

CAROLINA COUTO ROSA DE SOUZA

Expressão imuno-histoquímica da Miosina Va no cerebelo humano
durante o desenvolvimento pós-natal

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo USP para a obtenção do título
de Mestre em Ciências.**

**Área de Concentração:
Neurociências**

**Orientador: Prof.Dr.
Antonio Roberto Martins**

**RIBEIRÃO PRETO - SP
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Carolina Couto Rosa de

Expressão imuno-histoquímica da Miosina Va no cerebelo humano durante o desenvolvimento pós-natal.
Ribeirão preto, 2010.

49p. 2:fig.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Neurociências.

Orientador: Martins, Antonio Roberto

1. Miosina Va. 2. Desenvolvimento cerebelar. 3. Humano

Folha de Aprovação

Carolina Couto Rosa de Souza

Expressão imuno-histoquímica da Miosina Va no cerebelo humano durante o desenvolvimento pós-natal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo USP para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Roberto Martins

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Assinatura _____

Prof. Dr. Roy Edward Larson

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

Assinatura: _____

Aos meus pais, Francisco e Rosana, que me trouxeram com todo o amor e carinho a este mundo, dedicaram, cuidaram e doaram incondicionalmente seu sangue e suor em forma de amor e trabalho por mim, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores.

Agradecimentos

Acima de tudo, agradeço a Deus pela dádiva da vida e por, em muitos momentos aflitivos, proporcionar-me a sua paz e a serenidade para enfrentar os obstáculos que me atravessavam e superar os desafios.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Roberto Martins pelas exigências e ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante os anos do curso.

Aos membros da banca examinadora, pela importante contribuição feita à finalização desta dissertação.

À Elisabete G. Sartori e Silvana Loturco, secretárias do departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento, pela competência no auxílio às questões burocráticas.

Às secretárias do departamento de Farmacologia Fátima Helena F. Petean e Sônia Maria S. de Andrade e ao secretário José Valdik Ramon, pela disposição em atender as minhas dificuldades.

À Vani Maria Alves, pelos serviços histotécnicos prestados, que permitiram a execução do projeto.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Alina, Ana Luiza, Diva, Elizabete Rosa, Fernando, Karina, Liliane, Renata, Roberta Costa, Roberta Maia, Sandy e Thaís, que me fizeram aprender com as discussões e conversas.

Aos colegas do laboratório do prof. Prado: Ariane, Carol, Gláucia, João, Josie, Karina, Marcelo, Marquinhos, Paulo, Quintino, Rafael pela agradável convivência durante esses anos.

Às companheiras de república Ananda, Anelisa e Bárbara, pela convivência e amizade durante estes anos.

Às amigas Patrícia, Priscila, Thaís e Vanessa, pela amizade, incentivo e torcida pelo meu sucesso.

À Tia Rosália, por me acolher em sua casa e pela amizade que construímos.

Ao Tio Celso, Tia Rosângela, Aninha e Thiago por todo carinho e por me acolherem nos momentos finais da conclusão deste trabalho.

Aos amigos Ana, Fernando, João, Liliane e Vani pelos ótimos momentos de desabafo e descontração.

Aos meus queridos irmãos e cunhados (as), Gabriela e Luizinho, Rafael e Ana Carolina, Arthur e Rayane, por todo amor.

Ao meu noivo Evandro, que sempre incentivou e apoiou minhas escolhas e por todo amor e compreensão.

À Maria Emília, à Fernanda e ao Alfeu (*in memoriam*), que são a minha “segunda família”, por sua contribuição nesta minha caminhada.

A toda minha família que contribuiu mesmo a distância, para a realização deste trabalho.

Se quisermos progredir, não devemos repetir a história, mas fazer uma história nova.

(Mahatma Gandhi)

Sumário

Resumo.....	10
Abstract.....	13
Introdução.....	16
1. Corticogênese Cerebelar.....	17
2. Migração Neuronal Durante a Corticogênese Cerebelar.....	18
3. Miosina Va.....	20
Objetivos.....	25
Materiais e Métodos.....	27
1. Tecido Humano.....	28
2. Processamento tissular para imuno-histoquímica.....	28
3. Coloração com hematoxilina e eosina (HE).....	28
4. Recuperação da antigenicidade.....	29
5. Imuno-histoquímica.....	29
6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, Sistema SDS-PAGE.....	30
7. Eletrotransferência.....	31
8. <i>Western blot</i>	31
9. Purificação do anticorpo anti-M-Va.....	32
Resultados.....	33
Discussão.....	37
Conclusões.....	41
Referências Bibliográficas.....	43

Lista de Abreviaturas

ARNm: ácido ribonucléico mensageiro

ATP: adenosina trifosfato

BCIP: 5-bromo-4chloro-3-indolylphosphate

CG: camada granular

CGE: camada germinativa externa

CM: camada molecular

CP: camada de células de Purkinje

DAB: diaminobenzidina

HE: hematoxilina e eosina

M-Va: Miosina Va

NBT: nitro blue tetrazolium

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

REL: retículo endoplasmático liso

SB: substância branca

SDS: dodecil sulfato de sódio

TBS: Tampão Tris-Salina

TEMED: N, N, N', N' tetrametilendiamina

Tris: Tris (hidroximetil)aminometano

ZP: zona proliferativa da CGE

ZPM: zona pré-migratória da CGE

Resumo

SOUZA, C. C. R. **Expressão imuno-histoquímica da Miosina Va no cerebelo humano no período pós-natal.** 2010. 49f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A Miosina V, integrante da classe de miosinas não-convencionais, é um motor molecular baseado em actina encontrada em células eucarióticas. Esta proteína está envolvida em processos importantes para a manutenção das células, como por exemplo: extensão dos cones de crescimento, transporte axonal, citocinese, contração muscular, transporte de organelas no citoplasma e fagocitose. Utilizando anticorpo policlonal monoespecífico purificado por afinidade, foi possível investigar a localização celular dessa proteína em cerebelo humano durante o período pós-natal, do dia do nascimento até o envelhecimento. Os tecidos obtidos de autópsias foram fixados em formalina tratados para inclusão em parafina, cortados com 5µm de espessura e incubadas com o anticorpo primário de coelho anti-M-Va. A detecção do anticorpo primário foi feita através de incubação com o anticorpo secundário de porco anti-coelho biotilado seguido por tratamento com Kit Elite ABC. A reação da peroxidase foi revelada utilizando-se como substrato água oxigenada e DAB. A expressão da M-Va foi detectada nas CM, CP e CG no cerebelo de crianças, adulto e idoso. Nos cerebelos adulto e idoso, a CM apresentou uma marcação com aspecto radiado. Além disso, foi observada na CM marcação de interneurônios (células em cesto e estreladas). Uma expressão forte da M-Va foi observada em regiões perinuclear e subcortical do citoplasma das células de Purkinje em todas as idades estudadas. Foi observado também, nestas mesmas células, estruturas semelhantes à vesículas no citoplasma. Não detectamos marcação no núcleo das células de Purkinje. A expressão da M-Va nos dendritos das células de Purkinje foi conspícua, tanto em estruturas vesiculares como em microtúbulos dos dendritos e/ou fibras trepadeiras. O citoplasma das células granulares foi intensamente marcado em todas as idades. O anticorpo anti-M-Va marcou fibras na substância cinzenta, neurônios, fibras e varicosidades no núcleo denteado cerebelar. Alguns neurônios apresentaram marcação de nucléolo. Os citoplasmas de neurônios pequenos apresentaram marcação mais intensa do que os neurônios maiores, que exibiram uma marcação do tipo puntata e perinuclear. A M-Va exibiu uma expressão diferencial durante o primeiro ano pós-natal. A CGE está bem desenvolvida no início do primeiro ano pós-natal, porém sua marcação não foi observada no cerebelo de 12 meses pós-natal. As células granulares prospectivas na ZP da CGE apresentaram intensidade de marcação fraca ou imperceptível comparado com aquelas da ZPM, onde

a marcação da M-Va foi bem definida. A M-Va foi fortemente e diferencialmente expressada pela CM, cuja porção pial, mais externa, apresentou marcação mais intensa do que a porção interna. As fibras gliais de Bergman também foram marcadas. Observamos células granulares com perfil migratório marcadas com anti-M-Va. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que a expressão da M-Va é aparentemente constitutiva e desenvolvimento-dependente e sua localização pode sugerir sua participação no transporte de vesículas, organelas e membranas celulares, bem como na função e/ou morfologia sináptica e na migração neuronal.

Palavras-chave: Miosina Va. Desenvolvimento cerebelar. Humano.

Abstract

SOUZA, C. C. R. **Immunohistochemical expression of Myosin Va in the human cerebellum at postnatal period.** 2010. 49f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Myosin Va is an integrant of non-conventional myosin class and an actin-based molecular motor founded in eukaryotic cells. This protein is involved in important processes for cellular maintenance like cone guidance growth, axonal transport, cytokinesis, muscular contraction, organelles trafficking in the cytoplasm and phagocytosis. Using a monospecific polyclonal antibody purified by affinity, it was possible to investigate the cellular localization of this protein during the postnatal, adult and elderly human cerebellum development. The tissues obtained from autopsies were fixed in formalin, treated for inclusion in paraffin, cutted at 5µm of thickness and incubated with a rabbit primary antibody anti-MVa. The detection of the primary antibody was carried out through incubation with biotinilated porcine secondary antibody anti-rabbit followed by treatment with ABC Elite Kit. Peroxidase reaction was revealed using hydrogen peroxide as substrate and DAB. Myosin Va expression was detected in ML, PL and GL of children, adults and elderly cerebellum. At adult and elderly cerebellum the ML presented labeling with radial aspect. Besides, it was observed labeling of neurons (basket and star cells) in ML. A strong expression of MVa was observed at perinuclear and subcortical regions of cytoplasm of Purkinje cells in all of the ages studied. It was observed, in these cells, structures similar to vesicles in the cytoplasm. We do not detect labeling in Purkinje cells nucleus. MVa expression in Purkinje cells dendrites was conspicuous as in vesicular structures as in dendrites microtubules and/or climbing fibers. The cytoplasm of granular cells was intensely labeled in all ages. Anti-MVa antibody labeled fibers in grey substance, neurons, fibers and varicosities at the cerebellum dentatus nucleus. Some neurons presented nucleolus labeling. Small neuronal cytoplasm presented stronger labeling than bigger neurons, which exhibited punctata and perinuclear labeling. MVa exhibited a differential expression during the first postnatal year. The EGL is well developed at the beginning of the first postnatal year, but its labeling was not observed in the 12-month postnatal cerebellum. Prospective granular cells in PZ of EGL presented weak or imperceptible labeling compared to those of PMZ, where the labeling was not well defined. MVa was strongly and differentially expressed by ML, whose more external pial portion presented more intense labeling than the inner portion. Bergman's glial fibers were labeled too. We observed granular cells with migratory profiles labeled with anti-MVa.

Taken together, these results suggest that the expression of M-Va is apparently constitutive and development-dependent and its location may suggest their involvement in vesicles, organelles and membranes trafficking, as well in the synaptic function and/or morphology and neuronal migration.

Key words: Myosin Va, Human cerebellum development

Introdução

Introdução

1. Corticogênese Cerebelar

O córtex cerebelar, por ser um sistema que combina os três padrões clássicos de desenvolvimento neural em uma única região do encéfalo: movimentos morfogenéticos, formação de estruturas ganglionares e formação de camadas corticais, é uma das regiões mais bem estudadas do sistema nervoso (HATTEN E HEINTZ, 1995).

A superfície cerebelar humana apresenta um grande crescimento entre a 13^a semana gestacional e o 4^o mês pós-natal e adquire neste período a maioria de suas características maduras (RAKIC E SIDMAN, 1970).

Durante as 10 primeiras semanas gestacionais o córtex cerebelar humano, assim como o dos primatas, é formado por uma estrutura chamada neuroepitélio constituída por duas camadas celulares: a camada marginal e a camada intermediária.

Entre 10 e 20 semanas gestacionais, o córtex é composto por três camadas celulares. No período de 10 a 11 semanas gestacionais surge a camada germinativa externa (CGE), localizada acima da zona marginal (RAKIC E SIDMAN, 1970). As células granulares que compõem a CGE surgem a partir da proliferação de células no trígono germinativo e migram tangencialmente através da superfície cerebelar. Depois de estabelecida a camada germinativa externa, podemos observar duas regiões distintas: a zona proliferativa (ZP), próxima a pia, onde ocorre a proliferação das células granulares e a zona pré-migratória (ZPM), localizada entre a ZP da CGE e a camada molecular (CM). Neste período é possível visualizar na ZPM células bipolares orientadas paralelamente à superfície cerebelar (RAKIC E SIDMAN, 1970). Após a 13^o semana gestacional, há significativa proliferação das células do neuroepitélio ventricular, de onde surgem as células de Purkinje, astrócitos, células gliais e células ganglionares do núcleo denteado (ZECEVIC E RAKIC, 1976).

No período seguinte, de 20 a 30 semanas gestacionais, o córtex apresenta-se dividido em cinco camadas: a CGE, a CM, a camada de células de Purkinje (CP) a *lamina dissecans* (LD), presente no cerebelo humano e de outros primatas, e a camada granular (CG). A *lamina dissecans*, localizada entre as camadas granular e de células de Purkinje, é uma camada acelular e não é visualizada em todo o *folium*, mas principalmente na profundidade da *fissura prima*. Neste período já houve uma migração massiva de células da CGE em direção ao interior do cerebelo, iniciando assim a formação da CG.

O período seguinte vai de 30 a 32 semanas gestacionais até o primeiro ano pós-natal e o córtex está dividido em quatro camadas celulares: a CGE, que fica cada vez mais estreita à medida que as células granulares migram para a CG; a CM, que aumenta em espessura durante a corticogênese; a CP disposta em monocamada e a CG. A *lamina dissecans* desapareceu neste período.

No segundo ano pós-natal o córtex cerebelar já tem a citoarquitetura do cerebelo adulto, composto por três camadas celulares: camada molecular, camada de células de Purkinje e camada granular (RAKIC E SIDMAN, 1970).

2. Migração Neuronal Durante a Corticogênese Cerebelar

As células nervosas imaturas possuem uma capacidade extraordinária para se moverem antes de assumirem sua posição final e estabelecerem sinapses permanentes. A maioria dos neurônios durante o desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados é gerada em locais diferentes daqueles em que eles residirão no encéfalo adulto. Em muitas estruturas laminares do encéfalo de mamíferos, tais como o córtex cerebral e o cerebelar, neurônios gerados mais tardiamente passam por aqueles gerados primeiro. Portanto, a migração de células neuronais pode ser considerada uma “necessidade biológica” que torna possível a comunicação entre neurônios formados em tempos distintos do desenvolvimento, antes deles estabelecerem suas conexões sinápticas (RAKIC, 1990).

O cerebelo é um sistema apropriado para o estudo da migração neuronal, pois apresenta um grande número de neurônios granulares migratórios, apenas cinco tipos neuronais (células de Purkinje, células granulares, células de Golgi, células estreladas e células em cesto) e devido à sua citoarquitetura estereotipada e repetitiva ao longo do córtex. Enquanto no hipocampo e no córtex cerebral a migração ocorre essencialmente no período embrionário, no cerebelo ela continua no período pós-natal, o que facilita seu estudo.

A migração de células granulares cerebelares representa um evento celular fundamental e essencial ao desenvolvimento do córtex cerebelar humano. O fenômeno da migração da célula granular cerebelar através da camada molecular, de forma ordenada e sequencial, foi observado primeiramente por Ramón y Cajal, em 1891, utilizando microscopia de luz. Os neurônios granulares do cerebelo sofrem vários tipos de migração à medida que se desenvolvem de progenitores mitóticos a neurônios maduros (RAKIC, 1971; 1990). A formação da CGE, situada logo abaixo da pia-máter,

ocorre pela migração das progenitoras das células granulares localizadas no lábio rômboico, tangencialmente à superfície pial cerebelar entre 10 e 13 semanas gestacionais. A CGE pode ser dividida em duas zonas distintas: a zona proliferativa (ZP) e a zona pré-migratória (ZPM). Na ZP no plano sagital, as células são arredondadas. Na ZPM em plano coronal, elas tornam-se bipolares, com processos horizontais paralelos à superfície pial. Antes de iniciarem a migração radial, coincidente com a extensão dos processos horizontais, as células granulares migram tangencialmente (RYDER E CEPKO, 1994) na direção dos processos mais longos (KOMURO e cols., 2001), de maneira glia-independente.

No próximo estágio, um processo descendente (chamado processo líder) e orientado verticalmente é lançado ao longo das fibras gliais de Bergmann e as células assumem uma forma de “T”. O corpo celular destas células também toma uma forma bipolar e os processos horizontalmente orientados transformam-se nas fibras paralelas, os axônios das células granulares. As fibras gliais de Bergman, com as quais os processos líder das células granulares estabelecem contato, têm seus corpos celulares localizados próximos às células de Purkinje e enviam seus processos em forma de candelabro até a superfície pial, onde são fixados seus pés terminais. A célula granular migra da CGE passando pela CM e pela CP até atingir seu destino na CG. À medida que começam a se movimentarem através da camada molecular as células granulares migratórias deixam um axônio vertical chamado processo *trailing* (RAKIC, 1971).

Muitas células granulares em sucessão seguem a mesma fibra glial de Bergmann; as fibras paralelas mais profundas são derivadas das primeiras células que migraram e aquelas próximas à superfície pial, das últimas (SIDMAN E RAKIC, 1973).

O movimento das células granulares na migração radial é caracterizado por alternância de fases estacionárias curtas com movimentos para frente (em direção à CG) ou em direção à superfície pial, porém, com menor intensidade e frequência de saltos (KOMURO E RAKIC, 1995). Na aposição neurônio-glia de células em movimento, foi descoberta uma junção especializada chamada densidade intersticial que não ocorre nas células estacionárias apostas às fibras gliais de Bergmann. A função deste elemento na migração pode estar relacionada à comunicação, motilidade e/ou adesão (GREGORY e cols., 1988). Komuro e Rakic em 1996 sugerem que flutuações nos níveis intracelulares de cálcio são necessárias para ocorrência da migração. Durante a migração, as células granulares alteram sua forma, velocidade e modo de movimento de acordo com as mudanças de terreno que enfrentam. A expressão gênica alternativa durante sua

translocação da CGE para a CG modularia estas alterações de forma e movimento (KOMURO E RAKIC, 1998; HATTEN, 2002).

O processo de migração neuronal é altamente sensível a vários agentes físicos, químicos e biológicos, bem como a mutações gênicas. Como resultado, a migração neuronal defeituosa pode ser considerada a maior causa de malformações cerebelares grosseiras ou sutis.

Apesar de vários aspectos da migração neuronal já terem sido elucidados (para revisão: HATTEN, M. E, 1999; COOPER, J.A., 2008, SCHAEFER, A.; POLUCH, S.; JULIANO, S., 2008, SAGHATELYAN, A, 2009, VALIENTE, M. E MARIN, O, 2010), a maquinaria molecular que transloca o núcleo celular durante a migração radial e depois na migração não-radial ainda não foi esclarecido (RAKIC, P.; KNYIHARCSILLIKt, E.; E CSILLIKt, B.,1996; KOMURO E RAKIC, 1998). Para que ocorra esse deslocamento do núcleo é necessária uma força mecânica considerável que inclui um rearranjo da estrutura citoesquelética, já que o corpo celular é impulsionado através da camada molecular em desenvolvimento, ou seja, uma região densa em fibras paralelas, e depois translocado através da camada granular até o seu posicionamento definitivo.

Análises, utilizando microscopia eletrônica, revelaram feixes paralelos de microtúbulos tanto no processo líder, quanto no processo *trailing* (RAKIC, 1971). O grande número de microtúbulos presentes e de organelas que se deslocam para o processo líder durante a migração radial sugere sua participação na migração neuronal (RIVAS E HATTEN, 1995). Contudo, o conjunto de proteínas (motores moleculares) que participam no processo de geração de força durante a migração neuronal não é bem conhecido (RAKIC, P.; CAMERON, R.S. E KOMURO, H., 1994; FISHELL E HATTEN, 1991; RIVAS E HATTEN, 1995).

3. Miosina Va (M-Va)

No interior de todas as células eucarióticas existem proteínas que são responsáveis pela geração de força e de movimentos necessários para realizar uma variedade de tarefas subcelulares essenciais para sustentar a vida. Os motores que se movem ao longo de filamentos de actina constituem uma superfamília de diversas proteínas, coletivamente referidas como miosinas (BERG, J.S.; POWELL, B.C.; E CHENEY R.E., 2001).

Miosinas são mecanoenzimas que interagem com filamentos de actina e convertem a energia da hidrólise do ATP em força mecânica, participando, assim, de

mecanismos da motilidade celular, como por exemplo: extensão dos cones de crescimento, transporte axonal, citocinese, contração muscular, transporte de organelas no citoplasma e fagocitose (BERG, J.S.; POWELL, B.C.; E CHENEY R.E., 2001).

Vários estudos têm destacado o papel fundamental da Miosina V na distribuição intracelular de vários compartimentos vesiculares. Além disso, outros tipos de carga, como ácido ribonucléico mensageiro (ARNm) e retículo endoplasmático liso (REL) parecem serem transportados pela miosina V (RECK-PETERSON e cols., 2000). Nos últimos anos o que se discute é que o transporte à longa distância de organelas é impulsionado por motores baseados em microtúbulos (HIROKAWA 1998, 2006), enquanto que o transporte de curta distância depende de filamentos de actina e miosinas não-convencionais (DESNOS, C.; HUET, S. E DARCHEN, F, 2007).

A superfamília miosina abrange muitas classes que desempenham diversas atividades celulares. Estas classes foram determinadas com base em análises e comparações filogenéticas do domínio motor conservado (FOTH, B.J.; GOEDECKE, M.C.; SOLDATI, D., 2006).

Dentre as classes de miosinas, a convencional (com duas cabeças e formadoras de filamentos) é a miosina II, as outras são constituídas por miosinas não-convencionais (ESPREAFO e cols., 1992; CHENEY E MOOSEKER, 1992; CHENEY e cols., 1993 a,b; MOOSEKER E CHENEY, 1995).

Todas as cadeias pesadas de miosinas conhecidas consistem em um domínio cabeça ou motor N-terminal, um domínio pescoço ou regulatório que é o sítio ligante de cadeias leves e o domínio cauda, específico por classe (figura 1).

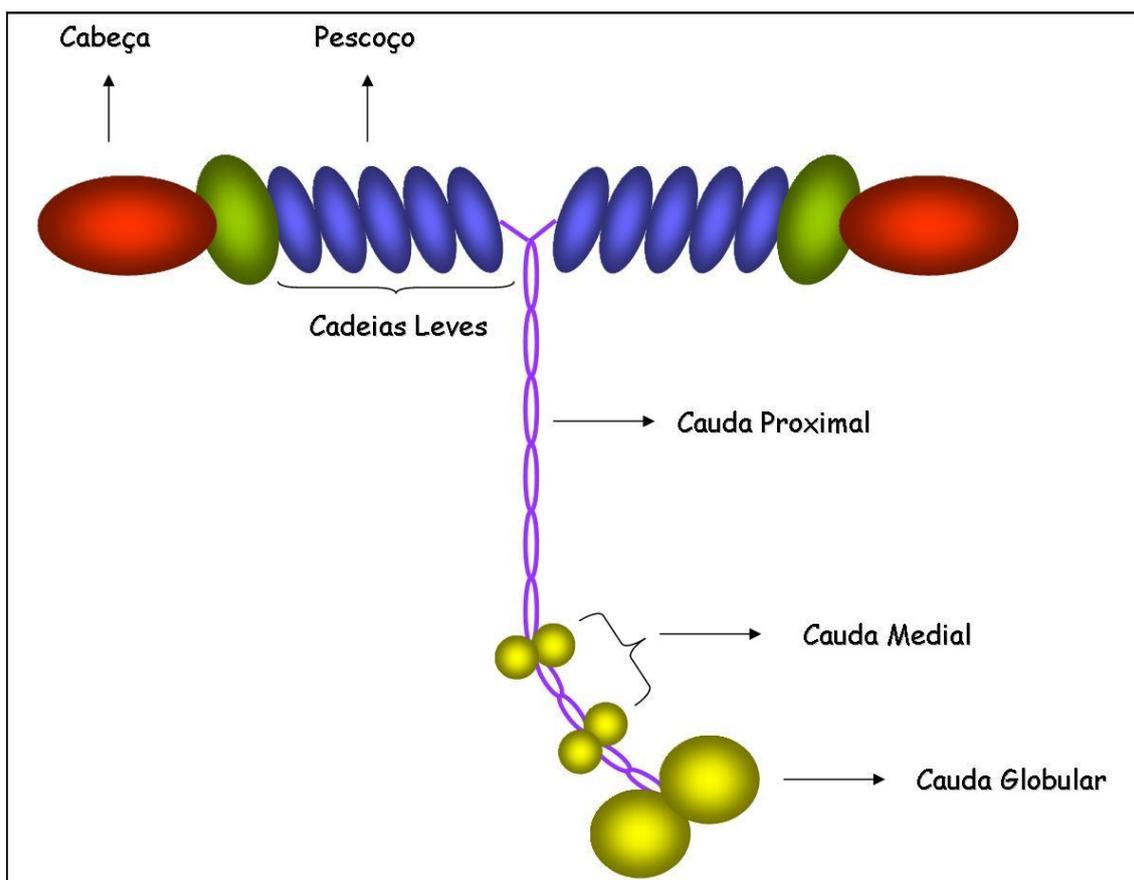


Figura 1. Diagrama esquemático da estrutura da M-Va. Em vermelho está representado o domínio cabeça seguido pelo domínio pescoço representado pela cor verde e azul. Em seguida, a cauda, que está dividida em caudas proximal (região coiled coil, representada por duas linhas na cor rocha, entrelaçadas), medial e globular na cor amarela (LARSON, 1996).

As diferentes classes de miosinas apresentam grande homologia no domínio cabeça, e diferem nos domínios pescoço e cauda (MOOSEKER E CHENEY, 1995). A região da cabeça contém sítios ligantes de ATP, que fornece energia para a locomoção. O domínio pescoço é formado por uma ou mais cópias de uma sequência consenso, conhecida como motivo IQ, que apresenta a seguinte sequência de aminoácidos: IQxxxRGxxxRxxY, o que consiste em sítios potencialmente ligantes de calmodulina ou cadeias leves relacionadas. Este domínio atua como um braço de alavanca, amplificando pequenos movimentos realizados pelo domínio cabeça (ESPREAFIGO, E.M. e cols. 1992). O domínio cauda apresenta uma grande variação de estrutura e função dentre as classes de miosinas e mesmo dentro de uma dada classe específica, como a miosina-I. Esse domínio cauda fornece o ponto de ancoramento que mantém a posição da cadeia pesada e determina a especificidade funcional do domínio motor. (MOOSEKER E CHENEY, 1995, FOTH, B.J.; GOEDECKE, M.C.; SOLDATI, D., 2006). Na Miosina

V este domínio constitui-se em duas regiões: a α -hélice dupla (*coiled coil* ou espiral espiralizada) e a região globular que interage com a carga.

Como as classes de Miosinas I e II, as miosinas da classe V são amplamente expressas, com membros caracterizados em vertebrados e levedura.

A Miosina V de vertebrado foi descrita primeiramente como uma proteína ligante de calmodulina purificada de cérebro de mamífero com atividade de ATPase (LARSON, R.E.; PITTA, D.E.; FERRO, J.A., 1988, LARSON, R.E.; ESPINDOLA, F.S.; ESPREAFICO, E.M 1990; ESPINDOLA e cols., 1992). Posteriormente foi classificada como uma miosina nova, com sequência semelhante à de duas miosinas não-convencionais descobertas em levedura, *S. cerevisiae*, e em camundongos, respectivamente (ESPREAFICO e cols., 1992).

Apesar da miosina V ser expressa na maioria dos tecidos de vertebrados, ela é mais abundante no tecido nervoso e nas células neurosecretoras (ESPINDOLA e cols., 1992). Esta proteína também foi detectada em células epiteliais intestinais (HEINTZELMAN, M.B.; HASSON, T.; MOOSEKER, M.S. 1994).

Em vertebrados a classe de Miosina V inclui três formas moleculares Va, Vb, e Vc (BERG, J.S.; POWELL, B.C.; E CHENEY R.E., 2001), todas elas expressas diferencialmente em cérebro, pulmão, rim, estômago, pâncreas, jejuno e cólon (RODRIGUEZ E CHENEY 2002). Em neurônios e células gliais é observada vasta marcação puntiforme (granular) em regiões do cone de crescimento ricas em organelas e em região perinuclear (ESPREAFICO e cols., 1992; EVANS, L.L.; HAMMER, J.; BRIDGMAN, P.C. 1997; SUTER e cols., 2000).

A M-Va é amplamente distribuída em muitas regiões do encéfalo de camundongos (MERCER e cols., 1991), embora uma marcação intensa fosse relatada em tipos celulares específicos, como as células de Purkinje do cerebelo (ESPÍNDOLA e cols., 1992; ESPREAFICO e cols., 1992, TILELLI e cols., 2003), a camada plexiforme da retina (SCHLAMP E WILLIAMS, 1996) e neurônios do glânglio mientérico (DRENGK e cols., 2000). Em comundongos *dilute* (STROBEL e cols., 1990; MERCER e cols., 1991) e em ratos *dilute-opisthotonus* (DEKKER-OHNO, K.; ODA, S.; YAMAMURA, H.; KONDO, K. 1993; FUTAKI e cols., 2000), nos quais a expressão da M-Va é deficiente, não só a cor do pêlo destes animais é afetada, mas filhotes homozigóticos manifestam graves defeitos neurológicos (convulsões e alterações no equilíbrio e na postura) e morrem dentro de cerca de três semanas após o nascimento (FUTAKI e cols., 2000). A cor diluída dos pêlos destes animais é devido ao transporte

defeituoso de grânulos de melanossomas no interior dos melanócitos (RECK-PETERSON e cols., 2000; WU, X.; JUNG, G. E HAMMER III, J. A. 2000, ESPREAFICO e cols., 1998). Porém, as bases celulares das alterações neurológicas, ainda não foram totalmente esclarecidas. Características semelhantes são observadas em humanos com a síndrome de Griscelli Tipo I (GRISCELLI, C.; PRUNIERAS, M.1978), uma doença recessiva, caracterizada por albinismo parcial e graves distúrbios neurológicos (hipotonia, retardo mental, epilepsia e ataxia).

A identificação dos motores moleculares envolvidos nos processos do desenvolvimento cerebelar, em especial a M-Va, ajudaria no entendimento do desenvolvimento cortical normal assim como a compreensão da patogênese de desordens que ocorrem durante o desenvolvimento.

No presente estudo, nós usamos um anticorpo purificado por afinidade contra M-Va de cérebro de pintainho, para delinear sua expressão no cerebelo humano no período pós-natal.

Objetivos

Objetivos

O uso do cerebelo como modelo de desenvolvimento neural permite a correlação entre eventos morfológicos e moleculares. Desse modo, propomos:

1. Estudar a expressão imuno-histoquímica da M-Va no cerebelo humano durante o período pós-natal.

Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

1. Tecido Humano

Foram utilizados tecidos cerebelar humano obtidos de autópsias realizadas no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Os tecidos são provenientes de pacientes sem história de doença neurológica ou psiquiátrica, e sem evidência de patologia neurológica detectável pelo exame macroscópico e microscópico do Sistema Nervoso. O exame neuropatológico foi realizado pelos Profs. Leila M.C. Chimelli e Luciano N. Serafini. O uso do material foi aprovado pela Comissão de Ética do HC FMRP-USP. Usamos 29 casos entre recém nascido a termo e 98 anos de idade. A idade, a *causa mortis*, o intervalo entre o óbito e a fixação foram determinados pela história clínica e autópsia.

2. Processamento tissular para imuno-histoquímica

Os tecidos cerebelares humanos foram fixados em formalina 10% (v/v). O tecido fixado foi desidratado em etanol, diafanizado em xileno e embocado em parafina. Os blocos de tecidos foram cortados em micrótomo modelo RM 2065 (Leica) com 5 µm de espessura. As secções foram dispostas em lâminas revestidas com gelatina e cromalumen.

3. Coloração com hematoxilina e eosina (HE)

Secções cerebelares parafinizadas de todas as idades foram colocadas em lâminas revestidas com silano e coradas por HE para avaliação da preservação tecidual e padronização da região do vermis ou hemisfério a ser utilizada. Após a coloração, as secções (5µm) foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e montadas sob lamínula com Permount (Fisher).

4. Recuperação da antigenicidade

A recuperação antigênica foi estabelecida a partir de modificação do método descrito por Martins e cols., (1999) e Zanardo e cols., (1997).

As lâminas com secções de tecido desparafinizadas foram colocadas em suportes plásticos para lâminas e em seguida em 800ml de tampão Citrato de Sódio 10mM, pH 6,0 em Béker de vidro, e tratadas durante 20 minutos (dois tiros de 10 minutos com um intervalo de um minuto entre eles), com potência nominal 900watt em aparelho de microondas NN-S66B (Panasonic). Antes de dar continuidade a técnica de imuno-histoquímica, houve uma pausa para que o tampão contido no Becker voltasse à temperatura ambiente.

5. Imuno-histoquímica

Primeiramente as secções (5 μ m) foram desparafinizadas e hidratadas. A seguir realizamos a recuperação antigênica conforme o procedimento anteriormente descrito. Após resfriamento, as secções foram incubadas com solução de H₂O₂ 3% (v/v) em tampão PBS [tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7, 4, contendo NaCl 0,9% (p/v)] para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Em seguida as secções foram incubadas com tampão Tris-Glicina 0,1M, pH 7, 4, por 30 minutos e depois com tampão de bloqueio [tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7, 4, contendo: NaCl 0,45 M, Triton X-100 0,3%(v/v), leite em pó desnatado (Molico) 2,5% (p/v) e soro de jumento não-imune 15% (v/v)] durante 4 horas, para bloqueio dos grupamentos aldeído livres e para minimizar a interação do anticorpo primário com sítios de ligação inespecífica no tecido, respectivamente.

Para a reação imuno-histoquímica foi utilizado o anticorpo primário coelho anti-M-Va diluído em tampão de bloqueio a 1:25(v/v). Nas secções utilizadas como controles do experimento, houve omissão do anticorpo primário que foi substituído por tampão de bloqueio. Para cada secção testada durante o experimento foi obtido um controle. A incubação ocorreu por aproximadamente 16 horas e em seguida as secções foram lavadas com tampão B [tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4 contendo: NaCl 0,45 M e Triton X-100 0,3% (v/v)].O anticorpo secundário empregado para detecção do

anticorpo primário foi IgG de porco anti-coelho biotilado (Dako0353) diluído a 1:200 em tampão de bloqueio. A seguir, as secções foram incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit Elite ABC, Vector). A detecção foi baseada na reação da peroxidase, utilizando-se H_2O_2 e 3,3 – diaminobenzidina (DAB). A reação foi interrompida com H_2O destilada.

As secções foram então desidratadas com etanol (Merck), diafanizadas em xilol (Merck) e montadas sob lamínula com Permount (Fisher).

Todos os procedimentos foram realizados a temperatura ambiente, exceto o da recuperação antigênica.

A análise das secções foi feita em microscópio óptico Jenamed 2 (Carl Zeiss) e lupa SZH10 (Olympus) e as microfotografias em microscópio óptico BX60(Olympus).

6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, Sistema SDS-PAGE

As amostras de cerebelo obtidas para SDS-PAGE e *Western blot* foram aplicadas em gel de poliacrilamida com gel de empilhamento a 5 % e gel de separação a 8%, segundo o método descrito por Laemmli e Favre (1973). O gel de empilhamento consiste em tampão Tris-HCl 0,126 M, pH 6,8 contendo N, N, N', N' tetrametilenodiamina (TEMED) 0,125% (v/v), persulfato de amônio 0,063%(p/v), SDS 0,1% e acrilamida-bisacrilamida 5% (p/v). O gel de separação é composto de tampão Tris-HCl 0,378 M, pH 8,8 contendo TEMED (N, N, N', N' tetrametilenodiamina) 0,125%(v/v), persulfato de amônio 0,063%(p/v), SDS 0,1% e acrilamida-bisacrilamida 8%(p/v).

Foram aplicados 40,8µg de proteína do homogeneizado total de cerebelo de rato em cada poço do gel de empilhamento. O padrão de peso molecular (6H, Sigma) foi fervido durante 50 segundos, aplicado nos poços laterais do gel e continha as proteínas: miosina de músculo de coelho (205 kDa), β-galactosidase de *Escherichia coli* (116 kDa), fosforilase B de músculo de coelho(97,4 kDa), albumina de soro bovino(66kDa), ovoalbumina(45 kDa), anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa).

O gel foi colocado numa cuba para eletroforese preenchida com tampão Tris 25mM e Glicina 190mM, contendo SDS 0,1%. A eletroforese foi conduzida a 10mA durante a corrida na região de empilhamento do gel e a 15mA durante a corrida na região de separação, durante aproximadamente 1 hora.

7. Eletrotransferência

Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C Extra, Amersham), de acordo com o procedimento estabelecido por Towbin e cols., (1970). O gel foi colocado em contato com a membrana num conjunto formado sucessivamente por: placa acrílica, esponja, papel de filtro, gel, membrana de nitrocelulose, papel de filtro, esponja e placa acrílica. A transferência foi conduzida sob voltagem constante de 30 V durante 2 horas, numa cuba para transferência, em tampão Tris 25mM e Glicina 190mM, contendo SDS 0,1%(p/v) e etanol 18,75%(v/v).

A seguir, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau S (USB) 5% (p/v), diluído em ácido tricloroacético (Merck) 3% (p/v) durante 30 minutos e lavada com uma solução descorante, ácido tricloroacético 3% (p/v), para visualização e marcação das bandas referentes aos padrões de peso molecular utilizados.

8. *Western blot*

Após secagem, a membrana de nitrocelulose foi lavada com tampão de lavagem [tampão Tris HCl 50mM, pH 7,5, contendo NaCl 150mM e Triton X-100 0,1% (v/v)] e submetida ao bloqueio de sítios de ligação inespecífica com tampão de bloqueio [tampão B contendo leite em pó desnatado(Molico) 2,5%(p/v)] e soro de jumento não-imune 5% (v/v) durante 2 horas. Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo primário coelho anti-M-Va (Transduction Laboratories) diluído 1:200(v/v) em tampão de bloqueio durante 3 horas. O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário, que foi substituído por tampão de bloqueio. Após lavagens com tampão de lavagem a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina (Promega) diluído 1:2000(v/v) em tampão de bloqueio durante 1 hora. Ao término da incubação a membrana foi lavada com tampão de lavagem e tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5, contendo NaCl 0,1 M e MgCl₂ 1g/L. A revelação foi feita pela reação da fosfatase alcalina, usando nitro blue tetrazolium (NBT) e 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) (Promega). A reação foi interrompida com água destilada.

O imunoblot foi fotografado e analisado utilizando o programa GelPro-Analyzer v.3.1 (Media Cybernetics).

9. Purificação do anticorpo anti-M-Va

O anticorpo Anti-M-Va foi feito em coelhos contra uma proteína de fusão contendo resíduos de aminoácidos do domínio cabeça da miosina Va de galinha, que havia sido expressa na cepa BB4 de *E. coli* (ESPREADICO e cols., 1992). A proteína de fusão foi purificada por eletroeluição de SDS-PAGE. O anticorpo Anti-BM-Va foi purificado por afinidade utilizando purificado de Miosina Va de galinha eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C extra da Amersham) (TOWBIN e cols., 1979). As membranas foram lavadas com TBS, e o anticorpo foi então eluído com trietilamina 100 mM, pH 12,2. O pH do eluído foi ajustado para 8 com 1,0 M Tris-HCl, pH 8,0. O eluato foi dialisado contra TBS, e concentrado em 1 ml, de 4 °C. A concentração final do anticorpo Anti-M-Va purificado por afinidade foi de 0,5 mg / ml.

Resultados

Resultados

O grupo de 29 pacientes estudado neste trabalho compreendem 7 adultos de 19-53 anos de idade, 6 idosos de 63-98 anos de idade, e 16 crianças de recém nascido a termo - 9 anos de idade.

As secções de tecido utilizadas como controles, nas quais houve omissão do anticorpo primário, não mostraram imunorreatividade (Fig. 1, H). O anticorpo Anti-M-Va foi monoespecífico, conforme determinado pela análise do imunoblot (Fig. 1, G).

A expressão da M-Va foi detectada nas CM, CP e CG no cerebelo de crianças com mais de ano, adulto e idoso (Fig. 1, A, M). Nos cerebelos adultos de 19-53 anos e nos cerebelos idosos de 63-98 anos de idade, a CM apresentou uma marcação com aspecto radiado (Fig. 1, B, M). Além disso, foi observada marcação de interneurônios (células em cesto e estreladas) na CM (Fig. 1 C, M, N). Uma expressão forte da M-Va foi observada em regiões perinuclear e subcortical do citoplasma das células de Purkinje em todas as idades estudadas (Fig. 1, A, D, M, O) Foi observado também, nestas mesmas células, estruturas semelhantes à vesículas no citoplasma [Fig. 1,D, O (em destaque)]. Não detectamos marcação no núcleo das células de Purkinje. A expressão da M-Va nos dendritos das células de Purkinje foi conspícua, tanto em estruturas vesiculares como em microtúbulos dos dendritos e/ou fibras trepadeiras (Fig. 1N). O citoplasma das células granulares foi intensamente marcado em todas as idades (Fig. 1, E). O anticorpo anti-M-Va marcou fibras na substância cinzenta (Fig. 1, F) neurônios (Fig. 1I, J), fibras e varicosidades (Fig. 1K, L,) no núcleo denteado cerebelar com marcação de nucléolo em alguns neurônios [Fig. 1, J (em destaque)]. Os citoplasmas de neurônios pequenos apresentaram marcação mais intensa do que os neurônios maiores, que exibiram uma marcação do tipo puntata e perinuclear (Fig. 1, J, K, L).

A M-Va exibiu uma expressão diferencial durante o primeiro ano pós-natal. (Fig. 1, O, P). A CGE está bem desenvolvida no início do primeiro ano pós-natal, porém sua marcação não foi observada no cerebelo de 12 meses pós-natal. As células granulares prospectivas na ZP da CGE apresentaram intensidade de marcação fraca ou imperceptível comparado com aquelas da ZPM, onde a marcação do foi bem definida (Fig. 1, P, Q). A M-Va foi fortemente e diferencialmente expressada pela CM, cuja porção pial, mais externa, apresentou marcação mais intensa do que a porção interna (Fig. 1O). Esta expressão diferencial parece ser devido à intensa marcação de fileiras de células migratórias apostas às fibras gliais de Bergmann (setas Fig. P). As fibras gliais

de Bergman também foram marcadas (cabeças de setas Fig.1, P). Observamos células granulares com perfil migratório marcadas com anti-M-Va [Fig. 1, Q (seta e em destaque)]. O perfil migratório é caracterizado pela forma alongada da célula, pelo posicionamento do núcleo na porção posterior do corpo celular, pela presença de processos líder e trailing e pela proximidade da célula à fibra glial de Bergmann.

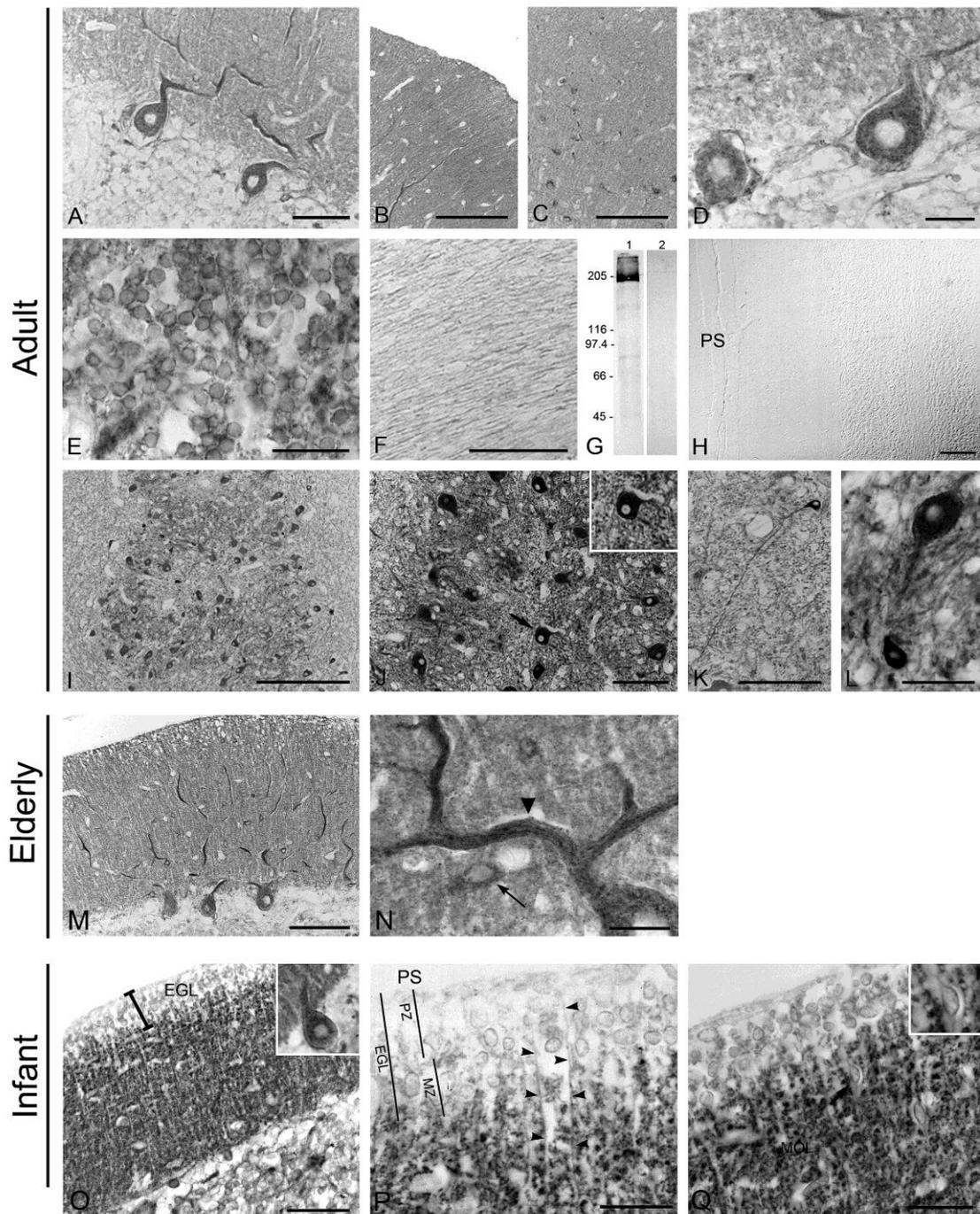


Figura 1. Expressão imuno-histoquímica da M-Va no cerebelo humano. A, CM, CP, CG do cerebelo adulto. B, CM com aspecto radiado. C, interneurônios na CM. D, intensa marcação nas regiões perinuclear e subcortical das células de Purkinje. E, CG do cerebelo adulto. F, fibras na substância branca. G, *Western blot*, H branco. I, visão geral do núcleo denteado. J, neurônios, alguns com marcação de nucléolo (em destaque), fibras e varicosidades do núcleo denteado. K, neurônio do núcleo denteado com processo longo. L, neurônio com marcação de dendrito e axônio. M, CM, CP, CG do cerebelo idoso. N (cabeça de seta) estruturas vesiculares, microtúbulos dos dendritos e/ou fibras trepadeiras da CP e interneurônio na CM (seta). O, presença de quatro camadas cerebelares e célula de Purkinje com marcação de varicosidades em região perinuclear (em destaque). P, fibras gliais de Bergmann (cabeças de setas). Q (seta e em destaque), célula com perfil migratório. Barras: A, L, O, 50µm; B, C, F, H, J, K, M 100µm; D, E, N, P, Q, 20µm; I, 200µm.

Discussão

Discussão

A Miosina V representa uma classe de motores moleculares envolvidos no transporte de organelas e ARN em vários organismos. Sua associação em encéfalo, com terminais nervosos (PREKERIS e TERRIAN, 1997), vesículas sinápticas e proteínas associadas a estas vesículas (PREKERIS E TERRIAN, 1997; COSTA e cols., 1999.) bem como, com movimentos de organelas em axônios (HOLLENBECK P.J. e SAXTON W. M., 2005) sugerem um papel funcional das miosinas no transporte de organelas. As miosinas apresentam um domínio mecano-químico conservado, capaz de transformar a energia química da hidrólise do ATP em geração de força e movimento ao longo de filamentos de actina.

Na literatura não há nenhum trabalho sobre a localização imuno-histoquímica da M-Va no cerebelo humano durante este período. Este trabalho mostra a expressão desta proteína no cerebelo desde o recém nascido a termo até o idoso, ajudando-nos a esclarecer a função da M-Va no processo de desenvolvimento cerebelar.

A seleção dos casos utilizados para este trabalho, foi feita através de análise das secções coradas com HE que apresentaram melhor preservação de suas estruturas.

A especificidade do anticorpo anti-M-Va utilizado foi confirmada por *Western blot*, no qual uma banda com peso molecular aparente de 190 kDa foi detectada em amostras de homogeneizado total de cerebelo de rato (ESPINDOLA e cols., 1992; COSTA e cols., 1999). Nas secções que foram utilizadas como controle dos experimentos de imuno-histoquímica não foi detectada marcação, o que indica que a detecção de M-Va foi método-específica.

De acordo com o estudo de Tilelli e cols., 2003, detectamos marcação intensa da M-Va em corpos e dendritos das células de Purkinje e células granulares. A CM mostrou considerável marcação de dendritos das células de Purkinje e/ou fibras paralelas.

A imunolocalização das CM, CP e CG dos córtices cerebelares de adulto e idoso não apresentaram diferenças significantes na intensidade de marcação durante este período. A migração dos neurônios que vão formar as camadas cerebelares se dá através de fibras gliais de Bergman, que saem de corpos celulares localizados próximos às

células de Purkinje e enviam seus processos em forma de candelabro até a superfície pial, onde são fixados seus pés terminais (RAKIC, 1971). A marcação com aspecto radiado, observada na CM indicam que fibras gliais de Bergmann expressam M-Va. Ainda, na CM foi observada a presença de interneurônios A identificação destas células como em cesto ou estrelada foi realizada tentativamente pela observação de seu posicionamento na CM: as células em cesto localizam-se mais próximas das células de Purkinje, enquanto que as estreladas ficam mais próximas à superfície pial. Como não foi detectada marcação de seus processos característicos, não foi possível identificar inequivocamente estes dois tipos de interneurônios.

Em cerebelo adulto e idoso observamos marcação do tipo puntata nas regiões perinuclear e subcortical do citoplasma das células de Purkinje e neurônios do núcleo denteado. Em cerebelos mais jovens esta marcação puntata perinuclear mostrou-se mais intensa e concentrada ao redor do núcleo. A marcação característica encontrada em nossos dados corroboram os achados de Espreafico e cols., (1992). Em conjunto, estes resultados sugerem a expressão da M-Va em organelas citoplasmáticas.

Não observamos a presença de M-Va em núcleo. Nossos dados vão de encontro com os dados de Pranchevicius e cols., 2008, que demonstraram a presença da miosina Va no núcleo em vários tipos de células em cultura e em neurônios de fatias de medula cerebral.

A marcação em fibras localizadas na substância branca sugerem a expressão da M-Va nos axônios localizados nesta estrutura. Outros dados de nosso trabalho mostraram a expressão da M-Va nos dendritos primários das células de Purkinje de maneira notável, tanto em vesículas como em microtúbulos e/ou fibras trepadeiras. Além disso, foi detectada uma intensa marcação em axônios de neurônios do núcleo denteado. Vale (2003), Sellers e Veigel (2006) e Yildiz e colaboradores (2003), demonstraram, através de elegantes experimentos, que a M-Va é um motor processivo e atua dando suporte aos movimentos de organelas ao longo de trilhas de actina. Hollenbeck P.J. e Saxton W. M. (2005) ressaltaram que as mitocôndrias movem-se em neurônios ao longo de filamentos de actina. Isto implica a participação de motores moleculares como as miosinas. Tomados em conjunto, estes resultados suportam a hipótese da participação da M-Va no transporte axonal.

O cerebelo apresenta três matrizes germinativas. No período pré-natal, o neuroepitélio possui células em proliferação que vão dar origem às células de Purkinje e aos neurônios dos núcleos profundos. As futuras células granulares originam-se de duas matrizes germinativas: uma primária, o trígono germinativo e outra secundária, a CGE. Ambas estão presentes durante o desenvolvimento pré-natal, sendo que a CGE permanece durante o desenvolvimento pós-natal (ALTMAN E BAYER, 1997). A não detecção da expressão de M-Va na ZP da CGE sugere que esta proteína motora não tem participação em eventos de divisão celular na região do sistema nervoso analisada

Foi observada em cerebelos mais jovens uma marcação bem definida da ZPM da CGE e uma marcação forte e diferencial da CM em sua porção pial. Esta expressão diferencial parece ser devido à intensa marcação de fileiras de células migratórias apostas às fibras gliais de Bergmann. Algumas células com perfil migratório foram detectadas. A correlação entre a Miosina Va e a migração neuronal pode ser feita considerando-se a dependência de Ca^{++} em ambos os processos. A motilidade celular depende da ativação de proteínas do citoesqueleto e proteínas regulatórias e estes eventos são mediados por Ca^{++} . Mudanças nos níveis intracelulares de Ca^{++} afetam a estabilidade do citoesqueleto e de proteínas contráteis e são críticas para a ocorrência da migração neuronal. O controle dos níveis intracelulares de Ca^{++} nas células migratórias pode ocorrer devido a modulação da atividade de canais iônicos e receptores. Os canais de cálcio do tipo N e os receptores ionotrópicos do tipo NMDA são essenciais para este controle. Durante o período de migração, receptores do tipo NMDA podem ser ativados pelo glutamato extracelular liberado pelas fibras paralelas de células granulares previamente formadas (RAKIC e cols., 1994).

Conclusões

Conclusões

A M-Va foi localizada no cerebelo humano em todos os tipos neuronais principais e sua expressão é aparentemente constitutiva e desenvolvimento-depedente.

A localização da M-Va no cerebelo humano pode sugerir sua participação no transporte de vesículas, organelas e membranas celulares, bem como na função e/ou morfologia sináptica e na migração neuronal.

Referências Bibliográfica

Referências Bibliográficas

- ALTMAN, J. and BAYER, S.A. Development of the Cerebellar System in Relation to its Evolution, Structure and Functions. **CRC Press**, Boca Raton, 783pp, 1997.
- BERG, J.S.; POWELL, B.C.; and CHENEY R.E. A Millennial Myosin Census. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, p.780–794, 2001.
- CAMERON, R.S.; RUFFIN, J.W.; CHO, N.K.; CAMERON, P.L.; and RAKIC P. Developmental expression, pattern of distribution, and effect on cell aggregation implicate a neuron-glia junctional domain protein in neuronal migration. **J. Comp. Neurol.**, v. 387(4), p. 467-488, 1997.
- CHENEY, R.E.; and MOOSEKER, M.S. Unconventional myosins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 4(1), p. 27-35, 1992.
- CHENEY, R.E.; O'SHEA, M.K.; HEUSER, J.E.; COELHO, M.V.; WOLENSKI, J.S.; ESPREAFICO, E.M.; FORSCHER, P.; LARSON, R.E.; and MOOSEKER, M.S. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell*, v. 75, p. 13-23, 1993b.
- CHENEY, R.E.; RILEY, M.A.; and MOOSEKER, M.S. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. **Cell Motil. Cytoskeleton**, v. 24, p. 215-223, 1993a.
- COOPER, J.A. A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. **Trends in Neurosciences**, v.31, p. 113-119, 2008.
- COSTA, M. C. R.; MANI, F.; SANTORO, W. JR.; ENILZA M. ESPREAFICO, E. M.; and LARSON, R. E. Brain Myosin-V, a Calmodulin-carrying Myosin, Binds to Calmodulin-dependent Protein Kinase II and Activates Its Kinase Activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274 (22), p. 15811–15819, 1999.
- DEKKER-OHNO, K.; ODA, S.; YAMAMURA, H.; KONDO, K. An ataxic mutant rat with dilute coat color. *Lab. Anim. Sci.*, v. 43(4), p. 370-372, 1993.
- DESNOS, C.; HUET, S. and DARCHEN, F. **Biol. Cell.**, v. 99, p. 411–423, 2007.

- DRENGK, A.C.; KAJIWARA, J.K.; GARCIA, S.B.; CARMO, V.S.; LARSON, R.E.; ZUCOLOTO, S.; and ESPREAFICO, E.M. Immunolocalisation of myosin-V in the enteric nervous system of the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.*, v.14;78(2-3), p. 109-112 2000.
- ESPINDOLA, F.S.; ESPREAFICO, E.M.; COELHO, M.V.; MARTINS, A.R.; COSTA, F.R.C.; MOOSEKER, M.S.; and LARSON, R.E. Biochemical and Immunological Characterization of p190-Calmodulin Complex from Vertebrate Brain: A Novel Calmodulin-binding Myosin. *The Journal of Cell Biology*, v. 118(2), p. 359-368, 1992.
- ESPREAFICO, E.M.; CHENEY, R.E.; MATTEOLI, M.; NASCIMENTO, A.A.C.; DE CAMILLI, P.V.; LARSON, R.E.; and MOOSEKER, M.S. Primary Structure and Cellular Localization of Chicken Brain Myosin-V (p190), an Unconventional Myosin with Calmodulin Light Chains. *The Journal of Cell Biology*, v.119 (6), p. 1541-1557, 1992.
- ESPREAFICO, E. M.; COLING, D. E.; TSAKRACLIDES, V.; KROGH, K.; WOLENSKI, J. S.; KALINEC, G. and KACHAR, B. Localization of myosin-V in the centrosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,v.95, p., 8636–8641,1998.
- EVANS, L.L.; HAMMER, J.; BRIDGMAN, P.C. Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from dilute-lethal neurons. *Journal of Cell Science*, v.110, p. 439-449, 1997.
- FISHELL, G.; HATTEN, M.E. Astrotactin provides a receptor system for CNS neuronal migration. *Development*, v. 113(3), p. 755-765, 1991.
- FOTH, B.J.; GOEDECKE, M.C.; SOLDATI, D. New insights into myosin evolution and classification. *PNAS*, v.103 (10), p. 3681–3686, 2006.
- FUTAKI, S.; TAKAGISHI, Y.; HAYASHI, Y.; OHMORI, S.; KANOU, Y.; INOUE, M.; ODA, S. I.; SEO, H.; IWAOKAWA, Y.; MURATA, Y. Identification of a novel myosin-Va mutation in an ataxic mutant rat, dilute-opisthotonus. *Mammalian Genome*, v.11, p. 649–655, 2000.
- GREGORY, W.A.; EDMONDSON, J.C.; HATTEN, M.E.; and MASON, C. A Cytology and neuron-glia apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro. *J. Neuroscience*, v. 8(5), p. 1728-38, 1988.
- GRISCELLI, C.; PRUNIERAS, M. Pigment dilution and immunodeficiency: a new syndrome. *Int. J. Dermatol.*, v.17(10), p. 788-791, 1978.

- HATTEN, M.E. Central Nervous System Neuronal Migration. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 22, p. 511–539, 1999.
- HATTEN, M.E. New directions in neuronal migration. **Science**, v. 297, p. 1660-1663, 2002.
- HATTEN, M.E.; HEINTZ, N. Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.18, p.385-408, 1995.
- HEINTZELMAN, M.B.; HASSON, T.; MOOSEKER, M.S. Multiple unconventional myosin domains of the intestinal brush border cytoskeleton. **Journal of Cell Science**, v. 107, p. 3535-3543, 1994.
- HIROKAWA, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science**, v.279, p.519–526, 1998.
- HIROKAWA, N. mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. **J. Neurosci**, v. 26, p. 7139–7142, 2006.
- HOLLENBECK, P. J. AND SAXTON, W. M. The axonal transport of mitochondria **Journal of Cell Science**, v.118, p. 5411-5419, 2005.
- KOMURO, H.; RAKIC, P. Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. **J. Neuroscience**, v. 15; 18(4), p. 1478-90, 1998.
- KOMURO, H.; RAKIC, P. Dynamics of granule cell migration: a confocal microscopic study in acute cerebellar slice preparations. **J. Neuroscience**, v. 15, p. 1110-1120, 1995.
- KOMURO, H.; RAKIC, P. Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. **Neuron**, v. 17(2), p. 275-85, 1996.
- KOMURO, H.; YACUBOVA, E.; YACUBOVA, E.; and RAKIC, P. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. **J. Neuroscience**, v. 21, p. 527- 540, 2001.
- LAEMMLI, U.K. and FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. **J. Mol. Biol.**, v. 80, p. 575-599, 1973.

- LARSON, R. E. Myosin-V: a novel class of unconventional myosins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p.309-318, 1996.
- LARSON, R. E.; ESPINDOLA, F.S.; ESPREAFICO, E.M. Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. **J. Neurochem.**, v. 54(4), p.1288-1294, 1990.
- LARSON, R.E.; PITTA, D.E.; FERRO, J.A. A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 21(2), p. 213-217, 1988.
- MARTINS, A.R.; DIAS, M.M.; VASCONCELOS, T.M.; CALDO, H.; COSTA, M.C.R.; CHIMELLI, L. and LARSON, R.E. Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. **J. Neurosci. Methods**, v. 92, p. 25-29, 1999.
- MERCER, J.A.; SEPERACK, P.K.; STROBEL, M.C.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature*, v. 21; 349(6311), p. 709-713, 1991.
- MOOSEKER, M.S.; CHENEY, R.E. Unconventional myosins **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 11, p. 633-675, 1995.
- PREKERIS, R.; TERRIAN, D.M. Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: Evidence for a Ca²⁺ dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. **J Cell Biol** v.37, p.1589–1601, 1997.
- RAKIC, P. A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. **Trends Neurosci.**, v. 18(9), p.383-388, 1995 a.
- RAKIC, P. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electromicroscopic study in *Macacus rhesus* **J. Comp. Neurol.**,v. 141, p. 183-312, 1971.
- RAKIC, P. Principles of neural cell migration. **Experientia**, v. 46, p. 883-891, 1990.
- RAKIC, P. Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.92 (25), p.11323-11327, 1995b.

- RAKIC, P.; CAMERON, R.S. and KOMURO, H. Recognition, adhesion, transmembrane signaling and cell motility in guided neuronal migration. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 4, p. 63-69, 1994.
- RAKIC, P.; KNYIHAR-CSILLIKt, E.; and CSILLIKt, B. Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.93 (17), p.9218-9222, 1996.
- RAKIC, P.; KOMURO, H. The role of receptor/channel activity in neuronal cell migration. **J. Neurobiology**, v. 26(3), p. 299-315, 1995.
- RAKIC, P.; SIDMAN, R.L. Histogenesis of cortical lauers in human cerebellum, particularly the lamina dissecans. **J. Comp. Neurol.**, v. 139, p 473-500, 1970.
- RECK-PETERSON, S.L.; PROVANCE JR, D.W.; MOOSEKER, M.S.; MERCER, J.A. Class V myosins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1496, p. 36–51, 2000.
- RIVAS, R.J.; HATTEN, M.E. Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. **J. Neurosci.**, v. 15(2), p. 981-989, 1995.
- RODRIGUEZ, O.C. and CHENEY, R.E. Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 991-1004, 2002.
- RYDER, E.F.; CEPKO, C.L. Migration patterns of the developing chick cerebellum. **Neuron.**, v. 12, p. 1011-1029, 1994.
- SAGHATELYAN, A. Role of blood vessels in the neuronal migration. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, p. 744–750, 2009.
- SCHAEFER, A.; POLUCH, S.; JULIANO, S. Reelin is Essential for Neuronal Migration but Not for Radial Glial Elongation in Neonatal Ferret Cortex. **Developmental Neurobiology**, v. 68, p. 590–604, 2008.
- SCHLAMP, C.L.; WILLIAMS, D.S. Myosin V in the retina: localization in the rod photoreceptor synapse. **Exp. Eye Res.**, v. 63, p. 613-619, 1996.
- SIDMAN, R.L.; RAKIC, P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain. Review. **Brain Res.**, v. 62, p. 1- 35, 1973.

SELLERS JR, VEIGEL C. Walking with myosin V. **Curr Opin Cell Biol.** v. 18, p.68–73, 2006.

STROBEL, M.C.; SEPERACK, P.K.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A. Molecular analysis of two mouse dilute locus deletion mutations: spontaneous dilute lethal20J and radiation-induced dilute prenatal lethal As2 alleles. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, p. 501–509, 1990.

SUTER, D.M.; ESPINDOLA, F.S.; LIN C.H.; FORSCHER, P.; MOOSEKER, M.S. Localization of Unconventional Myosins V and VI in Neuronal Growth Cones. **J. Neurobiol.**, v. 42, p. 370–382, 2000.

TILELLI, C.Q.; MARTINS, A. R.; LARSON, R. E. and GARCIA-CAIRASCO. Immunohistochemical localization of Myosin Va in the adult rat brain. **Neuroscience**, v.121, p. 573-586, 2003.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T. and GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VALE, R.D. Myosin V motor proteins: marching stepwise towards a mechanism. **J. Cell Biol.** v. 163, p. 445–450, 2003.

VALIENTE, M. AND MARIN, O. Neuronal migration mechanisms in development and disease. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, p. 68–78, 2010.

WU, X.; JUNG, G. and HAMMER III, J. A. Functions of unconventional myosins **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 42–51, 2000.

YILDIZ, A., FORKEY, J.N., MCKINNEY, S.A., HA, T., GOLDMAN, Y.E. AND SELVIN, P.R. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. **Science**. v. 300, p. 2061–2065, 2003.

ZANARDO, R.C.; COSTA E.; FERREIRA, H.H.; ANTUNES, E.; MARTINS, A.R.; MURAD, F. and DE NUCCI, G. Pharmacological and immunohistochemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 14111- 14114, 1997.

ZECEVIC, N.; RAKIC, P. Differentiation of Purkinje cells and their relationship to other components of developing cerebellar cortex in man. **J. Comp. Neurol.**, v.167, p.27-47, 1976.

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](#)