolidos com a pré-incubação desse meio com anticorpos neutralizantes para EGF ou com o tratamento simultâneo com drogas inibidoras da ativação de EGFR, o que evidencia que é esse fator o responsável pelo incremento da migração. Tais resultados foram corroborados por ensaios *in vivo* de injeção de EGF, onde o mesmo estímulo migratório pôde ser comprovado.

Esses achados são em grande parte corroborados por dados prévios da literatura. As células da EGL expressam níveis elevados do RNAm para EGFR, e tal expressão é ainda mais intensa na porção pré-migratória dessa camada (Seroogy et al., 1995), tornando-se muito menos intensa na IGL. Os níveis de EGFR permanecem elevados durante todo o período migratório e decrescem logo após. Fatores solúveis e receptores de membrana são de fato importantes influenciadores da migração das células granulares. Um exemplo disso é obtido a partir da observação de que animais KO para BDNF apresentam uma EGL persistente, decorrente da falha do processo migratório

normal (Schwartz et al., 1997). E de fato, esse fator é quimiotrópico para esses neurônios, em um mecanismo que depende da ativação de receptores de membrana do tipo TrkB e também é caracterizado pela polarização desses receptores em sítios mais próximos da fonte do fator (Zhou et al., 2007), o que poderia por si só justificar em grande parte o sentido da migração granular, já que a concentração desse fator é maior na IGL do que na EGL (Kaplan & Miller, 2007). Da mesma forma, a mutação no receptor órfão nuclear *v-erbA* também está associada a um impedimento na migração dessas células (Chomez et al., 2000). Vários fatores solúveis foram relacionados a eventos migratórios no SNC. Durante o desenvolvimento cerebelar precoce, a Netrina-1 exerce efeito quimiorrepulsivo sobre os interneurônios que surgem de progenitores da substância branca e migram em direção a porções mais periféricas do órgão (Guijarro et al., 2006). Durante a migração tangencial dos neurônios granulares, as células de Purkinje secretam a molécula solúvel repulsiva Slit-2, que tem papel de impedir uma migração precoce dos precursores granulares para camadas mais internas do córtex cerebelar (Guan et al., 2007). Além de Netrina-1 e Slit-2, as semaforinas, outro grupo de moléculas inicialmente caracterizadas com a função de direcionamento axonal, também se mostraram relevantes para o processo migratório no cerebelo, uma vez que se evidenciou que a semaforina 4C tem papel importante pró-migratório dos neurônios granulares, atuando através de seu receptor Plexina-B2, cuja expressão, da mesma forma que a de EGFR é também aumentada em neurônios migratórios e cessa após essas células atingirem a IGL (Deng et al., 2007).

Os receptores de EGF regulam a migração em uma variedade de modelos celulares e a expressão de EGFRs já foi apontada como uma característica de células migratórias de diversas regiões do SNC, já que esta expressão é mais intensa ao longo de vias migratórias como a via radial entre as zonas proliferativas e a placa cortical, e o



percurso tangencial entre a zona subventricular e o bulbo olfatório (Caric et al., 2001). Além disso, infusões de EGF no ventrículo lateral provocam modificações no padrão migratório de algumas populações do SNC (Burrows et al., 1997). Ainda mais interessante é a observação de que a migração celular é dependente de um nível elevado de expressão de EGFR, que costuma ocorrer com os neurônios do córtex cerebelar entre 15 e 18 dias embrionários. Uma elevação prematura, como a decorrente da transfecção por um vetor viral, na expressão desse receptor desencadeia uma migração precoce nesse modelo (Caric et al., 2001). No córtex cerebelar, essa modulação não havia sido ainda descrita, mas já se sabe que há uma grande expressão de EGFR na porção mais interna da EGL, justamente a porção denominada “pré-migratória”. É tentador supor que as células nessa localização estejam atingindo esse limiar migratório de expressão de EGFR descrito para algumas populações do córtex cerebral. Estudos com transfecção de vetores virais desencadeando a superexpressão de EGFR poderiam reforçar os nossos achados e ajudar na elaboração de nosso modelo.

Da mesma forma, o fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) modula a migração celular em diversos sistemas, incluindo aí o córtex cerebral, onde se verifica também um estímulo à expressão da proteína de adesão celular como N-CAM por esse fator (Siegenthaler & Miller, 2004). Em nosso modelo de estudo, TGF- $\beta$ 1 não promoveu a migração granular, dado que comprova a especificidade do fenômeno para EGF e reforça o vínculo desse fenômeno com o mecanismo de ação hormonal.

Uma ação direta dos hormônios tireoideanos sobre a migração neuronal já foi demonstrada em um modelo de cultura de explantes, porém em uma magnitude muito menos relevante e após um tempo de observação mais prolongado do que o de nossos experimentos com EGF (Farwell et al., 2005). Apesar de diferenças metodológicas fundamentais nos protocolos, nossos dados não excluem que de fato haja uma ação

direta dos hormônios tireoideanos sobre o processo migratório. Podemos, entretanto, afirmar que os nossos resultados são secundários à ação de EGF uma vez que: 1) MCT3 é desprovido de hormônios tireoideanos, conforme evidenciado previamente por radioimunoensaio (Trentin et al., 1995) e; 2) os fenômenos observados foram abolidos com a pré-incubação de MCT3 com anticorpo neutralizante para EGF ou com o emprego de drogas inibidoras da ativação de EGFR. Alguns resultados recentes *in vivo* evidenciam que a reversão nos déficits migratórios decorrentes do hipotireoidismo pela reposição hormonal ocorre apenas em períodos mais prolongados de tratamento do que o avaliado em nossos estudos (Takahashi et al., 2008). De qualquer forma, nenhuma das observações citadas acima pode ser considerada mutuamente excludente e as informações dos diferentes estudos podem ser complementares e desenharem um cenário extremamente complexo da ação dos HTs sobre esse aspecto do desenvolvimento cerebelar.

No processo migratório granular pós-natal, a glia de Bergmann tem papel primordial em guiar nos neurônios que se dirigem à IGL. Para isso, um íntimo contato entre esses dois subtipos celulares é estabelecido, caracterizado pela expressão de diversas moléculas de superfície celular e fatores solúveis (Yamada et al., 2002).

Descrevemos assim o efeito de astrócitos cerebelares tratados com T3 sobre o desenvolvimento da glia de Bergmann. Demonstramos que o meio condicionado por astrócitos tratados por T3 induz a extensão dos prolongamentos desse subtipo glial, estando associado a processos celulares mais extensos. Esse fenômeno é mimetizado pela adição de EGF e abolido quando se pré-incuba MCT3 com o anticorpo neutralizante para EGF, ou quando se cultivam essas células em MCT3 acrescido de drogas inibidoras da ativação de EGFR.

Esses resultados demonstram um efeito de EGF sobre a glia de Bergmann, é possível que esses efeitos sejam diretos ou indiretos. O fato de identificarmos EGFR na glia de Bergmann sugere fortemente que esse tipo celular seja alvo de EGF durante o desenvolvimento cerebelar. No entanto, nossos dados a respeito de glia de Bergmann foram obtidos com preparações onde outros tipos celulares, incluindo aí neurônios granulares, que sabidamente expressam EGFR, estavam presentes.

A ação de fatores solúveis astrocitários e mesmo especificamente de EGF sobre astrócitos já foi demonstrada em outros estudos. Como exemplo, astrócitos derivados de nervo óptico de rato apresentam mudanças morfológicas e de mobilidade em resposta a EGF (Liu et al, 2006). Da mesma forma, MCT3 é capaz de promover mudanças na morfologia ou proliferação de astrócitos (Trentin et al., 1995). Sendo assim, uma interação entre diferentes células gliais envolvendo EGF é um modelo plenamente factível e que deve se repetir em uma série de cenários ao longo do desenvolvimento do SNC.

Em nossos trabalhos, assumimos modificações na morfologia da glia de Bergmann como sinônimos de uma modificação na capacidade dessa glia em permitir a migração neuronal. Essa postura é reforçada por observações de que a glia de Bergmann assume morfologia mais alongada quando se efetiva a migração dos neurônios granulares, seja em situações do desenvolvimento do cerebelo quanto em experimentos de resgate do fenótipo de glia radial (Soriano et al. 1997). Ainda nesses experimentos, verificou-se justamente que fatores solúveis são capazes de resgatar esse fenótipo, de forma semelhante ao que observamos em nossos trabalhos. Os achados de que nos explantes, os neurônios migram usando as fibras gliais como guia (Hockberger et al., 1987) e evidenciando o maior desenvolvimento dessas fibras nas situações de cultivo em MCT3 reforçam a validade do uso desse parâmetro como uma medida de

capacitação da migração. Além da avaliação morfológica, outros parâmetros poderiam ser utilizados como medidas indiretas da diferenciação e capacidade dessa glia em prover o auxílio migratório às células granulares, como a avaliação da expressão de marcadores como RC1 e 2 (Yamada et al., 2002).

A descrição de EGF como uma molécula estimuladora da radialização da glia de Bergmann incluiria esse fator solúvel em um grupo de elementos com essa propriedade. Fatores solúveis derivados de neurônios migratórios jovens são capazes de resgatar o fenótipo radial da glia de Bergmann (Soriano et al., 1997). As neuregulinas têm papel importante nesse processo (Rio et al., 1997), e a sinalização por Notch é desencadeador desse fenômeno por aumentar a expressão dos receptores de neuregulinas (erbB) pelas células gliais (Patten et al., 2003). O Fator de Crescimento Transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) é também uma molécula capaz de promover o fenômeno de radialização em uma população de astrócitos maduros. Deve-se ressaltar, todavia, que o efeito desse último fator ocorre apenas em períodos mais prolongados de exposição, muito maiores que os necessários para a modificação do fenótipo desencadeada por neuregulinas ou mesmo por EGF (Sharif et al., 2006).

Evidenciamos também o papel da via de MAPK nos processos migratórios e de radialização da glia de Bergmann. Esses achados reforçam: 1) o papel de EGF, atuando a partir da sua via mais clássica nos dois fenômenos e; 2) uma provável interligação entre os dois fenômenos. Tendo em vista os nossos modelos de estudo, não podemos definir exatamente sobre qual dos dois subtipos celulares EGF atua diretamente ou em qual desses subtipos a via de MAPK está ativada primariamente. O fato de ambos os tipos celulares, gliais e neuronais, expressarem EGFR abre margem para diversas interpretações desses dados. Ensaios envolvendo culturas purificadas gliais ou imunocitoquímica para MAP fosforilada poderiam esclarecer melhor os subtipos

celulares nos quais a ação de EGF é primária e dar mais dados a respeito da interdependência dos fenômenos.

Esses dados em conjunto reforçam a possibilidade de um mecanismo indireto da ação hormonal sobre a migração granular: o EGF secretado em resposta ao tratamento hormonal promoveria a radialização da glia de Bergmann, em um processo similar ao desencadeado por outros fatores solúveis e esse evento estaria de alguma forma relacionado à migração granular.

### **5.3 Astrócitos como moduladores da neuritogênese cerebelar:**

A etapa final estudada diz respeito à diferenciação dos neurônios granulares. Após essas células atingirem a IGL, o processo de neuritogênese resulta na formação da complexa rede neurítica, fundamental para a fisiologia cerebelar (**Figura 29C**). Em especial, os axônios das células granulares devem estender-se a ponto de atingirem os dendritos das células de Purkinje, constituindo-se assim nas fibras musgosas. Classicamente, durante essas etapas é descrita como uma transição na qual a célula modifica o seu programa proliferativo e desencadeia um processo de diferenciação (Wang et al., 2007). O hormônio da tireóide parece ter papel nessa modificação da programação celular, uma vez que o hipotireoidismo está associado a um retardo na maturação das células granulares, e o hipertireoidismo parece acelerar esse processo (Lauder et al., 1974; Poguet et al., 2003; Corrales et al, 2006)

Demonstramos que astrócitos cerebelares tratados com T3 induzem os neurônios granulares a se diferenciarem, tomando como parâmetro de diferenciação a neuritogênese. Esse efeito é mediado pelo EGF secretado pelos astrócitos e envolve aumento na síntese de laminina e fibronectina e ativação das vias de sinalização MAPK

e PI3K. Esses achados, em conjunto com os dados prévios a respeito de proliferação e migração neuronais, sugerem um papel múltiplo de EGF: diretamente sobre os precursores neuronais, esse fator estimula a sua proliferação; indiretamente, e atuando de forma autócrina nos astrócitos, esse fator estimula a neuritogênese. A ação sobre a migração envolve também uma modulação na morfologia glial. De qualquer uma dessas formas, demonstramos como as células gliais e EGF possuem papel fundamental como mediadores do desenvolvimento cerebelar.

Os astrócitos são reconhecidos como fonte principal de síntese e secreção de componentes de matriz extracelular no SNC, incluindo aí laminina e fibronectina (Garcia-Abreu et al., 1995; Menet et al., 2001; Palu & Liesi, 2002). A expressão dessas proteínas em cerebelos hipotireóideos é sabidamente reduzida (Farwell & Dubord-Tomasetti 1999, a e b; Calloni et al., 2001). Nossos dados de que astrócitos cerebelares tratados com T3 ou EGF apresentaram grande incremento na síntese de laminina estão de acordo com os dados encontrados *in vivo* pelos autores citados acima, e poderiam mesmo explicar os achados descritos nesse trabalho. Por outro lado, nossos dados contrastam com os obtidos no trabalho realizado *in vitro* pelos autores, uma vez que estes apontam um efeito exclusivo de T4, e não de T3 sobre o aumento na síntese de laminina. Esses autores sugerem o envolvimento de fenômenos não-genômicos da ação dos hormônios tireoideanos sobre a síntese de proteínas de matriz extracelular. Acreditamos que essa discrepância entre os autores se dê em vista de diferenças importantes entre as metodologias adotadas entre os dois grupos. Essas diferenças podem ser verificadas através da análise dos protocolos de tratamento hormonal e preparação das culturas. Apenas como exemplo, esse trabalho foi realizado com culturas de cérebro total, enquanto que nossos dados envolvem uma cultura restritamente de cerebelo. Já sabemos a partir de diversos trabalhos prévios (Trentin et al., 1995; Garcia-

Abreu et al., 1995; Souza et al., 2004) que astrócitos apresentam grande heterogeneidade de acordo com a região do encéfalo não só em relação à resposta ao hormônio tireoideano como também no que diz respeito à expressão de receptores e mesmo resposta a fatores de crescimento (Trentin et al., 1995).

O emprego do inibidor da tirosina cinase específica do receptor de EGF tirfostina nas culturas astrocitárias tratadas com T3 promoveu grande inibição sobre o fenômeno de indução da neuritogênese e modulação na síntese de proteínas da MEC por T3. Esse dado sugere que esses fenômenos sejam obrigatoriamente mediados por EGF. Corroborando esses dados, o tratamento das culturas astrocitárias com T3 e EGF não apresentou efeitos aditivos, sugerindo, portanto, que ambos fatores estão presentes em uma mesma cadeia de fenômenos, que culminaria em aumento da síntese das proteínas da MEC e finalmente estímulo à neuritogênese.

As proteínas de matriz extracelular são importantes componentes do SNC e têm papel instrutivo e permissivo sobre o crescimento e migração neuronais (Lathia et al., 2007). O hormônio da tireóide tem claro papel em modular a expressão de proteínas de matriz extracelular no cerebelo, uma vez que o hipotireoidismo está relacionado a uma expressão reduzida da proteína de matriz extracelular permissiva ao crescimento neurítico, laminina e modifica a secreção dessa proteína por astrócitos (Farwell & Dubord-Tomasetti, 1999).

Nossos dados apontam para um fenômeno indireto de T3 sobre a indução da expressão astrocitária de laminina e fibronectina. É proposto que T3 seja capaz de modular diretamente a expressão de genes de proteínas de MEC (Alvarez-Dolado et al., 1998 e 1999). Por outro lado, foi demonstrado em outros sistemas (Matsubara et al., 2000; Ono et al., 2002) que a ativação de EGFR promove aumento na expressão do

RNA<sub>m</sub> ou mesmo da própria molécula de fibronectina, o que corrobora os resultados expostos por nós.

A promoção da neuritogênese, por sua vez, parece ser um fenômeno secundário à modulação na expressão de proteínas da MEC, uma vez que o meio condicionado astrocitário foi incapaz de promover por si só a neuritogênese cerebelar. Esses dados contrastam com os observados sobre a proliferação neuronal, onde se verificou que o efeito de EGF é secundário a uma ação direta desse fator sobre o referido subtipo celular.

Desta forma, em um dado momento do desenvolvimento cerebelar, o contato dos neurônios granulares com as proteínas da MEC poderia ser um fator promotor da sua diferenciação, e o processo proliferativo poderia ser interrompido por fatores como a cessação de estímulos mitogênicos ou mesmo pela presença de fatores que diminuam a sua proliferação. Sendo assim, alguns fatores solúveis demonstraram ser potentes inibidores da proliferação de neurônios granulares e promotores da sua diferenciação, como é o caso de estímulos moduladores da atividade de receptores de glutamato (Canudas et al., 2004) ou do polipeptídeo ativador da adenilato-ciclase pituitária (PACAP, do inglês, *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*). PACAP é um fator solúvel que atua através de receptores acoplados a proteína-G denominados receptores PAC1 (PAC1-R). No cerebelo em desenvolvimento, os neurônios de Purkinje produzem PACAP e as células granulares da EGL e da IGL expressam PAC1-R. Nessas células, PACAP interage com Shh de forma a reduzir a proliferação de neurônios granulares e aumentar o crescimento neurítico (Falluel-Morel et al., 2007). Seria tentador avaliar-se uma eventual modulação da expressão de alguns desses fatores pelos HTs. Nosso modelo provavelmente não envolve a modulação da síntese de PACAP já que MCT3 por si só não foi capaz de alterar a neuritogênese cerebelar, e essa



alteração foi totalmente dependente do contato celular. Da mesma forma, PACAP se mostrou um estabilizador de citoesqueleto com efeitos finais de inibição da migração granular (Falluel-Morel et al., 2005), o que, tendo em vista os nossos dados de migração, também fala contra a secreção desse fator por astrócitos cerebelares em resposta a T3.

Nosso trabalho considerou um aspecto morfológico como marcador da diferenciação neuronal. Embora esse seja um parâmetro adequado de quantificação da maturação neuronal, seria interessante avaliarem-se outros parâmetros de diferenciação celular. Recentemente, se demonstrou que NFI é um regulador-chave do desenvolvimento pós-mitótico das células granulares. A expressão desse fator torna-se significativa nas células da EGL pré-migratória e intensifica-se à medida que elas aproximam-se da IGL e está associada ao início do processo de neuritogênese dessas células. Perturbações na expressão de NFI impedem a neuritogênese granular (Wang et al., 2007). Esses dados encorajam-nos a futuramente investigar uma eventual modulação de NFI pelo contato celular com o substrato astrocitário previamente tratado com T3.

Após a ligação de EGF ao seu receptor, há ativação de EGFR pela fosforilação de seus resíduos de tirosina e, a partir disso, inúmeras vias de sinalização podem ser ativadas. Dentre essas vias, a ativação de Raf-MEK-MAP é a mais classicamente descrita e, aparentemente, a via envolvida na maior parte dos fenômenos descritos para essa molécula (Yamada et al., 1997, Danielsen & Maihle, 2002). No que concerne ao fenômeno de síntese de proteínas da MEC por astrócitos em resposta a T3, essa também parece ser a via de sinalização envolvida em tal fenômeno, uma vez que o tratamento das culturas astrocitárias com o inibidor da cinase MEK1/2, PD98059, inibiu o acréscimo na síntese dessas proteínas induzido pelo fator. Essa via de sinalização já foi

demonstrada estar envolvida em modular a expressão de fibronectina em outros sistemas (Kaiura et al., 1999; Rescan et al., 2001; Moriguchi et al., 1999). Outro inibidor que apresentou efeitos semelhantes sobre o fenômeno de modulação das proteínas da MEC foi o inibidor de PI3K, LY294002. As PI3K compõem uma família conservada de cinases de lipídios que catalisam a fosforilação da posição 3' do anel de inositol dos fosfoinosítídeos (Yart et al., 2002). A ativação dessa via leva à produção de lipídeos implicados em diversos processos celulares. O fato da inibição farmacológica de MAPK ou PI3K inibir completamente a expressão de proteínas da MEC e neuritogênese e a adição concomitante não produzir inibição aditiva sugere vias convergentes e não independentes. Esse achado, embora não seja o mais caracteristicamente descrito na literatura, pode ser corroborado por outros trabalhos onde a inibição farmacológica da PI3K mostrou-se capaz de interferir com a via de sinalização de MAPK em diferentes sistemas (Yart et al., 2002 e 2001; Carballada et al., 2001; Kim et al., 2002). Ao contrário do observado nos fenômenos de proliferação neuronal, e de forma semelhante à observada no fenômeno de migração neuronal, o emprego de inibidores da via de PKA não apresentou efeitos sobre a neuritogênese e síntese de proteínas da MEC. É possível que os fenômenos envolvendo efeitos sobre a população astrocitária, como é o caso da modificação da morfologia da glia de Bergmann e a promoção na síntese de proteínas da MEC, estejam relacionados com a ativação de MAPK. Os fenômenos relacionados com uma ação direta de EGF sobre os neurônios, como em nosso caso, a proliferação neuronal, envolvem a via de sinalização de PKA. Essas diferenças na ativação de vias de sinalização podem ser decorrentes de maquinários intracelulares distintos presentes nas diferentes populações celulares descritas.

#### **5.4 Um modelo final para o papel de EGF como um modulador dos efeitos de T3 no desenvolvimento cerebelar:**

Conforme descrito previamente, o desenvolvimento do cerebelo envolve diferentes etapas, nas quais fenômenos de proliferação, migração e diferenciação celulares apresentam papel primordial. Em um primeiro momento, a proliferação dos precursores granulares na camada granular externa é o fenômeno de destaque (**Figura 29A**), e encontra-se bastante comprometida em estados de depleção do hormônio tireoideano (Nicholson & Altman, 1972). Essas células, nesse momento, apresentam expressão intensa do receptor de EGF enquanto regiões extra-corticais aparentam ser as principais fontes de ligantes de EGFR nesse momento (Seroogy et al. 1995). Sendo assim, é possível que nesse momento do desenvolvimento cerebelar, T3 atue primariamente sobre astrócitos (ou outras células gliais como glia de Bergmann), os quais, através da secreção de EGF, promoveriam à distância, através da difusão desse fator para as regiões mais periféricas do cerebelo, a proliferação na EGL. Esse fenômeno envolveria a ativação do EGFR amplamente expresso pelos precursores granulares (**Figura 29A**). A ativação de EGFR nessas células promoveria a ativação da via de PKA, com conseqüente indução de proliferação dos progenitores. Como já citado, a ativação dessa via nessa subpopulação pode refletir um maquinário intracelular específico dessas células nesse dado momento do desenvolvimento cerebelar. A EGL foi já descrita como um “nicho mitogênico”, a partir de observações de que de alguma forma, a presença das células granulares nesse ambiente favoreceria a sua manutenção em um estado proliferativo (Choi et al., 2005). Diversos fatores poderiam contribuir para a manutenção desse microambiente como, por exemplo, a manutenção de

concentrações ótimas de fatores pró-mitóticos nessa camada e a proximidade com moléculas de matriz extracelular como laminina, presente na membrana basal (**Figura 29A**) (Blaess et al., 2004). Nosso modelo reforça em alguns aspectos a EGL como sítio favorável à proliferação dos precursores, supondo-se um acúmulo de EGF nessa camada e a potencialização da proliferação dos precursores pelo contato celular, fato que diz respeito de forma mais específica às células localizadas na porção mais externa da EGL, aquela mais próxima da membrana basal, as quais são sabidamente as que apresentam as maiores taxas de proliferação.

A segunda parte de nosso trabalho aponta para um outro fenômeno do desenvolvimento cerebelar: a migração dos neurônios granulares da EGL para a IGL (**Figura 29B**). Trata-se de um fenômeno essencialmente pós-natal, iniciando-se por volta de 4 dias pós-nascidos e durando cerca de 14 dias em roedores. Da mesma forma que a proliferação dos precursores da EGL, essa migração é dramaticamente afetada em situações de ausência de T3, verificando-se a permanência da EGL em animais hipotireóideos adultos (Morte et al., 2002). Novamente, EGF é um candidato a intermediário dos efeitos de T3 sobre a migração dessas células, tendo-se em vista a intensa expressão de EGFR nessa camada, em especial pelas células da porção mais interna (diga-se, EGL pré-migratória). Sendo assim, podemos propor, nesse momento, um modelo no qual T3 influenciaria primariamente a secreção de EGF pelos astrócitos localizados em camadas mais profundas do cerebelo, os quais por sua vez estimulariam dois fenômenos interligados: o desenvolvimento da glia de Bergmann, tornando-a mais habilitada na função de auxílio à migração radial; e, secundariamente ou não, a migração das células granulares em direção à IGL (**Figura 28B**).

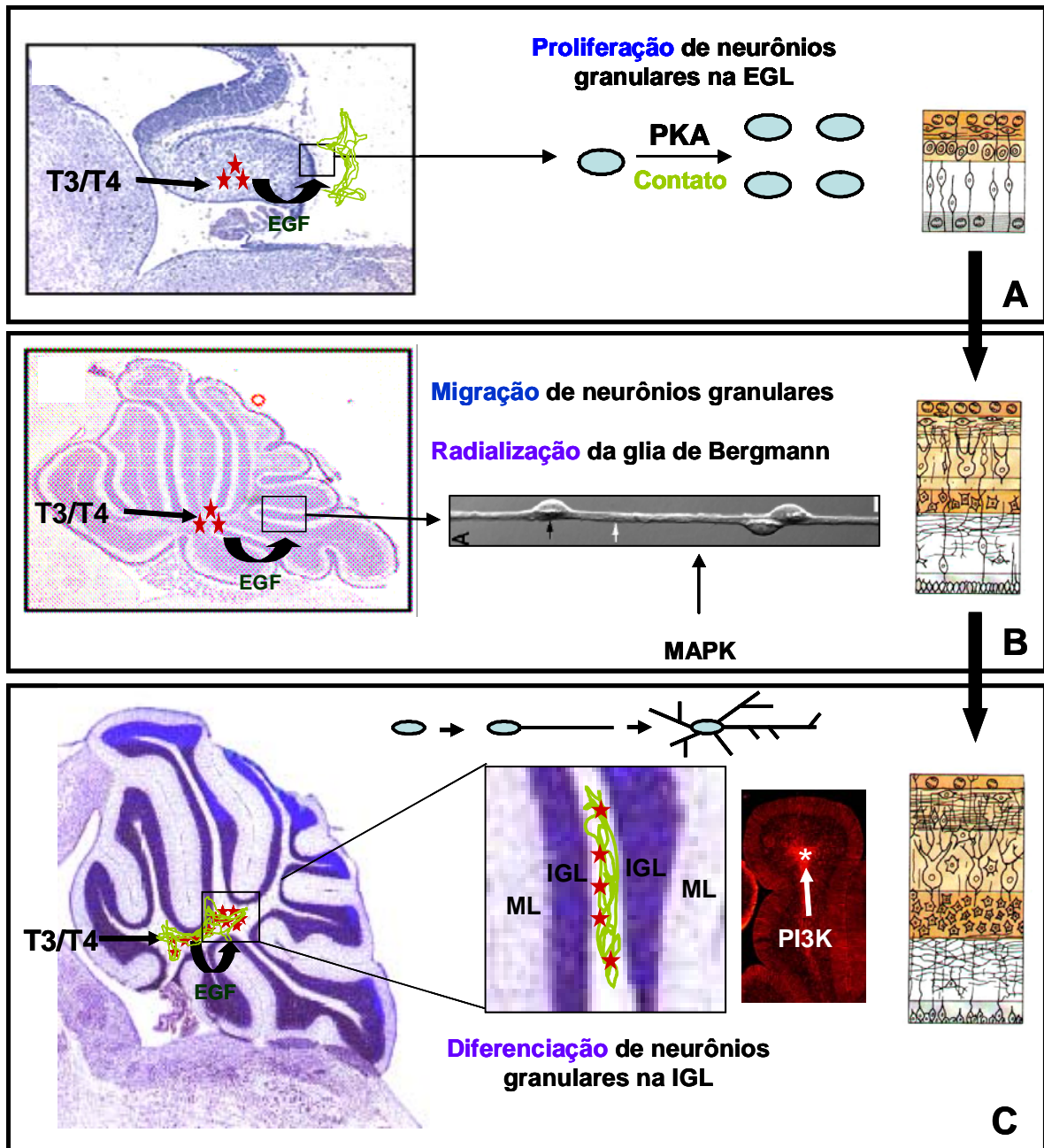
Finalmente, a terceira parte de nosso trabalho descreve um eventual papel de astrócitos e EGF como intermediários de T3 sobre uma etapa final do desenvolvimento

cerebelar: a maturação granular. Os neurônios granulares, após atingirem a IGL, diferenciam-se, e como processo fundamental dessa diferenciação, o crescimento axonal será a principal responsável pela formação da rica rede de conexões que caracteriza o cerebelo adulto (**Figura 29C**). Essas conexões compõem o substrato básico da fisiologia do órgão e devem ser exuberantes o suficiente para permitirem a extensão dos axônios das células granulares até a camada molecular, onde se dá a comunicação dessas células com os dendritos das células de Purkinje (Ghez, 2003). Da mesma forma que para os outros fenômenos descritos, estados de depleção de hormônio tireoideano são caracterizados por uma diminuição importante na arborização neuronal cerebelar. Sendo assim, nossos dados comprovam como os astrócitos, através da secreção de EGF, possuem papel em mediar os efeitos de T3 sobre a neuritogênese cerebelar. Desta forma, o hormônio teria papel em habilitar as células gliais em promover a neuritogênese das células granulares uma vez que essas atingissem a maturidade para isso. Verificamos que nesse processo há um envolvimento da modulação da expressão de proteínas da MEC. Esses dados são concordantes com as observações (Farwell & Dubord-Tomasetti, 1999) de que em estados de depleção de T3 há uma diminuição na expressão de proteínas da MEC no cerebelo, e também com as observações de que são os astrócitos as principais fontes dessas proteínas no SNC como um todo (Garcia-Abreu et al., 1995; Menet et al., 2001; Palu & Liesi, 2002).

Nossos dados em conjunto apontam para um papel central de EGF em mediar os efeitos de T3 sobre o desenvolvimento do cerebelo. Nesse contexto, um modelo animal que não expressasse EGFR poderia servir de ensaio ideal para comprovar os nossos achados, sobretudo se exibisse achados similares aos encontrados no hipotireoidismo congênito. Todavia, animais KOs para EGFR são inviáveis mesmo no período embrionário ou então marcadamente anormais ao nascimento devido ao

papel crítico que EGFR possui ao longo do desenvolvimento embrionário, sobretudo no que diz respeito ao seu papel em subtipos neuronais e gliais (Liu et al., 2006).

Concluimos assim que EGF é o principal interlocutor dos efeitos de T3 mediados por astrócitos no cerebelo. Os efeitos dessa molécula influenciam pelo menos três diferentes fenômenos celulares, proliferação, migração e diferenciação. Essa plethora de efeitos pode ser explicada por ações em diferentes tipos celulares, diferenças nas idades das células, graus diferenciados de expressão de receptores, variações nas vias de sinalização ativadas a partir da ligação do fator ao seu receptor de membrana e influências do microambiente no qual a célula-alvo está inserida, tais como presença de outros fatores solúveis e contato com proteínas de matriz extracelular e outros tipos celulares.



**Figura 29:** Um modelo para as diferentes ações de EGF e astrócitos sobre três etapas do desenvolvimento cerebelar. **A:** Fase embrionária; **B:** Fase pós-natal precoce; **C:** Fase pós-natal tardia. Modificado de Gilbert, 2000; Anton et al., 1997; Corrales et al., 2006

**6. Conclusões:**

1. Astrócitos cerebelares tratados com hormônio da tireóide secretam EGF;
2. EGF possui potente efeito mitótico sobre neurônios granulares;
2. A proliferação induzida por EGF é potencializada pelo contato celular;
3. EGF promove a proliferação das células granulares pela ativação da via de PKA;
4. EGF estimula a migração de neurônios granulares *in vitro* e *in vivo*;
5. EGF induz a radialização da glia de Bergmann;
6. A migração de neurônios granulares e a radialização da glia de Bergmann estimuladas por EGF são decorrente da ativação de uma mesma via de sinalização, a via de MAPK;
7. EGF promove a síntese de proteínas de matriz extracelular laminina e fibronectina por astrócitos;
8. O incremento na expressão de proteínas da MEC por astrócitos resulta no estímulo à neuritogênese das células granulares;



## 7. Referências:

Adams NC, Tomoda T, Cooper M, Dietz G & Hatten ME, Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration. *Development* 2002 129(4):965-972.

Altman J & Bayer SA, Embryonic development of the rat cerebellum. II. Translocation and regional distribution of the deep neurons. *J. Comp. Neurol.* 1985 231(1):27-41.

Alvarez-Dolado M, González-Sancho JM, Bernal J & Muñoz A, Developmental expression of the tenascin-C is altered by hypothyroidism in the rat brain. *Neuroscience* 1998 84(1):309-322.

Alvarez-Dolado M, Ruiz M, Del Rio JA, Alcántara S, Burgaya F, Sheldon M, Nakajima K, Bernal J, Howell BW, Curran T, Soriano E & Muñoz A, Thyroid hormone regulates reelin and *dab1* expression during brain development. *J. Neurosci.* 1999 19(16):6979-6993.

Alvarez Otero R, Sotelo C & Alvarado-Mallart RM, Chick/quail chimeras with partial cerebellar grafts: an analysis of the origin and migration of cerebellar cells. *J. Comp. Neurol.* 1993 333:597-615.

Anton ES, Cameron RS & Rakic P, Role of neuron-glia junctional domain proteins in the maintenance and termination of neuronal migration across the embryonic cerebral wall. *J. Neurosci.* 1996 16:2283-2293.

Anton ES, Marchionni MA, Lee KF & Rakic P, Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development* 1997 124(18):3501-3510.

Barres BA, Neuron-glia interactions molecular and cellular approaches to neural development. *Cowan WM, Jessell TM & Zipursky SL Eds; Oxford University Press, New York.* 1997 pg:64-107.

Barres B & Smith SJ, Cholesterol-making or breaking the synapse. *Science* 2001 292:1296-1297.

Bassett JH, Harvey CB & Williams GR, Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra-nuclear actions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2003 213(1):1-11.

Ben-Yehudah G, Guediche S & Fiez JA, Cerebellar contributions to verbal working memory: beyond cognitive theory. *Cerebellum* 2007 6(3):193-201.

Bernal J, Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2007 3(3):249-59.

Bignami A & Dahl D, The development of Bergmann glia in mutant mice with cerebellar malformations: reeler, staggerer and weaver. Immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *J. Comp. Neurol.* 1974 155(2):219-229.

Blaess S, Graus-Porta D, Belvindrah R, Radakovits R, Pons S, Littlewood-Evans A, Senften M, Guo H, Li Y, Miner JH, Reichardt L & Müller U, B1-integrins are critical for cerebellar granule cell precursor proliferation. *J. Neurosci.* 2004 24:3402-3412.

Boloventa P, Liem RK & Mason CA, Development of cerebellar astroglia: transitions in form and cytoskeletal content. *Dev. Biol.* 1984 102(1):248-259.

Bradley DJ, Towle HC & Young WS 3rd, Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* 1992 91(2):2288-2302.

Bromberg J, Stats proteins and oncogenesis. *J. Clin. Invest.* 2002 2:315-324.

Burrows RC, Wancio D, Levitt P & Lilien L, Response diversity and the timing of progenitor cell maturation are regulated by developmental changes in EGF-R expression in the cortex. *Neuron* 1997 19:251-267.

Calloni GW, Alvarez-Silva M, Vituri C & Trentin AG, Thyroid hormone deficiency alters extracellular matrix protein expression in rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2001 126:121-124.

Cambray-Deakin MA, Cerebellar granule cells., 1996 p3-13. *In* J. Cohen & G. P. Wilkin ed. Neural cell culture. Irl Press, Oxford, United Kingdom.

Canudas AM, Di Giorgi-Gerevini V, Iacovelli L, Nano G, D'onofrio M, Arcella A, Giangaspero F, Bruscati C, Ricci-Vitiani L, Battaglia G, Nicoletti F & Melchiorri D,

PHCCC, a specific enhancer of type 4 metabotropic glutamate receptors, reduces proliferation and promotes differentiation of cerebellar granule cell neuroprecursors. *J. Neurosci.* 2004 24(46):10343-10352.

Carballada R, Yasuo H & Lemaire P, Phosphatidylinositol-3 kinase acts in parallel to the ERK MAP kinase in the FGF pathway during *Xenopus* mesoderm induction. *Development* 2001 128(1):35-44.

Caric D, Raphael H, Viti J, Feathers A, Wancio D & Lilien L, EGFRs mediate chemotactic migration in the developing telencephalon. *Development* 2001 128(21):4203-4216.

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

Carpenter G & Cohen S, Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 1990 265(14):7709-7712.

Carrasco E, Blum M, Weickert CS & Casper D, Epidermal growth factor receptor expression is related to post-mitotic events in cerebellar development: regulation by thyroid hormone. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2003 140(1):1-13.

Casas F, Busson M, Grandemange S, Seyer P, Carazo A, Pessemesse L, Wrutniak-Cabello C & Cabello G, Characterization of a novel thyroid hormone receptor alpha variant involved in the regulation of myoblast differentiation. *Mol. Endocrinol.* 2006 20(4):749-63.

Chen SL, Chang YJ, Wu YH & Lin KH, Mitogen-activated protein kinases potentiate thyroid hormone receptor transcriptional activity by stabilizing its protein. *Endocrinology* 2003 144(4):1407-19.

Choi Y, Borghesani PR, Chan JA & Segal RA, Migration from a mitogenic niche promotes cell-cycle exit. *J. Neurosci.* 2005 25(45):10437-10445.

Cholley B, Wassef M, Arsenio-Nunes L, Brehier A & Sotelo C, Proximal trajectory of the braquium conjunctivum in rat fetuses and its early association with the parabrachial nucleus. A study combining in vitro HRP anterograde axonal tracing and immunocytochemistry. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1989 45:185-202.

Chomez P, Neveu I, Mansen A, Kiesler E, Larsson L, Vennstrom B & Arenas E, Increased cell death and delayed development in the cerebellum of mice lacking the verba orphan receptor. *Development* 2000 127:1489-1498.

Ciardello F & Tortora G, Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and implications. *Clin. Cancer Res* 1998 4:821-828.

Ciemerych MA, Kenney AM, Sicinska EW, Kalaszczyńska I, Bronson RT, Rowitch DH, Gardner H & Sicinski P, Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev.* 2002 16(24):3277-3289.

Clos J & Legrand J, Effects of thyroid deficiency on the different cell populations of the cerebellum in the young rat. *Brain Res.* 1973 63:450-455.

Clos J, Rebière A & Legrand J, Differential effects of hypothyroidism and undernutrition on the development of glia in the rat cerebellum. *Brain Res.* 1973 63:445-449.

Colognato H, Baron W, Avellana-Adalid V, Relvas JB, Baron-Van Evercooren A, Georges-Labouesse E & French-Constant C, CNS integrins switch growth factor signalling to promote target-dependent survival. *Nature Cell Biol.* 2002 4:833-841.

Connor B & Dragunow M, The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res. Rev.* 1998 27:1-39.

Corrales JD, Blaess S, Mahoney EM & Joyner AL, The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development* 2006 133(9):1811-1821.

Crepel F, Delhaye-Bouchaud N, Dupond JL & Sotelo C, Dendritic and axonic fields of Purkinje cells in developing and X-irradiated rat cerebellum. A comparative study using intracellular staining with horseradish peroxidase. *Neuroscience* 1980 5:333-347.

Cybulsky AV, McTavish AJ & Cyr MD, Extracellular matrix modulates epidermal growth factor receptor activation in rat glomerular epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 1994 94:68-78.

Dahmane N & Ruiz-i-Altaba A, Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 1999 126:3089-3100.

D'amico M, Hulit J, Amanatullah DF, Zafonte BT, Albanese C, Bouzahzah B, Fu M, Augenlicht LH, Donehover LA, Takemaru K, Moon RT, Davis R, Lisanti MP, Shtutman M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A, Troussard AA, Dedhar S & Pestell RG, The integrin-linked kinase regulates the cyclin D1 gene through glycogen synthase kinase 3beta and cAMP-responsive-element-binding protein-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 2000 275:32649-32657.

Danielsen AJ & Maihle NJ, The EGF/ErbB receptor family and apoptosis. *Growth Factors* 2002 20(1):1-15.

Deng S, Hirschberg A, Worzfeld T, Penachioni JY, Korostylev A, Swiercz JM, Vodraska P, Mauti O, Stoeckli ET, Tamagnone L, Offermanns S & Kuner R, Plexin-B2, but not Plexin-B1, critically modulates neuronal migration and patterning of the developing nervous system in vivo. *J. Neurosci.* 2007 27(23):6333-6347.

Edmondson JC, Liem RK, Kuster JE & Hatten ME, Astrotactin: a novel neuronal cell surface antigen that mediates neuron-astroglial interactions in cerebellar microcultures. *J. Cell Biol.* 1988 106:505-517.

Falluel-Morel A, Vaudry D, Aubert N, Galas L, Benard M, Basille M, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H & Gonzalez BJ, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents the effects of ceramides on migration, neurite outgrowth, and cytoskeleton remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005 102:2637-2642.

Falluel-Morel A, Chafai M, Vaudry D, Basille M, Cazillis M, Aubert N, Louiset E, de Jouffrey S, Le Bigot JF, Fournier A, Gressens P, Rostène W, Vaudry H & Gonzalez BJ, The neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide exerts anti-apoptotic and differentiating effects during neurogenesis: focus on cerebellar granule neurones and embryonic stem cells. *J. Neuroendocrinol.* 2007 19(5):321-327.

Farwell AP & Dubord-Tomasetti SA, Thyroid hormone regulates the expression of laminin in the developing rat cerebellum. *Endocrinology* 1999 140(9):4221-4227.

Farwell AP & Dubord-Tomasetti SA, Thyroid hormone regulates the extracellular organization of laminin on astrocytes. *Endocrinology* 1999 140(11):5014-5020.

Farwell AP, Dubord-Tomasetti SA, Pietrzykowski AZ, Stachelek SJ & Leonard JL, Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'- triiodothyronine. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2005 154(1):121-135.

Ferrarin M, Gironi M, Mendozzi L, Nemni R, Mazzoleni P & Rabuffenti M, Procedure for the quantitative evaluation of motor disturbances in cerebellar ataxic patients. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2005 43(3):349-356.

Figueiredo BC, Otten U, Strauss S, Volk B & Maysinger D, Effects of perinatal hypo- and hyperthyroidism on the levels of nerve growth factor and its low affinity receptor in cerebellum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1993 72(2):237-44.

Fishell G & Hatten ME, Astrotactin provides a receptor system for CNS neuronal migration. *Development* 1991 113:755-765.

Fishman R & Hatten ME, Multiple receptor systems promote CNS neural migration. *J. Neurosci.* 1993 13:3485-3495.

Flamant F, Baxter JD, Forrest D, Refetoff S, Samuels H, Scanlan TS, Vennström B & Samarut J, International union of pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily:thyroid hormone receptors. *Pharmacol. Rev.* 2006 58(4):705-711.

Freire E, Gomes FC, Jotha-Mattos T, Neto VM, Silva Filho FC & Coelho-Sampaio, Sialic acid residues on astrocytes regulate neuritogenesis by controlling the assembly of laminin matrices. *J. Cell Sci.* 2004 117(18):4067-4076.

Fricker-Gates RA, Winkler C, Kirik D, Rosenblad C, Carpenter MK & Bjöklund A, EGF infusion stimulates the proliferation and migration of embryonic progenitor cells transplanted in the adult rat striatum. *Exp. Neurol.* 2000 165(2):237-247.

Friedel RH, Kerjan G, Rayburn H, Schüller U, Sotelo C, Tessier-Lavigne M & Chédotal A, Plexin-B2 controls the development of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 2007 27(14):3921-3932.

Frost EE, BATTERY PC, Milner R & Ffrench-Constant C, Integrins mediate a neuronal survival signal for oligodendrocytes. *Curr. Biol.* 1999 9:1251-1254.

Garcia-Abreu J, Cavalcante LA & Moura-Neto V, Differential patterns of laminin expression in lateral and medial midbrain glia. *Neuroreport* 1995 6(5):761-764.

Garcion E, Fassner A, French-Constant C. Integrins mediate a neuronal survival signal for oligodendrocytes. *Development* 1999 9:1251-1254.

Ghez C, The cerebellum, pp 626-646. In: Kandel ER, Schwartz JH & Jessell TM, "Principles of Neural Science." 4th Ed. McGraw-Hill. 2003 USA.

Gilbert SF, The central nervous system and the epidermis, pp 379-398. In: "Developmental biology" 6<sup>th</sup> Ed. Sinauer Associates, Inc. 2000 USA.

Gomes FCA, Maia CG, Menezes JRL & Moura Neto V, Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. *Glia* 1999 25(3):247-255.

Gomes FC, Spohr TC, Martinez R & Moura Neto V, Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001 34(5):611-620.

Goodman C & Tessier-Lavigne T, Molecular mechanisms of axon guidance and target recognition. In: Cowan WM, Jessell TM & Zipursky SL, Ed. Molecular and cellular approaches to neural development. New York: Oxford University Press. P 108-178.

Gray H & Goss CM, Anatomia. 29<sup>a</sup> edição Ed. Guanabara Koogan S.A. 1988 Rio de Janeiro, RJ.

Guan C, Xu H, Jin M, Yuan X & Poo M, Long-range Ca<sup>2+</sup> signaling from growth cone to soma mediates reversal of neuronal migration induced by slit-2. *Cell* 2007 129:385-395.

Guijarro P, Simó S, Pascual M, Abasolo I, Del Rio JA & Soriano E, Netrin 1 exerts a chemorepulsive effect on migrating cerebellar interneurons in a DCC-independent way. *Mol. Cell. Neurosci.* 2006 33:389-400.

Haack H & Hynes RO, Integrin receptors are required for cell survival and proliferation during development of the peripheral glial lineage. *Dev. Biol.* 233:38-55.

Hall AC, Lucas FR & Salinas PC, Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 2000 100:525-535.

Hashimoto K, Curty FH, Borges PP, Lee CE, Abel ED, Elmquist JK, Cohen RN & Wondisford FE, An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 98(7):3998-4003.

Hatten ME, Liem RK & Mason CA, Two forms of cerebellar glial cells interact differently with neurons in vitro. *J. Cell Biol.* 1984 98:193-204.

Hatten ME, New directions in neuronal migration. *Science* 2002 297(5587):1660-1663.

Heuer H & Mason CA, Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor alpha1. *J Neurosci.* 2003 23(33):10604-10612.

Hilborn MD, Rane SG & Pollock JD, EGF in combination with depolarization or cAMP produces morphological but not physiological differentiation in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 1997 47:16-26.

Hockberger PE, Tseng H-Y & Connor JA, Immunocytochemical and electrophysiological differentiation of rat cerebellar granule cells in explant cultures. *J. Neurosci.* 1987 7:1370-1383.

Holsberger DR, Jirawatnotai S, Kiyokawa H & Cooke OS, Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology* 2003 144(9):3732-3738.

Jones PL, Crack J & Rabinovitch M, Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha v beta 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J. Cell Biol.* 1997 139:279-293.

Kaiura TL, Itoh H & Kent KC, The role of mitogen-activated protein kinase and protein kinase C in fibronectin production in human vascular smooth muscle cells. *J. Surg. Res.* 1999 84(2):212-217.

Kaplan DR & Miller FD, Developing with BDNF: a moving experience. *Cell* 2007 55(1):53-68.



Kim J, Eckhart AD, Eguchi S & Koch W, Beta-adrenergic receptor-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblasts is dependent on transactivation of the epidermal growth factor receptor and subsequent activation of extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.* 2002 277(35):32116-32123.

Kimelberg HK, The problem of astrocyte identity. *Neurochem. Int.* 2004 45(2-3):191-202.

Kingsbury MA, Rehen SK, Contos JJA, Higgins CM & Chun J, Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nat. Neurosci.* 2003 6(12):1292-1299.

Koibuchi N, Jingu H, Iwasaki T & Chin WW, Current perspectives on the role of thyroid hormone in growth and development of cerebellum. *Cerebellum* 2003 2(4):279-289.

Lathia JD, Patton B, Eckley DM, Magnus T, Mughal MR, Sasaki T, Caldwell MA, Rao MS, Mattson MP & French-Constant C, Patterns of laminins and integrins in the embryonic ventricular zone of the CNS. *J. Comp. Neurol.* 2007 505(6):630-643.

Lauder JM, Altman J & Krebs H, Some mechanisms of cerebellar foliation: Effects of early hypo- and hyperthyroidism. *Brain Res.* 1974 76(1): 33-40.

Legrand J, Comparative effects of thyroid deficiency and undernutrition on maturation of the nervous system and particularly on myelination in the young rat. In M. Hamburgh and E. J. W. Barrington (Eds.), *Hormones in Development* Apleton-Century-Crofts, New York, 1971 pg:381-390.

Liesi P & Risteli L, Glial cells of mammalian brain produce a variant form of laminin. *Exp. Neurol.* 1989 105(1):86-92.

Lim DA & Alvarez-Buylla A, Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999 96(13):7526-7531.

Lima FRS, Trentin AG, Rosenthal D, Chagas C & Moura Neto V, Thyroid hormone induces protein secretion and morphological changes in astroglial cells with an increase in expression of glial fibrillary acidic protein. *J. Endocrinol.* 1997 154(1):167-175.

Lindner J, Rathjen FG & Schachner M, L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 1983 305:427-430.

Liu B, Chen H, Johns TG & Neufeld AH, Epidermal growth factor receptor activation: An upstream signal for transition of quiescent astrocytes into reactive astrocytes after neural injury. *J. Neurosci.* 2006 26(28):7532-7540.

Malatesta P, Hartfuss E & Gotz M, Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 2000 127(24):5253-63.

Manzano J, Bernal J & Morte B, Influence of thyroid hormones on maturation of rat cerebellar astrocytes. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2007 25(3):171-179.

Manzini MC, Ward MS, Zhang Q, Lieberman MD & Mason C, The stop signal revised: Immature cerebellar granule neurons in the external germinal layer arrest pontine mossy fiber growth. *J. Neurosci.* 2006 26(22):6040-6051.

Martinez R & Gomes FCA, Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by Epidermal growth factor/Mitogen-activated protein kinase-Phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *J. Biol. Chem.* 2002 277(51):49311-49318.

Matsubara H, Moriguchi Y, Mori Y, Masaki H, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Uchiyama-Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Nose-Fujiyama A, Iba S, Tateishi E & Iwasaka T, Transactivation of EGF receptor induced by angiotensin II regulates fibronectin and TGF-beta gene expression via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Mol. Cell. Biochem.* 2000 212(1-2):187-201.

Menet V, Giménez y Ribotta M, Chauvet N, Drian MJ, Lannoy J, Colucci-Guyon E & Privat A, Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J. Neurosci.* 2001 21(16):6147-6158.

Mills J, Niewmierzycka A, Oloumi A, Rico B, St-Arnaud R, Mackenzie JR, Mawji NM, Wilson J, Reichardt LF & Dedhar S, Critical role of integrin-linked kinase in granule cell precursor proliferation and cerebellar development. *J. Neurosci.* 2006 26(3):830-840.

Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS & Yamada KM, Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase

activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J. Cell Biol.* 1996 135:1633-1642.

Morales D & Hatten ME, Molecular markers of neuronal progenitors in the embryonic cerebellar anlage. *J. Neurosci.* 2006 26(47):12226-12236.

Moriguchi Y, Matsubara H, Mori Y, Murasawa S, Masaki H, Maruyama K, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Nakajima T, Oda K & Iwasaka T, Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor-beta synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Circ. Res.* 1999 84(9):1073-1084.

Moro L, Venturino M, Bozzo C, Silengo L, Altruda F, Beguinot L, Tarone G & Defilippi P, Integrins induce activation of EGF receptor: role of MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 1998 17:22-32.

Morte B, Manzano J, Scalan T, Vennström B & Bernal J, Deletion of the thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002 99(6):3985-3989.

Morte B, Manzano J, Scalan T, Vennström B & Bernal J, Aberrant maturation of astrocytes in thyroid hormone receptor alpha 1 knockout mice reveals an interplay between thyroid receptor isoforms. *Endocrinology* 145(3):1386-1391.

Miyata T, Nakajima K, Mikoshiba K & Ogawa W, Regulation of Purkinje cell alignment by reelin as revealed with CR-50 antibody. *J. Neurosci.* 1997 17:3599-3609.

Mugnaini E & Floris A, The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* 1994 339:174-180.

Nägler K, Mauch DH & Pfrieger FW, Glia-derived signals induce synapse formation in neurons of the rat central nervous system. *J. Physiol.* 2001 533:665-679.

Neveu I & Arenas E, Neurotrophins promote the survival and development of neurons in the cerebellum of hypothyroid rats in vivo. *J. Cell Biol.* 1996 133(3):631-646.

Nicholson JL & Altman J, The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of the rat cerebellar cortex. II. Synaptogenesis in the molecular layer. *Brain Res.* 1972 44(1): 25-36.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK & Kriegstein AR, Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J. Neurosci.* 2002 22(8):3161-3173.

Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna Pant HC, Brady RO, Martin LJ & Kulkarni AB, Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1996 93(20):11173-11178.

Okano-Uchida T, Himi T, Komiya Y & Ishizaki Y, Cerebellar granule cell precursors can differentiate into astroglial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 101(5):1211-1216.

Ono Y, Nakanishi Y, Gotoh M, Sakamoto M & Hirotsashi S, Epidermal growth factor receptor gene amplification is correlated with laminin-5 gamma2 chain expression in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 2002 175(2): 197-204.

Palu E & Liesi P, Differential distribution of laminins in Alzheimer disease and normal human brain tissue. *J. Neurosci. Res.* 2002 69(2): 243-256.

Patten BA, Peyrin JM, Weinmaster G & Corfas G, Sequential signaling through Notch1 and erbB receptors mediates radial glia differentiation. *J. Neurosci.* 2003 23(14):6132-6140.

Perez-Juste G & Aranda A, The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) is involved in thyroid hormone-mediated neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 1999 274(8): 5026-5031.

Pesetsky I, The development of abnormal cerebellar astrocytes in Young hypothyroid rats. *Brain Res.* 1973 63:456-460.

Pfriegeer FW & Barres BA, Synaptic efficacy enhanced by glial cells *in vitro*. *Science* 1997 5332:1684-1687.

Poguet AL, Legrand C, Feng X, Yen PM, Meltzer P, Samarut J & Flamant F, Microarray analysis of knockout mice identifies cyclinD2 as a possible mediator for the action of thyroid hormone during the postnatal development of the cerebellum. *Dev. Biol.* 2003 254(2):188-199.

Pons S, Trejo JL, Martinez-Morales JR & Marti 2001, Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development* 2001 128:1481-1492.

Pritchard JI & Olson JM, Methylation of PTCH1, the Patched-1 gene, in a panel, in a panel of primary medulloblastomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2008 180(1):47-50.

Rabié A, Clavel MC & Legrand J, Analysis of the mechanisms underlying increased histogenetic cell death in the developing cerebellum of the hypothyroid rat: Determination of the time required for granule cell death. *Brain Res.* 1980 190(2): 409-414.

Rabié A, Favre C, Clavel MC & Legrand J, Sequential effects of thyroxine on the developing cerebellum of rats made hypothyroid by propylthiouracil. *Brain Res.* 1979 161(3):469-479.

Rakic P, Cameron RS & Komuro H, Recognition, adhesion, transmembrane signaling and cell motility in guided neuronal migration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1994 4:63-69.

Reichardt LF & Tomaselli KJ, Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* 1991 14:531-70.

Rescan C, Coutant A, Talarmin H, Theret N, Glaise D, Guguen-Guilloyzo C & Baffet G, Mechanism in the sequential control of cell morphology and S phase entry by epidermal growth factor involves distinct MEK/ERK activations. *Mol. Biol. Cell* 2001 12(3):725-738.

Rio C, Rieff HI, Qi P, Khurana TS & Corfas G, Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 1997 19(1):39-50

de Sampaio e Spohr TC, Martinez R, da Silva EF, Neto VM & Gomes FC, Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor beta-1. *Eur. J. Neurosci.* 2002 16(1):2059-2069.

Santiago MF, Berredo-Pinho M, Costa MR, Gandra M, Cavalcante LA & Mendez-Otero R, Expression and function of ganglioside 9-O-acetyl GD3 in postmitotic granule cell development. *Mol. Cell. Neurosci.* 2001 17(3):488-499.

Santiago MF, Costa MR & Mendez-Otero R, Immunoblockage of 9-O-acetyl GD3 ganglioside arrests the in vivo migration of cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 2004 24(2):474-478.

Scaltriti M & Baselga J, The epidermal growth factor receptor pathway: A model for targeted therapy. *Clin. Cancer Res.* 2006 12(18):5268-5272.

Scelfo B, Sacchetti B & Strata P, Learning-related long-term potentiation of inhibitory synapses in the cerebellar cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008 105(2):769-774.

Schneller M, Vuori K, Ruoslahti E, Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J.* 1997 16:5600-5607.

Schnitzer J, Franke WW & Schachter M, Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J. Cell Biol.* 1981 90(2):435-447.

Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M & Wesker K, Neuroanatomia – Cerebelo, de “Prometheus Atlas de anatomia” volume 2 2007, pp. 238-239 1ª Ed. Guanabara Koogan Rio de Janeiro.

Schwartz PM, Borghesani PR, Levy RL, Pomeroy SL & Segal RA, Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF <sup>-/-</sup> mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron* 1997 19:269-281.

Seroogy KB, Gall CM, Lee DC & Kornblum HI, Proliferative zones of postnatal rat brain express epidermal growth factor receptor mRNA. *Brain Res.* 1995 670(1): 157-164.

Sharif A, Legendre P, Prévot V, Allet C, Romao L, Studler J-M, Chneiweiss H & Junier M-P, Transforming growth factor  $\alpha$  promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells. *Oncogene* 2007 26(19):2695-2706.

Shibata T, Watanabe M, Tanaka K & Wada K, Dynamic changes in expression of glutamate transporter mRNAs in developing brain. *Neuroreport* 1996 7(3):705-709.

Shibata T, Yamada K & Watanabe M, Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 1997 17(23):9212-9219.

Siegenthaler JA & Miller MW, Transforming growth factor beta1 modulates cell migration in rat cortex: effects of ethanol. *Cereb. Cortex* 2004 14(7):791-802.

Singh R, Upadhyay G, Kumar S, Kapoor A, Kumar A, Tiwari M & Godbole MM, Hypothyroidism alters the expression of Bcl-2 family genes to induce enhanced apoptosis in the developing cerebellum. *J. Endocrinol.* 2003 176(1):39-46.

Soriano E, Alvarado-Mallart RM, Dumesnil N, Del Rio JA & Sotelo C, Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron* 1997 18:563-577.

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

Sousa VO, Romão L, Neto VM & Gomes FC, Glial fibrillary acidic protein gene promoter is differently modulated by transforming growth factor-beta 1 in astrocytes from distinct brain regions. *Eur. J. Neurosci.* 2004 19(7):1721-1730.

Spohr TC, Choi JW, Gardell SE, Herr D, Rehen SK, Gomes FC & Chun J, LPA receptor-dependent effects via astrocytes promote neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 2008 NO PRELO.

Strait KA, Schwartz HL, Seybold VS, Ling NC & Oppenheimer JH, Immunofluorescence localization of thyroid hormone receptor protein  $\beta$ 1 and variant  $\alpha$ 2 in selected tissues: Cerebellar Purkinje cells as a model for  $\beta$ 1 receptor-mediated developmental effects of thyroid hormone in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991 88(9):3887-3891.

Takahashi M, Negishi T & Tashiro T, Identification of genes mediating thyroid hormone action in the developing mouse cerebellum. *J. Neurochem.* 2008 104(3):640-652.

Teune TM, van der Burg J, van der Moer J, Voogd J & Ruigrok TJ, Topography of the cerebellar nuclear projections to the brain stem in the rat. *Prog. Brain Res.* 2000 124:141-172.

Tortora G, Damiano V, Bianco C, Baldassarre G, Bianco AR, Lanfrancone L, Pelicci PG & Ciardiello F, The RIalpha subunit of protein kinase A (PKA) binds to Grb2 and allows PKA interaction with the activated EGF-receptor. 1997 *Oncogene* 14:923-928.

Trentin AG & Moura Neto V, T3 affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization. *NeuroReport* 1995 6(2):293-296.

Trentin AG, Alvarez-Silva M & Moura Neto V, Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001 281(5):1088-94.

Trentin AG, Rosenthal D & Moura Neto V, Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: Factor secretion, cell differentiation and proliferation. *J. Neurosci. Res.* 1995 41(3):409-417.

Virchow R, Über das granuliert ansehn der wandungen der gerhirnventrikel. *Allg. Z. Psychiatr.* 1846 3-242.

Vivanco I & Sawyers CL, The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2002 2:489-501.

Yamada M, Ikeuchi T & Hatanaka H, The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Prog. Neurobiol.* 1997 51(1):19-37

Yamada K, Fukaya M & Shibata T, Dynamic transformation of Bergmann glial fibers proceeds in correlation with dendritic outgrowth and synapse formation of cerebellar Purkinje cells. *J. Comp. Neurol.* 2000 418(1):106-120.

Yamada K & Watanabe M, Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat. Sci. Int* 2002 77(2):94-108.

Yart A, Chap H & Raynal P, Phosphoinositide 3-kinases in lysophosphatidic acid signaling: regulation and cross-talk with the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 2002 1582(1-3):107-111.

Yart A, Laffargue M, Mayeux P, Chretien S, Peres C, Tonks N, Roche S, Payraastre B, Chap H & Raynal P, A critical role for phosphoinositide 3-kinase upstream of Gab1 and SHP2 in the activation of ras and mitogen-activated protein kinases by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 2001 276(12):8856-8864.



Yarwood SJ & Woodgett JR, Extracellular matrix composition determines the transcriptional response to epidermal growth factor receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001 98:4472-4477.

Zhou P, Porcionatto M, Pilapil M, Chen Y, Choi Y, Tolias KF, Bikoff JB, Hong EJ, Greenberg ME & Segal RA, Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron* 2007 55(1):53-68.

Wang W, Mullikin-Kilpatrick D, Crandall JE, Gronostajski RM, Litwack ED & Kilpatrick, Nuclear factor I coordinates multiple phases of cerebellar granule cell development via regulation of cell adhesion molecules. *J. Neurosci.* 2007 27(23):6115-6127.

Weller M, Krautler N, Mantei N, Suter U & Taylor V, Jagged1 ablation results in cerebellar granule cell migration defects and depletion of Bergmann glia. *Dev. Neurosci.* 2006 28(1-2):70-80.

# ANEXO I

# Proliferation of Cerebellar Neurons Induced by Astrocytes Treated With Thyroid Hormone Is Mediated by a Cooperation Between Cell Contact and Soluble Factors and Involves the Epidermal Growth Factor-Protein Kinase A Pathway

Rodrigo Martinez<sup>1,2</sup> and Flávia Carvalho Alcantara Gomes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Anatomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Cerebellar development is fully dependent on thyroid hormone (T3) levels. We have previously demonstrated a glia-mediated effect of T3 on cerebellar neurons. We have reported that cerebellar astrocytes treated with thyroid hormone secrete epidermal growth factor (EGF), which directly induces neuronal proliferation and, indirectly, by increasing synthesis of extracellular matrix proteins, induces neurite outgrowth *in vitro*. Here, by using a neuron-astrocyte coculture model, we investigated the involvement of cell contact on neuronal proliferation. Culturing of cerebellar neurons on T3-treated astrocyte carpets or conditioned medium derived from them (T3CM) yielded similar results, revealed by a 60% increase in cell population. However, the absolute number of neurons in coculture assays was greatly enhanced in comparison with that in CM assays (3.5–4-fold). Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assays revealed that such an increase was due mainly to proliferation of precursors cells. BrdU incorporation was three times higher in cell carpet (31%) than in CM (13%). Treatment of astrocytes by T3 increased neuronal proliferation either by T3CM (2.5 times) or by contact with T3-treated astrocytes (1.5 times). Neuronal death was not affected by T3 treatment of astrocytes as revealed by either trypan blue viability assays or active caspase-3 labeling. Treatment of astrocytes by EGF mimicked T3 effects on neuronal proliferation. Addition of the EGF receptor tyrosine kinase inhibitor genistein and the protein kinase A (PKA) inhibitor KT5720 to cocultures and T3CM completely reversed neuronal proliferation. Our results implicate EGF and the PKA pathway in the proliferation induced by T3-treated astrocytes. Furthermore, the fact that cocultures potentiate the effect of T3 on neuronal proliferation suggests that neuron-astrocyte contact may cooperate with astrocyte soluble factors to enhance neuronal population. Our data reveal an important role

of astrocytes as mediators of T3-induced cerebellar development and partially elucidate the role of cell contact and soluble factors on this process.

© 2005 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** T3; EGF; cerebellum; proliferation; extracellular matrix

Most of the granular cells of the cerebellum arise from the external granular layer (EGL), a transient proliferative layer. Postnatally these cells migrate from the premigratory zone of the EGL to the internal granular layer (IGL). These events are followed by a progressive morphological differentiation of Purkinje cells (Miale and Sidman, 1961; Komuro et al., 2001; Anderson et al., 2003). Thyroid hormone (3,5,3'-triiodothyronine; T3) plays an essential role in several steps of cerebellar ontogenesis, such as neuronal migration, granule cell proliferation, neurite outgrowth, and glial cell differentiation (Bernal and Nunez, 1995; Gomes et al., 1999b; 2001a,b; Forrest et al., 2002; Martinez and Gomes, 2002; Heuer and Mason, 2003; Trentin et al., 2003; Morte et al., 2004). Hypothyroidism causes a series of abnormalities in the cerebellar cortex, such as a decrease

Contract grant sponsor: CNPq; Contract grant sponsor: CAPES; Contract grant sponsor: FAPERJ; Contract grant sponsor: FUJB; Contract grant sponsor: Pronex-MCT.

\*Correspondence to: Dr. Flávia Carvalho Alcantara Gomes, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Anatomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco F, Ilha do Fundão, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: fgomes@anato.ufrj.br

Received 16 August 2004; Revised 3 January 2005; Accepted 31 January 2005

Published online 23 March 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.20463

in the proliferation rate of the EGL, increased neuronal death in the IGL, impaired migration of granular cells, and a deficiency in the elaboration of Purkinje cell dendritic trees (Nicholson and Altman, 1972; Lauder, 1977, 1978; Cayrou et al., 2002; Morte et al., 2002; Heuer and Mason, 2003; Anderson et al., 2003; Singh et al., 2003).

In spite of the extensive description of granular cell proliferation being subject to thyroid hormone modulation, the molecular mechanisms underlying such events are poorly understood. An indirect action of T3 on neurons by inducing astrocytes to secrete mitogenic factors that induce granular cell proliferation and differentiation *in vitro* has been suggested (Gomes et al., 1999b; Martinez and Gomes, 2002; Trentin et al., 2003). We have shown that cerebellar astrocytes treated with T3 induce granular cell proliferation by secreting epidermal growth factor (EGF; Gomes et al., 1999b).

Interactions between cell-surface integrin receptors and extracellular matrix (ECM) ligands were shown to regulate and even potentiate the mitotic effects of several growth factors (Schneller et al., 1997; Blaschuk et al., 2000; Garcion et al., 2001; Colognato et al., 2002). With regard to EGF, a high degree of functional interdependence has been demonstrated between ECM and EGF receptor (EGFR) signaling pathways. EGFR autophosphorylation is enhanced in several cell types when they interact with ECM proteins (Cybulsky et al., 1994; Miyamoto et al., 1996; Jones et al., 1997). More recently, laminin and fibronectin, two widely distributed ECM proteins, were demonstrated specifically to modify gene expression in response to EGF (Yarwood and Woodgett, 2001).

In the present study, we investigated whether cell contact might modulate neuronal proliferation induced by T3-treated astrocytes. This hypothesis was supported by the observations mentioned above and by our previous demonstrations that 1) astrocytes treated with T3 induce granular cell proliferation by secreting EGF (Gomes et al., 1999b) and 2) EGF secreted by astrocytes in response to T3 enhances synthesis and deposition of laminin and fibronectin by astrocytes (Martinez and Gomes, 2002).

We report here that T3/EGF-induced granular neuronal proliferation is enhanced by cell contact. Furthermore, we demonstrate that this event is mediated by the protein kinase A (PKA) pathway. Our work provides new insights into the functional significance of ECM-EGF cross-talk during cerebellar development.

## MATERIALS AND METHODS

### Primary Astrocyte Cultures

Primary astrocyte cultures were prepared from cerebella of newborn Wistar rats (UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil), following a procedure previously described (Gomes et al., 1999a,b). The rats were decapitated, and then the cerebella were removed and carefully stripped of the meninges. Tissues were washed in phosphate-buffered saline (PBS)/0.6% glucose

(Sigma, St. Louis, MO) and dissociated into single cells in a medium consisting of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and nutrient mixture F12 (DMEM/F12; Sigma) enriched with glucose ( $3.3 \times 10^{-2}$  M), glutamine ( $2 \times 10^{-3}$  M), and sodium bicarbonate ( $0.3 \times 10^{-2}$  M). Cells ( $3 \times 10^5$ ) were plated on 5.5-mm-diameter glass coverslips that previously had been placed on a 24-well culture dishes and coated with polyornithine (1.5  $\mu$ g/ml; 41,000 MW; Sigma) in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal calf serum. The cultures were incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. Cell culture medium was changed 24 hr after plating and subsequently every third day until reaching confluence (usually after 7–10 days).

### T3 Treatment and Conditioned Medium Preparation

After reaching confluence, glial monolayers were washed three times with serum-free DMEM/F12 medium and incubated as previously described for an additional 1 day in serum-free medium. After this period, cultures were treated with 50 nM 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3; Sigma) in DMEM/F12 for 3 days, with daily medium renewal. After the third day, the medium was left in the culture. Control cultures were maintained in DMEM/F12 without serum. Control and T3-treated cultures were then maintained for 2 days without medium change when the conditioned medium (CM) was collected (on the second day after the end of T3 treatment). CM derived from either T3-treated cells (T3CM) or control cultures (CCM) was recovered, centrifuged at 1,500g for 10 min, and used immediately. T3CM was confirmed to be free of residual T3 by radioimmunoassay (RIA), as previously described (Trentin et al., 1998).

### Neuron Primary Cultures and Cocultures

Neurons were prepared from cerebella derived from 19-day Wistar rat embryos (E19) as previously described (Gomes et al., 1999b; Martinez and Gomes, 2002). Briefly, cells were freshly dissociated from cerebellum, and  $1 \times 10^5$  cells were plated onto glass coverslips previously coated with polyornithine (1.5  $\mu$ g/ml; 41,000 MW; Sigma) in astrocyte conditioned medium or in the presence of 10 ng/ml EGF (Invitrogen, Carlsbad, CA).

For coculture assays, neurons were plated onto glial monolayer carpets nontreated or previously treated with T3 as follows. As described above, astrocytes cultures were treated with 50 nM T3 for 3 days, with daily medium renewal, except on the third day. After the third day, the medium was left in the culture for an additional 2 days, when neurons were added. Cocultures were kept for 24 hr at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere.

### EGFR and PKA Inhibition Assays

For EGF receptor and PKA inhibition assays, the tyrosine kinase inhibitor genistein and the PKA inhibitor KT5720 were added at concentrations of 10  $\mu$ M and 300 nM, respectively, to astrocyte culture at the same time as the T3 treatment or directly on conditioned medium. All inhibitors were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA) and diluted in dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma). Cultures and cocultures

were kept at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> atmosphere for 24 hr.

### Trypan Blue Viability Assay

After 2 and 24 hr, neuron–astrocyte cocultures or pure neuronal cultures were incubated in the presence of 0.4% trypan blue solution in PBS for 1 min, and the number of viable neurons was quantified. At least five fields were counted per well. Experiments were performed in triplicate, and each result represents the mean of at least three independent experiments. Statistical analysis was by ANOVA.

### Apoptosis Assay

Neuron–astrocyte cocultures or pure neuronal cultures were immunolabeled with the antibody against the apoptosis marker active caspase-3, as described below. After immunocytochemistry, caspase-positive cells were quantified. At least five fields were counted per well. Experiments were performed in triplicate, and each result represents the mean of at least three independent experiments. Statistical analysis was by ANOVA.

### Quantitative Analysis of Neuron Number

To determine neuron number in different assays, cultures were immunostained for the neuronal marker class III  $\beta$ -tubulin, and positive cells were visualized and counted with a Nikon microscope. At least five fields were counted per well. The experiments were performed in triplicate, and each result represents the mean of three independent experiments. Statistical analysis was by ANOVA.

### Bromodeoxyuridil Incorporation and Detection

Neuron–astrocyte cocultures and neuronal cultures were incubated for 2 or 24 hr in the presence of 1  $\mu$ g/ml of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; Sigma). BrdU detection was performed as previously described (Gomes et al., 1999b). After BrdU incubation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min. Cultures were washed twice with distilled water and then incubated in 2 N HCl at 50°C for 15 min, twice. Subsequently, cultures were washed twice with 0.1 M borate buffer for 10 min at room temperature. Then, after being washed with PBS, cells were doubly immunoreacted with anti-BrdU and anti-class III  $\beta$ -tubulin antibody (as described below) and visualized with a Nikon microscope. The mitotic index was measured by counting the percentage of double-labeled cells in at least five different fields per coverslip.

### Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed as previously described (Gomes et al., 1999a,b). Briefly, cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min at room temperature. After permeabilization, cells were blocked with 10% normal goat serum (NGS; Vector Laboratories, Burlingame, CA) in PBS (blocking solution) for 1 hr and incubated overnight at room temperature with the specified primary antibodies diluted in blocking solution. Primary antibodies were mouse anti-human  $\beta$ -tubulin III antibody (Promega Corporation,

Madison, WI; 1:1,000), rat anti-BrdU (Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, NY; 1:500), and anti-active caspase-3 (Cell Signaling, Beverly, MA; 1:50). After primary antibody incubation, cells were extensively washed with PBS/10% NGS and incubated with secondary antibodies for 1 hr, at room temperature. Secondary antibodies were conjugated with Cy3 (sheep anti-rat; Sigma; 1:5,000) or with fluorescein isothiocyanate (FITC; sheep anti-mouse; Sigma; 1:400). Negative controls were performed by omitting primary antibody during staining. In all cases, no reactivity was observed when the primary antibody was absent. Cell preparations were mounted directly on N-propyl gallate and visualized by using a Nikon microscope.

## RESULTS

### Cerebellar Astrocytes Treated With T3 Increase Neuronal Population

We have previously demonstrated that cerebellar astrocytes, treated with T3 increase neuronal population (Gomes et al., 1999b). This effect was demonstrated to be mediated mainly by soluble factors secreted by hormone-treated astrocytes. Cell contact has been reported to modulate proliferation in several systems (Frost et al., 1999; Garcion et al., 2001; Haack and Hynes, 2001), so we sought to investigate the role of neuron–astrocyte contact in this event. For this evaluation, neurons were cultivated on astrocyte carpets previously treated with T3. After 24 hr, neuronal number was evaluated. Cultivation of cerebellar neurons on T3-treated astrocytes increased neuronal number by 60%, a magnitude similar to that observed after cultivation of neurons on the conditioned medium of astrocytes solely (T3CM; Fig. 1). However, the absolute number of neurons in coculture assays was greatly enhanced in comparison with that in CM assays, by almost fourfold (CCM:  $72.7 \pm 2.4$ ; T3CM:  $116.5 \pm 5.8$ ; CCo:  $271.3 \pm 30.2$ ; T3Co:  $407.3 \pm 47.2$ ; Fig. 1). Such results suggest that neuron–astrocyte contact might cooperate with astrocyte soluble factors to enhance the neuronal population.

### Cerebellar Astrocytes Increase Population of Neurons by Inducing Neuronal Proliferation

We formulated two hypotheses for the increase in neuronal number elicited by astrocytes: 1) an increase in proliferation, by which neuronal progenitors are specifically induced to proliferate and 2) an increase in neuronal survival. To assess this question, we carried out trypan blue and BrdU incorporation assays and immunolabeling for active caspase-3.

Staining of cells with trypan blue after 24 hr of plating demonstrated that viability did not significantly vary for neurons plated onto astrocytes treated or not with T3 (Table I). A similar result was obtained for neurons directly plated onto conditioned medium. Whereas general neuronal viability slightly decreased with culture time in conditioned medium, it increased within 24 hr in cocultures (Table I). However, there was no difference between neuronal viability in control or treated

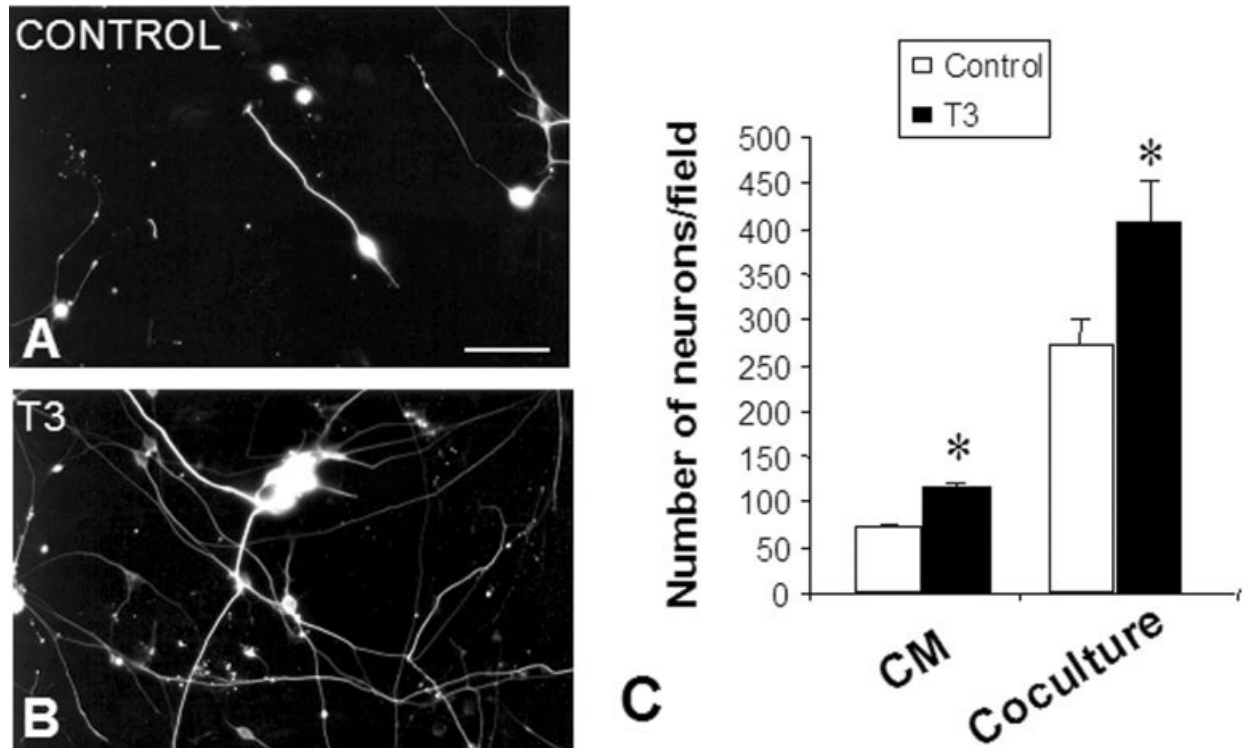


Fig. 1. Astrocytes treated with T3 increase the cerebellar neuronal population. Cerebellar neurons obtained from E19 rats were cultivated for 24 hr on control (control; **A**) and hormone-treated astrocyte monolayers (T3; **B**) or on conditioned medium derived from them. Subsequently,  $\beta$ -Tubulin III-positive cells were quantified (**C**). Coculture or T3CM strongly increased the neuronal population. A higher density of neurons is observed on T3 carpets (**B**). Statistical significance was seen for all groups ( $P < 0.001$ ). Scale bar = 100  $\mu$ m.

**TABLE I. Effect of Astrocyte Conditioned Medium and Coculture on Granular Neuron Survival\***

	2 Hours (%)	24 Hours (%)
CCM	84 $\pm$ 10	68 $\pm$ 9
T3CM	83 $\pm$ 7	69 $\pm$ 5
CCo	71 $\pm$ 4	82 $\pm$ 3
T3Co	69 $\pm$ 7	85 $\pm$ 4

\*Cerebellar neurons obtained from E19 rats were kept for 2 and 24 hr in conditioned medium from either T3-treated (T3CM) or control astrocytes (CCM) or on astrocyte carpets nontreated (CCo) or treated with T3 (T3Co). Cellular viability was assessed by Trypan blue staining. Five fields were counted for each well in the experiment. Each point represents the average of three independent experiments performed in triplicate (mean  $\pm$  SD).  $P > 0.05$  for CCM-T3CM and for CCo-T3Co, at both times.

cultures either in CM or in coculture despite culture time.

To rule out completely modulation of neuronal death as a mechanism of neuronal increase induced by T3 astrocytes, we evaluated the number of cells expressing activated caspase-3 (a marker of apoptosis) after 24 hr of culture. As demonstrated in Figure 2, there was no difference in the number of caspase-positive neurons

cultured in control or treated cultures either in CM or in coculture after 24 hr. Although the level of apoptosis was slightly decreased under coculture conditions in comparison with conditioned medium, we did not find statistical significance between conditions. Together, data from caspase measurements and trypan blue assays suggest that, at least after 24 hr of coculture, the main event involved in the neuronal population increase (either in T3CM or in T3 coculture) is not modulation of neuronal survival.

To assess neuronal proliferation, we performed BrdU incorporation assays. As shown in Figure 3A, we observed an increase in the number of BrdU-positive cells on neuron-astrocyte cocultures after 24 hr. Whereas T3CM increased neuronal proliferation by 2.6-fold, contact with T3-treated astrocytes increased it by 1.5-fold (Gomes et al., 1999b; Fig. 3A). However, it is important to note that, in the control situation, BrdU incorporation was three times higher in cell carpet (31%) in comparison with CM (13%). Cultivation of neurons on T3-treated astrocytes potentiated proliferation elicited by T3CM (47% vs. 34%). It is interesting that, under both conditions, in T3CM or T3 astrocyte carpets, neurons present a clear tendency to form clusters (Fig. 3B,C), a condition previously associated with proliferating cells (Freire et al.,

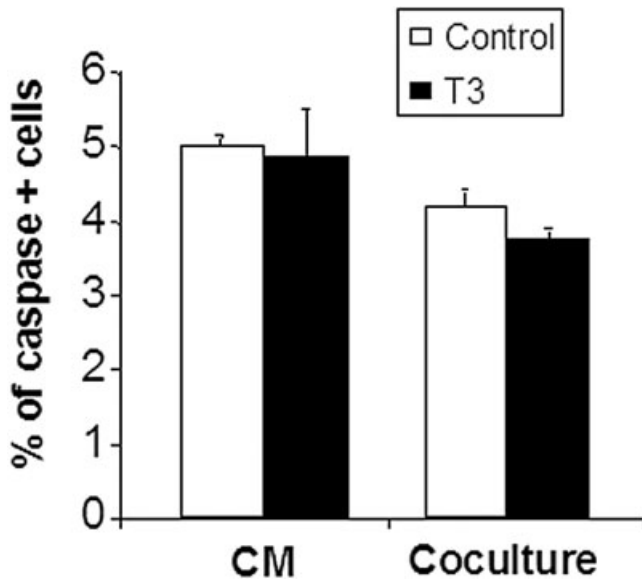


Fig. 2. Astrocytes treated with T3 do not modulate neuronal apoptosis. Cerebellar neurons obtained from E19 rats were cultivated for 24 hr on control and hormone-treated astrocyte monolayers or on conditioned medium (CM) derived from them. Subsequently, activated caspase-3-positive cells were quantified. Number of apoptotic cells was similar under all conditions ( $P > 0.05$ ).

2002). Together, these results demonstrate that 1) coculture per se increases neuronal proliferation and 2) cell contact enhances neuronal proliferation induced by T3CM.

We further investigated whether the proliferation induced by thyroid hormone was due to an increase in the entrance of neuronal precursors to the cell division cycle or to the increase in viability of proliferating neuronal precursors. To address this question, we have analyzed neuronal proliferation and viability after 2 hr of coculture. With these conditions, we could already observe an increase in cell proliferation after 2 hr (as assessed by BrdU accumulation; Fig. 4), without any alteration in cell viability (Table I). Similar results for proliferation were obtained after culturing neurons on T3CM for 2 hr (data not shown). These results indicate that the proliferation induced by T3CM and cocultures is due to an increased entrance of the neuronal precursors into the cell division cycle and not to an increase in precursor viability.

#### Neuronal Proliferation Induced by T3 Is Mediated by the EGF-PKA Pathway

We have previously demonstrated that astrocytes treated with T3 induce neuronal proliferation mainly by secreting EGF (Gomes et al., 1999b), which induces synthesis and secretion of extracellular matrix proteins by astrocytes (Martinez and Gomes, 2002). To investigate the involvement of cell contact in this event, we performed assays using the tyrosine kinase inhibitor genistein, known to inhibit EGF receptor activity. Direct contact of astrocytes or their conditioned medium

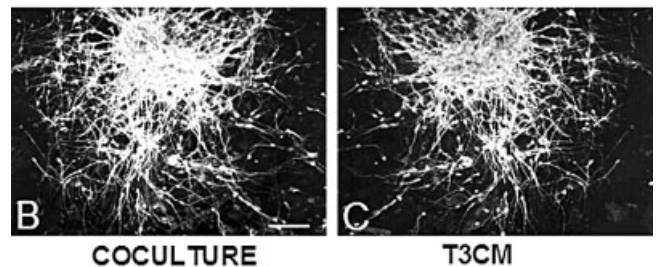
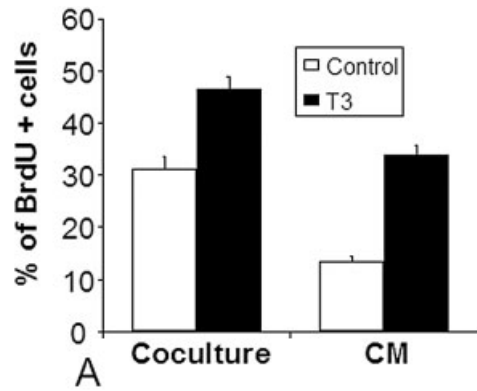


Fig. 3. Coculture of neurons with hormone-treated astrocytes induces neuronal proliferation. Cerebellar neurons obtained from E19 rats were cultivated for 24 hr on control (control) and hormone-treated astrocyte (T3) carpets (coculture) or conditioned medium (CM) in the presence of 1  $\mu\text{g/ml}$  BrdU (A). Subsequently, cells were fixed and doubly stained for  $\beta$ -tubulin III and BrdU. Five fields were counted for each well in the experiment. Each point represents the average of three independent experiments performed in triplicate (mean  $\pm$  SD;  $P < 0.001$ ). Neuron-astrocyte coculture and CM greatly increased neuronal proliferation. Note that either coculture with T3-treated astrocytes (B) or on T3CM neurons (C) tended to form large clusters. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

greatly increased neuronal proliferation (Fig. 5). Culture of cerebellar neurons on astrocytes carpets treated with 10 ng/ml of EGF mimicked T3CM or T3 astrocyte effects on neuronal increase, suggesting a major role for EGF in this process. Addition of genistein in either coculture or neuronal cultures completely inhibited the neuronal population increase (Fig. 5). The fact that genistein completely inhibited neuronal increase suggests a primary role for EGF in neuronal proliferation in T3CM as well as in neuron-astrocyte culture.

We have previously demonstrated that the proliferation induced by T3CM was potentiated by the activation of the cAMP pathway (Gomes et al., 1999b). Such results did not fully implicate the PKA pathway in this process, insofar as they did not show whether the inhibition of this pathway was also inhibitory for the proliferation induced by T3CM. To evaluate this, the PKA inhibitor KT5720 was simultaneously added to neurons cultivated on T3CM or T3 astrocytes. Addition of KT5720 completely inhibited neuronal proliferation induced by T3CM or T3 astrocytes (Fig. 6). Such results

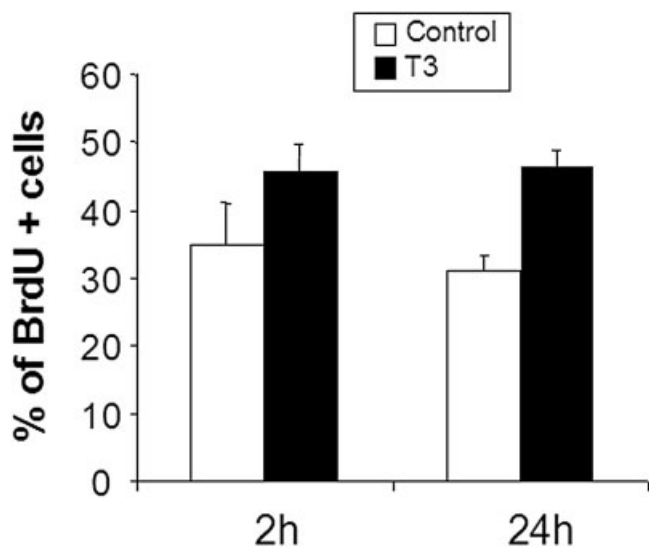


Fig. 4. Coculture of neurons with hormone-treated astrocytes induces neuronal proliferation. Cerebellar neurons obtained from E19 rats were cultivated for 2 or 24 hr on control and hormone-treated astrocyte monolayers (T3) in the presence of 1  $\mu$ g/ml BrdU. Subsequently, cells were fixed and doubly stained for  $\beta$ -tubulin III and BrdU. Five fields were counted for each well in the experiment. Each point represents the average of three independent experiments performed in triplicate (mean  $\pm$  SD;  $P < 0.001$ ). Note that an increase in BrdU incorporation is already observed after 2 hr of culture on T3-treated astrocyte carpets.

implicate the same signaling cascade, the PKA pathway, in the proliferation induced by either T3CM or cell contact.

## DISCUSSION

In the present work, we provide evidence that granular cell proliferation induced by T3-treated astrocytes is mediated mainly by EGF and represents a cooperation between this factor and cell contact molecules. Furthermore, we demonstrated that this event is mediated by the PKA-cAMP pathway. The present findings together with those we previously described suggest that mechanisms of T3 glia-mediated effects on cerebellar granular cells might diverge throughout cerebellar development. Whereas cooperation between soluble factors (EGF, for example) and cell contact (ECM molecules) modulates neuronal proliferation in an earlier phase of EGL development, such cooperation elicits granular neuron differentiation later. Our work provides evidence that EGF signaling might induce distinct cellular responses according to development and gives new insights into the functional significance of ECM-EGF cross-talk during cerebellar ontogenesis.

We have previously demonstrated a binary role for EGF in cerebellar development: directly, EGF increases neuronal proliferation; and, indirectly by inducing laminin and fibronectin synthesis, EGF enhances neurite outgrowth (Gomes et al., 1999b; Martinez and Gomes,

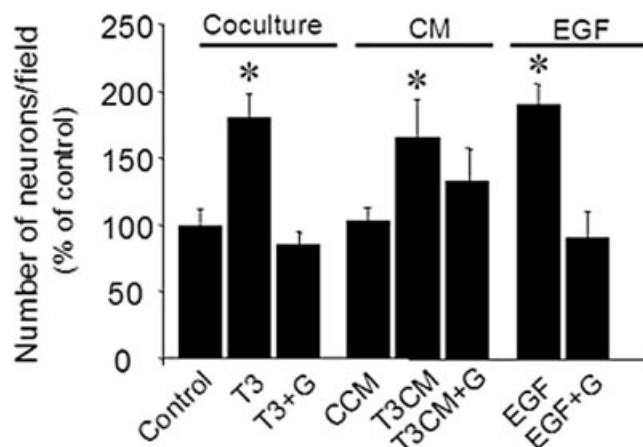


Fig. 5. Effect of the EGFR tyrosine kinase inhibitor genistein on neuronal proliferation. E19 cerebellar neurons were cultivated in the presence of T3CM or astrocyte monolayers previously treated with T3 or 10 ng/ml EGF, alone or in combination with genistein (2.5  $\mu$ M). After 24 hr of culture,  $\beta$ -tubulin III-positive cells were quantified. Note that addition of genistein completely inhibited the T3 astrocyte-, T3CM-, and EGF-induced neuronal number increment. None of these inhibitors had a significant effect on control cultures (data not shown). \* $P < 0.05$ .

2002). In this study, we sought to investigate whether cell contact could modulate the cell proliferation induced by T3-treated astrocytes, as we previously described, in which EGF has been reported to play a major role.

Our data implicate ECM molecules or cell contact in T3 astrocyte-induced neuronal proliferation. First, levels of granular proliferation in the presence of astrocyte monolayers were higher in comparison with those elicited by astrocyte conditioned medium (ACM), indicating that cell contact does enhance soluble factor activity. Second, treatment of astrocytes with T3 enhances their proliferative property, indicating that T3 modulates the proliferation factor. Furthermore, the behavior of neurons plated on ACM or astrocyte monolayer was very similar regarding T3 effects: survival was not affected by T3 treatment; proliferation was increased in both situations, and the pattern of cluster organization was observed in ACM and monolayer. Such clustering was previously correlated with cell proliferation (Freire et al., 2002).

Contact between the cell surface integrin receptors and ECM ligands has been reported to modulate growth factor responses in several systems (Miyamoto et al., 1996; Jones et al., 1997; Moro et al., 1998). For example, recently, ligation of  $\alpha 6 \beta 1$  integrin has been reported to enhance the function of neuregulin as a survival factor for oligodendrocytes (Colognato et al., 2002). Furthermore, the laminin  $\alpha 2$  subunit, a component of laminin 2, has been shown to lower the amount of platelet-derived growth factor (PDGF) required to elicit an oligodendrocyte survival response in vitro (Frost et al.,



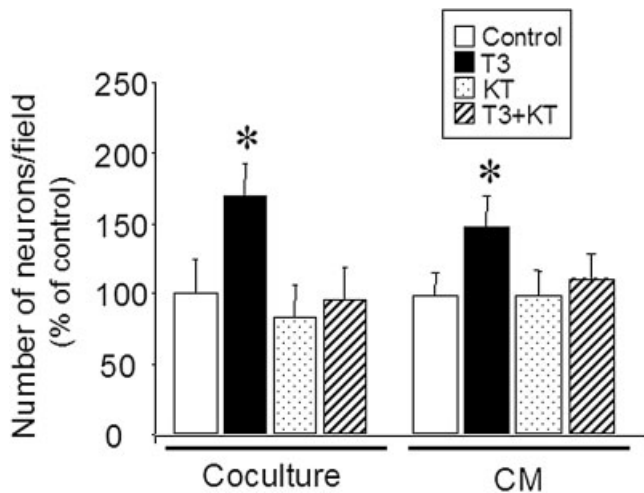


Fig. 6. Effect of the protein kinase A inhibitor KT5720 on neuronal proliferation. E19 cerebellar neurons were cultivated in the presence of T3CM or astrocyte monolayers previously treated with T3, alone or in combination with KT5720 (300 nM for T3CM and 10  $\mu$ M for cocultures). After 24 hr of culture,  $\beta$ -tubulin III-positive cells were quantified. Note that addition of the PKA inhibitor completely inhibited the T3 astrocyte and T3CM effect on number of neurons. None of these inhibitors had a significant effect on control cultures. \* $P < 0.05$ .

1999). Although the mechanism of such regulation has not been completely elucidated,  $\alpha 5 \beta 3$  integrin has been shown to interact directly with the PDGF receptor intracellular signaling pathways and then potentiate the mitotic effects of PDGF on mouse fibroblasts in vitro (Schneller et al., 1997). Several reports have documented that cell proliferation might be regulated by long-range signals from diffusible growth factors, short-range signals from the ECM, and interactions between them (Jones and Jones, 2000; Garcion et al., 2001).

It is interesting to note that, in spite of T3 treatment, cell contact by itself increases the absolute number of neurons, which might be explained by increased proliferation or adhesion under this condition. In fact, astrocytes (despite T3 treatment) have been recognized for a long time as excellent substrates for neuronal growth. In the mature mammalian brain, astrocytes constitute almost one-half of the total cell number, providing structural, metabolic, and trophic support for neurons. Astrocytes represent a potent source for most neurotrophic factors involved in these processes, such as fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF), and epidermal growth factor (EGF) families (Banker, 1980; Connor and Dragunow, 1998; Gomes et al., 2001a,b), and for asymmetric cues during axonal navigation and neuronal polarization (Goodman and Tessier-Lavigne, 1997). More recently, it has been demonstrated that astrocytes from the subventricular zone (SVZ) assist adult neural stem cells toward a neuronal fate (Lim and Alvarez-Buylla, 1999). Culturing dissociated postnatal or adult SVZ cells on astrocyte monolayers supports exten-

sive neurogenesis similar to that observed in vivo. In this case, a direct cell-cell contact between astrocytes and SVZ neuronal precursors seems to be necessary for the production of neuroblasts (Lim and Alvarez-Buylla, 1999). We cannot completely rule out the possibility that, under cell contact conditions, neuronal specification is being favored.

Treatment of astrocytes with EGF yielded results for neuronal proliferation similar to those of treatment with T3. Assays using the tyrosine kinase inhibitor genistein completely inhibited the astrocyte conditioned medium or astrocyte monolayer effect on granular proliferation, indicating that the same signaling pathway (the EGF pathway) is taking place under both conditions. The fact that genistein completely inhibited the neuronal increase induced by T3 suggests that, even in astrocyte carpets, EGF plays a key role in mediating T3-induced neuronal proliferation. Previously, we have demonstrated that treatment of astrocytes with T3 induces secretion of EGF, which in an autocrine fashion induces deposition of laminin and fibronectin on the surface of these cells (Martinez and Gomes, 2002). Our data suggest that ECM molecules secreted by astrocytes in response to T3 treatment might act in synergy with EGF, modulating granular precursors proliferation. Two possibilities might be considered. In the first, ECM molecules directly modulate granular precursors response to EGF. ECM proteins have been demonstrated to enhance EGFR autophosphorylation in a number of cell types, including fibroblasts, smooth muscle, kidney, and epithelial cells (Cybulsky et al., 1994; Miyamoto et al., 1996; Jones et al., 1997; Yarwood and Woodgett, 2001). The second possibility is that ECM molecules activate another pathway, which acts in synergy with EGF. This latter hypothesis has been strengthened by the recent finding that the induction of EGL precursors' proliferation by laminin is mediated by its binding to Shh, a known potent inducer of EGL proliferation (Pons et al., 2001; Blaess et al., 2004).

EGF is a highly mitogenic factor for many mammalian cells systems (Carpenter and Cohen, 1979; Wong and Guillaud, 2004). Its mechanism of action is mainly through a transmembrane receptor, which is part of the Erb family, bearing a tyrosine kinase intracellular domain. Binding of the ligand to the receptor leads to tyrosine kinase domain phosphorylation and activation of a series of intracellular signal pathways, the best known being the mitogen-associated protein kinase (MAPK)-ras cascade (Wong and Guillaud, 2004). Recently, it has been demonstrated that the ras-MAPK cascade is just one of the transcytoplasmic nuclear signaling pathways activated by EGF (Yart et al., 2002; Martinez and Gomes, 2002).

The T3CM effect on neuronal proliferation has been previously demonstrated to be enhanced by forskolin, an adenylate cyclase inducer, supporting a role for cAMP in this process (Gomes et al., 1999b). In the present study we demonstrated that EGF neuronal proliferation is mediated by the PKA-cAMP pathway.

Equally, assays using the PKA inhibitor KT5720 indicated that proliferation triggered by cell contact is also mediated by the same pathway. Although EGF-induced proliferation does not classically involve solely the PKA-cAMP pathway, a synergy between PKA and other pathways, such as MAPK and protein kinase C, has been shown to be involved in EGF responses (Hilborn et al., 1997). Furthermore, a direct interaction between EGFR and PKA has been proposed for tumor cells (Tortora et al., 1997; Ciardiello and Tortora, 1998). This seems to be mediated by the adaptor protein Grb2. In this case, PKA functions downstream of the EGFR and upstream of MAPK. The fact that addition of KT5720 to T3 astrocytes or T3CM completely abolished their effects on neuronal increase strongly suggests a role for the PKA pathway in this event. On the other hand, we cannot completely rule out the involvement of additional pathways acting together with PKA. However, if this is true, they might act downstream of the PKA pathway or might depend on it.

It is interesting that a unique growth factor might trigger distinct responses by activating different signaling pathways. We have previously demonstrated that deposition of laminin and fibronectin in astrocytes in response to T3/EGF treatment is mediated by MAPK/PI3K pathways (Martinez and Gomes, 2002). This event leads to increased differentiation and neurogenesis of granular cells. Addition of PKA inhibitor had no effect on neurogenesis, indicating that this pathway is not implicated in cerebellar granular neuron differentiation (Martinez and Gomes, 2002). Thus, overall, our work demonstrates that distinct signaling pathways are involved in different phases of cerebellar neuron morphogenesis: PKA in proliferation and MAPK-PI3K in axonal growth. Our work suggests that thyroid hormone, via glial cells, might modulate granular cell development through two kinds of interactions: soluble factors and cell contact molecules. How might this idea fit in with *in vivo* thyroid hormone modulation of cerebellar ontogenesis?

The development of cerebellar cortex is strongly impaired by T3 deficiency. T3 is known to modulate the levels of several neurotrophins and their receptors as well as levels of ECM proteins (Neveau and Arenas, 1996; Farwell and Dubord-Tomasetti 1999a,b; Calloni et al., 2001). Although the level of EGF in hypothyroidism has not been evaluated yet, synthesis of laminin is severely altered in this condition (Farwell et al., 1999a,b; Calloni et al., 2001). It is followed by decreased and late proliferation of EGL (Lauder, 1977) as well as deficits in the morphological development of Bergman glia cells (Clos et al., 1980). EGFR and several isoforms of integrins, ECM receptors, have already been identified in the EGL of the cerebellum (Seroogy et al., 1995; Pons et al., 2001; Wong and Guillaud, 2004), which strongly suggests a function for these molecules in cerebellar ontogenesis. Recently, it has been shown that granule cell precursor proliferation is severely affected in  $\beta$ 1 integrin knockout mice, supporting a role for ECM

molecules in the control of EGL proliferation (Blaess et al., 2004). Granular cell precursor proliferation is a complex step, which has been proposed to be modulated by signaling molecules provided by distinct sources, such as meningeal cells, Purkinje cells, glial cells, and granule cell precursors themselves (Barakat et al., 1981; Gao et al., 1991; Smeyne et al., 1995; Gomes et al., 1999b; Klein et al., 2001). Our work indicates that T3 modulates EGL precursor proliferation by inducing astrocytes to secrete EGF and ECM proteins. Our hypothesis implies that distinct cues, cell ECM, and cell-soluble factors, regulate granular cell development and provide insights into how T3 might modulate these events.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Adiel Batista do Nascimento for care and breeding of the animals.

## REFERENCES

- Anderson GW, Schoonover CM, Jones SA. 2003. Control of thyroid hormone action in the developing rat brain. *Thyroid* 13:1039–1056.
- Banker GA. 1980. Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* 209:809–810.
- Barakat I, Wittendorp-Rechenmann W, Rechenmann RV, Sensenbrenner M. 1981. Influence of meningeal cells on the proliferation of neuroblasts in culture. *Dev Neurosci* 4:363–372.
- Bernal J, Nunez J. 1995. Thyroid hormones and brain development. *Eur J Endocrinol* 133:390–398.
- Blaess S, Graus-Porta D, Belvindrah R, Radakovits R, Pons S, Littlewood-Evans A, Senften M, Guo H, Li Y, Miner JH, Reichardt L, Müller U. 2004.  $\beta$ 1-integrins are critical for cerebellar granule cell precursor proliferation. *J Neurosci* 24:3402–3412.
- Blaschuk KL, Frost EE, French-Constant C. 2000. The regulation of proliferation and differentiation in oligodendrocyte progenitor cells by  $\alpha$ V integrins. *Development* 127:1961–1969.
- Calloni GW, Alvarez-Silva M, Vituri C, Trentin AG. 2001. Thyroid hormone deficiency alters extracellular matrix protein expression in rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 126:121–124.
- Carpenter G, Cohen S. 1979. Epidermal growth factor annual. *Rev Biochem* 48:193–216.
- Cayrou C, Denver RJ, Puymirat J. 2002. Suppression of the basic transcription element-binding protein in brain neuronal cultures inhibits thyroid hormone-induced neurite branching. *Endocrinology* 143:2242–2249.
- Ciardiello F, Tortora G. 1998. Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and implications. *Clin Cancer Res* 4:821–828.
- Clos J, Legrand C, Legrand J. 1980. Effects of thyroid state on the formation and early morphological development of Bergman glia in the developing cerebellum. *Dev Neurosci* 3:199–208.
- Colognato H, Baron W, Avellana-Adalid V, Relvas JB, Baron-Van Evercooren A, Georges-Labouesse E, French-Constant C. 2002. CNS integrins switch growth factor signalling to promote target-dependent survival. *Nature Cell Biol* 4:833–841.
- Connor B, Dragunow M. 1998. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Rev* 27:1–39.
- Cybulsky AV, McTavish AJ, Cyr MD. 1994. Extracellular matrix modulates epidermal growth factor receptor activation in rat glomerular epithelial cells. *J Clin Invest* 94:68–78.
- Farwell AP, Dubord-Tomasetti SA. 1999a. Thyroid hormone regulates the expression of laminin in the developing rat cerebellum. *Endocrinology* 140:4221–4227.

- Farwell AP, Dubord-Tomasetti SA. 1999b. Thyroid hormone regulates the extracellular organization of laminin on astrocytes. *Endocrinology* 140:5014–5021.
- Forrest D, Reh TA, Rüschi A. 2002. Neurodevelopmental control by thyroid hormone receptors. *Curr Opin Neurobiol* 12:49–56.
- Freire E, Gomes FC, Linden R, Neto VM, Coelho-Sampaio T. 2002. Structure of laminin substrate modulates cellular signaling for neuritogenesis. *J Cell Sci* 115:4867–4876.
- Frost EE, Buttery PC, Milner R, French-Constant C. 1999. Integrins mediate a neuronal survival signal for oligodendrocytes. *Curr Biol* 9:1251–1254.
- Gao WO, Heintz N, Hatten ME. 1991. Cerebellar granule cell neurogenesis is regulated by cell–cell interactions in vitro. *Neuron* 6:705–715.
- Garcion E, Faissner A, French-Constant C. 2001. Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development* 128:2485–2496.
- Gomes FCA, Garcia-Abreu J, Galou M, Paulin D, Moura Neto V. 1999a. Neurons induce GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. *Glia* 26:97–108.
- Gomes FCA, Maia CG, Menezes JRL, Moura Neto V. 1999b. Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. *Glia* 25:247–255.
- Gomes FCA, Lima FRS, Trentin AG, Moura Neto V. 2001a. Thyroid hormone role in nervous system morphogenesis. *Prog Brain Res* 132:41–50.
- Gomes FCA, Spohr TCL, Martinez R, Moura Neto V. 2001b. Neuron–glia interactions: highlights on soluble factors. *Braz J Med Biol Res* 34:611–620.
- Goodman C, Tessier-Lavigne T. 1997. Molecular Mechanisms of axon guidance and target recognition. In: Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SL, editors. *Molecular and cellular approaches to neural development*. New York: Oxford University Press. p 108–178.
- Haack H, Hynes RO. 2001. Integrin receptors are required for cell survival and proliferation during development of the peripheral glial lineage. *Dev Biol* 233:38–55.
- Heuer H, Mason CA. 2003. Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor  $\alpha 1$ . *J Neurosci* 23:10604–10612.
- Hilborn MD, Rane SG, Pollock JD. 1997. EGF in combination with depolarization or cAMP produces morphological but not physiological differentiation in PC12 cells. *J Neurosci Res* 47:16–26.
- Jones PL, Jones FS. 2000. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol* 19:581–596.
- Jones PL, Crack J, Rabinovitch M. 1997. Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the  $\alpha v \beta 3$  integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J Cell Biol* 139:279–293.
- Klein RS, Rubin JB, Gibson HD, DeHaan EN, Alvarez-Hernandez X, Segal RA, Luster AD. 2001. SDF-1  $\alpha$  induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells. *Development* 128:1971–1981.
- Komuro H, Yacubova E, Rakic P. 2001. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci* 21:527–540.
- Lauder JM. 1977. The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. III. Kinetics of cell proliferation in the external granular layer. *Brain Res* 126:31–51.
- Lauder JM. 1978. Effects of early hypo- and hyperthyroidism on development of rat cerebellar cortex. IV. The parallel fibers. *Brain Res* 142:25–39.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A. 1999. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7526–7531.
- Martinez R, Gomes FC. 2002. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* 277:49311–49318.
- Miale IL, Sidman RL. 1961. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol* 47:26–41.
- Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. 1996. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 135:1633–1642.
- Moro L, Venturino M, Bozzo C, Silengo L, Altruda F, Beguinot L, Tarone G, Defilippi P. 1998. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J* 17:22–32.
- Morte B, Manzano J, Scanlan T, Vennström B, Bernal J. 2002. Deletion of the thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3985–3989.
- Morte B, Manzano J, Scanlan T, Vennström B, Bernal J. 2004. Aberrant maturation of astrocytes in thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  knockout mice reveals an interplay between thyroid hormone receptor isoforms. *Endocrinology* 145:1386–1391.
- Neveu I, Arenas E. 1996. Neurotrophins promote the survival and development of neurons in the cerebellum of hypothyroid rats in vivo. *J Cell Biol* 133:631–646.
- Nicholson JL, Altman J. 1972. The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation. *Brain Res* 44:13–23.
- Pons S, Trejo JL, Martinez-Morales JR, Marti E. 2001. Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development* 128:1481–1492.
- Schneller M, Vuori K, Ruoslahti E. 1997.  $\alpha v \beta 3$  integrin associates with activated insulin and PDGF $\beta$  receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J* 16:5600–5607.
- Seroogy KB, Gall CM, Lee DC, Kornblum HI. 1995. Proliferative zones of postnatal rat brain express epidermal growth factor receptor mRNA. *Brain Res* 670:157–164.
- Singh R, Upadhyay G, Kumar S, Kapoor A, Kumar A, Tiwari M, Godbole MM. 2003. Hypothyroidism alters the expression of Bcl-2 family genes to induce enhanced apoptosis in the developing cerebellum. *J Endocrinol* 176:39–46.
- Smeyne RJ, Chu T, Lewin A, Bian F, S-Crisman S, Kunsch C, Lira SA, Oberdick J. 1995. Local control of granule cell generation by cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci* 6:230–251.
- Tortora G, Damiano V, Bianco C, Baldassarre G, Bianco AR, Lanfrancione L, Pelicci PG, Ciardiello F. 1997. The R1 $\alpha$  subunit of protein kinase A (PKA) binds to Grb2 and allows PKA interaction with the activated EGF-receptor. *Oncogene* 14:923–928.
- Trentin AG, Gomes FCA, Lima FRS, Moura Neto V. 1998. Thyroid hormone induces secretion of factors and progressive morphological changes on primary and subcultured astrocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* 34:280–282.
- Trentin AG, De Aguiar CB, Garcez RC, Alvarez-Silva M. 2003. Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effects on astrocyte adhesion. *Glia* 42:359–369.
- Wong RWC, Guillaud L. 2004. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:147–156.
- Yart A, Chap H, Raynal P. 2002. Phosphoinositide 3-kinases in lysophosphatidic acid signaling: regulation and cross-talk with the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochim Biophys Acta* 1582:107–111.
- Yarwood SJ, Woodgett JR. 2001. Extracellular matrix composition determines the transcriptional response to epidermal growth factor receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4472–4477.

# ANEXO II

# Neuritogenesis Induced by Thyroid Hormone-treated Astrocytes Is Mediated by Epidermal Growth Factor/Mitogen-activated Protein Kinase-Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways and Involves Modulation of Extracellular Matrix Proteins\*

Received for publication, September 10, 2002  
Published, JBC Papers in Press, September 27, 2002, DOI 10.1074/jbc.M209284200

Rodrigo Martinez and Flávia Carvalho Alcantara Gomes‡

From the Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Anatomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Thyroid hormone (T3) plays a crucial role in several steps of cerebellar ontogenesis. By using a neuron-astrocyte coculture model, we have investigated the effects of T3-treated astrocytes on cerebellar neuronal differentiation *in vitro*. Neurons plated onto T3-astrocytes presented a 40–60% increase on the total neurite length and an increment in the number of neurites. Treatment of astrocytes with epidermal growth factor (EGF) yielded similar results, suggesting that this growth factor might mediate T3-induced neuritogenesis. EGF and T3 treatment increased fibronectin and laminin expression by astrocytes, suggesting that astrocyte neurite permissiveness induced by these treatments is mostly due to modulation of extracellular matrix (ECM) components. Such increase in ECM protein expression as well as astrocyte permissiveness to neurite outgrowth was reversed by the specific EGF receptor tyrosine kinase inhibitor, tyrphostin. Moreover, studies using selective inhibitors of several transduction-signaling cascades indicated that modulation of ECM proteins by EGF is mainly through a synergistic activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. In this work, we provide evidence of a novel role of EGF as an intermediary factor of T3 action on cerebellar ontogenesis. By modulating the content of ECM proteins, EGF increases neurite outgrowth. Our data reveal an important role of astrocytes as mediators of T3-induced cerebellar development and partially elucidate the role of EGF and mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase pathways on this process.

Thyroid hormone (3,5,3'-triiodothyronine, T3)<sup>1</sup> is essential for normal development of the vertebrate nervous system (NS), in-

\* This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Comité Français d'Evaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil (CAPES-COFECUB), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho de Ensino para Graduados e Pesquisa-Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEPG-UFRJ), and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência-2-Ministério de Ciência e Tecnologia (PRONEX2-MCT). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ To whom correspondence should be addressed: Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Anatomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco F, Ilha do Fundão 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: 55-21-2562-6460; E-mail: fgomes@anato.ufrj.br.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: T3, triiodothyronine; NS, nervous system; CNS, central nervous system; ECM, extracellular matrix protein; EGF, epidermal growth factor; EGFR, EGF receptor; EGL, external granular layer; MAPK, mitogen-activated protein (MAP) kinase; MEK,

fluencing diverse processes of brain development such as neuronal migration, neurite outgrowth, synapse formation, myelination, and glial cell differentiation (1–5). Although the T3 role on central nervous system (CNS) morphogenesis is well documented, the precise mechanism of hormone action is not completely understood. To gain insights into T3 effects on CNS we have focused on the cerebellum ontogenesis, which is one of the most dramatically affected brain structures in hypothyroidism (6, 7).

Most of the granular cells of the cerebellum arise from the external granular cell layer (EGL). Postnatally, these cells migrate from the premigratory zone of the EGL to the internal granular layer, leaving their axons behind to produce the molecular layer. These events are accompanied by a progressive morphological differentiation of Purkinje cells characterized by perisomatic extensions and dendritic trees (8–10). Although cerebellar histogenesis is well studied, the molecular mechanisms that control proliferation and differentiation of granular cells are still unknown. These processes have been shown to undergo dramatic modulation by thyroid hormone (6, 10, 11). Besides a series of abnormalities found in the cerebellar cortex, hypothyroidism causes a decrease in EGL proliferation rate, increased neuronal death in the internal granular layer, impaired migration of granular cells, and a deficiency in the elaboration of Purkinje cell dendritic trees, spines, and synapses (6).

Although a few genes have been shown to be directly modulated by T3 in the cerebellum, the molecular mechanism of T3 action on this brain region is still controversial (12–14). It has been proposed that such endocrine regulation of cerebellar development might be the result of T3-dependent modulation of secretion of several growth factors such as neurotrophin 3, nerve growth factor, insulin growth factor, and brain-derived neurotrophic factor (15, 16).

Astrocytes have been pointed out as the major source of trophic factors in the CNS (17–19). The fact that thyroid hormone treatment of astrocytes is associated *in vitro* with the secretion of several growth factors makes the astrocyte a putative candidate for mediating T3 action on neural histogenesis (19, 20). Recently, we described a novel mechanism for T3 action over granular neurons mediated by astrocytes. We demonstrated that cerebellar astrocytes treated by T3 secrete a combination of growth factors such as epidermal growth factor (EGF) and tumor necrosis factor- $\beta$ , which induces proliferation of cerebellar granular neurons *in vitro* (19).

In the present work, we used an *in vitro* system of neuron-astrocyte coculture to assess the effects of T3 mediated by

MAPK/extracellular signal regulated kinase kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; CM, conditioned medium.

astrocytes on another step of cerebellar morphogenesis such as granule cell differentiation. We provide evidence that EGF secreted by astrocytes in response to T3 presents a binary role in cerebellar ontogenesis; acting directly on neurons, EGF promotes proliferation of granular cell precursors, and indirectly, EGF increases neuronal morphological differentiation by modulating the content of two astrocytic extracellular matrix (ECM) proteins, laminin and fibronectin. Furthermore, we suggest that EGF modulation of ECM proteins is mainly mediated by activation of MAPK and PI3K pathways. Together, our work gives glial cells a novel attribute as mediators of the endocrine-regulated cerebellar development and describes an additional role for EGF on brain morphogenesis.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Astrocyte Primary Cultures**—Primary astrocyte cultures were prepared from cerebella derived from newborn Wistar rats (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) after the procedure previously described (19, 21). After rats were decapitated, cerebella were removed and carefully stripped off the meninges. Tissues were washed in phosphate-buffered saline, 0.6% glucose (Sigma) and dissociated into single cells in a medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and nutrient mixture F-12 (Sigma) enriched with glucose ( $3.3 \times 10^{-2}$  M), glutamine ( $2 \times 10^{-3}$  M), and sodium bicarbonate ( $0.3 \times 10^{-2}$  M). Cells were plated onto plastic culture flasks (Sigma) or glass cover slips (24 wells plates, Sigma), previously coated with polyornithine (1.5  $\mu$ g/ml,  $M_r$  41,000, Sigma) in DMEM/F-12 medium supplemented with 10% fetal calf serum (Fazenda Pigue, Rio de Janeiro, RJ). The cultures were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere. Cell culture medium was changed 24 h after plating and subsequently every third day until reaching confluence, which usually occurred after 7–10 days.

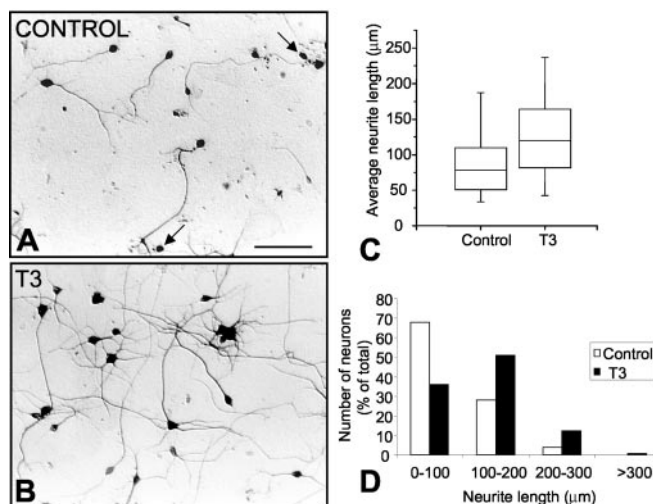
**T3 and EGF Treatment**—After reaching confluence, glial monolayers were extensively washed with serum-free DMEM/F-12 medium and incubated as previously described for an additional day in serum-free medium. After this period, cultures were treated with 50 nM 3-3'-5 triiodo-L-thyronine (T3, Sigma) and/or 10 ng/ml of EGF (Invitrogen) in DMEM/F-12 for 3 days, which was renewed every day except after the third day. Control cultures were maintained in DMEM/F-12 without fetal calf serum with medium changes equivalent as those of T3/EGF-treated cultures.

**Conditioned Medium (CM) Preparation**—Conditioned medium was obtained as previously described (19). After the third day of T3 treatment, control and hormone-treated cultures were maintained for 2 days without medium change, and the CM was collected on the second day after the end of T3 treatment. CM derived from either T3-treated cells (T3CM) or control cultures (CCM) was clarified by centrifugation at  $1500 \times g$  for 10 min and used immediately or stored in aliquots at -20 °C for further use. T3CM was confirmed to be free of residual T3 by radioimmunoassay as previously described (19).

**Neuron Primary Cultures and Cocultures**—Neurons were prepared from cerebella derived from 19-day Wistar rat embryos (E19) as previously described (19, 21). Briefly, cells were freshly dissociated from cerebellum, and  $1 \times 10^5$  cells were plated onto glass cover slips previously coated with polyornithine (1.5  $\mu$ g/ml,  $M_r$  41,000, Sigma) in T3CM or CCM. For coculture assays, neurons were plated onto glial monolayer carpets nontreated or previously treated by T3. Cultures were kept for 24 h at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere.

**Inhibition Assays**—Astrocyte monolayers were concomitantly treated by EGF (10 ng/ml) or T3 (50 nM) and specific signaling pathway inhibitors for 3 days accordingly to the previously described protocol. To prevent a direct action of the inhibitors on neurons on coculture assays, inhibitor-containing medium was replaced by drug-free medium immediately before neuronal plating. Cocultures were kept for 24 h. The following inhibitors were used: PD98059, MAPK-specific inhibitor (50  $\mu$ M); LY294002, PI3K-specific inhibitor (5  $\mu$ M); genistein, tyrosine kinase inhibitor (2.5  $\mu$ M); bis-tyrphostin, potent and specific inhibitor of the EGF receptor (EGFR) (500 nM); KT5720, specific inhibitor of protein kinase A (400 nM). All inhibitors were purchased from Calbiochem and diluted in methyl sulfoxide (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, Sigma).

**Immunocytochemistry**—Immunostaining was performed as previously described (19). Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 3 min (for extracellular matrix protein labeling) or 20 min (for cytoskeleton protein labeling), extensively washed with phosphate-buffered saline, and in the case of cytoskeleton protein labeling, permeabilized with 0.2% Triton X-100. For peroxidase assays, endogenous per-



**FIG. 1. Astrocytes treated by T3 increase cerebellar neurite outgrowth.** Cerebellar neurons obtained from E19 rats were cultivated for 24 h onto control (A) and hormone-treated astrocyte monolayers (B). Subsequently, cells were fixed and immunostained using a monoclonal anti- $\beta$ -tubulin III reagent as the primary antibody. Total neurite length (C and D) was obtained using the Sigma Scan Pro Software (Jandel Scientific). In all cases, at least 100 neurons randomly chosen were observed. Hormone treatment strongly enhanced astrocyte permissiveness to neurite outgrowth. Arrows in A shows aneuritic neurons frequently found on control carpets. A higher density of neurons as well as those with longer neurites can be observed on T3-carpet (B). Statistical significance was observed for all groups ( $p < 0.05$ ). The scale bar corresponds to 50  $\mu$ m.

oxidase activity was abolished with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 min followed by extensive washing with phosphate-buffered saline. Cells were incubated with 5% bovine serum albumin (Invitrogen) in phosphate-buffered saline (blocking solution) for 30 min and subsequently with the specified primary antibodies, diluted in blocking solution, overnight at 4 °C. Primary antibodies were mouse anti-human  $\beta$ -tubulin III antibody (1:400 dilution; Sigma), rabbit anti-mouse laminin (1:30 dilution; Sigma), and rabbit anti-human fibronectin (1:200 dilution, Dako, Carpinteria, CA). Secondary antibodies were conjugated with Cy3 (sheep anti-rabbit, 1:3000 dilution, Sigma) or horseradish peroxidase (goat anti-mouse, 1:200; Invitrogen). Peroxidase activity was revealed with 3,3'-diaminobenzidine (Sigma). Negative controls were created by omitting primary antibodies during staining. In all cases, no reactivity was observed when the primary antibody was absent. Cell preparations were mounted directly on *N*-propyl gallate for fluorescence assays, or in the case of peroxidase reactions, they were dehydrated in a graded ethanol series, and coverslips were mounted in Entellan (Merck).

**Morphometry and Statistical Analysis**—Neurons stained with anti- $\beta$ -tubulin III antibody were photographed in a Nikon microscope (Nikon Eclipse TE300). Photos were scanned, and the numbers of neurites and total neurite length were analyzed using the Sigma Scan Pro Software (Jandel Scientific). In each experiment (at least three independent experiments were done), about 100 neurons per well, encompassing five fields randomly chosen, were analyzed. The data were stored, and graphical and statistical analyses were performed using the Microsoft Excel version 7.0.

#### RESULTS

**Cerebellar Astrocytes Treated by T3 Enhance Number and Neurite Outgrowth**—To investigate the role of astrocytes as mediators of T3 action in cerebellum ontogenesis, we analyzed outgrowth and number of neurites of cerebellar neurons cultivated with T3-treated astrocytes. Cerebellar neurons derived from 19-day embryonic rats (E19) were plated onto cerebellar astrocyte monolayers previously treated by T3. After 24 h, cells were immunostained for the neuronal marker,  $\beta$ -tubulin III, and number and total length of neurites were measured. Such analysis revealed a clear difference between neurons plated on the two carpets (Fig. 1). We observed a 40–60% increment on total neurite length of cells plated onto T3-treated astrocyte monolayers as well as an increased number of neurons as

expected due to the previous reported T3-astrocyte action on neuronal proliferation (19) (Fig. 1C). Neurite sprouting started as early as 2 h of culturing in both control and treated monolayers, although a significant difference in neurite length between these two conditions could already be noted at this time (1.6-fold increase) (data not shown). On T3-astrocyte carpets, most of the neurons developed neurites with average size between 100 and 200  $\mu\text{m}$ , whereas most of those plated onto control astrocytes exhibited an average size between 0 and 100  $\mu\text{m}$  (Fig. 1D). A major difference was observed for neurons with extensive neurites (200  $\mu\text{m}$  or more). Whereas 13% of neurons presented this pattern of neuritogenesis when plated onto T3-treated astrocytes, only 4% of those plated onto control astrocytes developed neurites between 200 and 300  $\mu\text{m}$  (Fig. 1D). Neurites longer than 300  $\mu\text{m}$  were rarely observed in control condition (Fig. 1D).

Analysis of neuronal morphology revealed a dramatic improvement of neurite number of cells plated onto T3-treated astrocytes. As shown in Fig. 2B, there was a 50% decrease on the number of neurons without neurites on T3-treated astrocytes. Furthermore, a significant increase was also observed on the number of neurons with two or more neurites in this condition (Fig. 2B). A few neurons extended three or more neurites when plated onto T3-monolayers; on the other hand, they very seldom presented this pattern when plated onto control cul-

tures (Fig. 2A). Taken together these data indicate that cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone positively modulate neuritogenesis of cocultured neurons.

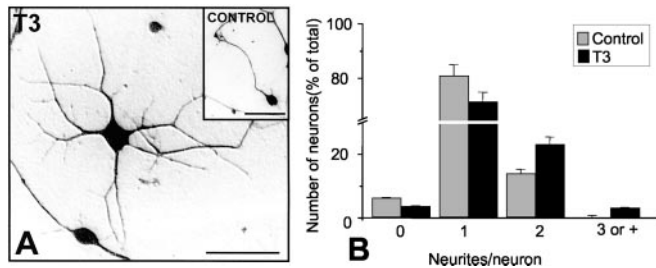
**T3-astrocyte-induced Neuritogenesis Is Indirectly Mediated by EGF**—We previously described that astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation by secreting growth factors, one of them identified as EGF (19). To evaluate the involvement of T3-astrocyte-derived EGF on neurite outgrowth, cerebellar astrocyte cultures were treated by EGF and T3 alone or in combination as described. After treatment, embryonic neurons were plated onto different astrocyte carpets, and the number and length of neurites were analyzed (Fig. 3).

Treatment of astrocytes by EGF induced a neurite outgrowth similar to that promoted by T3 treatment (Fig. 3C). Quantitative analyzes revealed that under this condition there was a significant increase in the average neurite length. Most of the neurons plated onto EGF-astrocytes extended neurites ranging from 100 to 200  $\mu\text{m}$  in contrast to the great majority of those kept onto control astrocytes, which exhibit neurites shorter than 100  $\mu\text{m}$  (Fig. 3E). It is noteworthy that a significant increase in the number of neurons presenting 200–300  $\mu\text{m}$  neurites was observed in EGF-astrocyte carpets (150%) (Fig. 3E).

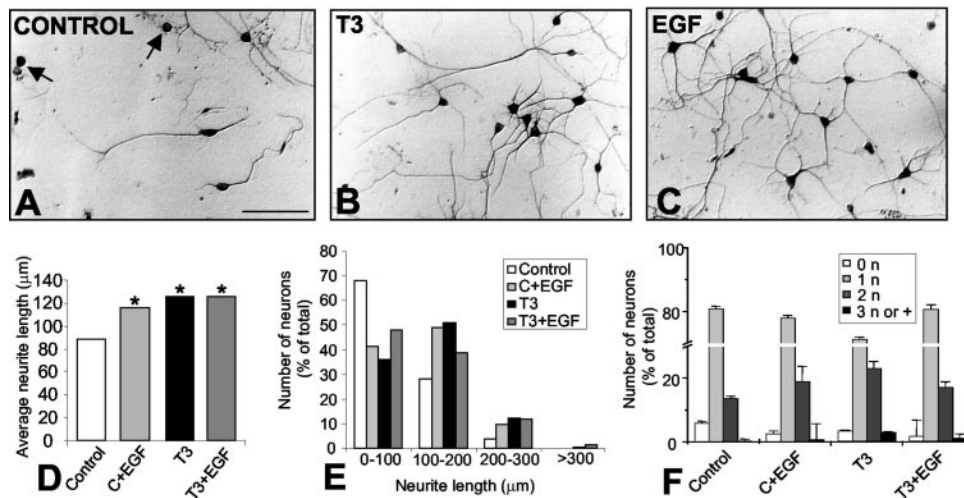
Neurite number was also affected by EGF treatment of astrocytes. The fraction of aneuritic neurons was significantly decreased by EGF treatment (50%, Fig. 3F), whereas neurons with two neurites were substantially increased (40%). Neurons with three or more processes, virtually absent from control cocultures, were often observed after EGF treatment (Fig. 3F). Surprisingly, the addition of EGF concomitantly to T3 did not enhance T3 effect on either number or length of neurites (Fig. 3, E and F).

To discriminate between a direct and indirect action of EGF on neuritogenesis, we cultivated embryonic neurons on conditioned medium derived from hormone-treated astrocytes (T3CM). After 24 h, outgrowth and number of neurites were evaluated as previously described. Culture of cerebellar neurons on T3CM did not promote significant increment in either total neurite length or number of neurites when compared with CCM (Fig. 4), indicating that astrocytic EGF secreted in response to T3 treatment is not directly implicated in modulation of cerebellar neuritogenesis.

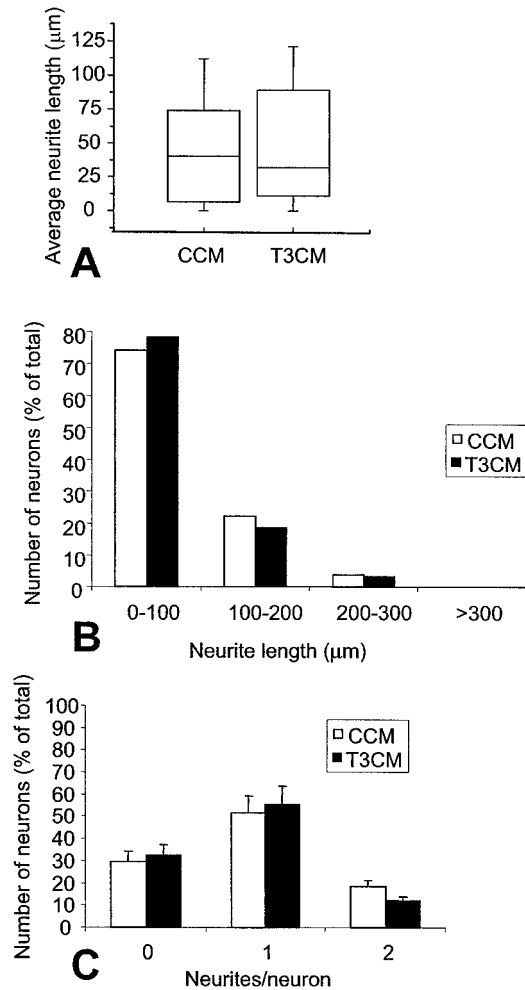
To fully implicate EGF on T3 modulation of neurite outgrowth, we blocked its activity with genistein and tyrphostin,



**FIG. 2. Astrocytes treated by T3 increase neuritogenesis.** Cerebellar neurons obtained from E19 rats were cultivated for 24 h onto hormone-treated (A) and control astrocyte monolayers (inset). After 24 h of coculture, neurons were morphologically characterized by  $\beta$ -tubulin III immunostaining, and number of neurites was obtained using the Sigma Scan Pro Software (Jandel Scientific) (B). In all cases, at least 100 neurons randomly chosen were observed. T3-astrocytes promoted neuronal arborization. A complex neuritic network was frequently observed on neurons plated onto T3-astrocytes. Statistical significance was observed for all groups ( $p < 0.05$ ). Scale bars correspond to 25  $\mu\text{m}$ .



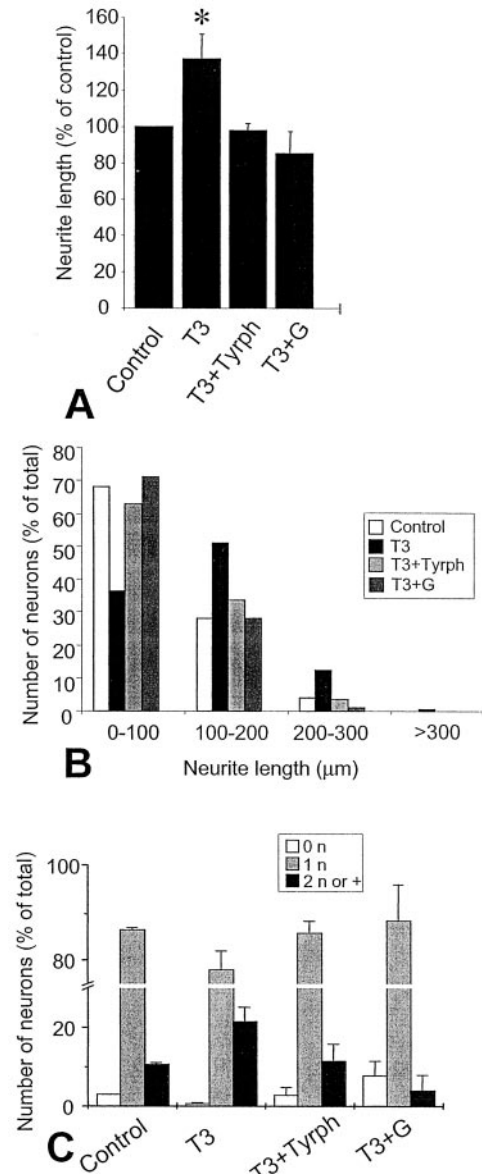
**FIG. 3. Effect of EGF on cerebellar neuritogenesis.** Cerebellar neurons obtained from E19 rats were plated onto astrocyte monolayers nontreated (A) or previously treated by T3 (B) or EGF (C) (10 ng/ml) alone or in combination. Cultures were kept for 24 h before quantification of length (D and E) and number of neurites (F) as previously described. EGF treatment of astrocytes significantly enhanced astrocyte permissiveness for neuritogenesis. Arrows in A show aneuritic neurons. The asterisk in D corresponds to  $p < 0.001$ ; n, neurites; C, control. The scale bar corresponds to 50  $\mu\text{m}$ .



**FIG. 4. Conditioned medium derived from T3-treated astrocytes does not increase number and neurite outgrowth.** Cerebellar neurons obtained from E19 rats were maintained for 24 h on conditioned medium derived from nontreated (CCM) and T3-treated astrocytes (T3CM). Subsequently,  $\beta$ -tubulin III-positive cells were analyzed as described under "Experimental Procedures." Total length (A and B) and number of neurites (C) were obtained using the Sigma Scan Pro Software (Jandel Scientific). In all cases, at least 100 neurons randomly chosen were observed. T3CM did not affect the number and outgrowth of neurites. All groups analyzed did not present significant statistical relevance ( $p > 0.05$ ).

two EGFR inhibitors. Astrocytes were concomitantly treated by T3 and genistein or tyrphostin, as previously described (Fig. 5). Inhibitor-containing medium was replaced by drug-free medium immediately before neuronal plating. After treatment, E19 cerebellar neurons were settled onto astrocyte carpets, and number and length of neurites were analyzed after 24 h of coculture. Trypan blue viability assays showed that cell viability was not altered by inhibitors (data not shown). Genistein and tyrphostin treatment of T3-astrocyte monolayers dramatically affected the average neurite length (Fig. 5A). Under these conditions, an increment was observed in the number of neurons extending short processes (0–100  $\mu$ m) followed by a striking decrease in those with longer neurites (Fig. 5B). Similar results were obtained by concomitant treatment of astrocyte carpets with EGF and inhibitors (data not shown).

Number of aneuritic neurons was severely increased by concomitant treatment of astrocytes with T3 and genistein or tyrphostin, especially the former (7–10 times), whereas the fraction of more branched neurons (two or more neurites) clearly decreased after inhibitor treatment (Fig. 5C). Together, our data highly implicate EGF in mediation of neuritogenesis



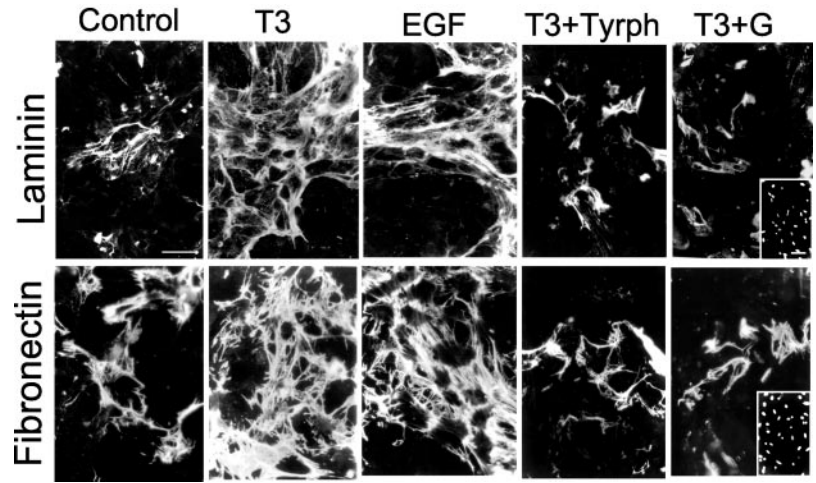
**FIG. 5. Effect of the EGFR tyrosine kinase inhibitors genistein and tyrphostin on neurite outgrowth induced by T3-astrocytes.** E19 cerebellar neurons were cultivated onto astrocyte monolayers previously treated by T3 alone or in combination with genistein (2.5  $\mu$ M) (G) and tyrphostin (500 nM) (Tyrph). Inhibitor-containing medium was replaced by drug-free medium immediately before neuronal plating. After 24 h of culture the average of neurite length (A and B) and number of neurites (C) were analyzed as previously described. The asterisk corresponds to  $p < 0.001$ ; n, neurites. Note that addition of genistein or tyrphostin completely inhibited T3-astrocyte effect on number and outgrowth of neurites. None of these inhibitors had a significant effect on control cultures (data not shown).

induced by T3-treated astrocytes. However, our data strongly suggest a diverse mechanism of action for EGF in neuritogenesis (indirect) from the one previously described by us to modulate neuronal proliferation (direct) (19).

**EGF Effect on Cerebellar Neuritogenesis Is Mediated by Extracellular Matrix Proteins**—Because we demonstrated that T3CM, which contains EGF, does not enhance neurite outgrowth, we assume that EGF action on neuritogenesis might be indirect, possibly modulating secretion of additional molecules by astrocytes. Neurite growth of CNS neurons is primarily dependent of ECM protein expression. Within ECM components, laminin and fibronectin play a major role in stimulating neurite outgrowth during NS development. To evaluate the



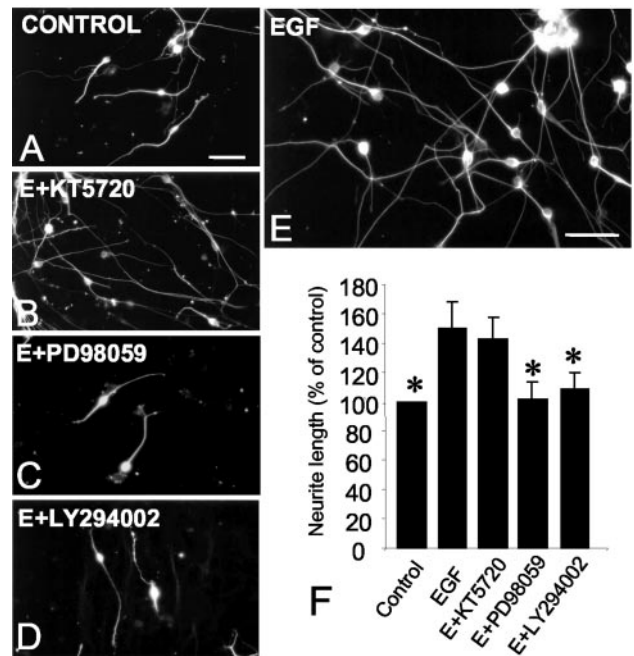
**FIG. 6. T3 and EGF modulate astrocyte production of extracellular matrix proteins.** Cerebellar astrocyte cultures treated by EGF (10 ng/ml) or T3 (50 nM) as described under "Experimental Procedures" were immunostained for the ECM proteins laminin (*upper panel*) and fibronectin (*lower panel*). Note that either T3 or EGF greatly potentiated ECM production by astrocytes. The addition of genistein or tyrphostin strongly reversed this phenomenon. *Control*, nontreated astrocytes; *T3*, astrocytes treated by T3; *EGF*, astrocytes treated by EGF; *T3+G*, astrocytes concomitantly treated by T3 and genistein; *T3+Tyrph*, astrocytes concomitantly treated by T3 and tyrphostin. *Insets* show a 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear immunolabeling of a T3 and genistein astrocyte culture, which is equivalent for all conditions. *Scale bars* correspond to 100  $\mu\text{m}$ .



involvement of these ECM proteins in EGF-induced neurite outgrowth, T3 and EGF-treated astrocytes were immunolabeled for laminin and fibronectin. As shown in Fig. 6, both proteins had their pattern of expression highly augmented after T3 and/or EGF treatments. Although in control cultures laminin and fibronectin were restricted to certain groups of cells, in treated cultures the staining was more uniform and widespread throughout cultures (Fig. 6). Staining was mostly extracellular with a network of thick and fibrous strands. Concomitant treatment of astrocytes with T3 and the EGFR inhibitors, genistein and tyrphostin, decreased fibronectin and laminin staining (Fig. 6), strongly implicating the EGF pathway in this process. Similar results were obtained by the addition of these inhibitors to EGF-treated astrocytes (data not shown). Together, these results strongly suggest that modulation of ECM protein expression might be the major mechanism by which EGF indirectly promotes neurite outgrowth of cerebellar neurons *in vitro*.

**EGF Modulates Laminin and Fibronectin Expression through MAPK and PI3K Pathways**—The biological response to EGF might be determined by activation of distinct signaling pathways. To define the signaling molecules involved in EGF-induced cerebellar neuritogenesis and laminin/fibronectin overexpression we used several kinase inhibitors (Figs. 7 and 8). Astrocyte monolayers concomitantly treated with EGF and the specific inhibitor for 3 days were used as carpets for cerebellar neurons. To prevent a direct action of the drug on neurons rather than a glia-mediated effect, inhibitor-containing medium was replaced by drug-free medium before neuronal plating. PD98059, a selective inhibitor of MEK (MAPK/extracellular signal regulated kinase kinase), completely blocked EGF-induced neuritogenesis (Fig. 7). Similar results were obtained by administration of LY294002, a specific inhibitor of the PI3K (Fig. 7). In contrast, KT5720, a specific inhibitor of protein kinase A, did not block EGF effects on neuritogenesis (Fig. 7). Neither inhibitor had effect on control astrocytes (data not shown). Trypan blue viability assays revealed that all inhibitors were used in nontoxic concentrations (data not shown).

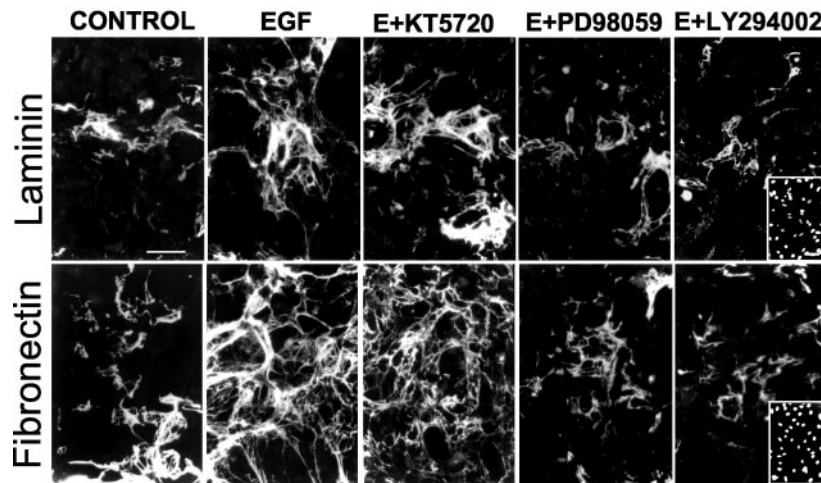
To further correlate EGF-induced neuritogenesis with ECM expression, astrocyte carpets treated by EGF and kinase inhibitors were immunostained for laminin and fibronectin (Fig. 8). In agreement with their effects on neuritogenesis, PD98059 and LY294002 dramatically attenuated EGF-induced ECM overexpression (Fig. 8). As expected, KT5720 did not prevent laminin and fibronectin overexpression induced by EGF. These data highlight the straight correlation between EGF modulation of neuritogenesis and ECM overexpression and strongly implicate the MAPK and PI3K pathways in this process.



**FIG. 7. Effect of kinase inhibitors on EGF-induced neurite outgrowth.** E19 cerebellar neurons were cultivated onto astrocyte monolayers nontreated (*Control*; *A*) or previously treated by EGF (10 ng/ml) alone (*EGF*; *E*) or in combination with KT5720 (400 nM) (*E* + *KT5720*; *B*), PD98059 (50  $\mu\text{M}$ ) (*E* + *PD98059*; *C*), and LY294002 (5  $\mu\text{M}$ ) (*E* + *LY294002*; *D*). Inhibitor-containing medium was replaced by drug-free medium immediately before neuronal plating. After 24 h of coculture, cells were immunolabeled for  $\beta$ -tubulin III (*A*–*E*), and the average of neurite length (*F*) was analyzed. EGF greatly potentiated neuritogenesis. The addition of PD98059 and LY294002 greatly prevented this phenomenon, whereas that of KT5720 had no effect on neuritogenesis. None of these inhibitors had a significant effect on control cultures (data not shown). Concomitant treatment of astrocytes with EGF and methyl sulfoxide did not impair EGF effect. The asterisk corresponds to  $p < 0.001$  in comparison to EGF. The scale bar corresponds to 100  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSION

In the present work, we provide the first evidence that EGF secreted by T3-treated astrocytes induces EGL neurons to undergo differentiation initiated by outgrowth of neurites. Such an event is mediated by EGF modulation of laminin and fibronectin astrocytic expression through MAPK and PI3K pathways. The present findings together with those previously described by us (19) suggest a binary role for EGF on cerebellar ontogenesis, directly, on granular precursors proliferation and,



**FIG. 8. Effect of kinase inhibitors on EGF-induced astrocyte production of ECM proteins.** Astrocyte carpets were treated by EGF and specific inhibitors according to “Experimental Procedures.” After treatments, cultures were immunolabeled for the ECM proteins laminin and fibronectin. EGF strongly potentiated ECM production by astrocytes. The addition of PD98059 and LY294002 greatly prevented this phenomenon, whereas that of KT5720 had no effect on ECM pattern. None of these inhibitors had a significant effect on control cultures (data not shown). *Control*, nontreated astrocytes; *EGF*, EGF-treated astrocytes; *E+KT5720*, astrocytes concomitantly treated by EGF and KT5720 (400 nM), *E+PD98059*, astrocytes concomitantly treated by EGF and PD98059 (50  $\mu$ M), *E+LY294002*, astrocytes concomitantly treated by EGF and LY294002 (5  $\mu$ M). *Insets* show a 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear immunolabeling of an E+LY294002 astrocyte culture, which is equivalent for all conditions. *Scale bars* correspond to 100  $\mu$ m.

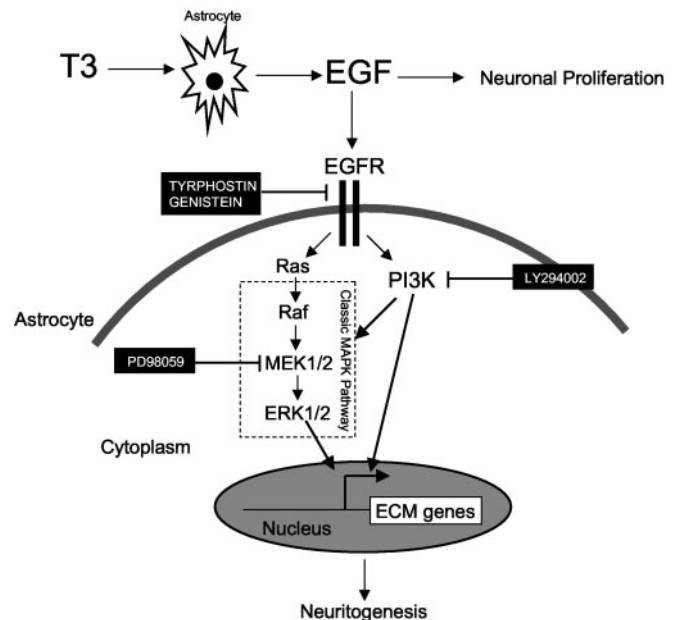
indirectly, through ECM components in neurite outgrowth. Our data create a new scenario on the role of EGF and glial cells as mediators of T3 action on cerebellar development.

Astrocytes have been well recognized as the major source of ECM components including fibronectin and laminin both *in vivo* and *in vitro* (22–24). The pattern of these ECM proteins on the astrocyte surface, which is highly modulated by thyroid hormone, provides directional cues to neurite outgrowth (22, 25–28).

We now report that astrocytes treated by T3 or EGF greatly increased laminin and fibronectin fibrils in the extracellular space, thus providing a permissive substrate to neurite outgrowth. Our data contrast with those obtained from Farwell and Dubord-Tomasetti (29), who demonstrated that T4 but not T3 increases laminin expression. We believe, however, that this apparent discrepancy between these two works most likely reflect fundamental differences in the technical approaches such as hormone treatment schedule, hormone concentration, and differences in culture conditions. Furthermore, those authors have cultured astrocytes derived from whole brain, whereas we have used in our study astrocytes derived from cerebellum. It has been speculated that spatial differences in the expression of T3 receptors account for the variety of T3 response elicited in brain structures (3, 30).

The addition of the EGFR tyrosine kinase inhibitor, tyrphostin, to T3-treated astrocytes greatly inhibited the ECM increment elicited by the hormone as well as impaired astrocyte permissivity to neurite extension. These data strongly suggest that T3-induced ECM augmentation in astrocytes is mediated by EGF. Furthermore, because no additive effects on neurite outgrowth were observed in astrocytes treated by EGF and T3 in combination, it seems likely that the two growth factors act probably through the same pathway, *i.e.* induction of ECM components. Because T3-astrocytes already produce EGF (19), we assume that the addition of exogenous EGF raises the growth factor concentration beyond the saturation limit optimum for its effect.

T3 has been proposed to directly modulate some ECM genes (31, 32); however, a direct T3 regulation has not been undoubtedly reported for laminin and fibronectin. Our results do not completely rule out a T3 direct regulation of these proteins;



**FIG. 9. Schematic representation outlining the roles of MAPK and PI3K pathways in the EGF-induced cerebellar neuritogenesis.** Thyroid hormone induces astrocytes to secrete EGF. Directly, EGF induces neuronal proliferation; indirectly, by modulating the content of astrocytic ECM proteins, EGF increases neurite outgrowth. EGF effects are triggered by EGFR tyrosine kinase signaling mediated by cooperation between MAPK and PI3K pathways. Two possibilities are depicted; 1) PI3K and MAPK cascades are independently activated, or 2) The two pathways cross-talk somewhere. The influences of general tyrosine kinase inhibition (genistein), EGFR inhibition (tyrphostin), classic MAPK pathway inhibition (PD98059), and PI3K pathway inhibition (LY294002) are shown.

however, they reveal an additional new mechanism for ECM protein modulation mediated by EGF in the NS. Together with ours, the recent finding that fibronectin mRNA is increased by activation of the EGFR in cardiac fibroblasts (33) and EGFR gene amplification is associated with laminin overexpression in tumor cell lines (34) suggest that EGF modulation of laminin and fibronectin might be a more general process occurring in several tissues. We completely rule out a direct action of EGF

on cerebellar neurite outgrowth since addition of EGF (data not shown) or T3CM (which contains EGF) directly on neuronal cultures does not increase neuritogenesis. This is the first time a T3 action on ECM protein expression and neuronal outgrowth mediated by an intermediary growth factor in NS is clearly described.

EGF is implicated in widespread effects in CNS such as proliferation and differentiation of a variety of neuronal progenitors, postmitotic neurons, and glial cells (35, 36). EGF exerts most of its cellular actions through activation of the EGF receptor, which belongs to a family of structurally related tyrosine kinase receptors (37). Immunoreactivity for EGFR has been demonstrated in several regions of the embryonic and adult brains such as frontal cortex, hippocampus, cerebellum, and striatum (36, 38), which support a role for EGF during brain development. Signaling through EGFR is triggered by ligand binding, receptor dimerization, and tyrosine phosphorylation and is classically associated with activation of the Raf-MEK-MAP/extracellular signal-regulated kinase pathway (36, 39). In our work, the specific inhibitor of MEK1/2 kinase, PD98059, greatly inhibited laminin and fibronectin overexpression induced by EGF. Similar results were yielded by administration of the specific EGFR inhibitor, tyrphostin, which suggested that MAPK pathway is activated downstream of EGFR tyrosine kinase (data not shown). Although the molecular mechanism of ECM modulation by EGF in NS has not been described yet, EGFR transactivation was found to up-regulate fibronectin in a MEK-extracellular signal-regulated kinase-dependent manner in other systems (40–42). Activation of EGFR is followed by induction of the Ras signaling pathway characterized by a kinase cascade, including Raf, MAPK kinase, and MAPK. It has been suggested that activated MAPK can translocate into the nucleus where it phosphorylates and activates several transcriptional factors (36). Recently, it has been demonstrated that the Ras-MAPK cascade described above is just one of the transcytoplasmic nuclear-signaling pathways activated by EGF (43). This is the case of PI3K, the activity of which has been described to be stimulated by EGF. PI3Ks are a conserved family of lipid kinases that catalyze the phosphorylation of the 3' position of the inositol ring of phosphoinositides (43). They produce lipids implicated in several cellular processes. Although the mechanism involved in EGFR activation of MAP does not display an obvious role for PI3K, pharmacological inhibitors of PI3K were found to strongly interfere with MAPK pathways in several systems (43–46). In agreement with these data, the addition of the PI3K pathway inhibitor, LY294002, completely abolished EGF-induced ECM overexpression. Recent evidence has been accumulated pointing a functional cross-talking between PI3K and MAP kinase pathways (43, 45–48).

Because we previously demonstrated that the effects of EGF on neuronal proliferation involved the protein kinase A-cAMP pathway, we sought to investigate the role of this pathway on EGF-induced neuritogenesis. The addition of the protein kinase A inhibitor KT5720 had no effect on EGF-induced ECM overexpression and neuritogenesis. Taken together, two models for the T3/EGF neuritogenesis induced by astrocytes might be proposed. Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes to secrete EGF, which induces neuronal proliferation (Ref. 19 and Fig. 9). By autocrine mechanism, EGF activates astrocytic EGFR. Transactivation of EGFR leads to 1) induction of PI3K followed by MAPK pathway activation, or 2) alternatively, EGFR may activate two separate cascades, a PI3K-dependent pathway and the classical MAPK pathway (Fig. 9). The fact that the administration of LY294002 and PD98059 alone is sufficient to completely inhibit ECM overproduction, and con-

comitant addition does not yield additive inhibition (data not shown) call in favor of converging rather than independent pathways. Full elucidation of the molecular mechanisms implicating PI3K and MAPK pathways await further experiments.

We reported a new attribute of EGF as mediator of thyroid hormone action on cerebellar development. Our results suggest that EGF might play a crucial role in distinct aspects of granular cell development in culture. How these *in vitro* results could account for *in vivo* cerebellar ontogenesis? Expression of the EGFR and T3 receptor does appear to be temporally uncoordinated in cerebellum. The early germinative zone of the EGL (E15–19) was not undoubtedly reported to express T3 receptor, which will be expressed later in the development in the postmitotic premigratory zone of EGL and in the internal granular layer (49), whereas EGFR mRNA is highly expressed in the EGL (50). These data highlight the importance of a mediator for T3 activity (possibly glia cells via EGF secretion) at least on these early events of cerebellum ontogenesis.

Other factors also modulated by thyroid hormone such as the neurotrophins family have been also implicated in the regulation of several steps of cerebellar development (51). Our work points to EGF as an additional growth factor in the modulation of cerebellar granular cell ontogenesis, thus providing support for a multiple novel neurotrophic activity of growth factors in the development of cerebellar cortex. The fact that replacement of neurotrophin-3 or brain-derived neurotrophic factor results in some rescue of cerebellar development in hypothyroid animals (52) points to the possibility of using glia-derived growth factors as putative therapy to congenital hypothyroidism. Understanding the molecular relationship of thyroid hormones and neuron-astrocyte interactions could open in the future a new avenue to explore and rescue the abnormalities exhibited by the hypothyroid brain. Our work provides the first evidence that EGF secreted by astrocytes mediates thyroid hormone neuritogenesis in the cerebellum. The complexity of the processes underlying axonal growth suggests the existence of multiple sites of possible regulation. Therefore, it is likely that modulation of ECM proteins by EGF reported here in this paper might provide a potential mechanism by which this morphogenetic hormone exerts its effects on neurite outgrowth and establishment of neuronal connections.

*Acknowledgments*—We thank Adiel Batista do Nascimento for care and breeding of the animals. We are also in debt with Ângela Langer for technical assistance and João R. L. de Menezes for critically reading the manuscript. We specially thank Vivaldo Moura Neto for helpful discussion during the work.

#### REFERENCES

- Bernal, J., and Nunez, J. (1995) *Eur. J. Endocrinol.* **133**, 390–398
- Lima, F. R. S., Gervais, A., Colin, C., Izembart, M., Moura Neto, V., and Mallat, M. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 2028–2038
- Gomes, F. C. A., Lima, F. R. S., Trentin, A. G., and Moura Neto, V. (2001) *Prog. Brain Res.* **132**, 41–50
- Gomes, F. C. A., Spohr, T. C. L. S., Martinez, R., and Moura Neto, V. (2001) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 611–620
- Forrest, D., Reh, T. A., and Rüsche, A. (2002) *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 49–56
- Nicholson, J. L., and Altman, J. (1972) *Brain Res.* **44**, 13–23
- Morte, B., Manzano, J., Scanlan, T., Vennström, B., and Bernal, J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3985–3989
- Miale, I. L., and Sidman, R. L. (1961) *Exp. Neurol.* **47**, 26–41
- Komuro, H., Yacubova, E., and Rakic, P. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 527–540
- Anderson, G. W. (2001) *Front. Neuroendocrinol.* **22**, 1–17
- Cayrou, C., Denver, R. J., and Puymirat, J. (2002) *Endocrinology* **143**, 2242–2249
- Koibuchi, N., Fukuda, H., and Chin, W. W. (1999) *Endocrinology* **140**, 3955–3961
- Anderson, G. W., Hagen, S. G., Larson, R. J., Strait, K. A., Schwartz, H. L., Mariash, C. N., and Oppenheimer, J. H. (1997) *Mol. Cell. Endocrinol.* **131**, 79–87
- Potter, G. B., Facchinetti, F., Beaudoin, G. M., III, and Thompson, C. C. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 4373–4380
- Beck, K. D., Knusel, B., and Hefti, F. (1993) *Neuroscience* **52**, 855–866
- Figueiredo, B. C., Almazan, G., Ma, Y., Tetzlaff, W., Miller, F. D., and Cuellar, A. C. (1993) *Mol. Brain Res.* **17**, 258–268
- Garcia-Segura, L. M., Naftolin, F., Hutchison, J. B., Azcoitia, I., and Chowen,

- J. A. (1999) *J. Neurobiol.* **40**, 574–584
18. Dong, Y., and Benveniste, E. M. (2001) *Glia* **36**, 180–190
19. Gomes, F. C. A., Maia, C. G., Menezes, J. R. L., and Moura Neto, V. (1999) *Glia* **25**, 247–255
20. Trentin, A. G., Alvarez-Silva, M., and Moura Neto, V. (2001) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**, 1088–1094
21. Gomes, F. C. A., Garcia-Abreu, J., Galou, M., Paulin, D., and Moura Neto, V. (1999) *Glia* **26**, 97–108
22. Garcia-Abreu, J., Cavalcante, L. A., and Moura Neto, V. (1995) *Neuroreport* **6**, 761–764
23. Menet, V., Giménez y Ribotta, M., Chauvet, N., Drian, M. J., Lannoy, J., Colucci-Guyon, E., and Privat A. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 6147–6158
24. Palu, E., and Liesi, P. (2002) *J. Neurosci. Res.* **69**, 243–256
25. Freire, E., Gomes, F. C. A., Linden, R., Moura Neto, V., and Coelho-Sampaio, T. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 4867–4876
26. Farwell, A. P., and Dubord-Tomasetti, S. A. (1999) *Endocrinology* **140**, 4221–4227
27. Calloni, G. W., Alvarez-Silva, M., Vituri, C., and Trentin, A. G. (2001) *Brain Res. Dev. Brain Res.* **126**, 121–124
28. Trentin, A. G., and Moura Neto, V. (1995) *Neuroreport* **6**, 293–296
29. Farwell, A. P., and Dubord-Tomasetti, S. A. (1999) *Endocrinology* **140**, 5014–5021
30. Lima, F. R. S., Gonçalves, N., Gomes, F. C. A., de Freitas, M. S., and Moura Neto, V. (1998) *Int. J. Dev. Neurosci.* **16**, 19–27
31. Alvarez-Dolado, M., González-Sancho, J. M., Bernal, J., and Muñoz, A. (1998) *Neuroscience* **84**, 309–322
32. Alvarez-Dolado, M., Ruiz, M., Del Río, J. A., Alcántara, S., Burgaya, F., Sheldon, M., Nakajima, K., Bernal, J., Howell, B. W., Curran, T., Soriano, E., and Muñoz, A. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 6979–6993
33. Matsubara, H., Moriguchi, Y., Mori, Y., Masaki, H., Tsutsumi, Y., Shibasaki, Y., Uchiyama-Tanaka, Y., Fujiyama, S., Koyama, Y., Nose-Fujiyama, A., Iba, S., Tateishi, E., and Iwasaka, T. (2000) *Mol. Cell Biochem.* **212**, 187–201
34. Ono, Y., Nakanishi, Y., Gotoh, M., Sakamoto, M., and Hirotsashi, S. (2002) *Cancer Lett.* **175**, 197–204
35. Fricker-Gates, R. A., Winkler, C., Kirik, D., Rosenblad, C., Carpenter, M. K., and Björklund, A. (2000) *Exp. Neurol.* **165**, 237–247
36. Yamada, M., Ikeuchi, T., and Hatanaka, H. (1997) *Prog. Neurobiol.* **51**, 19–37
37. Carpenter, G. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 881–914
38. Kornblum, H. I., Hussaim, R. J., Bronstein, J. M., Gall, C. M., Lee, D. C., and Seroogy, K. B. (1997) *J. Comp. Neurol.* **380**, 243–261
39. Danielsen, A. J., and Maihle, N. J. (2002) *Growth Factors* **20**, 1–15
40. Kaiura, T. L., Itoh, H., and Kent, K. C. (1999) *J. Surg. Res.* **84**, 212–217
41. Rescan, C., Coutant, A., Talarmin, H., Theret, N., Glaise, D., Guguen-Guillouzo, C., and Baffet, G. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**, 725–738
42. Moriguchi, Y., Matsubara, H., Mori, Y., Murasawa, S., Masaki, H., Maruyama, K., Tsutsumi, Y., Shibasaki, Y., Tanaka, Y., Nakajima, T., Oda, K., and Iwasaka, T. (1999) *Circ. Res.* **84**, 1073–1084
43. Yart, A., Chap, H., and Raynal, P. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 107–111
44. Yart, A., Laffargue, M., Mayeux, P., Chretien, S., Peres, C., Tonks, N., Roche, S., Payrastre, B., Chap, H., and Raynal, P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 8856–8864
45. Carballada, R., Yasuo, H., and Lemaire, P. (2001) *Development* **128**, 35–44
46. Kim, J., Eckhart, A. D., Eguchi, S., and Koch, W. (2002) *J. Biol. Chem.* **35**, 32116–32123
47. Fang, X., Yu, S., Eder, A., Mao, M., Bast, R. C., Jr., Boyd, D., and Mills, G. B. (1999) *Oncogene* **18**, 6635–6640
48. Yu, C. F., Liu, Z.-X., and Cantley, L. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 19382–19888
49. Bradley, D. J., Towle, H. C., and Young, W. S. (1992) *J. Neurosci.* **12**, 2288–2302
50. Seroogy, K. B., Gall, C. M., Lee, D. C., and Kornblum, H. I. (1995) *Brain Res.* **670**, 157–164
51. Lindholm, D., Hammer, S., and Zirrgiebel, U. (1997) *Dev. Neurobiol.* **5**, 83–94
52. Neveu, I., and Arenas, E. (1996) *J. Cell Biol.* **133**, 631–646

# 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](#)