

LEO MORITA MIYAKOSHI

“Papel da proteína do príon celular (PrP^c) e de seu ligante, Hop/STI1, em modos distintos de migração tangencial de células neurais no prosencéfalo”

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
2 0 0 8

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Miyakoshi, Leo Morita

Papel da proteína do príon celular (PrP^C) e de seu ligante, Hop/STI1, em modos distintos de migração tangencial de células neurais no prosencéfalo / Leo Morita Miyakoshi – Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF, 2008

xii, 135f

Orientadores: Cecília Hedin Pereira

Tese (Doutorado) – UFRJ/IBCCF/Programa de Pós-graduação em Biofísica

Referências Bibliográficas: f.122–135

- | | | |
|----------------|------------------------|----------------------|
| 1. Hop/STI1 | 2. Príon celular | 3. Migração neuronal |
| 4. Neuroblasto | 5. Zona subventricular | |

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro

III. Título

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neuroanatomia Celular do Departamento de Anatomia da UFRJ, RJ – Brasil sob orientação da Dra. Cecilia Hedin Pereira e na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) (L.M.M) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (PRONEX/FAPERJ) (C.H.P.).

“Se eu fosse um vencedor? Morreria de tédio.”

Clarice Lispector, Um sopro de vida

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Cecília Hedin Pereira, por tudo.

Aos professores João Menezes e Máira Fróes, pelos ensinamentos.

Às colaboradoras, Dra. Vilma Regina Martins e Dra. Flávia Lima por terem permitido a realização deste trabalho.

Aos 4 doutores, Marcos Romualdo Costa, Luciana Nogaroli, Ruben Navarrete e Eduardo Bouth Sequerra, pelas discussões, ajudas e etc...

À Carla Furtado e Elizabeth de Moraes, pelo apoio técnico.

Aos amigos do Laboratório, porque sem eles não teria conseguido.

Aos amigos da UFRJ, por terem contribuído, cada qual à sua maneira, na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	vii
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Migração radial de neurônios e a ontogênese do córtex cerebral	1
1.2 - Migração neuronal tangencial embrionária	4
1.3 - - Migração neuronal em períodos pós-natais.....	11
1.4 - A proteína do príon celular.....	18
1.5 - Funções fisiológicas da proteína do príon celular	19
1.6 - A proteína do Príon celular e migração neuronal.....	20
1.7 - Proteína induzida por estresse (Hop/STI1).....	22
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 - Animais utilizados	28
3.2 - Co-culturas de fatias organotípicas de córtex e eminência ganglionar	28
3.3 - Culturas de explantes de zona subventricular	33
3.4 - Imunocitoquímica.....	34
3.5 - Imuno-histoquímica.....	35
3.6 - Tratamento de culturas de explantes com anti-Hop/STI1	36
3.7 - Tratamento de culturas de explantes de ZSV com Hop/STI1 recombinante	39
3.8 - Análise quantitativa de migração dos explantes de zona subventricular	40
3.9 - Videomicroscopia de tempo intervalado	41
3.10 - Determinação da velocidade média das células através de análise de videomicroscopia de tempo intervalado	42
3.11 - <i>Western Blot</i>	43
3.12 - Formação de agregados celulares a partir de explantes de ZSV	44
4. RESULTADOS	47
4.1 - Co-culturas de fatias organotípicas de córtex e eminência ganglionar.....	47
4.2 - Expressão de PrP ^c em explantes de zona subventricular.....	58
4.3 - Expressão de Hop/STI1 na zona subventriculararborização	63
4.4 - Tratamento de culturas de explantes com anticorpo que reconhece Hop/STI1	68
4.5 - Efeito do anti-Hop/STI1 sobre o halo migratório de explantes de ZSV	71
4.6 - Videomicroscopia de tempo intervalado	81
4.7 - Tratamento com proteína recombinante STI1	91
4.8 - Formação de agregados celulares	93
4. DISCUSSÃO.....	100
5.1 - <i>Células neurais que não expressam a proteína do príon celular ainda mantém a capacidade migratória</i>	100
5.2 - <i>Inibição da mobilidade celular após tratamento com anticorpo anti Hop/STI1.....</i>	105

<i>5.3 - A proteína Hop/ST11 como reguladora de migração neuronal.....</i>	<i>107</i>
<i>5.4 - Alteração na adesão célula-célula após tratamento com anti Hop/ST11.....</i>	<i>114</i>
5. CONCLUSÕES.....	121

Lista de abreviaturas

- BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain derived neurotrophic factor*)
- BrdU - 5'-Bromo-2'-Deoxiuridina
- Ctx - Córtex cerebral
- DAPI - 4'-6'-diamino-2-phenyllindole
- DIV - Dias *in vitro*
- EGC - Eminência ganglionar caudal
- EGF - Fator de crescimento epidermal (do inglês, *epidermal growth factor*)
- eGFP - Proteína de fluorescência verde sob o controle de um *enhancer* de citomegalovírus (do inglês, *enhanced green fluorescent protein*)
- EGL - Eminência ganglionar lateral
- EGM - Eminência ganglionar medial
- EST - Encefalopatias espongiiformes transmissíveis
- FAK - Cinases de adesão focal (do inglês, *focal adhesion kinases*)
- GBSS - Solução salina balanceada com tampão Gey (do inglês, *Gey's balanced salt solution*)
- GDNF - Fator neurotrófico derivado de células gliais
- GPI - Glicosilfosfatidilinositol
- HBSS - Solução salina balanceada com tampão Hank (do inglês, *Hank's balanced salt solution*)
- HGF - Fator de crescimento de hepatócitos (do inglês, *hepatocyte growth factor*)
- Hop - Proteína organizadora de proteínas de choque térmico (do inglês, *heat-shock organizing protein*)
- Hsp70 - Proteína de choque térmico de 70 kD
- Hsp90 - Proteína de choque térmico de 90 kD
- NCAM - Molécula de adesão de células neurais (do inglês, *neural cell adhesion molecule*)
- NT4 - Neurotrofina 4

- PBS - Solução tampão fosfato com salina (do inglês, *phosphate buffer saline*)
- PC - Placa cortical
- PI-PLC - enzima fosfolipase C específica para fosfatidilinositol
- PrP^c - Proteína do príon celular
- PrP^{sc} - Isoforma scrapie da proteína do príon celular
- RMS - Via migratória rostral (do inglês *rostral migratory stream*)
- ST11 - Proteína induzida por estresse (do inglês *stress inducible protein 1*)
- TBS - Salina tamponada com Tris (do inglês, *Tris buffered saline*)
- ZSV – Zona subventricular
- ZV- Zona ventricular

RESUMO

Estudos prévios sugerem que a proteína do príon celular (PrP^c) está envolvida com diversos eventos do desenvolvimento como crescimento axonal, sinaptogênese, assim como proliferação, diferenciação e morte celular. Já foi descrito que PrP^c participa em alguns destes eventos através de sua interação com outras proteínas, como a proteína induzida por estresse 1 (Hop/STI1), que atua como um ligante de PrP^c na superfície celular, promovendo neuritogênese. A partir destas evidências, procuramos investigar o papel destas proteínas na migração neuronal, um evento que pode ser mediado pelos mesmos mecanismos celulares e moleculares de processos de crescimento neurítico e direcionamento axonal. Analisamos especificamente dois modos de migração celular tangencial: a migração de interneurônios originados do telencéfalo basal em períodos embrionários e de neuroblastos provenientes da zona subventricular (ZSV) pós-natal. Para estudar a relevância de PrP^c nestes eventos migratórios, foram utilizadas células obtidas a partir de camundongos nocautes para a PrP^c, que foram analisadas em modelos desenvolvidos *in vitro*, consistindo de co-culturas de fatias organotípicas embrionárias, assim como explantes derivados da (ZSV) pós natal. Os resultados obtidos sugerem que a ausência de PrP^c não parece afetar o comportamento migratório destas células, visto que o padrão de migração observado não difere em relação ao que foi observado em células de camundongos selvagens. Por outro lado, neuroblastos migratórios desprovidos de PrP^c mantêm a expressão de seu ligante, a co-chaperona Hop/STI1. Tratamento com um anticorpo que reconhece de forma específica Hop/STI1 inibe a migração de neuroblastos em culturas de explantes de ZSV obtidos a partir de animais selvagens e nocautes para PrP^c, conforme pode ser demonstrado através de alterações no perímetro dos halos migratórios. Estes resultados são observados mesmo após a utilização de anticorpos que reconhecem especificamente o domínio de Hop/STI1 responsável por sua interação com PrP^c, reforçando a hipótese dos efeitos observados serem independentes de PrP^c. Através de análises utilizando videomicroscopia de tempo intervalado é possível observar que o tratamento com anticorpo resulta na diminuição da velocidade média das células migratórias, assim como no colapso das cadeias de neuroblastos e na aquisição de uma organização celular mais compacta no interior destas estruturas. Estes efeitos aparentam ser resultado de um aumento nas adesões intercelulares, conforme averiguado pelo aumento da área dos agregados celulares em ensaios de gotas suspensas. Estes resultados indicam que a proteína Hop/STI1 pode desempenhar um papel importante na migração de neuroblastos da ZSV, independente de sua interação com a proteína do príon celular.

ABSTRACT

Previous studies have suggested that the cellular prion protein (PrP^c) is involved in developmental events such as axonal growth, synaptogenesis, cell proliferation, differentiation and survival. PrP^c can exert biological roles through the interaction with several molecular partners. It is known that it acts as a cell surface ligand for the co-chaperone stress inducible protein-1 (Hop/STI1) to induce neuritogenesis. Thus, we sought to investigate the role of these proteins in neuronal migration, which shares several cellular and molecular mechanisms with axon growth processes. We have focused on two different modes of tangential cell migration: Interneuron migration from the ventral telencephalon occurring during embryonic stages and postnatal neuroblast migration from the subventricular zone (SVZ). In order to study the relevance of PrP^c in these processes we developed *in vitro* models, consisting of co-cultures of embryonic organotypical slices as well as explants derived from postnatal SVZ, to analyze the behavior of migratory cells obtained from PrP^c knock-out mice. Our results suggest that the absence of PrP^c in these cells does not interfere with their migratory capacity, since the migration pattern observed is indistinguishable from the wild-type cells. However, the same does not apply for Hop/STI1. This protein is expressed in migratory neuroblasts from the SVZ even from mice lacking PrP^c. When SVZ explants, from both wild-type and knock-out mice, are treated with an antibody that recognizes STI1, neuroblast migration is inhibited as detected by migration halo perimeter. Moreover, when an antibody against STI1 that specifically recognizes its site of interaction with PrP^c is applied to SVZ explants no effect is produced, a further indication of the independent action of STI1. Using time-lapse videomicroscopy analysis it is possible to observe that upon antibody binding average migratory speed decreases, chains of neuroblasts tend to collapse and cells within these chains are organized in a more compact manner. These effects seem to be caused by an increase in cell-cell adhesion since measures of cell aggregation capacity reveal that treatment with anti-STI1 induces the formation of larger cell aggregates in hanging drop assays. These results indicate that Hop/STI1 plays an important role in the regulation of SVZ neuroblast migration which is independent of PrP^c interaction.

1 – Introdução

Este trabalho visa compreender a relevância da proteína do prion e de seu ligante Hop/ST11 na regulação da migração de células neurais, um evento que ocorre durante o desenvolvimento do sistema nervoso central e que persiste ao longo da vida de mamíferos em regiões específicas do prosencéfalo.

1.1 - Migração radial de neurônios e a ontogênese do córtex cerebral

A migração celular é uma etapa crucial durante o desenvolvimento do prosencéfalo. Para se tornarem funcionais no contexto do sistema nervoso central, populações celulares inteiras devem se dispersar ao longo de diferentes trajetos até atingirem os locais onde sofrerão os processos de diferenciação. De forma geral, esta dispersão celular ocorre a partir de regiões que são caracterizadas como camadas germinativas. Durante a formação do córtex cerebral a maioria dos neurônios é gerada na zona ventricular, uma camada germinativa primária adjacente aos ventrículos laterais, de onde migram em direção à placa cortical. As células que proliferam na zona ventricular (ZV) da porção mais dorsal do telencéfalo se caracterizam por exibir um padrão de migração nuclear intercinética (Sauer, 1935), onde a posição dos núcleos reflete o estágio do ciclo celular em que estas células se encontram. Logo após se tornarem pós-mitóticas estes neurônios migram radialmente em direção ao córtex cerebral amparados por células de glia radial (Rakic, 1972). Estudos recentes (Noctor et al., 2001,

2002, Tamamaki et al., 2001) demonstraram que estas células gliais não apenas servem de suporte para a migração radial, mas seriam verdadeiras células tronco neurais, responsáveis por gerar neurônios que irão migrar sobre elas até a placa cortical (PC). As primeiras células pós-mitóticas do neuroepitélio formam uma estrutura conhecida como pré-placa (comitê Boudier, 1970; Bystron et al., 2008). Em camundongos, a pré-placa existe até o décimo terceiro dia de gestação embrionária (E13), quando ela é dividida por sucessivas ondas de neurônios que migram radialmente, responsáveis por gerar as futuras camadas corticais (Supèr et al., 1998). Após esta divisão, a pré-placa origina duas regiões: a zona marginal e a subplaca. Uma das características da ontogênese do córtex cerebral de mamíferos consiste no seu padrão de formação de camadas “de dentro para fora”. Ou seja, para se estabelecer em suas respectivas camadas, neurônios que são gerados mais tardiamente no desenvolvimento precisam migrar através de camadas de células geradas mais precocemente (Angevine e Sidman, 1961) (Fig 1). Após o seu estabelecimento definitivo no interior da placa cortical, os neurônios provenientes da zona ventricular do telencéfalo dorsal de roedores atingem a maturidade e se tornam primordialmente neurônios piramidais excitatórios de projeção (Hatanaka, 2002; Gorski et al., 2002; Chan et al., 2001).

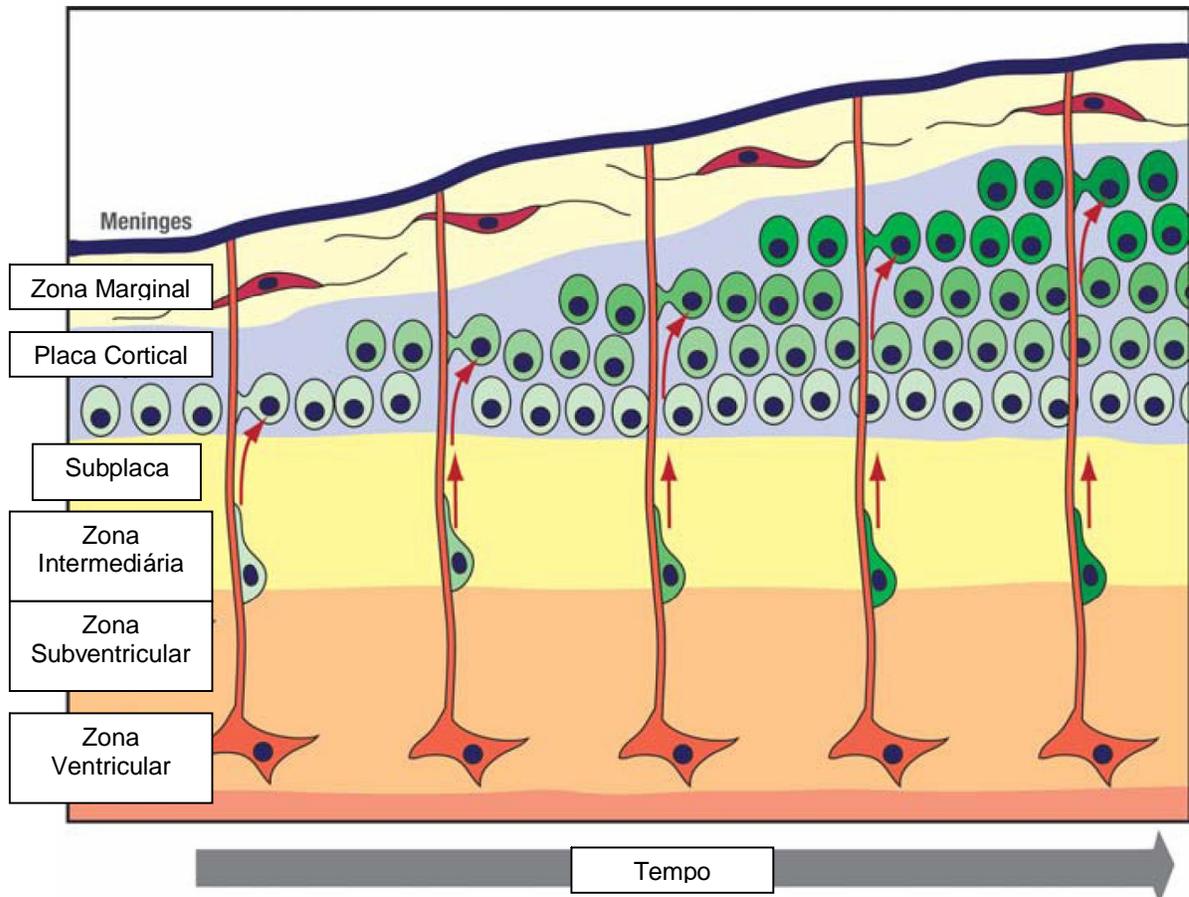


Figura 1 - Os neurônios excitatórios de projeção do córtex cerebral migram radialmente a partir da zona ventricular. O esquema representa diferentes subpopulações de neurônios migrando a partir da zona ventricular associadas a células de glia radial. Os neurônios mais claros são os primeiros a serem gerados e se estabelecem nas camadas mais profundas do córtex, enquanto que as populações geradas tardiamente (representados pelas cores mais escuras) migram através das camadas previamente estabelecidas, formando as camadas mais superficiais. Adaptado de Bielas et al., 2004.

1.2 - Migração neuronal tangencial embrionária

Existem ainda diferentes classes de neurônios que habitam o córtex maduro. Em humanos, 65 % dos interneurônios GABAérgicos são gerados nos mesmo local dos neurônios glutamatérgicos de projeção, a zona ventricular neocortical (Letinic et al., 2002). Já em muitas outras espécies, incluindo roedores, estes mesmos interneurônios inibitórios GABAérgicos são inteiramente gerados no telencéfalo basal e de acordo com o período do desenvolvimento embrionário analisado, a predominância dos sítios de origem destas células, assim como as rotas de migração percorridas variam entre diferentes regiões do subpálio (Marín e Rubenstein, 2001).

Em estágios mais precoces, correspondentes a 11,5 dias de gestação (E 11,5), a migração neuronal é intensa a partir da eminência ganglionar medial (EGM). As células geradas a partir desta região migram em um plano paralelo e adjacente à superfície pial, na área correspondente à pré-placa. Após a divisão da mesma, os interneurônios migratórios podem ser detectados na zona marginal e subplaca/zona intermediária (Lavdas et al., 1999). Em E13,5, no auge da migração tangencial, a EGM passa a ser o local preponderante de origem dos interneurônios, que migram através da zona intermediária e subplaca. Neste mesmo período, a eminência ganglionar lateral (EGL) gera células exclusivamente para os bulbos olfatórios (Wichterle et al., 2001). Por fim, em estágios mais tardios (E 15,5), ambas as eminências, medial e lateral, se tornam as fontes dos interneurônios destinados ao córtex cerebral, que adotam como trajetos migratórios a zona intermediária e a zona subventricular (Anderson et al., 2001). Outros estudos

ainda destacam a migração proveniente da eminência ganglionar caudal (ECG) em direção ao hipocampo e regiões mais posteriores do córtex (Nery et al., 2002; Yozu et al., 2005) (Fig 2).

Após a sua entrada no córtex, uma subpopulação de células proveniente da EGC continua migrando através da zona intermediária até atingir o hipocampo (Pleasure et al., 2000). Dentre os que permanecem no córtex, alguns se difundem tangencialmente através da zona marginal, enquanto que outros adotam trajetórias radiais ou oblíquas (Fig 3). Estes padrões de migração intracortical permitiriam a ocupação de todas as camadas corticais por parte destas células (Tanaka et al., 2003). Esta invasão de camadas está longe de ser um processo aleatório, conforme já demonstrado, alguns destes interneurônios que migram na zona marginal seriam capazes de iniciar uma trajetória descendente, invadindo a placa cortical e se estabelecendo em camadas específicas. Curiosamente, assim como visto para os neurônios glutamatérgicos que migram radialmente, interneurônios gerados em períodos mais precoces tendem a ocupar camadas mais profundas em relação aos que são gerados mais tarde (Ang et al., 2003). Deste modo, mesmo que sejam oriundos de sítios distintos, neurônios de projeção e interneurônios GABAérgicos contemporâneos ocupam as mesmas camadas corticais e o padrão de ocupação “de dentro para fora”, seria adotado pelas duas populações (Miller, 1985; Fairén et al., 1986). Embora os mecanismos envolvidos neste estabelecimento em camadas específicas ainda sejam pouco conhecidos, já foi proposto que interneurônios que migram tangencialmente na zona intermediária desceriam em direção à zona ventricular, aonde receberiam pistas acerca do seu

posicionamento laminar correto para então migrarem em direção à camada que lhes foi especificada (Nadarajah et al., 2002). Mais recentemente, foi sugerido que a quimiocina CXCL12 desempenha um papel importante na determinação da especificação laminar destes neurônios, visto que sua perturbação funcional modifica o padrão de migração intracortical dos interneurônios GABAérgicos (López-Bendito et al., 2008).

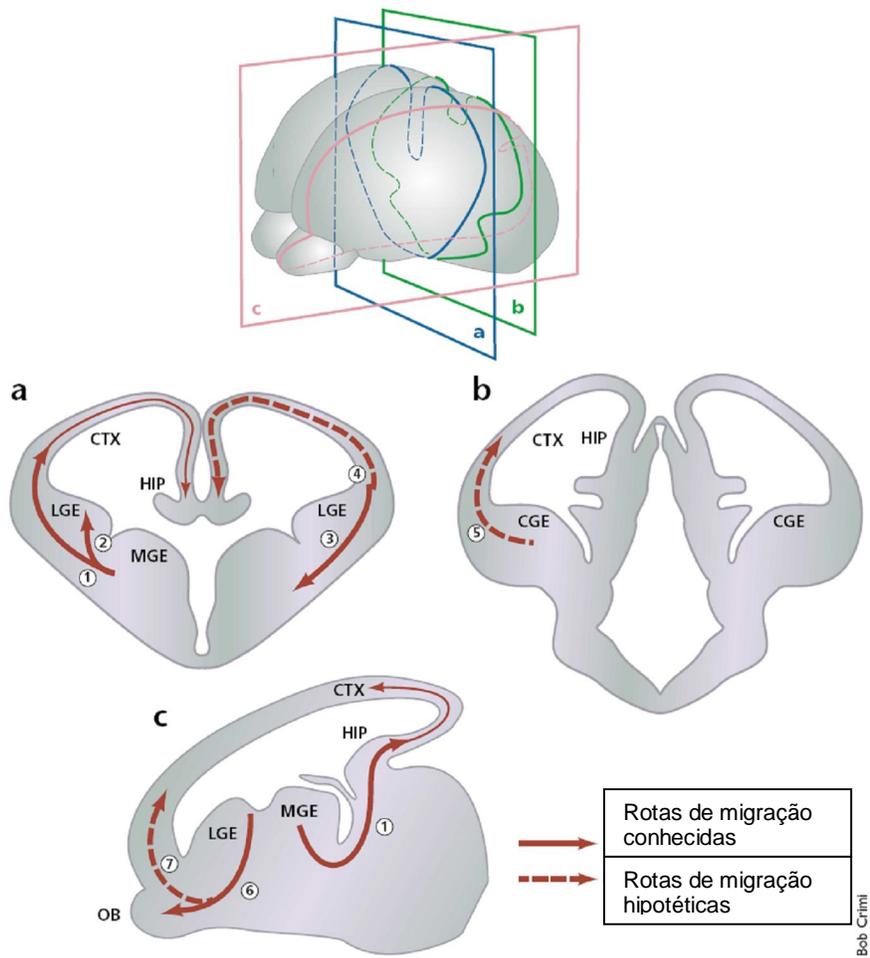


Figura 2 – Alguns trajetos migratórios adotados por células derivadas das eminências ganglionares. Em (A) e (B) cortes transversais demonstrando a migração de interneurônios para o córtex a partir das eminências medial, lateral e caudal, respectivamente. Notar em (A) como alguns destes interneurônios continuam sua trajetória pelo telencéfalo dorsal até atingirem o hipocampo. Em (C) observa-se que a EGL gera populações celulares que migram até o bulbo olfatório em períodos embrionários. LGE, eminência ganglionar lateral; MGE, eminência ganglionar medial; CGE, eminência ganglionar caudal; Ctx, córtex cerebral; HIP, hipocampo; OB, bulbo olfatório. Adaptado de Cobin et al., 2001

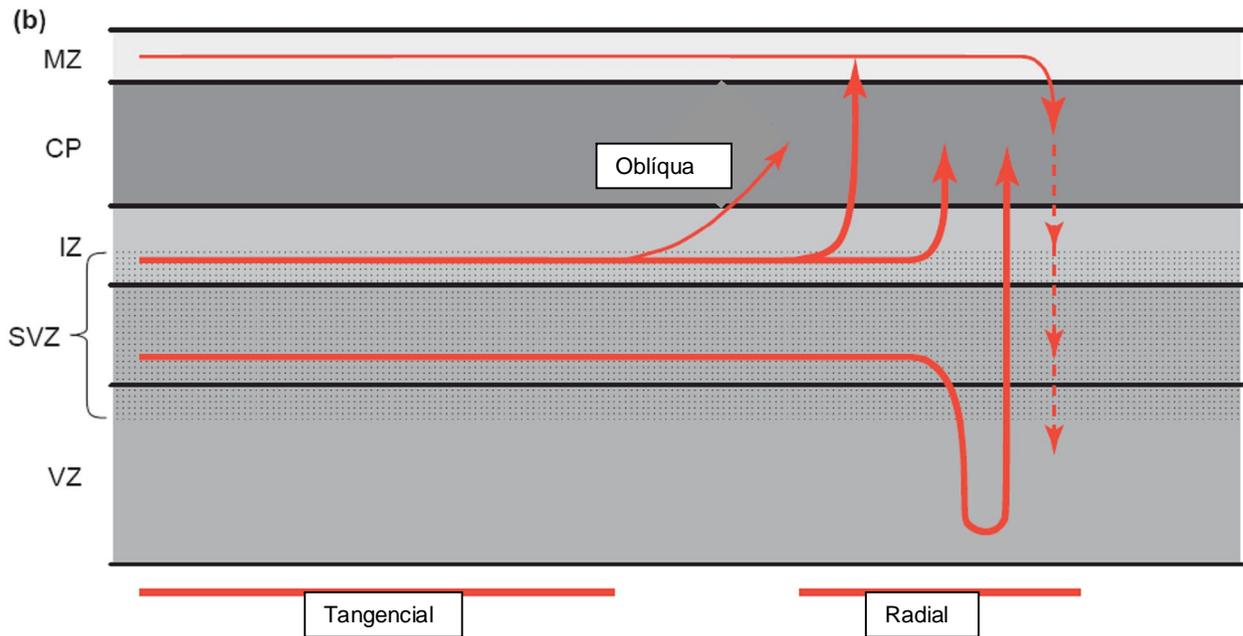


Figura 3 – Trajetórias migratórias intracorticais de interneurônios provenientes das eminências ganglionares. Predominantemente, as células migratórias migram tangencialmente através da zona intermediária e subventricular, algumas células também podem ser observadas migrando na zona marginal. Ao atingirem o córtex, estas células que adotavam trajetórias tangenciais, defletem-se de forma radial ou oblíqua permitindo assim o seu estabelecimento em camadas específicas do córtex. MZ, zona marginal; CP, placa cortical; IZ, zona intermediária; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular. Adaptado de Kriegstein e Noctor, 2004.

A segregação dos sítios de origem das diferentes classes de neurônios é um indicativo de que a heterogeneidade de populações neuronais seria estabelecida em períodos que antecedem a sua chegada à placa cortical. Esta hipótese aparenta ser verdadeira se for considerado que além de serem geradas em locais anatômicos distintos, neurônios excitatórios de projeção e interneurônios GABAérgicos expressam fatores de transcrição característicos. Alguns destes fatores de transcrição presentes nas regiões de origem e também expressos pelos interneurônios, como Nkx2.1, Gsh 2 e Dlx1/2, estão envolvidos em especificação regional e diferenciação celular no telencéfalo basal e a sua ausência, observada através da utilização de animais nocautes, reduzem drasticamente o número de interneurônios GABAérgicos no córtex (Sussel et al., 1999; Cobos et al., 2005, para revisão Marín e Rubenstein, 2001).

Ao contrário da migração de neurônios excitatórios, os interneurônios GABAérgicos não utilizam as células de glia radial como substrato para auxiliar o seu deslocamento do telencéfalo basal até o córtex. Porém, a relação entre estes interneurônios e fibras de glia radial já foi observada na zona intermediária (Polleux et al., 2002). Esta evidência aliada ao fato de que a integridade da paliçada de glia radial seria necessária para um padrão de distribuição normal dos interneurônios no córtex (Poluch et al., 2007), indicam que estas células gliais poderiam estar sendo utilizadas por estas células como suportes na migração intracortical.

Apesar da falta de uma comprovação definitiva, evidências indicam que estes interneurônios GABAérgicos utilizariam um modo de migração axonofílico, onde axônios do sistema cortico-fugal, as projeções eferentes do

córtex, serviriam como substrato migratório no trajeto das eminências ganglionares até o córtex (O'Rourke et al., 1995; Denaxa et al., 2001). Já foram descritas várias moléculas que poderiam contribuir de forma diferente para a regulação deste modo de migração, sendo classificadas de acordo com as funções desempenhadas. Desta forma, existem fatores motogênicos, como o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e Neurotrofina 4 (NT4), que estimulam os movimentos celulares (Brunstrom et al., 1997; Powell et al., 2001). Outras moléculas forneceriam um substrato sobre o qual estes interneurônios migram. Acredita-se que este seja o caso da molécula de adesão TAG-1, presente na superfície dos axônios cortico-fugais (Denaxa et al., 2001). A última classe de moléculas mediadoras desta migração atuaria sobre o direcionamento destes interneurônios. Já foi descrita a expressão de fatores no córtex como a proteína Neuregulina-1 e o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) capazes de promover a quimioatração, assim como a diferenciação celular, após a ligação aos seus respectivos receptores ErbB4 e GFR α 1, presentes nos interneurônios migratórios (Flames et al., 2004; Pozas e Ibanez, 2005). Proteínas como Slit e Semaforinas também se encaixariam nesta categoria, sendo capazes de repelir estes interneurônios, o que poderia auxiliar a sua saída do telencéfalo ventral, assim como impedir que estas células percorram trajetórias errôneas (Zhu et al., 1999; Marín et al., 2001).

1.3 - Migração neuronal em períodos pós-natais.

A zona subventricular (ZSV) é uma camada germinativa secundária, que surge em períodos embrionários tardios e de forma adjacente à zona ventricular (ZV) (Smart e McSherry, 1982; Takahashi et al., 1995). Ainda na embriogênese, foi demonstrado que a ZSV seria responsável por gerar as populações neuronais mais tardias do córtex cerebral, que se localizam nas camadas mais superficiais (camadas II-IV) (Tarabykin et al., 2001). Ambas as camadas germinativas sofrem mudanças em períodos pós-natais. A ZV se transforma em uma fina camada celular que margeia os ventrículos laterais, conhecida como camada ependimária (para revisão, Brazel et al., 2003). Apesar de também sofrer uma redução de tamanho, a ZSV ainda mantém a atividade proliferativa e esta característica perdura durante toda a vida, conforme foi demonstrado no sistema nervoso de mamíferos. Porém, as populações celulares migratórias que são originadas, assim como o seu padrão de migração também sofrem alterações na ZSV pós-natal. Aparentemente, duas populações celulares, uma glial e outra neuronal, migram a partir da zona subventricular pós-natal, os progenitores gliais da ZSV migram radialmente para se estabelecer no córtex, corpo estriado e na substância branca, dando origem a astrócitos e oligodendrócitos durante as primeiras semanas pós-natais (Suzuki e Goldman, 2003). Por outro lado, os precursores neuronais da ZSV migram a partir da porção mais anterior desta camada germinativa por um trajeto definido como via migratória rostral (RMS) ou extensão rostral da SVZ, até atingir os bulbos olfatórios, aonde estes precursores, ou neuroblastos, irão se diferenciar em interneurônios

GABAérgicos (Luskin, 1993). Uma dos traços mais notáveis desta migração consiste na capacidade proliferativa que é mantida por estas células migratórias durante o seu trajeto (Menezes et al., 1995). Outra característica que diferencia esta migração, consiste no fato dos neuroblastos não utilizarem células de glia radial como suporte migratório. Pelo contrário, a orientação desta migração é perpendicular à paliçada de glia radial presente no telencéfalo, por este motivo, de modo similar ao que já foi descrito para a migração neuronal a partir das eminência ganglionares, esta migração é definida como tangencial (Fig 4).

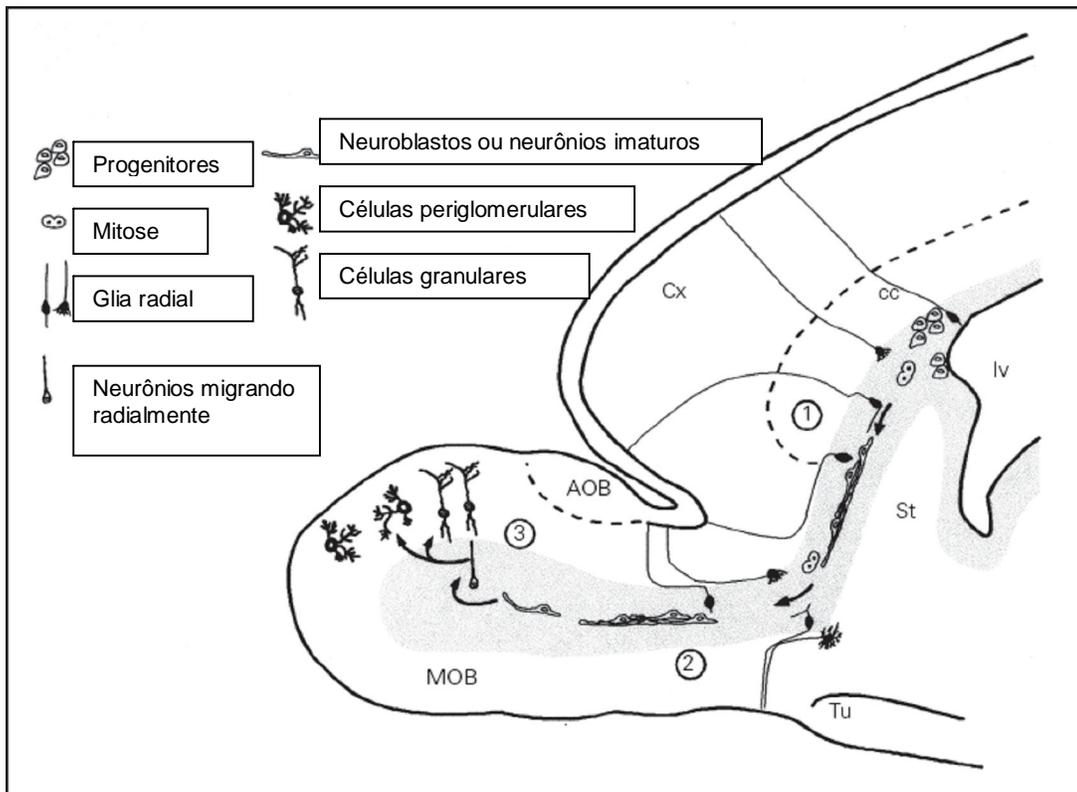


Figura 4 – Esquema representativo ilustrando a trajetória migratória dos neuroblastos da zona subventricular. Os neuroblastos migram a partir da porção mais anterior da zona subventricular e percorrem a via migratória rostral até atingirem o interior dos bulbos olfatórios, aonde adotam um padrão de migração radial e se diferenciam em células granulares e periglomerulares. AOB, bulbo olfatório acessório; cc, corpo caloso; Cx, córtex cerebral; lv, ventrículo lateral; MOB, bulbo olfatório principal; St, corpo estriado; Tu, tubérculo olfatório. Adaptado de Menezes et al., 2002.

O primeiro ponto de controvérsia em relação à migração celular a partir da ZSV se refere ao questionamento acerca da compartimentalização desta camada germinativa. Inicialmente, acreditava-se que apenas a porção mais anterior da ZSV pós-natal seria capaz de gerar neuroblastos que se encaminhariam para os bulbos olfatórios (Luskin et al., 1993), enquanto que as porções mais caudais gerariam as células de linhagem glial. Porém, utilizando animais de idades similares (P0-P3), Suzuki e Goldman demonstraram a existência de células capazes de migrar pela RMS através da aplicação de retrovírus codificando a proteína de fluorescência verde ao longo do eixo rostro-caudal da zona subventricular (Suzuki e Goldman, 2003). Em animais adultos, outros trabalhos já haviam demonstrado que as células migratórias também estão presentes desde os níveis mais caudais da ZSV e que são capazes de migrar em sentido rostral (Doetsch e Alvarez-Buylla, 1996).

O modo de migração destes neuroblastos também pode ser considerado até hoje como controverso, devido à existência de dados conflitantes na literatura. Alguns autores afirmam que desde estágios embrionários precoces (E15), que correspondem ao início do desenvolvimento da via migratória rostral, os neuroblastos já migrariam associados entre si, formando estruturas caracterizadas como cadeias migratórias (Pencea e Luskin, 2003). No entanto, um estudo mais recente indica que a formação destas estruturas só ocorreria por volta da terceira semana pós-natal (Peretto et al., 2005), mantendo esta organização até a vida adulta (Louis et al., 1996, Doetsch e Alvarez-Buylla, 1996). É interessante observar que em modelos *in vitro*, neuroblastos da zona

subventricular são capazes de formar cadeias migratórias desde idades pós-natais bem precoces (Wichterle et al., 1997; Miyakoshi et al., 2001).

Existem também algumas discrepâncias entre períodos pós-natais precoces e adultos em relação à presença e o modo de organização de células gliais nas proximidades da via migratória rostral, que podem refletir diretamente sobre o modo de migração das células. Nas primeiras semanas pós-natais, os corpos celulares das células de glia radial se acumulam na fronteira entre a ZSV e a substância branca e seus processos aparentam envolver a porção mais anterior da ZSV, assim como a RMS (Alves et al., 2002). De acordo com o trabalho de Peretto e colaboradores, a partir da terceira semana pós-natal, coincidentemente com o surgimento das primeiras cadeias migratórias, células de linhagem glial formariam estruturas tubulares, caracterizadas como túneis astrocitários, ao redor dos neuroblastos (Peretto et al., 2005), que persistiriam até a vida adulta (Louis et al., 1996).

Da mesma forma que as características desta migração aparentam ser moduladas de acordo com o amadurecimento da zona subventricular e da via migratória rostral, seria razoável supor que alguns dos mecanismos moleculares envolvidos nesta migração também sofram alterações no decorrer do tempo, enquanto que outros possam atuar tanto em períodos pós-natais precoces como na fase adulta. Esta hipótese é confirmada se analisarmos alguns dos vários fatores descritos como mediadores desta migração. Embora, alguns deles sejam expressos presumivelmente durante a vida toda, outros supostamente agem em períodos específicos e poucas moléculas tiveram seu padrão de expressão analisado ao longo do amadurecimento da ZSV-RMS.

Para compreender como toda a gama de moléculas descritas ao longo dos últimos anos pode modular esta migração convém classificá-las de acordo com o papel desempenhado por cada uma delas. Para algumas destas moléculas foi proposto um papel no direcionamento das células migratórias originárias da ZSV. No interior dos bulbos olfatórios existem proteínas difusíveis como a Netrina (Murase et al., 2002), Prokineticina (Ng et al., 2005) e o fator neurotrófico derivado de glia (GDNF) (Paratcha et al., 2006), que são secretadas e agiriam como fatores quimioatrativos, enquanto que no septo caudal a presença das isoformas 1 e 2 da proteína Slit (Wu et al., 1999; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2007) exerce um papel quimiorrepulsivo. Foi sugerido ainda que o movimento dos cílios das células ependimárias, responsáveis pelo fluxo do líquido cérebro-espinhal no interior dos ventrículos laterais, seria importante no estabelecimento de um gradiente destes fatores repulsivos (Sawamoto et al., 2006).

Além das pistas que auxiliariam no direcionamento dos neuroblastos, outras moléculas, mediadoras de processos de interação e reconhecimento celular, são necessárias para que esta migração ocorra de forma correta. A isoforma da proteína NCAM que contém ácido polissialílico pode ser visualizada desde períodos pós-natais bem precoces, onde conforme mencionado anteriormente ainda existem controvérsias acerca da organização em cadeias por parte dos neuroblastos, até a vida adulta. A PSA-NCAM foi implicada com a regulação de processos de adesão entre as células migratórias (Tomasiewicz et al., 1993, Ono et al., 1994), assim como a interação entre estas células e o ambiente estacionário ao seu redor (Chazal et al., 2000). No entanto, ao contrário do que se poderia supor, a ausência de todas as

isoformas de NCAM não causa a interrupção total da migração de neuroblastos *in vivo* e *in vitro* (Chazal et al., 2000). Aparentemente, os processos de formação das cadeias migratórias de neuroblastos é dependente da presença da sub-unidade $\beta 1$ da integrina e de sua conseqüente interação com a laminina. Esta mesma sub-unidade participa do estabelecimento dos túneis astrocitários que envolvem as cadeias (Belvindrah et al., 2007). Por sua vez, estas células gliais influenciam diretamente esta migração, seja através da liberação de proteínas capazes de induzir movimentos migratórios (Mason et al., 2001), ou ainda através da incorporação do GABA liberado pelos neuroblastos, criando assim um ambiente propício para a migração destas células (Bolteus e Bordey, 2004). Já foi sugerido também um papel para gangliosídeos (Miyakoshi et al., 2001) e junções comunicantes (Marins et al., 2008) nesta migração, porém ainda são desconhecidos os mecanismos de ação desencadeados pelos mesmos.

O modo de migração dos neuroblastos sofre alterações no interior dos bulbos olfatórios. As células que antes migravam associadas tangencialmente, formando cadeias, passam a se locomover individualmente em uma trajetória radial em direção às camadas mais superficiais do bulbo olfatório, onde irão se diferenciar em células glomerulares e granulares. Moléculas de matriz extracelular como a Reelina (Hack et al., 2002) e a Tenascina-R (Saghatelyan et al., 2004) são algumas das moléculas presentes nos bulbos olfatórios capazes de induzir a dissociação dos neuroblastos migratórios de suas cadeias. Uma vez individualizados, os neuroblastos utilizariam vasos sanguíneos do bulbo olfatório como suporte para a migração radial (Bovetti et al., 2007).

1.4 - A proteína do príon celular

De modo geral, a proteína do príon celular (PrP^c) se encontra inserida nas membranas plasmáticas através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Stahl et al., 1987) e apesar de estar presente de forma abundante no sistema nervoso, há indícios de sua expressão no sangue, em componentes do sistema imune e em vários outros órgãos (Linden et al., 2008). Uma de suas propriedades mais notáveis consiste na capacidade de sofrer uma mutação conformacional, gerando assim uma isoforma denominada como *Scrapie* (PrP^{sc}). A formação de PrP^{sc} decorre de uma modificação no nível estrutural secundário da proteína do príon, basicamente uma diminuição no número de alfa-hélices e um aumento no número de folhas beta-pregueadas (Caughey et al., 1991). Esta isoforma por sua vez, é o agente etiológico causador das encefalopatias espongiformes transmissíveis (EST), caracterizadas como as doenças de príon (Prusiner, 1982). Após a comprovação de que a mudança conformacional de PrP^c é responsável direta pelo desenvolvimento das EST, surgiram questionamentos se estas patologias seriam consequência de um ganho ou de uma perda de função por parte da proteína modificada. A primeira hipótese sugere que o acúmulo de PrP^{sc} que ocorre no encéfalo, gerando agregados protéicos altamente resistentes à ação de proteases (Ross et al., 2004), é a etapa determinante para o desenvolvimento do processo neurodegenerativo, visto que a toxicidade de PrP^{sc} foi sugerida em estudos *in vivo* e *in vitro* (Collins et al., 2004). Por sua vez, esta mesma teoria pode ser refutada por evidências demonstrando que a isoforma *scrapie* só é capaz de exercer seus efeitos

danosos na presença de PrP^C (Brandner et al., 1996). Além disso, modelos vigentes propõem que o PrP^C endógeno é convertido em PrP^{Sc}, e esta mudança conformacional da proteína acarreta na perda de sua função. A hipótese de perda de função carece exatamente em propor quais destas funções são comprometidas após esta modificação estrutural, visto que apesar do crescente número de trabalhos comprometidos a investigar a importância de PrP^C no organismo, um parecer definitivo acerca do seu exato papel biológico ainda não foi atingido.

1.5 - Funções fisiológicas da proteína do príon celular.

A utilização de animais nocaute tem se demonstrado útil para investigar o papel de determinadas proteínas, seja no decorrer do desenvolvimento ou no organismo maduro. Os resultados obtidos a partir da análise de diferentes linhagens de camundongos nocautes para a proteína do príon celular podem ser considerados controversos, visto que em algumas linhagens, como a Zurich I, não foram detectadas alterações drásticas na estrutura do encéfalo, assim como no padrão de maturação de componentes do sistema imune. Testes comportamentais nestes animais realizados até os 7 meses de idade também não indicam anormalidades (Bueler et al., 1992). Já em algumas linhagens desenvolvidas posteriormente, foram observados indícios de neurodegeneração no cerebelo, mais especificamente em células de Purkinje (Sakaguchi et al., 1996). Porém, o fenótipo neurodegenerativo detectado nestas linhagens não é consequência da ausência da proteína do príon, mas de um efeito citotóxico causado pelo aumento da expressão da

proteína Doppel e não pela ausência direta de PrP^c (Moore et al., 1999). Contudo, outros estudos em que foram utilizados camundongos da linhagem Zurich I relataram diferenças, sobretudo comportamentais, observadas entre animais nocautes e selvagens. Dentre algumas hipóteses levantadas, foi sugerida uma ação de PrP^c sobre níveis de ansiedade (Nico et al., 2005), o ciclo-circadiano (Tobler et al., 1996) e na retenção de memória (Nishida et al., 1997; Coitinho et al., 2007).

Dentro do contexto do sistema nervoso, baseando-se em observações da expressão de PrP^c nos terminais pré e pós sinápticos e tendo em vista a sua capacidade de ligação com o cobre (Brown et al., 1997), foi proposto um papel de PrP^c na regulação da função sináptica. Os níveis de expressão de PrP^c em neurônios parecem ainda estar relacionados diretamente com o seu grau de diferenciação, conforme foi demonstrado através da co-expressão de PrP^c com marcadores específicos de diferenciação neuronal *in vivo* e *in vitro* (Steele et al., 2006).

1.6 - A proteína do Príon celular e migração neuronal

Apesar de sua expressão bastante generalizada no encéfalo adulto, ao longo do desenvolvimento, o padrão de expressão espaço-temporal de PrP^c pode ser um indicativo de uma função específica desta proteína durante a embriogênese. A detecção de PrP^c em embriões de camundongos é possível a partir de 13,5 dias embrionários (Manson et al., 1992), período que coincide exatamente com o pico da migração de interneurônios GABAérgicos do telencéfalo ventral em direção ao córtex cerebral. Além do mais, algumas

linhagens de camundongos nocautes para PrP^c são mais suscetíveis à indução de epilepsia (Walz et al., 1999), fato que poderia ser justificado pela ausência de neurônios GABAérgicos no córtex, consequência de uma migração deficiente.

Em trabalhos prévios, PrP^c foi caracterizada como uma proteína localizada em microdomínios de membrana plasmática, as chamadas balsas lipídicas (do inglês, *lipid rafts*, Nasvalsky et al., 1997). Esta condição permite que PrP^c possua a propriedade de agir como uma molécula de reconhecimento, sendo capaz de interagir com várias outras moléculas. Embora ainda não existam dados concretos indicando que PrP^c possa mediar processos de migração neuronal, sua interação com moléculas de matriz extracelular e as consequências funcionais destas interações podem ser indícios de uma participação ativa de PrP^c em fenômenos migratórios.

Já foram descritas interações de PrP^c com o precursor de receptores de laminina de 37 kDa e sua isoforma madura de 67 kDa (Gauczynski et al., 2001). Além de interagir com estes receptores, PrP^c atua também como um receptor de alta afinidade para a própria laminina e esta ligação é importante para mediar crescimento neurítico em culturas de células hipocâmpais (Graner et al., 2000). A regulação de crescimento neurítico também é dependente de interações entre PrP^c e a proteína de adesão NCAM (Santucci et al., 2005). Estes estudos comprovam que PrP^c possui a capacidade de interagir com moléculas que já foram implicadas com processos de migração neuronal.

Tendo em vista que algumas moléculas de reconhecimento podem modular tanto o direcionamento axonal como a migração neuronal (Maness et

al., 2007), é possível propor que a proteína do Príon esteja exercendo esta dupla função, pois há evidências de sua expressão em axônios em crescimento durante o desenvolvimento e na vida adulta (Sales et al., 1998 e 2002). Mais recentemente, um trabalho deste mesmo grupo correlaciona o aumento de expressão de PrP^c com a regeneração axonal em modelo de esmagamento de nervo ciático (Moya et al., 2005). De forma similar, um modelo semelhante a este foi usado para demonstrar o papel do Gangliosídeo 9-O-acetil GD3, um glicolípido de reconhecida importância em eventos de migração neuronal radial (Santiago et al., 2001 e 2004) e tangencial (Miyakoshi et al., 2001), no crescimento de axônios pós-lesão (Ribeiro-Resende et al., 2007).

Recentemente, nossos colaboradores mostraram em cortes histológicos de cérebros de hamster, que o padrão de expressão espaço-temporal de PrP^c, corresponde ao fluxo migratório de interneurônios GABAérgicos em direção ao córtex cerebral (Costa et al., dados não publicados). Estes resultados são as primeiras evidências diretas de que a proteína do príon pode estar envolvida com migração neuronal durante o desenvolvimento do córtex.

1.7 - Proteína induzida por estresse (Hop/ST11)

Chaperonas são proteínas essenciais para o funcionamento da maquinaria celular, pois são responsáveis diretas pelo enovelamento correto e a manutenção de proteínas em uma conformação nativa, seja sob condições normais ou de estresse celular. As proteínas de choque térmico

(HSP, do inglês, *heat shock proteins*) são chaperonas cuja atividade depende da capacidade de ligar e hidrolisar ATP, assim como a sua associação com co-chaperonas (Young et al., 2004).

A proteína induzida por estresse (STI1, do inglês, *stress inducible protein-1*) foi identificada como uma co-chaperona pela primeira vez em leveduras (Nicolet et al., 1989), devido à sua capacidade de se ligar e modular a atividade de chaperonas como Hsp70 e Hsp90 (do inglês *heat shock protein 70* e *heat shock protein 90*, respectivamente) (Chang et al., 1997). Posteriormente, homólogos de STI1 foram descritos em vegetais (Zhang et al., 2003), insetos (Adams et al., 2001) e mamíferos (Honore et al., 1992; Blatch et al., 1997; Demand et al., 1998). Estes homólogos diferem entre si em algumas características funcionais, sendo classificados assim de acordo com o sistema em que atuam, YSTI1 em leveduras, STI1 vegetal e STI1 animal, que também é conhecida como Hop (do inglês, *heat-shock organizing protein*) (Honore et al., 1992; Smith et al., 1993; Blatch et al., 1997). A STI1 animal é o foco deste estudo e ao longo deste texto será referida como Hop/STI1.

A proteína Hop/STI1 tem um peso molecular de aproximadamente 66 kda e em sua estrutura podem ser observados 3 domínios tetratricopeptídeos repetidos (TPR), que são classificados como TPR1, TPR2 e TPR2B (Odunuga et al., 2004). Estes domínios definem a função principal desta proteína, pois é através deles que Hop/STI1 é capaz de se ligar à Hsp70 e Hsp90. Embora Hop/STI1 tenha sido descrita inicialmente como um fator capaz de estimular a dissociação de HSP70 com ADP, assim como sua capacidade de hidrolisar ATP (Gross et al., 1996), estudos posteriores

indicaram que ao contrário do que ocorre no sistema de leveduras (Prodromou et al., 1999; Wegele et al., 2003) Hop/STI1 não regularia a função ATPase de Hsp70 e Hsp90 (Wegele et al., 2003; Wegele et al., 2006). Foi sugerido então que Hop/STI1 exerceria um papel de “ligador passivo”, sendo um dos elementos responsáveis na formação de um heterocomplexo de chaperonas moleculares (HCM). A importância destes heterocomplexos foi analisada de forma mais ampla no processo de maturação de receptores de hormônios esteróides, mais especificamente os receptores de glicocorticóides e progesterona. O estabelecimento dos heterocomplexos ocorreria em diferentes etapas e seria dependente da ação conjunta das proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hop/STI1 e P23 (Dittmar et al., 1998; Kosano et al., 1998). Algumas destas proteínas, como Hop/STI1 e Hsp70, só participariam das primeiras etapas deste processo de formação, compondo um complexo intermediário (Smith et al., 1993; Smith e Toft, 1993). A proteína Hsp90, por sua vez, interage diretamente com o domínio do receptor que reconhece o ligante, promovendo, através de uma mudança conformacional, a abertura deste sítio, o que torna possível a ligação hormônio-receptor. (Bresnick et al., 1989, Dittmar et al., 1997, ver também Pratt et al., 2003). Estes complexos são ainda importantes para regular a interação de receptores e fatores de transcrição com seus respectivos sítios de ligação com o DNA (Bharadwaj et al., 1999; Arbeitman et al., 2000).

Embora esteja localizada de forma predominante no citoplasma, Hop/STI1 não está restrita ao mesmo, pois aparentemente pode transitar entre o núcleo e o citoplasma (Longshaw et al., 2004). Esta distribuição subcelular de Hop/STI1 poderia ainda ser regulada por situações de estresse

celular causadas por choque térmico, pois sob esta condição foi observado o aumento do acúmulo desta proteína tanto no núcleo como na membrana celular (Daniel et al., 2008). A presença de Hop/STI1 na superfície de membranas celulares é um indicativo de que esta co-chaperona possa estar exercendo também papel importante no meio extracelular. De fato, quando presente na superfície de membranas celulares, esta proteína pode atuar como ligante específico da proteína do príon celular (Zanata et al., 2002) e até o presente momento, já foi demonstrado que a interação Hop/STI1-PrP^c é capaz de mediar mecanismos de neuroproteção em tecido retiniano (Chiarini et al., 2002) e em neurônios hipocâmpais (Lopes et al., 2005), assim como promover neuritogênese em culturas de células hipocâmpais (Lopes et al., 2005).

A diversidade de sítios de localização e sua capacidade de se ligar a PrP^c abre um leque de possibilidades funcionais ainda não descritas para a proteína Hop/STI1. Apesar do exato papel fisiológico de PrP^c ser desconhecido, seu padrão de expressão, sua localização subcelular em microdomínios de membrana e seu envolvimento já descrito em eventos de neuritogênese sugerem uma ação desta proteína sobre mecanismos de migração neuronal. Além da necessidade de comprovar esta hipótese de modo definitivo, surgem dúvidas acerca de quais outras moléculas seriam capazes de atuar em conjunto com a proteína do príon celular na suposta regulação de migração celular. A importância da interação de Hop/STI1 com PrP^c na superfície celular para mediar neuritogênese torna esta co-chaperona uma provável candidata para desempenhar esta função. A possibilidade destas duas proteínas desempenharem papéis biológicos neste contexto de

migração induziria ainda um questionamento sobre o modo de atuação de cada uma delas. Seria interessante investigar se a funcionalidade das duas dependeria necessariamente de sua interação na superfície celular, formando um complexo protéico, ou se as duas seriam capazes de atuar de forma independente, e neste caso determinar o grau de importância individual de cada uma delas neste processo de migração neuronal.

2 - OBJETIVOS

Objetivo geral - Investigar os possíveis papéis da proteína do príon celular e de seu ligante, a proteína induzida por estresse 1 (Hop/STI1) na migração tangencial de neurônios e neuroblastos que ocorre em estágios embrionários e pós-natais precoces.

Objetivos específicos –

1. Analisar alterações no padrão de migração tangencial de células neurais desprovidas de PrP^c em modelos estabelecidos *in vitro*.
2. Caracterizar a expressão da proteína Hop/STI1 na zona subventricular *in vivo* e *in vitro*.
3. Verificar a importância da proteína Hop/STI1 na migração dos neuroblastos provenientes da zona subventricular, através de análises funcionais *in vitro*.
4. Investigar os possíveis mecanismos celulares da migração dos neuroblastos que estão sendo influenciados pela proteína Hop/STI1.

3 - Materiais e métodos

3.1 - Animais utilizados

Foram utilizados camundongos selvagens e nocautes para a proteína do príon celular da linhagem Zurich I, que apresentam um fundo genético misto, sendo gerados a partir do cruzamento das linhagens C57/BL6/J e 129/SV (Bueler et al., 1992). Estes animais foram cedidos gentilmente pela Dra. Vilma Regina Martins do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer. Para experimentos adicionais foram utilizados camundongos suíços criados no Departamento de Anatomia/UFRJ.

3.2 - Co-culturas de fatias organotípicas de córtex e eminência ganglionar

Embriões foram obtidos a partir de fêmeas grávidas selvagens no décimo-quarto dia de gestação, anestesiadas por de inalação de éter etílico. Os embriões tiveram seus cérebros dissecados e fatiados coronalmente no fatiador de tecidos (McIlwain *tissue chopper*) na espessura de 350 µm. As fatias obtidas foram colocadas em solução de tampão GBSS (do inglês *GEY's Balanced Salt Solution*, cada litro de solução contém 0,17g de CaCl₂, 0,37 g de KCl, 0,03g de KH₂PO₄, 0,098g de MgCl₂, 0,034g de MgSO₄, 8g de NaCl, 0,227g de NaHCO₃, 0,12g de NaHPO₄ e 7.5g de D-Glucose) gelado e mantidas na geladeira por 30 minutos. Após este período, as porções das fatias contendo o teléncéfalo dorsal foram separadas com o auxílio de

microbisturis do telencéfalo basal e imediatamente plaqueadas em placa PETRIPERM permeável a gases (Sigma-Aldrich), pré-tratadas com Poli-L-lisina (0,1mg/mL Sigma), por cerca de 1 hora dentro de uma estufa a 37 °C. As placas contendo as fatias foram preenchidas com meio de cultura DMEM/F12 (Gibco) e 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco) e então mantidas em uma estufa incubadora a 37 °C e 5% de CO₂.

Camundongas grávidas selvagens e nocautes no décimo-quarto dia de gestação receberam injeções de Bromo-2-deoxi-5-uridina (BrdU, Sigma), diluído em uma solução de NaOH 0,007M (10mg/mL, 300 µL para cada animal) cerca de 40 minutos antes da extração dos fetos. Os cérebros obtidos a partir dos embriões extraídos de fêmeas selvagens e nocautes passaram então por procedimentos similares aos realizados para a obtenção prévia das fatias corticais, sendo que após o período de 30 minutos na geladeira, o telencéfalo ventral das fatias, contendo as eminências ganglionares, foi separado da porção dorsal. Em seguida, as eminências ganglionares foram plaqueadas sobre as placas que continham as fatias corticais, de modo que as duas fatias se mantivessem em contato durante todo o período de cultura, que consistia de 48 h sob as mesmas condições já citadas anteriormente.

Após 48 h, as fatias foram pré-fixadas em vapor de formol por 15 minutos, em seguida foram fixadas com paraformaldeído 4% por mais 15 minutos.

Os procedimentos de imuno-histoquímica utilizando anticorpos anti-BrdU foram precedidos por um tratamento das fatias. Estas foram tratadas com água destilada a 37 °C por 10 minutos, em seguida foram imersas em HCl a 37 °C por mais 30 minutos. Após este período as fatias foram tratadas

com tampão borato 0,1 M (pH = 8,5) por 10 minutos e lavadas 3 vezes com solução salina com tampão fosfato (0,1M) acrescida de Triton X-100 (PBS Triton 0,3 %). Em seguida, as fatias foram pré-incubadas com Soro normal de cabra a 5% por 30 minutos em temperatura ambiente e finalmente submetidas à incubação com anticorpo anti-BrdU feito em camundongo (Amersham, 1:3, diluição em PBS) por uma noite inteira (aproximadamente 12 horas) numa temperatura de 4 °C. Em seguida, as fatias foram incubadas com anticorpo secundário feito em cabra que reconhece imunoglobulinas de camundongo conjugado a Cy3 (1:800).

A análise de resultados foi realizada através da visualização das fatias em câmera clara, acoplada a um microscópio óptico de fluorescência Zeiss Axioplan.

Foi realizado também 1 experimento co-cultivando fatias organotípicas de eminência ganglionar obtidas a partir de camundongos expressando a proteína de fluorescência verde (GFP). Para a realização deste experimento, camundongos selvagens e nocautes da linhagem Zurich I foram cruzados com camundongos transgênicos eGFP, de fundo genético misto BCF1/C57BL/6J cedidos por Okabe et al., 1997. Os animais desta prole foram então cruzados mais uma vez para a obtenção de camundongos nocautes para PrP^c, assim como selvagens que expressavam a proteína de fluorescência verde de forma constitutiva.

Os procedimentos para a realização destas co-culturas foram semelhantes aos já descritos. O único diferencial consiste na ausência de injeção de BrdU nas fêmeas grávidas antes da extração dos embriões, que após sua extração eram colocados sob a luz UV (comprimento de onda de

excitação 358 nanômetros) de modo a permitir a seleção dos embriões eGFP. Os embriões eGFP selvagens e nocautes para PrP^c foram então co-cultivados conforme já foi descrito com fatias corticais obtidas a partir de camundongos selvagens, previamente plaqueadas em placas Petriperm.

Os resultados do experimento de co-culturas com embriões eGFP foram analisados em um microscópio confocal Zeiss LSM 510 meta.

A análise quantitativa dos dados obtidos através da utilização da câmara clara ou do microscópio confocal foi realizada de maneira similar. Através da utilização do programa Image J 1.37 (National Institutes of Health, USA), foram delineados setores sobre as fatias. Para determinar o tamanho destes setores, 3 linhas em série de mesmo comprimento (250 µm para os desenhos de câmara clara e 365 µm para as imagens obtidas através do microscópio confocal) foram tracejadas na metade da espessura da fatia cortical, de modo que a extremidade proximal da primeira coincidiu sempre com a fronteira entre o córtex e a eminência ganglionar. Em seguida, linhas ortogonais foram tracejadas nas extremidades distais de cada uma destas linhas, gerando assim 3 setores. O quarto setor foi considerado como sendo toda a extensão da fatia cortical que não estava contida nos 3 setores. O programa Prisma (Graphpad Software) foi utilizado para a análise estatística através de um teste Mann-Whitney dos valores obtidos (n=12 fatias para experimentos de câmara clara e n=8 fatias para experimentos com células eGFP) (Fig 5).

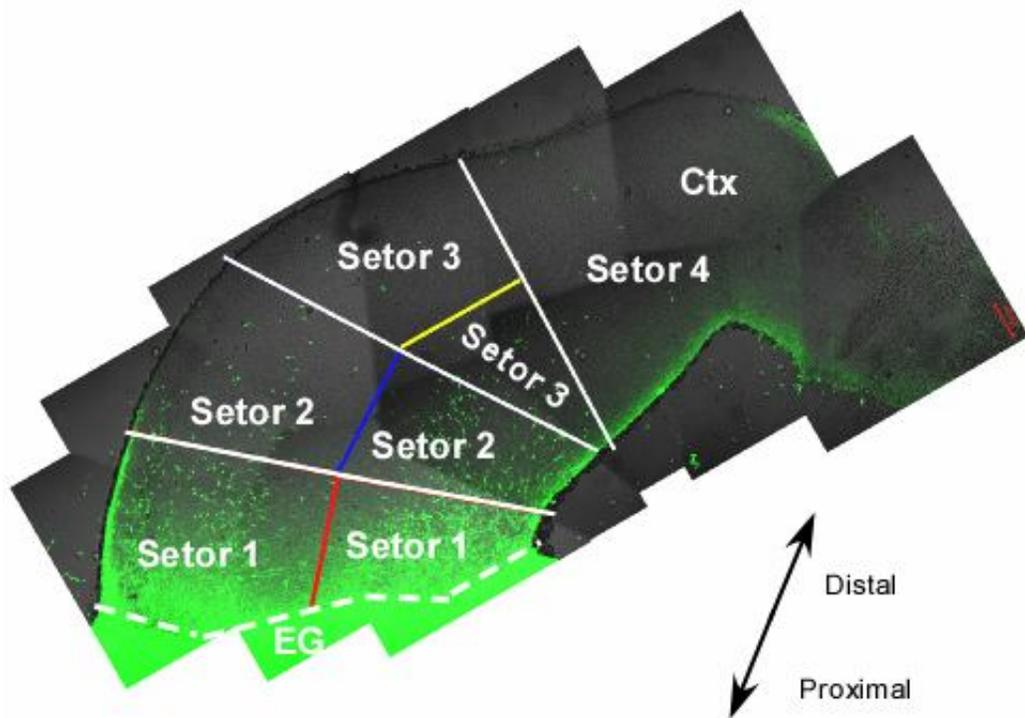


Figura 5 - Esquema demonstrando como foi realizada a quantificação da migração celular nos ensaios de co-cultura de fatias organotípicas. As extremidades das linhas orientadas para a fatia de eminência ganglionar são consideradas proximais. Note que a extremidade proximal da primeira linha se encontra no ponto de contato entre as duas fatias organotípicas (indicado pela linha pontilhada), enquanto que as outras linhas de mesmo comprimento são tracejadas em contato com as extremidades distais das precedentes. A disposição das mesmas procura representar a curvatura da fatia cortical. As linhas ortogonais brancas delimitam os três setores estipulados, enquanto que o quarto setor corresponde ao restante da fatia cortical. Barra de calibração: 100 mm. EG - Eminência ganglionar. Ctx - Córtex.

3.3 - Culturas de explantes de zona subventricular

Foram utilizados camundongos selvagens e nocautes para PrP^c na primeira semana pós-natal (P0-P6). Os animais foram decapitados e os cérebros extraídos das caixas cranianas foram imersos em solução gelada de GBSS. Os cérebros foram então cortados parassagitalmente a 350 µm em um fatiador de tecidos (Tissue chopper - McIlwain) e as fatias obtidas foram separadas no interior do fluxo laminar e novamente imersas em tampão GBSS, onde permaneceram por 30 minutos a 4 °C, com o intuito de inibir a ação de proteases. Após este período, as fatias foram transportadas para o interior do fluxo, de modo a permitir a dissecação da zona subventricular. Após a obtenção dos explantes de ZSV, os mesmos foram plaqueados em placas de cultura de 4 poços (NUNC), sendo cobertos com uma fina camada de Matrigel (Collaborative Biomedical Products) diluído em meio Neurobasal (Gibco), numa concentração 1:3. Após um período de 5 minutos na estufa a 37°C, tempo suficiente para que o Matrigel adquira uma consistência mais gelatinosa, cada poço foi preenchido com meio Neurobasal suplementado de B-27 e os explantes foram mantidos por 48h na estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

3.4 - Imunocitoquímica

Após 48h (2 dias *in vitro*), os explantes foram submetidos a um processo de pré-fixação em vapor de formol por 15 minutos, seguido por fixação em paraformaldeído 4% (PF 4%) por outros 15 minutos. Os explantes foram então lavados 3 vezes em PBS (solução salina com tampão fosfato 0,1M), mantidos por cerca de 1 hora em soro normal de cabra e incubados com anticorpos primários por toda a noite (aproximadamente 12 horas) em uma temperatura de 4°C. Os anticorpos primários e as diluições utilizadas neste estudos foram: anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-PrPc M221 (1:500), anticorpo policlonal feito em coelho Anti-Hop/STI1 (Bethyl, 1:500), anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-PSA-NCAM (Chemicon, 1:200). Os anticorpos foram diluídos em PBS (tampão fosfato 0,1M), sendo que em algumas reações imunocitoquímicas utilizando o anticorpo anti-Hop/STI1, as células foram permeabilizadas através da diluição do anticorpo primário em PBS acrescido de Triton 0,3%. Após 3 lavagens de 5 minutos no dia seguinte, os explantes foram incubados com anticorpos secundários por cerca de 2 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários e as diluições utilizadas foram: anticorpo feito em cabra que reconhece imunoglobulinas de camundongo conjugado a Cy3 (Jackson, 1:800) e Alexa 488, anticorpo feito em cabra que reconhece imunoglobulinas de coelho conjugado a fluoresceína (Molecular Probes, 1:400). Após o período de incubação, os explantes eram novamente lavados 3 vezes em PBS e banhados com DAPI. Por fim, as lâminas foram montadas com N-

Propil Galacto (Merck) ou um meio de montagem aquoso Gel-Mount (Biomeda).

3.5 - Imuno-histoquímica

Camundongos selvagens na primeira semana pós-natal (P0-P6) foram perfundidos com paraformaldeído 4%, após a remoção dos cérebros das caixas cranianas, os mesmos foram mantidos em PF 4% a 4 °C por períodos que variaram aproximadamente entre 6 e 18h. Os cérebros foram então cortados parassagitalmente no vibrátomo em fatias de espessuras entre 40 e 100 µm. As fatias foram lavadas 3 vezes com PBS Triton 0,3% e incubadas por 1 hora em soro normal de cabra 5%. Em seguida, as fatias foram mantidas por aproximadamente 24 h a 4°C com o anticorpo policlonal feito em coelho que reconhece a proteína Hop/STI1 (Bethyl, 1:500). É importante frisar que todos os procedimentos de lavagem dos cortes, assim como as incubações com os anticorpos primários e secundários foram feitos em poços, de modo que as fatias estavam constantemente boiando em solução, sendo banhadas em ambas as superfícies. Após o período de 24 h de incubação, as fatias foram novamente lavadas em PBS Triton 0,3% e incubadas, por 2h em temperatura ambiente, com anticorpo secundário conjugado a fluoresceína Alexa 488 (1:400). Os cortes foram então banhados com DAPI e coletados para a montagem de lâminas utilizando o meio de montagem aquoso Gel-Mount (Biomeda).

3.6 - Tratamento de culturas de explantes com anti-Hop/STI1

Aproximadamente 24 h após o plaqueamento dos explantes (1DIV), as culturas foram visualizadas em um microscópio invertido (Zeiss Axiovert), de modo a serem selecionadas para o tratamento com os anticorpos. Apenas os explantes que já apresentavam halos migratórios, cadeias de neuroblastos migrando para fora dos limites dos explantes, foram selecionados e divididos em dois grupos. O grupo experimental foi tratado com anticorpo policlonal que reconhece a proteína Hop/STI1 (2,2µg/µL, coelho 33, diluição 1:200; 0,011 µg/µL), enquanto que no grupo controle, os explantes foram tratados com IgGs purificadas obtidas a partir de soro coelho antes de sua exposição ao antígeno utilizado para produção do anticorpo (0,82 µg/µL, coelho 34). Estes procedimentos foram realizados em explantes obtidos a partir de camundongos selvagens e nocautes para a proteína do príon. Em experimentos independentes, culturas de camundongos selvagens foram tratadas também com o anticorpo policlonal que reconhecia Hop/STI1 procedente de outro animal (coelho 36, 0,64 µg/µl) e também o anticorpo que reconhece o domínio da proteína Hop/STI1 responsável pela interação com a proteína do príon celular (anti peptídeo 230-245, 0,2 µg/µl). Na figura 6 estão esquematizadas as moléculas de PrP^C e de Hop/STI1, assim como os seus principais domínios e os epítomos reconhecidos pelo anticorpos policlonais anti-Hop/STI1 e anti-peptídeo 230-245.

Para o estabelecimento de uma curva dose-resposta do anticorpo, as culturas de explantes de ZSV foram tratadas com anti-Hop/STI1 (2,2µg/µL, coelho 33) nas seguintes diluições: 1:400 (0,0055 µg/µL), 1:500

(0,0044 µg/µL) e 1:600 (0,0037 µg/µL). Estas mesmas concentrações foram testadas em explantes obtidos a partir de animais nocautes para PrP^c, à exceção de 1:500.

O ensaio de internalização de anti-Hop/STI1 foi realizado através da incubação do anticorpo pelo período de 1 hora em culturas vivas (diluição 1:200 em meio Neurobasal). Em seguida, as culturas foram pré-fixadas com vapor de formol por 15 minutos e imediatamente após o meio de cultura contendo o anti-Hop/STI1 foi substituído por PF 4% a 4 °C por mais 15 minutos. Os explantes foram então lavados 3 vezes com PBS Triton 0,3 %, pré incubados por 1 hora com NGS 5% e incubados com Alexa 488, anticorpo feito em cabra que reconhece imunoglobulinas de coelho, conjugado a fluoresceína (1:400). Os explantes foram incubados com este anticorpo fluorescente por toda uma noite (aproximadamente 12 horas) a 4 °C.

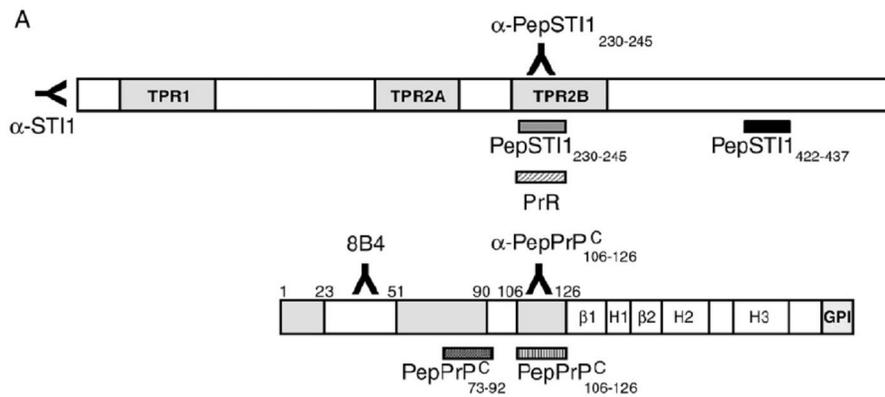


Figura 6 - Esquema caracterizando as moléculas de Hop/STI1 e PrPc. A proteína Hop/STI1 é representada com seus 3 domínios tetratricopeptídeos, responsáveis pela sua interação com a HSP70 e HSP90. Dois dos anticorpos utilizados neste estudo, assim como os seus respectivos epítomos antigênicos se encontram representados. Adaptado de Coitinho et al, 2007

3.7 - Tratamento de culturas de explantes de ZSV com Hop/STI1 recombinante

Foram realizados os mesmos procedimentos já descritos para a obtenção dos explantes de ZSV a partir de cérebros de camundongos selvagens pós-natais. Aproximadamente 24 h após o plaqueamento dos explantes, as culturas foram tratadas com a forma recombinante da proteína Hop/STI1. As proteínas recombinantes foram mantidas a -20 °C e descongeladas cerca de 40 minutos antes de serem diluídas em meio Neurobasal para serem adicionadas às culturas de explantes de ZSV.

Foram testadas diferentes concentrações da proteína e até o presente momento, foram avaliados os efeitos das seguintes concentrações: 0,5 µM, 1,5 µM, 3 µM, 4µM e 4,5 µM. As avaliações dos possíveis efeitos sobre a migração foram feitas através de análises de comparação dos halos migratórios e análise de videomicroscopia de tempo intervalado antes e após o tratamento com a proteína recombinante conforme previamente descrito.

3.8 - Análise quantitativa de migração dos explantes de zona subventricular

Imagens dos explantes foram adquiridas através de uma câmera digital Zeiss Axiocam, acoplada ao microscópio invertido Zeiss Axiovert dotado de câmara incubadora com controle de temperatura (37°C e 5%CO₂). As imagens foram obtidas em dois períodos distintos, antes do tratamento com os anticorpos e cerca de 24h após a adição dos mesmos. As imagens foram então submetidas à análise através da utilização do programa Image Pro Express aonde foram obtidas as medidas dos perímetros dos explantes e seus respectivos halos migratórios.

Em seguida, a partir destas medidas foi calculado um índice migratório para cada explante, que consiste na razão do perímetro 24h após o tratamento, sobre o perímetro inicial antes do tratamento. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa Prisma, sendo que foram utilizados dois tipos de testes não-paramétricos, pois foi considerado que os índices migratórios não apresentavam uma distribuição normal. Inicialmente, foi utilizado o teste tipo T não-paramétrico Mann-Whitney, para comparar grupos de camundongos selvagens e nocautes para PrP^C tratados com anti-Hop/ST11 e os tratados com anticorpos controle. Grupos de animais selvagens controle e experimentais foram ainda comparados com grupos controle e experimentais de animais nocautes para PrP^C, através da utilização de um teste ANOVA não-paramétrico, seguido de um pós-teste de Dunn. Em experimentos adicionais realizados para análise quantitativa da migração em explantes de ZSV, as imagens foram adquiridas através de uma câmara

digital CoolSnap Pro Monochrome (Media Cybernetics), acoplada a um microscópio de epifluorescência invertido Nikon TE200 Eclipse. As imagens foram analisadas através do programa Image J 1.37 (National Institutes of Health, USA). A partir da obtenção do índice migratório, que foi realizada de forma similar aos experimentos anteriores, estes valores foram submetidos aos testes estatísticos já mencionados no programa Prisma.

3.9 - Videomicroscopia de tempo intervalado

Em 1 DIV, as placas de cultura contendo os explantes de ZSV foram colocados em uma câmara incubadora acoplada ao microscópio invertido Zeiss Axiovert. O ambiente no interior da câmara foi mantido em condições semelhantes ao de uma estufa (5 % CO₂ e 37°C). Imagens dos explantes foram adquiridas através de uma câmera digital Zeiss Axiovision a cada 2 min, em períodos que variavam de 4 a 5 horas. Após o término de um período inicial de aquisição de imagens, os explantes foram submetidos ao tratamento com anticorpo que reconhece Hop/STI1 ou IgG purificada a partir de um coelho não imunizado. Em seguida, as placas de cultura foram novamente posicionadas no interior da câmara incubadora, de modo a iniciar um novo ciclo de aquisição de imagens. Para demonstrar a reversão do tratamento com anti-Hop/STI1, após este segundo período de 4-5 h, o meio contendo o anticorpo foi retirado, lavado 2-3 vezes com meio e substituído por meio Neurobasal sem acréscimo de qualquer anticorpo, os explantes foram então retornados para a câmara incubadora, onde foram registradas imagens por mais um período de 4-5h.

3.10 - Determinação da velocidade média das células através de análise de vídeomicroscopia de tempo intervalado

Com o intuito de obter dados quantitativos a partir da análise dos vídeos realizados, células no interior das cadeias tiveram seu movimento rastreado através da utilização do programa Image J 1.37 (National Institutes of Health, USA). A seleção da amostragem de células analisadas variou de acordo com o tratamento utilizado nas culturas. Desta forma, em culturas tratadas com anti-Hop/ST11 apenas foram consideradas células migrando em direção à extremidade mais distal das cadeias. Em contrapartida, em culturas tratadas com proteína recombinante Hop/ST11 as células foram selecionadas aleatoriamente. O rastreamento das células nas duas situações foi iniciado quando a locomoção celular foi deflagrada e interrompido quando as células saíam de foco ou misturavam-se a outras de forma indistinguível. Em seguida, a distância total percorrida pelas células foi utilizada para calcular a velocidade média das células avaliadas. Estes valores foram então analisados através do programa Prisma utilizando Teste T não pareado e Teste Mann-Whitney para as células tratadas com anti-Hop/ST11 e Hop/ST11 recombinante respectivamente.

3.11 - *Western Blot*

Foram realizados os mesmos procedimentos já descritos para a obtenção da zona subventricular a partir dos cérebros de 6 camundongos selvagens e 6 camundongos nocautes pós-natos (P1). Após serem dissecados, os explantes de cada tipo de animal foram recolhidos em tubos *ependorfs* contendo solução de GBSS. Os explantes foram lavados duas vezes com PBS gelado antes da adição de 80 µl de tampão HEPA em cada *ependorf*. Por 40 minutos, os *ependorfs* foram mantidos no gelo, sendo retirados a cada 10 minutos para serem agitados no vórtex. Em seguida, os *ependorfs* foram centrifugados por 15 minutos a 14000 RPM (16000 G) (Hitachi Himac CF15D2, rotor Hitachi RT 1508) em uma centrífuga refrigerada que mantinha a temperatura a 4 °C. A solução sobrenadante contendo o extrato total de proteínas foi coletada e armazenada a -80°C.

A quantidade de proteína total foi calculada através do método de Lowry (Lowry et al, 1951). Após a determinação da quantidade de proteínas foi realizada eletroforese, com o depósito de 20 µg do extrato de proteínas da ZSV de camundongos selvagens e nocautes. Depois do término da corrida, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Antes da incubação com o anticorpo primário, a membrana foi bloqueada com 5% leite desnatado em TBS/Tween 0,05% por 1 hora. Os anticorpos primários e secundários foram diluídos em BSA a 5%, as concentrações utilizadas foram 1:5000 e 1:2000, respectivamente. O anticorpo primário anti-HOP/STI1 foi incubado com a membrana de nitrocelulose pernoite e após a lavagem da membrana com TBS/Tween 0,05% seguiu-se a incubação de 1 hora com

anticorpo secundário conjugado a peroxidase. Embora os tempos de exposição dos filmes à membrana tenham sido variados, o tempo máximo de exposição foi de apenas 5 segundos.

Para o controle de carregamento, foi utilizado o anticorpo que reconhece a α -tubulina (anti-mouse sigma, concentração 1:10000). Este anticorpo também foi diluído em BSA a 5% e incubado pernoite com a membrana. O anticorpo secundário conjugado a peroxidase foi utilizado na concentração 1:2000.

3.12 - Formação de agregados celulares a partir de explantes de ZSV

Foram utilizados camundongos selvagens P2-P3. Os animais foram sacrificados, tiveram seus cérebros fatiados parassagitalmente no fatiador de tecidos na espessura de 350 μm e mantidos por 30 minutos na geladeira antes dos procedimentos de dissecação da ZSV. Os explantes obtidos foram coletados em um tubo falcon contendo solução de HBSS (-) a temperatura ambiente. Em seguida, os explantes foram lavados duas vezes com HBSS (-) antes de serem tratados por 2 minutos com tripsina (0,5 mg/ml), sendo agitados ocasionalmente neste período. A tripsina foi então removida com o auxílio de uma pipeta pasteur para a adição de HBSS (+) (Para cada 10 ml de HBSS (+): 10 μl de DNase 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 ml soro fetal de cavalo, 200 μl MgCl_2 (400mM), 100 μl HEPES (1M) em 8,7 ml de HBSS (-)). Os explantes foram lavados duas vezes com esta solução de HBSS (+), ressuspensos em 2ml desta mesma solução e submetidos a 40 ciclos de dissociação mecânica com pipetas pasteur previamente polidas em fogo. Após os procedimentos de dissociação mecânica, uma amostra de 20 μL da solução contendo células foi misturado com azul de Trypan para contagem na câmara de Neubauer. Na seção dos resultados estão descritos os dados obtidos a partir de um experimento de formação de agregados, aonde foi obtida uma solução contendo 43×10^4 células. O tubo falcon contendo a solução foi centrifugado por 3 minutos a 3000 RPM, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 μL de meio Neurobasal. Após homogeneização, os 200 μL foram separados em dois *ependorfs* de 100 μL . Em seguida, um *ependorf* foi tratado com anti-Hop/ST11 (1:200) e o outro com IgG irrelevante

de coelho. O conteúdo de cada *ependorf* foi depositado em forma de 5 gotas de 20 μ L sobre a superfície interna de uma tampa de placa de petri, estas tampas foram imediatamente colocadas sobre as respectivas placas de petri contendo meio neurobasal, de modo a permitir que a ação da gravidade contribuísse na formação de agregados celulares. Estas placas foram mantidas em uma estufa incubadora de CO₂ por pelo menos 30 minutos. Após este período, pares de gotas foram montados sobre lâminas e levados para análise em um microscópio invertido Nikon TE200 Eclipse. Para cada gota foram capturadas 3 ou 4 imagens de campos distintos através de uma câmera digital CoolSnap Pro acoplada ao microscópio já mencionado. As imagens foram posteriormente submetidas à análise através da utilização do programa Image J, aonde foram obtidos os valores das áreas dos agregados. Estes valores foram então analisados através de teste estatístico Mann-Whitney no programa Prisma. Apenas pares de gotas que foram montados sobre as lâminas simultaneamente foram comparados entre si.

4 - Resultados

4.1 - Co-culturas de fatias organotípicas de córtex e eminência ganglionar

Nós estabelecemos inicialmente um modelo *in vitro* cujo propósito básico consistia em analisar a migração de células de uma região telencéfalica ventral, que compreende as eminências ganglionares, até o seu destino final que corresponde ao córtex cerebral e assim observar quais seriam os efeitos da ausência de PrP^c sobre esta migração celular. Decidimos por um modelo de cultura no qual colocávamos fatias de eminências ganglionar (EG) nocaute ou selvagem apostos a fatias de córtex cerebral provenientes de camundongos selvagens. Com este desenho experimental pretendíamos revelar diferenças que possivelmente fossem compensadas no camundongo nocaute *per se*.

De modo a permitir que acompanhássemos estas células migratórias neste trajeto, as fêmeas grávidas eram injetadas com BrdU 40 minutos antes da retirada dos fetos que seriam utilizados para a obtenção das eminências ganglionares. Após as 48h de cultura e a subsequente análise imunohistoquímica, eram observadas várias células imunoreativas para BrdU nestas co-culturas. Apesar da maioria das células marcadas estar na região mais dorsal das eminências ganglionares, muitas células foram detectadas no interior das fatias corticais.

Para tentar quantificar os dados gerados, foi necessário estabelecer uma relação entre o número e a localização de células no interior das fatias

corticais, assim como a distância em relação ao seu ponto de origem. Isto foi possível através da representação destas co-culturas em ilustrações de câmara clara. Este procedimento revelou que apesar da grande densidade celular na região mais proximal à junção fatia cortical-eminência ganglionar, as células se encontravam difundidas por toda a fatia cortical, inclusive sendo detectadas nas extremidades mais distais das fatias corticais em relação à sua junção com a eminência ganglionar. Em alguns casos, células marcadas com anticorpo que reconhece o BrdU eram visualizadas fora dos limites das fatias. Estas descrições se aplicam tanto para células selvagens, como para células obtidas a partir de camundongos nocautes para PrP^c (Fig 7).

A porcentagem de células ocupando setores diferentes dentro das fatias corticais, em relação ao número total observado nas mesmas fatias, foi em seguida determinada a partir das representações das co-culturas em câmara clara. Análises estatísticas realizadas através do teste Mann-Whitney não detectaram diferenças significativas entre o padrão de ocupação nos 4 diferentes setores observados das co-culturas realizadas com eminências ganglionares provenientes de camundongos selvagens e nocautes para PrP^c (Setor 1, $p = 0,5697$; Setor 2, $p = 0,3677$; Setor 3, $p = 0,3677$; Setor 4, $p=0,6828$) (Fig 8).

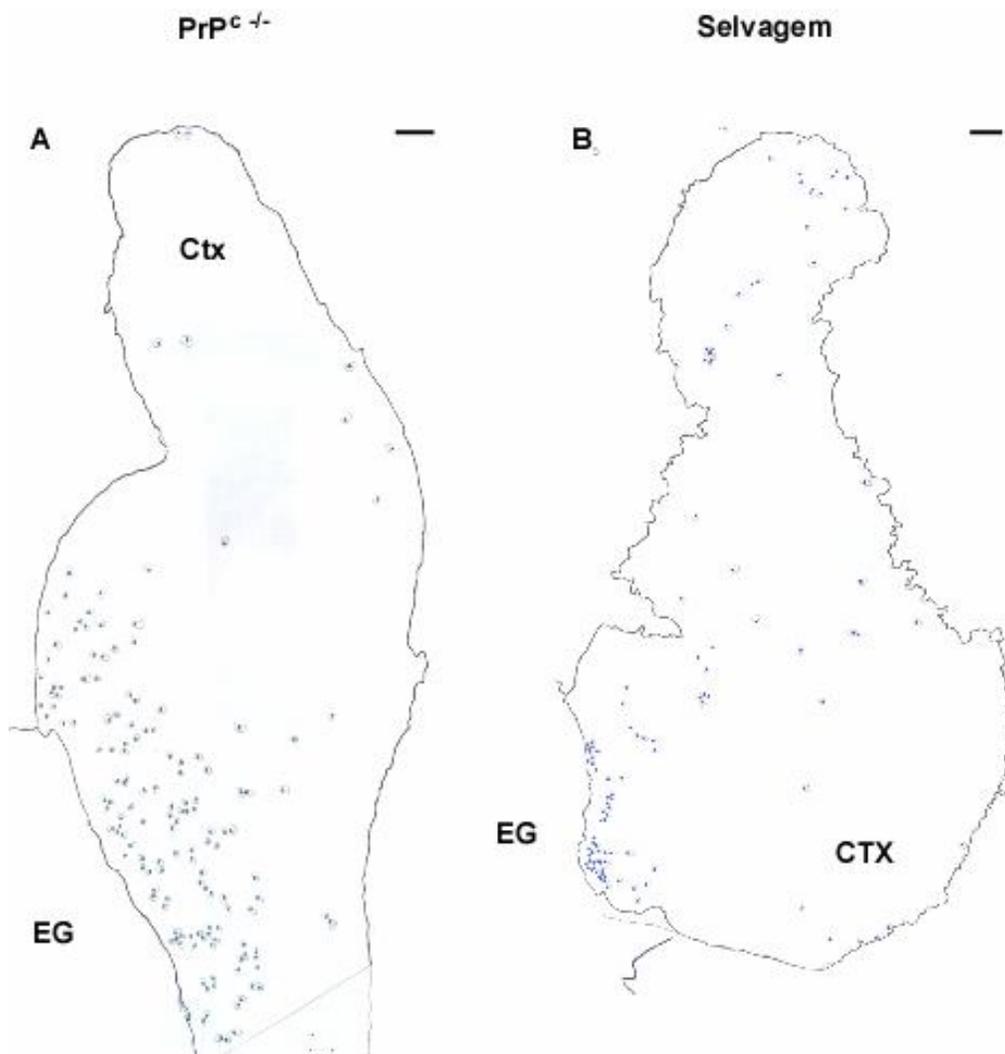


Figura 7 - Células BrdU+ provenientes de camundongos selvagens e nocautes para PrPc são capazes de migrar para o córtex (Ctx) em co-culturas de fatias organotípicas. (A) e (B) ilustrações representativas de co-culturas cujas eminências ganglionares (EG) foram obtidas de camundongos nocautes para PrPc e de selvagens, respectivamente. Note que em ambos os casos são encontradas células até a extremidade distal da fatia cortical. Barra de calibração: 100 μ m

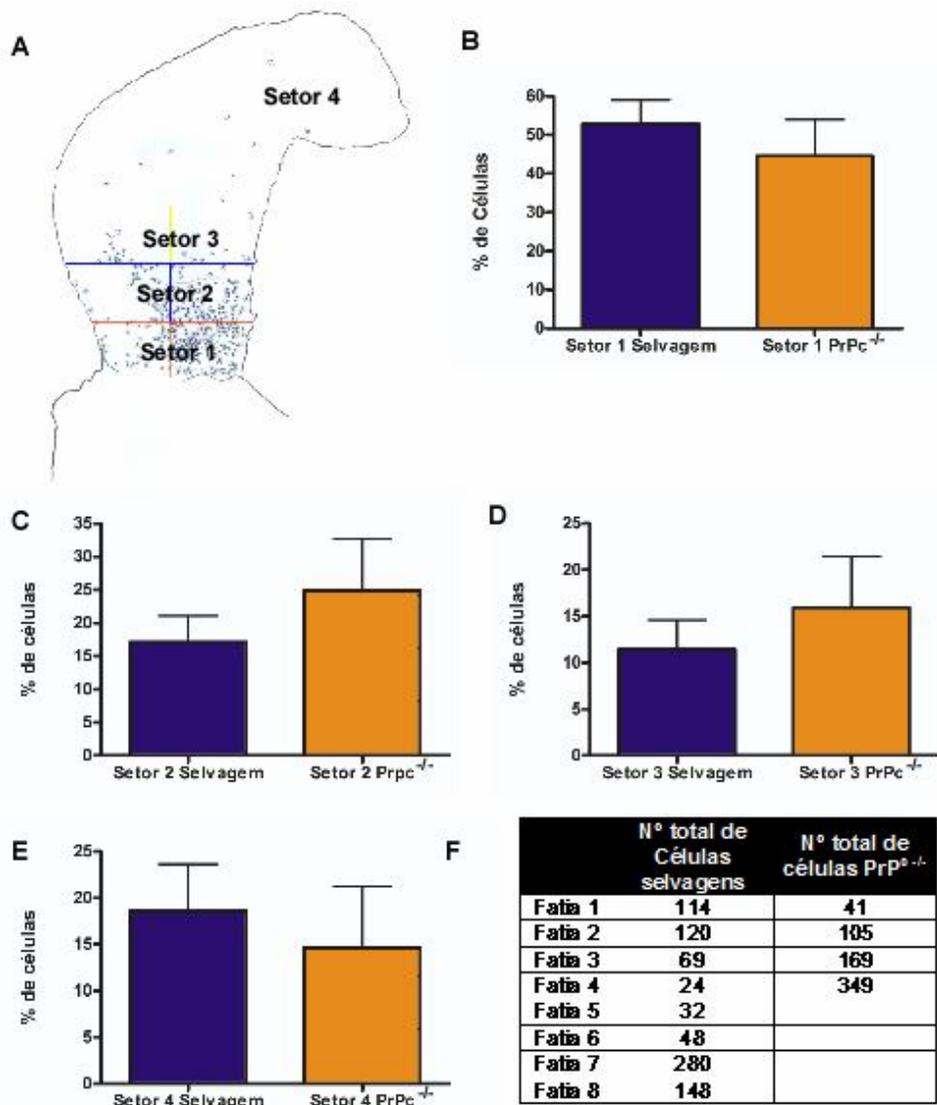


Figura 8 - Células selvagens e nocautes para PrPc ocupam diferentes setores do córtex em proporção similar. (A) Esquema representativo de uma fatia de córtex subdividida em 4 setores. B, C, D e E mostram as médias das porcentagens obtidas em relação ao número total de células no interior das fatias corticais localizadas nos setores 1, 2, 3 e 4, respectivamente. A análise estatística não detectou diferenças significativas (Teste Mann-Whitney, Setor 1, $p=0,5697$; Setor 2, $p=0,3677$; Setor 3, $p=0,3677$; Setor 4, $p=0,6828$). (F) Tabela com os valores do número total de células detectadas sobre as fatias corticais.

A presença de células imuno-marcadas para BrdU no interior das fatias poderia não ser uma evidência direta de migração celular, visto que a detecção de algumas células imunoreativas para BrdU do lado de fora das fatias indica a possibilidade de que as fatias corticais estariam sendo preenchidas por células das eminências ganglionares que por ventura se soltaram do tecido após os procedimentos de lavagem e tratamento ácido necessários para a realização da imuno-histoquímica. Para descartar esta hipótese e simultaneamente facilitar a identificação das células migratórias por sua morfologia nos ensaios de co-cultura de fatias organotípicas, foram utilizados camundongos nocautes para PrP^c expressando a proteína de fluorescência verde de forma constitutiva. Somente as fatias de eminência ganglionar destes animais eram utilizadas, sendo co-cultivadas em contato direto com fatias corticais de camundongos selvagens. Após 48h de cultura, células eGFP selvagens e nocautes eram detectadas no interior das fatias corticais. Conforme já descrito para as células imunoreativas com BrdU, na maioria dos casos analisados, a densidade de células eGFP era elevada na área mais proximal ao ponto de contato entre as fatias corticais e de eminência ganglionar. Porém, ao contrário do que foi observado com a marcação com BrdU, onde aparentemente as células se encontravam difusas por toda a superfície das fatias corticais, havia um gradiente de ocupação mais nítido por parte das células eGFP, pois apesar do alto grau de concentração na região próxima à junção córtex-eminência, as células nas regiões mais distais se tornavam cada vez mais escassas (Fig 9 e 10 A).

Ao serem analisadas em maior aumento, eram identificadas no interior das fatias corticais células com morfologia típica migratória, dotadas de

longos prolongamentos líderes. Desta forma, aparentemente, estas células também migram efetivamente em direção e sobre a fatia cortical. Estes prolongamentos exibiam várias orientações, o que poderia ser um indicativo de uma migração intracortical multidirecionada, semelhante ao padrão de migração de interneurônios GABAérgicos previamente descrito por Tanaka e colaboradores em fatias corticais organotípicas (Tanaka et al., 2003) (Fig 9 e 10 B).

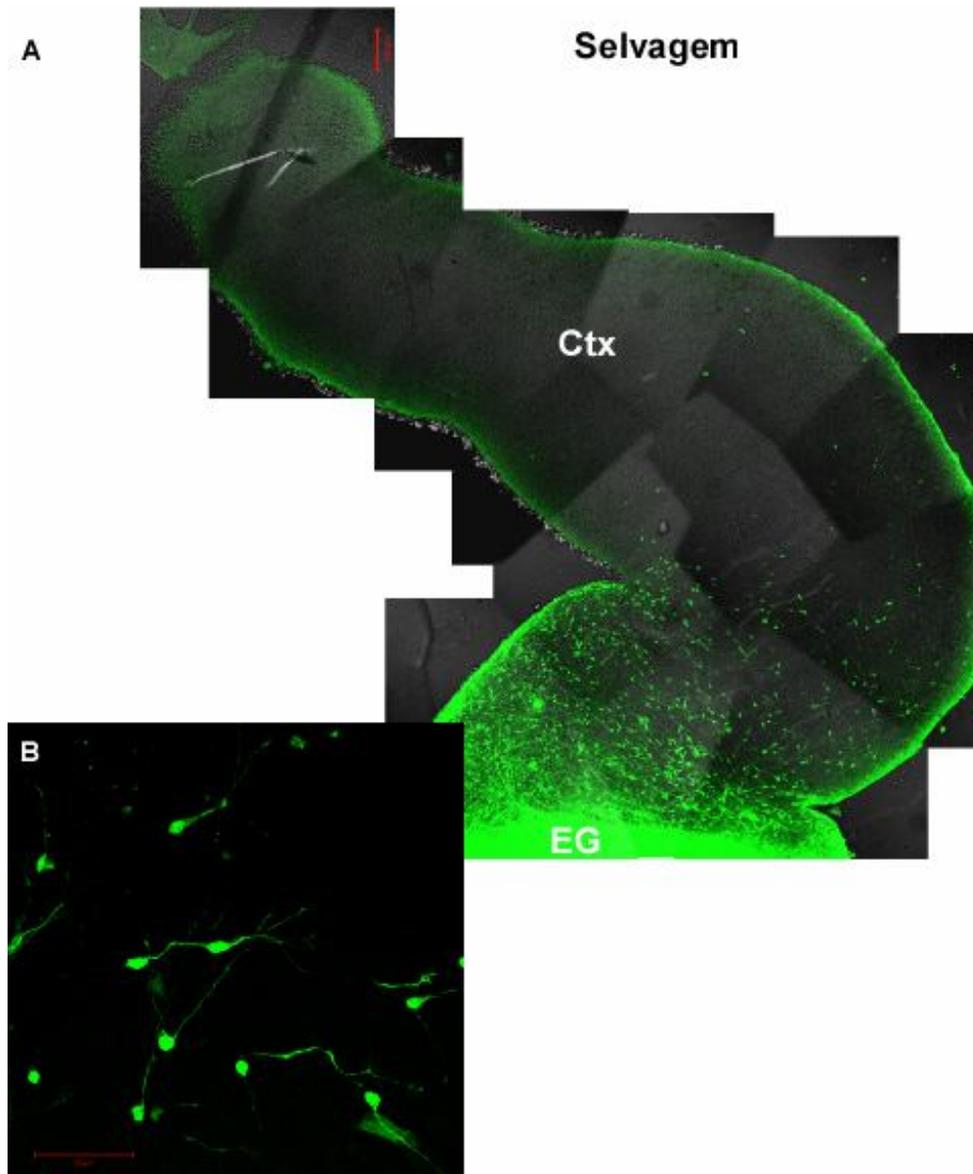


Figura 9 - Co-culturas de fatias organotípicas de córtex e eminência ganglionar realizadas com eminências ganglionares de animais transgênicos eGFP. (A) Células selvagens eGFP migram a partir das eminências ganglionares e invadem as fatias corticais. (B) Imagem em maior aumento representando um grupo de células selvagens eGFP dotadas de morfologias migratórias, caracterizadas pela presença de prolongamentos líderes orientados para várias direções. Barras: (A) 100 mm, (B) 50 mm. EG. Eminência ganglionar, Ctx - Córtex.

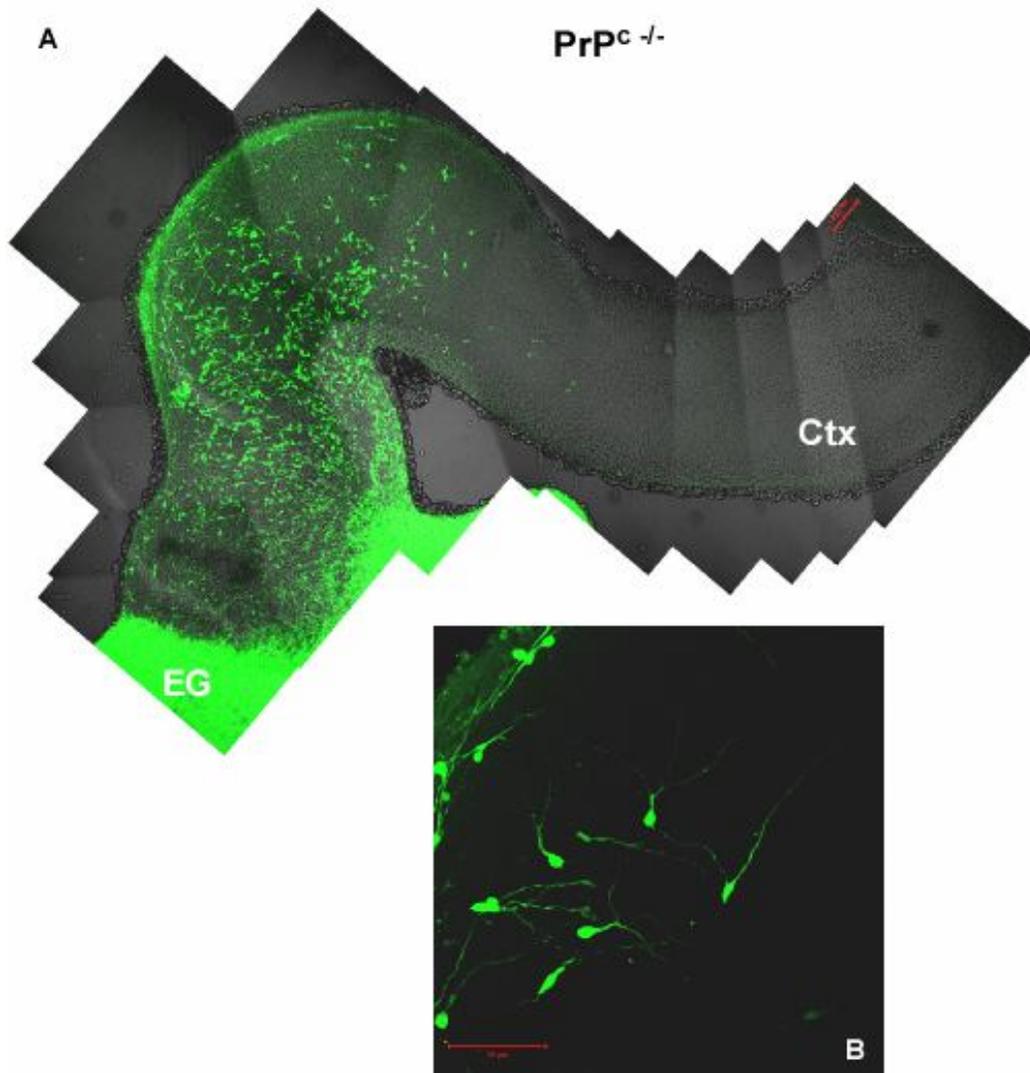


Figura 10 - Co-culturas de fatias organotípicas de córtex e eminência ganglionar realizadas com eminências ganglionares de animais eGFP. (A) Células PrPc $-/-$ eGFP migram a partir das eminências ganglionares e invadem as fatias corticais de animais selvagens. (B) Imagem em maior aumento representando um grupo de células PrPc $-/-$ eGFP dotado de morfologia migratória, caracterizado por prolongamentos líderes orientados para várias direções. Barras: (A) 100 μ m, (B) 50 μ m. EG - Eminência ganglionar, Ctx - Córtex

O padrão de ocupação das fatias por parte das células eGFP, assim como a detecção de morfologias migratórias e a multi-orientação de prolongamentos foram observados em co-culturas onde foram utilizadas fatias de eminência ganglionar selvagens ou nocautes para PrP^c co-cultivadas com fatias de córtex cerebral selvagens. Com o intuito de verificar possíveis efeitos na migração celular decorrentes da ausência de PrP^c, novamente as fatias corticais foram subdivididas em setores que permitiram avaliar o grau de invasão do tecido por parte das células das eminências. De acordo com os resultados prévios analisados através de câmara clara, não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de células eGFP selvagens e nocautes, referentes ao valor total da população celular eGFP das fatias, presentes em cada setor (Setor 1, p = 0,6857; Setor 2, p = 0,4857; Setor 3, p = 0,8857; Setor 4, p = 0,8857) (Fig 11).

Estudos prévios afirmam que PrP^c exerce um papel importante em processos de neuritogênese (Graner et al., 2000; Lima et al., 2007), considerando estas evidências investigamos a morfologia dos prolongamentos neuríticos de células eGFP migrando sobre fatias corticais. Adotando como parâmetros o perímetro e a área das células, novamente não foram observadas diferenças significativas entre células selvagens (média perímetros = 152,9 $\mu\text{m} \pm 21,93$; média áreas = 93,46 $\mu\text{m} \pm 11,95$, n=11) e derivadas de animais nocautes para PrP^c (média perímetros = 151,3 $\mu\text{m} \pm 11,88$; média área = 88,13 $\mu\text{m} \pm 7,209$) (Teste T não pareado, perímetro p=0,9426; área p = 0,6884) (Fig 12).

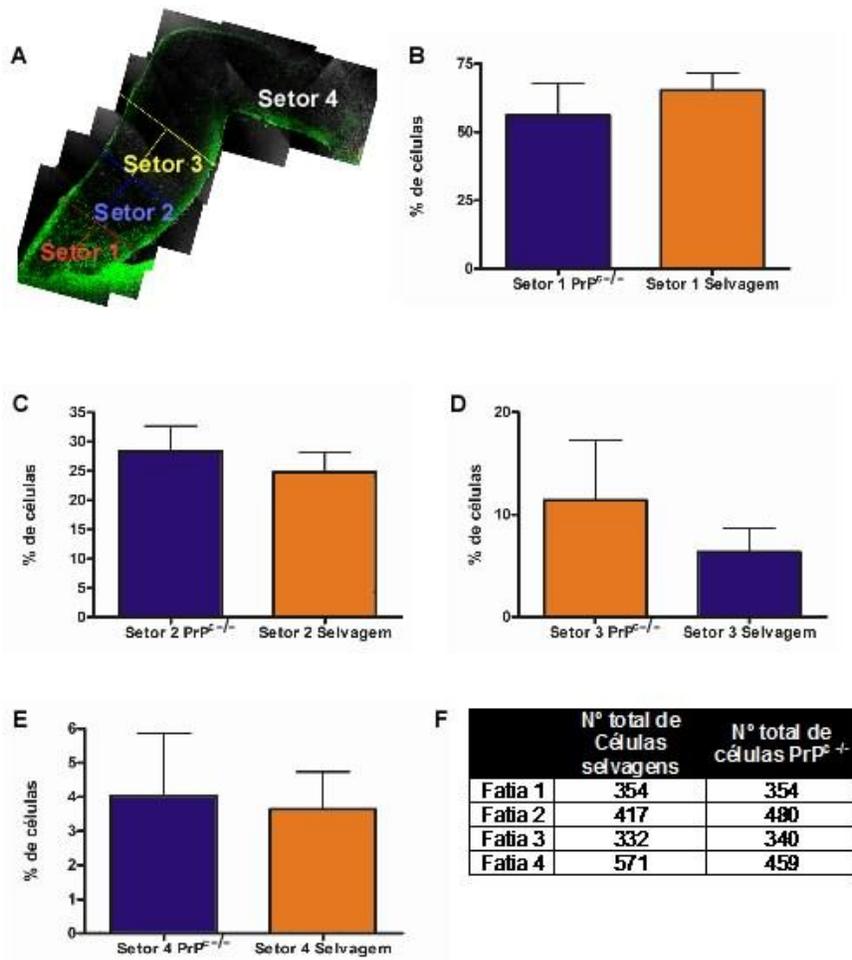


Figura 11 - Quantificação da porcentagem de células por setor de córtex como parâmetro de análise da capacidade migratória das células da eminência ganglionar. Em (A), representação de uma fatia cortical subdividida em 4 setores. (B, C, D e E). Análises estatísticas não revelaram diferenças significativas entre o padrão de ocupação das células quando o grupo nocaute para PrPc foi comparado com o selvagem nos 4 setores analisados (Teste Mann-Whitney, Setor 1, $p=0,6857$; Setor 2, $p=0,4857$; Setor 3, $p=0,8857$; Setor 4, $p=0,8857$). (F) Tabela com os valores do número total de células detectados sobre as fatias corticais.

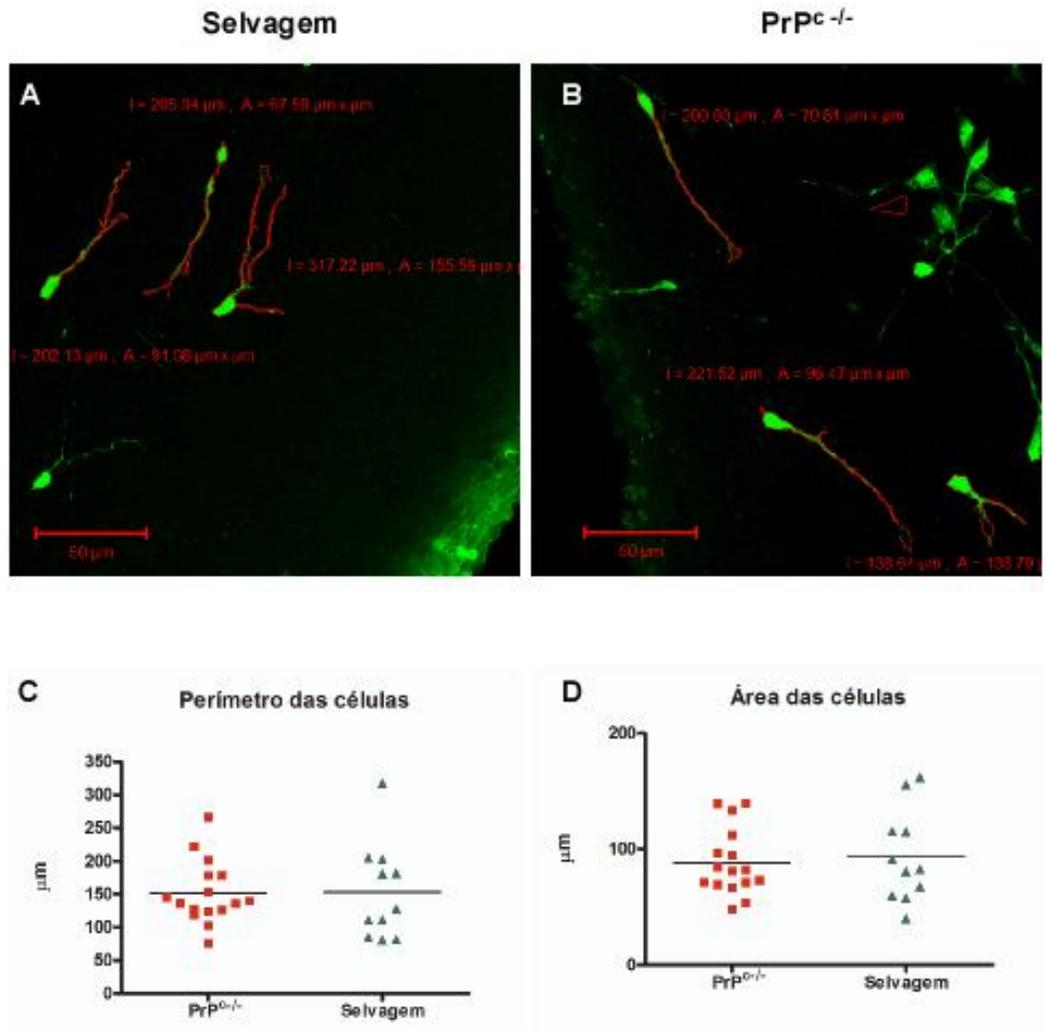


Figura 12 - A ausência de PrPc não parece afetar a morfologia dos neuritos de células eGFP migrando sobre fatias corticais. Em (A) e (B) fotos representativas de reconstruções feitas a partir de microscopia confocal ilustrando células eGFP selvagens e nocautes para PrPc e suas respectivas medidas de área e perímetro. Em (C) e (D) análise quantitativa demonstra que o perímetro e a área das células de ambos genótipos não diferem entre si (Teste T não pareado, em C, $p=0,9426$, em D, $p=0,6884$). Barra: 50 μm

Conclusões da primeira parte

- Células provenientes da eminência ganglionar de animais selvagens e nocautes para PrP^c apresentam um padrão de migração similar sobre um substrato selvagem.
- A morfologia dos prolongamentos neuríticos de células em atividade migratória sobre fatias corticais selvagens não sofre alterações significativas na ausência de PrP^c.

4.2 - Expressão de PrP^c em explantes de zona subventricular

Baseado nos resultados descritos pelo nosso grupo (Costa et al., dados não publicados), onde a expressão de PrP^c foi descrita em rotas migratórias *in situ* e em neurônios migratórios *in vitro*, nós resolvemos investigar se PrP^c poderia ser detectada em outras populações de neurônios migratórios. Utilizamos então o ensaio *in vitro* de explantes de zona subventricular em Matrigel, por se tratar de um modelo que nos permite visualizar e manipular experimentalmente a migração de neuroblastos da ZSV em cadeias, característica desta região (Wichterle et al., 1997; Miyakoshi et al., 2001). Conforme já foi previamente descrito nestes estudos, a migração em cadeias é caracterizada pela forma justaposta como as células migratórias se associam entre si. A formação de estruturas tão compactas dificulta muitas vezes o discernimento dos limites celulares individuais, de modo que muitas vezes as cadeias exibem um aspecto de um grande sincício (Fig 13 A, detalhe).

Em trabalhos anteriores, já havíamos observado que esta organização em cadeias no modelo de explantes de ZSV em Matrigel é perdida após 3 DIV, consequência de um possível processo de diferenciação celular, algo que corrobora dados de outros grupos (Simó et al., 2006). Por este motivo, todas as nossas manipulações experimentais foram feitas antes das células atingirem este estado de diferenciação.

Para analisar a expressão de diferentes moléculas nestas células migratórias, as culturas foram fixadas após 2 DIV e submetidas à imunocitoquímica. A imunomarcação para a proteína do príon, obtida a partir

da utilização do anticorpo policlonal M221, revela um padrão puntiforme ao longo das membranas celulares (Fig 13 C), que de certo modo se assemelha ao descrito para outra molécula presente nas membranas destas células, o gângliosídeo 9-O-acetil GD3 (Miyakoshi et al., 2001). A total ausência de imunomarcação em explantes de camundongos nocautes para PrP^c indica que este anticorpo reconhece especificamente a proteína do príon (dados não mostrados). No entanto, apesar de estarem desprovidos de PrP^c, células provenientes destes explantes mantêm a capacidade de migrar organizadas em cadeias (Fig 15).

Para avaliar possíveis alterações nesta migração em cadeia decorrente da ausência de PrP^c, foram delineados os perímetros das cadeias ao redor dos explantes, que compõem o que classificamos como halos migratórios. Foram obtidas medidas dos halos circundando explantes provenientes de animais selvagens e nocautes para PrP^c. Através de análise estatística, foi observado que os perímetros dos halos de ambos os genótipos não diferem significativamente em 1 DIV e 2 DIV (Teste Mann Whitney, 1DIV, $p = 0,2031$; 2DIV, $p = 0,4179$), confirmando assim os dados qualitativos que sugeriam que a migração em cadeias nos animais nocautes era indistinguível da observada nos animais selvagens (Fig 14). No entanto, é possível que a ausência de PrP^c acarrete em mudanças finas no modo de migração destas células, no entanto estas modificações não resultam em prejuízo na capacidade migratória global dos neuroblastos. Contudo, esta hipótese pode vir a ser descartada se nos basearmos nos dados de videomicroscopia de tempo intervalado que serão relatados nas próximas seções.

Uma outra forma de investigar a relevância de PrP^c na migração em cadeias consistiu no tratamento de culturas de explantes de ZSV com anticorpos capazes de se ligar de forma específica a PrP^c presente nas células migratórias. Embora um experimento deste tipo tenha sido de fato realizado, os dados gerados foram insuficientes para a obtenção de uma análise quantitativa conclusiva. No entanto, se for considerado apenas o aspecto qualitativo deste mesmo experimento, em nenhuma das concentrações de anti - PrP^c utilizadas (1:25, 1:50 e 1:100) observou-se uma alteração significativa na organização e morfologia dos halos migratórios (dados não mostrados)

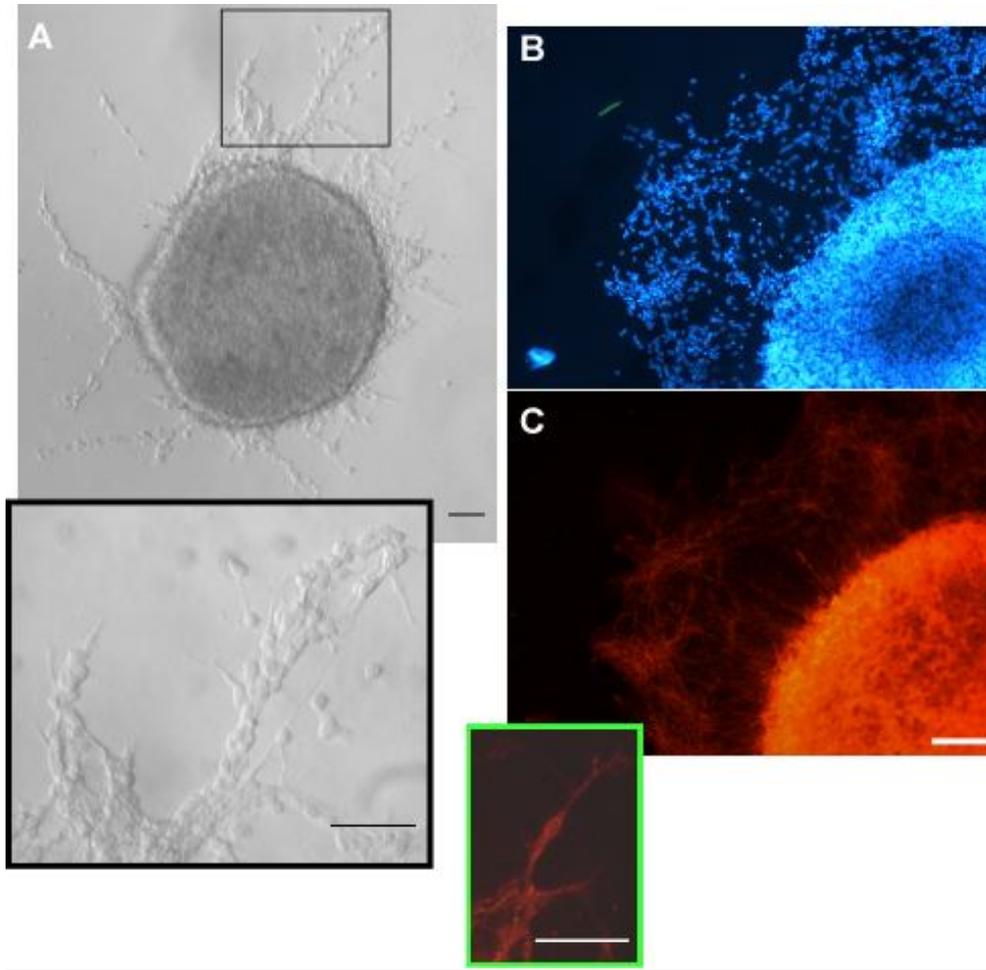


Figura 13 - Análise da expressão da proteína do príon celular através de imunocitoquímica em um modelo in vitro de explantes de zona subventricular. (A) Imagem de microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) demonstrando a organização em cadeias das células migrando a partir dos explantes de ZSV. Em destaque, imagem em maior aumento de uma cadeia migratória composta por várias células. (B) Explante de ZSV corado com DAPI exibindo um denso halo de núcleos após 2 DIV. (C) As células do halo migratório assim como o interior dos explantes apresentam imunomarcagem para a proteína do príon celular. Em detalhe, nota-se o padrão de marcação puntiforme da PrPc ao longo da membrana de uma célula. Barras: (A) 50 μ m, (C) 100 μ m, no destaque 50 μ m

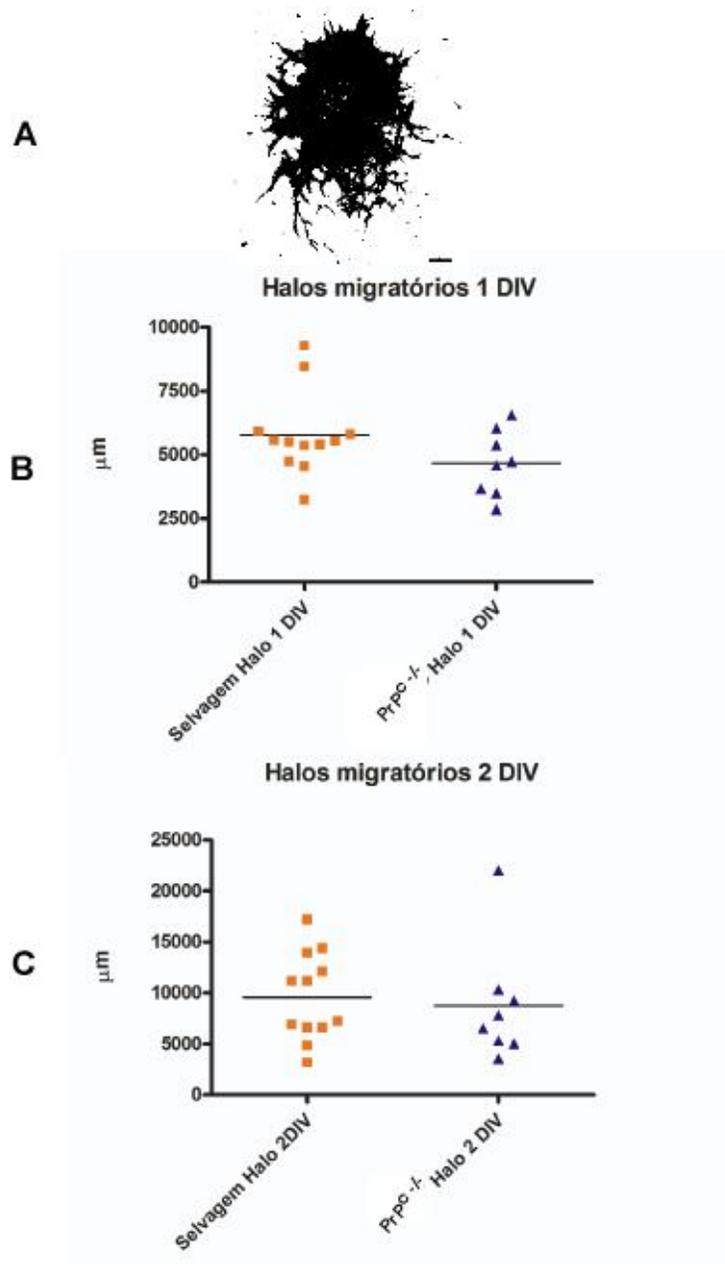


Figura 14 - Os halos migratórios ao redor de explantes provenientes de animais selvagens e animais nocautes para PrPc são aparentemente indistinguíveis quando comparados entre si.(A) Figura representativa da análise dos halos migratórios ao redor dos explantes feita através do programa Image J. Não há diferença significativa ($p=0,2031$) entre os perímetros dos halos ao redor de explantes selvagens e nocautes para PrPc no primeiro dia de cultura (1 DIV). Esta característica é mantida ($p=0,4179$) também no segundo dia de cultura (2 DIV). Ambos os grupos foram tratados com Imunoglobulinas isoladas de soro de coelho pré-imunizado. Os perímetros dos explantes foram analisados através de um teste não-paramétrico Mann-Whitney. Barra de Calibração 100 µm.

4.3 - Expressão de Hop/STI1 na zona subventricular

Através de ensaios imunocitoquímicos usando anticorpo policlonal anti-Hop/STI1, é possível observar que a proteína Hop/STI1 está presente em explantes de ZSV, sejam eles procedentes de camundongos selvagens ou nocautes para PrP^c. Uma análise preliminar através de microscopia de fluorescência convencional não forneceu nenhum indicativo de discrepância entre o padrão de expressão de Hop/STI1 em culturas originárias de animais dos dois genótipos. À primeira vista também não parece possível discernir se a imunomarcação observada é predominantemente citoplasmática ou membranar, apesar da aparente presença da proteína ao redor do soma e ao longo dos prolongamentos celulares (Fig 15). Outros ensaios imunocitoquímicos utilizando anticorpos contra Hop/STI1 e PSA-NCAM, a molécula de adesão neural que é expressa em neuroblastos da ZSV, permitiram caracterizar parcialmente os tipos celulares que expressam Hop/STI1. Análises obtidas através de microscopia confocal demonstram que células PSA-NCAM positivas também apresentam expressão de Hop/STI1, confirmando que tratam-se de neuroblastos da zona subventricular (Fig 16). No entanto, foram encontradas diferenças nos padrões de imunomarcação quando as culturas foram submetidas a tratamento permeabilizante com o detergente Triton. A permeabilização das células antes da incubação com anticorpo anti-ST1 resulta na marcação quase total das células contidas no interior das cadeias migratórias. Em contrapartida, a detecção de Hop/STI1 é mais esparsa na ausência de um tratamento com Triton, apenas uma subpopulação das células parece expressar a proteína. Quando analisadas por microscopia confocal, é possível notar que sem o tratamento com Triton,

a expressão de Hop/STI1 está restrita aos prolongamentos celulares (Fig 17). Estes dados sugerem que a localização de Hop/STI1 nas células das cadeias migratórias é majoritariamente citoplasmática, porém de alguma maneira estaria sendo externalizada para o meio extracelular.

Com o intuito de verificar o padrão de expressão de Hop/STI1 *in vivo*, cortes histológicos foram preparados para imuno-histoquímica. A imuno-histoquímica em fatias sagitais, obtidas a partir de cérebros de camundongos P4 selvagens, revela uma intensa marcação de Hop/STI1 em regiões como a zona subventricular, plexo coróide e por toda a via migratória rostral. No interior desta via, é possível identificar várias células expressando Hop/STI1 orientadas em sua maioria na mesma direção (Fig 18). Nota-se que diferente das regiões que margeiam a RMS apenas os perfis migratórios podem ser discernidos. Para confirmar os dados de imuno-histoquímica que indicam expressão da Hop/STI1 na zona subventricular e verificar a especificidade do anticorpo utilizado foi realizado um ensaio de *western blot* a partir do extrato total de proteínas da ZSV dissecada de cérebros de camundongos selvagens e nocautes pós-natais (P1). O anti- STI1 reconheceu uma banda única na faixa dos 66 kda, correspondente ao peso molecular da proteína, em extratos provenientes de camundongos dos dois genótipos (Fig 19).

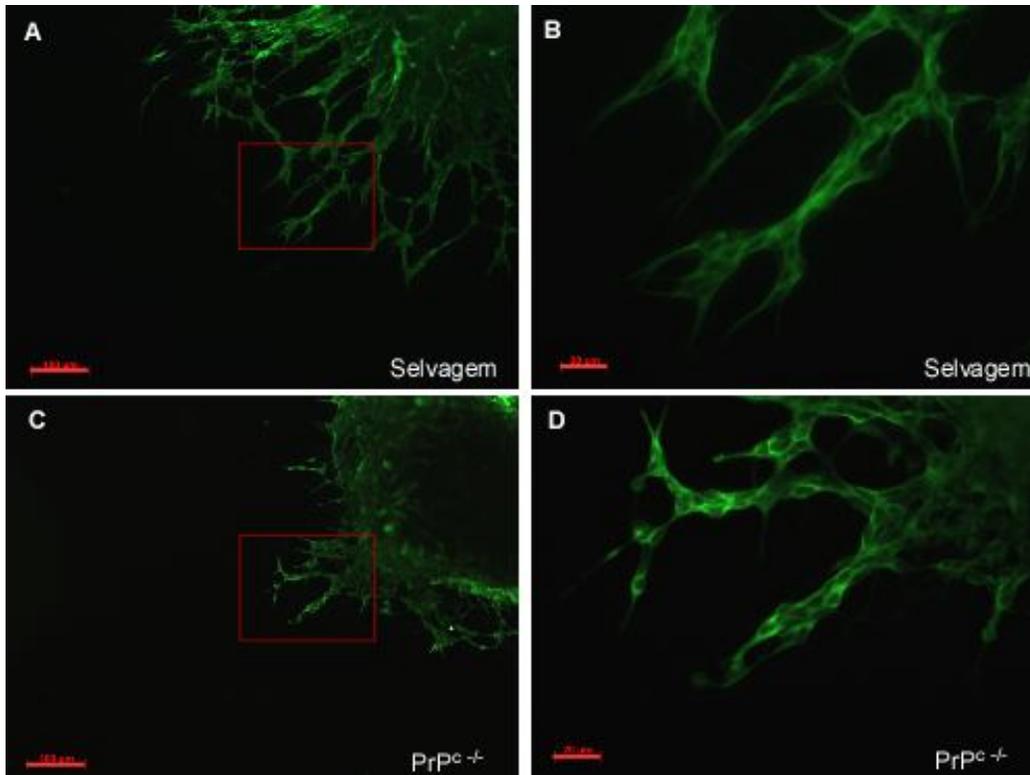


Figura 15 - A proteína Hop/STI1 é expressa em células migratórias provenientes de explantes de ZSV submetidos a permeabilização prévia com Triton. (A) Imunomarcacão para o anticorpo que reconhece Hop/STI1 é observada em células organizadas em cadeias migrando a partir de explantes de ZSV. (B) Maior aumento da região delimitada em (A) demonstra expressão de Hop/STI1 ao redor do núcleo e ao longo dos prolongamentos celulares, ainda pode-se notar que neste caso a totalidade das células nas cadeias é imunomarcada com o anticorpo. (C) As células de explantes obtidos a partir de camundongos nocautes para a proteína do príon mantêm a capacidade migratória e a organização em cadeias, assim como também continuam a expressar Hop/STI1.(D) O padrão de expressão de Hop/STI1 nestas células é indistinguível em relação ao observado em camundongos selvagens. Barras de calibração (A) e (C) 100 μ m, (B) e (D) 20 μ m

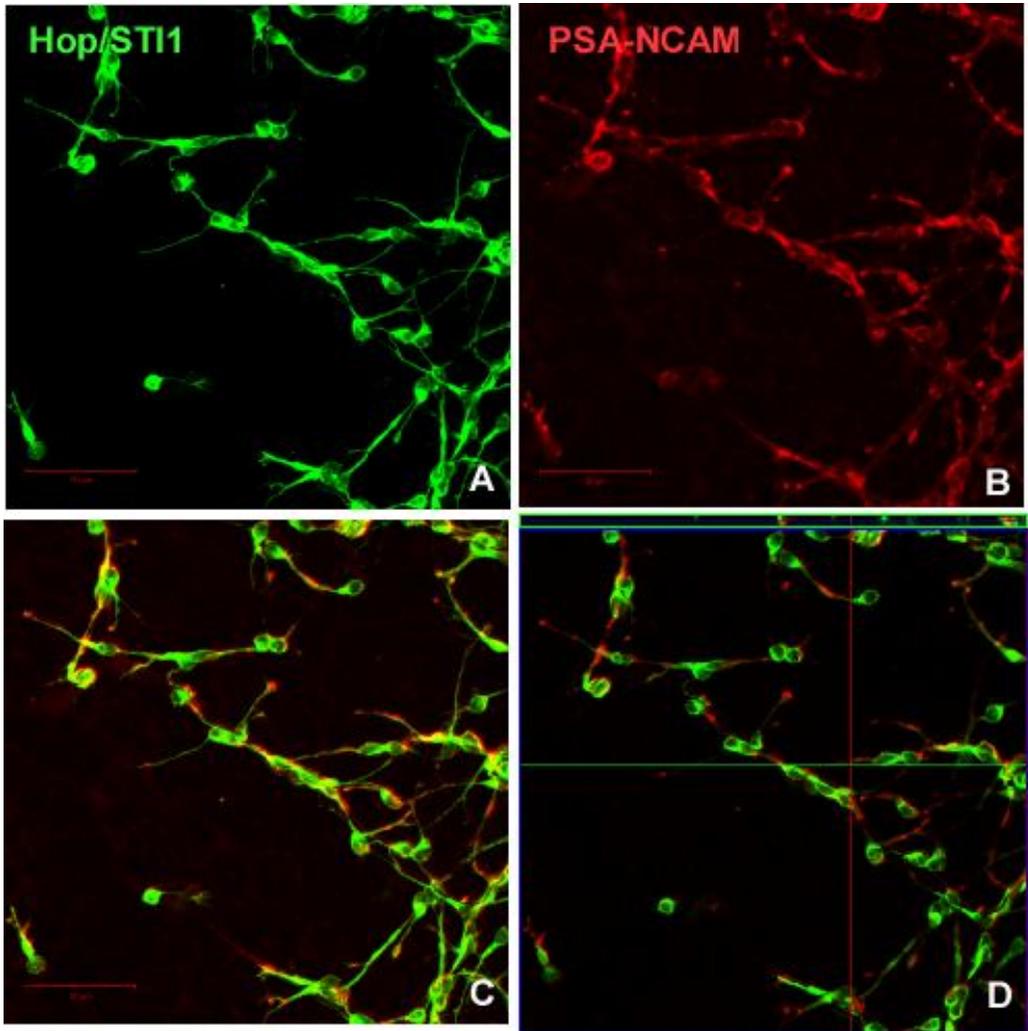


Figura 16 - As células migratórias co-expressam a proteína Hop/STI1 e o marcador de neuroblastos migratórios PSA-NCAM. (A) Imagem de microscopia confocal revela que a proteína Hop/STI1 está expressa ao redor do núcleo por todo o corpo da célula e ao longo dos prolongamentos das células organizadas em cadeias. (B) Estas mesmas células são imunomarcadas com anticorpo contra PSA-NCAM, revelando a presença da molécula de adesão ao longo das membranas plasmáticas. (C) Sobreposição das imagens demonstra o padrão de expressão das proteínas Hop/STI1 e PSA-NCAM (D) Cortes confocais ortogonais em células das cadeias sugerem a ausência de sítios de co-localização destes marcadores. Todas as imagens foram obtidas através de microscopia confocal. As culturas foram previamente permeabilizadas com Triton. Barra de calibração: 50 μ m

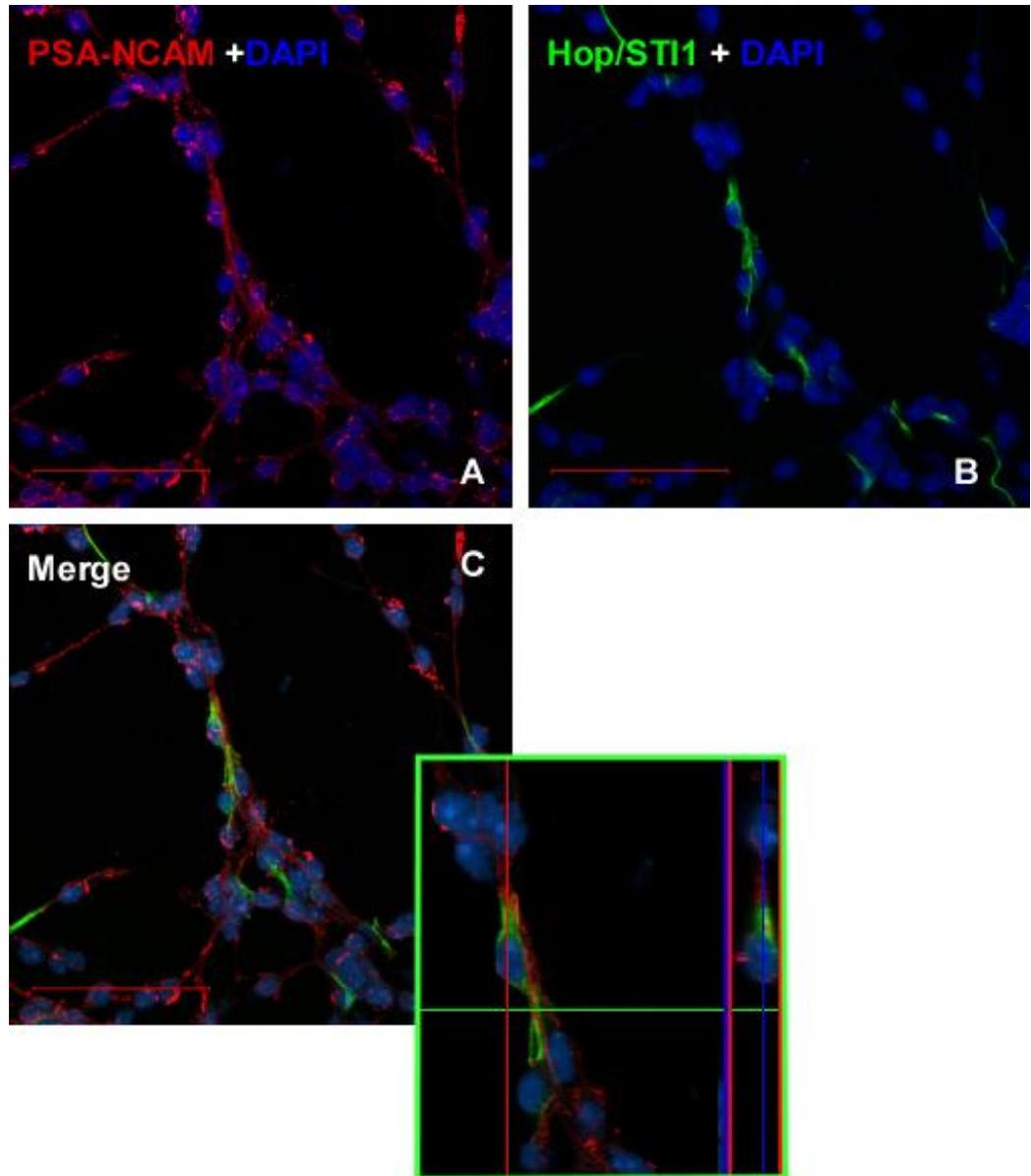


Figura 17 - A proteína Hop/STI1 aparenta ser expressa predominantemente no citoplasma das células no interior das cadeias migratórias. (A) Imunomarcção para anticorpo contra PSA-NCAM (vermelho) revela neuroblastos organizados em cadeias. (B) Sem permeabilização prévia com Triton, a expressão da proteína Hop/STI1 (verde) está restrita a alguns prolongamentos celulares. (C) Sobreposição das imagens mostradas em (A) e (B) revela que células expressando PSA-NCAM apresentam marcação para Hop/STI1. Em destaque, cortes confocais ortogonais demonstram a segregação dos sítios de expressão de Hop/STI1 e PSA-NCAM. Todas as imagens foram obtidas através de microscopia confocal e os núcleos celulares foram corados com DAPI. Barra de calibração: 50 μ m

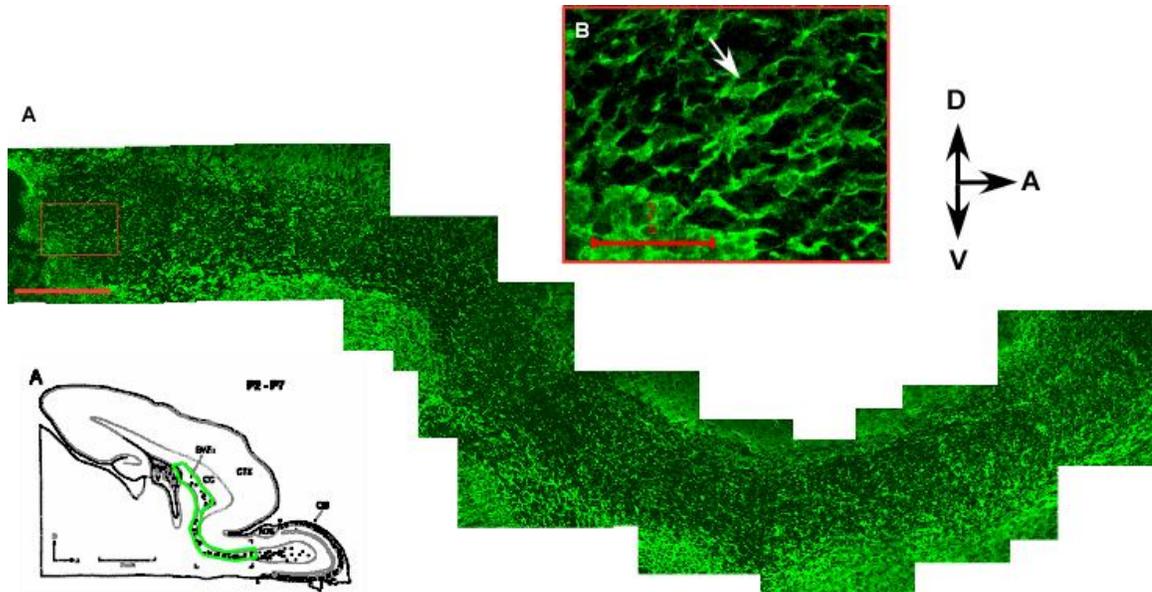


Figura 18 - Análise imuno-histoquímica com triton demonstrando expressão de Hop/ST11 na via migratória rostral. (A) Imuno-histoquímica para Hop/ST11 em Corte sagital de camundongo pós-nato (P4) evidencia imunoreatividade ao longo da via migratória rostral. É possível observar um fluxo contínuo de células marcadas que se origina na porção mais anterior da zona subventricular e segue em direção aos bulbos olfatórios. Em (B), um maior aumento da região delimitada em (A), onde a seta indica uma célula com morfologia migratória, dotada de prolongamento líder, migrando na proximidade do ventrículo lateral (seta branca). No detalhe, esquema representativo da via migratória rostral em um cérebro de rato pós-natal (adaptado de Luskin, 1993). A fotomontagem representa de forma aproximada a área delimitada em verde no esquema. Barra : (A) 200 mm, (B) 50 μ m

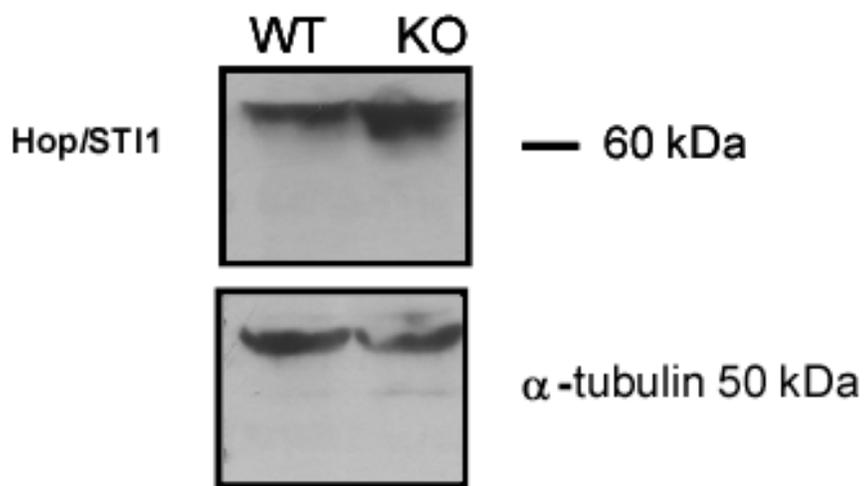


Figura 19 - Detecção da proteína Hop/STI1 através de ensaio de western blot. A banda única na faixa de 66 kDa, correspondente ao peso molecular de Hop/STI1, indica que a proteína está presente em um extrato total de proteínas da zona subventricular obtido a partir de camundongos pós-natos (P1) selvagens e nocautes. Na parte inferior encontra-se o controle de carregamento com α -Tubulina 50 kDa.

4.4 - Tratamento de culturas de explantes com anticorpo que reconhece Hop/STI1

Os resultados de imuno-marcação em cadeias de células migratórias provenientes de explantes caracterizam a expressão de Hop/STI1 em células com atividade migratória. A partir destas evidências, a próxima etapa consistiu na realização de ensaios que demonstrassem o papel funcional desta proteína na migração de neuroblastos da ZSV. Foi utilizado então o modelo de culturas de explantes de ZSV, de modo que o comportamento das cadeias migratórias fosse observado após o tratamento com anticorpo policlonal que se liga a esta proteína. Como foram realizados dois tipos de análises da migração mediante a presença do anticorpo, os resultados destes experimentos serão descritos em dois blocos separados.

4.5 - Efeito do anti-Hop/STI1 sobre o halo migratório de explantes de ZSV

A avaliação inicial dos efeitos do tratamento com o anti-Hop/STI1 sobre a migração dos neuroblastos de ZSV foi realizada através da medição do perímetro dos halos migratórios formados ao redor dos explantes. Para isto, foram adquiridas imagens dos explantes antes e 24 horas após o tratamento com o anticorpo. Através de uma análise qualitativa inicial nota-se que na presença do anticorpo, os halos migratórios tendem a apresentar uma drástica redução de tamanho, se comparados com o perfil exibido 24 h antes. As cadeias de neuroblastos, antes abundantes na periferia dos explantes, se tornam escassas e as poucas remanescentes se organizam de forma mais compacta do que o normal (Fig 20A). De modo a obter uma análise quantitativa destes resultados, os perímetros dos halos migratórios foram então delineados em dois momentos distintos, antes (1DIV) e 24 h (2DIV) após o tratamento com o anticorpo, para uma análise estatística posterior. Inicialmente, só foi observado como culturas de explantes obtidos a partir de animais selvagens reagiriam ao anticorpo. A razão entre os perímetros obtidos (2DIV/1DIV) dos explantes tratados era comparada com dois grupos controles distintos. O primeiro grupo controle consistia de explantes que não sofreram nenhuma espécie de manipulação do seu meio de cultura, já os explantes do segundo grupo foram submetidos ao tratamento de um anticorpo que reconhece imunoglobulinas de camundongo, utilizado como controle. Os testes estatísticos realizados (*one-way ANOVA não paramétrico*) demonstram que o tratamento com o anti-

Hop/STI1 diminui de forma significativa ($p < 0,001$) os halos migratórios do grupo tratado em relação aos dois grupos controle. Em contrapartida, os perímetros dos halos migratórios do grupo que não foi submetido a nenhuma manipulação não diferem do grupo tratado com anticorpos que reconhecem IgGs de camundongo (Fig 20 B). Por este motivo, a partir deste ponto todos os experimentos foram realizados apenas com um tipo de controle negativo. Com o objetivo de verificar se estes efeitos observados mediante o tratamento com anti-Hop/STI1 eram dependentes de proteína do príon, estes mesmos ensaios foram realizados com explantes de ZSV retirados de camundongos nocaute para PrP^c. Inicialmente, ao serem comparados explantes de animais selvagens com animais nocautes (one-way ANOVA não paramétrico), não foi detectada diferença significativa entre os explantes nocautes tratados com o anticorpo e o grupo controle (Fig 21A). No entanto, se analisados separadamente (Teste não paramétrico de Mann-Whitney), é possível notar que ocorre uma redução na razão entre os perímetros ($p < 0,05$), quando os explantes nocautes são submetidos ao tratamento com anti-Hop/STI1 (Fig 21B). Esta discrepância inicial entre os dados com explantes nocautes nos motivou a realizar novas abordagens para averiguar a possibilidade dos efeitos causados pelo tratamento com o anticorpo serem independentes da proteína do príon.

Para tentar elucidar estas questões, foi realizado um experimento onde mais uma vez a migração de explantes selvagens e nocautes eram comparadas após tratamento com anticorpos. Desta vez, além da utilização do anticorpo anti-Hop/STI1, um grupo de explantes selvagens foi tratado com o anticorpo contra o peptídeo 230-245, capaz de reconhecer de forma

específica o domínio de Hop/STI1 responsável pela sua interação com a proteína do príon (Lopes et al., 2005; Coitinho et al., 2007). Como controle negativo neste experimento foi utilizado IgG purificada a partir do soro de um coelho antes de sua exposição ao antígeno Hop/STI1, desta forma todos os anticorpos utilizados neste ensaio foram provenientes de coelho, validando o grupo controle de forma mais adequada. Os resultados, avaliados de forma semelhante aos experimentos anteriores, revelam que o anticorpo que reconhece o peptídeo 230-245 não causa efeitos aos halos migratórios dos explantes selvagens se comparado aos explantes tratados com IgG irrelevante. No entanto, neste experimento é visível que os explantes nocautes tratados com o anti-Hop/STI1 apresentam uma redução nos seus halos migratórios em relação aos explantes nocautes submetidos ao tratamento com IgGs irrelevantes. Porém, esta redução é menos significativa ($p < 0,05$) do que a diferença observada quando os explantes selvagens são expostos ao anti-STI1 ($p < 0,001$) (Fig 22). Estes dados indicam que apesar de ter um efeito mais sutil, na ausência de PrP^c, o anti-Hop/STI1 exerce efeitos que são parcialmente independentes da proteína do príon sobre os halos migratórios dos explantes de ZSV. Esta hipótese é corroborada através da demonstração de que os halos não são afetados após o tratamento com o anticorpo que reconhece especificamente o sítio responsável pela interação da proteína Hop/STI1 com a proteína do príon.

O estabelecimento de uma curva dose-resposta do anticorpo demonstra que o halo migratório ao redor de explantes de animais selvagens e nocautes é afetado de forma dose-dependente pelo anticorpo que se liga a Hop/STI1. No entanto, de acordo com os dados anteriores, os testes

estatísticos indicam que as diferenças significativas são mais acentuadas nos halos migratórios de explantes obtidos a partir de animais selvagens (One way ANOVA, explantes selvagens, IgG irrelevante vs Anti STI1 1:200 $p \leq 0,01$; IgG irrelevante vs Anti STI1 1:400 $p \leq 0,05$. Explantes nocautes, IgG irrelevante vs Anti STI1 1:200 e IgG irrelevante vs Anti STI1 1:400 $p \leq 0,05$) (Fig 23).

Como demonstramos anteriormente a existência de padrões de expressão de Hop/STI1 distintos nos halos migratórios, que variam de acordo com o estado de permeabilização das células, nos indagamos se os efeitos observados após tratamento com o anti Hop/STI1 seria decorrente de sua ligação com esta proteína em sítio extra ou intracelular. Esta questão foi investigada através de ensaios que consistiam do tratamento com o anticorpo em culturas não fixadas para tentar observar evidências capazes de indicar a internalização do mesmo por parte das células dos explantes de ZSV, sugerindo uma provável interação com Hop/STI1 intracelular. Após 1 hora de tratamento com o anticorpo, as culturas foram então fixadas e permeabilizadas. Os resultados obtidos nestes ensaios demonstram que são poucas células no interior das cadeias que compõem o halo migratório que aparentam internalizar o anticorpo. Em algumas cadeias, a imunoreatividade estava localizada em estruturas semelhantes a prolongamentos, similar ao padrão de expressão de Hop/STI1 em cadeias não permeabilizadas com Triton (Fig 24 B, setas). Já no interior dos explantes, algumas células apresentaram uma imunoreatividade ao redor dos núcleos corados com DAPI, sugerindo então uma internalização do anticorpo por parte destas células (Fig 24 A, setas). Curiosamente, era possível observar estruturas

fibrilares, que não eram dotadas de corpos celulares, envolvendo as cadeias de neuroblastos (Fig. 24 C). Estas estruturas se encontravam marcadas com o anticorpo e esta imunoreatividade só era observada quando as culturas eram tratadas com o anticorpo antes de serem fixadas.

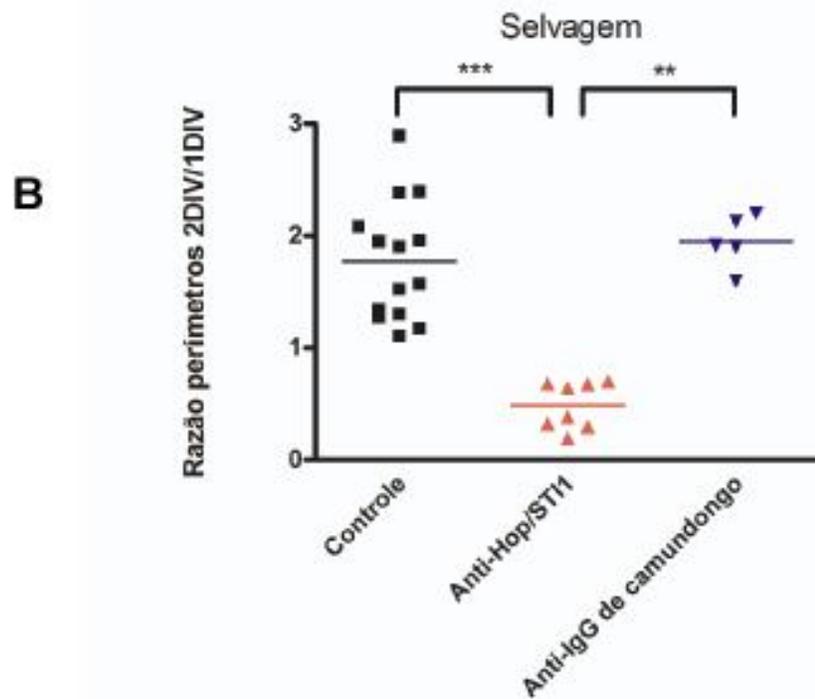
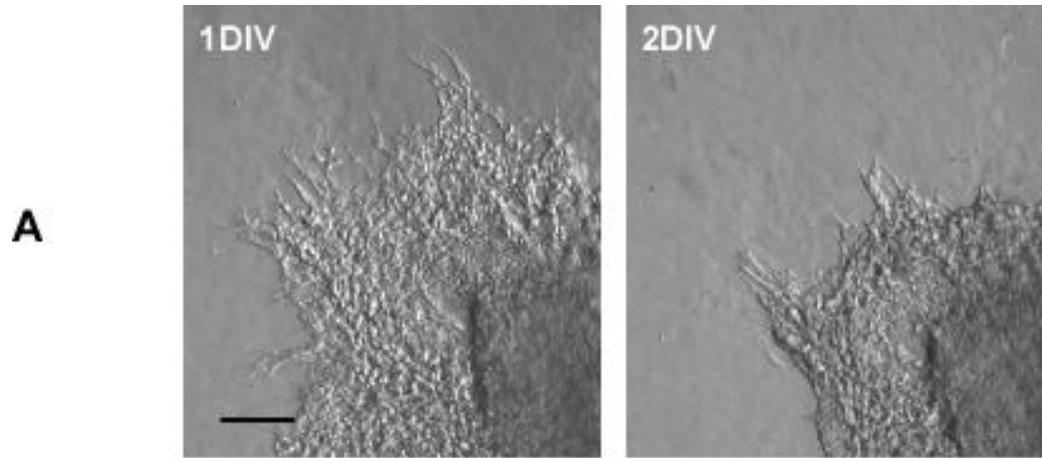


Figura 20 - Tratamento com anti-Hop/ST11 reduz o halo migratório ao redor dos explantes de zona subventricular. (A) Imagens de contraste interferencial diferencial representativas de cadeias de células nos halos migratórios ao redor de explantes de ZSV em 1 DIV e após o tratamento com anticorpo em 2 DIV. (B) A razão entre os perímetros dos halos migratórios do segundo sobre o primeiro dia in vitro foi comparada através de um teste ANOVA não paramétrico (Teste de Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn). A razão dos perímetros do grupo de explantes que foi submetido ao tratamento com anti-Hop/ST11 apresentou decréscimo significativo ($p < 0,001$) em relação aos dois grupos controle. Barra de calibração : 100 μ m

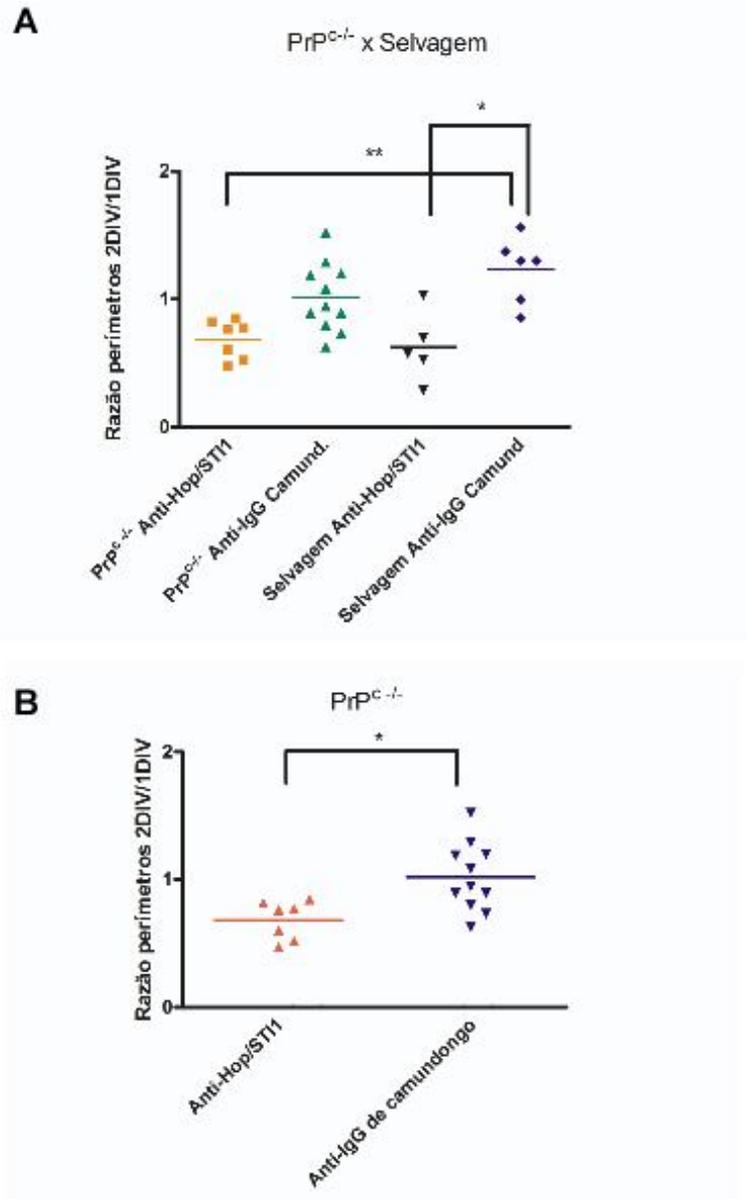


Figura 21- Tratamento com anti-Hop/ST11 induz redução no halo migratório ao redor de explantes de zona subventricular provenientes de camundongos nocautes para PrPc. (A) Quando as razões entre os perímetros dos halos migratórios do segundo sobre o primeiro dia foram comparadas através de um teste ANOVA não paramétrico (Teste de Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn), não foram encontradas diferenças significativas entre as razões dos halos dos camundongos nocautes para PrPc tratados com IgGs irrelevantes e os que foram tratados com anti-Hop/ST11. (B) Quando somente as razões dos explantes obtidos de camundongos nocautes para PrPc são avaliadas em um teste T não paramétrico (Mann-Whitney), foi observada uma diferença significativa entre o grupo tratado com IgG irrelevante e o tratado com anti-Hop/ST11.

fig 21

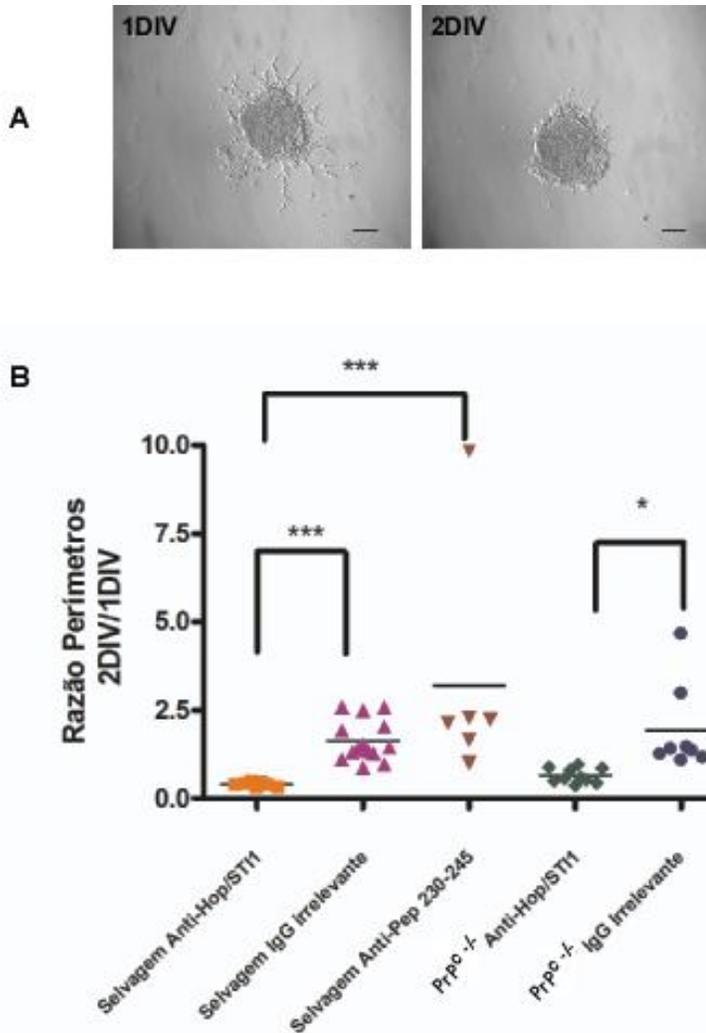


Figura 22 - Efeito de redução dos halos migratórios pelo tratamento com anti-Hop/STI1 sobre os halos migratórios é parcialmente independente de PrPc. Em (A) figuras representativas demonstrando o efeito do tratamento de 24h de anti-Hop/STI1 sobre os halos migratórios de explantes nocautes para PrPc. (B) Comparação entre razões dos halos migratórios controle (tratados com IgGs irrelevantes) e submetidos a tratamento com anti-Hop/STI1 de explantes de camundongos selvagens e nocautes para PrPc. Nota-se que nos explantes de camundongos selvagens, o anti-Hop/STI1 induz redução significativa ($p < 0.001$) dos halos migratórios se comparado aos grupos controle e tratado com anticorpo que reconhece o peptídeo 230-245, que corresponde à região de reconhecimento de Hop/STI1 pela PrPc. Quando submetidos ao tratamento com anti-Hop/STI1, os halos ao redor dos explantes provenientes de camundongos nocautes para PrPc também sofrem redução significativa em relação aos explantes submetidos a tratamento com IgG irrelevante ($p < 0,05$). Análise estatística realizada através de teste ANOVA não paramétrico, Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn. Barra de calibração: 100 μ m.

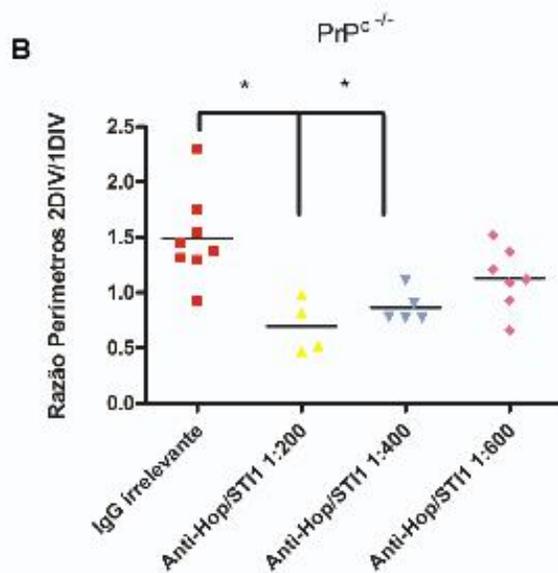
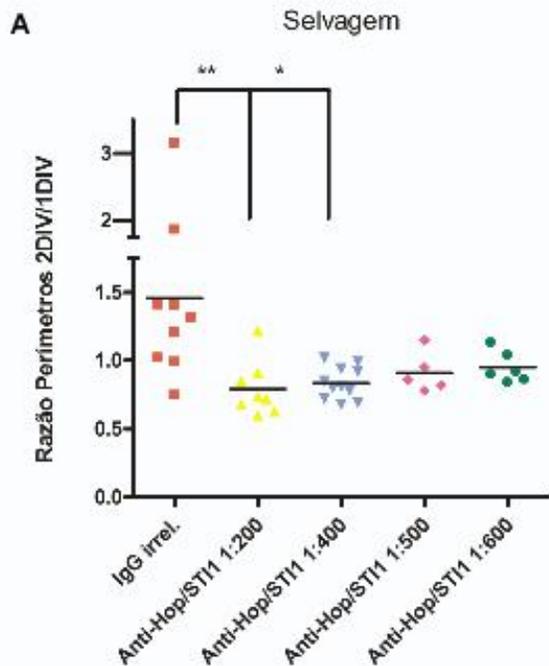


Figura 23- Efeito do tratamento do anti-Hop/ST11 sobre os halos migratórios é dose-dependente.(A) Curva dose-resposta do efeito do anti-Hop/ST11 sobre halos migratórios ao redor de explantes selvagens (One way ANOVA não paramétrica, IgG irrel. vs Anti-Hop/ST11 1:200, $p < 0,01$; IgG irrel. vs Anti-Hop/ST11 1:400, $p < 0,05$; IgG irrelevante vs Anti-Hop/ST11 1:500 e 1:600, $p > 0,05$). (B) Curva dose-resposta do efeito do anti-Hop/ST11 sobre halos migratório ao redor de explantes nocautes para PrPc (One way ANOVA não paramétrica, IgG irrelevante vs Anti-Hop/ST11 1:200, $p < 0,05$; IgG irrelevante vs Anti-Hop/ST11 1:400, $p < 0,05$; IgG irrelevante vs Anti-Hop/ST11 1:600, $p > 0,05$).

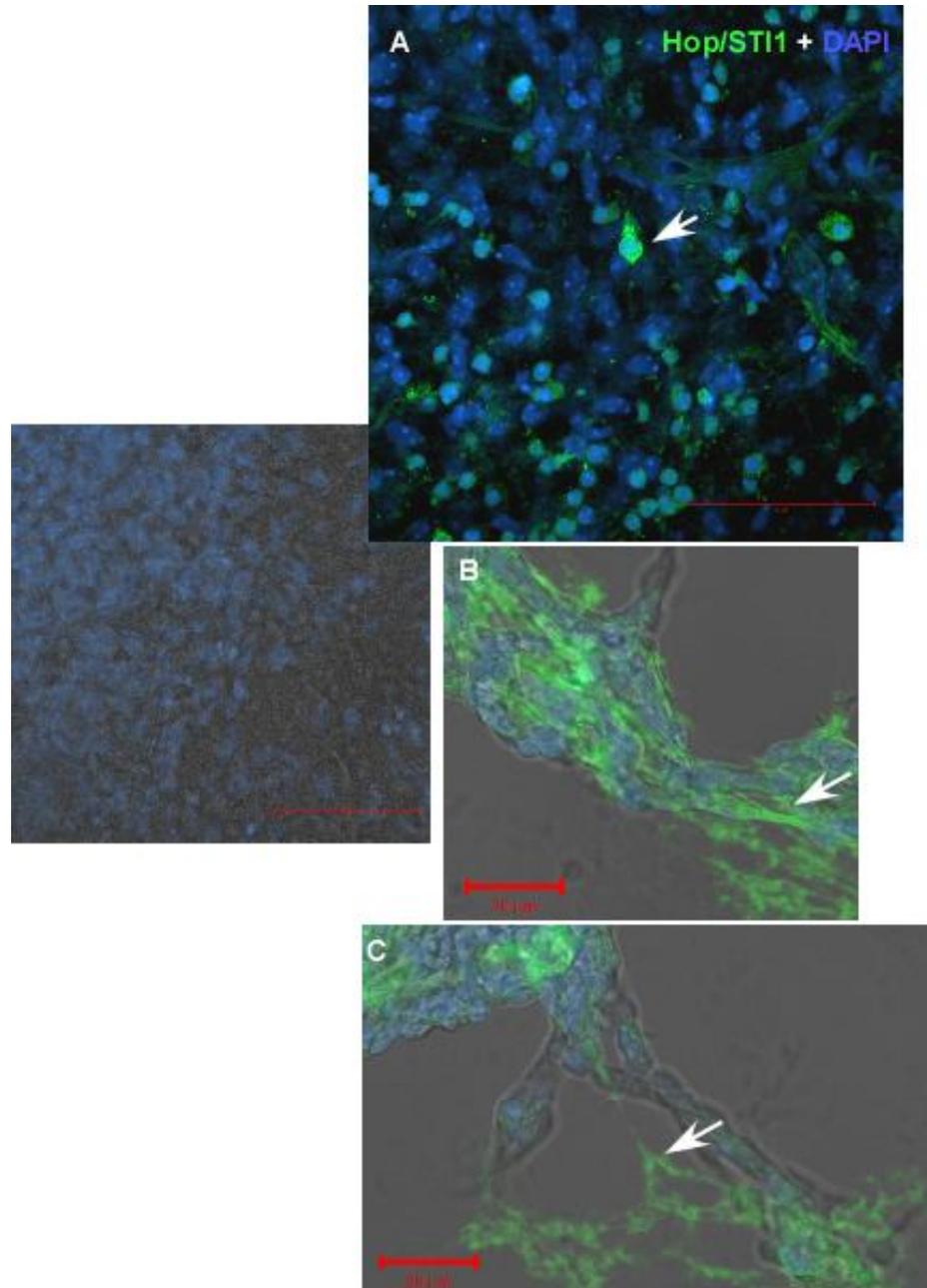


Figura 24 - Células no interior dos explantes de ZSV são capazes de internalizar o anti Hop/STI1 ao contrário das células nas cadeias migratórias (A) Após incubação das culturas com anti Hop/STI1 por 1 hora, algumas células apresentam imunoreatividade ao redor de núcleos corados com DAPI (seta branca). No detalhe, controle da reação utilizando apenas anticorpo secundário, demonstrando total ausência de imunofluorescência. (B) A escassa marcação detectada nas cadeias parece restrita a alguns prolongamentos celulares (seta branca) mas não apresentam marcação citoplasmática típica. (C) Estruturas fibrilares não-identificadas ao redor das cadeias aparentam ser imunoreativas para o anti-Hop/STI1. Barras: (A) 50 μm, (B) e (C) 20 μm

4.6 - Videomicroscopia de tempo intervalado

Para se obter uma melhor compreensão de como o anti-Hop/ST11 afetaria a migração dos neuroblastos, os explantes de ZSV foram analisados através de videomicroscopia de tempo intervalado. Utilizando esta forma de análise é possível visualizar detalhadamente o comportamento de neuroblastos individuais, assim como de cadeias inteiras que se originam a partir dos explantes. As aquisições de imagens eram feitas a partir do momento em que as primeiras cadeias migratórias se tornavam visíveis, período que variava de 12h-24h após o plaqueamento dos explantes, e cada ciclo de captura tinha uma duração média de 4-5h. Um ciclo inicial era sempre realizado de modo a registrar o padrão normal de migração dos neuroblastos. Conforme previamente descrito por Wichterle e colaboradores (Wichterle et al., 1997), em condições normais estas células apresentam um comportamento altamente dinâmico, exibindo uma migração bidirecional ao longo das cadeias. O deslocamento das células era intercalado por períodos estacionários, caracterizando esta migração como saltatória. Embora seja possível discernir com certa facilidade neuroblastos individuais migrando, rastreá-los por muito tempo é inviável, pois estas células se deslocam com frequência de regiões onde a densidade celular é esparsa para regiões altamente povoadas por neuroblastos organizados de forma compacta. Uma vez que as células em processo migratório atingem estas áreas a identificação dos limites individuais de neuroblastos fica comprometida (Fig 25). Após o término do período inicial de aquisição de imagens, o meio de cultura utilizado era substituído por meio de cultura acrescido de anti-

Hop/STI1. Uma vez tratadas com o anticorpo, o comportamento das cadeias sofre modificações drásticas. Antes dinâmicos, a maioria dos neuroblastos observados apresentam uma considerável redução de mobilidade. Entretanto, apesar da ausência de mobilidade observada, o rastreamento individual de neuroblastos por muito tempo também é difícil de ser efetuado. Isto ocorre porque embora os neuroblastos tenham um perfil mais estático, as cadeias em que eles se encontram exibem um movimento retrógrado lento. Durante estes processos de retração, devido ao agrupamento das células em seu interior, as cadeias tendem a se tornar ainda mais compactas, resultando assim numa dificuldade em se discernir limites celulares individuais (Fig 26). Quando o meio contendo anticorpos era substituído, todas estas características eram revertidas, dando lugar ao comportamento migratório que foi descrito em condições normais (Fig 27).

Através de uma análise posterior das imagens adquiridas, a partir de uma amostragem contendo três subpopulações celulares distintas foram calculadas as velocidades médias dos movimentos migratórios. A primeira subpopulação consistia de células selecionadas antes do tratamento com o anticorpo e as outras duas eram conjuntos de células analisados depois do tratamento e durante o processo de reversão dos efeitos do anticorpo. De acordo com os dados já descritos, o tratamento com o anticorpo afeta a mobilidade geral das células e este efeito se reflete diretamente sobre a velocidade média das subpopulações analisadas. O valor das velocidades médias, estipulado antes do tratamento com o anticorpo ($2,198 \mu\text{m}/\text{minuto} \pm 0,2467$, $n=12$) é muito superior ao que é observado em células na presença do anti-Hop/STI1 ($0,5729 \mu\text{m}/\text{minuto} \pm 0,086$, $n=7$). Após a remoção do

anticorpo do meio de cultura, as velocidades médias apresentam um aumento, porém não alcançam os mesmos níveis que foram observados antes do início do tratamento ($1,183 \mu\text{m} \pm 0,117$, $n = 9$), indicando que os efeitos causados pelo anticorpo são parcialmente revertidos. Uma análise estatística destes dados revela diferença significativa entre as velocidades médias das células antes do tratamento com anticorpo se comparadas com os valores obtidos após o tratamento (Teste T não-pareado, $p = 0,0001$). A diferença também pode ser observada entre as velocidades médias das células tratadas e durante a retomada dos movimentos após a retirada do anticorpo (Teste T não pareado, $p = 0,0014$) (Figs 28 e 29).

A partir da análise destes dados, é possível sugerir que a redução dos halos migratórios observada anteriormente é consequência do processo de retração das cadeias que ocorre após o tratamento com o anti-Hop/STI1. O fato destes efeitos serem revertidos mediante a retirada do anticorpo do meio de cultura, indica que a inibição da migração não é decorrente de um processo de toxicidade inespecífica.

A análise através de videomicroscopia de tempo intervalado também demonstra efeitos similares do tratamento com anti-Hop/STI1 sobre explantes obtidos de animais nocautes para PrP^c. A observação detalhada do comportamento das cadeias de neuroblastos antes da exposição ao anticorpo revela um padrão similar ao que foi descrito previamente para explantes provenientes de animais selvagens. De fato, as velocidades médias celulares observadas em ambos os genótipos confirmam esta impressão inicial (velocidade média de células selvagens, $2,198 \mu\text{m}/\text{minuto} \pm 0,2467$, $n=12$; velocidade média de células nocautes para PrP^c, $2,094 \mu\text{m}/\text{minuto} \pm 0,1510$,

n=14, Teste T não pareado, $p=0,7141$) (Fig 30 A). Estes dados corroboram a hipótese de que a migração em cadeia em animais nocautes e selvagens é indistinguível.

Esta similaridade entre os comportamentos destas duas populações é mais uma vez observada na presença do anti-Hop/STI1, pois além das alterações na organização das cadeias decorrentes do tratamento com anticorpo, ocorre uma redução significativa da velocidade média das células provenientes de animais nocaute pra PrP^c ($0,6889 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0,1131$ n= 9, Teste T não pareado, $p<0,0001$) (Fig 30 B).

A inibição da motilidade celular e a retração das cadeias de neuroblastos não foram observadas quando os explantes foram expostos à imunoglobulinas purificadas a partir do soro pré-imune de coelho, que foram utilizadas como controle negativo, tampouco quando o tratamento foi efetuado com anticorpo policlonal que reconhece Hop/STI1 proveniente de outro animal (coelho 36, $0,64 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) sugerindo que os efeitos observados são causados especificamente pela ligação do anticorpo obtido do coelho 33 a determinados epítomos da Hop/STI1 presente nas cadeias.

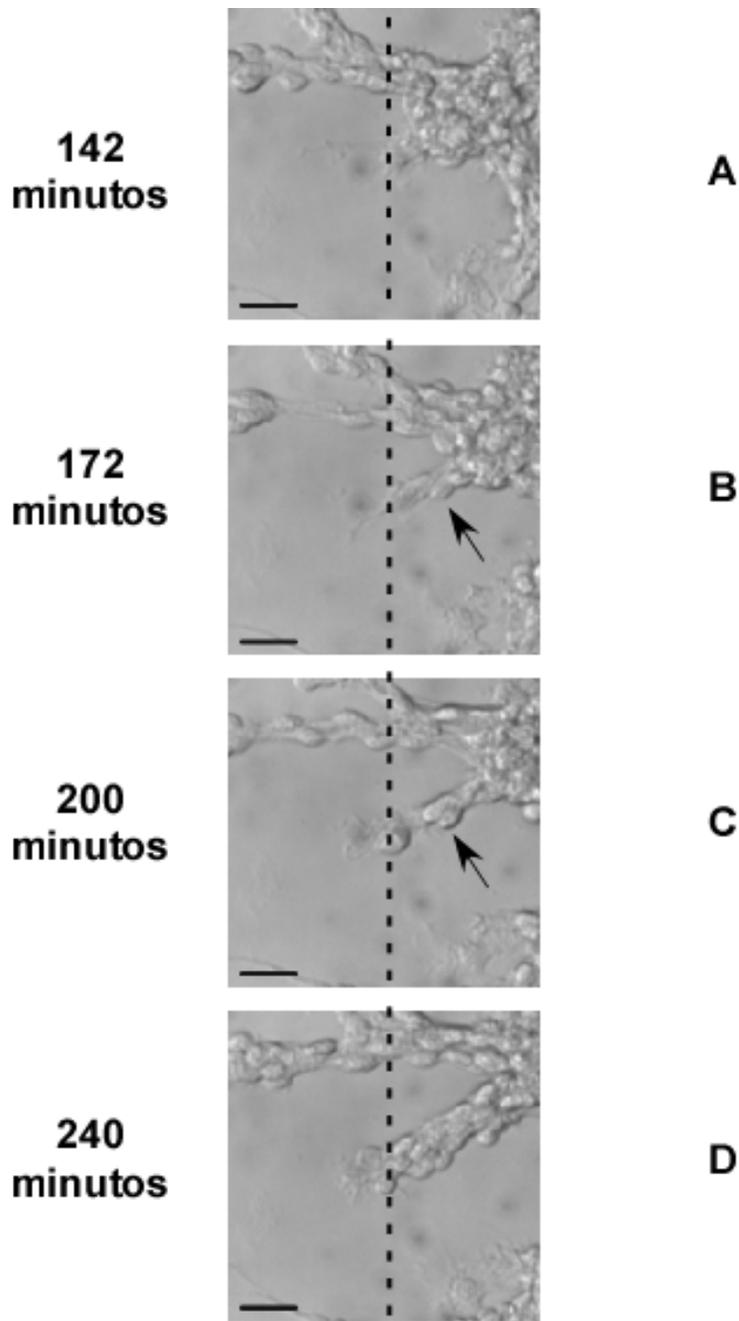


Figura 25 - Padrão de migração de cadeias de neuroblastos de explantes de ZSV através de análise de videomicroscopia de tempo intervalado. Aos 142 minutos (A) uma cadeia começa a se formar. A posição da sua extremidade mais distal no momento de origem é indicada pela linha pontilhada. Os minutos seguintes (B,C) são caracterizados por uma intensa movimentação bidirecional de células, que migram em direção ao explante e à extremidade distal das cadeias (setas pretas) . Na cadeia exemplificada, ao término do período de aquisição de imagens (D), um maior número de células se deslocou em direção à extremidade distal das cadeia e esta avançou em relação à posição que ocupava inicialmente. Barra de calibração: 20 μ m

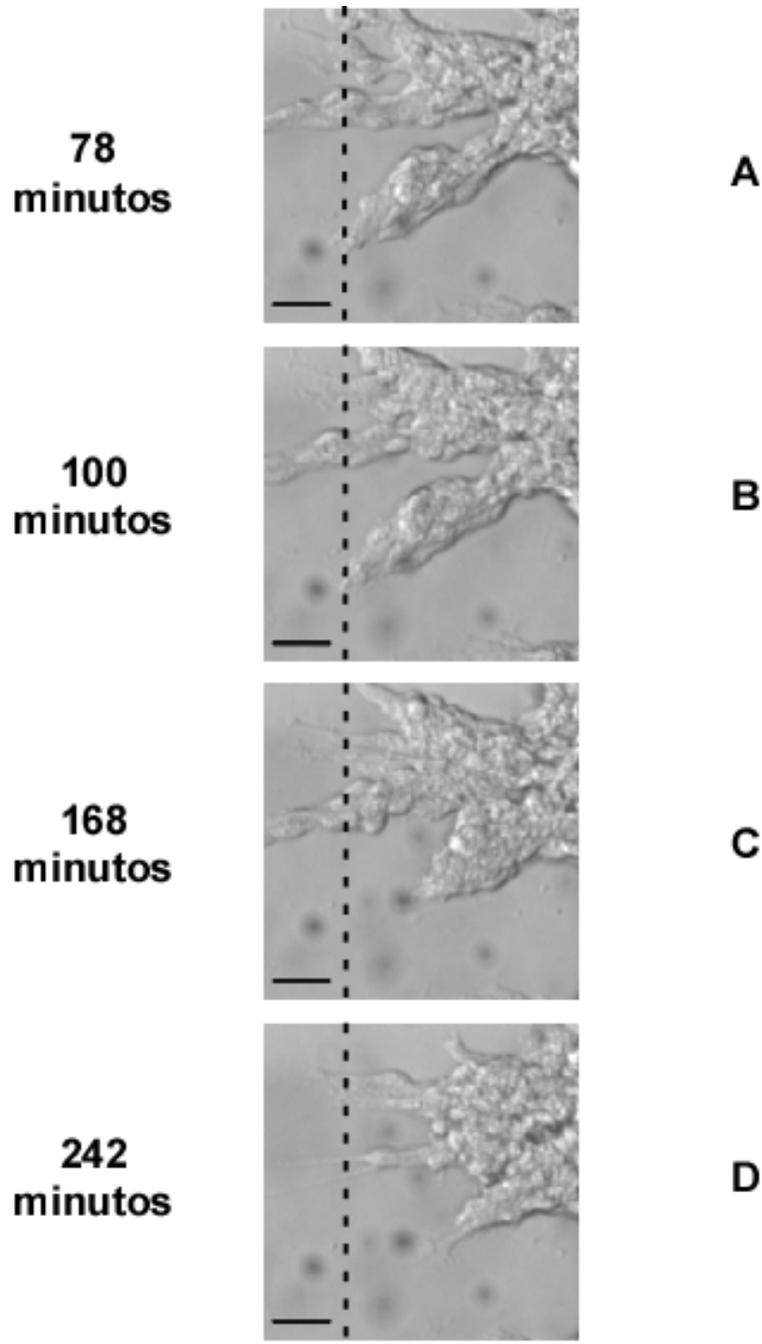


Figura 26 - Efeito do tratamento com anti-Hop/STI1 em cadeias de neuroblastos provenientes de explantes de ZSV analisado através de análise de videomicroscopia de tempo intervalado. Nota-se uma retração contínua e sincronizada das cadeias ao longo das 4 horas de aquisição de imagens. Em A, uma cadeia aos 78 minutos inicia o processo de retração em direção ao explante. É possível notar que nos minutos seguintes (B, C) os contornos celulares no interior das cadeias se tornam quase indistinguíveis. Aos 242 minutos (D) as cadeias completam o processo de retração, notar a posição da extremidade distal das cadeias no momento inicial, indicada pela linha pontilhada. Barra de calibração: 20 μm .

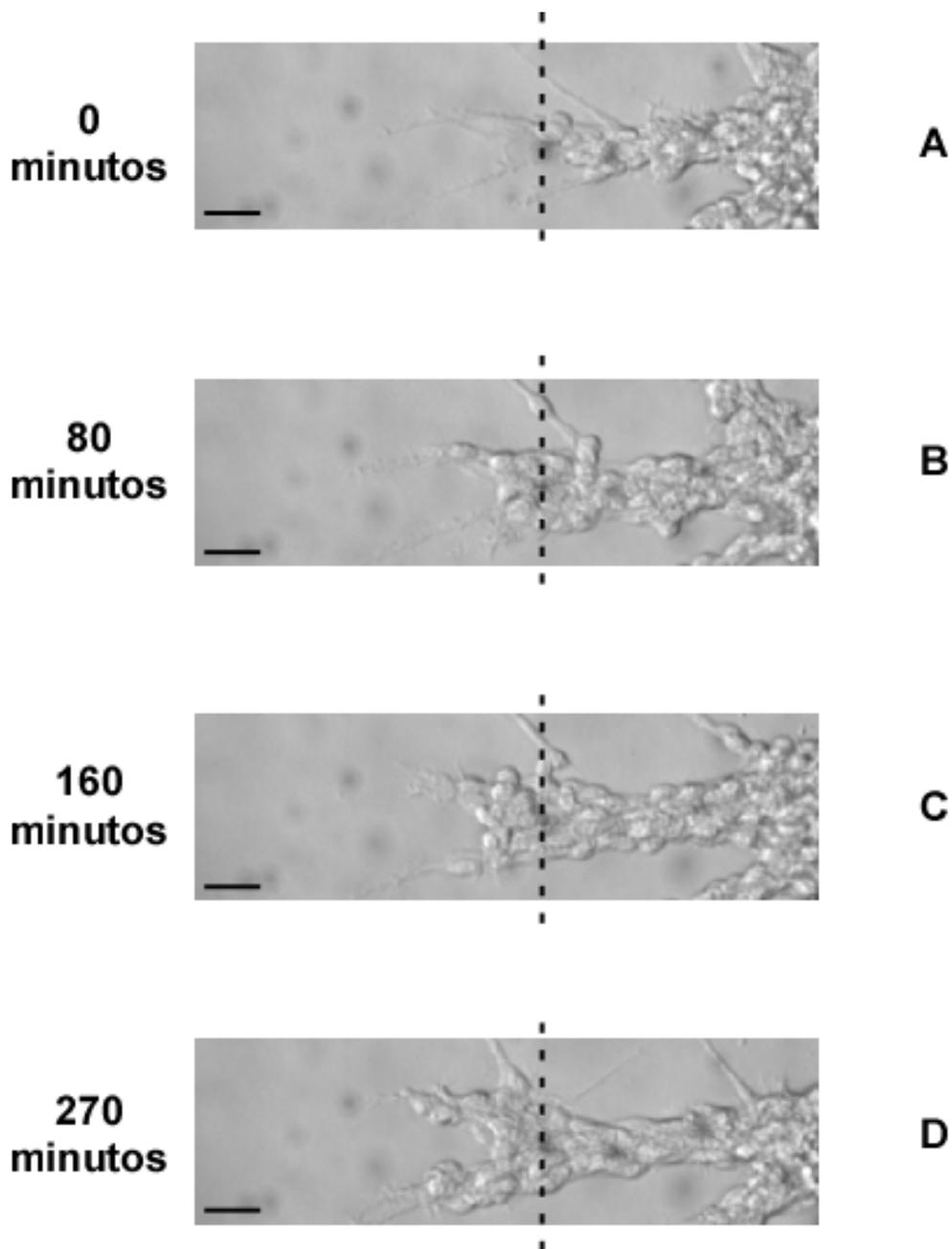


Figura 27 - Reversão do efeito provocado pelo anti-Hop/ST11 após troca do meio de cultura. Após a retirada do meio contendo o anticorpo o padrão de mobilidade celular é restaurado e as cadeias cessam o processo de retração. No momento inicial de aquisição de imagens (A), as extremidades distais das cadeias se apresentam com vários prolongamentos. Nos minutos seguintes as células parecem migrar sobre estes prolongamentos, de modo que se acumulam nas porções mais distais das cadeias. As células são depositadas de forma contínua na extremidade das cadeias resultando em um avanço destas em relação à posição inicial indicada pela linha pontilhada. Barra de calibração: 20 μm

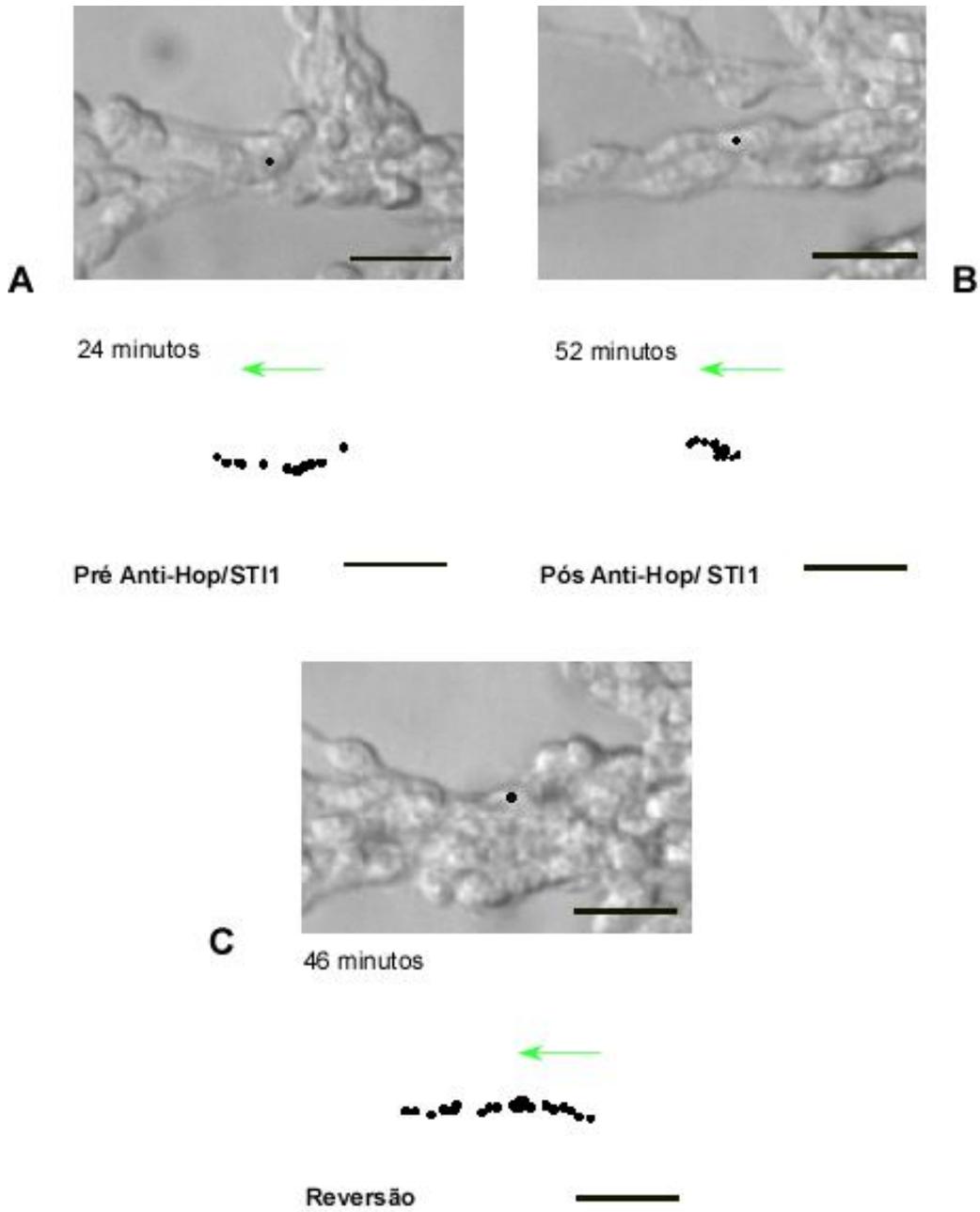


Figura 28 - Representações das trajetórias percorridas por algumas células no interior das cadeias ao redor dos explantes de ZSV durante diferentes períodos de tempo. (A) Trajetória de uma célula no interior de uma cadeia rastreada por 24 minutos antes do tratamento com anti-Hop/STI1. (B) Na presença do anticorpo uma célula percorre uma trajetória mais curta em um período de tempo mais prolongado, revelando mobilidade celular prejudicada. (C) A retirada do anticorpo é acompanhada por uma retomada de movimentos celulares similares aos da etapa inicial. Barra : 20 μ m

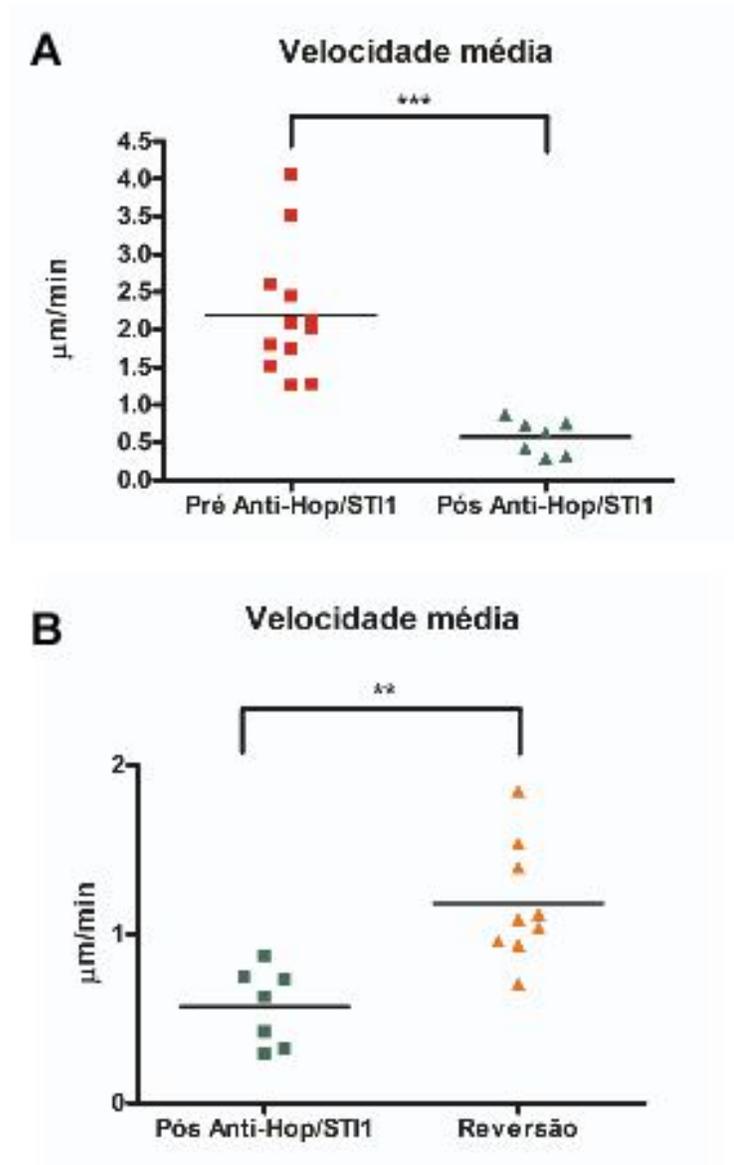


Figura 29 - Tratamento com o anti-Hop/ST11 altera a velocidade média de células no interior das cadeias migratórias. (A) Antes do tratamento com o anticorpo a média das velocidades médias de um grupo de células corresponde a 2,20 mm/minuto, na presença do anticorpo a velocidade média das células é reduzida de forma significativa (média da velocidade = 0,57 mm/minuto, Teste Mann-Whitney, $p=0,0005$). (B) A média das velocidades médias de um grupo de células após a retirada do anticorpo (1,18 mm/min) aumenta de forma significativa em relação ao valor na presença do anticorpo (0,57 mm/min, Teste Mann-Whitney, $p=0,0012$).

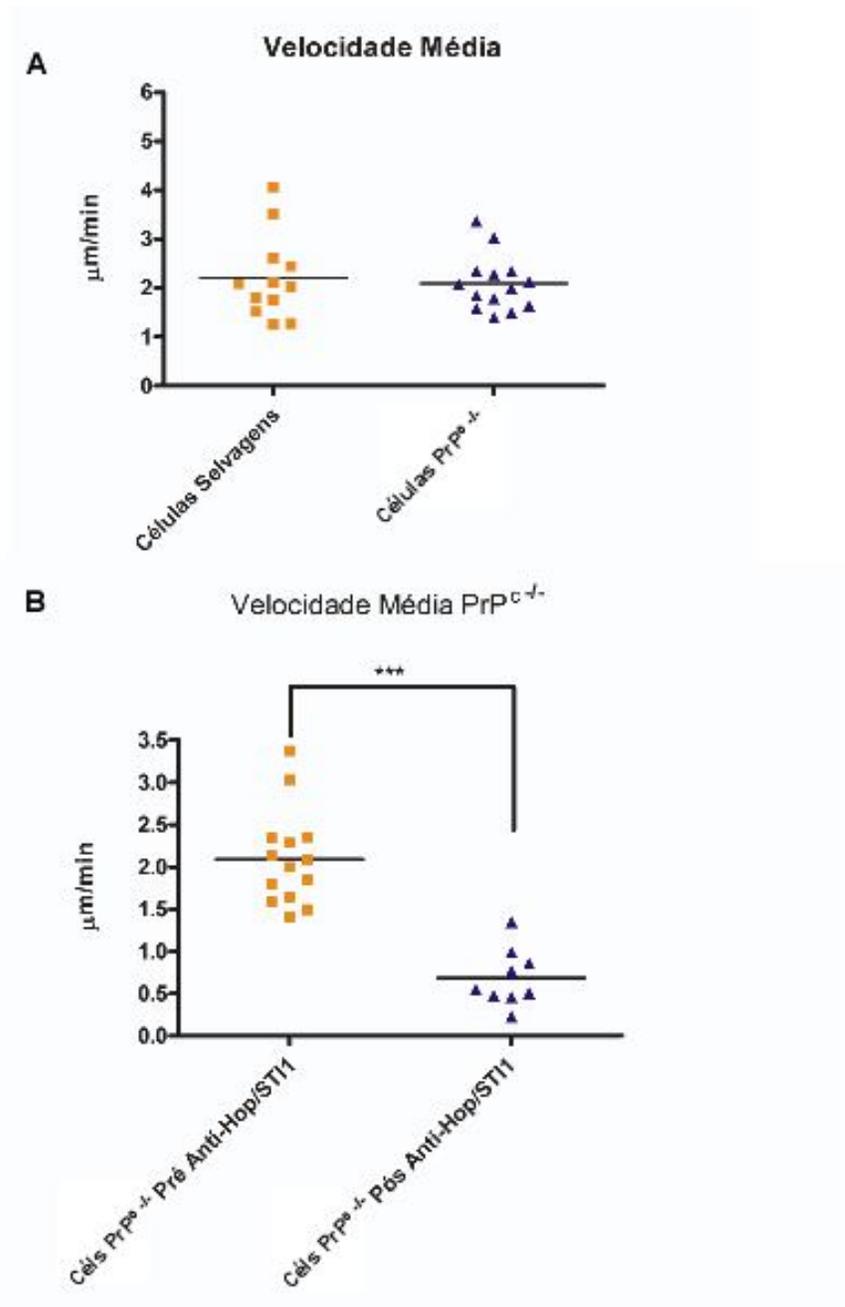


Figura 30 - Tratamento com anti-Hop/STI1 reduz a velocidade média de células de explantes obtidos a partir de animais nocautes para PrPc. (A) Gráfico demonstrando que antes do tratamento com o anti-Hop/STI1, não há diferenças significativas entre as velocidades médias de um grupo de células selvagens e nocaute (Teste T não pareado, $p=0,7141$). (B) O tratamento com anti-Hop/STI1 reduz a velocidade média de células nocaute de forma significativa (Teste T não pareado, $p<0,0001$).

4.7 - Tratamento com proteína recombinante STI1

Os resultados obtidos até agora através da utilização do anti-Hop/STI1 sugerem um papel funcional desta proteína na migração de neuroblastos da zona subventricular. Contudo, neste modelo a ligação do anticorpo com a proteína ainda não foi caracterizada como agonista ou antagonista, desta forma nossos dados ainda são insuficientes para inferir sobre qual seria a verdadeira função de Hop/STI1 na migração de neuroblastos da ZSV.

Dados prévios da literatura relatam que efeitos biológicos resultantes da adição de Hop/STI1 recombinante em culturas de neurônios dissociados podem ser observados a partir de uma concentração de 0,1 μM (Lima et al., 2007). Para investigar se efeitos semelhantes ocorreriam em nosso modelo, as culturas de explantes de ZSV foram tratadas com Hop/STI1 recombinante em concentrações que variaram de 0,5 μM até 10 μM e os efeitos deste tratamento foram observados através da análise de videomicroscopia de tempo intervalado, assim como através da avaliação dos perímetros dos halos migratórios ao redor dos explantes após 24 horas de tratamento. Inicialmente foram avaliados os efeitos nas culturas decorrentes de uma exposição de 24 horas a concentrações diferentes da proteína recombinante (3 μM , 5 μM , 4 μM e 4,5 μM). Não foram identificadas mudanças visíveis nos halos migratórios ou na organização das cadeias, semelhante às alterações que são observadas quando as mesmas são expostas ao anti-STI1, após o tratamento com proteína recombinante. Mesmo após a medição dos perímetros dos halos migratórios antes e 24 horas pós-tratamento não foram detectadas diferenças significativas (Fig 31, one-way ANOVA não paramétrico, $p = 0,9572$).

A possibilidade dos efeitos provocados pelo tratamento com proteína recombinante serem mais sutis do que os observados após adição do anticorpo, poderiam justificar a ausência de efeitos nos ensaios de halo migratório. Neste caso, talvez alterações na migração só fossem detectadas através de uma análise mais detalhada e por este motivo realizamos a videomicroscopia de tempo intervalado. No entanto, ao contrário do que ocorreu após o tratamento com o anti-Hop/STI1, o tratamento com Hop/STI1 recombinante não resultou em nenhuma mudança drástica no comportamento migratório das células em cadeia. Os movimentos celulares que foram registrados durante 4 horas antes do tratamento com a proteína recombinante apresentam o padrão característico descrito previamente, com células bastante dinâmicas e que se deslocam bidirecionalmente. Este comportamento é mantido durante as 4 horas seguintes, mesmo após o tratamento com Hop/STI1 recombinante em diferentes concentrações (0,5, 1,5, 3 e 10 μM , $n=4$, 1 explante avaliado para cada concentração). Como nenhuma destas concentrações gerou um resultado qualitativo visível, foi realizada uma análise quantitativa a partir da obtenção da velocidade média das células migratórias. Conforme foi estabelecido previamente em explantes tratados com anti-Hop/STI1, utilizando-se da distância migrada em determinados períodos de tempo, foi calculada a velocidade média de diferentes células, antes e após o tratamento com Hop/STI1 recombinante em todas as concentrações utilizadas. A análise estatística (Teste Mann-Whitney) não indicou diferenças significativas na velocidade média de células antes e depois de serem submetidas ao tratamento em nenhuma das concentrações

utilizadas (0,5 μ M, $p = 0,1111$; 1,5 μ M, $p = 0,8413$; 3 μ M, $p = 0,6905$, 10 μ M, $p = 0,7879$) (Fig 32).

4.8 - Formação de agregados celulares

Foram realizados ensaios de formação de agregados celulares, para avaliar possíveis alterações nas relações adesivas intracelulares após tratamento com o anticorpo, sugeridas pela análise de videomicroscopia de tempo intervalado. Células dissociadas a partir da ZSV foram separadas em dois grupos experimentais, o grupo controle, tratado com IgG irrelevante e o experimental tratado com o anticorpo que reconhece a proteína Hop/STI1, induzidas a formar agregados celulares através de um ensaio de gotas pendentes. Os agregados formados foram analisados ao longo de diferentes períodos de tempo, conforme descrito na seção de “Materiais e Métodos”. Decorridos 30 minutos, é possível observar a presença de agregados ao lado de algumas células dissociadas, nos dois grupos experimentais. Estes agregados possuem tamanhos variados, sendo que os menores são constituídos por 3-4 células, enquanto que na maioria das vezes, o número absoluto de células que compõem os maiores não pode ser determinado com precisão. De modo a obter um parâmetro de comparação entre os dois grupos experimentais e tendo em vista a impossibilidade de identificar o número total de células por agregado, foram calculados o número aproximado de agregados formados, assim como foram realizadas medidas de área dos mesmos. No primeiro tempo analisado, aos 30 minutos, as áreas dos agregados obtidas a partir dos dois grupos experimentais não

apresentam diferença estatística significativa (Área dos agregados tratados com IgG irrelevante = $380,1 \mu\text{m}^2 \pm 29,93$, área dos agregados tratados com Anti-Hop/ST11 = $358,5 \mu\text{m}^2 \pm 35,29$, teste Mann-Whitney, $p = 0,0866$) (Fig 33 B), entretanto, o número de agregados formados nas gotas pendentes tratadas com IgG irrelevante é superior ao encontrado no grupo submetido ao tratamento com anticorpo (359 e 279, respectivamente) (Fig. 33 A). Este número varia de acordo com o tempo de observação, de modo que cerca de 1 hora após o estabelecimento das gotas suspensas, enquanto o número de agregados na situação controle se manteve constante (352), ocorreu uma diminuição do número de agregados observado na condição tratada com o anticorpo (163), porém ainda não são observadas diferenças significativas em relação às áreas (Teste Mann Whitney, $p = 0,2541$). Por fim, no último tempo analisado, 1 hora e 25 minutos após o início do ensaio, de acordo com a tendência observada no tempo anterior, o número dos agregados no grupo controle não sofre grande variação (378) enquanto o número de agregados no grupo tratado com anticorpo contra Hop/ST11 é bastante inferior (117) quando comparado com o tempo inicial (Fig 34 A). Além disso, ao contrário dos tempos analisados anteriormente, as áreas dos dois grupos apresentam uma diferença estatística significativa (Teste Mann-Whitney, $p = 0,0019$), onde as médias das áreas das células tratadas com anti-Hop/ST11 ($1276 \mu\text{m}^2 \pm 209,4$) são maiores do que as observadas no grupo controle ($618,4 \mu\text{m}^2 \pm 59,10$) (Fig 34 B). Estes resultados parecem indicar que na presença do anti-Hop/ST11 as células da ZSV teriam uma tendência à agregação, talvez por uma alteração em mecanismos de regulação de adesão intercelulares,

justificando assim a redução do número de agregados totais e o aumento da área dos mesmos.

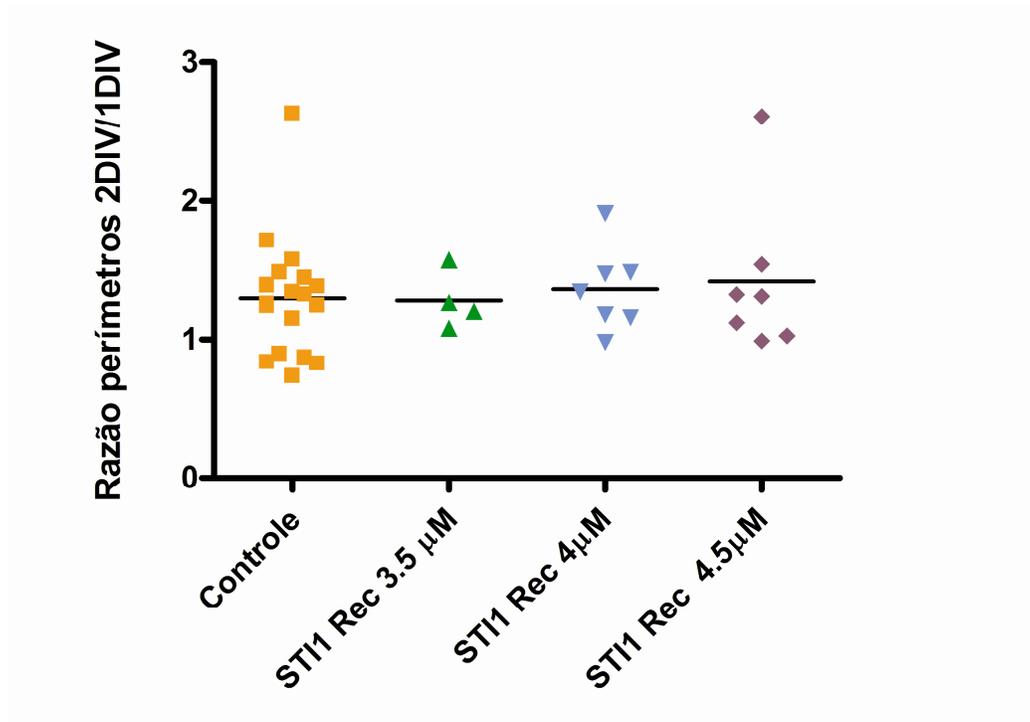


Figura 31 - Tratamento com Hop/ST11 recombinante nas concentrações de 3,5 mM, 4mM e 4,5 μM não altera os halos migratórios ao redor dos explantes de ZSV. Os perímetros foram obtidos no primeiro dia de cultura (1 DIV) antes do tratamento com Hop/ST11 recombinante e no segundo dia (2DIV), 24 horas após adição da proteína. As razões entre os perímetros demonstram que os halos dos explantes não sofrem alteração na presença de Hop/ST11 recombinante ($p=0,9572$). Análise estatística foi realizada através da utilização de teste ANOVA não-paramétrico.

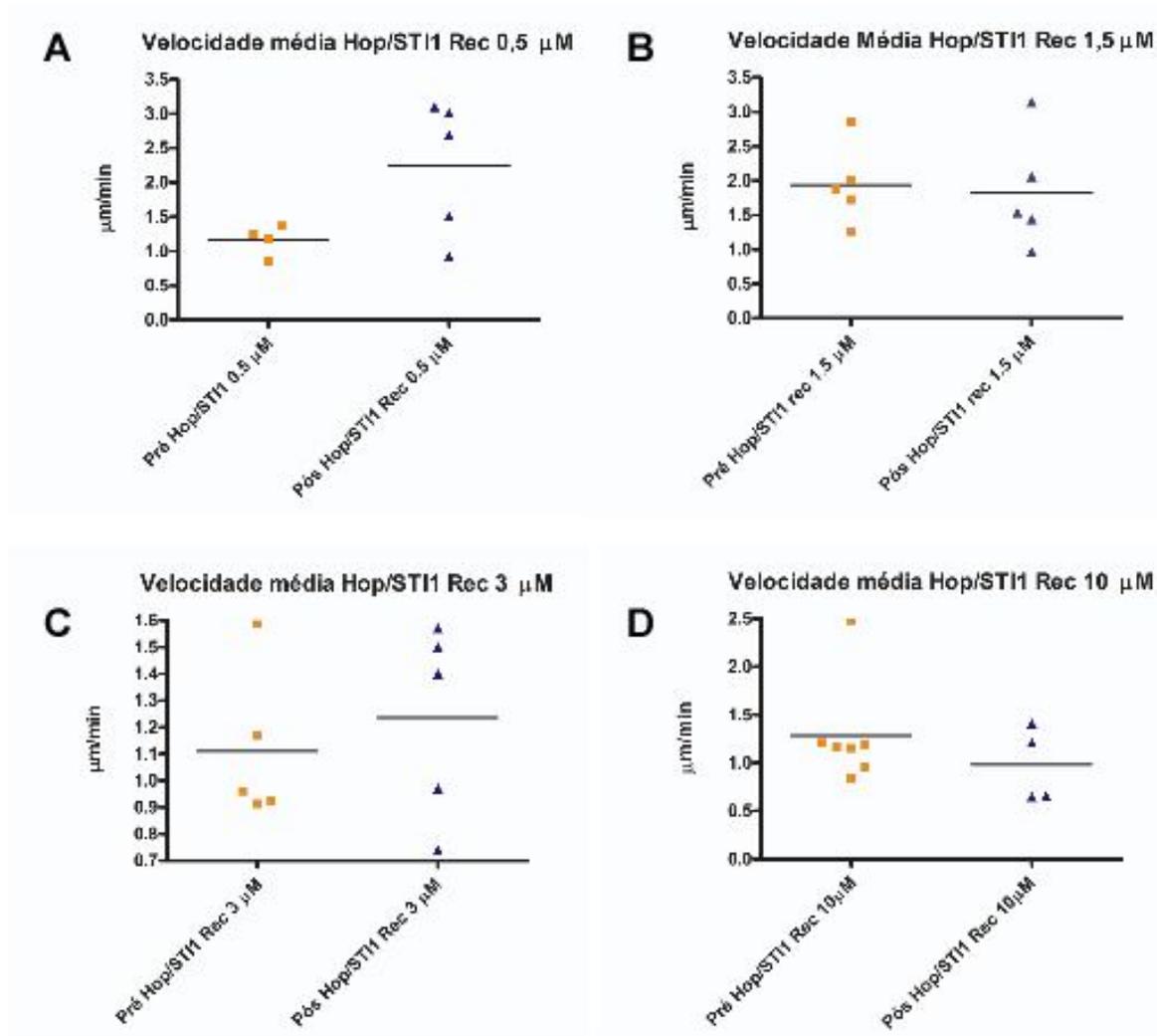


Figura 32 - Tratamento com Hop/STI1 recombinante não parece alterar a velocidade média de células migratórias. Células migrando ao redor dos explantes de ZSV foram selecionadas e rastreadas por períodos variáveis de tempo através de análise de videomicroscopia de tempo intervalado. A velocidade média das células não sofreu alterações significativas após o tratamento com Hop/STI1 recombinante nas concentrações demonstradas 0,5 mM(A) , 1,5 mM (B), 3 mM (C) e 10 mM (D). Análises estatísticas realizadas através de Teste Mann-Whitney (0,5 mM, $p = 0,1111$; 1,5 mM, $p = 0,8413$; 3 mM, $p = 0,6905$; 10 mM, $p = 0,7879$) .

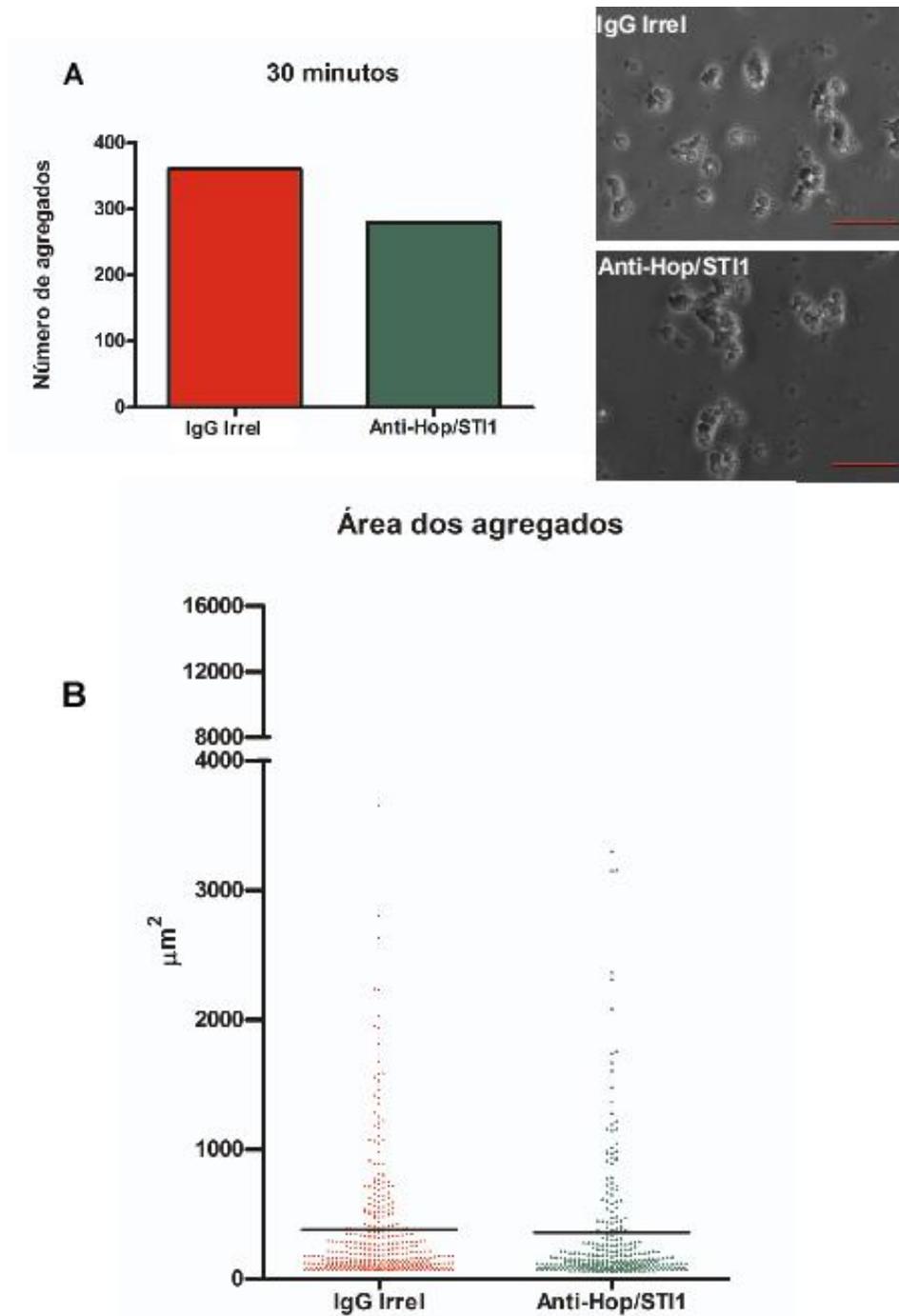


Figura 33 - Análise do número e área dos agregados 30 minutos após o início do ensaio de gotas suspensas. (A) O número de agregados é similar nas gotas que foram tratadas com IgG irrelevante ou Anti Hop/ST11. No detalhe, representações de alguns agregados formados após este período de tempo. (B) As áreas dos agregados formados na presença de IgG irrelevante ou Anti Hop/ST11 não diferem de forma significativa (Teste Mann-Whitney, $p=0,0866$). Barra: $50\mu\text{m}$

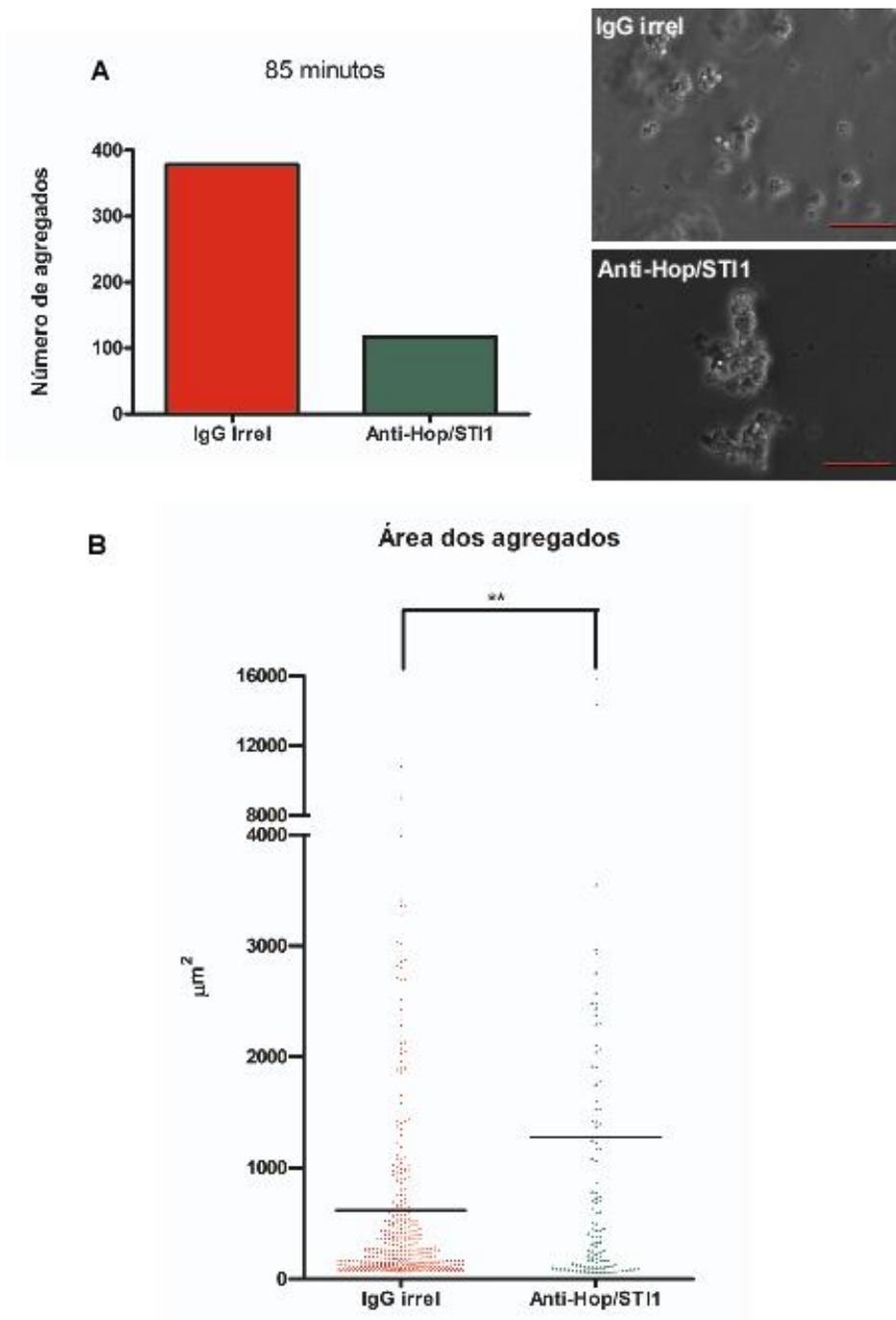


Figura 34 - Número e área de agregados celulares 85 minutos após o início do ensaio de gotas suspensas. (A) O número de agregados detectados nas gotas tratadas com anti-Hop/ST11(117) corresponde a menos da metade (378) do número de agregados formados nas gotas tratadas com IgG irrelevante. (B) A área dos agregados formados na presença do anti-Hop/ST11 é significativamente maior do que as áreas de agregados tratados com IgG irrelevante (Teste Mann-Whitney, $p=0,0019$). Barra: 50 µm

5 - Discussão

Demonstramos neste trabalho, através dos modelos *in vitro* empregados, que a ausência de PrP^c não parece afetar a migração tangencial de células neurais. Por outro lado, nossos dados sugerem que o ligante de PrP^c, a proteína Hop/STI1 desempenha um papel importante na migração de neuroblastos da zona subventricular pós-natal.

5.1 - Células neurais que não expressam a proteína do príon celular ainda mantém a capacidade migratória

Os resultados que obtivemos através da análise de co-culturas de fatias organotípicas, assim como de culturas de explantes de zona subventricular, indicam que células derivadas de animais nocautes para a proteína do príon celular (PrP^c^{-/-}) exibem um padrão de migração sem alterações drásticas em relação às células retiradas de animais selvagens. Estes dados remetem parcialmente à estudos prévios da literatura que demonstraram que a ausência de PrP^c não compromete a migração de tímócitos no interior do timo (Terra-Granado et al., 2007). No entanto, este mesmo trabalho demonstra que alterações são observadas no timo de camundongos que super-expressam PrP^c.

Em nosso trabalho, a análise morfológica de células eGFP migratórias sobre fatias corticais demonstra que os comprimentos e grau de ramificação de neuritos também não são alterados na ausência de PrP^c. Estes dados são intrigantes se considerarmos que recentemente foi demonstrado que quando neurônios de hemisférios cerebrais nocaute para PrP^c são cultivados sobre

astrócitos também PrP^{c/-} estes desenvolvem neuritos mais curtos (Lima et al., 2007). O mesmo ocorre quando neurônios PrP^{c/-} são cultivados sobre astrócitos selvagens. Em nosso trabalho estamos estudando uma subpopulação das células cerebrais, especificamente os neurônios GABAérgicos da eminência ganglionar que colonizarão o córtex cerebral. Estudamos células PrP^{c/-} que migram e diferenciam em fatias de córtex cerebral selvagem. No trabalho de Lima e colaboradores, toda a população cerebral é incluída em sua amostra – células em diferentes estágios de diferenciação, diferentes tipos celulares etc. Seria interessante saber se entre os fenótipos neuronais identificados pelo grupo estão neurônios GABAérgicos. É possível que os componentes celulares e moleculares produzidos pelas fatias corticais sejam mais complexos e que possam compensar pela ausência da proteína do prion. É possível também que estejamos analisando nossas células em estágios mais precoces e que posteriormente estas pudessem desenvolver diferenças.

Nós consideramos que os métodos de quantificação utilizados na análise das co-culturas são efetivos para avaliar a migração das células desde a sua saída das eminências ganglionares até a sua entrada no córtex, porém eles fornecem pouca informação em relação ao padrão de migração intracortical destas células. Já havia sido demonstrado que a clivagem de âncoras de GPI através do tratamento de fatias corticais com a enzima fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) não altera o padrão de migração intracortical dos neurônios GABAérgicos (Tanaka et al., 2003), indicando que a PrP^c e outras proteínas que estão associadas às membranas plasmáticas através de âncoras de GPI como TAG-1 poderiam regular

apenas a migração dos interneurônios ao longo do trajeto telencéfalo basal-córtex, descartando um papel para as mesmas no deslocamento intracortical destes interneurônios.

Nossa hipótese inicial previa que possivelmente o baixo limiar para indução de surtos epiléticos exibido em algumas linhagens de PrP^c^{-/-} (Walz et al., 1999) poderia ser explicada pela diminuição do aporte de neurônios GABAérgicos para o córtex cerebral por defeitos na migração deste subconjunto de neurônios. Nestes animais há evidências eletrofisiológicas de aumento nos níveis de excitabilidade neuronal. Outras explicações para este fenômeno também se adicionam ao nosso resultado indicando que os níveis de GABA possivelmente não estejam na base desta patologia nestes animais. Animais PrP^c^{-/-} condicionais cuja a Cre recombinase é expressa sob regulação do promotor que codifica a expressão de neurofilamento (NFH) e que acredita-se só é expressa em animais pós-natos ainda assim desenvolvem altos níveis de excitabilidade neuronal (Malucci et al., 2002). Ou seja, depois da colonização do córtex cerebral por neurônios GABAérgicos. Alguns dados de nossos colaboradores realizados paralelamente ao nosso trabalho (Arantes et al., dados não publicados) não detectaram diferenças substanciais nos níveis de GAD65 no córtex cerebral destes animais em várias idades do desenvolvimento e no adulto medidos por *Western Blot*.

Nossos resultados não descartam por completo a possibilidade da ausência da influência de PrP^c sobre a migração de interneurônios oriundos das eminências ganglionares. Para uma comprovação definitiva desta hipótese, seria interessante realizar uma análise de rastreamento desta população celular *in vivo*, algo que poderia ser realizado através do emprego

de traçadores celulares ou do rastreamento de populações inteiras utilizando animais transgênicos específicos. Resultados obtidos a partir da análise exclusiva de animais nocautes são particularmente vulneráveis a críticas, devido aos possíveis mecanismos compensatórios atuantes nos organismos de animais transgênicos. Embora nossos resultados sejam derivados da análise de animais nocautes para PrP^c, o modelo de co-culturas empregado, onde células nocaute migram sobre um substrato selvagem, estaria, em teoria, minimizando a influência de mecanismos compensatórios neste modelo. A análise da migração das células nocautes ainda complementa dados prévios do nosso grupo que demonstraram que células selvagens provenientes da eminência ganglionar retêm a capacidade de migrar sobre o córtex de animais nocautes (Costa et al., dados não publicados). Deste modo, estes resultados, quando analisados em conjunto, fornecem um panorama acerca da relevância de PrP^c neste evento migratório, seja através da observação dos efeitos da ausência de PrP^c nas células das eminências, assim como no ambiente migratório.

Frequentemente, estudos de neurobiologia do desenvolvimento procuram correlacionar a expressão espaço-temporal de variadas moléculas com eventos específicos da ontogênese do sistema nervoso central. Esta abordagem muitas vezes pode originar resultados controversos, decorrentes de variações nas espécies, anticorpos e técnicas empregadas, gerando assim conclusões equivocadas. Um dos fatores que sugeria uma função para PrP^c na migração neuronal, foram os resultados demonstrados por Salés e colaboradores (Salés et al., 2002) onde foi proposto um papel de PrP^c sobre extensão axonal. Conforme já foi mencionado, algumas moléculas capazes

de atuar na regulação do direcionamento axonal podem também estar envolvidas em eventos de migração de neurônios (Tessier-Lavigne e Goodman, 1996). Porém, de acordo com dados de estudos mais recentes, a expressão axonal de PrP^C atinge o seu ápice após o término da fase de crescimento neurítico (Galvan et al., 2005), contestando desta maneira a hipótese de um papel de PrP^C na extensão de axônios.

A expressão de PrP^C que observamos em células originadas a partir de explantes de zona subventricular poderia ser um indicativo da importância desta proteína na migração em cadeia. Em adultos, a expressão de PrP^C descrita na zona subventricular demonstra que os níveis mais altos desta proteína foram detectados em células maduras não proliferativas periféricas a SVZ propriamente dita (Steele et al., 2005). Estas células expressam NeuN, marcador indicativo de neurônios diferenciados. Deste modo, se um papel de PrP^C na migração em cadeias for inferido baseado na sua expressão em períodos pós-natais, deve-se supor que os fatores que regulam estes eventos migratórios nas primeiras semanas diferem dos que estão envolvidos na fase adulta. Embora existam estudos descrevendo modificações no padrão de migração destes neuroblastos que ocorreriam ao longo de períodos pós-natais (Peretto et al., 2005), assim como a atuação de algumas moléculas regulando apenas a migração de neuroblastos em estágios pós-natais precoces (Bovetti et al., 2007), não temos conhecimento de indícios na literatura relatando a influência de PrP^C sobre a migração em cadeia de neuroblastos. Os nossos resultados obtidos com animais nocautes demonstram que os neuroblastos mantêm a capacidade migratória, que pode ser caracterizada de forma qualitativa e quantitativa como sendo

praticamente indistinguível em relação aos animais selvagens. Corroborando esta hipótese, o tratamento com um anticorpo que reconhece PrP^c em camundongos suíços selvagens também não resultou em alterações significativas nos halos migratórios ao redor de explantes de ZSV. Talvez a chave para a compreensão dos papéis fisiológicos de PrP^c esteja contida em estudos com animais nocautes condicionais para esta proteína e também no emprego de inibição específica da função da mesma através de RNAs de interferência.

5.2 - Inibição da mobilidade celular após tratamento com anticorpo anti Hop/STI1

Os nossos resultados de videomicroscopia de tempo intervalado demonstram que o tratamento com o anticorpo que reconhece a proteína Hop/STI1 acarreta em uma visível redução dos movimentos celulares. Este fenômeno ocorre tanto no interior das cadeias, como também nas bordas externas dos explantes de ZSV. Esta redução de mobilidade pode ser representada de forma quantitativa ao se comparar a velocidade média das células migratórias antes e após o tratamento com o anticorpo. Utilizando o mesmo modelo de explantes de ZSV, já foi demonstrado que o bloqueio de junções comunicantes entre as células das cadeias, através de variados tratamentos farmacológicos, resultam em inibição dos movimentos celulares (Marins et al., 2008 submetido). No entanto, é importante ressaltar as diferenças existentes entre os dois tipos de inibição de mobilidade observados. As células submetidas a tratamento com anti-Hop/STI1

apresentam uma interrupção parcial de mobilidade, ao passo que na situação de bloqueio de comunicação juncional a inibição dos movimentos celulares aparentam ser mais drásticos. Outros pontos contrastantes podem ser observados entre os dois estudos. Apenas o tratamento com anticorpo que reconhece Hop/STI1 resulta em uma modificação visível no modo de organização das cadeias, transformando-as em estruturas que se assemelham a um sincício, visto que a identificação dos corpos celulares é bastante prejudicada. Ao contrário do estudo de Marins e colaboradores, observamos também que após esta modificação na organização das células no interior das cadeias, estas tendem a sofrer colapsos abruptos, retraindo-se rapidamente no sentido dos explantes. Conforme foi descrito anteriormente, as células visualizadas através de videomicroscopia de tempo intervalado apresentam uma migração bidirecional, porém estas células nunca se direcionam para o explante da forma maciça e sincronizada que é característica do colapso após o tratamento com o anticorpo. Estas observações indicam que os mecanismos envolvidos na migração retrógrada e no colapso são essencialmente distintos.

A análise destes dados torna possível inferir que o bloqueio de junções comunicantes e o tratamento com o anti-Hop/STI1 podem afetar o microambiente celular de formas distintas, porém os dois tratamentos geram um efeito global semelhante, a inibição da migração dos neuroblastos da ZSV.

Embora o conjunto de resultados atuais não seja capaz de fornecer um parecer definitivo a respeito do mecanismo de ação da proteína Hop/STI1 sobre a migração dos neuroblastos, algumas hipóteses podem ser formuladas e serão apresentadas nas seções seguintes.

5.3 - A proteína Hop/STI1 como reguladora de migração neuronal

A maioria dos nossos resultados foram obtidos a partir da observação do comportamento migratório de células da ZSV após o tratamento com anticorpo que reconhece a proteína Hop/STI1. Ensaio de *Western Blot* realizados com este mesmo anticorpo a partir de extratos totais de proteína da zona subventricular apresentam uma banda única, correspondente ao peso molecular já descrito para esta proteína, garantindo desta maneira a especificidade do anticorpo em relação à proteína em estudo. A ausência de efeitos sobre os halos migratórios de culturas de explantes tratadas com o anti-peptídeo 230-245, assim como o anti-Hop/STI1 obtido a partir de outro animal, reforçam a hipótese de um efeito do anti-Hop/STI1 utilizado nos ensaios funcionais sobre epítomos específicos desta proteína presente nos neuroblastos. Estes resultados negativos reduzem a possibilidade da inibição de mobilidade celular ser causada por uma agregação inespecífica de proteínas na superfície dos neuroblastos, pois supostamente estes anticorpos reconheceriam a mesma molécula.

No entanto, a mera observação dos efeitos da ligação do anticorpo com a Hop/STI1 presente nas células migratórias não é capaz de esclarecer de forma concreta a função real da proteína nestes eventos migratórios. Isto se deve ao fato de que não podemos afirmar neste momento se esta ligação do anticorpo à proteína contribuiria para uma ativação ou inibição da mesma. No entanto, uma análise conjunta de alguns de nossos resultados e de

estudos prévios da literatura podem indicar mecanismos de ação sendo modulados por Hop/STI1.

A proteína Hop/STI1 é uma co-chaperona que ao ser externalizada pode atuar como ligante de PrP^c na face externa da membrana plasmática (Zanata et al., 2002), uma propriedade que sugere o desempenho de funções biológicas em dois meios celulares distintos.

Esta dualidade no padrão de expressão aparenta estar presente nos neuroblastos migratórios da ZSV, pois dependendo do estado de permeabilização das membranas celulares é possível observar diferenças no padrão de expressão da proteína Hop/STI1. Porém, não podemos afirmar no presente momento quais destes dois componentes, extracelular ou intracelular, seriam mais relevantes para a migração dos mesmos, ou ainda se a atuação sinérgica das porções extra e intracelulares da proteína poderiam contribuir para a migração de neuroblastos. É possível, que a metodologia empregada neste trabalho não seja capaz de discernir de forma fidedigna a presença de porções extracelulares de Hop/STI1. Desta maneira, para uma comprovação definitiva desta hipótese, seria necessária a análise de frações celulares de membrana e do citoplasma destes neuroblastos. Contudo, uma localização na superfície celular de Hop/STI1 já foi proposta em cultura de neurônios hipocâmpais utilizando metodologias semelhantes às empregadas neste estudo (Lopes et al., 2005). Curiosamente, em contraste com nossos resultados, a presumível localização de Hop/STI1 na superfície celular destes neurônios hipocâmpais está restrita ao corpo celular e não aos neuritos, sugerindo desta maneira que a expressão de Hop/STI1 na

superfície dos prolongamentos poderia ser exclusiva de células em atividade migratória.

É interessante observar que caso se confirme em definitivo a presença de Hop/STI1 na superfície celular dos neuroblastos migratórios, suas supostas funções extracelulares podem não estar vinculadas à proteína do príon celular. Isto se deve principalmente ao fato de que nossos resultados indicam que os efeitos observados em decorrência do tratamento com anti-Hop/STI1 são independentes da expressão de PrP^C. Embora a análise inicial dos halos migratórios sugira que os efeitos seriam apenas parcialmente independentes de PrP^C devido ao grau de significância menor demonstrado pelos testes estatísticos utilizados, observações realizadas através de videomicroscopia de tempo intervalado demonstram que o comportamento migratório de neuroblastos desprovidos de PrP^C e selvagens são indistinguíveis antes e após o tratamento com anticorpo. Além disso, os resultados do tratamento com anti-peptídeo 230-245 corroboram a hipótese de um efeito de Hop/STI1 independente de PrP^C sobre a migração dos neuroblastos. Efeitos neuroprotetores independentes de PrP^C decorrentes do tratamento com o mesmo anticorpo já haviam sido previamente observados em um modelo de indução de morte celular na retina de ratos (Arruda-Carvalho et al., 2007). A partir destas evidências seria possível supor que a Hop/STI1 presente na superfície celular destas células estaria interagindo com outras proteínas para regular este evento migratório.

Caso seja realmente confirmada uma função extracelular Hop/STI1, esta poderia estar sendo exercida através da interação com a proteína HSP90. A formação de heterocomplexos protéicos contendo Hop/STI1,

HSP90 e HSP70 já havia sido descrita no meio intracelular (Odunuga et al., 2004), no entanto outros dados prévios da literatura indicam que HSP90 e talvez Hop/STI1 podem também ter papel biológico importante na superfície celular (Eustace et al., 2004).

Desta forma, já foi demonstrada a presença de HSP90 na superfície celular de células granulares do cerebelo, células de Schwann e linhagens de células tumorais *in vitro* (Sidera et al., 2004;2008). De modo similar aos nossos resultados, foi observado que o tratamento com anticorpos policlonais que reconhecem de forma específica a chaperona HSP90 inibe a migração de todos os tipos celulares que expressam a proteína em suas superfícies. Aparentemente, esta inibição da migração está associada a alterações na organização das fibras de F-actina do citoesqueleto. A retração das cadeias migratórias observada mediante tratamento com anti-Hop/STI1 pode ser causada por semelhante reorganização do citoesqueleto dos neuroblastos em processo de migração. Esta possibilidade poderia ser averiguada através da comparação da disposição do citoesqueleto dos neuroblastos migratórios utilizando marcadores fluorescentes de actina como a faloidina conjugada a rodamina entre células submetidas ou não a tratamento com o anti Hop/STI1.

Os dois estudos de Sidera e colaboradores (2004; 2008) atribuem os efeitos observados sobre a migração à ligação do anticorpo com HSP90 presente na superfície celular, visto que ensaios com células tumorais demonstraram que o anticorpo não parece estar sendo internalizado pelas mesmas. Utilizando protocolos semelhantes, observamos que após um período de 1 hora de incubação, poucas células em nossas culturas aparentavam ter internalizado o anti-Hop/ STI1. Apesar da ausência de

resultados com tempos maiores de tratamento com o anticorpo, que poderiam sugerir que a internalização só ocorreria após exposições mais prolongadas, neste período de tempo único em que foi avaliada a possibilidade do anticorpo ser internalizado já podem ser observados os efeitos de inibição de motilidade celular, assim como de retração de cadeias migratórias. Portanto, os efeitos observados em nosso modelo devem ser consequência de uma ação do anticorpo sobre a Hop/STI1 localizada na superfície celular dos neuroblastos.

No estudo onde foram utilizadas células tumorais (Sidera et al., 2008), foi sugerido que anticorpos que reconhecem especificamente HSP90 afetam a interação entre esta chaperona e um domínio extracelular do receptor HER-2, da família ErbB dos receptores de fator de crescimento epidermais (EGF) tirosina cinase. Estes receptores ativam, através de sua capacidade de fosforilação de proteínas, cascatas de sinalização intracelular que resultam na reorganização do citoesqueleto, justificando desta maneira a inibição da motilidade celular decorrente do tratamento com o anticorpo.

Um dos papéis intracelulares mais notórios da chaperona HSP90 é sua capacidade de manter receptores de hormônios esteróides em um estado conformacional que permita a sua interação com seus ligantes. É importante observar que para exercer suas funções, frequentemente a HSP90 está associada a outras proteínas através de heterocomplexos de chaperonas (Pratt et al., 2003), a secreção de vários elementos característicos de maquinarias de chaperonas pode ser um indicativo da existência destes heterocomplexos no meio extracelular (Eustace et al., 2004). Deste modo, é possível supor que nestes prováveis heterocomplexos extracelulares, HSP90

também poderia regular a conformação de receptores específicos que poderiam estar agindo sobre vias de sinalização fundamentais para o controle da motilidade celular. Neste modelo, a proteína Hop/STI1, assim como outras proteínas destes heterocomplexos, poderiam ser essenciais para permitir que HSP90 execute suas funções de chaperona na superfície celular. Sendo assim, os efeitos que observamos a partir do tratamento com anti Hop/STI1 sobre a migração dos neuroblastos poderiam ser indiretos, causados na realidade por uma perda da capacidade de HSP90 em modular a conformação de receptores essenciais para a ativação de cascatas de sinalização de migração celular. Esta perda de capacidade por sua vez poderia ser ocasionada por uma inibição no processo de formação destes heterocomplexos extracelulares após a ligação do anticorpo com a Hop/STI1 de superfície celular.

Embora especulativa, alguns dados da literatura sustentam esta hipótese. Já foi demonstrada a expressão de vários tipos de receptores com atividade tirosina cinase em células da via migratória rostral, que liga a porção mais anterior da ZSV com o bulbo olfatório. Animais nocautes ou nocautes condicionais para alguns deles, como EGFR e ErbB4 (Threadgill et al., 1995; Anton et al., 2004) apresentam alterações na organização desta via migratória, assim como aparentes anomalias na migração neuronal em decorrência da ausência destes receptores. Os receptores Eph, que se ligam às efrinas, são outra classe de receptores tirosina cinase presente na zona subventricular, cuja inibição *in vivo* é capaz de interromper a migração dos neuroblastos (Conover et al., 2000). Mais recentemente, foi cogitado um papel para os receptores Met e trkB, que são estimulados por seus ligantes

HGF (sigla para fator de crescimento de hepatócitos) e BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), respectivamente (Chiaramello et al., 2007; Garzotto et al., 2008) neste tipo de migração. Portanto, a manutenção da atividade destes receptores, tarefa que pode estar sendo desempenhada por heterocomplexos extracelulares, pode ser crucial para que a migração em cadeias se estabeleça de forma correta.

A possibilidade do tratamento com anti Hop/STI1 resultar em um efeito indireto causado por uma alteração na função normal de HSP90 poderia justificar os dados obtidos através da utilização da proteína STI1 recombinante. Após o tratamento com a proteína não foram observadas, em nenhuma das concentrações utilizadas, alterações significativas seja no halo migratório ao redor dos explantes, como na velocidade média das células. Foi demonstrado que HSP90 se liga com alta afinidade a Hop/STI1 e que esta co-chaperona se encontra majoritariamente associada a HSP90 em lisados de reticulócitos (Silverstein et al., 1999; Murphy et al., 2001; Hernández et al., 2002). No entanto, não sabemos se há correlato desta ligação no ambiente extracelular. Uma hipótese seria a de que grande parte da HSP90 extracelular já se encontre associada com Hop/STI1, deste modo os sítios de ligação de ambas as proteínas já poderiam estar saturados, resultando assim na ausência de efeitos biológicos significativos causados pela adição de STI1 exógena. Da mesma maneira, talvez a etapa limitante do processo fosse o número de receptores presentes na superfície celular que poderiam estar associados com o suposto heterocomplexo de chaperonas extracelular. Em contrapartida, as concentrações de HSP90 parecem ser maiores do que as de Hop/STI1 no interior da célula. Se este fato puder ser extrapolado para o

meio extracelular, é provável que a detecção de algum efeito através da utilização de STI1 recombinante só ocorra em concentrações superiores em relação às que foram utilizadas neste estudo. Outro ponto a ser levantado é o de que a previsão de exacerbação da migração correlacionada ao aumento da concentração de um dado elemento participante da complexa rede de interações bioquímicas subjacentes à migração parece um tanto quanto simplista.

A análise do meio condicionado de culturas de explantes de zona subventricular pode ser a chave para a constatação da existência ou não de heterocomplexos de chaperonas no meio extracelular. Dados adicionais são necessários para a confirmação da secreção desta proteína por neuroblastos da ZSV. As análises do meio-condicionado destas culturas e experimentos de imunoprecipitação poderiam mostrar em nosso modelo se Hop/STI1 poderia estar interagindo com elementos de heterocomplexos como o formado por HSP90.

5.4 - Alteração na adesão célula-célula após tratamento com anti Hop/STI1

A julgar pelo comportamento das células no interior das cadeias após o tratamento com o anticorpo, visualizado através da videomicroscopia de tempo intervalado, é razoável supor que a proteína Hop/STI1 possa modular as relações adesivas entre células migratórias. Para que a migração neuronofílica, característica dos neuroblastos da zona subventricular, ocorra de maneira correta é necessária a manutenção de um balanço entre forças

atuantes no aumento ou diminuição da adesão. O tratamento com o anticorpo que reconhece Hop/STI1 pode afetar este balanço, resultando em uma modificação na interação adesiva dos neuroblastos com o substrato sobre o qual eles migram, ou então com as células vizinhas no interior das cadeias. De fato, nossos experimentos de formação de agregados celulares sugerem um aumento na adesão intercelular entre células da zona subventricular, embora tenham sido avaliadas alterações na adesão da população das células totais da ZSV e não apenas a porção que corresponde aos neuroblastos migratórios. Até o presente momento, não temos conhecimento sobre uma possível influência de Hop/STI1 sobre processos de adesão celular. No entanto, existem evidências da importância de HSP90 atuando em mecanismos relacionados com adesão, mais especificamente a adesão célula-matriz extracelular. Desta forma, já foi demonstrado em estudos utilizando células endoteliais que a inibição de HSP90 impede a fosforilação de cinases de adesão focal (FAK) através da ativação de receptores de fatores de crescimento endoteliais vasculares (VEGFR) (Rousseau et al., 2000; Masson-Gadais et al., 2003). A FAK não fosforilada por sua vez é incapaz de recrutar as proteínas Paxilina e Vinculina para os pontos de adesão focal, resultando assim em inibição da migração de células endoteliais.

Estes estudos indicam um papel intracelular de HSP90 na regulação de adesão e migração celular em contraponto à hipótese de atuação de HSP90 extracelular já proposta. Sendo assim, em nosso modelo, pode-se supor que o tratamento com anti Hop/STI1 seria capaz de desabilitar a função da HSP90 intracelular responsável pela fosforilação de FAK, isso resultaria

na perda de adesão dos neuroblastos migratórios com proteínas de matriz extracelular presentes no Matrigel, causando o colapso das cadeias observado. No entanto, os nossos resultados sugerem que o anti-Hop/STI1 pode estar agindo predominantemente na superfície celular devido aos baixos níveis de internalização do anticorpo.

Se esta ação intracelular do anticorpo for descartada, poderíamos supor que através de algum mecanismo desconhecido, a Hop/STI1 presente na superfície celular modularia o equilíbrio adesivo necessário para a formação de cadeias migratórias. Para que isto ocorra, a hipótese mais provável consistiria de uma possível interação, direta ou indireta, com moléculas presentes na membrana extracelular capazes de influenciar a adesão destes neuroblastos. Devido aos efeitos observados em nossos resultados, a escolha mais óbvia recairia sobre a forma da molécula de adesão neural (NCAM) contendo ácido polissialílico. Conforme já foi proposto em estudos prévios, o ácido polissialílico associado à esta isoforma atenuaria a adesão intercelular, permitindo a movimentação dos neuroblastos no interior das cadeias (Ono et al,1994). Receptores presentes na membrana plasmática como o ErbB4 e ApoEr2 também aparentam agir sobre a manutenção destas forças adesivas, porém de forma antagônica, pois enquanto o primeiro se mostra imprescindível para a formação de cadeias (Anton et al., 2004), a associação do segundo com o seu ligante, a glicoproteína reelina, resulta na perda da organização em cadeias, induzindo as células a migrarem individualmente (Hack et al., 2002).

Não temos conhecimento de evidências na literatura que indiquem uma interação de Hop/STI1 presente na superfície celular com estas

moléculas mencionadas, porém devido aos nossos resultados, julgamos relevante em experimentos futuros analisar se estas interações existem e de que maneira elas poderiam estar ocorrendo. É importante ressaltar, no entanto, que estas interações poderiam estar ocorrendo indiretamente, através do modelo proposto de heterocomplexos de chaperonas extracelulares. De fato, caso a existência e a funcionalidade de tais complexos seja comprovada, assim como sua importância na manutenção da conformação funcional de receptores, outras hipóteses podem ser formuladas.

Alguns estudos prévios já demonstraram que a inibição de receptores da família EGF em células epiteliais e também de linhagens tumorais resultam em um aumento de adesão intercelular através de alterações nos níveis de expressão de subtipos de caderinas (al Moustafa et al., 1999; Lorch et al., 2004). Da mesma forma como já foram descritos receptores EGF na via migratória rostral (Caric et al., 2001), a expressão de N-Caderinas em neuroblastos migrando em cadeias já foi demonstrada (Chauvet et al., 2003). Considerando que estes heterocomplexos seriam fundamentais para preservar a atividade funcional de receptores da família EGF, seria plausível supor que ao se ligar a Hop/STI1 o anticorpo poderia afetar deste modo a função de HSP90, impossibilitando a manutenção da conformação funcional de receptores EGF, resultando em um aumento da expressão de moléculas de adesão. Estes níveis elevados de moléculas de adesão poderiam então justificar a formação de agregados maiores e principalmente afetar o balanço adesivo ótimo entre os neuroblastos das cadeias e que possibilita a migração celular bem sucedida, resultando assim na inibição de migração e o

subseqüente colapso das cadeias observado. Resultados semelhantes, porém contrastantes foram obtidos em experimentos que avaliaram a migração de queratinócitos (Hintermann et al., 2005). Neste estudo específico, demonstrou-se que anticorpos monoclonais seriam capazes de ativar integrinas $\alpha 6\beta 4$, através da indução de agregação das mesmas, e a subsequente formação de complexos de integrinas com receptores ErbB2. Esta interação resulta na inibição da migração de queratinócitos, através de um aumento das adesões intercelulares que seria conseqüência da alteração no nível de expressão de caderinas.

A partir destas evidências, uma outra possibilidade que deve ser considerada consistiria em uma possível ativação da proteína Hop/STI1 mediante a sua ligação com o anticorpo, ao invés de uma inibição de sua função proposta nos modelos hipotéticos já descritos. Evidências na literatura propõem que a proteína Hop/STI1 poderia se organizar na forma de monômeros ou dímeros, de modo que a transição entre estes dois estados facilitaria o desempenho de suas funções de co-chaperona (Van der Spuy et al., 2001). Talvez a ligação do anticorpo com a Hop/STI1 poderia ser capaz de induzir a dimerização da mesma, resultando em sua ativação. No caso da proteína Hop/STI1 estar desempenhando funções na regulação de adesões intercelulares, esta ativação resultante da sua ligação com o anticorpo poderia acarretar em um aumento exacerbado da função normal desta proteína, gerando um desequilíbrio entre as forças adesivas necessárias para a manutenção da atividade migratória dos neuroblastos.

Ainda não é possível desenvolver um modelo definitivo que seja capaz de justificar os resultados obtidos neste trabalho. Porém, os efeitos do anti-

Hop/STI1 sobre a migração dos neuroblastos da zona subventricular se assemelham aos resultados obtidos nos estudos de Sidera e colaboradores (Sidera et al., 2004; 2008), tornando assim a hipótese de complexos de heterochaperonas extracelulares possível de ser proposta para nosso modelo (Fig. 35 A). No entanto, a já mencionada interação de Hop/STI1 com PrP^c e sua influência sobre aspectos da neuritogênese podem indicar que esta co-chaperona poderia interagir diretamente com outros parceiros moleculares extracelulares, capazes de mediar eventos de migração celular (Fig. 35B). Esta possibilidade estaria de acordo com nossos resultados que sugerem um papel de Hop/STI1 independente de sua interação com a proteína do Príon. Estes dois modelos hipotéticos propõem que de acordo com o modo de atuação de Hop/STI1 na superfície celular, que poderia consistir de interações diretas com moléculas ainda desconhecidas, ou participando da formação de heterocomplexos protéicos, seriam desencadeadas diferentes cascatas de sinalização intracelular. Estas cascatas por sua vez poderiam influenciar relações adesivas intercelulares e/ou a organização do citoesqueleto de actina, resultando assim na inibição dos movimentos celulares.

Fig 35

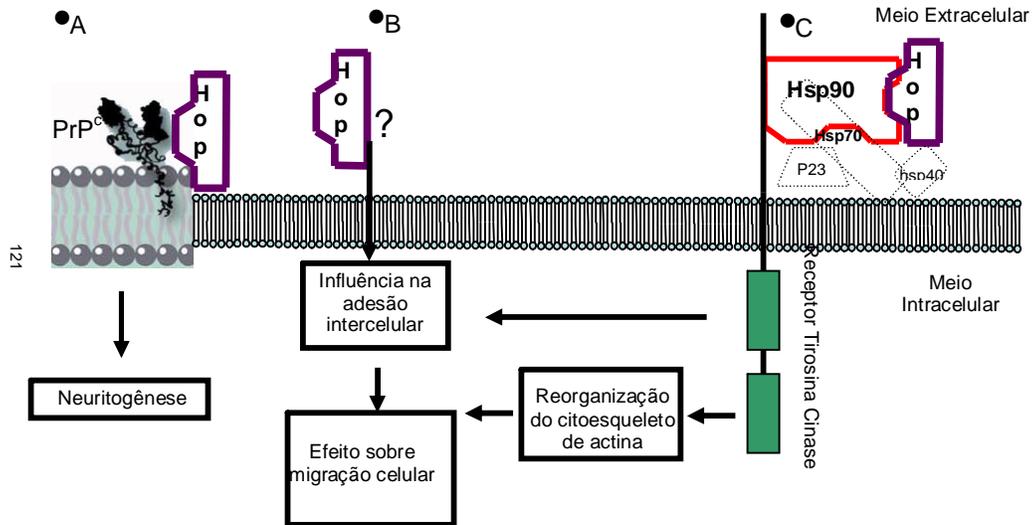


Figura 35 - Esquema ilustrando modelos já demonstrados e hipotéticos de interações extracelulares de Hop/STI1. (A) Hop/STI1 atua como um ligante de superfície celular para PrPc (Zanata et al., 2002) e esta interação é capaz de mediar neuritogênese (Lopes et al., 2005). (B) Os efeitos do tratamento com anti-Hop/STI1 independentes de PrPc sugerem uma interação na superfície celular com outras moléculas ainda não identificadas que poderia desencadear cascatas de sinalização intracelular que alterariam relações adesivas intercelulares, resultando em uma inibição dos movimentos migratórios celulares. (C) A presença de Hop/STI1 e Hsp90 já foi descrita no meio extracelular (Eustace et al., 2004), porém a interação destas proteínas formando heterocomplexos de chaperonas funcionais e seu consequente papel na ativação de receptores tirosina cinase ainda não foram descritos.

6 - Conclusões

1. Nossos resultados mostraram que a proteína do príon não exerce papel determinante na migração tangencial axonofílica e homofílica de neurônios da eminência ganglionar e da zona subventricular respectivamente
2. Demonstramos que a proteína Hop/STI1, conhecido ligante de PrP^c, interfere na migração de neuroblastos da SVZ.
3. Os efeitos sobre a migração mediados pelo anticorpo contra Hop/STI1 parecem ser independentes de PrP^c e predominantemente extracelulares. Estes efeitos consistem na diminuição da velocidade migratória dos neuroblastos e no colapso de cadeias migratórias.
4. Hipotetizamos que a proteína Hop/STI1 regula a adesão célula-célula importante para a migração de neuroblastos.

Referências

- (1970) Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. The Boulder Committee. *Anat. Rec.* **166**, 257-261.
- Adams, M. D., et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- al Moustafa, A. E., Yansouni, C., aoui-Jamali, M. A., and O'Connor-McCourt, M. (1999) Up-regulation of E-cadherin by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in lung cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* **5**, 681-686.
- Alves, J. A., Barone, P., Engelender, S., Froes, M. M., and Menezes, J. R. (2002) Initial stages of radial glia astrocytic transformation in the early postnatal anterior subventricular zone. *J. Neurobiol.* **52**, 251-265.
- Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L., and Rubenstein, J. L. (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* **278**, 474-476.
- Anderson, S. A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K., and Rubenstein, J. L. (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* **128**, 353-363.
- Ang, E. S., Jr., Haydar, T. F., Gluncic, V., and Rakic, P. (2003) Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J. Neurosci.* **23**, 5805-5815.
- Angevine, J. B., Jr. and Sidman, R. L. (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* **192**, 766-768.
- Arruda-Carvalho, M., Njaine, B., Silveira, S.M., Linden, R., Chiarini, L.B. (2007) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **361**, 474-480.
- Anton, E. S., Ghashghaei, H. T., Weber, J. L., McCann, C., Fischer, T. M., Cheung, I. D., Gassmann, M., Messing, A., Klein, R., Schwab, M. H., Lloyd, K. C., and Lai, C. (2004) Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nat. Neurosci.* **7**, 1319-1328.
- Arbeitman, M. N. and Hogness, D. S. (2000) Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell* **101**, 67-77.
- Belvindrah, R., Hankel, S., Walker, J., Patton, B. L., and Muller, U. (2007) Beta1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream. *J. Neurosci.* **27**, 2704-2717.
- Bharadwaj, S., Ali, A., and Ovsenek, N. (1999) Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 In vivo. *Mol. Cell Biol.* **19**, 8033-8041.

- Bielas, S., Higginbotham, H., Koizumi, H., Tanaka, T., and Gleeson, J. G. (2004) Cortical neuronal migration mutants suggest separate but intersecting pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 593-618.
- Blatch, G. L., Lassle, M., Zetter, B. R., and Kundra, V. (1997) Isolation of a mouse cDNA encoding mST11, a stress-inducible protein containing the TPR motif. *Gene* **194**, 277-282.
- Bolteus, A. J. and Bordey, A. (2004) GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J. Neurosci.* **24**, 7623-7631.
- Bovetti, S., Hsieh, Y. C., Bovolin, P., Perroteau, I., Kazunori, T., and Puche, A. C. (2007) Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J. Neurosci.* **27**, 5976-5980.
- Bovetti, S., Bovolin, P., Perroteau, I., and Puche, A. C. (2007) Subventricular zone-derived neuroblast migration to the olfactory bulb is modulated by matrix remodelling. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 2021-2033.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**, 339-343.
- Brazel, C. Y., Romanko, M. J., Rothstein, R. P., and Levison, S. W. (2003) Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Prog. Neurobiol.* **69**, 49-69.
- Bresnick, E. H., Dalman, F. C., Sanchez, E. R., and Pratt, W. B. (1989) Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 4992-4997.
- Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von, B. A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., and Kretzschmar, H. (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**, 684-687.
- Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J., and Jones, I. M. (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J.* **344 Pt 1**, 1-5.
- Brunstrom, J. E., Gray-Swain, M. R., Osborne, P. A., and Pearlman, A. L. (1997) Neuronal heterotopias in the developing cerebral cortex produced by neurotrophin-4. *Neuron* **18**, 505-517.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., and Weissmann, C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-582.

- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339-1347.
- Bystron, I., Blakemore, C., and Rakic, P. (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 110-122.
- Caric, D., Raphael, H., Viti, J., Feathers, A., Wancio, D., and Lillien, L. (2001) EGFRs mediate chemotactic migration in the developing telencephalon. *Development* **128**, 4203-4216.
- Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F., and Caughey, W. S. (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 7672-7680.
- Chan, C. H., Godinho, L. N., Thomaidou, D., Tan, S. S., Gulisano, M., and Parnavelas, J. G. (2001) Emx1 is a marker for pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Cereb. Cortex* **11**, 1191-1198.
- Chang, H. C., Nathan, D. F., and Lindquist, S. (1997) In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). *Mol. Cell Biol.* **17**, 318-325.
- Chauvet, N., Prieto, M., Fabre, C., Noren, N. K., and Privat, A. (2003) Distribution of p120 catenin during rat brain development: potential role in regulation of cadherin-mediated adhesion and actin cytoskeleton organization. *Mol. Cell Neurosci.* **22**, 467-486.
- Chazal, G., Durbec, P., Jankovski, A., Rougon, G., and Cremer, H. (2000) Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J. Neurosci.* **20**, 1446-1457.
- Chen, S., Prapapanich, V., Rimerman, R. A., Honore, B., and Smith, D. F. (1996) Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins hsp90 and hsp70. *Mol. Endocrinol.* **10**, 682-693.
- Chiaromello, S., Dalmasso, G., Bezin, L., Marcel, D., Jourdan, F., Peretto, P., Fasolo, A., and De, M. S. (2007) BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 1780-1790.
- Chiarini, L. B., Freitas, A. R., Zanata, S. M., Brentani, R. R., Martins, V. R., and Linden, R. (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* **21**, 3317-3326.
- Cobos, I., Calcagnotto, M. E., Vilaythong, A. J., Thwin, M. T., Noebels, J. L., Baraban, S. C., and Rubenstein, J. L. (2005) Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat. Neurosci.* **8**, 1059-1068.
- Coitinho, A. S., Lopes, M. H., Hajj, G. N., Rossato, J. I., Freitas, A. R., Castro, C. C., Cammarota, M., Brentani, R. R., Izquierdo, I., and Martins, V. R. (2007) Short-term memory formation and long-term memory consolidation are

enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. *Neurobiol. Dis.* **26**, 282-290.

Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R., and Jefferys, J. G. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**, 295-297.

Collins, S. J., Lawson, V. A., and Masters, C. L. (2004) Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* **363**, 51-61.

Conover, J. C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Gale, N. W., Yancopoulos, G. D., and varez-Buylla, A. (2000) Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat. Neurosci.* **3**, 1091-1097.

Corbin, J. G., Nery, S., and Fishell, G. (2001) Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nat. Neurosci.* **4 Suppl**, 1177-1182.

Daniel, S., Bradley, G., Longshaw, V. M., Soti, C., Csermely, P., and Blatch, G. L. (2008) Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock, and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 1003-1014.

Demand, J., Luders, J., and Hohfeld, J. (1998) The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol. Cell Biol.* **18**, 2023-2028.

Denaxa, M., Chan, C. H., Schachner, M., Parnavelas, J. G., and Karagogeos, D. (2001) The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* **128**, 4635-4644.

Dittmar, K. D., Hutchison, K. A., Owens-Grillo, J. K., and Pratt, W. B. (1996) Reconstitution of the steroid receptor.hsp90 heterocomplex assembly system of rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **271**, 12833-12839.

Dittmar, K. D. and Pratt, W. B. (1997) Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J. Biol. Chem.* **272**, 13047-13054.

Dittmar, K. D., Banach, M., Galigniana, M. D., and Pratt, W. B. (1998) The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J. Biol. Chem.* **273**, 7358-7366.

Doetsch, F. and varez-Buylla, A. (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 14895-14900.

- Eustace, B. K. and Jay, D. G. (2004) Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle* **3**, 1098-1100.
- Fairen, A., Cobas, A., and Fonseca, M. (1986) Times of generation of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons in mouse somatosensory cortex. *J. Comp Neurol.* **251**, 67-83.
- Flames, N., Long, J. E., Garratt, A. N., Fischer, T. M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J. L., and Marin, O. (2004) Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* **44**, 251-261.
- Galvan, C., Camoletto, P. G., Dotti, C. G., Aguzzi, A., and Ledesma, M. D. (2005) Proper axonal distribution of PrP(C) depends on cholesterol-sphingomyelin-enriched membrane domains and is developmentally regulated in hippocampal neurons. *Mol. Cell Neurosci.* **30**, 304-315.
- Garzotto, D., Giacobini, P., Crepaldi, T., Fasolo, A., and De, M. S. (2008) Hepatocyte growth factor regulates migration of olfactory interneuron precursors in the rostral migratory stream through Met-Grb2 coupling. *J. Neurosci.* **28**, 5901-5909.
- Gauczynski, S., Peyrin, J. M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C. I., and Weiss, S. (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J.* **20**, 5863-5875.
- Gorski, J. A., Talley, T., Qiu, M., Puelles, L., Rubenstein, J. L., and Jones, K. R. (2002) Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J. Neurosci.* **22**, 6309-6314.
- Graner, E., Mercadante, A. F., Zanata, S. M., Forlenza, O. V., Cabral, A. L., Veiga, S. S., Juliano, M. A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V. R., and Brentani, R. R. (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuriteogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **76**, 85-92.
- Gross, M. and Hessefort, S. (1996) Purification and characterization of a 66-kDa protein from rabbit reticulocyte lysate which promotes the recycling of hsp 70. *J. Biol. Chem.* **271**, 16833-16841.
- Hack, I., Bancila, M., Loulier, K., Carroll, P., and Cremer, H. (2002) Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **5**, 939-945.
- Hatanaka, Y. and Murakami, F. (2002) In vitro analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells. *J. Comp Neurol.* **454**, 1-14.
- Hernandez, M. P., Sullivan, W. P., and Toft, D. O. (2002) The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 38294-38304.

- Hintermann, E., Yang, N., O'Sullivan, D., Higgins, J. M., and Quaranta, V. (2005) Integrin alpha6beta4-erbB2 complex inhibits haptotaxis by up-regulating E-cadherin cell-cell junctions in keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 8004-8015.
- Honore, B., Leffers, H., Madsen, P., Rasmussen, H. H., Vandekerckhove, J., and Celis, J. E. (1992) Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. *J. Biol. Chem.* **267**, 8485-8491.
- Kosano, H., Stensgard, B., Charlesworth, M. C., McMahon, N., and Toft, D. (1998) The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 32973-32979.
- Kriegstein, A. R. and Noctor, S. C. (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* **27**, 392-399.
- Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V., and Parnavelas, J. G. (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* **19**, 7881-7888.
- Letinic, K., Zoncu, R., and Rakic, P. (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* **417**, 645-649.
- Lima, F. R., Arantes, C. P., Muras, A. G., Nomizo, R., Brentani, R. R., and Martins, V. R. (2007) Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J. Neurochem.* **103**, 2164-2176.
- Linden, R., Martins, V. R., Prado, M. A., Cammarota, M., Izquierdo, I., and Brentani, R. R. (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev.* **88**, 673-728.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M., and varez-Buylla, A. (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* **271**, 978-981.
- Longshaw, V. M., Chapple, J. P., Balda, M. S., Cheetham, M. E., and Blatch, G. L. (2004) Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases. *J. Cell Sci.* **117**, 701-710.
- Lopes, M. H., Hajj, G. N., Muras, A. G., Mancini, G. L., Castro, R. M., Ribeiro, K. C., Brentani, R. R., Linden, R., and Martins, V. R. (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J. Neurosci.* **25**, 11330-11339.
- Lopez-Bendito, G., Sanchez-Alcaniz, J. A., Pla, R., Borrell, V., Pico, E., Valdeolmillos, M., and Marin, O. (2008) Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *J. Neurosci.* **28**, 1613-1624.
- Lorch, J. H., Klessner, J., Park, J. K., Getsios, S., Wu, Y. L., Stack, M. S., and Green, K. J. (2004) Epidermal growth factor receptor inhibition promotes

desmosome assembly and strengthens intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 37191-37200.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Luskin, M. B. (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* **11**, 173-189.

Mallucci, G. R., Ratté, S., Asante, E. A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J. G., and Collinge, J. (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.* **21**, 202-210.

Maness, P. F. and Schachner, M. (2007) Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.* **10**, 19-26.

Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H., and Hope, J. (1992) The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* **115**, 117-122.

Marin, O. and Rubenstein, J. L. (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 780-790.

Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J. L. (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* **293**, 872-875.

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

Masson-Gadais, B., Houle, F., Laferriere, J., and Huot, J. (2003) Integrin α v β 3, requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and for Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell Stress. Chaperones.* **8**, 37-52.

Menezes, J. R., Smith, C. M., Nelson, K. C., and Luskin, M. B. (1995) The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Mol. Cell Neurosci.* **6**, 496-508.

Menezes, J. R., Marins, M., Alves, J. A., Froes, M. M., and Hedin-Pereira, C. (2002) Cell migration in the postnatal subventricular zone. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**, 1411-1421.

Miller, M. W. (1985) Cogeneration of retrogradely labeled corticocortical projection and GABA-immunoreactive local circuit neurons in cerebral cortex. *Brain Res.* **355**, 187-192.

Miyakoshi, L. M., Mendez-Otero, R., and Hedin-Pereira, C. (2001) The 9-O-acetyl GD3 gangliosides are expressed by migrating chains of subventricular zone neurons in vitro. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 669-673.

Moore, R. C., Lee, I. Y., Silverman, G. L., Harrison, P. M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S. H., Chishti, M. A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A. F., Katamine, S., Carlson, G. A., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Melton, D. W., Tremblay, P., Hood, L. E., and Westaway, D. (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J. Mol. Biol.* **292**, 797-817.

Moya, K. L., Hassig, R., Breen, K. C., Volland, H., and Di, G. L. (2005) Axonal transport of the cellular prion protein is increased during axon regeneration. *J. Neurochem.* **92**, 1044-1053.

Murase, S. and Horwitz, A. F. (2002) Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J. Neurosci.* **22**, 3568-3579.

Murphy, P. J., Kanelakis, K. C., Galigniana, M. D., Morishima, Y., and Pratt, W. B. (2001) Stoichiometry, abundance, and functional significance of the hsp90/hsp70-based multiprotein chaperone machinery in reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **276**, 30092-30098.

Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R. O., and Parnavelas, J. G. (2002) Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* **5**, 218-224.

Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G., and Taraboulos, A. (1997) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J. Biol. Chem.* **272**, 6324-6331.

Nery, S., Fishell, G., and Corbin, J. G. (2002) The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat. Neurosci.* **5**, 1279-1287.

Ng, K. L., Li, J. D., Cheng, M. Y., Leslie, F. M., Lee, A. G., and Zhou, Q. Y. (2005) Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* **308**, 1923-1927.

Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Picard-Riera, N., Tessier-Lavigne, M., Baron-Van, E. A., Sotelo, C., and Chedotal, A. (2004) Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J. Neurosci.* **24**, 1497-1506.

Nico, P. B., de-Paris, F., Vinade, E. R., Amaral, O. B., Rockenbach, I., Soares, B. L., Guarnieri, R., Wichert-Ana, L., Calvo, F., Walz, R., Izquierdo, I., Sakamoto, A. C., Brentani, R., Martins, V. R., and Bianchin, M. M. (2005) Altered behavioural response to acute stress in mice lacking cellular prion protein. *Behav. Brain Res.* **162**, 173-181.

- Nicolet, C. M. and Craig, E. A. (1989) Isolation and characterization of ST11, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **9**, 3638-3646.
- Nishida, N., Katamine, S., Shigematsu, K., Nakatani, A., Sakamoto, N., Hasegawa, S., Nakaoka, R., Atarashi, R., Kataoka, Y., and Miyamoto, T. (1997) Prion protein is necessary for latent learning and long-term memory retention. *Cell Mol. Neurobiol.* **17**, 537-545.
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S., and Kriegstein, A. R. (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* **409**, 714-720.
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Wong, W. S., Clinton, B. K., and Kriegstein, A. R. (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J. Neurosci.* **22**, 3161-3173.
- O'Rourke, N. A., Sullivan, D. P., Kaznowski, C. E., Jacobs, A. A., and McConnell, S. K. (1995) Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development* **121**, 2165-2176.
- Ogunuga, O. O., Longshaw, V. M., and Blatch, G. L. (2004) Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. *Bioessays* **26**, 1058-1068.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y. (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* **407**, 313-319.
- Ono, K., Tomasiewicz, H., Magnuson, T., and Rutishauser, U. (1994) N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* **13**, 595-609.
- Paratcha, G., Ibanez, C. F., and Ledda, F. (2006) GDNF is a chemoattractant factor for neuronal precursor cells in the rostral migratory stream. *Mol. Cell Neurosci.* **31**, 505-514.
- Pencea, V. and Luskin, M. B. (2003) Prenatal development of the rodent rostral migratory stream. *J. Comp Neurol.* **463**, 402-418.
- Peretto, P., Giachino, C., Aimar, P., Fasolo, A., and Bonfanti, L. (2005) Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *J. Comp Neurol.* **487**, 407-427.
- Pleasure, S. J., Anderson, S., Hevner, R., Bagri, A., Marin, O., Lowenstein, D. H., and Rubenstein, J. L. (2000) Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron* **28**, 727-740.
- Polleux, F., Whitford, K. L., Dijkhuizen, P. A., Vitalis, T., and Ghosh, A. (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* **129**, 3147-3160.

Poluch, S. and Juliano, S. L. (2007) A normal radial glial scaffold is necessary for migration of interneurons during neocortical development. *Glia* **55**, 822-830.

Powell, E. M., Mars, W. M., and Levitt, P. (2001) Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron* **30**, 79-89.

Pozas, E. and Ibanez, C. F. (2005) GDNF and GFRalpha1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons. *Neuron* **45**, 701-713.

Pratt, W. B. and Toft, D. O. (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* **228**, 111-133.

Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D. N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J. E., Piper, P. W., and Pearl, L. H. (1999) Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.* **18**, 754-762.

Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144.

Prusiner, S. B. (1998) Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 13363-13383.

Rakic, P. (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp Neurol.* **145**, 61-83.

Ribeiro-Resende, V. T., Oliveira-Silva, A., Ouverney-Brandao, S., Santiago, M. F., Hedin-Pereira, C., and Mendez-Otero, R. (2007) Ganglioside 9-O-acetyl GD3 expression is upregulated in the regenerating peripheral nerve. *Neuroscience*.

Ross, C. A. and Poirier, M. A. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **10 Suppl**, S10-S17.

Rossi, D., Cozzio, A., Flechsig, E., Klein, M. A., Rulicke, T., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (2001) Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO J.* **20**, 694-702.

Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., and Huot, J. (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 10661-10672.

Saghatelian, A., de, C. A., Schachner, M., and Lledo, P. M. (2004) Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* **7**, 347-356.

Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T., and Noda, T. (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* **380**, 528-531.

Sales, N., Rodolfo, K., Hassig, R., Faucheux, B., Di, G. L., and Moya, K. L. (1998) Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 2464-2471.

Sales, N., Hassig, R., Rodolfo, K., Di, G. L., Traiffort, E., Ruat, M., Fretier, P., and Moya, K. L. (2002) Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 1163-1177.

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

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

Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., and Schachner, M. (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* **169**, 341-354.

SAUER, M. E. and WALKER, B. E. (1959) Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **101**, 557-560.

Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J. A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N. S., Garcia-Verdugo, J. M., Marin, O., Rubenstein, J. L., Tessier-Lavigne, M., Okano, H., and Alvarez-Buylla, A. (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* **311**, 629-632.

Sidera, K., Samiotaki, M., Yfanti, E., Panayotou, G., and Patsavoudi, E. (2004) Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system. *J. Biol. Chem.* **279**, 45379-45388.

Sidera, K., Gaitanou, M., Stellas, D., Matsas, R., and Patsavoudi, E. (2008) A critical role for HSP90 in cancer cell invasion involves interaction with the extracellular domain of HER-2. *J. Biol. Chem.* **283**, 2031-2041.

Silverstein, A. M., Galigniana, M. D., Kanelakis, K. C., Radanyi, C., Renoir, J. M., and Pratt, W. B. (1999) Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein. *J. Biol. Chem.* **274**, 36980-36986.

Simo, S., Pujadas, L., Segura, M. F., La, T. A., Del Rio, J. A., Urena, J. M., Comella, J. X., and Soriano, E. (2007) Reelin induces the detachment of

postnatal subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 through Erk1/2 activation. *Cereb. Cortex* **17**, 294-303.

Smart, I. H. and McSherry, G. M. (1982) Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. II. Histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. *J. Anat.* **134**, 415-442.

Smith, D. F., Sullivan, W. P., Marion, T. N., Zaitsu, K., Madden, B., McCormick, D. J., and Toft, D. O. (1993) Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Mol. Cell Biol.* **13**, 869-876.

Smith, D. F. (1993) Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1418-1429.

Smith, D. F. and Toft, D. O. (1993) Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.* **7**, 4-11.

Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., and Prusiner, S. B. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**, 229-240.

Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S., and Macklis, J. D. (2006) Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 3416-3421.

Stewart, G. R. and Pearlman, A. L. (1987) Fibronectin-like immunoreactivity in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* **7**, 3325-3333.

Super, H., Soriano, E., and Uylings, H. B. (1998) The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **27**, 40-64.

Sussel, L., Marin, O., Kimura, S., and Rubenstein, J. L. (1999) Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* **126**, 3359-3370.

Suzuki, S. O. and Goldman, J. E. (2003) Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration. *J. Neurosci.* **23**, 4240-4250.

Takahashi, T., Nowakowski, R. S., and Caviness, V. S., Jr. (1995) Early ontogeny of the secondary proliferative population of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci.* **15**, 6058-6068.

Tamamaki, N., Nakamura, K., Okamoto, K., and Kaneko, T. (2001) Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosci. Res.* **41**, 51-60.

- Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., and Murakami, F. (2003) Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development* **130**, 5803-5813.
- Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N., and Gruss, P. (2001) Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development* **128**, 1983-1993.
- Terra-Granado, E., Berbert, L. R., de, M. J., Nomizo, R., Martins, V. R., Savino, W., and Silva-Barbosa, S. D. (2007) Is there a role for cellular prion protein in intrathymic T cell differentiation and migration? *Neuroimmunomodulation*. **14**, 213-219.
- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-1133.
- Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R. C., and . (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* **269**, 230-234.
- Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A., and Manson, J. C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**, 639-642.
- Tomasiewicz, H., Ono, K., Yee, D., Thompson, C., Golidis, C., Rutishauser, U., and Magnuson, T. (1993) Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* **11**, 1163-1174.
- van der, S. J., Cheetham, M. E., Dirr, H. W., and Blatch, G. L. (2001) The cochaperone murine stress-inducible protein 1: overexpression, purification, and characterization. *Protein Expr. Purif.* **21**, 462-469.
- Walz, R., Amaral, O. B., Rockenbach, I. C., Roesler, R., Izquierdo, I., Cavalheiro, E. A., Martins, V. R., and Brentani, R. R. (1999) Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* **40**, 1679-1682.
- Wang, Y. L., Liu, W., Wada, E., Murata, M., Wada, K., and Kanazawa, I. (2005) Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci. Res.* **53**, 241-249.
- Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S., and Katamine, S. (2003) Cellular prion protein promotes Brucella infection into macrophages. *J. Exp. Med.* **198**, 5-17.
- Wegele, H., Haslbeck, M., Reinstein, J., and Buchner, J. (2003) Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 25970-25976.

Wegele, H., Wandinger, S. K., Schmid, A. B., Reinstein, J., and Buchner, J. (2006) Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90. *J. Mol. Biol.* **356**, 802-811.

Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J. M., and varez-Buylla, A. (1997) Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* **18**, 779-791.

Wichterle, H., Turnbull, D. H., Nery, S., Fishell, G., and varez-Buylla, A. (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* **128**, 3759-3771.

Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J. Y., and Rao, Y. (1999) Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* **400**, 331-336.

Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., and Hartl, F. U. (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 781-791.

Yozu, M., Tabata, H., and Nakajima, K. (2005) The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain. *J. Neurosci.* **25**, 7268-7277.

Zanata, S. M., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Hajj, G. N., Chiarini, L. B., Nomizo, R., Freitas, A. R., Cabral, A. L., Lee, K. S., Juliano, M. A., de, O. E., Jachieri, S. G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R. R., and Martins, V. R. (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* **21**, 3307-3316.

Zhang, Z., Quick, M. K., Kanelakis, K. C., Gijzen, M., and Krishna, P. (2003) Characterization of a plant homolog of hop, a cochaperone of hsp90. *Plant Physiol* **131**, 525-535.

Zhu, Y., Li, H., Zhou, L., Wu, J. Y., and Rao, Y. (1999) Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* **23**, 473-485.

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](#)