

## Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Faculdade de Ciências Médicas

Luiz Otávio Ribeiro de Lemos Felgueiras

Efeitos da modulação da via do AMPc/PKA e da ausência de T3 na oligodendroglia *in vitro*: formação e manutenção dos prolongamentos e distribuição de proteínas de oligodendrócitos/mielina e da RhoA

> Rio de Janeiro 2016

Luiz Otávio Ribeiro de Lemos Felgueiras

Efeitos da modulação da via do AMPc/PKA e da ausência de T3 na oligodendroglia *in vitro*: formação e manutenção dos prolongamentos e distribuição de proteínas de oligodendrócitos/mielina e da RhoA

> Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Penha Cristina Barradas Daltro-Santos Coorientadora: Dra. Viviane Younes Rapozo

> Rio de Janeiro 2016

## CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F313 Felgueiras, Luiz Otávio Ribeiro de Lemos.

Efeitos da modulação da via do AMPc/PKA e da ausência de T3 na oligodendroglia in vitro: formação e manutenção dos prolongamentos e distribuição de proteínas de oligodendrócitos/mielina e da RhoA. / Luiz Otávio Ribeiro de Lemos Felgueiras. – 2016. 119 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Penha Cristina Barradas Daltro Santos. Coorientadora: Dra. Viviane Younes Rapozo.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimetal.

1. Oligodendrogloia - Teses. 2. Hormônios tireoidianos - Teses. 3. Morfologia (Biologia) - Teses. I. Santos, Penha Cristina Barradas Daltro. II. Rapozo, Viviane Younes. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 611-018.8

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Luiz Otávio Ribeiro de Lemos Felgueiras

# Efeitos da modulação da via do AMPc/PKA e da ausência de T3 na oligodendroglia *in vitro*: formação e manutenção dos prolongamentos e distribuição de proteínas de oligodendrócitos/mielina e da RhoA

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de agosto de 2016.

Coorientadora: Dra. Viviane Younes Rapozo Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.ª Dra. Penha Cristina Barradas Daltro-Santos (Orientadora) Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Alex Christian Manhães Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.<sup>a</sup> Dra. Celly Cristina Saba Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Claudio Alberto Serfaty Universidade Federal Fluminense

Prof.<sup>a</sup> Dra. Elizabeth Giestal de Araújo Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2016

### AGRADECIMENTO

03 de abril de 2006 de lá para cá tanta coisa aconteceu e tem tanta gente para agradecer. Primeiramente à Deus por tudo, mesmo que eu não entenda ou não lembre valeu. À Ana Cláudia Moraes Leal Felgueiras, minha esposa linda que esteve comigo praticamente todo esse caminho me dando força e acreditando em mim, dizendo sim a um bolsista da CAPES sem nenhuma certeza no futuro, mas que ela tinha certeza que conseguiria dar um jeito com meu talento e capacidade. Obrigado por tudo! Te amo muitão muitão! Aos meus pais e a minha irmã por sempre se preocuparem comigo e perguntarem como estão as coisas (mesmo eu tendo quase certeza que até hoje não saibam direito o que faço no laboratório).

À professora Penha por ter me ajudado a entender melhor como funciona o "sujeito da oração", obrigado por ter me aceitado no laboratório e ter me permitido continuar nele esses 10 anos. Espero ter podido contribuir de alguma maneira para o laboratório. (Espero que a construção da frase esteja boa e que ela faça sentido.) À Vivi que sempre teve a maior paciência comigo, sendo um amor de pessoa e uma co-orientadora sem igual, obrigado por tudo (inclusive por se acostumar a ouvir minhas besteiras). Amiga para a vida toda. Ao professor Frank(lin) sempre com uma história para contar ou tentando ensinar alguma coisa, espero que você consiga ser muito feliz na sua vida, até assistiria Masterchef Brasil por você.

Ao professor Alex pela solicitude e pelo esforço de me encaixar entre um seminário, 2 reuniões, uma ida ao *campus* e uma ida na FAPERJ, mesmo eu tendo dormido uma das primeiras vezes que sentei para acompanhar uma conversa sua com a Viviane. Professora Beth por ser o amor de pessoa que sempre foi comigo, sempre ultrapassando a barreira da educação protocolar para um carinho sincero e afetuoso. Aos professores Marcos (Vasco!) e Olga pelas conversas e comidas (neste caso só Olga).

Bruna (Ciclo completo), minha amiga mais macho, que você consiga ser a cientista sensacional que você pode ser. Paulinho, aproveite bastante suas férias remuneradas e seu décimo terceiro. Anna do Flúor, vai curtir a vida de madame pessoa. Skinner mãe, trabalhadora e horrorosa que sua família continue sendo muito feliz. Thiago que você consiga obter cada vez mais sucesso na sua já competente jornada e consiga inspirar cada vez mais profissionais.

João Felipe, Ana Carolina, Camila, Carol e Bárbara (Juízo hein, moça!) obrigado pela ajuda de vocês ao longo desse processo.

Ana Carolina, Cassiana, Gustavo, Lívia, Luiza e Marta que todos vocês consigam ser os profissionais que desejam ser. Aprendam, cresçam, apareçam, melhorem e causem impacto positivo por ondem passarem. Alan, boa sorte nos seus empreendimentos que você consiga ter sucesso e colocar em prática todas as suas ideias. Everton e Michael, boa sorte na jornada de vocês.

Jorge que você consiga finalmente aproveitar a aposentadoria.

Andréa, Bela Besta, Gabizinha, Serginho e Tiagão, que vocês estejam felizes em suas carreiras, obrigado.

Portanto, de que adianta uma pessoa ganhar o mundo inteiro e perder a sua alma? Marcos 8:36

### RESUMO

FELGUEIRAS, Luiz Otávio Ribeiro de Lemos. *Efeitos da modulação da via do AMPc/PKA e da ausência de T3 na oligodendroglia in vitro: formação e manutenção dos prolongamentos e distribuição de proteínas de oligodendrócitos/mielina e da RhoA*. 2016. 119f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Já foi demonstrada em trabalhos anteriores de nosso laboratório a importância do hormônio tireoidiano (T3) na diferenciação da oligodendroglia, sua relação com as proteínas de citoesqueleto e seu papel na distribuição das proteínas de mielina como CNPase e MBP. Já demonstramos também que a via da MAPK/ERK participa do crescimento e arborização dos prolongamentos da oligodendroglia, sendo importante para sua morfologia. A PKA também pode ser importante para a extensão dos prolongamentos uma vez que pode inibir a RhoA e consequentemente aumentar o comprimento dos prolongamentos. Neste estudo buscamos avaliar a relação entre T3 e a sinalização da via do AMPc/PKA na distribuição da CNPase, MAG e RhoA, no desenvolvimento da oligodendroglia e na sua morfologia. A oligodendroglia foi obtida de hemisférios cerebrais de ratos neonatos e cultivada na presença ou ausência de T3 (T3 ou -T3). Após 5 dias os dois grupos foram divididos de acordo com os tratamentos realizados com cada fármaco: DMSO (controle); ativador da adenilato ciclase forscolina (FORSC) [10 mM]; inibidor da adenilato ciclase SQ22356 (SQ) [1 mM]; inibidor da PKA H-89 [1 mM] e ambos forscolina [10 mM] e H-89 [1 mM] (FORSC+H-89). Os efeitos dos tratamentos foram observados após 30min ou 24h. Com 24h de tratamento com H-89 a porcentagem de progenitores de oligodendrócitos (OPCs) reduziu e o tratamento com FORSC ou FORSC+H-89 por 30min reduziu a porcentagem de OPCs com prolongamentos acima da média. A ausência de T3 reduziu a porcentagem de OPCs com prolongamentos acima da média nas culturas com 5 div, mas o tratamento com FORSC ou SQ por 30min reverteu esses efeitos. Os tratamentos na presença de T3 não interferiram na porcentagem de pré oligodendrócitos (POs), mas o tratamento com FORSC por 24H alterou a porcentagem de POs com prolongamentos acima da média. Os tratamentos com FORSC, H-89 ou ambos durante 30min reduziu esta porcentagem na ausência de T3. FORSC elevou a porcentagem de oligodendrócitos imaturos (IO) e a ausência de T3 reduziu a porcentagem de IO com prolongamentos superiores à média, esses efeitos foram prevenidos com os tratamentos com SQ e H-89. Nas células maduras todos os tratamentos afetaram a porcentagem de células com prolongamentos acima da mediana e o tratamento com FORSC pode reverter os efeitos da ausência de T3. O tratamento com H-89 concentra a RhoA no núcleo das células com 5 div. Os resultados reforçam a importância do T3 em estágios tardios de diferenciação da oligodendroglia, assim como na formação e manutenção dos prolongamentos. Além disso, sugerem que a via do AMPc/PKA é importante para a formação dos prolongamentos e é capaz de interferir nos efeitos da ausência de T3.

Palavras-chave: Oligodendroglia. Via do AMPc/PKA. Hormônio tireoidiano.

Morfologia.

### ABSTRACT

FELGUEIRAS, Luiz Otávio Ribeiro de Lemos. *Effects of cAMP/PKA pathway* modulation and T3 absence on oligodendroglia in vitro: formation and maintenance of oligodendroglial processes and distribution of oligodendrocytes/myelin proteins and RhoA. 2016. 119f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The importance of thyroid hormone (T3) in oligodendroglial differentiation, its relationship with cytoskeleton proteins and its role in myelin proteins distribution such as CNPase and MBP had already been showed. We have also showed that MAPK/ERK pathway has a role in oligodendrocyte processes elongation and branching. The cAMP/PKA pathway may be also relevant for oligodendroglial morphology. PKA can also be important to the process elongation because can inhibit RhoA and consequently its increase. In this study we aimed to evaluate the relationship between T3 and cAMP/PKA signaling on CNPase, MAG and RhoA distribution, oligodendroglial development and morphology, in vitro. Oligodendroglial cells were obtained from cerebral hemispheres of newborn rats and cultured with or without T3 (T3 or –T3) in the medium. After 5 days these two groups were divided accordingly to each drug treatment: DMSO (control); an adenylyl cyclase activator forskolin (FORSC) [10 mM]; an adenylyl cyclase inhibitor SQ22356 (SQ) [1 mM]; an inhibitor of PKA, H-89 [1 mM] and both forskolin [10 mM] and H-89 [1 mM] (FORSC+H-89). Treatment effects were observed at 30min or at 24h. With 24h of treatment with H-89 progenitors's (OPCs) percentage was reduced and the treatment with FORSC or FORSC+H-89 for 30min reduced the percentage of OPCs with processes above the media. Absence of T3 reduced the percentage of OPCs with processes above the media in cultures with 5 div but FORSC or SQ's treatments with 30 min reverted these effects. Treatment during 30min or 24h did not change preoligodendrocyte's (POs) percentage in the presence of T3 but the treatment with FORSC during 24h changed the percentage of POs with processes above the media. Treatment with FORSC, H-89 or both together for 30min reduced the percentage of POs above the media in the absence of T3. FORSC enhanced immature's (IO) percentage and the absence of T3 reduced the percentage of IO with processes above the media, these effects were prevented with SQ and H-89's treatments. In mature cells all treatments affected the percentage of cells above the median and FORSC could revert the effects of T3 absence. The results corroborated T3's participation on CNPase and MAG distribution and that FORSC can reverts the effects of T3 absence. H-89 treatments concentrated RhoA in the nucleus of cells with 5 div. Our results reinforce the importance of T3 in late stages of oligodendroglia differentiation as well as in the formation and maintenance of cells processes. Besides suggests that cAMP/PKA pathway is important for processes formation and can interfere in the T3's absence effects.

Keywords: Oligodendroglia. cAMP/PKA pathway. Thyroid hormone. Morphology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema representativo do desenvolvimento da oligodendroglia	18
Figura 2 –	Estágios de diferenciação da oligodendroglia	22
Figura 3 –	Linha do tempo das mudanças no número de células em culturas	
	controle (C) e em deficiência de T3 (-T3) agrupadas pelo fenótipo	
	indicado pela morfologia celular e expressão de CNPase	34
Figura 4 –	Representação esquemática da interação entre as vias da	
	MAPK/ERK e do AMPc/PKA	37
Figura 5 –	Esquema representativo da via do AMPc/PKA	39
Figura 6 –	Esquema representativo da inibição e ativação das Rho GTPases	
	pela PKA	42
Figura 7 –	Árvore filogenética da família Rho das GTPases e representantes de	
	outras GTPases da superfamília Ras	44
Figura 8 –	Regulação das RhoGTPases	45
Figura 9 –	Ação das Rho GTPases nos cones de crescimento	48
Figura 10 –	Desenho experimental dos tratamentos realizados nas culturas	52
Figura 11 -	Imagem demonstrativa do processo de medição das células	55
Figura 12 -	Distribuição da oligodendroglia com 5 div nos diferentes grupos	
	tratados	58
Figura 13 -	Distribuição da oligodendroglia com 6 div nos diferentes grupos	
	tratados	59
Figura 14 -	Distribuição da oligodendroglia com 5 div nos diferentes grupos	
	tratados em ausência de T3	60
Figura 15 -	Distribuição da oligodendroglia com 6 div nos diferentes grupos	
	tratados em ausência de T3	61
Figura 16 -	Gráfico demonstrativo do percentual de progenitores com	
	prolongamentos com tamanho acima da média, após os diferentes	
	tratamentos por 30 minutos ou 24 horas, na presença ou ausência	
	de T3	64
Figura 17 -	Gráfico demonstrativo do percentual de pré-oligodendrócitos com	
	prolongamentos com tamanho acima da média, após os diferentes	
	tratamentos por 30 minutos ou 24 horas, na presença ou ausência de	

	ТЗ	67
Figura 18 -	Gráfico demonstrativo do percentual de oligodendrócitos imaturos	
	com prolongamentos com tamanho acima da média, após os	
	diferentes tratamentos por 30 minutos ou 24 horas, na presença ou	
	ausência de T3	69
Figura 19 -	Gráfico demonstrativo do percentual de oligodendrócitos maduros	
	com prolongamentos com tamanho acima da mediana, após os	
	diferentes tratamentos por 30 minutos ou 24 horas, na presença ou	
	ausência de T3	72
Figura 20 -	Oligodendroglia com 5 ou 6 div imuno identificadas com os anticorpos	
	anti- CNPase e anti-MAG	74
Figura 21 -	Oligodendroglia com 5 ou 6 div imuno identificadas com o anticorpo	
	anti-CNPase	76
Figura 22 -	Oligodendroglia com 5 ou 6 div imuno identificadas com o	
	anticorpoanti-MAG	77
Figura 23 -	Oligodendroglia com 5 ou 6 <i>div</i> imuno identificadas com o	
	anticorpo anti-RhoA	79
Figura 24 -	Oligodendroglia com 5 ou 6 div cultivadas em ausência de T3 imuno	
	identificadas com o anticorpo anti-CNPase	81
Figura 25 -	Oligodendroglia com 5 ou 6 div cultivadas em ausência deT3 imuno	
	identificadas com o anticorpo anti-MAG	82
Figura 26 -	Oligodendroglia com 5 ou 6 div cultivadas em ausência de T3 imuno	
	identificadas com o anticorpo anti-RhoA	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Anticorpos utilizados para a técnica de imunocitoquímica. Nos	
	anticorpos secundários: Em verde, Alexa 488 - fluorocromo	
	emitido em verde; Em vermelho, Alexa 555 - fluorocromo emitido	
	em vermelho, Alexa 633 – fluorocromo emitido no comprimento de	
	onda próximo ao vermelho, e alterado no programa para	
	violeta	53
Tabela 2 –	Resumo comparativo do percentual de oligodendroglia com	
	maiores tamanhos de prolongamentos entre os grupos DMSO e	
	tratados	73
Tabela 3 –	Resumo do padrão de distribuição das	
	proteínas	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AKAP Proteína de ancoragem cinase-A
- AKT/mTOR Cinase serina treoanica alvo para rapamicina de mamíferos
- AMPc Monofosfato cíclico de adenosina
- ATP Trifosfato de adenosina
- bFGF Fator Básico de Crescimento de Fibroblasto
- CNPase 2',3' nucleotídeo cíclico 3'fosfodiesterase
- CREB Proteína de ligação ao elemento responsivo ao cálcio/AMP cíclico
- DCC Receptor de neutrina-1 deletado em carcinoma colorretal
- DRG Gânglios da base
- ECM Matrix extracelular
- EPAC Proteína ativada diretamente por AMPc
- ERK: Cinase regulada por sinal extracelular
- FABP7: Proteína 7 de ligação de ácidos graxos
- FAK Cinase de adesão focal
- FGF Fator de Crescimento de Fibroblasto
- GalC Galactocerebrosídeo
- GDP Guanosina Difosfato
- GEF Fator de troca de GTPase
- GEF Fatores de troca do nucleotídeo guanina
- GGF Fator de Crescimento Glial
- GPCR: receptor acoplado à proteína G;
- GPR37 Receptor acoplado a proteína G 37
- GTP Guanosina Trifostato
- hESC Células tronco embrionárias humanas
- HGF Fator de Crescimento de Hepatócitos
- hiPSC Progenitores gliais derivados de células tronco induzidas
- LIF Fator inibitório de leucemia
- L-MAG- large MAG
- MAG Glicoproteína associada à mielina
- MAPK Cinase ativada por mitógenos
- MBP Proteína básica de mielina
- MEK: cinase ativada por mitógenos;

- MMP Metaloproteinase
- MMP-9 Metaloproteinase-9
- MOBP Proteína básica de oligodendrócito associada à mielina
- MOG Glicoproteína de oligodendrócito e mielina
- NG2 Proteoglicano sulfato condroitina CSPG4/NG2/MCSP
- NgR1- Receptor Nogo 1
- NgR2 Receptor Nogo 2
- OPC Progenitores de oligodendrócitos
- PAK cinase ativada por p21
- PBS Tampão Fosfato Salino
- PDGF Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
- PDGFRα Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas
- PirB- Receptor B do tipo imunoglobulina
- PKA proteína cinase dependente de AMPc
- PLP proteína proteolipídica
- POA Antígeno pró-oligodendroblasto
- PSA-NCAM Forma embrionária polisialilada da molécula de adesão celular neural
- RNAm Ácido Ribonucléico mensageiro
- Shh Sonic Hedgehog
- S-MAG small MAG
- SNC Sistema Nervoso Central
- SVZ Zona subventricular
- T3 triodotinonina
- T4 Tiroxina
- THRα Receptor α do hormônio tireoideano
- THR $\beta$  Receptor  $\beta$  do hormônio tireoideano

# SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	49
1.1	Objetivo geral	49
1.2	Objetivos específicos	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1	Obtenção dos animais	50
2.2	Cultura primária de oligodendrócitos	50
2.3	Avaliação da via de sinalização do AMPc/PKA	51
2.4	Reação imunocitoquímica	52
2.5	Análise das imagens e quantificação	53
2.6	Análise estatística	54
2.6.1	<u>Tipo Celular</u>	54
2.6.2	Tamanho dos prolongamentos celulares	55
3	RESULTADOS	56
3.1	Tipo celular	56
3.2	Tamanho dos prolongamentos celulares	62
3.2.1	Progenitor – OPC	62
3.2.2	Pré oligodendrócitos – PO	64
3.2.3	<u>Imaturo – IO</u>	67
3.2.4	<u>Maduro – M</u>	69
3.3	Distribuição das proteínas	73
3.3.1	<u>Modulação da via do AMPc/PKA e distribuição da CNPase, MAG e</u>	
	<u>RhoA na presença de T3</u>	75
3.3.1.1	CNPase	75
3.3.1.2	MAG	75
3.3.1.3	RhoA	78
3.3.2	<u>Manipulação da via do AMPc/PKA e distribuição da CNPase, MAG e</u>	
	<u>RhoA na ausência de T3</u>	80
3.3.2.1	CNPase	80
3.3.2.2	MAG	80

3.3.2.3	RhoA	83
4	DISCUSSÃO	85
4.1	Efeitos dos fármacos na oligodendroglia	86
4.2	Efeitos da ausência do T3	91
4.3	Efeitos dos tratamentos farmacológicos na oligodendroglia	
	cultivada sem T3	93
	CONCLUSÕES	96
	REFERÊNCIAS	98

### INTRODUÇÃO

O termo glia, deriva da palavra grega cola e é usado para descrever a maioria das células não neuronais do sistema nervoso. A origem da palavra reflete um conceito precoce no qual as células da glia eram vistas apenas como o que mantinha unidas as células operacionais do Sistema Nervoso Central (SNC) os neurônios. Contudo, hoje a glia é reconhecida como uma diversidade de tipos celulares que desempenham importantes papéis no desenvolvimento neural e no seu funcionamento (Colognato & Tzvtanova, 2011). Na verdade, o termo glia, usado na ocasião se referia aos astrócitos, células com numerosos prolongamentos e distribuídas no tecido nervoso ao redor dos neurônios e de vasos.

Em 1921 del Rio Hortega propôs o termo *oligodendroglia* (oligo = poucos, dendro = ramo) para identificar um grupo de células com: poucos prolongamentos, corpos celulares esféricos ou poligonais, núcleos celulares que podem ser redondos, ovais ou ainda irregulares. O núcleo destas células geralmente está excêntrico e por isso grande quantidade de citoplasma pode acabar se localizando em um polo da célula. Ao compararmos os oligodendrócitos com os astrócitos, por exemplo, é possível diferenciá-los pela grande densidade do citoplasma e do núcleo, ausência de fibrilas e glicogênio no citoplasma e a presença de um grande número de microtúbulos nos prolongamentos (Peters et al., 1991).

O aparecimento destas células em seu estágio mielinizante no sistema nervoso central e das células de Schwann no sistema nervoso periférico compõe um grande avanço evolucionário que permitiu a formação de estruturas e o desenvolvimento de funções mais complexas. Além do embainhamento dos axônios, que facilita a condução elétrica, os oligodendrócitos cumprem diversos papéis como auxiliar o desenvolvimento de neurônios, a manutenção da integridade axonal, organização dos nódulos de ranvier com o isolamento dos canais iônicos nele e a participação em vias de sinalização com neurônios. (Baumann & Pham-Dihn, 2001, Nave, 2010, Bergles et al., 2000).

Os oligodendrócitos formam prolongamentos que entram em contato com o axônio e o envolvem em determinado trecho (Bunge et al., 1962, Bunge, 1968), como resultado é formada uma pilha de membranas fortemente ligadas entre si por suas superfícies citosólicas e externas (Waxman, 2006). Uma única célula é capaz

de envolver mais de 50 segmentos de axônios, sendo que em um mesmo axônio, diferentes segmentos pertencem a diferentes oligodendrócitos (Baumann & Pham-Dihn, 2001).

Para que ocorra a mielinização é necessário que o oligodendrócito passe por diferentes etapas durante a maturação (Hardy & Reynolds, 1993, Pfeiffer et al., 1993), a diferenciação envolve ainda a perda e/ou a aquisição de alguns antígenos. As células se tornam multipolares com vários prolongamentos primários que passarão por ciclos de arborização. Estes prolongamentos podem entrar em contato com os axônios e envolvê-los, formando assim a bainha de mielina (Peters et al., 1991; Song et al., 2001; Bauer et al., 2009).

Sobre o desenvolvimento da linhagem oligodendroglial, ela tem sua origem em precursores mitóticos e migratórios, que passam a progenitores e então se diferenciam progressivamente em células pós-mitóticas produtoras de mielina. A expressão sequencial dos marcadores de desenvolvimento, identificados por anticorpos específicos, divide a linhagem em diferentes estágios do desenvolvimento (Hard & Reynolds, 1993, Hilton et al., 1995), caracterizados por capacidade proliferativa, migratória e grandes mudanças na morfologia.

### Desenvolvimento dos oligodendrócitos

Os precursores de oligodendrócitos originam-se de progenitores neuroepiteliais no tubo neural ventral (Rowitch, 2004, Richardson et al., 2006, Richardson et al., 2011) e respondem especificamente ao *Sonic Hedgehog* (Shh) derivados da placa do tubo neural (Yu et al., 2013). Essas células serão proliferativas por toda a vida e podem se dividir simetricamente para formarem dois outros precursores ou assimetricamente para se auto renovarem enquanto geram uma nova célula (Figura 1) (Hughes et al. 2013; Zhu et al., 2011).



Figura 1 - Esquema representativo do desenvolvimento da oligodendroglia

Legenda: A figura demonstra o processo de diferenciação da oligodendroglia. Células precursoras de oligodendrócitos saem do estágio proliferativo e então começam o processo de diferenciação no qual ocorrerá a formação de prolongamentos utilizados para o reconhecimento do ambiente. Uma vez reconhecido um axônio o oligodendrócito entra em seu último estágio de desenvolvimento e inicia a formação da bainha de mielina que envolverá o axônio.

Fonte: Adaptado da ilustração de Layla Lang (http://www.laylalang.com/)

Como a diferenciação dos oligodendrócitos no SNC ocorre de forma tardia, o desenvolvimento desse grupo de células sofre a influência de diferentes sinais que podem ser oriundos dos diversos tipos celulares, pois todos secretam moléculas específicas que atuam como moléculas de sinalização para as células vizinhas. Os neurônios, por exemplo, liberam o Fator de Crescimento Glial (GGF), os astrócitos por sua vez liberam o Fator Básico de Crescimento de Fibroblasto (bFGF) e ambos liberam o Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) e o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF). PDGF e bFGF são fatores que atuam na regulação da proliferação de células progenitoras de oligodendrócitos (OPC), iniciação do crescimento de prolongamentos primários e a migração celular dependente de Ca<sup>2+</sup> (Simpson & Armstrong, 1999). Acredita-se ainda que a indução do OPC pelo Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF) seja dependente da ativação da via da MAPK cinase (Kessaris et. al., 2004).

Trabalhos apontam que a atividade neuronal, por exemplo, é importante para os oligodendrócitos (Barres & Ralf, 1993). Ao longo do tempo tem sido demonstrado que os precursores de oligodendrócitos recebem sinapses funcionais de neurônios (Bergles et al., 2000, Mangin & Gallo, 2011), mas os seus papéis ainda não foram definidos. Uma possibilidade é a percepção por parte dos precursores da atividade neuronal para regular a sua capacidade de dividir, diferenciar e mielinizar (Emery, 2010). A atividade neuronal pode ainda influenciar a diferenciação e mielinização *in vitro* através de sinais secretados, entre eles o glutamato e o ATP (Wake et al., 2011).

Ao longo da migração, os progenitores formam múltiplos prolongamentos com a função de analisarem e explorarem o local onde a célula se encontra. Em resposta aos estímulos recebidos do meio, a célula poderá continuar a migrar, proliferar ou terminar a sua diferenciação, com as células passando de precursores a OPCs e depois células pós-mitóticas produtoras de mielina (Miller, 2002), iniciando assim o processo de mielinização (Kirby et al., 2006).

Para identificarem o caminho a ser percorrido através da matriz extracelular (ECM) produzida pelos astrócitos e para regularem a extensão dos seus prolongamentos os oligodendrócitos se utilizam de metaloproteínas (MMP). O aumento nos níveis de MMPs em tecidos ricos em oligodendrócitos e mielina ocorre justamente quando há também o aumento pós-natal da mielinização. *In vitro*, os oligodendrócitos de camundongos que não expressam MMP-9 apresentaram um retardo na formação dos seus prolongamentos (Oh et al., 1999). Além disso, inibidores de MMP causam a diminuição dos prolongamentos dos oligodendrócitos (Uhm et al., 1998).

Apesar da importância da ECM os oligodendrócitos não possuem a capacidade de secretar e montar a sua própria matriz extracelular, contudo foi observado que precursores de oligodendrócitos têm a capacidade de secretar baixos níveis de proteínas de matriz, incluindo laminina (Yang et al., 2006).

Durante o desenvolvimento do SNC os OPCs migram grandes distâncias até os tratos axonais, onde atingem o estágio de oligodendrócitos mielinizantes (Zang & Miller, 1996, Sugimoto et al., 2001; Aguirre and Gallo, 2004; Simons and Trajkovic, 2006; Barres, 2008, Hughes et al., 2013;). Os OPCs são capazes de expressar o proteoglicano sulfato condroitina CSPG4/NG2/MCSP (NG2) capaz de modular a sua migração e o PDGFRα (Niehaus et al., 1999; Nishiyama et al., 2009; Crawford et al., 2014). Estas informações passam a ser importantes pelo fato da mielinização depender da migração de OPCs na direção certa e da migração necessitar da polarização celular (Benninger et al., 2007; Binami et al., 2010; Hall and Lalli, 2010),

sendo os reguladores destas ações as proteínas Rho GTPases e as proteínas do complexo de polaridade (Fukata et al., 2003; Petrie et al., 2009).

A migração e a protrusão dos prolongamentos nos OPCs envolve a remodelação constante do citoesqueleto controlada pela família das Rho GTPases, incluindo Cdc42, Rac e RhoA (Bacon et al., 2007; Bauer et al., 2009) que são ativadas pela GTP via fatores de troca do nucleotídeo guanina (GEF) (Rossman et al., 2005)

Em roedores, os OPCs são caracterizados pela morfologia bipolar e pela presença de marcadores específicos como glicolipideos e NG2 (Hardy & Reynolds, 1991, Fredman et al., 1984, Nishiyama et al., 1996). Estudos *in vitro* e *in vivo* através de técnicas de transplante mostraram que as células eram capazes de proliferarem ativamente e também possuíam propriedades migratórias (Curtis et al., 1988, Baron-Van Evercooren et al., 1996, Espinosa de Los Monteros et al., 1993, Lachapelle F et al., 1983).

Entre os marcadores de progenitores, temos: gangliosídeos de superfície identificados pelo anticorpo A2B5 (Raff, 1989); o receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGFRα (Hart et al., 1989; Decker & ffrench-Constant, 2004); os proteoglicanos de sulfato de condroitina O-2A (NG2) (Nishiyama, et al., 1996), que aparecem logo depois do PDGFRα e se co-localizam com este tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Nishiyama et al., 1996); a forma embrionária polisialilada da molécula de adesão celular neural (PSA-NCAM); a nestina, uma proteína que distingue linhagens de células neuroepiteliais (Lendahl et al., 1990); e o RNAm da 2',3' nucleotídeo cíclico 3'fosfodiesterase (CNPase), que é o primeiro marcador protéico específico de oligodendrócito a surgir.

No SNC de mamíferos, os progenitores se dispõem pelos tratos das fibras onde será formada a substância branca e então se desenvolvem os préoligodendrócitos (POs). Estas células passam a ter mais prolongamentos, mas continuam tendo capacidade proliferativa. Apresentam o marcador O4 (Sommer and Schachner, 1981) e também o antígeno pró-oligodendroblasto (POA). Nesta etapa do desenvolvimento, as células ficam menos móveis (Orentas & Miller, 1996) ou até mesmo pós-migratórias (Pfeiffer et al., 1993), e deixam de apresentar resposta mitogênica ao PDGF (Gao et al., 1998, Hart et al., 1989, Pringle & Richardson, 1993). Então, os pré-oligodendrócitos se tornam oligodendrócitos imaturos. Em ratos, essas células são caracterizadas pelo surgimento do antígeno galactocerebrosídeo (GalC), pelas perdas da expressão dos antígenos de GD3 e A2B5 na superfície celular (Raff, 1989), e pela perda da PSA-NCAM (Fewou et al., 2007).

Existem alguns estágios que caracterizam o oligodendrócito maduro, como o aparecimento da proteína básica de mielina (MBP), a troca da expressão do transcrito de 20kDa (DM-20) pela isoforma de 35kDa da proteína proteolipídica (PLP), que é um sinal do começo do processo de mielinização (Kidd et al., 1990, Trapp et al., 1997), o surgimento da glicoproteína de oligodendrócito e mielina (MOG) (Solly et al., 1996), da proteína básica de oligodendrócito associada à mielina (MOBP) (Holz et al., 1996) e da glicoproteína associada à mielina (MAG). Haverá ainda a perda de prolongamentos que não se ligarem aos axônios (Hardy & Friedrich, 1996); isto permitirá que o número de oligodendrócitos existentes seja o necessário para que o processo de mielinização ocorra de forma satisfatória (Barres & Raff, 1999).

Como os oligodendrócitos maduros migram menos, a prevenção da diferenciação prematura da linhagem oligodendroglial é fundamental para garantir que os progenitores de oligodendrócitos cheguem ao local correto da maturação celular. O término da maturação é realmente prevenido por vários mecanismos de inibição, capazes de regular a localização e a extensão da oligodendrogliogênese, restringindo a especificação das células precursoras de oligodendrócitos e a sua diferenciação (See & Grinspan, 2009). Uma via responsável por esta regulação é a via da Notch (Shrager & Novakovic, 1995). A figura 2 resume as mudanças morfológicas e a aquisição de marcadores fenotípicos ao longo da linhagem oligodendroglial.



### Figura 2 - Estágios de diferenciação da oligodendroglia

### Proliferação

Legenda: Esquema representativo da classificação morfológica nas diferentes fases de maturação oligodendrocítica. Seguem listados os marcadores expressos nos diferentes estágios de desenvolvimento. PDGF-Rα: Receptor α do fator de crescimento derivado de plaquetas; NG2: Proteoglicano

sulfato condroitina CSPG4/NG2/MCSP; PSA-NCAM: Forma embrionária polisialilada da molécula de adesão celular neural; FABP7: Proteína 7 de ligação de ácidos graxos; CNPase: 2'3'-nucleotídeo-cíclico 3'-fosfodiesterase; GalC: Galactocerebrosídeo; MBP: Proteína Básica de Mielina; MAG: Glicoproteína associada à mielina; PLP: Proteína proteolipidica.

Fonte: Modificado de Barateiro & Fernandes, 2014.

Análises *in vitro* sugerem que a maturação dos oligodendrócitos do estágio de precursor para célula madura em cultura é idêntica ao *in vivo*, mesmo na ausência de neurônios. Sugerindo assim que a capacidade dos progenitores de oligodendrócitos em se diferenciarem em oligodendrócitos maduros é intrínseca da própria linhagem celular (Temple & Raff, 1986, Lee, et al., 2012, Lee et al., 2013). Na ausência de neurônios, os oligodendrócitos são capazes de formar uma membrana semelhante à mielina (Sarlieve et al., 1983). Porém, em co-culturas com neurônios, a expressão de genes de mielina como *plp, mbp* e *mag* aumentam (Macklin et al., 1986, Matsuda et al., 1997). Já a presença da MOG mantém a relação com os estágios mais tardios de desenvolvimento do oligodendrócito (Solly et al., 1996).

Em relação à geração das células, os oligodendrócitos possuem diferentes origens que estão relacionadas aos diferentes estágios do desenvolvimento neural do indivíduo. Em mamíferos, nas etapas tardias da gestação e em períodos precoces pós-natais, podem ser encontrados na zona subventricular (SVZ), a maior fonte de astrócitos, que podem se originar também da glia radial, e de oligodendrócitos. A maturação desses dois tipos celulares acontece em sua grande maioria em período precoce pós-natal (Baumann & Pham-Dihn, 2001). No córtex de mamíferos, tanto neurônios quanto glia têm origem nas células neuroepiteliais do ventrículo telencefálico e na SVZ (Doetsch et al., 1997). A SVZ é uma mistura de precursores de linhagem restrita ou multipotentes (Levison & Goldman, 1993) e vários fatores irão influenciar no destino, escolha e sobrevivência de todas as células (Jensen & Raff, 1997). Acredita-se que mesmo após o final do desenvolvimento, a via da Notch ajude a manter células-tronco e precursores em tecidos adultos, impedindo que estas células se diferenciem, deixando em aberto a possibilidade de que novas células sejam geradas para renovação ou em tecidos danificados (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). Mas já se sabe também que os progenitores são capazes de se renovarem proliferando durante toda a vida do indivíduo (Young et al., 2013) e com isso manterem uma densidade de progenitores constante mesmo em adultos (Rivers et al., 2008).

Essas características dos progenitores têm colocado essas células como as mais indicadas para a restauração da mielina do SNC que passa por demielinização, fazendo com que a geração dos progenitores mielinogênicos oriundos de células tronco humanas possa prover um reagente celular capaz de tratar todos os tipos de desordens demielinizantes (Goldman & Kuypers, 2015, Fox et al., 2014). Além disso, Wang e colaboradores (2013) descreveram que progenitores derivados de células tronco embrionárias humanas (hESC) e de enxertos de progenitores gliais derivados de células tronco induzidas pluripotentes (hiPSC) quando implantados em camundongos mutantes hipomielinizantes, incapazes de produzir MBP, foram capazes de se diferenciarem em células maduras capazes de formarem mielina com ultraestrutura correta e reconstituição dos nodos (Wang et al., 2013).

Outro ponto importante sobre o desenvolvimento celular são os fatores de transcrição. No desenvolvimento dos oligodendrócitos podemos ressaltar dois deles, OLIG1 e OLIG2. Estudos na medula espinhal de camundongos demonstraram que o OLIG2 promove a especificação de neurônios motores e de progenitores de

oligodendrócitos expressando PDGFR $\alpha$ . Aparentemente o OLIG1 nyo estaria relacionada com a formaŋyo dos progenitores, mas com a maturaŋyo deles visto que em camundongos com *Olig1*-nulos ocorreu o retardado na maturação dos progenitores (Lu et al., 2002; Xin et al., 2005). Além disso, focos de progenitores positivos para PDGR $\alpha$  foram observados no prosencéfalo de camundongos com *Olig2*-nulos, sendo mais abundante no rombencéfalo (Lu et al., 2002). Só foi possível remover os vestígios da formação dos oligodendrócitos com a ablação tanto do *Olig1* e do *Olig2* (Zhou et al., 2002).

### Mielinização

No sistema nervoso de humanos, a mielinização tem início na segunda metade da vida fetal na medula espinhal e se completa após o nascimento até cerca de 2 anos de idade, tendo o seu auge no primeiro ano após o nascimento (Peters et al., 1991). A mielinização pode continuar até os 20 anos de idade em algumas fibras corticais, principalmente nas áreas associativas. A formação da mielina geralmente tem origem perto do corpo celular e avança ao longo do axônio em direção a sua terminação (Yakovlev & Lecours, 1966). A quantidade total de mielina no SNC aumenta do nascimento à maturidade e algumas fibras individuais tornam-se muito mais mielinização ocorre caudorostralmente, enquanto na medula espinhal ocorre rostrocaudalmente (Yakovlev & Lecours, 1966).

A bainha de mielina em si é uma membrana rica em lipídeos empilhada que envolve os axônios. A presença dela altera as propriedades elétricas da região do axônio, criando uma região de alta resistência e de pouca capacitância. Estas propriedades irão permitir a rápida propagação dos impulsos nervosos. Já que o potencial de ação percorre o axônio envolvido pela bainha de mielina mais rapidamente até a porção descoberta do axônio (condução saltatória) nos nódulos de Ranvier, aumentando a eficiência da neurotransmissão (Keirstead & Blakemore, 1999; Kotter et al., 2011).

Ainda existem lacunas no que se refere ao que define se um axônio será mielinizado ou não. Um dos fatores seria a espessura do axônio, em geral é

necessário um calibre mínimo em torno de 1µm. Uma possível razão para isso é o fato de que a condução saltatória pode não ser tão efetiva em axônios com calibres pequenos (Sherman & Brophy, 2005). Contudo é possível encontrar no SNC axônios de calibres menores que podem ser mielinizados (Mitew et al., 2013). O axônio escolhido não é mielinizado em todo seu comprimento ao mesmo tempo, o que nos permitia inferir que existissem outros fatores além do diâmetro capazes de definir quando o axônio seria mielinizado ou não (Suzuki & Raisman, 1994).

Para que o processo de mielinização ocorra, além do processo migratório da oligodendroglia, é necessária a ligação dos prolongamentos do oligodendrócito com o axônio, a espiralação do prolongamento ao redor do axônio, com um número de membranas já pré-determinado e o reconhecimento de espaços não mielinizados que formarão os nódulos de Ranvier (Baumann & Pham-Dihn, 2001). O envolvimento feito pela mielina é então seguido pela compactação dela, na qual o citoplasma das células mielinizantes é na sua maioria excluído. Este processo da bainha de mielina dá a sua disposição concêntrica característica vista na microscopia eletrônica (Sherman & Brophy, 2005).

É possível que o axônio tenha participação no controle da regulação da espessura da bainha de mielina, já que um oligodendrócito é capaz de mielinizar vários axônios com diferentes tamanhos, formando bainhas mais grossas ao longo de axônios mais grossos (Waxman & Sims, 1984). Isto indica que de alguma maneira o axônio controle o número de lamelas formadas. Os oligodendrócitos são extremamente adaptáveis para a produção apropriada da quantidade de mielina, por isso a quantidade produzida por um oligodendrócito pode variar bastante, assim um número pequeno de oligodendrócitos não indica necessariamente pouca quantidade de mielina (Skoff & Guandour, 1995, Almeida et al., 2011). Um único oligodendrócito é capaz de produzir mais de 40 segmentos de mielina em diferentes axônios, com isso os oligodendrócitos são capazes de produzir de 5 a 50 x 10<sup>3</sup> µm<sup>2</sup> de membrana por dia (Pfeiffer et al., 1993). Foi demonstrado também a participação dos astrócitos nas etapas mais tardias do processo de envolvimento do axônio em um processo associado a liberação do fator inibitório de leucemia (LIF) ou contribuindo com pacotes de lipídeos (Ishibashi et al., 2006; Sorensen et al., 2008; Watkins et al., 2008)

Este processo exige dos oligodendrócitos uma grande capacidade de sintetizar membranas em um tempo específico, correto para cada espécie e região do SNC

(Schwab & Schnell, 1989), sendo aproximadamente 5 horas no desenvolvimento do *zebrafish* e 12 horas em culturas mielinizantes de células derivadas de roedores (Watkins et al., 2008, Czopka et al., 2013). O processo é tão fortemente regulado, tendo as etapas da mielinização precisas sendo possível definir qual a idade do feto apenas observando quais etapas da mielinização já foram cumpridas. Isto sugere que há mecanismos de sinalização regulando não só as etapas da diferenciação do oligodendrócito, mas também o processo de mielinização em si (Baumann & Pham-Dihn, 2001). Diante dos diferentes fatores envolvendo este processo Mitew e colaboradores afirmam em sua revisão que diferentes estudos *in vitro* relacionam diferentes vias de sinalização como importantes ao processo de mielinização e nenhuma molécula se mostrou indispensável, demonstrando o grande controle existente (Mitew et al., 2013).

Um único oligodendrócito amadurece todos os seus prolongamentos ao mesmo tempo e em um mesmo comprimento (Butt & Ranson, 1989). Estudos demonstraram que o controle da diferenciação dos oligodendrócitos e da mielinização é realizado por diferentes vias como as da Notch, a mesma via responsável por manter células-tronco para reserva, e da cinase serina/treonina / alvo para rapamicina de mamíferos (AKT/mTOR) (Baumann & Pham-Dihn, 2001, Flores et al., 2008, Narayanan et al., 2009, Goebbels et al., 2010),. Outro fator importante para o controle da mielinização é o hormônio tireoideano (Bernal 2007, Darras 2008), ratos com hipertireoidismo do período neonatal até 17 dias de idade apresentaram mielinização adiantada com o aumento no total das proteínas MBP, PLP e CNPase (Adamo, et al., 1990, Marta et al., 1998,) e camundongos com demielinização induzida passaram pelo processo de remielinização após injeções de T3, com a restauração dos níveis das proteínas de mielina como MBP e PLP (Harsan et al., 2008, Zendedel et al., 2016).

Além disso, cada vez são maiores as evidências de que a bainha de mielina age no suporte trófico às demandas metabólicas dos axônios. Camundongos transgênicos com a ausência do gene decodificador da PLP apresentaram degeneração dos axônios a longo termo, mesmo na presença de bainhas de mielina estruturalmente normais (Griffiths et al., 1998). Indicando que os oligodendrócitos desempenham papel importante na integridade dos axônios independente da capacidade deles de formarem a bainha de mielina. Acrescenta-se a isso o fato dos produtos da glicólise em oligodendrócitos poderem se difundir através dos transportadores de monocarboxilato das alças paranodais para o axônio, sendo utilizados como substrato energético (Lee et al. 2012; Saab et al., 2013).

#### Proteínas constituintes da mielina

As proteínas compõem 30% do peso seco da mielina (Campagnoni & Macklin, 1988) e são componentes específicos de mielina e de oligodendrócitos. A MBP e a PLP, com sua isoforma DM-20, são as principais proteínas da mielina em termos de quantidade, sendo responsáveis por 80% do total de proteínas (Baumann & Pham-Dihn, 2001). A CNPase é o marcador protéico mais precoce de oligodendrócitos e responde por 4% do total de proteínas de mielina (Amur-Umarjee et al., 1990, Barradas et al., 1995, Barradas et al., 1998, de Monasterio-Scrader et al., 2012). Além disso, a CNPase também é expressa em células gliais que não formam mielina como células de Schwann não mielinizantes, células embainhantes olfatórias e micróglia ativada (Omar et al, 2011, Toma et al., 2007, Wu et al., 2006).

Estudos *in vitro* demonstraram a importância da CNPase nas fases iniciais de mielinização. A CNPase é essencial para o crescimento dos prolongamentos de oligodendrócitos devido à sua associação com a membrana, bem como a sua capacidade de interagir com o citoesqueleto (ver abaixo) (Lee et al., 2005). Entretanto sua verdadeira relevância fisiológica, não é clara, uma vez que a mielinização em camundongos com deleção do gene da CNPase parece prosseguir normalmente, e aberrações neuronais aparecem meses mais tarde, juntamente com alterações comportamentais (Lappe-Siefke et al., 2003). Isto sugere que na ausência de CNPase, sua possível função fisiológica na promoção do crescimento dos prolongamentos de oligodendrócitos seja compensada por outros fatores ainda desconhecidos, mas, no entanto, após a mielinização o papel da CNPase pode ser crucial para a manutenção axonal (Raasakka & Kursula, 2014).

Existem duas isoformas dessa proteína com seus pesos estimados em 46 kDa para a CNPase1 e 48 kDa para a CNPase 2 (Sprinkle, 1989). A CNPase2 possui 20 aminoácidos a mais na sua composição e ambas têm origem do *splicing* alternativo do mesmo gene e são formadas a partir do RNAm para CNPase2 (Tsukada e Kurihara, 1992). As duas isoformas podem ser geradas tanto *in vitro* como *in vivo* e isso se dá pela utilização de dois "códons" de iniciação da CNPase 2, o primeiro códon está relacionado com a própria CNPase2 e o outro com a CNPase1.

Como já mencionado, a CNPase atua no crescimento dos prolongamentos dos oligodendrócitos, induzindo a reorganização precoce das proteínas de citoesqueleto. Em estágios avançados de desenvolvimento do oligodendrócito, a CNPase se localiza nas porções de mielina não compacta, como as alças paranodais, e atuam na manutenção da bainha de mielina através da ligação com dímeros de tubulina e na polimerização de microtúbulos (Bauer et al., 2009). O padrão de distribuição dessa proteína muda durante o processo de diferenciação da oligodendroglia. Inicialmente ela se encontra distribuída na face interna da membrana plasmática, formando com actina e tubulina o esqueleto sub-membranoso (Dyer, 2002).

No estágio maduro do oligodendrócito as isoformas da MBP são expressas e localizadas em domínios entre as redes de microtúbulos (Brophy, 1992; Dyer, 2002). A característica hidrofóbica da MBP propicia a forte interação desta com fosfolipídeos de membrana, deslocando a CNPase. A CNPase então, migra de regiões com MBP para as estruturas microtubulares semelhantes a nervuras, assim as nervuras de citoesqueleto possuem uma parte central de microtúbulos envolto pela CNPase onde os filamentos de actina estão ligados e agrupados em forma de feixe (Dyer et al., 1997). Assim, o segundo estágio de desenvolvimento da bainha parece resultar na compactação de regiões da bainha de mielina contendo MBP, com o fluido permanecendo nas estruturas de citoesqueleto semelhantes a nervuras (incisuras de Schmidt-Lanterman). O estágio final de desenvolvimento da bainha de mielina in vivo ocorre quando o fluido nas "nervuras de citoesqueleto" é perdido, e a junção dos domínios MBP acontece. Após esses eventos, somente uma pequena quantidade de fluido, nas incisuras Schmidt-Lanterman e nas alças interna e externa, permanece na mielina (Dyer, 2002). Recentemente foi sugerido que um equilíbrio entre a CNPase e a MBP regula a taxa de compactação durante o desenvolvimento (Snaidero et al., 2014).

Essas relações com as proteínas de citoesqueleto torna a CNPase uma das constituintes do complexo molecular capaz de regular e modular a expansão e migração da membrana do oligodendrócito. Já foi demonstrado que este complexo é funcionalmente ativo antes e durante o processo de formação da mielina *in vivo*. A interação com outras proteínas e a translocação para a membrana são favorecidas

pelo fato da CNPase ser isoprenilada (Bifulco, 2005; Lee et al., 2005; Esposito et al., 2008).

Entretanto, a atividade enzimática da CNPase continuou sendo um enigma até bem recentemente. Estudos tem sugerido que a via 2',3'-AMPc-adenosina é funcional *in vivo* no SNC. As evidências que suportam esta hipótese são: 1) 2', 3'-AMPc, 2'-AMP, 3'-AMP e adenosina estão presentes no liquor de pacientes com trauma encefálico; 2) o cérebro de camundongo *in vivo* metaboliza 2',3'-AMPc a 2'-AMP e 3'-AMP; 3) o cérebro de camundongo *in vivo* metaboliza 2',3'-AMPc a 2'-AMP e 3'-AMP; 3) o cérebro de camundongo *in vivo* metaboliza 2'-AMP and 3'-AMP a adenosina; e 4) lesões corticais em camundongos elevam os níveis intersticiais de 2',3'-AMPc, 2'-AMP, 3'-AMP e adenosina (Verrier et al. 2012).

A CNPase, 2 ', 3'- nucleotideo cíclico -3'-fosfodiesterase, metaboliza 2 ', 3'-AMPc a 2'-AMP no cérebro do rato *in vivo* e este mecanismo proporciona uma importante fonte de produção local de adenosina pós-injúria cortical (Verrier et al. 2012). Este potencial enzimático para metabolizar 2 ', 3'-nucleotideos cíclicos a 2'nucleotideos *in vitro* foi intrigante, porque até a detecção recente de 2 ', 3'-de AMPc *in vivo*, o seu substrato endógeno era desconhecido. Como os oligodendrócitos mantém a expressão da CNPase ao longo do tempo isso os torna bastante eficientes na metabolização desses nucleotídeos (Verrier et al., 2013). Curiosamente, o rato knockout CNPase exibe uma neuropatia progressiva com apenas ligeiras alterações ultra-estruturais, para a mielina. Tem sido proposto que a falta de CNPase nos oligodendrócitos inibe um mecanismo de suporte trófico de células gliais essencial para os axônios (Edgar et al., 2009), embora nenhum desses fatores tenha sido ainda identificado.

Entre as várias outras proteínas que constituem a mielina encontramos também a glicoproteína associada à mielina (MAG), que se apresenta em menor quantidade, cerca de 1% do total de proteínas existentes. Essa proteína apresenta dois domínios: um transmembrana e um extracelular contendo cinco domínios com homologia interna semelhante a domínios de imunoglobulinas (Salzer et al., 1987). A MAG foi descrita primeiramente como uma proteína ligante do ácido siálico capaz de interagir com o complexo de gangliosideos GT1 $\beta$  e GD1 $\alpha$ , mas depois foram descobertos os receptores NgR1, NgR2 e PirB, além de ser capaz de se ligar à integrina  $\beta$ -1 (Vinson et al., 2001, Domeniconi et al., 2002, Liu et al., 2002, Venkatesh et al., 2005, Atwal et al., 2008, Goh et al., 2008)

No SNC de ratos adultos, a MAG está localizada ao redor do axônio na bainha de mielina (Trapp et al., 1989). No SNC de camundongos *knock-outs* para MAG, a mielina se formou com poucas alterações. Um defeito surgido foi a não formação do colar citoplasmático ao redor do axônio na maioria das bainhas, justamente no local onde a MAG se localiza. Além disso, as bainhas de mielina apresentavam organelas citoplasmáticas entre as lamelas e isto é indicativo que tenha ocorrido um atraso ou o bloqueio da compactação da mielina. Axônios também foram mielinizados mais de uma vez na mesma região, sugerindo que a MAG tenha o papel de ajudar os prolongamentos dos oligodendrócitos a reconhecer axônios mielinizados ou não (Li et al., 1994, Montag et al., 1994). A MAG é expressa apenas em células mielinizantes, sendo enriquecida nas membranas da mielina em contato direto com o axônio (Trapp & Quarles, 1982). A MAG também está relacionada com a inibição do crescimento de neuritos e com a regeneração do SNC depois de uma lesão (Qiu et al., 2000, Filbin, 1996).

Duas isoformas da MAG foram identificadas: a de peso molecular maior (large) L-MAG e a de peso molecular menor (small) S-MAG, pesando 72 e 67 kDa, respectivamente (Frail et al., 1985, Salzer et al., 1987). Ambas possuem domínios extracelulares e transmembrana idênticos. diferindo apenas no domínio citoplasmático, essa diferença corresponde ao splicing alternativo do exon 12 de uma única cópia de RNA. Estudos descrevem que a L-MAG é expressa antes na mielinização de roedores e é predominante na mielina do SNC, enquanto a S-MAG é predominante no SNP (Frail et al., 1985). Essas diferenças podem explicar os fenótipos distintos apresentados pelos animais totalmente nulos e deficientes para L-MAG, indicando que o domínio citoplasmático da proteína é importante para a mielinização correta do SNC, mas não do SNP (Fujita et al., 1998). Em humanos a distribuição da L-MAG predominantemente SNC da S-MAG no е predominantemente no SNP também já foi demonstrada (Miescher et al., 1997).

Acredita-se que a L-MAG possa agir como receptor e isso é reforçado pela sua participação na ativação da tirosina cinase Fyn (Umemori et al., 1994), pelo seu sítio de fosforilação da tirosina (Jaramillo et al., 1994) e por sua interação com a proteína de ligação do cálcio S100-beta (Kursula et al., 1999). Já a S-MAG tem o papel de molécula de adesão que liga a superfície axonal com o citoesqueleto do oligodendrócito, isso se dá pelo fato dessa isoforma interagir com a tubulina e com os microtúbulos (Kursula et al., 2001).

Experimentos *in vitro* demonstraram que a MAG estimula o crescimento de neuritos em neurônios em estágios precoces de desenvolvimento, mas inibe esse mesmo crescimento em estágios mais maduros do desenvolvimento de neurônios (Mukhopadhyay et al., 1994; DeBellard et al., 1996). Sendo identificado que esse papel distinto é regulado pelos níveis endógenos do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Ocorrendo uma redução nos níveis de AMPc neuronal e uma redução na atividade *downstream* da PKA relacionada com uma alteração na resposta neuronal a MAG (Cai et al., 2001).

### Hormônio Tireoideano

A triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4) são sintetizadas na glândula tireóide, sendo reguladores importantes na fisiologia e no desenvolvimento dos vertebrados. Tem papel fundamental na maturação e manutenção do SNC. Em períodos críticos do desenvolvimento a ausência do hormônio causa alterações nas estruturas e no funcionamento do sistema nervoso, entre eles o atraso na diferenciação neuronal e da oligodendroglia (Bernal & Nunez, 1995, Rodriguez-Peña et al., 1993; Barradas et al., 2000, Morreale de Escobar et al., 2004, Wallis et al., 2010).

No desenvolvimento da linhagem oligodendroglial o T3 possui pelo menos três funções distintas: o controle da proliferação de células precursoras, a regulação da expressão gênica de componentes de mielina e a ativação da expressão de um ou mais fatores de sobrevida para os oligodendrócitos. Além disso, a regulação dependente de T3 dos processos citados ocorre apenas em estágios distintos de desenvolvimento do oligodendrócito e, no mínimo, para a expressão gênica das proteínas de mielina e sobrevida dos oligodendrócitos, e estes efeitos são transitórios (Jones et al., 2003).

Em cérebros de roedores neonatos a deficiência do hormônio tireoideano causa o atraso na diferenciação neuronal (Bernal & Nunez, 1995) e da oligodendroglia (Rodriguez-Peña et al., 1993; Barradas et al., 2000) com consequências no processo de mielinização (Rodriguez-Peña, 1999). Além disso, cérebros hipotireoideos tiveram redução do conteúdo total de mielina (Walters & Morell, 1981; Noguchi & Sugisaki, 1984; Guardaño-Ferraz et al., 1994), na atividade

enzimática relacionada à síntese de glicolipídeos de mielina (Sarliéve et al., 1983) e nos níveis de RNAm de proteínas de mielina (Muñoz et al., 1991; Rodriguez-Peña et al., 1993; Ibarrola & Rodriguez-Peña, 1997; Pombo et al., 1998). Foi demonstrado também que a administração de T3 foi capaz de estimular a remielinização em camundongos que passaram por desmielinização causada por cuprizona, indicando o papel do hormônio na maturação da oligodendroglia, contudo esta administração não seria capaz de direcionar precursores para a linhagem oligodendroglial (Zendedel et al., 2016).

Já foi demonstrado em nosso laboratório que a imunorreatividade à CNPase em fibras mielinizadas, embora em número menor de fibras nos animais hipotireoideos durante o desenvolvimento, apresentou-se de forma contínua, delineando grosseiramente as fibras nervosas (Barradas et al., 2000), indicando uma menor compactação da bainha de mielina nestes animais, visto que a CNPase permanece na mielina madura apenas nas regiões de mielina não compacta (alças interna e externa e alças para-nodais). Ainda em nosso laboratório foi visto em animais hipotireoideos que a expressão da MBP e da CNPase sofrem um atraso no desenvolvimento (Barradas et al., 2001), mas atingem níveis normais na vida adulta. Porém, a PLP e a MOBP, estão permanentemente alteradas pelo hipotireoidismo (Barradas et al., 2001).

Além disso, ao observamos a interação oligodendrócito-axônio e a morfologia da bainha de mielina (Ferreira et al., 2004) notamos que os axônios do corpo caloso dos ratos hipotireoideos apresentaram características de imaturidade já conhecidas, como redução do diâmetro do axônio (Gravel et al., 1990), mas também apresentaram comprometimento da organização da estrutura da bainha de mielina com aumento da frequência de figuras de mielina (Dupree et al., 1998). Em 2006, nosso grupo demonstrou *in vitro* os efeitos da ausência do T3 em culturas de oligodendrócitos. Em culturas de oligodendrócitos com T3 era possível observar a redução no número de células em estágios de progenitores e pré-oligodendrócitos ao longo dos dias, sendo mais acentuada a redução após 10 dias *in vitro*. Esta redução cra acompanhada ainda pelo aumento no número de células maduras, mais acentuado também após 10 dias, indicando que as células passaram pelo processo de diferenciação celular. Contudo, quando foram observadas as culturas em deficiência de T3 notava-se que a quantidade de células nos estágios de progenitores e pré-oligodendrócitos praticamente eram mantidos com o número de

células maduras bem menor quando comparados com as culturas controle, principalmente nas culturas com 10 dias (Figura 3), demonstrando com isso que a ausência de T3 nas culturas poderia contribuir para um retardo no processo de diferenciação dos oligodendrócitos (Younes-Rapozo et al., 2006).

Os efeitos dos hormônios tireoideanos no SNC se dão principalmente através de seus receptores em regiões reguladoras do DNA para ativar ou reprimir a transcrição gênica com a interseção de co-reguladores (Schroeder & Privalsky, 2014). Os receptores são codificados por dois *loci* distintos: THRα e THRβ, os dois são expressos através de RNAms oriundos de *splicing* alternativo (Rosen et al., 2009). Duas das isoformas mais importantes são as TRα1 e TRβ1, nas quais o hormônio tireoideano se liga, e que apresentam papéis distintos (Chan et al., 2009).

 Figura 3 - Linha do tempo das mudanças no número de células em culturas controle
(C) e em deficiência de T3 (-T3) agrupadas pelo fenótipo indicado pela morfologia celular e expressão de CNPase



Legenda: O número de células com o fenótipo de progenitor (P) reduz do dia 3 ao 10 div (P<0,048). Nos pré-oligodendrócitos (PO) o número de células nas culturas controle aumentou do dia 3 ao dia 10 div enquanto o oposto foi observado nas culturas –T3, resultado que explica a interação significante (P<0,028) entre os fatores Tratamento (C e –T3) e Dias (3, 7 e 10 div). Há um aumento significativo (P<0,021) no fenótipo maduro (M) do dia 3 ao 10 div em ambas as culturas, com o número de oligodendrócitos M nas culturas controle significativamente maior (P<0,036).

TRα1 é expresso em estágios precoces do desenvolvimento embrionário e depois amplamente distribuído nos adultos enquanto o TRβ1 pode ser encontrado em estágios tardios do desenvolvimento embrionário e com um padrão de expressão mais restrito nos adultos (Calvo et al., 1990, Murata, 1998, Chatonnet et al., 2013).

Em 2005 Bergh e colaboradores identificaram a integrina αvβ3 como um receptor análogo ao do hormônio tireoideano (Bergh et al., 2005), o que possibilitou a identificação de efeitos não genômicos relacionados ao hormônio, como por exemplo a organização do citoesqueleto de actina (Davis et al., 2008). Ações não genômicas do hormônio tireoideano são independentes de ligantes intranucleares e dos receptores do hormônio e consideradas como atividades de início rápido (Kopp & Jameson, 1998; Chin & Yen, 2003; Davis et. al., 2011). Foi observado que o T3 é capaz de agir no desenvolvimento de astrócitos induzindo a diferenciação morfológica e a maturação celular podendo ser a sua atuação na ativação das vias

Fonte: Younes-Rapozo et al., 2006.

da MAPK/ERK e do AMPc/PKA. Além disso, a literatura demonstra que os níveis de AMPc podem ser aumentados pelo hormônio tireoideano e que o hormônio é capaz ainda de modular a fosforilação dos filamentos intermediários via PKA no córtex cerebral (Zamoner et al., 2006).

Na oligodendroglia, a distribuição de proteínas também é alterada em deficiência de T3, tanto *in vitro* (Younes-Rapozo et al., 2006), com alterações na distribuição de proteínas do citoesqueleto como a CNPase e a tubulina, como *in vivo*, com alteração na distribuição da CNPase, MBP e PLP (Ferreira et al., 2007) o que sugere que também nessas células o hormônio tireoideano exerça efeitos não genômicos, mediados pela ação do T3 sobre a integrina αvβ3 e sua relação com as vias de sinalização.

#### Vias de sinalização

As células necessitam das informações extracelulares para conseguirem se adaptar e se desenvolver, mas para isso essas informações precisam ser convertidas em respostas intracelulares. Isto pode resultar em reprogramação da expressão gênica, estabilidade do RNAm ou tradução protéica. Este reconhecimento se utiliza de uma rede de cascatas de sinalização interconectadas, com as proteínas cinases sendo elementos chave. Muitas doenças têm o seu começo em alterações das vias de sinalização, incluindo aterosclerose, diabetes e câncer. As proteínas cinases e outras enzimas relacionadas às vias de sinalização se tornaram alvos para o desenvolvimento terapêutico (Palacios et al., 2007).

Younes-Rapozo e colaboradores demonstraram em 2009 que a inibição da via da proteína cinase ativada por mitógenos e cinase regulada por sinal extracelular (MAPK/ERK) em oligodendrócitos *in vitro* altera a morfologia dos oligodendrócitos. Após o tratamento, as células apresentaram um aumento no número de células com morfologia imatura e ainda um aumento de oligodendrócitos maduros com morfologia arredondada, sem prolongamentos. Sugerindo a importância desta via para a estabilização, mesmo que indiretamente, dos véus de membrana. Na oligodendroglia, esta via é importante tanto para a sobrevivência como para progressão da diferenciação (Bhat & Zhang, 1996; Baron et al., 2000; Colognato et
al., 2002; Laursen & French-Constant, 2007). Um dos alvos da via da ERK durante a diferenciação é a proteína de ligação ao elemento responsivo ao cálcio/AMP cíclico (CREB), um fator chave comumente envolvido no crescimento celular em resposta a fatores de crescimento e implicado na expressão de genes relacionados à mielina (Baron et al., 2000; McNulty et al., 2001; Bhat et al., 2007).

É sabido que a ativação da via da MAPK/ERK pode ser regulada pela PKA (proteína cinase dependente de AMPc), pois a PKA é fortemente, porém transitoriamente, ativada pelo destacamento celular. Quando esta atividade é inibida pode ocorrer o atraso da inativação de certas proteínas ativadas por adesão celular como a cinase ativada por p21 (PAK), a cinase de adesão focal (FAK), paxilina e da ativação da ERK (Howe et al., 2002). Muitos aspectos da atividade da FAK e da PAK, assim como a integridade do citoesqueleto de actina, podem ser regulados pela PKA (Figura 4) para que ocorra a ativação da ERK em resposta a sinais de adesão (Aplin & Juliano, 1999; Howe et al., 2002).



# Figura 4 - Representação esquemática da interação entre as vias da MAPK/ERK e do AMPc/PKA

Legenda: A adesão mediada por integrinas influencia a ativação da ERK em diferentes estágios: ativação dos receptores tirosina cinase (1); ativação da MEK através de cinases citosólicas como, por exemplo, a PAK (2); ativação da ERK que, posteriormente vai se translocar para o núcleo para ativação de fatores de transcrição (3). A ativação da adenilato ciclase mediada pela ligação ao GPCR libera o AMPc que irá ativar a PKA (4). A PKA ativada é capaz de ativar o CREB e também a ERK (5). Além disso, irá inibir a atividade da PAK ativada por integrina via FAK e Pax (6). A Pax inibida acaba não conseguindo ativar a Raf que pode ser ativada pelo receptor tirosina cinase via Ras e irá ativar a MEK e consequentemente a ERK.

MEK: cinase ativada por mitógenos; ERK: cinase regulada por sinal extracelular; FAK: cinase de adesão focal; Pax: paxilina; PAK: cinase ativada por p21; GPCR: receptor acoplado à proteína G; AC: adenilato ciclase, AMPc: monofostato cíclico de adenosina; PKA: proteína cinase dependente de AMPc; CREB: proteína de ligação ao elemento responsivo ao cálcio/AMP cíclico.

Fonte: Felgueiras, 2012.

## A via do AMPc/PKA

A regulação diferencial e a distribuição distinta nos tecidos das diferentes isoformas da adenilato ciclase permitem a estas enzimas integrar e interpretar sinais celulares frequentemente opostos, tornando-as enzimas chave de suas vias de sinalização (Scholich et al., 1999, Patel et al., 2001, Scholich et al., 2007, Pierre et al., 2004), como a via do AMPc/PKA, por exemplo. A adenilato ciclase é constituída por uma pequena e variável terminação amino, seguida por um par (M1 e M2) de

seis porções transmembrana e dois domínios citoplasmáticos formadores do sítio catalítico de aproximadamente 40KDa cada (C1 e C2) (Tang et al., 1995, Tesmer et al., 1997, Tesmer et al., 1999). A estrutura terciária dos domínios citoplasmáticos é quase idêntica e, juntas, formam uma enzima pseudossimétrica (Tesmer et al., 1997; Zhang et al., 1997).

A identificação de estruturas cristalinas, aliada aos dados bioquímicos (Dessauer et al., 1997), mostrou que o ATP se liga a um dos dois sítios de ligação, pseudossimétricos, na interface C1-C2. A porção catalítica desta enzima inclui um subsítio ligante a purina derivado do domínio C2 que gera resíduos que se liga especificamente a adenina do substrato (Pierre et al., 2009). É esta ligação do ATP com a adenilato ciclase que formará o monofostato de adenosina cíclico (AMPc).

O AMPc é um segundo mensageiro importante no desenvolvimento e proliferação celular. Em mamíferos ele é o resultado da ativação de nove moléculas de adenilato ciclase ligadas à membrana e uma solúvel, todas com diferentes padrões de regulagem e de expressão (Pierre et al., 2009). O AMPc também tem influência no desenvolvimento do oligodendrócito (McMorris, 1983; Raible & McMorris, 1989, 1990, 1993; Sato-Bigbee & De Vries, 1996; Afshari et al., 2001). Em sua maioria, os seus efeitos são relacionados apenas com a ligação dele com a proteína cinase dependente de AMPc (PKA) (Figura 5, adaptado de Alberts et al., 2004), compondo um modelo linear onde se acredita que a ligação citada seja o começo da via. Contudo, outros estudos já mostraram que ambos possuem atividade em vias diferentes. Assim, a expressão AMPc/PKA fará alusão a esse eixo formado pela interação entre ambos, sem o intuito de sugerir que ambas estão relacionadas de forma inexorável e idêntica em suas ações.



#### Figura 5 - Esquema representativo da via do AMPc/PKA

Legenda: A ligação de uma molécula sinalizadora extracelular a um receptor associado à proteína G causa a ativação da adenilato ciclase e consequentemente aumento da concentração de AMPc. Esse aumento ativa a PKA no citosol, e as subunidades catalíticas liberadas vão para o núcleo, lá fosforilam a proteína reguladora CREB. Uma vez fosforilada, a CREB recruta o co-ativador CBP, que irá estimular a transcrição gênica.
Fonte: Adaptado de Alberts et al., 2004.

Quanto à composição da PKA, ela é uma enzima heterotetramérica formada por duas unidades regulatórias (R) e mais duas catalíticas (C). Nas duas unidades R existem quatro subunidades que são codificadas por quatro genes (RIa, RIh, RIIa e RIIh). O tipo de PKA – tipo I e tipo II – são definidos pelo tipo de subunidade R que elas possuem. Essas subunidades apresentam como função: manter a holoenzima inativa inserindo um pseudo-substrato (para subunidades RI) ou um substrato real (para subunidades RII) na fenda catalítica da subunidade C; traduzir os níveis do AMPc dentro da célula em atividade fosfodiesterase, pois elas liberam a subunidade C ativa através da ligação cooperativa de duas moléculas de AMPc por uma molécula de R; o N-terminal de cada subunidade R medeia a dimerização, o que dirige a formação da holoenzima heterotetramérica e é crucial para a ligação cooperativa do AMPc interagir com as proteínas de ancoragem cinase-A ou AKAPs (Howe, 2004). A subunidade C, por sua vez é codificada por três genes (a, h e g). A PKA é ativa em vários sítios celulares (Shabb, 2001), com alvos na membrana, citoplasma, mitocôndria, núcleo e em quase toda a rede do citoesqueleto, incluindo microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos de actina (Howe, 2004). São várias as consequências da atividade dessa proteína cinase assim como seus alvos, por isso é importante cada vez mais se focar ou especificar a atividade desta proteína cinase.

Estudos mostraram sinais distintos do AMPc ocorrendo em diferentes regiões subcelulares (Zaccolo et al., 2002) e que a PKA do tipo I possui mais afinidade com o AMPc em relação a PKA do tipo II (Francis et al., 1999). Isto permite uma hipótese simples, porém altamente plausível na qual a baixa afinidade da PKA do tipo II permite a enzima ancorada a responder apenas a concentrações locais e elevadas do AMPc. Este efeito acaba por criar locais-específicos para a interpretação e disseminação espacial de diferentes sinais do AMPc. Isto é importante para a sinalização espacial na mielinização, uma atividade que necessita da distribuição de diferentes atividades enzimáticas em diferentes localizações subcelulares.

Em células da glia embainhante olfatória (células que produzem envoltórios de axônios sem, no entanto, produzirem lamelas compactas de mielina), cultivadas *in vitro,* foi demonstrado que a ativação do AMPc altera tanto a morfologia celular como o padrão de imunorreatividade da CNPase, que passa de um padrão puntiforme para um padrão tracejado, formando nervuras. Contudo, quando a PKA foi inibida ocorreu a redução da expressão da CNPase e indução da expressão da MBP que não costuma ser expressa neste tipo celular (Silva, 2003).

Em relação à linhagem oligodendroglial, Raible e McMorris demonstraram que a sinalização via AMPc é capaz de atuar na interrupção da proliferação celular e estimular o desenvolvimento celular por vias sem relação entre si (Raible & McMorris, 1993). Especificamente o AMPc e a ativação da PKA são sinais que levam a expressão dos genes da MBP e da CNPase (Clark et al., 2002; Gravel et al., 2000). Além disso, o AMPc também pode fosforilar a CNPase (Agrawal et al., 1994), levar a expressão da PLP (Afshari et al., 2001) e inibir a expressão dos receptores de PDGFRα (Li & Wang, 2011). O AMPc também parece estar relacionado com a produção da proteína MAG. Um trabalho com cultura de uma linhagem transfectada com um oncogene que mantem as células em estado de precursores (Olig-Neu) demonstrou que antes das células serem estimuladas com AMPc, a L-MAG era a

isoforma predominante, porém, após o tratamento com AMPc, a S-MAG passou a ser a isoforma majoritária nessas células (Erb et al., 2003).

Já foi demonstrado que o AMPc promove o crescimento e extensão de neuritos, via adenilato ciclase e PKA, em culturas de motoneurônios (Aglah et al., 2008). Em co-culturas de oligodendrócitos e neurônios dos gânglios da base (DRG) quando os níveis de AMPc foram elevados utilizando forscolina, rolipram ou dB-cAMP ocorreu também o aumento na quantidade de segmentos de axônios mielinizados (Malone et al., 2013). Dados na literatura indicam que a adesão celular mediada por integrinas utiliza a PKA para modular os eventos como a dinâmica e migração do citoesqueleto de actina (Howe, 2004).

A PKA fosforila diretamente a RhoA o que acaba por inibir a atividade desta na extremidade das células migratórias (Tkachenko et al., 2011). A PKA também pode ativar, indiretamente, a Rac1 e a Cdc42 (Figura 6). Esses componentes da via do AMPc/PKA são proteínas associadas ao citoesqueleto chamadas de Rho – guanosina trifosfatases (Rho GTPases). Uma das funções dessas proteínas é a de regular o citoesqueleto em resposta a fatores externos, como fatores de transcrição e moléculas de adesão. Em astrócitos, a Rac1 e o Cdc42 se localizam na ponta dos prolongamentos e são importantes para uma migração eficiente (Bacon et al., 2007).

Na oligodendroglia, essas proteínas são capazes de regular a mielinização de forma refinada e orquestrada (Feltri et al., 2008). *In vitro*, progenitores de oligodendrócitos expressam RhoA e, com o avanço da diferenciação, aumenta a expressão de Cdc42 e Rac1. Estes possuem papel oposto ao primeiro, a RhoA é um regulador negativo da diferenciação de oligodendrócitos, que inibe a extensão dos prolongamentos, enquanto Cdc42 e Rac1 agem como reguladores positivos da diferenciação morfológica, induzindo a extensão e ramificação dos prolongamentos (Liang et al., 2004).





Legenda: A ativação da adenilato ciclase leva ao aumento dos níveis de AMPc. Este aumento causará a ativação da PKA que por sua vez irá estimular a ativação das Rho GTPases Rac1 e Cdc42 e a inibição da RhoA. Quando ocorre a inibição da adenilato ciclase temos a redução nos níveis do AMPc que irá causar a redução da atividade da PKA e consequentemente temos a inibição das Rac1 e Cdc42 e ativação da RhoA. Fonte: Felgueiras, 2016.

Além disso, a ablação de *cdc42* ou *rac1* leva a um fenótipo particular de mielina, caracterizado por acúmulo anormal de grande quantidade de citoplasma nas alças internas e lamelas mais internas dos prolongamentos embainhantes de oligodendrócito com a concomitante formação de mielina irregular (Thurnherr et al., 2006).

#### RhoGTPases

As RhoGTPases, pequenas guanosinas trifosfatases, são *switches* moleculares que integram os estímulos extracelulares às diversas respostas celulares. Isto é possível por causa da rede de proteínas que regulam a atividade das RhoGTPases através de diferentes efetores celulares (Feltri et al., 2008).

A família destas proteínas é formada por um subgrupo da superfamília Ras de proteínas ligadas à GTP com o peso entre 20 e 30 kDa. É identificada pela presença de um domínio α-helicoidal de aminoácidos, chamado Rho (Johnson, 1999). Essas

proteínas são expressas ubiquamente desde as leveduras até os mamíferos, mostrando que elas acompanham o processo evolutivo dos seres vivos. Nos mamíferos existem 20 tipos diferentes de RhoGTPases que dividem mais de 50% da sua sequência de identidade. As RhoGTPases são divididas ainda em 8 subfamílias, sendo 3 as mais estudadas: a subfamília relacionada a RhoA, membro A homólogo a Ras, composta por RhoA, RhoB e RhoC, a subfamília relacionada a Rac1, substrato 1 da toxina botulinica C3 relacionado a Ras, composta pelas Rac1, Rac2, Rac3 e RhoG e a subfamília relacionada a Cdc42, ciclo 42 da divisão celular, Cdc42, TC10, TCL, Chp/Wrch-2 e Wrch1 (Wennerberg and Der, 2004) (Figura 7).

Como dito anteriormente as RhoGTPases são *switches* moleculares binários que alternam entre o estado inativo, ligado à GDP, ou ativo, ligado à GTP, decorrente do estímulo extracelular. No estado ativo, eles se ligam aos efetores *downstream* gerando diferentes respostas biológicas (Luo, 2000; Moon and Zheng, 2003), como ativação enzimática, transplante de vesículas ou participação no ciclo celular, por exemplo. Cada família é capaz de ativar diferentes efetores e diferentes famílias podem reconhecer os mesmos efetores (Feltri et al., 2008).

Figura 7 - Árvore filogenética da família Rho das GTPases e representantes de outras GTPases da superfamília Ras



Legenda: A família das Rho GTPases pode ser dividida em seis ramos principais: relacionadas à RhoA, relacionadas à Rac, relacionadas à Cdc42, proteínas Rnd, proteínas RhoBTB e proteínas Miro. Fonte: Wennerber & Der, 2004.

A regulação entre o estado ativo ou inativo, GTP/GDP, é fortemente controlado por três classes de proteínas: GEFs, fatores de troca de GTPase, com a função de promover a troca da ligação GDP para GTP, tendo como consequência a ativação das RhoGTPases (Schmidt and Hall, 2002) e iniciando a sinalização *downstream* através de diferentes proteínas efetoras; GAPs, proteínas ativadoras da GTPase, que catalisam a capacidade intrínseca das GTPases hidrolisarem a ligação GTP para GDP inativando-as (Moon and Zheng, 2003); e GDIs, inibidores da dissociação do nucleotídeo guanina, que estabilizarão a ligação GDP da GTPase e inibe a ligação das proteínas Rho na membrana impedindo a troca de nucleotídeo e a ativação (Olofsson, 1999) (Figura 8). Existem ainda outros meios de regulação, mas que ocorrem apenas nas famílias atípicas, envolvendo associações

constitutivas com as membranas e interações entre proteínas (Aspenstrom et al., 2007; Wennernerg and Der, 2004).



#### Figura 8 - Regulação das RhoGTPases

Legenda: A Rho GTPase é ativada quando ocorre a ligação com o GTP mediada pelo GEF. A GAP catalisa a hidrólise GTP-GDP intrínseca da Rho GTPase, incluindo a remoção do fosfato e a subsequente inativação da Rho GTPase. A GDI sequestra a Rho GTPase em sua conformação inativa protegendo sua calda hidrofóbica. A interação e anexação com a membrana plasmática é importante para a ativação da Rho GTPase e da subsequente promoção do efetor.

Fonte: Adaptado de Ensign et al., 2013.

No início as RhoGTPases foram descritas apenas na regulação do citoesqueleto respondendo aos estímulos extracelulares, pois tanto a Cdc42 como a Rac possuem a capacidade de regular a polimerização de actina que se inicia com as forças de protrusão (Arrieumerlou and Meyer, 2005). A RhoA, por sua vez, contribui para a migração limitando o número de protrusões celulares inibindo a atividade da Rac mediada pela ROCK (Rho Cinase) (Vega et al., 2011). A inibição da ROCK nos OPCs, por sua vez induz a inibição da protrusão dos prolongamentos (Siebert and Osterhout, 2011), mas não é capaz de induzir a diferenciação celular (Czopka et al., 2009). Foi observado em fibroblastos que as fibras de estresse e os complexos de adesão focal estão organizados quando a RhoA está ativa (Hall, 1998). Foi demonstrado também que, com 15 minutos de inativação da RhoA, não é mais visto o acúmulo de integrinas na superfície celular (Hotchin & Hall, 1995). Notou-se ainda que as estruturas de actina induzidas pela Rac e pela Cdc42 estão associadas com os complexos de adesão das integrinas (Nobes & Hall, 1995).

As RhoGTPases podem ser ativadas por integrinas (Luo et al., 2007), como já foi descrito em astrócitos *in vitro*, a Cdc42 e a Rac1 são ativadas e recrutadas até o limite da polarização dos astrócitos. Contudo, quando as integrinas foram inibidas não ocorre a ativação da Cdc42. Essa polarização celular é importante, por exemplo, para o transporte de vesículas de RNAm. Assim, se ocorre uma falha na polarização, o transporte fica comprometido. O caso específico da Cdc42 é ainda mais complicado porque esta RhoGTPase é fundamental para o controle da orientação da célula; quando ela é inibida, o centrossomo, a protrusão e a migração celular passam a ter uma orientação aleatória (Etienne-Mannevie & Hall, 2001). A Cdc42 ainda está relacionada a um complexo importante para o transporte de vesículas, crescimento dos prolongamentos e da arborização em oligodendrócitos (Anitei et al., 2006).

Já foi descrito que camundongos com ablação para os genes da Cdc42 e Rac1 apresentaram mielina aberrante com o acúmulo de citoplasma nas alças internas da mielina. Estudos mostraram que a Cdc42 e a Rac1 atuam em sinergia e que ambos são capazes de interferir, separados ou em conjunto, na mielinização, sem afetar a proliferação e diferenciação da oligodendroglia (Thurnherr et al., 2006).

A RhoA e a ROCK em conjunto, têm papel chave como reguladores da morfologia e extensão celular no processo de mielinização em oligodendrócitos. A RhoA pode ser inibida pela cinase Fyn pertencente a família Src, e esta inibição leva ao amadurecimento dos oligodendrócitos (Wolf et al., 2001). Já foi demonstrado que componentes da mielina inativam a Fyn para que a RhoA seja ativada, inibindo assim a diferenciação celular (Baer et al., 2009). A neutrina-1, importante fator de diferenciação do oligodendrócito, inibe a RhoA através da ativação da Fyn para que haja o amadurecimento celular com o crescimento e elaboração dos prolongamentos (Rajasekharan et al., 2009). Acrescenta-se a isso que a inativação da RhoA é necessária para a especialização da membrana plasmática nos oligodendrócitos (Kippert et al., 2007).

Rajasekharan e colaboradores demonstraram em 2010 que a diferenciação morfológica do oligodendrócito passa pelo balanço entre a ativação e desativação da RhoA controlado pela neutrina-1. Quando o precursor de oligodendrócito está migrando, a ativação da RhoA e da ROCK pela neutrina-1 depende do DCC (receptor de neutrina-1 deletado em carcinoma colorretal) e reduz o tamanho dos prolongamentos. Quando o precursor para de migrar e se diferencia em célula madura a neutrina-1 leva a uma redução da atividade da RhoA. É importante observar que o mesmo fator pode levar a resultados diferentes dependendo do caminho utilizado e do estágio de desenvolvimento da célula. Note-se também que a Fyn participa da inativação da RhoA e da ROCK, mas participa da ativação da Cdc42 causando a extensão dos prolongamentos. Além disso, a mielinização é altamente dependente da polarização que é regulada pelas RhoGTPases (Etienne-Manneville, 2008).

Em culturas primárias de oligodendrócitos a RhoA é expressa e ativa nos estágios precoces do desenvolvimento, ocorrendo o aumento da atividade da Cdc42 e da Rac1 ao decorrer da diferenciação. Estudos utilizando moléculas modificadas geneticamente sugeriram que as duas últimas proteínas atuam como reguladores positivos da diferenciação morfológica, induzindo a formação dos prolongamentos e a arborização, enquanto a RhoA atuaria como um regulador negativo inibindo a extensão dos prolongamentos (Figura 9) (Liang et al., 2004).

A RhoA está localizada no citosol e na membrana plasmática (Adamson et al, 1992; Dietrich et al., 2009). No processo migratório a porção posterior da célula é caracterizada pela atividade da RhoA inibindo forças protrusivas via ROCK, enquanto a porção anterior apresenta maior atividade da Rac1 promovendo a polimerização da actina (Binamé et al., 2013). Estudos com a inibição farmacológica da ROCK em oligodendrócitos *in vitro s*ugerem seu papel como regulador negativo da RhoA (Wolf et al., 2001). A inibição da ROCK levou ainda à mudanças morfológicas como o aumento no número e no tamanho dos prolongamentos, aumento de protrusões móveis da membrana (*membrane ruffling*) e colapso das fibras de estresse de actina (Salhia et al., 2005). Em células de astrocitomas a ativação da RhoA causou a retração dos prolongamentos celulares e o arredondamento da mesma, enquanto há a redução da atividade da Rac1 (Seasholtz 2004).



#### Figura 9 - Ação das Rho GTPases nos cones de crescimento

Legenda: Na porção onde temos maior atividade da RhoA (verde) notamos que ocorre a desconstrução ou colapso do citoesqueleto. Já na porção com maior atividade da Cdc42 e da Rac (alaranjado) temos a formação dos filopódios com a posterior estabilização do mesmo.

Fonte: Adaptado de Rajnicek et al., 2006.

Diante dos dados encontrados na literatura e em trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório demonstrando o papel do T3 e da via do AMPc/PKA no desenvolvimento dos oligodendrócitos, este trabalho tem o objetivo de avaliar os impactos da manipulação da via do AMPc/PKA na diferenciação da oligodendroglia e na distribuição das proteínas CNPase, MAG e RhoA na oligodendroglia cultivada em ausência de T3.

## 1 OBJETIVOS

#### 1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da modulação da via do AMPc/PKA na morfologia celular e na distribuição de proteínas da oligodendroglia cultivada em deficiência de T3.

## 1.2 **Objetivos específicos**

- a) Avaliar os efeitos da modulação da via do AMPc/PKA no desenvolvimento da oligodendroglia cultivada em deficiência de T3;
- b) Avaliar os efeitos da modulação da via do AMPc/PKA na formação dos prolongamentos da oligodendroglia cultivada na presença ou em deficiência de T3;
- c)Avaliar os efeitos da modulação da via do AMPc/PKA na distribuição celular das proteínas CNPase e MAG na oligodendroglia cultivada na presença ou em deficiência de T3;
- d)Avaliar os efeitos da modulação da via do AMPc/PKA na distribuição celular do componente da família da RhoGTPase RhoA na oligodendroglia cultivada na presença ou em deficiência de T3.

# 2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1 Obtenção dos animais

Ratos Wistar foram mantidos em ciclo de claro-escuro (luzes desligadas de 7 da noite às 7 da manhã) e em temperatura de 25±1°C. Todos os estudos com animais foram realizados de acordo com os princípios e procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética (CEA/019/2010) para uso de animais do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

## 2.2 Cultura primária de oligodendrócitos

Foram usados ratos Wistar, fêmeas, neonatos com no máximo 3 dias de vida pós-natal. Os animais foram decapitados, os encéfalos foram removidos em fluxo laminar. Após os bulbos olfatórios, o rombencéfalo e as meninges terem sido completamente retirados, o tecido foi picotado e, logo após, posto em tubos Falcon, onde as células foram dissociadas mecanicamente com pipeta Pasteur. A dissociação foi feita três vezes, e, após a precipitação, foram retirados os três sobrenadantes e colocados em outro tubo Falcon. O conteúdo foi centrifugado a 1500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado, e o precipitado (rico em células) diluído em volume conhecido de meio DMEM-F12 com 10% de soro bovino. As células foram ressuspensas, contadas em câmara de Neubauer, e plaqueadas de 200.000 a 400.000 células por lamínula. As lamínulas foram previamente tratadas com poli-L-lisina (400µl / poço), e acondicionadas em placas contendo 24 poços. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por três dias neste meio de cultura. Em seguida, o meio foi trocado para o meio N2B3, meio definido para crescimento de oligodendrócitos em cultura (modificado de Bottenstein & Sato, 1979). A base para este meio é o meio DMEM-F12. Foram adicionados: BSA (10 ng/mL); progesterona (20 nM); selênio (5 ng/mL); transferrina (50 μg/mL); biotina (10 ng/mL); putrescina (100 μM); insulina (5 μg/mL); glutamina (2 mM); Triiodotironina (T3) (30 nM), sendo que em parte das culturas o T3 não é acrescido (-T3); bicarbonato de sódio (1,2 mg/mL) e soro fetal bovino (concentração final de 0,5%) (Figura 11).

## 2.3 Avaliação da via de sinalização do AMPc/PKA

Para a avaliação da via do AMPc/PKA foram utilizados o inibidor da PKA, o H-89 [1  $\mu$ M] (Calbiochem), o inibidor da adenilato ciclase, o SQ22356 [1  $\mu$ M] (Biomol) e o ativador da adenilato ciclase, a forscolina [10  $\mu$ M] (Cell Signaling) diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma). Com 5 dias *in vitro* (div), em meio definido, as células foram tratadas por 30 min ou 24 h. Incluímos ainda um outro grupo em que as culturas foram tratadas com o inibidor H-89 mais o ativador forscolina, a fim de analisar se os efeitos encontrados no grupo forscolina mediados pelo AMPc eram independentes da via da PKA. Como controle do veículo, células cultivadas foram expostas ao DMSO na mesma concentração pelos mesmos períodos (Figura 10), que foi considerado posteriormente como grupo controle. Após o tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 15 min e depois lavadas 3 vezes por 5 min com solução tampão de fosfato salina (PBS), pH 7.4. Foram utilizadas três lamínulas de cinco culturas diferentes para cada intervalo de tratamento.



#### Figura 10 - Desenho experimental dos tratamentos realizados nas culturas

Legenda: Acima – Oligodendroglia cultivada em presença de T3 e tratadas aos 5div por 30 minutos ou 24 horas com veículo (DMSO/T3/30 ou DMSO/T3/24); Forscolina (FORSC/T3/30 ou FORSC/T3/24); SQ 22356 (SQ/T3/30 ou SQ/T3/24); H-89 (H-89/T3/30 ou H-89/T3/24) e Forsolina+H-89 (FORSC+H-89/T3/30 ou FORSC+H-89/T3/24). Abaixo – Oligodendroglia cultivada em ausência de T3 e tratadas aos 5div por 30 minutos

Abaixo – Oligodendrogila cultivada em ausencia de 13 e tratadas aos 5div por 30 minutos ou 24 horas com veículo (DMSO/-T3/30 ou DMSO/-T3/24); Forscolina (FORSC/-T3/30 ou FORSC/-T3/24); SQ 22356 (SQ/-T3/30 ou SQ/-T3/24); H-89 (H-89/-T3/30 ou H-89/-T3/24) e Forsolina+H-89 (FORSC+H-89/-T3/30 ou FORSC+H-89/-T3/24) .

Fonte: Felgueiras, 2016.

#### 2.4 Reação imunocitoquímica

Após a fixação, as lamínulas foram lavadas em solução de PBS pH 7,4. Para a marcação de antígenos intracelulares, as lamínulas foram permeabilizadas com PBS-Triton 0,3%. Foi realizado bloqueio para reações inespecíficas com incubação com solução de albumina sérica bovina (Sigma) diluída em PBS (PBS-BSA) a 5% por 30 min e, após, incubação com os anticorpos primários diluídos em PBS-BSA 1% durante a noite a 4°C. No dia seguinte, procedeu-se às lavagens com PBS, incubação com os anticorpos por 1 h em câmara úmida a

temperatura ambiente. Seguiu-se com lavagens com PBS, e após, as lamínulas foram contra-coradas com o marcador de núcleo DAPI (0,2µg/mL - Sigma). Foram feitas lavagens com água destilada e montagem das lamínulas em lâminas utilizando N-propil-galato.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para a técnica de imunocitoquímica. Nos anticorpos secundários: Em verde, Alexa 488 – fluorocromo emitido em verde; Em vermelho, Alexa 555 - fluorocromo emitido em vermelho, Alexa 633 – fluorocromo emitido no comprimento de onda próximo ao vermelho, e alterado no programa para violeta

## **Anticorpos Primários**

Anticorpo anti-	Marca	Isotipo	Origem	Diluição
CNPase	Sigma	Monoclonal IgG	Camundongo	1:100
RhoA	Santa Cruz	Policlonal IgG	Cabra	1:150
MAG	Invitrogen	Policlonal IgG	Coelho	1:100

# Anticorpos Secundários

Anticorpo anti-	Conjugado a	Marca	Origem	Diluição
IgG de coelho	Alexa 488	M.Probes	Cabra	1:400
IgG de camundongo	Alexa 555	M.Probes	Cabra	1:400
IgG de camundongo	Alexa 488	Invitrogen	Burro	1:400
IgG de cabra	Alexa 633	Life Tech	Burro	1:500

# 2.5 Análise das imagens e quantificação

As imagens foram obtidas com o microscópio de epifluorescência Olympus BX40, acoplado a câmera de vídeo digital (Olympus DP71). Sendo os programas utilizados o DP Manager versão 3.3.1.222 e Olympus cellSens Entry versão 1.14. Para análise do tipo celular foram capturadas imagens de dois campos diferentes em cada lamínula com a objetiva de 20x, para o tamanho celular as imagens foram capturadas imagens de cinco campos diferentes por lamínula com a objetiva de 40x e para a observação da distribuição proteica foram capturadas a mesma quantidade de imagens utilizando a objetiva de 60x. Para todas as análises foram utilizadas três lamínulas de cada tratamento e todas as culturas.

Para a análise da oligodendroglia foi utilizada a imunocitoquímica com a marcação para CNPase que, como já descrito, é expressa em todas as fases de diferenciação. As células foram classificadas em diferentes estágios de maturação, de acordo com a morfologia apresentada: progenitor (OPC: dois prolongamentos), pré-oligodendrócito (PO: com três a cinco prolongamentos), imaturo (IO: com mais de cinco prolongamentos sem véus de membrana) ou maduro (M: presença de véus de membrana). Células redondas e sem prolongamentos ou ainda sem morfologia possível de ser definida foram incluídas no grupo de não classificadas (NC) (Figura 2).

Para a contagem do número das células nos diferentes tipos celulares e do tamanho celular foi utilizado o programa Image-Pro Plus versão 4.5.0.29. Para a observação da distribuição das proteínas o programa utilizado foi o Microsoft Office Picture Manager versão 6.1.7601.

# 2.6 Análise estatística

## 2.6.1 Tipo Celular

As células imunorreagidas foram contadas e identificadas dentro dos tipos celulares. Após a contagem os dados, as respectivas porcentagens de cada tipo foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov e a normalidade das mesmas foi confirmada. Dando seguimento, os dados foram submetidos às medidas de análise de variância de repetição global (ANOVAr) univariadas e multivariadas (TIPO, TIPOxTEMPO, TIPOxTRATAMENTO, TIPOxT3, TIPOxTEMPOxTRATAMENTO, TIPOxTEMPOxT3, TIPOxTRATAMENTO, TIPOxTEMPOxTRATAMENTOXT3 e TIPOxTEMPOxTRATAMENTOXT3). Para nível de significância foi considerado p<0,05 e próximo da significância p<0,1.

## 2.6.2 Tamanho dos prolongamentos celulares

Para a medição do tamanho dos prolongamentos de cada tipo celular, foram posicionadas circunferências que delimitassem toda a célula, nas quais os centros foram estabelecidos no corpo celular. O tamanho foi definido pelo valor do raio destas circunferências (Figura 11).



Figura 11 - Imagem demonstrativa do processo de medição das células

Legenda: Na imagem temos três células em estágios diferentes de desenvolvimento selecionadas para a medição da circunferência da célula. O ponto central é escolhido o mais próximo possível do centro da célula. Fonte: Felgueiras, 2016.

Os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados dos grupos OPC, PO e IO se confirmaram paramétricos e para estes foi calculada a média do tamanho das células do grupo DMSO, após 30 minutos e 24 horas de tratamento, na presença de T3 para cada tipo celular. O tipo celular M se apresentou não paramétrico e por isso neste grupo foi definida a mediana do tamanho das células. O procedimento executado nos outros tipos celulares foi repetido para o grupo M. Uma vez identificados os valores das médias e das medianas no grupo DMSO, analisamos o número de células cujo tamanho chegava até estes valores (médias e medianas) e quais passavam destes. Isto foi feito para todos os grupos respeitando o tempo pós-tratamento.

Para a análise das proporções foi utilizado o teste Qui-Quadrado da interação RESULT X GRUPO. Sendo considerado significativo p<0,05 e próximo da significância p<0,1.

#### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Tipo celular

A fim de compreender os efeitos da modulação da via do AMPc/PKA e da ausência de T3 no desenvolvimento da oligodendroglia contamos o número de células dentro de cada estágio de diferenciação celular como estabelecido previamente na sessão "Materiais e métodos" em cada grupo de tratamento.

A ANOVAr indicou uma interação do TIPOXTEMPO (F=6,7; g.l.=4; P=0,000) e uma interação TIPOXTRATAMENTO (F=2,7; g.l.=16; P=0,001). A análise estatística não foi capaz de identificar interação entre TIPOXT3 (P>0,01) e nem TIPOXT3XTRATAMENTO (P>0,01), desta forma, não fomos autorizados a fazer análise par-a-par com relação à presença ou não do T3.

Nas culturas controle (DMSO/T3) observamos nos progenitores (OPC) um número reduzido de células, próximo de 12%, enquanto no estágio de préoligodendrócitos (PO) vamos encontrar uma taxa celular próxima de 42%, sendo o grupo no qual encontramos a maior quantidade de células. No estágio imaturo (IO), por sua vez, temos a menor porcentagem um pouco superior a 5%. O grupo maduro (M) apresentou uma taxa de aproximadamente 25%, enquanto o grupo não classificado (NC) apresentou uma taxa de quase 20% (Figura12).

Com os tratamentos por 30 minutos os percentuais de distribuição dos diferentes estágios são semelhantes ao das culturas controle. No estágio OPC os cinco grupos apresentaram praticamente a mesma porcentagem próxima a 10%. Também encontramos as maiores taxas do estágio PO nos grupos tratados e não pudemos identificar diferenças estatísticas entre o grupo controle e os tratamentos (P>0,05). Contudo, pudemos identificar diferenças entre os tratamentos. O grupo FORSC+H-89 com uma taxa de 35% apresentou diferença estatisticamente significativa com o grupo H-89 com 45%(P=0,044), e com o grupo SQ, aproximadamente 42% (P=0,016) (Figura 12).

O estágio IO foi o que exibiu mais diferenças significativas. O grupo DMSO apresentou diferença significativa com FORSC que apresentou maior porcentagem de células, aproximadamente 11% (P=0,022) e com o grupo FORSC+H-89

(P=0,016) que apresentou a menor porcentagem, aproximadamente 2%. Entre os tratamentos, os grupos SQ e FORSC apresentaram uma diferença que tende a significância (P=0,098) e o grupo FORSC+H-89 apresentou diferença significativa com todos os outros tratamentos FORSC (0,000), H-89 (0,002) e SQ (0,004) (Figura 12).

No estágio M, não foram identificadas diferenças significativas entre o grupo DMSO e os grupos tratados (P>0,001). Entre os tratamentos o grupo FORSC+H-89, aproximadamente 32%, apresentou diferença significativa com o grupo H-89 (P=0,023) e tendendo a significância com o grupo SQ (P=0,069), ambos próximos de 25%. Nas células NC, o grupo DMSO apresentou apenas uma relação que tende a significância com o grupo FORSC+H-89 (P=0,081), sendo este o grupo que apresentou a maior porcentagem com aproximadamente 30%. O grupo FORSC+H-89 apresentou diferença significativa com todos os outros grupos tratados FORSC (0,047), H-89 (0,018) e SQ (0,003). (Figura 12).

Estes resultados demonstram que o tipo IO é o mais afetado pela manipulação da via do AMPc/PKA aos 30 minutos de tratamento.



Figura 12 – Distribuição da oligodendroglia com 5 div nos diferentes grupos tratados

T3 30 minutos

Legenda: OPC: Progenitores; PO: Pré oligodendrócitos; IO: Oligodendrócitos imaturos; M: Oligodendrócitos maduros; NC: Oligodendrócitos não classificados. Barras representam média +/- Erro padrão da média; \*: p<0,05 e Δ: p<0,1 Fonte: Felgueiras, 2016.

Nas culturas controle com 6 div notamos que o perfil de distribuição é semelhante ao de 5 div. O estágio PO apresenta a maior porcentagem, sendo superior à metade do total de células, enquanto o estágio IO apresenta a menor, aproximadamente 5%. O estágio M apresenta uma porcentagem intermediária, próxima de 20% (Figura 13).

No estágio OPC o grupo H-89 apresentou uma porcentagem próxima de 10%, taxa inferior à do grupo DMSO, existindo uma diferença significativa (P=0,044). Em PO, não há diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados (P>0,05). Na comparação entre os tratamentos, entretanto, pudemos observar uma diferença significativa entre o grupo H-89, com 48% aproximadamente, e o grupo FORSC+H-89, 43% aproximadamente (P=0,037) (Figura 13).

Em IO, assim como em 5 div, o grupo controle apresentou diferença tendendo a significância com FORSC+H-89 (P=0,078), com menor taxa de aproximadamente 1%, e este por sua vez apresentou diferença significativa com todos os grupos tratados. Os grupos SQ, FORSC e H-89 apresentaram porcentagens superiores ao grupo FORSC+H-89, aproximadamente 7%(P=0,024), 8% (P=0,002) e 6% (P=0,005), respectivamente.

Em M não foram observadas diferenças significativas, independente do tratamento (P>0,5). Também em NC os grupos tratados não apresentaram diferença significativa com o grupo controle (P>0,5). O tratamento FORSC+H-89 apresentou a maior porcentagem, quase 23%. Quando comparado aos outros tratamentos este apresentou diferença estatística com o grupo FORSC (P=0,046) que apresentou a menor porcentagem, próximo de 12%, e tendendo à significância quando comparado com o grupo H-89 (P=0,054), próximo de 13% (Figura 13).

Os resultados demonstram que o tipo IO continua sendo afetado pela manipulação da via do AMPc/PKA também com 24 horas de tratamento, mas de maneira menos drástica, indicando que o efeito pode ser passageiro. Além disso, neste tempo o estágio OPC foi afetado pela inibição da PKA, indicando que o tratamento com H-89 necessita de mais tempo para ter um efeito evidente neste estágio.



Figura 13 – Distribuição da oligodendroglia com 6 div nos diferentes grupos tratados.

Barras representam média +/- Erro padrão da média; \*: p<0,05 e  $\Delta$ : p<0,1 Fonte: Felgueiras, 2016.

Nas culturas com 5 div em ausência de T3 podemos observar que mais uma vez não há uma alteração no perfil de distribuição das células do grupo controle. O estágio OPC apresentou uma porcentagem próxima de 10%, no estágio PO encontramos a maior taxa, 38% aproximadamente, já no estágio IO encontramos uma taxa próxima à do estágio OPC, enquanto em M a porcentagem foi próxima de 29% e em NC de 21% (Figura 14).

Aos 30 minutos de tratamento não foi possível identificar diferenças estatísticas significativas ou que tendessem à significância entre o grupo controle com nenhum dos grupos com tratamento em nenhum estágio de desenvolvimento (Figura 14).





-T3 30 minutos

Nas culturas com 6 div em ausência de T3 o grupo controle apresenta mais uma vez a repetição do perfil já encontrado. O estágio OPC tem uma porcentagem de 15%, enquanto o estágio PO apresenta uma taxa de aproximadamente 44%. No estágio IO o grupo controle apresentou uma porcentagem de apenas cerca de 6% e em M quase 25%. No NC notamos uma proporção próxima de 20% (Figura 15).

Neste tempo de tratamento também não foi possível identificar diferenças estatísticas significativas ou que tendessem a significância do grupo controle com nenhum dos grupos tratados em nenhum estágio de desenvolvimento (Figura 15).

Legenda: OPC: Progenitores; PO: Pré oligodendrócitos; IO: Oligodendrócitos imaturos; M: Oligodendrócitos maduros; NC: Oligodendrócitos não classificados. Barras representam média +/- Erro padrão da média Fonte: Felgueiras, 2016.





-T3 24 Horas

# 3.2 Tamanho dos prolongamentos celulares

Como é sabido que o tamanho dos prolongamentos da oligodendroglia varia de acordo com o estágio de desenvolvimento celular, para a análise dos resultados obtidos com a medição dos prolongamentos celulares optamos por separar a avaliação pelos estágios de diferenciação. Assim seria possível inclusive identificar a existência de um efeito estágio específico.

Para a avaliação do tamanho dos prolongamentos fizemos a média do tamanho dos prolongamentos da oligodendroglia em cada tipo celular e então contamos quantas células tinham prolongamentos que chegavam até a média ou que apresentavam prolongamentos maiores que a média. No caso do estágio M utilizamos o valor da mediana. Para facilitar a análise dos dados nos gráficos

Legenda: OPC: Progenitores; PO: Pré oligodendrócitos; IO: Oligodendrócitos imaturos; M: Oligodendrócitos maduros; NC: Oligodendrócitos não classificados. Barras representam média +/- Erro padrão da média Fonte: Felgueiras, 2016.

colocamos apenas os dados referentes ao percentual de células com prolongamentos com tamanhos superiores à média ou mediana.

#### 3.2.1 Progenitor - OPC

No estágio OPC nas culturas com 5 div o grupo controle (DMSO/T3) apresentou 46,15% de células com prolongamentos superiores à média. Na comparação com os grupos tratados por 30 minutos o grupo SQ/T3/30, que não apresentou nenhuma célula (0%) com prolongamentos superiores à média, apresentou prolongamentos menores que o grupo DMSO/T3/30 uma diferença tentendo a significância (g.l.=1; P=0,078) (Figura 16). Nas comparações entre tratamentos observamos que o grupo FORSC+H-89/T3/30 apresenta diferença significativa com FORSC/T3/30, com 55,56% das células com prolongamentos maiores (g.l.=1; P=0,05) (Figura 16). Isso demonstra que, nas culturas com 5 div após 30 minutos de tratamento a inibição da adenilato ciclase, assim como a ativação da adenilato ciclase com a concomitante inibição da PKA causam a redução no tamanho dos prolongamentos da oligodendroglia.

Nas culturas com 6 div observamos no grupo DMSO/T3/24 que 40% das células apresentaram prolongamentos superiores à média. O grupo tratado por 24 horas SQ/T3/24 apresentou maior porcentagem de oligodendrócitos com prolongamentos superiores à média, em relação ao tratamento por 30 minutos, 52,17% (g.l.=1; P=0,012), e maior quando comparado ao grupo DMSO/T3/24 (g.l.=1; P=0,046). O grupo FORSC/T3/24 com 41,57% também apresentou mais células superiores à média que o grupo DMSO/T3/24 (g.l.=1; P=0,032) (Figura 16). Os resultados sugerem que com o tratamento com o SQ por 24 horas ocorre um aumento dos prolongamentos para compensar a redução observada aos 30 minutos de tratamento e que o tratamento com FORSC necessita de tempo para aumentar os prolongamentos da oligodendroglia.

Em ausência de T3 notamos nas culturas com 5 div que o grupo DMSO/-T3/30 não apresentou células com os prolongamentos superiores à média, assim como os grupos tratados por 30 minutos FORSC/-T3/30 e H-89/-T3/30 (Figura 16).

Os grupos DMSO/-T3/30 e FORSC/-T3/30 também apresentaram diferenças significativas com os respectivos grupos na presença do T3, com menor percentual

de células com prolongamentos maiores. O grupo H-89/-T3/30 por sua vez, apresentou diferença tendendo a significância, menor percentual, com o grupo H-89/T3/30 (Figura 16).

Na comparação dos grupos tratados sem T3 com o grupo DMSO/T3/30 notamos que os grupos H-89/-T3/30 (g.l.=1; P=0,016) e FORSC+H-89/-T3/30 (g.l.=1; P=0,016) apresentaram menos células com prolongamentos superiores à média, ambos com diferenças estatisticamente significativas (Figura 16).

Os resultados demonstram que os progenitores cultivados em ausência de T3 têm redução no tamanho dos prolongamentos que permanece com a modulação da via do AMPc/PKA.Entretanto, deve se considerar que com a inibição da adenilato ciclase não ocorre diferença com o grupo DMSO/T3/30.

Nas culturas com 6 div em ausência de T3 observamos que o grupo DMSO/-T3/24 apresentou 33,33% de células com prolongamentos superiores à média em uma relação que tende a significância quando comparado com o grupo DMSO/-T3/30 (g.l.=1; P=0,081). Entretanto, comparando todos os tratamentos por 24 horas não foi possível identificar nenhuma diferença estatisticamente significativa (Figura 16).

Os resultados demonstram que com 6 div o número de progenitores com prolongamentos acima da média são semelhantes aos da cultura cultivada com T3 e que não são observadas diferenças estatisticamente significativas com a manipulação da via do AMPc/PKA.

Figura 16 – Gráfico demonstrativo do percentual de progenitores com prolongamentos com tamanho acima da média, após os diferentes tratamentos por 30 minutos ou 24 horas, na presença ou ausência de T3



Legenda: T3 – culturas cultivadas com T3; -T3 – culturas cultivadas sem T3 30 min – Culturas com 5 div e com 30 minutos de tratamento 24h – Culturas com 6 div e com 24 horas de tratamento \*: p<0,05, Δ: p<0,1, a: p<0,05 na relação DMSO/T3 x grupos tratados sem T3 e b: p<0,1 na relação DMSO/T3 x grupos tratados sem T3. Média do comprimento dos prolongamentos no grupo DMSO/T3/30 = 75,18 µm e no grupo DMSO/T3/24 = 74,54 µm. Fonte: Felgueiras, 2016.

## 3.2.2 Pré oligodendrócitos - PO

No estágio PO nas culturas com 5 div observamos no grupo DMSO/T3/30 uma porcentagem de 35,29% de oligodendrócitos com prolongamentos superiores à média e não foi possível identificar diferenças estatísticas significativas quando comparado com os grupos tratados (figura 17).

Com 6 div o grupo DMSO/T3/24 apresentou 40% de oligodendrócitos com prolongamentos superiores à média. Quando comparado com os grupos tratados por 24 horas, o grupo FORSC/T3/24 apresentou mais células com prolongamentos maiores que a média, 62,69%, sendo esta diferença estatisticamente significativa (g.l.=1; P=0,08). Na comparação entre os grupos tratados o grupo FORSC/T3/24 apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo H-89/T3/24 (g.l.=1; P=0,016) (Figura 17). Este resultado demonstra que o aumento nos níveis do AMPc causa o aumento dos prolongamentos dos pré-oligodendrócitos, mas que este efeito necessita de mais tempo para ser percebido.

Além disso, os grupos SQ/T3/24 (g.l.=1; P=0,031), FORSC/T3/24 (g.l.=1; P=0,002) e FORSC+H-89/T3/24 (g.l.=1; P=0,001) apresentaram diferenças estatísticas significativas com seus respectivos grupos no tempo de 30 minutos, apresentando um percentual maior de células com prolongamentos maiores (Figura 17).

Nas culturas com 5 div sem T3 o grupo DMSO/-T3/30 apresenta 44,62% de oligodendrócitos com prolongamentos superiores à média. Na comparação com os grupos tratados os grupos H-89/-T3/30, com 20,34% (g.l.=1; P=0,04), e FORSC+H-89/-T3/30, com 10% (g.l.=1; P=0,000), apresentaram menos células com prolongamentos superiores à média (Figura 17). Na comparação entre tratamentos observamos que o grupo SQ/-T3/30 apresentou diferença significativa com o grupo H-89/-T3/30 (g.l.=1; P=0,014). Também observamos que os grupos H-89/-T3/30 e FORSC+H-89/-T3/30 apresentaram menos células com prolongamentos superiores à média quando comparado com o grupo DMSO/T3/30, no primeiro uma diferença que tende significância (g.l.=1; P=0,09) e no segundo a diferença foi significativa (g.l.=1; P=0,06) (Figura 17).

Os resultados demonstram que a ausência do T3 não altera o percentual de pré oligodendrócitos com prolongamentos acima da média em culturas de 5 div. Entretanto com a inibição da PKA há um menor percentual de células com prolongamentos acima da média, sugerindo que nesse estágio há uma interação entre os efeitos da ausência de T3 e a PKA, com a ausência do hormônio reforçando os efeitos da inibição da PKA, principalmente.

Nas culturas com 6 div em ausência de T3 observamos que o grupo DMSO/-T3/24 apresentou mais oligodendrócitos com prolongamentos superiores à média que o grupo com T3, 59,04%, uma diferença estatisticamente significativa (g.l.=1; P=0,025). Quando comparado com o grupo DMSO/-T3/30 a porcentagem também foi superior apresentando uma diferença que tende a significância (g.l.=1; P=0,098). Em comparação com os grupos tratados apresentou diferença significativa apenas com o grupo FORSC+H-89/-T3/24, com 35,48% (g.l.=1; P=0,035) (Figura 17).

Entre os grupos tratados por 24 horas observamos que o grupo SQ/-T3/24 com 66,67% de células superiores à média apresentou mais células do que os grupos H-89/-T3/24, com 47,83% (g.l.=1; P=0,001) e FORSC/-T3/24, com 52,44%, neste tendendo a significância (g.l.=1; P=0,097). O grupo SQ/-T3/24 apresentou ainda diferença significativa quando comparado com o grupo SQ/-T3/30 (g.l.=1; P=0,016), que apresenta menor percentual e o grupo H-89/-T3/24, com um maior percentual, apresentou diferença significativa com o grupo H-89/-T3/30 (g.l.=1; P=0,001). O grupo FORSC+H-89/-T3/24 apresentou ainda diferença significativa com o grupo H-89/-T3/30 (g.l.=1; P=0,001). O grupo FORSC+H-89/-T3/24 apresentou ainda diferença significativa com o grupo FORSC+H-89/-T3/24 apresentou ainda diferença significativa

Os resultados demonstram que culturas cultivadas por 6 dias em ausência de T3 apresentam um percentual maior de PO com prolongamentos maiores que a média e que os tratamentos modificam esse efeito, exceto quando se ativa a adenilato ciclase.

Figura 17 – Gráfico demonstrativo do percentual de pré-oligodendrócitos com prolongamentos com tamanho acima da média, após os diferentes tratamentos por 30 minutos ou 24 horas, na presença ou ausência de T3



Legenda: T3 – culturas cultivadas com T3; -T3 – culturas cultivadas sem T3 30 min – Culturas com 5 div e com 30 minutos de tratamento 24h – Culturas com 6 div e com 24 horas de tratamento \*: p<0,05, Δ: p<0,1, a: p<0,05 na relação DMSO/T3 x grupos tratados sem T3 e b: p<0,1 na relação DMSO/T3 x grupos tratados sem T3. Média do comprimento dos prolongamentos no grupo DMSO/T3/30 = 66,63 µm e no grupo DMSO/T3/24 = 57,1 µm. Fonte: Felgueiras, 2016.

## 3.2.3 Imaturo - IO

No estágio IO nas culturas com 5 div o grupo DMSO/T3/30 apresentou 48% de oligodendrócitos com prolongamentos superiores à média (Figura 18) não sendo encontrada diferença estatística dos grupos tratados em relação ao grupo controle e também entre si (Figura 18).

Com 6 div o grupo DMSO/T3/24 apresentou uma proporção de 30,77% de oligodendrócitos com prolongamentos maiores que a média, mas também não foi possível identificar diferenças estatísticas entre os tratamentos ou entre a cultura com 5 div (Figura 18).

Na ausência de T3 com 5 div o grupo DMSO/-T3/30 apresentou uma proporção de 46,43% de oligodendrócitos com prolongamentos maiores que a média e mais uma vez não foi possível identificar diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 18).

Com 6 div em ausência de T3 o grupo apresentou uma porcentagem de 23,08% de oligodendrócitos superiores à média, diferença que tende a significância comparada a cultura com 5 div (g.l.=1; P=0,092). Os grupos SQ/-T3/24, com 62,50%, e H-89/-T3/24, com 53,85%, apresentaram maior proporção de células que o grupo DMSO/-T3/24, uma diferença que tende à significância com o primeiro (g.l.=1; P=0,079) e significativa com o segundo (g.l.=1; P=0,045) (Figura 18).

Estes resultados indicam que neste estágio de desenvolvimento é necessário mais tempo para que haja interação entre os efeitos da ausência de T3 e da inibição da via do AMPc/PKA aumentando o percentual de oligodendrócitos imaturos com prolongamentos superiores à média.

Figura 18 – Gráfico demonstrativo do percentual de oligodendrócitos imaturos com prolongamentos com tamanho acima da média, após os diferentes tratamentos por 30 minutos ou 24 horas, na presença ou ausência de T3



Legenda: T3 – culturas cultivadas com T3; -T3 – culturas cultivadas sem T3 30 min – Culturas com 5 div e com 30 minutos de tratamento 24h – Culturas com 6 div e com 24 horas de tratamento \*: p<0,05, Δ: p<0,1, a: p<0,05 na relação DMSO/T3 x grupos tratados sem T3 e b: p<0,1 na relação DMSO/T3 x grupos tratados sem T3. Média do comprimento dos prolongamentos no grupo DMSO/T3/30 = 73,11 µm e no grupo DMSO/T3/24 = 66,88 µm.
Fonte: Felgueiras, 2016.

#### 3.2.4 <u>Maduro - M</u>

No último estágio de desenvolvimento, M, nas culturas com 5 div observamos no grupo DMSO/T3/30 que 48,70% dos oligodendrócitos apresentaram prolongamentos superiores à mediana. Quando comparado com os grupos tratados por 30 minutos, todos apresentaram menor percentual de células com prolongamentos maiores que a mediana que o grupo DMSO/T3/30, SQ/T3/30, com 33,33% (g.l.=1; P=0,009), FORSC/T3/30, com 65% (g.l.=1; P=0,036), H-89/T3/30,

com 35,23% (g.l.=1; P=0,028) e FORSC+H-89/T3/30 com 66,7% (g.l.=1; P=0,032) (Figura 19). Na comparação entre grupos tratados percebemos que o grupo SQ/T3/30, apresentou diferença tendendo a significância com o grupo H-89/T3/30, com 35,23%. (Figura 19), demonstrando que com 30 minutos de tratamento, a manipulação da via do AMPc/PKA causa a redução dos prolongamentos da oligodendroglia.

Nas culturas com 6 div o grupo DMSO/T3/24 apresentou 49,55% de oligodendrócitos com prolongamentos maiores que a mediana. Quando comparado com os grupos tratados por 24 horas os grupos SQ/T3/24, com 64% (g.l.=1; P=0,019), e FORSC/T3/24, com 63,16% (g.l.=1; P=0,025), apresentaram mais células com prolongamentos maiores que a mediana do que o grupo DMSO/T3/24 (Figura 19). Os resultados demonstram que a modulação da adenilato ciclase por 24 horas aumenta o percentual de oligodendrócitos maduros com prolongamentos acima da mediana sugerindo um efeito compensatório da redução observada com 30 minutos.

Na comparação entre os grupos tratados encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos FORSC/T3/24 e H-89/T3/24, com 49,35% (g.l.=1; P=0,023). Além disso, todos os grupos tratados apresentaram percentuais superiores que os respectivos grupos tratados por 30 minutos, SQ/T3/30 com SQ/T3/24 (g.l.=1; P=0,015), FORSC/T3/30 com FORSC/T3/24 (g.l.=1; P=0,000), H-89/T3/30 com H-89/T3/24 (g.l.=1; P=0,000) e FORSC+H-89/T3/30 com FORSC+H-89/T3/24 (g.l.=1; P=0,001) (Figura 19).

Nas culturas com 5 div em ausência de T3 o grupo DMSO/-T3/30 apresentou 38,16% de oligodendrócitos com prolongamentos maiores que a mediana, e foi possível notar uma redução na porcentagem de células quando comparado com o grupo DMSO/T3/30 (g.I.=1; P=0,000) (Figura 19).

O grupo FORSC+H-89/-T3/30, com 17,5%, apresenta uma diferença significativa com o grupo DMSO/-T3/30 (g.l.=1; P=0,002) e apresentou ainda menores taxas quando comparado com os grupos FORSC/-T3/30, com 38,26% (g.l.=1; P=0,002), e H-89/-T3/30, com 34,82% (g.l.=1; P=0,004). E também menor quando comparado com o grupo FORSC+H-89/T3/30 (g.l.=1; P=0,000) (Figura 19).

Na comparação com o grupo DMSO/T3/30, os grupos SQ/-T3/30 (g.l.=1; P=0,023), H-89/-T3/30 (g.l.=1; P=0,014) e FORSC+H-89/-T3/30 (g.l.=1; P=0,000)
apresentaram redução no número de células com prolongamentos superiores à mediana (Figura 19).

Nossos resultados demonstram que o T3 é determinante para o tamanho dos prolongamentos dos oligodendrócitos maduros ocorrendo a redução no número de células com prologamentos superiores à mediana, mas que o aumento nos níveis do AMPc se mostrou capaz de reverter os efeitos da ausência do hormônio.

Com 6 div em ausência de T3 o grupo DMSO/-T3/24 apresentou um percentual maior de prolongamentos superiores à mediana que o grupo DMSO/T3/24, 64,29% (g.l.=1; P=0,019), sendo esta diferença estatisticamente significativa. Quando comparado com os grupos tratados o grupo FORSC/-T3/24 apresentou percentuais menores, 41,67% (g.l.=1; P=0,043), o único que apresentou diferença significativa (Figura 19).

Na comparação entre grupos tratados notamos que o grupo FORSC/-T3/24 foi o que apresentou o menor percentual de células com prolongamentos maiores que a mediana, tendo diferença significativa com os grupos SQ/-T3/24, com 70,58% (g.l.=1; P=0,009), e FORSC+H-89/-T3/24, com 70,83% (g.l.=1; P=0,014). O grupo SQ/-T3/24 também apresentou mais células que o grupo H-89/-T3/24 (g.l.=1; P=0,078) em uma diferença que tende à significância (Figura 19).

Os grupos SQ/-T3/24, H-89/-T3/24 e FORSC+H-89/-T3/24 apresentaram ainda mais oligodendrócitos com prolongamentos maiores que os seus respectivos grupos nas culturas com 5 div (g.l.=1; P=0,000, para todos). Além disso, na comparação dos grupos tratados na presença do T3 o grupo FORSC/-T3/24 apresentou uma redução do número de células quando comparado com o grupo FORSC/T3/24 (g.l.=1; P=0,071), já o grupo H-89/-T3/24 apresentou mais células quando comparado com o grupo H-89/T3/24 (g.l.=1; P=0,072), ambos tendendo à significância (Figura 19).

Quando comparamos os grupos tratados na ausência de T3 com o grupo DMSO/T3/24 observamos que os grupos SQ/-T3/24 (g.l.=1; P=0,001), H-89/-T3/24 (g.l.=1; P=0,076) e FORSC+H-89/-T3/24 (g.l.=1; P=0,003) apresentaram porcentagem maior de células com prolongamentos superiores à mediana (Figura 19).

Os resultados demonstram que em culturas de 6 div na ausência do T3 ocorre o aumento dos prolongamentos de oligodendrócitos maduros, que não é modificado pela manipulação da via do AMPc/PKA exceto com a ativação da adenilato ciclase que apresenta perfil semelhante ao do grupo DMSO/T3/24.

Figura 19 – Gráfico demonstrativo do percentual de oligodendrócitos maduros com prolongamentos com tamanho acima da mediana, após os diferentes tratamentos por 30 minutos ou 24 horas, na presença ou ausência de T3



Legenda: T3 – culturas cultivadas com T3; -T3 – culturas cultivadas sem T3 30 min – Culturas com 5 div e com 30 minutos de tratamento 24h – Culturas com 6 div e com 24 horas de tratamento \*: p<0,05, Δ: p<0,1, a: p<0,05 na relação DMSO/T3 x grupos tratados sem T3 e b: p<0,1 na relação DMSO/T3 x grupos tratados sem T3. Mediana do comprimento dos prolongamentos no grupo DMSO/T3/30 = 85,71 µm e no grupo DMSO/T3/24 = 50,24.

Fonte: Felgueiras, 2016.

	DMSO															
	T3		-T3		Т3		-T3		Т3		-T3		Т3		-T3	
	30	24	30	24	30	24	30	24	30	24	30	24	30	24	30	24
	Progenitor			Pré Oligodendrócito			ócito	Imaturo				Maduro				
DMSO/T3/30	Х	-	$\uparrow$		х	-	-		Х	-	-		Х	-	$\uparrow$	
DMSO/T3/24	-	X		-	-	Х		$\downarrow$	-	Х		-	-	х		$\downarrow$
DMSO/-T3/30	$\downarrow$		Х	$\downarrow$	-		Х	$\downarrow$	-		Х	$\downarrow$	$\downarrow$		Х	-
DMSO/-T3/24		$\uparrow$	$\uparrow$	X		$\uparrow$	$\uparrow$	Х		-	-	х		$\uparrow$	-	Х
SQ/T3/30	$\downarrow$				-				-				$\downarrow$			
SQ/T3/24		$\uparrow$				-				-				$\uparrow$		
SQ/-T3/30	-		$\uparrow$		-		$\downarrow$		-		-		$\downarrow$		$\downarrow$	
SQ/-T3/24		-		-		$\uparrow$		-		-		$\uparrow$		$\uparrow$		-
FORSC/T3/30	-				-				-				$\downarrow$			
FORSC/T3/24		-				$\uparrow$				-				$\uparrow$		
FORSC/-T3/30	-		-		-		$\downarrow$		-		-		-		-	
FORSC/-T3/24		-		-		-		-		-		-		-		$\downarrow$
H-89/T3/30	-				-				-				$\downarrow$			
H-89/T3/24		-				-				-				-		
H-89/-T3/30	$\downarrow$		-		$\downarrow$		$\downarrow$		-		-		$\downarrow$		$\downarrow$	
H-89/-T3/24		-		-		-		-		-		$\uparrow$		$\uparrow$		-
FORSC+H-89/T3/30	-				-				-				$\downarrow$			
FORSC+H-89/T3/24		-				-				-				-		
FORSC+H-89/-T3/30	$\downarrow$		-		$\downarrow$		$\downarrow$		-		-		$\downarrow$		$\downarrow$	
FORSC+H-89/-T3/24		-		-		-		-		-		-		$\uparrow$		-

Tabela 2 - Resumo comparativo do percentual de oligodendroglia com maiorestamanhos de prolongamentos entre os grupos DMSO e tratados

Legenda: ↑ - Maior que; ↓ - Menor que; X – Mesmo grupo; - - Igual; - Sem comparação.

## 3.3 **Distribuição das proteínas**

Conforme resultados anteriores (Felgueiras, 2012) nas culturas com 5 div podemos observar que a CNPase se apresentou distribuída pela célula (Figura 20A), enquanto a MAG se apresentou com acúmulo no corpo celular (Figura 20B). Nas culturas com 6 div a CNPase (Figura 20D) se manteve distribuída pela célula e a MAG se apresentou presente em toda a célula, porém mantendo o acúmulo no corpo celular (Figura 20E).

Figura 20 – Oligodendroglia com 5 ou 6 *div* imuno identificadas com os anticorpos anti-CNPase e anti-MAG



30 min

24 H

Legenda: A-C: Culturas com 5 div. D-F: Culturas com 6 div. A e D: Culturas imunomarcadas com anticorpo anti-CNPase. B e E: Culturas imunomarcadas anti-MAG. C e F: Sobreposição. Em A identificamos a CNPase distribuída pela célula, mesmo padrão observado em D. Em B identificamos a MAG com acúmulo no corpo celular. Em E MAG distribuída porém com acúmulo no corpo celular. Barra de calibração: 20µm.

Fonte: Felgueiras, 2016.

# 3.3.2 <u>Manipulação da via do AMPc/PKA e distribuição da CNPase, MAG e</u> <u>RhoA em presença de T3</u>

#### 3.3.2.1 CNPase

O mesmo padrão de distribuição das culturas controle, DMSO/T3/30 (Figura 21A), foi observado nos grupos SQ/T3/30 e FORSC/T3/30 (Figuras 21B e C, respectivamente). Quando observamos o grupo H-89/T3/30 pudemos identificar o acúmulo da CNPase no corpo celular e nas extremidades dos prolongamentos da oligodendroglia, que em sua maioria aparecem encurtados (Figura 21D, setas). Enquanto na oligodendroglia do grupo FORSC+H-89/T3/30 as células apresentaram a proteína acumulada apenas no corpo celular (Figura 21E). Ainda aos 5div, a intensidade da marcação parece menos intensa com a inibição da adenilato ciclase e mais intensa com a ativação da enzima (Figuras 21B e C, respectivamente).

Com o tratamento por 24 horas pudemos observar que todos os grupos SQ/T3/24, FORSC/T3/24, H-89/T3/24 e FORSC+H-89/T3/24 (figuras 21G, H, I e J, respectivamente) que a CNPase se manteve distribuída pela célula com o mesmo padrão das culturas controle, DMSO/T3/24 (Figura 21F).

### 3.3.2.2 MAG

O mesmo padrão de distribuição da MAG, com acúmulo no corpo celular, observado no grupo DMSO/T3/30 (Figura 22A, cabeças de seta) foi observado nos grupos SQ/T3/30, FORSC/T3/30 e H-89/T3/30 (Figuras 22B, C e D). Já no grupo FORSC+H-89/T3/30 a proteína estava distribuída por toda a célula (Figura 22E).

Com 24 horas de tratamento observamos que os grupos FORSC/T3/24 e H-89/T3/24 (Figuras 22H, I respectivamente) continuam apresentando um padrão semelhante ao grupo DMSO/T3/24, agora com a MAG já distribuída pelos prolongamentos (Figura 22F). Já nos grupos SQ/T3/24 e FORSC+H-89/T3/24 (Figuras 22G e J, respectivamente) a MAG se apresenta concentrada no corpo celular, sendo que no grupo FORSC+H-89/T3/24 véus de membrana podem ser visualizados (Figura 22J, setas).



Figura 21 – Oligodendroglia com 5 ou 6 *div* imuno identificadas com o anticorpo anti-CNPase

Legenda: A-E: Culturas com 5 div e F-J: Culturas com 6 div. A-F: Culturas controle; B-G: Tratadas com SQ 22356; C-H: Tratadas com forscolina; D-I: Tratadas com H-89 e E-J: Tratadas com forscolina e H-89. Em A observamos a CNPase distribuída por toda a célula, mesmo padrão observado em B, C, F, G, H, I e J. Em D observamos o padrão filamentar com acumulo da proteína no corpo celular e prolongamentos (Setas). Em E nota-se o padrão puntiforme com acumulo no corpo celular. Barra de calibração: 20µm.

Fonte: Felgueiras, 2016.



Figura 22 – Oligodendroglia com 5 ou 6 *div* imuno identificadas com o anticorpo anti-MAG.

Legenda: A-E: Culturas com 5 div e F-J: Culturas com 6 div. A-F: Culturas controle; B-G: Tratadas com SQ 22356; C-H: Tratadas com forscolina; D-I: Tratadas com H-89 e E-J: Tratadas com forscolina e H-89. Em A, B, C, D, G e J a MAG está acumulada no corpo celular (Cabeças de seta). Em E observamos a MAG distribuída pela célula. Em F, H e I a MAG apresentou a proteína distribuída pela célula e também acumulo no corpo celular. Em J também é possível observar a presença de véus de membrana (setas). Barra de calibração: 20µm. Fonte: Felgueiras, 2016.

#### 3.3.4.3 RhoA

Foi possível identificar no grupo DMSO/T3/30 a RhoA distribuída pela célula evidenciando o prolongamento e o corpo celular (Figura 23A). Este padrão é coerente com o de uma cultura em diferenciação onde diferentes estágios de oligodendroglia coexistem e onde eventos de polimerização/despolimerização de citoesqueleto estão ocorrendo. O mesmo padrão de distribuição foi observado na oligodendroglia dos grupos SQ/T3/30 FORSC/T3/30, e H-89/T3/30 (Figuras 23B, C e D, respectivamente), sendo que com a modulação da adenil ciclase a marcação parece menos intensa. No grupo FORSC+H-89/T3/30 notamos o acúmulo da proteína no núcleo da célula (Figura 23E, Setas).

Com 6 div no grupo DMSO/T3/24 notamos a RhoA distribuída pela célula, com menor intensidade de marcação em relação à cultura de 5div (Figura 23F). Os grupos SQ/T3/24, FORSC/T3/24 e FORSC+H-89/T3/24 (Figuras 23G, H e J), também apresentam a RhoA distribuída, porém as culturas tratadas com SQ e FORSC apresentam uma intensidade de marcação maior que a da cultura controle. No grupo H-89/T3/24 notamos o acúmulo da proteína no núcleo celular (Figura 23I, Setas).



Figura 23 – Oligodendroglia com 5 ou 6 *div* imuno identificadas com o anticorpo anti-RhoA

Legenda: A-E: Culturas com 5 div e F-J: Culturas com 6 div. A-F: Culturas controle; B-G: Tratadas com SQ 22356; C-H: Tratadas com forscolina; D-I: Tratadas com H-89 e E-J: Tratadas com forscolina e H-89. Em A, B, C, D, F, G, H e J notamos a RhoA distribuída pela célula. Em E e I a proteína está acumulada no núcleo celular (Setas). Barra de calibração: 20µm. Fonte: Felgueiras, 2016.

# 3.3.2 <u>Manipulação da via do AMPc/PKA e distribuição da CNPase, MAG e RhoA na</u> ausência de T3

#### 3.3.2.1 CNPase

Nas culturas com 5 div cultivadas em ausência de T3 o grupo DMSO/-T3/30 apresentou muitas células com a CNPase acumulada no corpo celular (Figura 24A). Nos grupos tratados SQ/-T3/30, FORSC/-T3/30 e FORSC+H-89/-T3/30 foi observada a proteína distribuída por toda a célula (Figuras 23 B, C e E, respectivamente), sendo que no grupo tratado com SQ a imunorreatividade parece menos intensa (Figura 24B) e no grupo FORSC+H-89/-T3/30 observamos também a marcação no núcleo (Figura 24E). No grupo H-89/-T3/30 a CNPase está mais consentrada no corpo celular (Figura 24D).

Nas culturas com 6 div em ausência de T3 não observamos no grupo DMSO/-T3/24 a CNPase concentrada no corpo celular e estava distribuída por todas as células em padrão puntiforme (Figura 24F). O mesmo padrão foi observado nos grupos SQ/-T3/24, FORSC/-T3/24 e H-89/-T3/24 (Figuras 24G, H e I, respectivamente). No grupo FORSC+H-89/-T3/24 a CNPase estava concentrada no núcleo celular (Figura 24J).

### 3.3.2.2 MAG

Quando observamos as culturas com 5 div cultivadas em ausência de T3 observamos no grupo DMSO/-T3/30 a MAG, assim como no grupo DMSO/T3/30, acumulada no corpo celular (Figura 25A). Todos os grupos tratados por 30 minutos apresentaram a proteína distribuída pela célula (Figuras 25B, C, D e E).

Com 6 div em ausência de T3 o grupo DMSO/-T3/24 apresentou a oligodendroglia com a MAG distribuída pela célula (Figura 25F). O mesmo foi observado no grupo SQ/-T3/24 (Figuras 25G). Nos grupos FORSC/-T3/24, H-89/-

T3/24 e FORSC+H-89/-T3/24 observamos a MAG também presente no núcleo celular (Figura 25H, I e J, respectivamente).





Legenda: A-E: Culturas com 5 div e F-J: Culturas com 6 div. A-F: Culturas controle; B-G: Tratadas com SQ 22356; C-H: Tratadas com forscolina; D-I: Tratadas com H-89 e E-J: Tratadas com forscolina e H-89. Em A notamos a CNPase distribuída pela célula porém algumas células apresentam acumulo no corpo celular. De B a J notamos a proteína distribuída pela célula. Em E e J ainda podemos observar a CNPase acumulada no núcleo celular. Barra de calibração: 20µm.

Fonte: Felgueiras, 2016.

Figura 25 – Oligodendroglia com 5 ou 6 *div* cultivadas em ausência de T3 imuno identificadas com o anticorpo anti-MAG



Legenda: A-E: Culturas com 5 div e F-J: Culturas com 6 div. A-F: Culturas controle; B-G: Tratadas com SQ 22356; C-H: Tratadas com forscolina; D-I: Tratadas com H-89 e E-J: Tratadas com forscolina e H-89. Em A observamos a MAG acumulada no corpo celular. De B a J notamos a proteína distribuída pela célula. Em H, I e J, observa-se também a presença da MAG no núcleo da oligodendroglia. Barra de calibração: 20µm.
Fonte: Felgueiras, 2016.

Na análise da distribuição da RhoA nas culturas cultivadas em ausência do T3 pudemos observar no grupo DMSO/-T3/30 a RhoA distribuída pela célula (Figura 26A), o mesmo foi observado nos grupos SQ/-T3/30, FORSC/-T3/30, H-89/-T3/30 e FORSC+H-89/-T3/30 (Figuras 26B, C, D, e E respectivamente). Contudo os tratamentos com forscolina e H-89 apresentaram marcação mais intensa que o grupo DMSO/-T3/30.

Com 6 div em ausência de T3 observamos no grupo DMSO/-T3/24 a RhoA distribuída pela oligodendroglia (Figura 26F), assim como na presença de T3, sendo observado o mesmo padrão nos grupos SQ/-T3/24, FORSC/-T3/24 e FORSC+H-89/-T3/24 (Figuras 26G, H e J, respectivamente), apenas no grupo H-89/-T3/24 notamos a RhoA acumulada no núcleo da célula (Figura 26I). Mais uma vez o tratamento com forscolina apresentou marcação mais intensa da RhoA.

Figura 26 – Oligodendroglia com 5 ou 6 *div* cultivadas em ausência de T3 imuno identificadas com o anticorpo anti-RhoA



Legenda: A-E: Culturas com 5 div e F-J: Culturas com 6 div. A-F: Culturas controle; B-G: Tratadas com SQ 22356; C-H: Tratadas com forscolina; D-I: Tratadas com H-89 e E-J: Tratadas com forscolina e H-89. Em A, B, C, D, F, G, H e J a proteína encontra-se distribuída pela célula. Em E e I nota-se a RhoA acumulada no núcleo celular. Barra de calibração: 20µm. Fonte: Felgueiras, 2016.

	Tratamento	CNF	Pase	M	AG	RhoA			
	Tratamento	30 min	24h	30 min	24h	30 min	24h		
T3	DMSO	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	Acumulado no corpo celular	Distribuída com acumulo no corpo celular	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula		
	SQ22356	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	Acumulado no corpo celular	Acumulado no corpo celular	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula		
	FORSCOLINA	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	Acumulado no corpo celular	Distribuída com acumulo no corpo celular	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula		
	H-89	Acumulado no corpo celular e prolongamentos	Distribuída pela célula	Acumulado no corpo celular	Distribuída com acumulo no corpo celular	Distribuída pela célula	No núcleo		
	FORSC+H-89	Acumulado no corpo celular	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	Acumulado no corpo celular	No núcleo	Distribuída pela célula		
-T3	DMSO	Distribuída com acumulo no corpo celular	Distribuída pela célula	Acumulado no corpo celular	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula		
	SQ22356	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	Distribuída com acumulo no corpo celular	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula		
	FORSCOLINA	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula e no núcleo	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula		
	H-89	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula	No núcleo		
	FORSC+H-89	Distribuída pela célula e no núcleo	Distribuída pela célula e no núcleo	Distribuída pela célula	Acumulado no corpo celular	Distribuída pela célula	Distribuída pela célula		

Tabela 3 - Resumo do padrão de distribuição das proteínas

## 4 DISCUSSÃO

Para a análise da morfologia celular utilizamos a marcação imunocitoquímica para o anticorpo anti-CNPase. Importante ressaltar que apesar de parte da literatura não mencionar a possibilidade de ser identificada a CNPase no estágio de progenitor, nosso laboratório já demonstrou que é possível a localização da mesma neste estágio (Younes-Rapozo et al., 2009) e por isso optamos por manter a utilização desse marcador que identifica diferentes estágios de oligodendroglia.

Sobre a classificação em si é preciso ressaltar que os parâmetros utilizados para definir o estágio de desenvolvimento das células foram a imunoidentificação com o anticorpo anti-CNPase para a confirmação da linhagem celular e a morfologia para a identificação do tipo celular propriamente, utilizando como critérios o número de prolongamentos e a presença dos véus de membrana. É possível que com critérios diferentes pudéssemos observar perfis diferentes.

De qualquer forma, os resultados obtidos demonstraram que o perfil de distribuição dos diferentes estágios de maturação não se alterou independente do tempo de manutenção da cultura, sendo este perfil caracterizado por uma porcentagem menor em OPC, uma grande porcentagem de PO, geralmente o maior independente do tratamento, com uma quantidade reduzida de IO e uma porcentagem intermediária no estágio M ou NC. Os perfis com grande número de oligodendrócitos em estágios precoces do desenvolvimento é explicado pelo fato das culturas serem recentes, os trabalhos anteriores do laboratório já demonstraram que apenas com 7 div passamos a ter maior número de células em estágios mais tardios (Younes-Rapozo et al., 2006).

## 4.1 Efeitos dos fármacos na oligodendroglia

Nas culturas com 5 div apenas nos estágios IO e NC notamos diferenças na porcentagem das células, no primeiro o tratamento com forscolina foi capaz de aumentar a porcentagem de células. Esse aumento no número de oligodendrócitos imaturos já era esperado tendo em visto que já é sabido a importância do AMPc para a diferenciação da oligodendroglia, porém o mesmo não foi percebido no estágio maduro. Em 2015 foi demonstrado em células de Schwann que o AMPc é importante sim para alterações morfológicas e diferenciação destas células, contudo não é capaz de orientar a mielinização, sendo o seu limite de atuação a expressão de marcadores como o galactocerebrosídeo lipídico de mielina, o O1, um marcador importante para a mielinização, mas incapaz de conduzi-la (Bacallao & Monje, 2015).

Com a ativação da adenilato ciclase e inibição da PKA ocorreu o contrário, a redução da porcentagem de células no estágio imaturo; porém, no tipo NC, o tratamento com FORSC+H-89 apresentou maior porcentagem não só em relação a do grupo DMSO, como de todos os outros grupos. É possível que os dois resultados tenham relação direta, sendo a pequena porcentagem de IO uma consequência da grande porcentagem de oligodendroglia NC. Nosso laboratório também já demonstrou aumento na oligodendroglia NC na oligodendroglia *in vitro* tratada com o inibidor da ERK PD98059 que apresentava marcadores específicos de células maduras como MBP (Younes-Rapozo et al., 2009), o que indica que a oligodendroglia prosseguiu com a diferenciação porém apresentando encurtamento nos prolongamentos quando a ERK é inibida.

Com a inibição da PKA a RhoA é ativada, assim ocorre a desconstrução do citoesqueleto e consequentemente a redução dos prolongamentos dos oligodendrócitos fazendo com que as células não apresentassem prolongamentos (NC) ou um pequeno número deles (Liang et al., 2004, Seasholtz 2004, Tkachenko et al., 2011). Importante ressaltar que no estágio M não identificamos diferença, indicando que a RhoA era capaz de interferir na formação dos prolongamentos, mas não na formação dos véus de membrana. Contudo, já foi mencionada a necessidade da inativação da RhoA para que possa ocorrer a especialização da membrana plasmática nos oligodendrócitos (Kippert et al., 2007).

No grupo FORSC+H-89/T3/30 notamos a RhoA no núcleo da célula o que pode indicar um aumento na síntese da proteína e por isso o pequeno número de células IO com o grande número de células NC, apesar da elevação nós níveis de AMPc.

Diferente do que foi observado anteriormente, nas culturas com 6 div a inibição da PKA causou a redução da porcentagem de OPCs, um efeito já esperado de retardo da diferenciação (Liang et al., 2004), mas o fato de só podermos observar

os efeitos com 24 horas de tratamento demonstra que é necessário um tempo maior para que a inibição da PKA surta efeito. Uma outra possível explicação para a redução no número de OPCs seria a morte de células nesse estágio de diferenciação. Entretanto, como o número total de células não varia com os tratamentos, essa explicação é a menos provável.

Em IO também deixamos de observar a maior porcentagem de células quando comparado com o grupo DMSO, indicando com isso que o tratamento com forscolina tem um efeito passageiro. Contudo, continuamos observando a pequena porcentagem de células com o tratamento FORSC+H-89, demonstrando a persistência dos efeitos deste tratamento, mas sem a persistência da maior porcentagem de células NC, um possível motivo para isso é que com o passar do tempo, células que antes não tinham seus prolongamentos conseguiram formar os mesmos e assim puderam ser classificadas dentro de algum estágio. Um dado que pode reforçar esta hipótese é a de que com 24 horas não vemos mais o acúmulo da RhoA no núcleo dos oligodendrócitos do grupo FORSC+H-89/T3/24.

Para a medição dos prolongamentos nós utilizamos como base a média, ou mediana no caso do tipo maduro, do tamanho dos prolongamentos das células presentes nas culturas controle DMSO/T3/30 e DMSO/T3/24. Após o cálculo das médias foi definida a porcentagem de células cujos tamanhos dos prolongamentos são menores ou iguais a media ou mediana e das que ultrapassavam as mesmas.

Nosso objetivo ao separar a análise pelos tipos celulares era tentar identificar a existência de algum efeito estágio especifico. Esta análise é importante para a oligodendroglia, pois é sabido que alterações nos prolongamentos dessas células são fundamentais para o desenvolvimento das mesmas.

Em relação à morfologia da oligodendroglia já foi demonstrado que existem diferentes tipos de oligodendrócitos com diferentes formas e tamanhos (Del Rio-Hortega P, 1928), contudo não podemos creditar a esse fato as diferenças observadas neste trabalho, tendo em vista que nas regiões cerebrais utilizadas não foram identificadas diferenças entre os tipos de oligodendrócitos (Barradas et al., 1998).

Nas culturas com 5 div no estágio de progenitor foram evidentes os efeitos da inibição da adenilato ciclase na redução da porcentagem de células com prolongamentos superiores à média. O fato de não ser identificada diferença entre os grupos DMSO/T3/30 e H-89/T3/30 indica que os efeitos do AMPc na formação dos prolongamentos pelo menos neste estágio independem da PKA, ou pelo menos não dependem dela exclusivamente. Esses dados são similares aos resultados vistos em células de Schawnn que demonstraram a participação da PKA na divisão celular, mas não na diferenciação destas células, processo que teria a participação da EPAC (Bacallao & Monje, 2013, Yang et al., 2016). Porém, com 24 horas de tratamento, nas culturas com 6 div, as células tratadas com o SQ apresentaram porcentagem maior que a média, acreditamos que isto seja uma compensação aos efeitos observados com 30 minutos de tratamento.

No estágio de pré oligodendrócito foi necessário mais tempo para que pudesse ser identificado algum efeito dos tratamentos. Apenas com 24 horas foi possível identificar que o grupo FORSC/T3/24 apresentou maior porcentagem das células com prolongamentos superiores à média. Em motoneurônios também foi visto o crescimento dos prolongamentos quando tratados com forscolina (Aglah et al., 2008), o que reforça a hipótese da participação do AMPc no crescimento de prolongamentos.

Já o estágio M se mostrou mais sensível aos tratamentos, com todos os grupos apresentando redução da porcentagem de células com prologamentos superiores à mediana. Estes resultados podem parecer uma contradição, já que tanto o ativador da adenilato ciclase quanto o inibidor apresentaram o mesmo resultado. Uma possível explicação é que como o AMPc estimula a diferenciação da oligodendroglia, a maior disponibilidade do mesmo acaba causando um encurtamento natural dos prolongamentos e formação dos véus de membrana com a distribuição das proteínas MAG e MBP expressas na fase de mielinização. Contudo estes efeitos são transitórios, pois todos os grupos tratados apresentam aumento na porcentagem de células, no caso dos grupos SQ/T3/24 e FORSC/T3/24 maior até do que o grupo DMSO/T3/24.

Na análise da distribuição da CNPase observamos que a inibição da PKA fez com que a proteína estivesse localizada no corpo celular e nos prolongamentos, este resultado pode estar associado com a redução dos prolongamentos observado no estágio M quando tratados com H-89. Contudo, no grupo FORSC+H-89/T3/30, que apresentou a redução dos prolongamentos nos estágios OPC e M, observamos apenas o acumulo no corpo celular. Em oligodendrócitos, parte do RNAm da CNPase é transportado para os seus sítios antes que ocorra a transcrição (Braun et al., 1988; Trapp et al., 1988), o que também depende dos microtúbulos (Brumwell et al., 2002), o tratamento com H-89 pelo mesmo período é capaz de causar alterações na distribuição da tubulina, que ficou mais concentrada no corpo celular da oligodendroglia tratada com o inibidor (Felgueiras, 2010). Acreditamos que a explicação para isso passa pelo fato do AMPc atuar na transcrição da CNPase, causando o aumento da transcrição da CNPase associada a uma desconstrução do citoesqueleto de tubulina não permitindo a distribuição correta da proteína. De qualquer forma ambos os efeitos se mostraram passageiros já que não foram observados com 24 horas de tratamento.

A MAG tem como padrão o acúmulo no corpo celular, contudo guando temos o aumento nos níveis do AMPc e a inibição da PKA a proteína se apresenta distribuída pela célula. Com o passar do tempo a proteína além de estar no corpo celular também está distribuída pela célula, porém a inibição da adenilato ciclase manteve a proteína acumulada no corpo celular. Indicando que a distribuição da MAG pode ser dependente do AMPc, mas que o nucleotídeo possa atuar por outra via, já que a inibição da PKA não apresentou alterações. Yang e colaboradores demonstraram que a redução dos níveis do AMPc pela atividade do receptor acoplado a proteína G 37 (GPR37) é capaz de inibir a maturação da oligodendroglia impedindo a fosforilação da ERK via EPAC e não PKA, com conseguências na imunomarcação das proteínas MBP e PLP (Yang et al., 2016). É possível que o mesmo se dê com a MAG justificando a manutenção do padrão mesmo com 24 horas de tratamento. No grupo FORSC+H-89, também com esse período de tratamento, observamos acúmulo da MAG no corpo celular, acompanhado também da presença da MAG nos véus de membrana. Isso sugere que o H-89 possa estar atuando na ROCK, como já descrito por Leemhuis e colaboradores (2002) e, com isso, os efeitos da forscolina figuem exacerbados, com elevação dos níveis de AMPc e consegüente diferenciação.

Como já era esperado a PKA se mostrou importante para a distribuição da RhoA já que quando ocorreu a inibição da mesma, a proteína se apresentou acumulada no núcleo celular, indicando um aumento na transcrição gênica, sendo necessário um tempo para que este efeito seja percebido. Como o tratamento com SQ não apresentou alteração acreditamos que este efeito está associado a PKA em si, este resultado pode estar relacionado com a menor porcentagem de células do grupo H-89/T3/24 no estágio OPC, sendo o aumento da transcrição responsável pelo retardo no desenvolvimento da oligodendroglia em estágios precoces.

Quando temos associado à inibição da PKA o aumento nos níveis de AMPc o acumulo de RhoA no núcleo da oligodendroglia já é visto com 5 div, sendo este efeito passageiro. Estes resultados parecem explicar os resultados observados nos tipos celulares, pois nas culturas com 5 div vemos uma porcentagem elevada de células do grupo FORSC+H-89/T3/30 no estágio NC e assim como com 24 horas de tratamento não notamos mais o acúmulo da proteína no núcleo da oligodendroglia também deixamos de identificar maior porcentagem de células NC tratadas com FORSC+H-89 nas culturas com 6 div. Além disso, parece ter relação também com os resultados do tamanho dos prolongamentos, pois nos estágios progenitor e maduro das culturas com 5 div notamos que a porcentagem de células superiores à média ou mediana no grupo FORSC+H-89/T3/30 é menor que DMSO/T3/30 o que não era observado nas culturas com 6 div.

#### 4.2 Efeitos da ausência do T3

Não foi possível identificar diferenças na distribuição do tipo celular nas culturas que foram cultivadas sem T3 aos 5 e 6 div, e neste período estas culturas apresentaram um perfil de distribuição de células semelhante às culturas com T3. Este resultado, contudo, não diminui o papel do hormônio tireoideano na diferenciação destas células, uma vez que as culturas foram avaliadas em um período curto, em que podemos ver oligodendrócitos distribuídos em diferentes estágios de maturação. A divisão celular da oligodendroglia segue um padrão intrínseco da linhagem e não é sincronizada, ou seja, a capacidade proliferativa de cada OPC varia muito. Enquanto uma célula se divide uma ou duas vezes, outras se dividem até 8 vezes antes de começarem a se diferenciar (Temple & Raff, 1986), e por isso é possível observar células em estágios imaturos e maduros em uma cultura de 5/6div. O hormônio tireoideano é um dos fatores extrínsecos mais importantes para tirar as células do estágio de proliferação para dar início à diferenciação (Barres et al., 1994). De fato, nosso laboratório já demonstrou que na ausência de T3 ocorre alteração no perfil dos tipos celulares (OPC, PO e M) ao longo de 10 div, em que as culturas sem T3 apresentavam um atraso na diferenciação. Este atraso significativo foi identificado ao longo da cultura com a interação Tempo x tratamento (3, 7 e 10div), porém, só possível identificar uma diferença no tipo celular aos 10div, quando foi observada uma diminuição do número de células maduras (Younes-Rapozo et al., 2006). É possível que para identificar diferenças na distribuição de células no presente trabalho, fosse necessário um tempo de cultura maior.

Com relação ao tamanho dos prolongamentos, observamos que no estágio OPC o T3 é importante para a formação dos mesmos, uma vez que com 5 div sem hormônio não foram identificadas células com prolongamentos superiores à média, contudo o efeito se mostrou passageiro tendo em vista que não observamos diferenças nas culturas com 6 div em relação ao grupo DMSO/T3/24. Este dado confirma uma observação anterior do nosso laboratório de que a ausência de T3 poderia diminuir 0 tamanho dos prolongamentos dos progenitores de oligodendrócitos (Younes-Rapozo et al., 2006), e corrobora com outros trabalhos na literatura (Fernandez et al., 2004). Quando comparamos a média do tamanho dos prolongamentos do grupo DMSO/T3/24 em OPC com PO observamos uma redução do primeiro para o segundo, por isso o fato do grupo DMSO/-T3/24 em PO apresentar mais células superiores à média que DMSO/T3/24 pode ser um indicativo de retardo no desenvolvimento do oligodendrócito que deveria ter uma redução no tamanho dos seus prolongamentos, mas aparentemente não é isso que ocorre.

Já no estágio M com 5 div notamos que a ausência do hormônio causou a redução do número de células com prolongamentos superiores à mediana, indicando que mesmo em estágios mais avançados do desenvolvimento, com a formação dos véus, o T3 segue sendo importante na manutenção dos prolongamentos. Já com 6 div notamos que as células cultivadas sem T3 apresentaram mais células com prolongamentos superiores a mediana. Acreditamos que isto se trata outra vez de um retardo no desenvolvimento da célula, tendo em vista que o grupo DMSO/T3/24 apresentou um valor de mediana muito menor que o grupo DMSO/T3/30 indicando uma redução do tamanho dos prolongamentos em condições normais e que não foi observado na ausência do T3.

Em relação à distribuição das proteínas a ausência do T3 causou o acumulo da CNPase no corpo celular, mesmo estando a proteína distribuída pela célula, porém os efeitos se mostraram passageiros já que o acúmulo no corpo celular só foi observado nas culturas com 5 div, o que já havia sido demonstrado por nosso grupo (Younes-Rapozo, et al., 2006). Já em relação a MAG, a ausencia de T3 não parece afetar a distribuição, entretanto, como não é possível observar acúmulo na cultura

de 6 div, podemos sugerir que há uma redução na síntese da proteína, e, consequentemente um atraso na diferenciação. A distribuição da RhoA não é afetada pela ausência de T3. Entretanto, a intensidade da marcação está reduzida aos 5 div e aumentada aos 6 div, o que, mais uma vez pode sugerir um atraso na diferenciação provocada pela ausência do T3.

# 4.3 Efeitos dos tratamentos farmacológicos na oligodendroglia cultivada sem T3

No estágio OPC apenas o tratamento com SQ foi capaz de reverter os efeitos da ausência de T3, sobre o tamanho dos prolongamentos nas culturas com 5 div. Esse resultado sugere que o AMPc de alguma forma pode ter um efeito inibitório quando o T3 não está presente.

Já no estágio PO, com 5 div a ausência de T3 demonstrou ter efeito nos grupos os quais a PKA estava inibida que apresentaram menor porcentagem de células com prolongamentos superiores à média quando comparados com os grupos controle, contudo com 24 horas de tratamento estes grupos pareceram se recuperar. Já a inibição da adenilato ciclase parece causar um atraso no desenvolvimento da oligodendroglia, com um efeito semelhante ao observado no grupo DMSO/-T3/24, não permitindo que ocorra a redução dos prolongamentos.

O estágio IO foi o que se mostrou menos suscetível aos tratamentos, só sendo possível identificar alguma alteração nos grupos com 6 div sem T3, com uma redução da porcentagem de células superiores à média no grupo DMSO/-T3/24. O aumento na intensidade de marcação da RhoA também observada aos 6 div é coerente com esta redução. Uma possível explicação para isso é o fato de que no estágio IO ocorre a maior variação de porcentagem de células entre os diferentes grupos de tratamento sendo a construção e desconstrução dos prolongamentos um ponto importante no processo de diferenciação é possível que os próprios grupos DMSO/T3/30 e DMSO/T3/24 apresentem uma variação tão grande no tamanho dos prolongamentos que não seja possível identificar alterações causadas pelo tratamento nestes.

No estágio M o aumento nos níveis de AMPc se mostrou capaz de reverter os efeitos da ausência do hormônio em ambos os tempos de tratamento o que pode

indicar que o T3 atue na formação dos prolongamentos da oligodendroglia necessitando da participação do AMPc neste processo. Curioso observar que a porcentagem de células superiores a mediana no grupo FORSC/-T3/24 é menor que no grupo FORSC/T3/24 podendo indicar que assim como o T3 necessita do AMPc para atuar na formação dos prolongamentos o AMPc também precisa da ativação via T3, sugerindo uma interdependência. Porém, notamos que o tratamento com FORSC+H-89 não foi capaz de reverter os efeitos da ausência de T3 demonstrando que o AMPc precisa também da PKA. Assim, podemos sugerir que o hormônio tireoideano atue na formação dos prolongamentos da oligodendroglia através da via do AMPc/PKA, mas que a via também não é capaz de regular o tamanho dos prolongamentos sem que o T3 esteja presente.

Os outros grupos tratados em ambos os tempos apresentaram um porcentual menor de células com prolongamentos maiores que a mediana do grupo DMSO/T3/30, e com um percentual maior de células com prolongamentos maiores que a mediana do grupo DMSO/T3/24. Esses resultados sugerem um retardo no desenvolvimento celular, pois tem sido descrito que ao atingirem o estágio maduro, os oligodendrócitos têm retração dos microtúbulos e encurtamento nos prolongamentos ao mesmo tempo em que ocorre a compactação da bainha (ver Bauer et al., 2009, para revisão).

Na distribuição da CNPase todos os tratamentos, exceto o com FORSC+H-89, foram capazes de reverter o efeito da ausência do T3. Enquanto o grupo DMSO/-T3/30 apresentou a proteína acumulada no corpo celular de algumas células o tratamento FORSC+H-89/-T3/30 apresentou a CNPase distribuida pela oligodendroglia, mas com acumulo no núcleo mantendo o padrão mesmo nas culturas com 6 div.

A distribuição da MAG por sua vez se mostrou mais suscetível aos tratamentos na ausência do T3, pois praticamente todos os grupos tratados apresentaram alterações na sua distribuição. A redução nos níveis de AMPc parece acelerar a distribuição da proteína já que o grupo SQ/-T3/30 apresentou padrão semelhante ao do grupo DMSO/T3/24, já a inibição da PKA com o aumento nos níveis do AMPc aparentemente não sofre efeito da ausência de T3 já que apresentou o mesmo padrão de quando o hormônio está presente aos 5 div. Entretanto, apesar da distribuição no núcleo aos 6 div, não é possível verificar a

presença de véus de membrana, indicando que a presença do hormônio tireoideano é importante para a formação destes.

Com a ausência do T3 a RhoA apresenta marcação mais intensa e distribuída pela célula com os tratamentos com forscolina e com H-89 por 30 minutos. Acreditamos que isso ocorra por aumentar a síntese e a distribuição da RhoA pela célula. Aos 6 div notamos no grupo H-89/-T3/24 que ocorre marcação mais intensa no núcleo. Além disso, o grupo FORSC/-T3/24 continuou apresentando marcação mais intensa. Os resultados parecem reforçar a importância do T3 na formação dos prolongamentos, estando ela associada a ação da RhoA no citoesqueleto. Um ponto que pode parecer contraditório é como o tratamento com forscolina pode apresentar também marcação mais intensa da RhoGTpase se atua justamente na formação dos prolongamentos. Apesar da RhoA ser relacionada com o seu papel na desconstrução do citoesqueleto e na manutenção dos prolongamentos celulares, sendo identificado o acúmulo dela onde serão formadas as protrusões celulares iniciando a polimerização da actina e tendo sua atividade inibida quando a Rac1 atinge o seu máximo de ativação (Machachek et al., 2009).

Nossos resultados reforçam o papel do hormônio tireoideano em etapas tardias da diferenciação da oligodendroglia assim como na formação/manutenção de seus prolongamentos. Além disso, sugerem que a via do AMPc/PKA também é importante para a formação dos prolongamentos e que a modulação desta via pode interferir nos efeitos da ausência do hormônio.

## CONCLUSÕES

O tratamento com ativadores/inibidores da via do AMPc/PKA por 30 minutos não altera o percentual de OPCs em oligodendroglia cultivada na presença de T3. Porém o tratamento com o inibidor da PKA por 24 horas reduz o percentual de OPCs;

A ativação da adenil ciclase somente ou a ativação desta com a inibição da PKA por 30 minutos reduz o percentual de OPCs com prolongamentos superiores a média;

A ausência de hormônio tireoideano reduz o percentual de células com prolongamentos superiores à média em culturas de 5div e o tratamento por 30 minutos com ativador ou inibidor da adenil ciclase reverte este efeito.

O tratamento com ativadores/inibidores da via do AMPc/PKA por 30 minutos ou 24 horas não altera o percentual de POs em oligodendroglia cultivada na presença de T3. O percentual de POs com prolongamentos acima da média somente sofre alteração com o tratamento com o ativador da adenil ciclase por 24 horas.

A ausência do T3 não altera o percentual de POs com prolongamentos superiores à média. Entretanto a inibição da PKA ou ativação da adenilato ciclase com a inibição da PKA juntos por 30 minutos reduz o percentual de células com prolongamentos acima da média. Esses efeitos não foram observados na cultura de 6div tratada por 24 horas.

O aumento dos níveis de AMPc na presença de T3 aumenta o percentual de IOs, sem alterar o percentual destes com prolongamentos acima da média. Por outro Iado, a deficiência de T3 reduz o percentual de IOs com prolongamentos acima da média e a redução dos níveis de AMPc e inibição da PKA revertem este efeito, o que sugere que a interação entre T3 e a via do AMPc/PKA seja importante na diferenciação e na formação dos prolongamentos;

O tratamento com ativadores/inibidores da via do AMPc/PKA por 30 minutos ou 24 horas também não altera o percentual de oligodendroglia no estágio M na presença de T3. Entretanto, todos os tratamentos por 30 minutos reduzem o percentual de oligodendroglia M com prolongamentos acima da mediana. Os resultados de aumento do percentual com 24 horas de tratamento sugerem um efeito compensatório da modulação da via do AMPc/PKA sobre a formação dos prolongamentos no estágio maduro. No estágio maduro a elevação nos níveis do AMPc é capaz de reverter os efeitos da ausência do T3, tanto nas culturas de 5div quanto na de 6 div;

Os resultados com relação à distribuição da CNPase e da MAG comprovam o papel do T3 na distribuição dessas proteínas na oligodendroglia e que a elevação dos níveis de AMPc podem reverter os efeitos da ausência do T3.

A RhoA apresenta-se distribuída na oligodendroglia cultivada com T3 aos 5 div e com a inibição da PKA obervamos a marcação no núcleo o que sugere um aumento na transcrição. A marcação da RhoA está reduzida na oligodendroglia cultivada 5 div em ausência de T3 e o tratamento com ativador da adenil ciclase ou inibidor da PKA reverte este efeito, o que reforça o a interação do hormônio tireoideano com a via do AMPc/PKA na modulação de proteínas reguladoras de citoesqueleto com provável consequencia na formação/manutenção nos prologamentos da oligodendroglia.

## REFERÊNCIAS

Adamo AM, Aloise PA, Soto EF, Pasquini JM. 1990. Neonatal hyperthyroidism in the rat produces an increase in the activity of microperoxisomal marker enzymes coincidente with biochemical signs of accelerated myelination. J. Neurosci. Res. 25 (3): 353–359.

Adamson P, Paterson HF, Hall A.1992. Intracellular localization of the P21rho proteins. J Cell Biol 119: 617–627.

Afshari FS, Chu AK, Sato-Bigbee C. 2001. Effect of cyclic AMP on the expression of myelin basic protein species and myelin proteolipid protein in committed oligodendrocytes: differential involvement of the transcription factor CREB. J Neurosci Res 66(1): 37-45.

Aglah C, Gordon T, Posse de Chaves EI. 2008. cAMP promotes neurite outgrowth and extension through protein kinase A but independently of Erk activation in cultured rat motoneurons. Neuropharmacology 55(1): 8-17.

Agrawal HC, Sprinkle TJ, Agrawal D. 1994. In vivo phosphorylation of 2´,3´- cyclic nucleotide 3´- phosphohydrolase(CNP): CNP in brain myelin is phosphorylated by forskolin- abd phorbol ester-sensitive protein kinases. Neurochem Res. 19(6): 721-728.

Aguirre A, Gallo V. 2004. Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG-2expressing progenitors of the subventricular zone. J Neurosci 24:10530-10541.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 2004. Biologia Molecular da Célula 4<sup>a</sup> ed.Editora Artes Médicas-Porto Alegre.

Amur-Umarjee, SG, Dasu, RG, Campagnoni, AT. 1990. Temporal expression of myelin specific componenents in neonatal mouse brain cultures: evidence that 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase appears prior galactocerebroside. Developmental Neuroscience. 12: 251-262.

Anitei M, Ifrim M, Ewart MA, Cowan AE, Carson JH, Bansal R, Pfeiffer SE. 2006. A role for Sec8 in oligodendrocyte morphological differentiation. J Cell Sci 119(Pt 5): 807-818.

Aplin AE, Juliano RL. 1999. Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. J Cell Sci 112 (Pt 5): 695-706.

Arrieumerlou C, Meyer T. 2005. A local coupling model and compass parameter for eukaryotic chemotaxis. Dev Cell 8: 215-277.

Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. 1995. Notch signaling. Science 268: 225-232.

Aspenström P, Ruusala A, Pacholsky D. 2007. Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. Exp Cell Res 13(17): 3673-3679.

Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, Tessier-Lavigne M. 2008. PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. Science 322: 967–970.

Bacallao K, Monje PV. 2013. Opposing roles of PKA and EPAC in the cAMPdependent regulation os schwann cell proliferation and differentiation. PLoS One 8(12): e82354.

Bacallao K, Monje PV. 2015. Requirement of cAMP signaling for Schawann cell differentiation restricts the onset of myelination. PLoS One 10(2): e0116948.

Bacon C, Lakics V, Machesky L, Rumsby M. 2007. N-WASP regulates extension of filopodia and processes by oligodendrocyte progenitors, oligodendrocytes, and Schwann cells-implications for axon ensheathment at myelination. Glia 55:844-858.

Baer AS, Syed YA, Kang SU, Mitteregger D, Vig R, French-Constant C, Franklin RJ, Altmann F, Lubec G, Kotter MR. 2009. Myelin-mediated inhibition of oligodendrocyte precursor differentiation can be overcome by pharmacological modulation of Fyn-RhoA and protein kinase C signaling. Brain 132(part 2): 465-481.

Baron W, Metz B, Bansal R, Hoekstra D, de Vries H. 2000. PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiple intracelular signaling pathways. Molecular and Cellular Neuroscience 15(3): 314-329.

Baron-Van Evercooren A, Avvellana-Adalid V, Ben Younes-Chennoufi A, Gansmuller A, Nait-Ousmesmar B, Vignais L. 1996. Cell-cell interactions during the migration of myelin-forming cells transplanted in the demyelinated spinal cord. Glia 16(2): 147-164.

Barradas PC, Ferraz AS, Ferreira AA, Daumas RP, Moura EG. 2000. 2'3' Cyclic nucleotide 3'phosphodiesterase immunohistochemistry shows na impairment on myelin compaction in hypothyroid rats. Int J Dev Neurosci 18(8): 887-892.

Barradas PC, Gomes SS, Cavalcante LA. 1995. CNPase expression in the developing opossum brain stem and cerebellum. Neuroreport. 6(2): 289-292.

Barradas PC, Gomes SS, Cavalcante LA. Heterogeneous patterns of oligodendroglial differentiation in the forebrain of the opossum Didelphis marsupialis. J Neurocytol. 1998; 27(1): 15-25.

Barradas PC, Vieira RS, De Freitas MS. Selective effect of hypothyroidism on expression of myelin markers during development. *Journal of Neuroscience Research*. 2001; 66(2): 254-261.

Barres BA. 2008. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. Neuron 60: 430-440.

Barres BA, Raff MC. 1993. Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. Nature 361: 258-260.

Barres BA, Raff MC. 1999. Axonal control of oligodendrocyte development. J Cell Biol 147: 1123–1128.

Barre BA, Lazar MA, Raff MC. 1994. A novel role for thyroid hormone, glucorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. Development 120 (5): 1097-1108.

Bauer NG, Richter-Landsberg C, Ffrench-Constant C. 2009. Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. Glia 57: 1691-1705.

Baumann N, Pham-Dihn D. 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. Physiol Rev 81: 871-927

Bechler ME, Byrne L, ffrench-Constant. 2015. CNS myelin sheath lengths are an intrinsic property of oligodendrocytes. Current Biology 25: 2411-2416.

Benninger Y, Thurnherr T, Pereira JA, Krause S, Wu X, Chrostek-Grashoff A, Herzog D, Nave KA, Franklin RJ, Meijer D, Brakebusch C, Suter UI, Relvas JB. 2007.

Essential and distinct roles for cdc42 and rac1 in the regulation of Schwann cell biology during peripheral nervous system development. J Cell Biol 177: 1051-1061.

Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, Davis PJ. 2005. Integrin  $\alpha\nu\beta$ 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. Endocrinology 146: 2864–2871.

Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE. 2000. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. Nature 405: 187–91.

Bernal J, Nunez J. 1995. Thyroid Hormones and brain deveploment. Eur J Endocrinol 133: 390-398.

Bhat NR, Zhang P, Mohanty SB. 2007. P38 MAP kinase regulation of oligodendrocyte differentiation with CREB as a potential target. Neurochem Res 32(2): 293-302.

Bhat NR, Zhang P. 1996. Activation of mitogen-activated protein kinases in oligodendrocytes. Journal of Neurochemistry 66(5): 1986-1994.

Bifulco M. Role of the iporenoid pathway in ras transforming activity, cytoskeleton organization, cell proliferation and apoptosis. Life Science. 2005; 77(14): 1740-1749.

Binamé F, Sakry D, Dimouo L, Jolivel V, Trotter J. 2013. NG2 regulates directional migration of oligodendrocyte precursor cells via Rho GTPases and polarity complex proteins. The Journal of Neuroscience 33(26): 10.858-10.874.

Brophy P. Interactions of lipids with proteins of myelin and its associated cytoskeleton. In: Myelin-Biology and Chemistry, R.E. Martenson. Boca Raton: Ed. CRCPress; 1992, pp. 197-211.

Bunge MB, Bunge RP, Pappas GD. 1962. Electron microscopic demonstration of the connections between glia and myelin sheath in the developing mammalian central nervous system. J Cell Biol 12: 448-459.

Bunge RP. 1968. Glial cells and the central myelin sheath. Physiol Rev 48: 197-210.

Butt AM, Ransom B. 1989. Visualization of oligodendrocytes and astrocytes in the intact rat optic nerve by intracellular injection of Lucifer Yellow and horseradish peroxidase. Glia 2: 470–475.

Cai D,Qiu J, Cao Z, McAtee M, Bregman BS, Filbin MT. 2001. Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss inability of axons to regenerate. J. Neurosci. 21, 4731–4739.

Calvo R, Obregon MJ, Ruiz, De Ona C, Escobar Del Rey F, Morreale de Esco- bar G. 1990. Congenital hypothyroidism, as studied in rats. Crucial role of maternal thyroxine but not of 3,5,3'-triiodothyronine in the protection of the fetal brain. J Clin Invest 86:889–899.

Campagnonil AT, Macklin WB. 1988. Cellular and molecular aspects of myelin protein gene expression. Mol Neurobiol. 2: 41–89.

Chan IH, Privalsky ML. 2009. Isoform-specific transcriptional activity of overlapping target genes that respond to thyroid hormone receptors alpha1 and beta1. Mol Endocrinol 23: 1758-1775.

Chatonnet F, Guyot R, Benoit G, Flamant F. 2013. Genome-wide analysis of thyroid hormone receptors shared and specific functions in neural cells. Proc Natl Acad Sci USA 110: E766–775.

Chin WW, Yen PM. 2003. Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action. In: Braverman LE, ed. Contemporary Endocrinology: Diseases of the Thyroid. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1–18.

Chong SYC, Rosenberg SS, Fancy SPJ, Zhao C. Shen YAA, Hann AT, McGee AW, Xu X, Zheng B, Zhang LI, Rowitch DH, Franklin RJM, Lu QR, Chan JR. 2012. Neurite outgrowth inhibitor Nogo-A establishes spatial segregation and extent of oligodendrocyte myelination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:1299-1304.

Clark RE Jr., Miskimins WK, Miskimins R. 2002. Cyclic AMP inducibility of the myelin basic protein gene promoter requires the NF1 site. Int J Dev Neurosci. 20(2): 103-11.

Colognato H, Baron W, Avellan-Adalid V, Relvas JB, Baron-Van Evercooren A, Georges-Labouesse E, ffrench-Constant C. 2002. CNS integrins swith growth factor signaling to promote target-dependent survival. Nature Cell Biology Nature Cell Biology 4(11): 833-841.

Colognato H, Tzvetanova I. 2011. Glia Unglued: How signals from the extracellular matrix regulate the development of myelinating glia. Dev Neurobiol 71(11): 924-955.

Crawford AH, Stockley JH, Tripathi RB, Riichardson WD e Franklin RJM. 2014. Oligodendrocyte progenitors: adult stem cells of the central nervous system? Exp Neurol 260: 50-55.

Curtis R, Cohen J, Fok-Seang J, Hanley MR, Gregson NA, Reynolds R, Wilkin GP. 1988. Development of macroglial cells in rat cerebellum. I. Use of antibodies to follow early in vivo development and migration of oligodendrocytes. J Neurocytol 17: 43–54.

Czopka T, Ffrench-Constant C, Lyons DA. 2013. Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. Dev Cell 25: 599-609.

Czopka T, Von Holst A, Schimidt G, Ffrench-Constant C, Faissner A. 2009. Tenascin C and tenascin R similarly prevent the formation of myelin membranes in a RhiAdependent manner, but antagonistically regulate the expression of myelin basic protein via a separate pathway. Glia 57: 1790-1801.

Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. 2008. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. Front Neuroendocrinol 29: 211-218.

DeBellard ME, Tang S, Mukhopadhyay G, Shen YJ, Filbin MT. 1996. Myelinassociated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. Mol Cell Neurosci 7: 89 –101.

De Monasterio-Schrader P, Jahn O, Tenzer S, Wichert SP, Patzig J, Werner HB. 2012. Systematic approaches to central nervous system myelin. Cell. Mol. Life Sci. 69: 2879-2894.

Del Rio Hortega P. 1928. Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación functional de la oligodendroglia. Mem. Real Soc. Esp. Hist. Nat. 14: 5-122.

Decker L, ffrench-Constant C. 2004. Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. J Neurosci 24(15): 3816-3825.

Dessauer CW, Gilman AG. 1997. The catalytic mechanism of mammalian adenylyl cyclase. Equilibrium binding and kinetic analysis of P-site inhibition. J. Biol. Chem. 272: 27787–27795.

Dietrich KA, Schwarz R, Liska M, Grass S, Menke A, Meister M, Kierschke G, Längle C, Genze F, Giehl K. 2009. Specific induction of migration and invasion of pancreatic

carcinoma cells by RhoC, which differs from RhoA in its localisation and activity. Biol Chem 390: 1063–1077.

Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. J Neurosci 17(13): 5046-5061.

Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, He Z, Filbin M. (2002). Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. Neuron 35: 283–290.

Dupree J L, Coetzee T, Suzuki K, Popko B. 1998. Myelin abnormalities in mice deficient in galactocerebroside and sulfatide. J Neurocytol 27(9): 649-659.

Dyer CA, Phillbotte T, Wolf MK, Billings-Gagliardi S. Regulation of cytoskeleton by myelin components: studies on shiverer oligodendrocytes carrying an Mbp transgene. Dev Neurosci. 1997; 19(5): 395-409.

Dyer CA. The structure and function of myelin: from inert membrane to perfusion pump. Neurochem Research. 2002; 27(11): 1279-1292.

Edgar JM, McLaughlin M, Werner HB, McCulloch MC, Barrie JA, Brown A, Faichney AB, Snaidero N, Nave KA, Griffiths IR. 2009. Early ultrastructural defects of axons and axon–glia junctions in mice lacking expression of Cnp1. Glia. 57: 1815–1824.

Emery B 2010. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. Science 330:779-782.

Erb M, Steck AJ, Nave KA, Schaeren-Wiermers. 2003. Differential expression of Land S-MAG upon CAMP stimulated differentiation in oligodendroglial cells. J Neurosci Res 71(3): 326-337.

Espinosa de Los Monteros A, Bernard R, Tiller B, Rouget P, de Vellis J. 1993. Grafting of fast blue labeled glial cells into neonatal brain: differential survival and migration among cell types. Int J Dev Neurosci 11(5): 625-639.

Esposito C, Scrima M, Carotenuto A, Tedeschi A, Rovero P, D'Errico G, et al. Structures and micelle locations of the nonlipidated and lipidated C-terminal membrane anchor of 2'-3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. Biochemistry. 2008; 47(1): 308-319.

Etienne-Manneville S, Hall A. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. Cell 106(4): 489-498.

Etienne-Manneville S. 2008. Polarity proteins in glial cell functions. Curr Opin Neurobiol. 18(5): 488-494.

Felgueiras LOR. 2010. Efeito da via de sinalização do AMPcíclico/PKA na diferenciação da oligodendroglia *in vitro.* Monografia UERJ, 56p.

Felgueiras LOR. 2012. A modulação da vida do AMPc/PKA altera a morfologia da oligodendroglia e a distribuição das proteínas CNPase e MAG *in vitro*. Dissertação de Mestrado UERJ, 78p.

Feltri ML, Suter U, Relvas JB. 2008. The function of RhoGTPases in axon ensheathment and myelination. Glia. 56(14): 1508-1517.

Ferreira AA, Nazario JC, Pereira MJS, Azevedo NL, Barradas PC. 2004. Effects of experimental hypothyroidism on myelin sheath strucutural organization. Journal of Neurocytology 2(33): 225-231.

Ferreira AA. 2000. Análise ultra-estrutural da bainha de mielina central em ratos hipotireoideos. Dissertação de Mestrado UERJ, 103p.

Fewou SN, Ramakrishnan H, Bussow H, Gieselmann V, Eckhardt M. 2007. Downregulation of polysialic acid is required for efficient myelin formation. J Biol Chem 282(22): 16700-16711.

Fox IJ, Daley GQ, Goldman SA, Huard J, Kamp TJ, Trucco M. 2014. Use of differentiated pluripotent stem cells in replacement therapy for treating disease. Science. 345(6199): 1247391.

Frail DE, Webster HD, Braun PE. Developmental expression of the myelinassociated glycoprotein in the peripheral nervous system is different from that in the central nervous system. J Neurochem. 1985; 45: 1308–1310.

Francis SH, Corbin JD. 1999. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. Crit Rev Clin Lab Sci 36: 275–328.

Fredman P, Magnani JL, Nirenberg M, Ginsurg V. 1984. Monoclonal antibody A2B5 reacts with many gangliosides in neuronal tissue. Arch Biochem Biophys 233: 661–666.

Fujita N, Kemper A, Dupree J, Nakayasu H, Batsch U, Schachner M, Maeda N, Suzuki K, Popko B. 1998. The cytoplasmic domain of the large myelin-associated glycoprotein isoform is needed for proper CNS but not peripheral nervous system myelination. J Neurosci. 18: 1970–1978.

Fukata M, Nakagawa M, Kaibuchi K. 2003. Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. Curr Opin Cell Biol 15: 590-597.

Gao FB, Apperly J, Raff M. 1998. Cell-intrinsic timers and thyroid hormone regulate the probability of cell-cycle withdrawal and differentiation of oligodendrocyte precursor cells. Dev Biol 197: 54–66.

Ghosh M, Gharami K, Paul S, Das S. 2005. Thyroid hormone-induced morphological differentiation and maturation of astrocytes involves activation of protein kinase A and ERK signalling pathway. Eur J Neurosci 22(7): 1609-1617.
Goh, E. L., Young, J. K., Kuwako, K., Tessier-Lavigne, M., He, Z., Griffin, J. W., et al. (2008). beta1-integrin mediates myelin-associated glycoprotein signaling in neuronal growth cones. Mol. Brain 1:10.

Goldman SA, Kuypers N. 2015. How to make an oligodendrocyte. Development 142: 3983-3995.

Govek EE, Newey SE, Van Aelst L. 2005. The role of the Rho GTPases in neuronal development. Genes Dev 19(1): 1–49.

Gravel C, Sasseville R, Hawkes R. 1990. Maturation of the corpus callosum of the rat: II. Influence of thyroid hormones on the number and maturation of axons. J Comp Neurololgy 291: 147-161.

Gravel M, Gao E, Hervouet-Zeiber C, Parsons V, Braun PE. 2000. Transcriptional regulation of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene expression by cyclic AMP in C6 cells. J Neurochem 75(5): 1940-1950.

Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA. 1998. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. Science 280: 1610-1613.

Guadano Ferraz A, Escobar Del Rey F, Morreale de Escobar G, Innocenti G, Berbel P. 1994. The development of the anterior commissure in normal and hypothyroid rats. Developmental Brain Research 81: 293-308.

Hall A, Lalli G. 2010. Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. Cold Spring Harb Perspect Biol 2(2): a001818.

Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science 279(5350): 509-14.

Hardy R, Reynolds R. 1993. Neuron-oligodendroglial interactions during central nervous system development. J Neurosci Res 36(2): 121-126.

Hardy RJ, Friedrich VL. 1996. Progressive remodeling of the oligodendrocyte process arbor during myelinogenesis. Dev Neurosci 18: 243–254.

Hart IK, Richardson WD, Bolsover SR, Raff MC. 1989. PDGF and intracellular signaling in the timing of oligodendrocyte differentiation. J Cell Biol 109: 3411–3417.

Hildebrand C, Remahl S, Persson H, Bjartmar C. 1993. Myelinated nerve fibres in the CNS. Prog. Neurobiol. 40:319-284.

Hotchin NA, Hall A. 1995. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. J Cell Biol. 131(6 Pt 2): 1857-1865.

Howe AK, Aplin AE, Juliano RL. 2002. Anchorage-dependent ERK signaling-mechanisms and consequences. Curr Opin Genet Dev 12(1):30-5. Howe AK. 2004. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. Biochim Biophys Acta 1692(2-3):159-174.

Hughes EG, Kang, SH, Fukaya, M, Bergles, DE. 2013. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. Nat. Neurosci. 16 (6): 668-676.

Ibarrola N, Rodriguez-Pena A. 1997. Hypothyroidism coordinately and transienthy affects myelin protein gene expression in most rat brain regions during postnatal development. Brain Research 752: 285-293.

Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov SV, Stewart CL, Fields RD. 2006. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. Neuron 49, 823–832.

Jaramillo ML, Afar DE, Almazan G, Bell JC. Identification of tyrosine 620 as the major phosphorylation site of myelin-associated glycoprotein and its implication in interacting with signaling molecules. J Biol Chem. 1994; 269: 27240 –27245

Jensen AM, Raff MC. 1997. Continuous observation of multipotential retinal progenitor cells in clonal density culture. Dev Biol 188(2):267-279.

Johnson DI. 1999. Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. Microbiol Mol Biol Rev 63:54–105.

Johnson PW, Abramow-Newerly W, Seilheimer B, Sadoul R, Tropak MB, Arquint M., Dunn RJ, Schachner M, Roder JC.1989. Recombinant myelin-associated glycoprotein confers neural adhesion and neurite outgrowth function. Neuron 3: 377– 385.

Keirstead HS, Blakemore WF. 1999. The role of oligodendrocytes and oligodendrocytes progenitors in CNS remyelination. Advances in Experimental Medicine and Biology 468: 183-197.

Kessaris N, Jamen F, Rubin LL, Richardson WD. Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/ MAPK signalling pathways in neocortical precursors. Development 2004, 131: 1289–1298.

Kidd GJ, Hauer PE, Trapp BD. 1990. Axons modulate myelin protein messenger RNA levels during central nervous system myelination in vivo. J Neurosci Res 26: 409–418.

Kippert A, Trajkovic K, Rajendran L, Ries J, Simons M. 2007. Rho regulates membrane transport in the endocytic pathway to control plasma membrane specialization in oligodendroglial cells. J Neurosci 27:3560–3570.

Kirby BB, Takada N, Latimer AJ, Shin J, Carney TJ, Kelsh RN, Appel B. 2006. In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. Nat Neurosci 9(12): 1506-1511.

Kopp P, Jameson JL. 1998. Thyroid disorders. In: Jameson JL and Collins FS, eds. Principles of Molecular Medicine. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 459–473.

Kotter MR, Stadelmann C, Hartung HP. 2011. Enhancing remyelination in disease – can we wrap it up? Brain 139: 1882-1900.

Kursula P, Lehto VP, Heape AM. The small myelin-associated glycoprotein binds to tubulin and microtubules. Brain Res Dev Brain Res. 2001; 87: 22–30.

Lachapelle F, Gumpel M, Baulac M, Jacque C, Duc P, Baumann N. 1983. Transplantation of CNS fragments into the brain of shiverer mutant mice: extensive myelination by implanted oligodendrocytes. I. Immunohistochemical studies. Dev Neurosci 6(6): 325-334.

Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave KA. 2003. Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. Nat Genet 33: 366–374.

Laurseon LS, French-Constant C. 2007. Adhesion molecules in the regulation of CNS myelination. Neuron Glia Biology 3(4): 367-375.

Lee J, Gravel M, Zhang R, Thibault P, Braun PE. Process outgrowth in oligodendrocytes in mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. Journal of Cell Biology. 2005; 170(4): 661-673.

Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD. 2012 Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. Nature 487: 443-448.

Leemhuis J, Boutillier S, Barth H, Schmidt G, Meyer DK. 2002. The protein kinase A inhibitor H89 acts on cell morphology by inhibiting Rho kinase. J. Pharmacol Exp Ther. 300(3): 1000-1007.

Leemhuis J, Boutillier S, Barth H, Feuerstein TJ, Brock C, Nurnberg B, Aktories K, Meyer DK. 2004. Rho GTPases and phosphoinositide 3-kinase organize formation of branched dendrites. J Biol Chem 279(1):585-596.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell 60(4):585-595.

Levison SW, Goldman JE. 1993. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnal rat forebrain. Neuron 10(2):201-212.

Li C, Tropak MB, Gerlai R, Clapoff S, Abramow-Newerly W, Trapp B, et al. Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. Nature. 1994; 369(6483): 747-750. Li H, Wang C. 2011. Post-transcriptional regulation of PDGF alpha-receptor in O-2A progenitor cells. Int J Clin Exp Med 4:241–251.

Liang X, Draghi NA, Resh MD. 2004. Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. J Neurosci 24:7140–7149.

Liu, B. P., Fournier, A., GrandPré, T., and Strittmatter, S. M. (2002). Myelinassociated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. Science 297, 1190–1193

Lu, Q. R. et al. 2002. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/ oligodendrocyte connection. Cell 109, 75–86.

Luo BH, Carman CV, Springer TA. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. Annu Rev Immunol 25: 619-647.

Luo L. 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. Nat Rev Neurosci 1:173– 180.

Machacek M, Hodgson L, Welch C, Elliot H, Pertz O, Nalbant P, Abell A, Johnson GL, Hahn KM, Danuser G. 2009. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. Nature 461(7260): 99-103.

Macklin WB, Weill CL, Deininger PL. 1986. Expression of myelin proteolipid and basic protein mRNAs in cultured cells. J Neurosci Res 6: 203–217.

Malone M, Gary D, Yang IH, Miglioretti A, Houdayer T, Thakor N, McDonald J. 2013. Neuronal Activity Promotes Myelination via a cAMP Pathway. Glia 61(6): 843-854.

Mangin JM, Gallo V. 2011. The curious case of NG2 cells: transient trend or game changer? ASN Neuro 3(1):e00052.

Marta CB, Adamo AM, Soto EF, Pasquini JM. 1998. Sustained neonatal hyperthyroidism in the rat affects myelination in the central nervous system. J. Neurosci. Res. 53 (2), 251–259.

Matsuda Y, Koito H, Yamamoto H. 1997. Induction of myelin-associated glycoprotein expression through neuron-oligodendrocyte contact. Dev Brain Res 100: 110–116.

McMorris FA. 1983. Cyclic AMP induction of the myelin enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in rat oligodendrocytes. J Neurochem 41: 121–132.

McNulty S, Crouch M, Smart D, Rumsby M. 2001. Differentiation of bipolar CG-4 line oligodendrocytes is associated with regulation of CREB, MAP kinase and PKC signaling pathways. Neuroscience Research 41(3): 217-226.

Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH N Nave KA. 2004. Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. Science 304: 700-703.

Miescher GC, Lutzelschwab R, Erne B, Ferracin F, Huber S, Steck AJ. Reciprocal expression of myelin-associated glycoprotein splice variants in the adult human peripheral and central nervous systems. Brain Res. 1997; 52: 299–306.

Miller RH. 2002. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. Prog Neurobiol 67(6):451-467.

Mitew S, Hay CM, Peckham H, Xiao J, Koenning M, Emery B. 2013. Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. Neuroscience Nov 22. Pii: S0306-4522(13)00976-7.

Montag D, Gise KP, Bartsch U, Martini R, Lang Y, Bluthman H, et al. Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. Neuron. 1994; 13: 229–246.

Moon SY, Zheng Y. 2003. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. Trends Cell Biol 13:13–22.

Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar Del Rey F. 2004 Role of thyroid hormone during early brain development. Eur J Endocrinol 151(Suppl3):U25–37.

Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. Neuron. 1994; 13: 757–767.

Munoz A, Rodriguez-Pena A, Perez-Castillo A, Ferreiro B, Sutcliffe JG, Bernal J. 1991. Effects of neonatal hypothyroidism on rat brain gene expression. Mol Endo 5:273-280.

Murata Y. 1998. Multiple isoforms of thyroid hormone receptor: ananalysis of their relative contribution in mediating thyroid hormone action. Nagoya J Med Sci 61:103–115.

Nave KA. 2010. Myelination and the trophic support of long axons. Nat. Rev Neurosci. 11: 275-283.

Niehaus A, Stegmüller J, diers-Fenger M, Trotter J. 1999. Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration. J Neurosci 19: 4948-4961.

Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X. 2009. Polydendrocytes (NG2 cells): multifuncitonal cells with lineage plasticity. Nat Rev Neurosci 10:9-22.

Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB. 1996. Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. J Neurosci Res 43(3): 315-30.

Nobes CD, Hall A. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell 81(1):53-62.

Noguchi T, Sugisaki T. 1984. Hypomyelination in the cerebrum of the congenitally hypothyroid mouse (hyt). J of Neurochem 42:891-893.

Oh LYS, Larsen PH, Krekoski CA, Edwards DE, Donovan F, Werb Z, Lee VW. 1999. Matrix metalloproteinase-9/Gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. J Neurosci 19: 8464–8475.

Olofsson B. 1999. Rho guanine dissociation inhibitors: Pivotal molecules in cellular signalling. Cell Signal 11:545–554.

Omar M, Bock P, Kreutzer R, Ziege S, Imbschweiler I, Hansmann F, Peck CT, Baumgärtner W, Wewetzer K. 2011. Defining the morphological phenotype 2´,3´cyclic nucleotide 3´-phosphodiesterase (CNPase) is a novel marker for in situ detection of canine but not rat olfactory ensheathing cells. Cell Tissue Res 344:391-405.

Orentas DM, Miller RH. 1996. A novel form of migration of glial precursors. Glia 16(1): 27-39.

Palacios N, Sánches-Franco F, Fernández M, Sánchez I, Villuendas G, Cacicedo L. 2007. Opposite effects of two PKA inhibitors on cAMP inhibition of IGF-I-induced oligodendrocyte development: a problem of unspecificity? Brain Res 31; 1178:1-11.

Patel, TB, Du, Z, Pierre, S, Cartin, L, Scholich, K. 2001. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. Gene. 269: 13–25.

Peters, A, Palay, S, Webster, HF. 1991. The fine structure of the nervous system: the neuron and the supporting cells. Oxford, UK: Oxford Univ. Press.

Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. 2009. Random versus directionally persistent cell migration. Nat Rev Mol Cell Biol 10: 538-549.

Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R. 1993. The oligodendrocyte and its many cellular processes. Trends Cell Biol 3: 191–201.

Pierre S, Eschenhagen T, Geisslinger G, Scholich K. 2009. Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. Nat Rev Drug Discov 8(4): 321-35.

Pierre SC, Hausler J, Bird K, Geisslinger G, Scholich K. 2004. PAM mediates sustenaid inhibition of cAMP signaling by spingosine-1-phosphate. Embo J 23: 3031-3040.

Pombo PMG, Ibarrola N, Alonso MA, Rodriguez-Pena A. 1998. Thyroid hormone regulates the expression of the MAL proteolipid, a component of glycolipid-enriched membranes in neonatal rat brain. J Neurosci Res 52: 584-590.

Quarles RH. 2007. Myelin-associated glycoprotein(MAG): past, present and beyond. *J. Neurochem.* 100: 1431–1448.

Raasakka A, Kursula P. 2014. The myelin membrane-associated enzyme CNPase: on a highway to structure and function Neurosci Bull 30(6): 956–966.

Raff MC. 1989. Glial cell diversification in the rat optic nerve. Science 243(4897): 1450–1455.

Raible DW, McMorris FA. 1993. Oligodendrocyte differentiation and progenitor cell proliferation are independently regulated by cyclic AMP. J Neurosci Res 34: 287–294.

Raible, DW, McMorris, FA. 1989. Cyclic AMP regulates the rate of differentiation of oligodendrocytes without changing the lineage commitment of their progenitors. Dev Biol 133: 437–466.

Raible, DW, McMorris, FA. 1990. Induction of oligodendrocyte differentiation by activators of adenylate cyclase. J Neurosci Res 27: 43–46.

Rajasekharan S, Baker KA, Horn KE, Jarjour AA, Antel JP, Kennedy TE. 2009. Netrin 1 and Dcc regulate oligodendrocyte process branching and membrane extension via Fyn and RhoA. Development 136(3): 415-426.

Rajasekharan S, Bin JM, Antel JP, Kennedy TE. 2010. A central role for RhoA during oligodendroglial maturation in the switch from netrin-1-mediated chemorepulsion to process elaboration. J Neurochem 113(6): 1589-1597.

Richardson WD, Kessaris N, Pringle N. 2006. Oligodendrocyte wars. Nat Rev Neurosci 7: 11-18.

Richardson WD, Young KM, Tripathi RB, McKenzie I. 2011. NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? Neuron 70: 661-673.

Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessaris N, Richardson WD. 2008. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. Nat. Neurosci. 11: 1392–1401.

Rodriguez-Pena A., Ibarrola N., Iniguez M.A., Munoz A., Berna, J. 1993. Neonatal hypothyroidism affects the timely expression of myelin-associated glycoprotein in the rat brain. Journal of Clinical Investigation 91: 812 - 818.

Rodriguez-Pena, A. 1999. Oligodendrocyte development and thyroid hormone. Journal Neurobiology. Revisão, 4(40): 497-512.

Rosen MD, Privalsky ML. 2009. Thyroid hormone receptor mutations found in renal clear cell carcinomas alter corepressor release and reveal helix 12 as key determinant of corepressor specificity. Mol Endocrinol 23:1183–92.

Rossman KL, der CJ, Sondek J. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat Rev Mol Cell Biol 6(2): 167-180.

Rowitch DH. 2004. Glial specification in the vertebrate neural tube. Nat Rev Neurosci 5: 409-419.

Saab AS, Tzventanova LD, Nave KA. 2013. The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. Curr. Opin. Neurobiol. 23 (6): 1065-1072.

Salhia B, Rutten F, Nakada M, Beaudry C, Berens M, Kwan A, Rutka JT. 2005. Inhibition of Rho-kinase affects astrocytoma morphology, motility, and invasion through activation of Rac1. Cancer Res 65: 8792–8800.

Salzer JL, Holmes WP, Coldman DR. The amino acid sequences of the myelinassociated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. J Cell Biol. 1987; 104: 957–965.

Sarlieve LL, Fabre M, Susz J, Matthieu JM. 1983. Investigations on myelination in vitro. IV. "Myelin-like" or premyelin structures in cultures of dissociated brain cells from 14- to 15-day-old embryonic mice. J Neurosci Res 10: 191–210.

Sato-Bigbee C, De Vries GH. 1996. Treatment of oligodendrocytes with antisense deoxyoligonucleotide directed against CREB mRNA: effect on the cyclic-dependent induction of myelin basic protein expression. J. Neurosci. Res. 46: 98–107.

Schmidt A, Hall A. 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: Turning on the switch. Genes Dev 16:1587–1609.

Scholich K, Mullenix JB, Wittpoth C, Poppleton HM, Pierre SC, Lindorfer MA, Garrison JC, Patel TB. 1999. Facilitation of signal onset and termination by adenylyl cyclase. Science 283(5406):1328-1331.

Scholich K, Pierre S, Patel TB. 2007. Protein associated with Myc (PAM) is a potent inhibitor of adenylyl cyclases. J. Biol. Chem. 276: 47583–47589.

Schroeder AC, Privalsky. 2014. Thyroid hormones, T3 and T4, in the brain. Front. Endocrinol. Vol 5 (40): 1-6.

Schwab ME, Schnell L. 1989. Region-specific appearance of myelin constituents in the developing rat spinal cord. J Neurocytol 18: 183–190.

Seasholtz TM, Radeff-Huang J, Sagi SA, Matteo R, Weems JM, Cohen AS, Feramisco JR, Brown JH. 2004. Rho-mediated cytoskeletal rearrangement in response to LPA is functionally antagonized by Rac1 and PIP2. J Neurochem 91:501–512.

See JM, Grinspan JB. 2009. Sending mixed signals: bone morphogenetic protein in myelination and demyelination. J Neuropathol Exp Neurol 68(6): 595–604.

Shabb JB. 2001. Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. Chem Rev 101(8): 2381–2411.

Sherman DL, Brophy PJ. 2005. Mechanismsof axon ensheathment and myelin growth. Nat Rev Neurosci 6(9): 683–690.

Shrager P, Novakovic SD. 1995. Control of myelination, axonal growth, and synapse formation in spinal cord explants by ion channels and electrical activity. Brain Res 88: 68–78.

Siebert JR, Osterhout DJ. 2011. The inhibitory effects of chondroitin sulfate proteoglycans on oligodendrocytes. J Neurochem 119:176-188.

Silva AS. 2003. Propriedades da glia embainhante olfatória: expressão de proteínas da mielina, motilidade e vias de sinallização. Tese de Doutorado UFRJ, 81p.

Simons M, Trajkovic K. 2006. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. J Cell Sci 119:4318-4389.

Simpson PB, Armstrong RC. 1999. Intracellular signals and cytoskeletal elements involved in oligodendrocyte progenitor migration. Glia 26(1): 22–35.

Skoff RP, Ghandour MS. 1995. Oligodendrocytes in female carriers of the jimpy gene make more myelin than normal oligodendrocytes. J Comp Neurol 355: 124–133.

Skoff RP. 1990. Gliogenesis in rat optic nerve: astrocytes are generated in a single wave before oligodendrocytes. Developmental Biol 139: 149-168.

Snaidero N, Möbius W, Czopka T, Hekkking LH, Mathisen C, Verkleij D, Goebbles S, Edgar J, Merkler D, Lyons, DA, Nave, KA, Simons M. 2014. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarize growth at the inner tongue. Cell 156: 277-290.

Solly SK, Thomas JL, Monge M, Demerens C, Lubetzki C, Gardinier MV, Matthieeu JM, Zalc B. 1996. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. Glia 18(1): 39–48.

Sommer I, Schachner M. 1981. Monoclonal antibodies (01 to 04) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. Dev Biol 83: 311–327.

Song J, Goetz BD, Baas PW, Duncan ID. 2001. Cytoskeletal reorganization during the formation of oligodendrocyte processes and branches. Mol Cell Neurosci 17(4):624-36.

Sorensen, A., Moffat, K., Thomson, C., and Barnett, S.C. 2008. Astrocytes, but not olfactory ensheathing cells or Schwann cells, promote myelination of CNS axons in vitro. Glia 56(7): 750-763.

Sprinkle TJ. <u>2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-</u> <u>Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system.</u>Crit Rev Neurobiol. 1989; 4(3): 235–301. Sugimoto Y, Taniguchi M, Yagi T, Akagi Y, Nojyo Y, Tamanaki N. 2001. Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. Development 128:3321-3330.

Suzuki M, Raisman G. 1994. Multifocal pattern of postnatal development of the macroglial framework of the rat fimbria. Glia12: 294–308.

Tang WJ, Gilman AG. 1995. Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs alpha and forskolin. Science. 268: 1769–1772.

Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL. 2005. Neuroregulin-1 type III determines the ensheament fate off axons. NNeuron 47: 681-694.

Temples S, Raff M. 1986. Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts cell divisions. Cell 44: 773–779.

Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR. 1997. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsalpha.GTPgammaS. Science 278(5345):1907-1916.

Tesmer JJ, Sunahara RK, Johnson RA, Gosselin G, Gilman AG, Sprang SR. 1999. Two-metal-Ion catalysis in adenylyl cyclase. Science 285(5428):756-760.

Thurnherr T, Benninger Y, Wu X, Chrostek A, Krause SM, Nave KA, Franklin RJ, Brakebusch C, Suter U, Relvas JB. 2006. Cdc42 and Rac1 signaling are both required for and act synergistically in the correct formation of myelin sheaths in the CNS. J Neurosci 26(40): 10110-10119.

Tkachenko E, Sabouri-Ghomi M, Pertz O, Kim C, Gutierrez E, Machacek M, Groisman A, Danuser G, Ginsberg MH. 2011. Protein kinase A governs a RhoA-RhoGDI protrusion-retraction pacemaker in migrating cells. *Nat Cell Biol* 13: 660–667.

Toma JS, McPhail LT, Ramer MS. 2007. Differential RIP antigen (CNPase) expression in peripheral ensheathing glia. Brain Res. 1137: 1-10.

Trapp BD, Andrews SB, Cootauco C, Quarles R. The myelin-associated glycoprotein is enriched in multivesicular bodies and periaxonal membranes of actively myelinating oligodendrocytes. J Cell Biol. 1989; 109: 2417–2426.

Trapp BD, Nishiyama A, Cheng D, Macklin W. 1997. Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. J Cell Biol 137: 459–468.

Trapp BD, Quarles RH. Presence of the myelin-associated glycoprotein correlates with alterations in the periodicity of peripheral myelin. J Cell Biol. 1982; 92: 877–882.

Tsukada Y, Kuruhara T. 2´3´-cyclic nucleotide 3´-phosphodiesterase; molecular characterization and possible functional significance. In Myelin: Biology and Chemistry.

Martensin RE (ed). Boca Raton: CRC Press; 1992, pp. 449–480.

Uhm JH, Dooley NP, Oh LYS, Yong VW. 1998. Oligodendrocytes utilize a matrix metalloproteinase, MMP-9, to extend processes along an astrocyte extracellular matrix. Glia 22: 53–63.

Umemori H, Sato S, Yagi T, Aizawa S, Yamamoto T. Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signaling. Nature. 1994; 367: 572–576.

Vega FM, Fruhwirth G, Ng T, Ridley AJ. 2011. RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. J Cell Biol 193:655-665.

Venkatesh K, Chivatakarn O, Lee H, Joshi PS, Kantor DB, Newman BA, et al. 2005. The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. J. Neurosci. 25, 808–822.

Verrier JD, Jackson TC, Bansal R, Kochanek PM, Puccio AM, Okonkwo DO, Jackson EK. 2012. The brain in vivo expresses the 2',3'-cAMP-adenosine pathway. J Neurochem. 122: 115–25.

Verrier JD, Jackson TC, Gillespie DG, Janesko-Feldman K, Bansal R, Goebbels S, Nave KA, Kochanek PM, Jackson EK. 2013. Role of CNPase in the oligodendrocytic extracellular 2'-3'-cAMP-adenosine pathway. Glia 61(10): 1595-1606.

Wake H, Lee PR, Fields RD. 2011. Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. Science 333:1647-1651.

Wallis K, Dudazy S, Van Hogerlinden M, Nordstrom K, Mittag J, Vennstrom B. 2010. The thyroid hormone receptor alpha1 proteinis expressed in embryonic post mitotic neurons and persists in most adult neurons. Mol Endocrinol 24:1904–16.

Walters SN, Morell P. 1981. Effects of altered thyroid states on myelinogenesis. J Neurochem 36(5): 1792-1801.

Wang S, Bates J, Li X, Schanz S, Chandler-Militello D, Levine C, Maherali N, Studer L, Hochedlinger K, Windrem M, Goldman SA. 2013. Humam iPC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. Cell Stem Cell 12: 252-264.

Watkins TA, Emery B, Mulinyawe S, Barres, B. 2008. Distinct stages of myelination regulated by gamma-secretase and astrocytes in a rapidly myelinating CNS coculture system. Neuron 60: 555-569.

Waxman SG and Sims TJ. 1984. Specificity in central myelination: evidence for local regulation of myelin thickness. Brain Res 292: 179–185.

Waxman SG. 2006. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. Nat. Rev. Neurosci. 7, 932–941.

Wennerberg K, Der CJ. 2004. Rho-family GTPases: It's not only Rac and Rho (and I like it). J Cell Sci 117:1301–1312.

Wolf RM, Wilkes JJ, Chao MV, Resh MD. 2001. Tyrosine phosphorylation of p190 RhoGAP by Fyn regulates oligodendrocyte differentiation. J Neurobiol 49:62–78.

Wu CY, Lu J, Cao Q, Guo CH, Gao Q, Ling EA. 2006. Expression of 2<sup>-3</sup> cyclic nucleotide 3<sup>-</sup>-phosphodiesterase in the amoeboid microglial cells in the developing rat brain. Neuroscience 142: 333-341.

Xin, M. et al. 2005. Myelinogenesis and axonal recognition by oligodendrocytes in brain are uncoupled in Olig1-null mice. J. Neurosci. 25, 1354–1365.

Yakovlev PI & Lecours AR. 1966. The myelinogenic cycles of regional maturation of the brain. In: Regional Development of the Brain in Early Life, editado por Minkovski A. Oxford, UK: Blackwell 3–70.

Yang HJ, Vainshtein A, Maik-Rachline G, Peles E. 2016. G protein-coupled receptor 37 is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination. Nat Commun 7: 10884.

Yang Z, Suzuki R, Daniels SB, Brunquell CB, Sala CJ, Nishiyama A. 2006. NG2 glial cells provide a favorable subtrate for growing axons. J Neurosci 26:3829-3839.

Younes-Rapozo V, Berendonk J, Savignon T, Manhaes AC, Barradas PC. 2006. Thyroid hormone deficiency changes the distribution of oligodendrocyte/myelin markers during oligodendroglial differentiation in vitro. Int J Dev Neurosci 24(7):445-453.

Younes-Rapozo V, Felgueiras LO, Viana NL, Fierro IM, Barja-Fidalgo C, Manhaes AC, Barradas PC. 2009. A role for the MAPK/ERK pathway in oligodendroglial differentiation in vitro: stage specific effects on cell branching. Int J Dev Neurosci 27(8):757–768.

Young KM, Psachoulia K, Tripathi RB, Dunn SJ, Cossell L, et al., 2013. Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. Neuron 77, 873–885.

Yu K, McGlynn S, Matise MP. 2013. Floor plate-derived sonic hedgehog regulates glial and ependymal cell fates in the developing spinal cord. Development 140:1594-1604.

Zaccolo M, Magalhaes P, Pozzan T. 2002. Compartmentalisation of cAMP and Ca(2+) signals. Curr. Opin.Cell Biol. 14: 160–166.

Zamoner A, Funchal C, Heimfarth L, Silva FRMB, Pessoa-Pureur R. 2006. Shortterm effects of thyroid hormones on cytoskeletal proteins are mediated by gabergic mechanisms in slices of cerebral cortex from young rats. Cel Mol Neurobiol 26(2): 209-224.

Zendebel A, Kashani IR, Azimzadeh M. 2016. Regulatory effect of triiodothyronine on brain myelination and astrogliosis after cuprizone-induced demyelination in mice. Metab Brain Dis 31: 425-433.

Zhang H, Miller RH. 1996. Density-dependent feedback inhibition of oligodendrocyte precursor expansion. J. Neurosci. 16: 6886-6895.

Zhou, Q. & Anderson, D. J. 2002. The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. Cell 109, 61–73.

Zhu X, Hill RA, Dietrich D, Komitova M, Suzuki R, Nishiyama A. 2011. Agedependent fate and lineage restricion of single NG2 cells. Development (Camb. Engl.) 138, 745-753.