



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

**Viviane Younes Rapozo**

**Sinalização da MAPK/ERK na diferenciação da oligodendroglia: efeitos de inibidores da MEK sobre a morfologia e distribuição de proteínas de oligodendrócitos/mielina *in vitro***

Rio de Janeiro

2009

Viviane Younes Rapozo

**Sinalização da MAPK/ERK na diferenciação da oligodendroglia: efeitos de inibidores da MEK sobre a morfologia e distribuição de proteínas de oligodendrócitos/mielina *in vitro***

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

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

Rio de Janeiro

2009

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

R219 Rapozo, Viviane Younes.

Sinalização da MAPK/ERK na diferenciação da oligodendroglia :  
efeitos de inibidores da MEK sobre a morfologia e distribuição de  
proteínas de oligodendrócitos/mielina in vitro / Viviane Younes Rapozo  
– 2009.

100 f.

Orientadora: Penha Cristina Barradas Dalto-Santos

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em  
Biociências.

1. Oligodendroglia – Teses. 2. Bainha de mielina – Doenças - Teses.  
3. Citoesqueleto - Teses. 4. Sistema de sinalização das MAP Quinases.  
I. Dalto-Santos, Penha Cristina Barradas. II. Universidade do Estado do  
Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III.  
Título.

CDU 577.3

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

---

Assinatura

---

Data

Viviane Younes Rapozo

**Sinalização da MAPK/ERK na diferenciação da oligodendroglia: efeitos de inibidores da MEK sobre a morfologia e distribuição de proteínas de oligodendrócitos/mielina in vitro**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 23 de agosto de 2009.

Banca Examinadora:

---

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

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia dos Santos Mermelstein  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Flavia Carvalho Alcantara Gomes  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Frank Tenório de Almeida Costa  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2009

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento e contou com a colaboração dos Professores Alex Manhães, Iolanda Fierro e Thereza Christina Barja-Fidalgo e do aluno de iniciação científica Luiz Otávio Felgueiras.

## DEDICATÓRIA

A Marcio, meu amor  
Aos meus pais

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Penha, pela amizade e carinho em todos estes anos. Obrigada pelo apoio, pela confiança, pelas lições de vida e, principalmente, por me ajudar a crescer. Você é muito importante para mim!

Ao professor Frank, por todo o carinho e pela alegria de tê-lo como um verdadeiro amigo para todas as horas!

Ao professor Alex, pela amizade e por todo apoio dispensado, sempre com muita dedicação, sem o qual este trabalho não seria possível.

À professora Iolanda, que me acompanhou neste projeto desde o início. Obrigada por sua amizade e dedicação, e também pela revisão extremamente cuidadosa!

À professora Olga, por sua amizade e apoio valioso e ao professor Marcos, por todo o carinho! À professora Thereza Christina pelo apoio indispensável e à professora Maria Augusta pela amizade e atenção dispensada sempre com muito carinho!

À professora Beth, por ter me recebido com tanto carinho!

Ao Luiz, pela pessoa especial que você é para mim, grande amigo, que está sempre ao meu lado, me apoiando! Obrigada por tudo, Magrão! A Natália, que me ajudou no início deste projeto, e que acabou se tornando uma grande amiga!

A todos do laboratório: Andréa, que me acompanhou desde o início, sempre carinhosa e fiel amiga! Às minhas amigas lindas, Marcinha (mesmo que o Paulinho diga o contrário, você é linda sim, por dentro e por fora!), Gabi, Bruninha, Claudinha, Ive, Bia, Aline e Priscila! E aos “meninos”, Tiagão (irmãozão), Serginho, Fabio, Michael, Everton, Paulinho, Léo e André! A amizade de cada um de vocês é muito importante e valiosa para mim, obrigada por todos os momentos que compartilhamos!

Ao Jorge, que está sempre me incentivado a ir longe... Obrigada por toda ajuda e por todo carinho!

Ao todos do laboratório de Farmacologia Bioquímica e Celular. Pela amizade de cada um, que me apoiou e aturou todo este tempo em que “invadi” o laboratório de vocês! Em especial à Renatinha e ao Genilson, por todo apoio e amizade, muito obrigada pela força! À Cris e à Roberta que me ajudaram desde o início e pela amizade de vocês!

Ao Neocir, Joarez e Cláudio, pelo apoio técnico, mas também pela amizade de vocês! À Bruna, pela amizade. À Mônica, que me aturou tanto tempo e Viviane, obrigada pela amizade de vocês!

Às minhas amigas Flavias, Vidal e Crespo e à Verinha por todo o apoio! Vocês são maravilhosas! Ao Davy, meu cunhado que trilhou todo este caminho comigo!

A toda minha querida família, meus tios e primos, por estarem ao meu lado em todos os momentos! Amo cada um de vocês! Ao meu irmão e minha cunhada, meus irmãos Fernandinha e JR, Sergio, à minha querida tia Rosângela, minha cunhada Lú que sempre acreditaram e estiveram prontos para me apoiar! Aos meus sogros, pelo carinho por esta filha “adotada”.

Aos meus pais! Mãe, pelo seu imenso amor e por ser a mulher incrível que você é, minha heroína e minha melhor amiga! Pai, por seu amor indescritível, que o faz ir até o fim do mundo só para me fazer feliz! Serei eternamente grata pelo amor de vocês. Eu os amo com todo o meu coração!

A Marcio, meu amor e meu melhor amigo! Você é o melhor presente de Deus para mim, e Ele sempre me dá o melhor, pois Ele me ama muito, você sabe disso. Obrigada por acreditar em mim, me apoiar, e principalmente, por me amar como você me ama! Te amo muito, baby, muito mesmo, hoje e sempre!

A Deus, meu Pai, meu Salvador, o amado da minha alma! Oro para que minha vida expresse o quanto te agradeço, pois as palavras não fazem justiça ao meu amor e à minha adoração a Ti!



A quem tenho eu nos céus senão a Ti?  
E na Terra, nada mais desejo além de estar junto a Ti.  
O meu corpo e o meu coração poderão fraquejar,  
mas Deus é a força do meu coração  
e minha herança para sempre.

*Sl 73:25-26*

## RESUMO

RAPOZO, Viviane Younes. *Sinalização da MAPK/ERK na diferenciação da oligodendroglia*: efeitos de inibidores da MEK sobre a morfologia e distribuição de proteínas de oligodendrócitos/mielina in vitro. 2009. 100f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

A via de sinalização da cinase regulada por fatores extracelulares, da família das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK/ERK) é importante tanto para a sobrevivência como para a progressão da diferenciação de oligodendrócitos. Neste trabalho, a via da MAPK/ERK foi avaliada na oligodendroglia in vitro com a utilização de inibidores da MEK. A morfologia celular, assim como a distribuição de proteínas foram analisadas em diferentes estágios de maturação da oligodendroglia. Culturas primárias de oligodendrócitos foram tratadas com os inibidores da MEK PD98059 ou U0126, aos 5 ou 11 dias in vitro (div), por 30min, 24 ou 48h. A oligodendroglia foi distinguida com marcadores estágio-específicos: A2B5, 2'3' nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase (CNPase) e proteína básica de mielina (MBP), e classificada de acordo com sua morfologia em diferentes estágios de desenvolvimento. O tratamento aumentou significativamente o número de células com morfologia mais imatura e diminuiu o número de células maduras. Além disso, aumentou o número de células redondas e sem prolongamentos as quais não puderam ser classificadas em nenhum dos estágios de desenvolvimento da oligodendroglia. Os efeitos mais evidentes foram observados logo após o menor tempo de tratamento. Células redondas eram positivas para CNPase e MBP, porém não foram marcadas com A2B5 ou com NG2, indicando que seriam células maduras incapazes de estender ou manter seus prolongamentos. De fato, estas mudanças foram acompanhadas por alterações na distribuição de proteínas de oligodendrócitos como a MBP e a CNPase, assim como alterações em proteínas de citoesqueleto, como actina, tubulina e na cinase de adesão focal (FAK). A MBP foi observada nas células tratadas em um padrão de distribuição desorganizado e disperso, oposto ao padrão contínuo que é observado nas células das culturas controle. Além disso, o tratamento causou uma desorganização na distribuição da CNPase, actina e tubulina. Nas células das culturas controle, estas proteínas apresentam um padrão organizado compondo as estruturas de citoesqueleto semelhantes a nervuras. Após um pequeno período de tratamento (30min), actina e tubulina apresentaram o mesmo padrão de marcação puntiforme que a CNPase apresentou. O tratamento também reduziu os pontos de adesão focal demonstrados pela FAK. Com o decorrer do tratamento, após 24 e 48h, actina e tubulina aparentavam estar se reorganizando em um padrão filamentar. Estes resultados indicam um efeito importante da via da MAPK/ERK na ramificação e alongamento dos prolongamentos dos oligodendrócitos, com possíveis consequências para a formação da bainha de mielina.

Palavras-chave: Oligodendrócito. Diferenciação. Via de sinalização MAPK/ERK. Citoesqueleto.

## ABSTRACT

The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) pathway is important for both long-term survival and timing of the progression of oligodendrocyte differentiation. In this work, the MAPK/ERK signaling in oligodendroglia was studied in vitro by using MEK inhibitors. Cell morphology and distribution of proteins were analyzed in different stages of maturation. Primary cultures of oligodendroglia were treated with the MEK inhibitors PD98059 or U0126, at 5 or 11div for 30min, 24 or 48h. Oligodendroglial cells were distinguished by using stage specific markers: NG2 proteoglycan, A2B5, 2'3'nucleotide-cyclic 3'phosphodiesterase (CNPase) and myelin basic protein (MBP), and classified according to their morphology into different developmental stages. Treatment significantly increased the number of cells with more immature morphologies and decreased the number of mature cells. Furthermore, it increased the number of rounded cells that could not be classified into any of the oligodendroglial developmental stages. The strongest effects were usually observed shortly after treatment. Rounded cells were CNPase/MBP positive and they were not stained by anti-NG2 or A2B5, indicating that they were mature cells unable either to extend and/or to maintain their processes. In fact, these changes were accompanied by alterations in the distribution of the oligodendroglial proteins MBP and CNPase, and alterations in cytoskeleton proteins, as actin, tubulin and the focal adhesion kinase (FAK). MBP was observed in a continuous distribution in cell body and processes in control cultures. Furthermore, in treated cultures a disorganized pattern of distribution of CNPase, actin and tubulin was observed. In control cultures, these proteins compose the cytoskeleton vein-like structures. By the other side, after a short time of MEK inhibition (30min), actin and tubulin showed the same punctual pattern observed in CNPase distribution. Treatment also caused a reduction of focal adhesion sites showed by FAK. As treatment progressed, after 24 and 48h, actin and tubulin seemed to be rearranged into a filament-like pattern. These data showed an effect of the MAPK/ERK pathway on oligodendroglial branching, with possible consequences for the formation of the myelin sheath.

Keywords: Oligodendrocyte. Differentiation. MAPK/ERK signaling pathway. Cytoskeleton.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema da mielinização de axônios (Ax) por um oligodendrócito.....	24
Figura 2 –	Esquema representativo da classificação morfológica nas diferentes fases de maturação oligodendrocítica.....	27
Figura 3 –	Representação de um modelo proposto de desenvolvimento da mielina em culturas de oligodendrócitos.....	34
Figura 4 –	Mecanismos de ativação da ERK dependente da adesão celular.....	30
Figura 5 –	Esquema representativo do tratamento das culturas com os inibidores/ativadores utilizados .....	44
Figura 6 –	Oligodendroglia imunoreagida aos 5div (A-D) e aos 11div (E-H) com o anticorpo anti-CNPase.....	41
Figura 7 –	Efeitos de um segundo tratamento com PD98059.....	52
Figura 8 –	Efeitos do tratamento com U0126.....	54
Figura 9 –	Caracterização das células NC.....	55
Figura 10-	Mudanças no número de células, agrupadas pelo fenótipo da oligodendroglia em culturas controle e culturas tratadas, indicadas pela expressão da NG2 e pela morfologia celular.....	59
Figura 11-	Mudanças no número de células, agrupadas pelo fenótipo da oligodendroglia em culturas controle e culturas tratadas, indicadas pela expressão da CNPase e pela morfologia celular.....	62
Figura 12-	Mudanças no número de células, agrupadas pelo fenótipo da oligodendroglia em culturas controle e culturas tratadas, indicadas pela expressão da MBP e pela morfologia celular.....	65
Figura 13-	Distribuição da MBP: Oligodendroglia imunoreagida aos 5div (A-D) e aos 11div (E-H) com o anticorpo anti-MBP.....	67
Figura 14-	Efeitos do tratamento com PD na distribuição da CNPase e actina aos 5div.....	69

Figura 15-	Efeitos do tratamento com PD na distribuição da CNPase e tubulina aos 5div.....	71
Figura 16-	Efeitos do tratamento com PD na distribuição da CNPase e tubulina aos 11div.....	72
Figura 17-	Efeitos do tratamento com PD na distribuição da CNPase e FAK aos 5div.....	75
Figura 18-	Efeitos do tratamento com PD na distribuição da CNPase e FAK aos 11div.....	76
Figura 19-	Modelo que resume a complexa sinalização associada à FAK que leva à formação dos contatos focais.....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para a técnica de imunocitoquímica.....	45
Tabela 2 - Número de células por fenótipo nas culturas controle e tratadas com PD098059.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A2B5 –	anticorpo monoclonal que reconhece gangliosídeos em progenitores O2-A
AMPc –	monofosfato de adenosina cíclico
BDNF –	fator neurotrófico derivado de cérebro (do inglês, <i>brain derived neurotrophic factor</i> )
BSA –	albumina bovina sérica (do inglês, bovine seric albumin)
C –	grupo controle
CaM -	calmodulina
CG4 –	linhagem de células da glia central-4 (do inglês, central glia-4 cell lineage)
CNPase –	2',3' nucleotídeo- cíclico 3'fosfodiesterase
CNTF –	fator neurotrófico ciliar (do inglês, ciliary neurotrophic factor)
CREB –	proteína de ligação ao elemento responsivo ao cálcio/AMPc (do inglês, calcium/cyclic AMP response-element binding protein)
CT-1 –	cardiotrofina-1
DAPI –	4',6-diamidino-2-fenilindole
Div –	dias <i>in vitro</i>
DM-20 –	isoforma da PLP (produto do splicing alternativo do gene plp) Dulbecco's
DMEM-F12-	minimum essential médium
DMSO –	Dimetilsulfóxido
ERK –	cinase regulada por sinais extracelulares (do inglês, extracellular signal-regulated kinase)
FAK –	cinase de adesão focal (do inglês, focal adhesion kinase)
FGFb –	fator básico de crescimento de fibroblastos (do inglês, <i>basic Fibroblast growth factor</i> )
FPLSD –	<i>Fisher's Least Significant Difference</i>
GalC –	Galactocerebrosídeo

GAP –	proteína ativadora de GTPases (do inglês, <i>GTPases activating protein</i> )
GDP –	guanosina di-fosfato
GGF-2 –	fator de crescimento glial-2 (do inglês, <i>glial growth factor-2</i> )
GTP –	guanosina tri-fosfato
HGF –	fator de crescimento de hepatócitos (do inglês, <i>hepatocyte growth factor</i> )
IGF-1 –	fator de crescimento semelhante à insulina (do inglês, <i>insulin-like growth factor-1</i> )
IL –	interleucina
IO –	oligodendrócito imaturo
LIF –	fator inibidor de leucemia (do inglês, <i>Leukaemia inhibitory factor</i> )
M –	oligodendrócito maduro
MAG –	glicoproteína associada à mielina (do inglês, <i>myelin associated glycoprotein</i> )
MAP –	proteína associada a microtúbulos (do inglês, <i>microtubule associated protein</i> )
MAPK –	proteína cinase ativada por mitógenos (do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MBP –	proteína básica de mielina (do inglês, <i>myelin basic protein</i> )
MEC –	matriz extracelular
MEK –	proteína cinase cinase ativada por mitógenos
MLC –	miosina de cadeia leve (do inglês, <i>myosin light chain</i> )
MLCK –	cinase da miosina de cadeia leve (do inglês, <i>myosin light chain kinase</i> )
MOG –	glicoproteína de oligodendrócito e mielina (do inglês, <i>myelin/oligodendrocyte glycoprotein</i> )
N2B3 –	meio definido para oligodendrócitos
NADP –	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NC –	células não classificadas
NG2 –	proteoglicano de sulfato de condroitina O-2A - nervo/glial antígeno 2
NGF –	fator de crescimento neuronal (do inglês, <i>neuronal growth factor</i> )



NT-3 –	neurotrofina – 3
O4 –	anticorpo anti-sulfatídeo e anti-POA
OPC –	célula progenitora de oligodendrócitos (do inglês, <i>oligodendrocyte progenitor cell</i> )
OSM –	oncostatina M
P –	célula precursora
P38/MAPK-	cinase pertencente à família das MAPK
PAK -	cinase ativada pela p21(do inglês, <i>p-21 activated kinase</i> )
PBS –	tampão fosfato salina (do inglês, <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PD –	inibidor da MEK PD98059
PDGF –	fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, <i>platelet-derived growth factor</i> )
PDGFR –	receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, <i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i> )
PD-I $\alpha$ /ATX-	fosfodiesterase-Ia/autotoxina (do inglês, <i>phosphodiesterase-Ia/autotoxin</i> )
PI3K –	fosfatidil inositol 3 cinase (do inglês, <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
PK –	proteína cinase (do inglês, <i>protein kinase</i> )
PLP –	proteína proteolípica
PMA –	forbol 12-miristato 13-acetato
PO –	pré-oligodendrócito
POA –	antígeno pró-oligodendroblasto
PSA-NCAM-	forma embrionária polisialilada da molécula de adesão celular
RNA <sub>m</sub> –	ácido Ribonucléico mensageiro (do inglês, <i>messenger ribonucleic acid</i> )
RTK –	receptor tirosina cinase (do inglês, <i>receptor tyrosine kinase</i> )
SN –	sistema nervoso
SNC-	sistema nervoso central
SNP-	sistema nervoso periférico

T3 – triiodotironina

UO- inibidor da MEK U0126

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	23
1.1	<b>Oligodendroglia</b> .....	23
1.2	<b>Diferenciação de oligodendrócitos</b> .....	25
1.3	<b>Proteínas de Oligodendrócitos / Mielina</b> .....	28
1.3.1	<u>Proteolipídeos</u> .....	29
1.3.2	<u>Proteína básica de mielina</u> .....	29
1.3.3	<u>2',3' nucleotídeo cíclico 3'fosfodiesterase</u> .....	30
1.4	<b>Organização e papel funcional do citoesqueleto em oligodendrócitos</b> .....	31
1.5	<b>Fatores envolvidos na diferenciação</b> .....	36
1.5.1	<u>Via da MAPK/ERK</u> .....	39
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
3.1	<b>Obtenção dos animais</b> .....	43
3.2	<b>Cultura primária de oligodendrócitos</b> .....	43
3.3	<b>Avaliação da via de sinalização da MAPK/ERK</b> .....	44
3.4	<b>Reação imunocitoquímica</b> .....	45
3.4.1	<u>Anticorpos</u> .....	45
3.5	<b>Análise e aquisição de imagens</b> .....	46
3.6	<b>Quantificação</b> .....	46
3.7	<b>Análise estatística</b> .....	47
4	<b>RESULTADOS</b> .....	49
4.1	<b>Morfologia celular</b> .....	49
4.1.1	<u>Caracterização das células NC: expressão de marcadores</u> .....	53
4.2	<b>Análise estatística</b> .....	56
4.2.1	<u>Células NG2<sup>+</sup>: de 5 a 7 div</u> .....	75
4.2.2	<u>Células NG2<sup>+</sup>: de 11 a 13 div</u> .....	57
4.2.3	<u>Células CNPase<sup>+</sup>: de 5 a 7 div</u> .....	60
4.2.4	<u>Células CNPase<sup>+</sup>: de 11 a 13 div</u> .....	61
4.2.5	<u>Células MBP<sup>+</sup>: de 5 a 7 div</u> .....	63
4.2.6	<u>Células MBP<sup>+</sup>: de 11 a 13 div</u> .....	63
4.2.7	<u>Marcação para DAPI: 5 a 7 div e 11 a 13 div</u> .....	64
4.3	<b>Avaliação do papel da via da MAPK na distribuição de proteínas</b> .....	66

4.3.1	<u>Distribuição da MBP</u> .....	66
4.3.2	<u>Distribuição da CNPase e actina</u> .....	68
4.3.3	<u>Distribuição da CNPase e tubulina</u> .....	70
4.3.4	<u>Distribuição da CNPase e FAK</u> .....	73
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	78
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	86
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87

## INTRODUÇÃO

As células gliais foram descobertas em meados de 1800, por um grupo de cientistas que inclui Rudolf Virchow, Theodor Schwann e Robert Remak. O termo *glia* é originado do grego e quer dizer cola ou cimento, pois, antes das células gliais serem identificadas, Virchow, em 1856 (citado em Kettenmann & Ransom, 2004) reconhecia que havia um tecido conectivo não celular que ligava os neurônios. Atualmente, sabe-se que a glia não pode ser considerada somente como célula de sustentação dos neurônios; as células gliais possuem papéis essenciais e muito ativos durante o desenvolvimento no sistema nervoso (SN) (Haydon, 2001; Doetsch, 2003; Allen & Barres, 2005; Seifert, et al., 2006; Ndubaku & de Bellard, 2008).

Provavelmente, a mais conhecida de todas as funções gliais é a formação da mielina, uma bainha composta por membranas que reveste os axônios e facilita a rápida comunicação entre os neurônios. Robert Remark foi quem começou a observar no sistema nervoso periférico (SNP) as fibras embainhadas “*medullated fibers*”, mas foi Virchow, novamente, quem criou o termo *mielina*, em 1853, quando se referiu às bainhas de gordura em volta de alguns axônios (revisado por Jacobson em 1991). As células de Schwann foram chamadas assim por Louis Ranvier em 1871, e Ramon y Cajal estabeleceu este nome pelo monumental trabalho deste pesquisador no SN. Finalmente, foi Pio del Rio-Hortega quem distinguiu dois outros tipos de células não neuronais: os oligodendrócitos e a microglia (citado em Kettenmann & Ransom, 2004 e em Ndubaku & de Bellard, 2008).

A bainha de mielina que envolve os axônios constitui a estrutura de membranas mais abundante no sistema nervoso dos vertebrados. Sua composição específica, rica em lipídeos e pobre em água, promove o isolamento elétrico de axônios em regiões segmentadas e permite que o potencial de ação avance pelas regiões desprovidas de mielina (nodos de Ranvier), constituindo assim, a chamada condução saltatória do potencial de ação. As vantagens da bainha de mielina dos axônios no curso da evolução das espécies podem ser consideradas bem claras. Não somente a velocidade de condução de potenciais de ação é aumentada, como também, realizada com economia de espaço e com pouco gasto de energia pela célula, pois os influxos e efluxos iônicos ocorrem somente nas interrupções da bainha, nas ramificações ou nos nodos (Roots & Vernadakis, 1995). No sistema nervoso central (SNC), os axônios, em sua maioria, são envolvidos por prolongamentos citoplasmáticos de oligodendrócitos,

formando sucessivas camadas modificadas de suas membranas plasmáticas, constituindo a bainha de mielina central (Peters et al., 1991).

A formação da mielina pelos oligodendrócitos requer uma síntese coordenada de uma grande quantidade de proteínas e lipídeos e a integração destes dentro de uma alta organização da estrutura multilamelar. A organização lamelar da mielina resulta de diferentes interações intra e extracelulares da membrana plasmática, que ocorre durante o embainhamento espiral dos axônios (Peters et al., 1991).

A mielinização é um dos temas mais estudados da interação neurônio-glia, visto que várias doenças cursam com episódios de perda da bainha de mielina e vários autores têm descrito que a mielina central e/ou as células que são responsáveis pela sua produção têm propriedades não permissivas ao crescimento de axônios e à regeneração (ver Baumann & Pham-Dinh, 2001 para revisão).

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Oligodendroglia

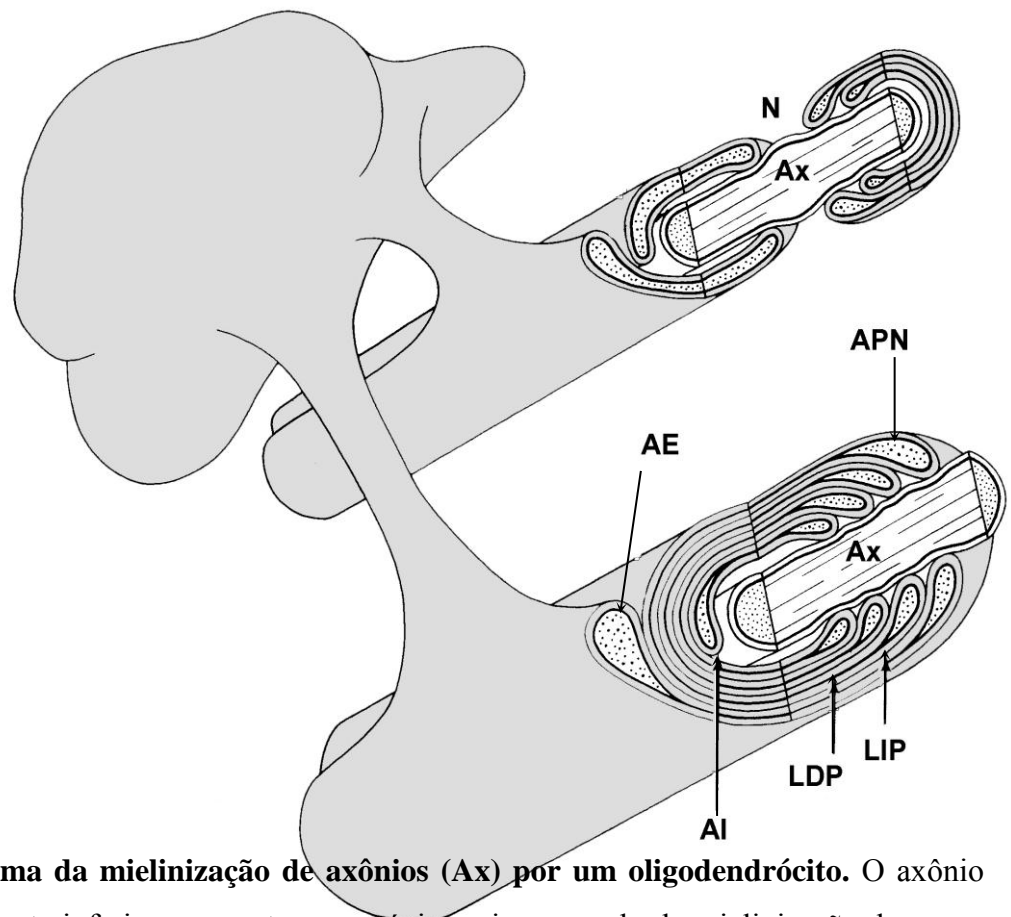
O termo oligodendroglia foi introduzido por del Rio Hortega em 1921 (Kettenmann & Ransom, 2004 para revisão) para descrever aquelas células que mostram poucos prolongamentos na técnica com material impregnado com metais.

Várias características distinguem os oligodendrócitos dos astrócitos, em particular: seu tamanho pequeno, a grande densidade de citoplasma, o núcleo com densa cromatina, a ausência de filamentos intermediários (fibrilas) e de glicogênio no citoplasma, e a presença de um grande número de microtúbulos que estão envolvidos com a estabilidade dos prolongamentos (Lunn et al., 1997). Oligodendrócitos maduros, em cultura, são caracterizados por suas numerosas extensões citoplasmáticas e por superfícies planas de membranas. Estas extensões contêm uma rede de citoesqueleto, formada por microtúbulos e microfilamentos. Estudos por microscopia eletrônica revelaram a presença de mitocôndrias, agrupamentos de ribossomos e cisternas de retículo endoplasmático nas extensões citoplasmáticas (Richter-Landsberg, 2000). Especificamente, os prolongamentos de oligodendrócitos maduros contêm numerosas organelas que normalmente estão associadas com síntese de lipídeos, transporte e produção de energia.

Um oligodendrócito pode estender vários prolongamentos, que podem entrar em contato com um segmento de axônio e envolvê-lo repetidamente formando uma espiral múltipla ainda contendo citoplasma (Bunge, 1968). Finalmente o citoplasma é excluído do prolongamento do oligodendrócito, as faces internas da membrana se fundem constituindo a linha densa principal da mielina; as faces externas também se mantêm apostas constituindo a linha intraperiódica (Figura 1). No mesmo axônio, segmentos adjacentes de mielina podem pertencer a diferentes oligodendrócitos. O número de prolongamentos projetados por um oligodendrócito varia de acordo com a área do SNC, e possivelmente da espécie, que vai de 1:1 na medula espinhal de gatos (Bunge et al., 1961) até 40:1 no nervo óptico de ratos (Peters et al., 1991). Muitos investigadores têm descrito várias formas de expansões (folhas) membranosas produzidas pelos oligodendrócitos na ausência de neurônios em preparações *in vitro* (Pfeiffer, 1984; Rome et al., 1986; Knapp et al., 1987). O número de folhas

membranosas por célula também varia, assim como seu tamanho, que pode chegar a diâmetros de até 200 $\mu$ m (Dyer, 1993).

Além dos oligodendrócitos responsáveis pela formação de mielina, existem também oligodendrócitos satélites (Penfield, 1932), que podem não estar diretamente ligados à formação e/ou à manutenção da bainha de mielina. Estes são perineuronais e parecem atuar na regulação do microambiente ao redor dos neurônios (Peters et al., 1991; Ludwin, 1997; Dawson et al., 2000).



**Figura 1- Esquema da mielinização de axônios (Ax) por um oligodendrócito.** O axônio representado na parte inferior apresenta um estágio mais avançado de mielinização do que o representado acima na figura. A linha intra-periódica (LIP) é formada pela junção dos folhetos externos da membrana do oligodendrócito enquanto a linha densa principal (LDP) é formada pela junção dos folhetos internos. Observar também os compartimentos da chamada mielina não-compacta: alça externa (AE), alça interna (AI) e alças paranodais (APN). Um nó de Ranvier (N) é aparente no axônio acima (modificada de Barradas et al., 2005).



## 1.2 Diferenciação de Oligodendrócitos

Os oligodendrócitos se originam de precursores migratórios e mitóticos, passam a progenitores, e com progressiva maturação passam a células pós-mitóticas produtoras de mielina (Miller, 2002). A expressão sequencial de marcadores do desenvolvimento, identificados por um painel de anticorpos específicos de oligodendroglia, divide a linhagem em diferentes estágios fenotípicos, caracterizados pela capacidade proliferativa, habilidade de migração e mudanças morfológicas dramáticas. Muitos dos marcadores têm sido identificados em culturas de tecidos. Alguns deles são também componentes de mielina. A diferenciação envolve a perda de alguns antígenos de superfície ou intracelulares e a aquisição de outros novos.

A maioria dos oligodendrócitos é gerada ventralmente, a partir de células proliferativas neuroepiteliais das zonas telencefálica ventricular e sub-ventricular (Doetsch et al., 1997). Os precursores de oligodendrócitos começam a ser gerados no dia embrionário E12.5, pelas células neuroepiteliais das regiões ventrais das zonas ventriculares, logo após a geração de neurônios motores (Pringle & Richardson, 1993; Rowitch, 2004; See & Grinspan, 2009). A especificação destes precursores na medula é controlada por sinais liberados pela placa do assoalho na região ventral, como o sonic hedgehog (Shh), que induz a expressão de fatores de transcrição necessários para os estágios de desenvolvimento dos oligodendrócitos (Lu et al., 2000; Zhou et al., 2000; Zhou & Anderson, 2002). A linhagem oligodendrocítica é induzida internamente por fatores de transcrição, tais como *Olig-1* e *Olig-2*, que são expressos durante o desenvolvimento em uma discreta população de progenitores neurais, atuando também na especificação de neurônios motores (Miller, 2002). Estudos com mutantes “knockouts” para ambos os genes *Olig-1* e *Olig-2* demonstraram que nenhum oligodendrócito era gerado nestes animais, em nenhuma região do SNC. Quando a mutação envolvia apenas um dos genes, a severidade era menor. No mutante para o gene *Olig-1*, ocorria somente um atraso na maturação de oligodendrócitos. No mutante para o gene *Olig-2*, poucos oligodendrócitos eram gerados no prosencéfalo, já no mesencéfalo e no metencéfalo, o número de oligodendrócitos chegava perto do normal, porém, estes animais eram totalmente desprovidos de oligodendrócitos na medula espinhal. Nestes mutantes, todos os oligodendrócitos gerados expressavam *Olig-1*, sugerindo uma sobreposição das funções de ambos os genes (Rowitch et al., 2002). Podemos citar outros fatores de transcrição

importantes como o Nkx2.2 e Sox-10 (Lu et al., 2000; Zhou et al., 2000; Stolt et al., 2002; See & Grinspan, 2009).

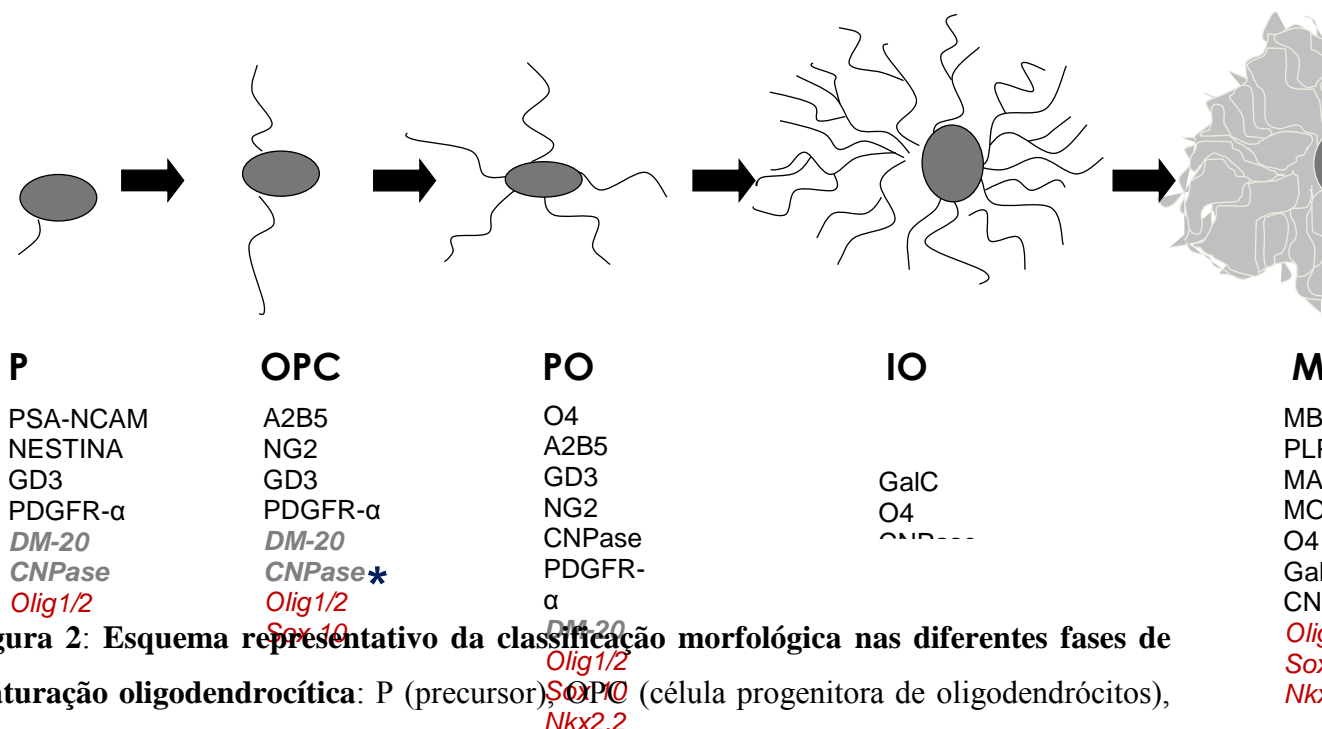
Progenitores de oligodendrócitos podem então, migrar, lateral e dorsalmente por longas distâncias, se multiplicar e se distribuir por todo o SNC como mostrado por estudos durante o desenvolvimento (Frost et al., 1996) e pós-transplantes (Lachapelle et al., 1994). O tempo de diferenciação dos oligodendrócitos depende de um programa intrínseco da linhagem além de sinais extracelulares (Kondo & Raff, 2000a, b). Como os oligodendrócitos maduros migram menos, a prevenção da diferenciação prematura dos progenitores é crucial para assegurar que isto vai ocorrer nos seus destinos certos e esta é efetivamente prevenida por mecanismos de inibição, como a via da Wnt/ $\beta$ -catenina (Feigenson et al., 2009), a sinalização das proteínas morfogenéticas de osso (BMP) 2 e 4 (See & Grinspan, 2009), e a via sinalizada pela proteína Notch (Wang et al., 1998). Tem sido levantada a hipótese de que, mesmo depois do desenvolvimento ser completado, a sinalização via Notch pode ajudar a manter algumas linhagens de células precursoras em tecidos adultos, prevenindo-as da diferenciação e permitindo a possibilidade de geração de novas células na reconstrução de tecidos danificados (Artavanis-Tsakonas et al., 1995).

Os progenitores de oligodendrócitos têm sido caracterizados pela morfologia bipolar e pela expressão de marcadores específicos. Em estudos *in vitro*, assim como *in vivo*, experimentos com técnicas de transplante mostram que estas células têm atividade proliferativa e possuem propriedade migratória. Entre os marcadores de progenitores estão: os gangliosídeos de superfície, ainda não caracterizados, identificados pelo anticorpo A2B5 (Raff, 1989); o receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR $\alpha$ ) (Hart et al., 1989; Decker & French-Constant, 2004); o proteoglicano sulfatado de condroitina (NG2) (Nishiyama et al., 1996), que aparecem logo depois do PDGFR $\alpha$  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), importante na migração celular por direcionar o progenitor em resposta ao PDGF (Ben-Hur et al., 1998) e o RNAm da 2',3' nucleotídeo cíclico 3'fosfodiesterase (CNPase), que é o primeiro marcador protéico específico de oligodendrócito a ser expresso (Amur-Umarjee et al., 1990; Barradas et al., 1995; Barradas et al., 1998).

Após a migração no SNC de mamíferos, progenitores se estabelecem ao longo do caminho das fibras da futura substância branca e se transformam em pré-oligodendrócitos, células com múltiplos prolongamentos, que mantêm a propriedade de divisão celular e adquirem o antígeno POA (antígeno pró-oligodendroblasto), que é reconhecido pelo anticorpo

O4 (Sommer & Schachner, 1981; Grinspan, 2002). Neste estágio, os pré-oligodendrócitos ficam menos móveis (Orentas & Miller, 1996), ou mesmo pós-migratórios (Pfeiffer et al., 1993), e perdem a resposta mitogênica ao PDGF (Hart et al, 1989; Gao et al.,1998). O pré-oligodendrócito se torna oligodendrócito imaturo, caracterizado em ratos pelo aparecimento do antígeno lipídico galactocerebrosídeo (GalC) e pela perda da expressão dos antígenos reconhecidos pelo anticorpo A2B5 na superfície da célula (Raff, 1989) e também pela perda do PSA-NCAM (Fewoun et al., 2007). Em cerebelos de ratos, a CNPase aparece simultaneamente ao GalC e antes da proteína básica de mielina (MBP) e da proteína proteolipídica (PLP) (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Esta mesma sequência ocorre também *in vitro* (Raff, 1989).

O aparecimento sequencial de MBP e também de outra proteína minoritária, a glicoproteína associada à mielina (MAG), assim como de PLP e da glicoproteína de oligodendrócito e mielina (MOG), que também é correlacionada com estágios tardios de maturação de oligodendrócitos (Solly et al., 1996), tanto *in vivo* quanto *in vitro*, caracteriza um oligodendrócito maduro (Pfeiffer et al, 1993) (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema representativo da classificação morfológica nas diferentes fases de maturação oligodendrocítica: P (precursor), OPC (célula progenitora de oligodendrócitos), PO (pré-oligodendrócito), IO (oligodendrócito imaturo), M (oligodendrócito maduro com véus de membrana). Seguem listadas as proteínas expressas em cada estágio específico (em preto), os RNA mensageiros (em cinza) e os fatores de transcrição (em vermelho). \* Alguns autores, inclusive o nosso grupo, já identificaram a proteína CNPase já expressa nesta fase de progenitor (baseada em Hardy & Reynolds, 1993 e Baumann & Pham-Dhin, 2001).

Há evidências de que a progressão da gênese da oligodendroglia ocorre de forma ventro-dorsal, baseada no gradiente da extensão da mielinização e na densidade de células precursoras de oligodendócitos, observada tanto em roedores (Pringle & Richardson, 1993; Timsit et al., 1995; Jakovcevski et al., 2007) como em cérebros fetais humanos (Rakic & Zecevic, 2003; Jakovcevski & Zecevic, 2005; Jakovcevski et al., 2009).

Análises *in vitro* sugerem que a maturação dos oligodendrócitos do estágio de precursor para célula madura é idêntica tanto em cultura, mesmo sem neurônios, como em um tecido intacto, sugerindo assim que a capacidade dos progenitores de oligodendrócitos de se diferenciarem em oligodendrócitos maduros é intrínseca na linhagem (Temple & Raff, 1986) e envolve a expressão do inibidor de ciclinas dependentes de cinase p57<sup>kip2</sup> (Cdkn1c). Esta molécula determina quantas vezes o progenitor de oligodendrócitos pode se dividir antes de se diferenciar (Dugas et al., 2007). Na ausência de neurônios, oligodendrócitos podem claramente formar a membrana de mielina (Sarliève et al., 1983). No entanto, em co-culturas com neurônios, a expressão dos genes de mielina, como PLP, MBP e MAG é aumentada (Matsuda et al., 1997). A indução dos genes de mielina é paralela às modificações morfológicas, por exemplo, *in vivo*, quando ocorre o contato axonal, ocorre uma modificação dramática na morfologia de oligodendrócitos com a perda de prolongamentos que não têm contato com axônios (Hardy & Friedrich, 1996). A sensibilidade dos oligodendrócitos a sofrerem o processo de apoptose é dependente do estágio de diferenciação em que se encontram. Os progenitores de oligodendrócitos são mais sensíveis à apoptose, em resposta a vários fatores como estresse oxidativo e excitotoxicidade relacionada ao glutamato, enquanto oligodendrócitos pós-mitóticos entram em apoptose se não estabelecerem contato axonal (Butts et al., 2008).

### 1.3 Proteínas de Oligodendrócitos / Mielina

As proteínas de mielina compreendem 30% do seu peso seco, e são componentes específicos de mielina e de oligodendrócitos. Existem vários marcadores protéicos de mielina e oligodendrócitos, mas os majoritários são MBP e PLP (com sua isoforma DM-20), que constituem 80% do total de proteínas; a CNPase, com aproximadamente 4% do total de proteínas, é o marcador protéico mais precoce de oligodendrócitos (Amur-Umarjee et al., 1990; Barradas et al., 1995; Barradas et al., 1998). Culturas de oligodendrócitos expressam

uma variedade de marcadores de mielina que são observados *in vivo*. Devido à relevância destas proteínas citadas para o desenvolvimento e processo de mielinização, elas serão descritas a seguir:

### 1.3.1 Proteolípídeos

Proteolípídeos são lipoproteínas solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água. Existem como componentes de membrana em muitas plantas, animais e células bacterianas, mas são mais abundantes na substância branca do cérebro, onde constituem mais de 50% da proteína de mielina central. A PLP é codificada por um gene de 15Kb organizado em 7 exons (Morello et al., 1986). O *splicing* alternativo do gene *plp* transforma-o numa isoforma menor, conhecida como DM20. A PLP e a DM20 dividem sequências idênticas, exceto em relação ao aminoácido 35 (Diehl et al., 1986; Macklin et al., 1987), codificado pela extremidade 5' do exon 3, que é ausente na DM20. O gene completo codifica a proteína PLP com uma sequência de 276 aminoácidos, massa molecular de 30 kDa. A sequência de aminoácidos da PLP é altamente conservada entre os mamíferos (Greer & Lees, 2002) e parece conferir uma atividade regulatória na progressão dos estágios de desenvolvimento da linhagem (Tuason et al., 2008). Mutações espontâneas envolvendo o gene para PLP ocorrem nos camundongos jimpy (*jp*) (Boison & Stoffel, 1994; Klugmann et al., 1997) e em um número de outros modelos animais, assim como em doenças desmielinizantes em humanos. Sem a expressão da PLP e da DM20, oligodendrócitos ainda são competentes em mielinizar axônios e montar a bainha de mielina compactada. No entanto, a ultra-estrutura da mielina mostra uma condensação nas linhas intraperiódicas, semelhante a um zíper (Klugmann et al., 1997).

### 1.3.2 Proteína básica de mielina

A MBP é uma das principais proteínas da mielina do SNC e constitui mais de 30% das proteínas de mielina. De fato é uma família de proteínas, pois existem muitas isoformas. Em roedores, a MBP possui quatro isoformas com pesos moleculares de 14, 17, 18,5 e 21.5 kDa (Lees & Brostoff, 1984). As múltiplas formas de RNAm podem ser derivadas do transcrito de

um único gene MBP por diferentes mecanismos de *splicing* alternativo do transcrito primário da MBP. Transcritos deste gene também foram encontrados em células do sistema imune e em alguns neurônios. Elementos regulatórios responsáveis pela expressão específica do gene de MBP têm sido identificados usando camundongos transgênicos, sendo que alguns destes elementos são suficientes para direcionar a expressão em oligodendrócitos. Algumas isoformas são re-expressas durante a remielinização (Capello et al., 1997), enquanto outras possuem função regulatória na mielinização, por ter um transporte ativo do citoplasma para o núcleo (Pedraza et al., 1997). Evidências diretas de que a MBP participa de uma função principal na compactação da mielina no SNC vieram de estudos de camundongos mutantes Shiverer, os quais têm uma deleção do gene para MBP e apresentam ausência da linha densa principal na bainha de mielina (Privat et al., 1979). A MBP também pode ser regulada mais tardiamente, no período mais ativo da mielinogênese (entre P13 e P20) pela expressão da Fyn, uma proteína tirosina cinase. A ausência da Fyn causa uma redução preferencial da região do RNAm que contém a isoforma com o exon-2, derivado de um *splicing* alternativo, demonstrando que a Fyn é necessária para a regulação pós-traducional da MBP (Lu et al., 2005).

### 1.3.3 2',3' nucleotídeo cíclico 3'fosfodiesterase

A CNPase pertence à superfamília das 2H fosfodiesterases, as quais, têm a capacidade de hidrolizar ligações fosfodiester em nucleotídeos cíclicos, oligonucleotídeos e 2', 3' NADP cíclico (Vogel & Thompson, 1988). A atividade desta enzima já foi evidenciada em tecidos e órgãos como: baço, pulmão, fígado, rim, coração e pâncreas, e células como: eritrócitos, linfócitos e plaquetas. Porém, como ainda não foi confirmada a presença de substrato nos tecidos estudados, a relevância da função enzimática da CNPase tem sido questionada (Tsukada & Kurihara, 1992).

A análise de tecidos por eletroforese em gel mostra que a CNPase acha-se representada por duas isoformas de peso molecular estimado de 46 e 48 kDa (CNPase humana), CNPase1 e CNPase2, respectivamente (Sprinkle,1989). Estas duas proteínas apresentam uma composição de aminoácidos muito semelhante com 20 aminoácidos a mais na estrutura da CNPase2 (Tsukada & Kurihara, 1992). As duas isoformas são produzidas a partir do mesmo gene por *splicing* alternativo e também a partir do RNAm para CNPase2

(Tsukada & Kurihara, 1992). Segundo O'Neill e colaboradores (1997), as duas isoformas podem ser produzidas *in vitro* e *in vivo* através da utilização de dois *codons* de iniciação no RNAm para CNPase2. O primeiro deles é utilizado para CNPase2 e o mais distal para CNPase1.

A CNPase é uma proteína constituinte do complexo molecular que regula e/ou modula a expansão e migração da membrana oligodendrocítica. Estudos indicam que aquele complexo é funcionalmente ativo em oligodendrócitos antes e durante a formação da mielina *in vivo*. É uma proteína isoprenilada e esta característica favorece a ligação com outras proteínas ou a translocação para a membrana (Bifulco, 2005; Lee et al., 2005; Esposito et al., 2008).

Estudos prévios com camundongos *knockouts* para a isoforma CNPase1 demonstraram que as interações axo-gliais eram rompidas com o decorrer da idade. Os canais de sódio e as proteínas de adesão paranodais eram, inicialmente, agrupados normalmente, porém ficavam progressivamente desorganizados, o que acarretava uma diminuição dos canais de sódio, invasão da microglia e degeneração axonal, demonstrando a importância da CNPase na integridade dos paranodos e na interação axônio-glia (Rasband et al., 2005).

#### 1.4 Organização e papel funcional do citoesqueleto em oligodendrócitos

No processo de mielinização, ocorrem etapas sequenciais e cruciais durante o desenvolvimento: a seleção dos axônios e o início do contato axonal; processo de extensão da mielina ao redor do axônio-alvo; contato axônio-glia e formação do nodo; regulação da espessura da mielina e promoção da sobrevivência axonal pela glia mielinizante (Sherman & Brophy, 2005).

Os mecanismos pelos quais os oligodendrócitos estendem as ramificações dos prolongamentos ainda não são muito esclarecidos, mas envolvem grandes mudanças na morfologia celular e, por esta razão, envolvem o citoesqueleto. Estes folhetos membranosos contêm uma rede de citoesqueleto extensa de microtúbulos e microfilamentos, mas são desprovidos de filamentos intermediários (Peters et al., 1991). Interações entre o citoesqueleto e a membrana plasmática são necessárias para regular a forma e os movimentos na maioria das células de mamíferos, e no oligodendrócito também são importantes para localizar

especialmente, regular temporalmente e coordenar o transporte de lipídeos, proteínas e RNAm essenciais para a síntese e manutenção da mielina (Song et al., 2001).

Na maioria das células, os microfilamentos são organizados em um sistema de malhas, o qual é responsável por gerar a força mecânica necessária para várias atividades como a migração celular e desenvolvimento (Fukui, 1993; Gavin, 1997; Brandt, 1998), e o mesmo parece acontecer nos oligodendrócitos (Simpson & Armstrong, 1999). Foi demonstrado que os microfilamentos existem em todas as regiões dos oligodendrócitos durante todo o seu desenvolvimento. Os microfilamentos são enriquecidos na região cortical bem abaixo da membrana celular, e destas regiões se expandem para os lamelipódios e para as extremidades dos prolongamentos (Song et al., 2001).

Os microtúbulos, em oligodendrócitos em cultura, têm uma aparência filamentosa e são distribuídos pelo corpo celular e ao longo dos prolongamentos, desde a sua base, mais larga, até a extremidade, mais fina. Começam formando feixes densos nos prolongamentos, depois se espalham e se estendem para as regiões ricas em microfilamentos. Utilizando microscopia de fluorescência foi demonstrado que os microtúbulos seguem o trajeto dos microfilamentos durante o crescimento dos prolongamentos dos oligodendrócitos (Song et al., 2001). Esta disposição dos microfilamentos e organização dos microtúbulos são consistentes com a idéia de que a organização dos microfilamentos provê a força motriz para as mudanças na conformação da membrana plasmática, acompanhando as extensões dos prolongamentos e das ramificações (Fishkind & Wang, 1995; Yumura & Fukui, 1998) como indicado por estudos anteriores com outros tipos celulares (Song et al., 1998). Estudos com drogas que desestabilizam os componentes do citoesqueleto demonstraram que a distribuição normal e a configuração de microtúbulos são altamente dependentes da formação dos microfilamentos, presumivelmente agindo como “trilhos” para a invasão dos microtúbulos nas novas regiões de crescimento (Song et al., 2001).

Tem sido demonstrado que várias proteínas de mielina interagem com o citoesqueleto. Enquanto a CNPase possui uma forte associação com filamentos de actina, a MBP é encontrada nos prolongamentos grossos e nos folhetos membranosos e se co-localiza com os microtúbulos em cultura. Depois de uma lise por detergentes, demonstrou-se uma firme associação da MBP com os microtúbulos (Wilson & Brophy, 1989), e o tratamento com colchicina resulta na ruptura de microtúbulos e desorganização da distribuição da MBP (Dyer & Benjamins, 1989).

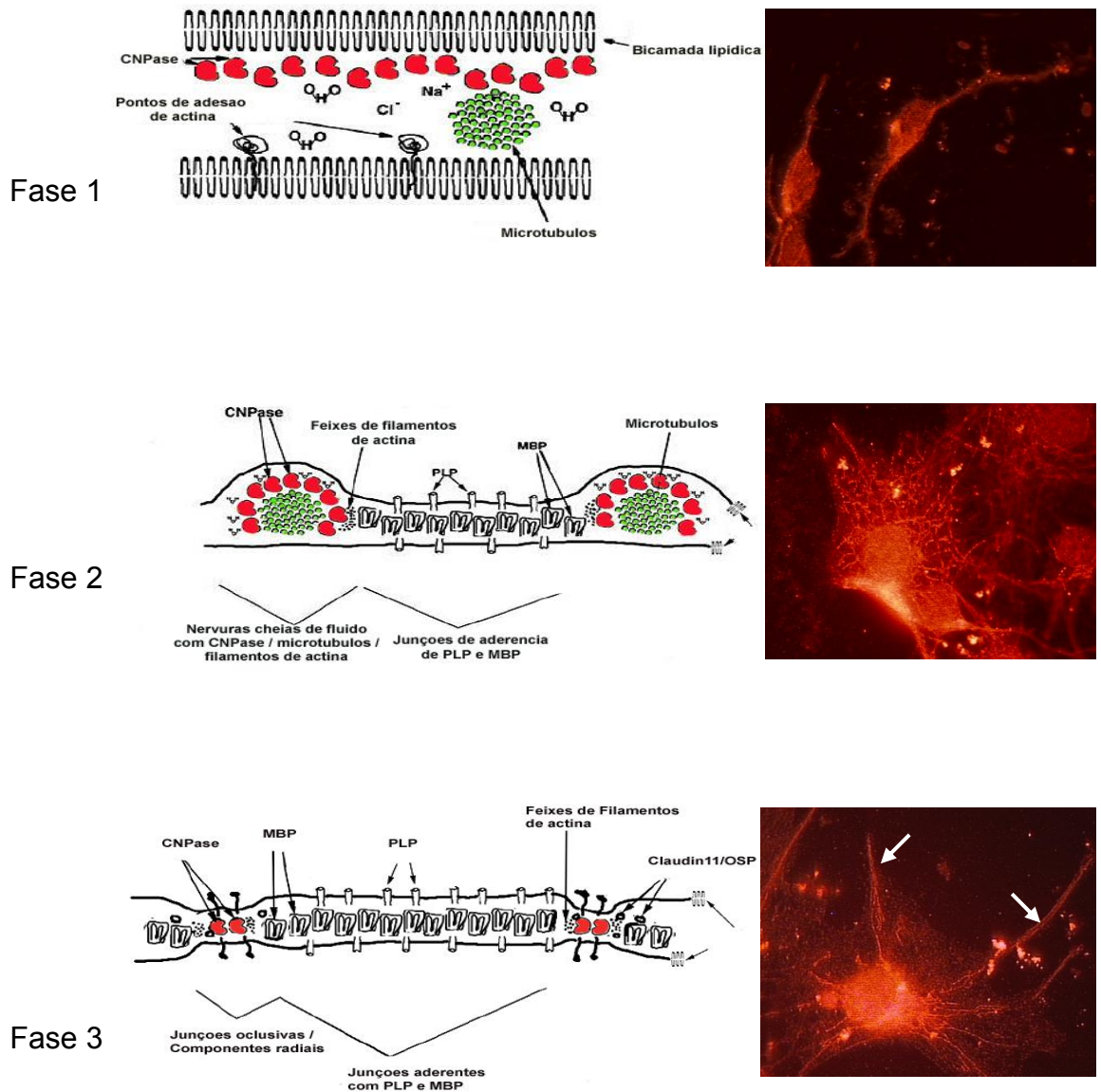


A CNPase pode servir como um regulador da polimerização da tubulina e da distribuição dos microtúbulos, e também para ancorar estes à membrana. Os microtúbulos se ligam à membrana plasmática ou às membranas de organelas através de ligantes. Esta associação deve ocorrer através de uma âncora de membrana, que proporciona uma interação hidrofóbica com a membrana de um lado. A CNPase provê domínios hidrofóbicos para a membrana, intercalando e mostrando domínios também para o citoplasma. Estudos com células da tireóide (FRTL-5) e células cerebrais demonstraram uma associação estável da CNPase com a tubulina, indicando assim as propriedades de uma proteína associada a microtúbulos (MAPs) para a CNPase (Bifulco et al., 2002).

A MBP também está relacionada com a actina, podendo fazer a ligação de filamentos de actina com a bicamada lipídica através de interações eletrostáticas, assim como polimerizar actina e feixes de filamentos de actina (Boggs et al., 2005). Possui também um sítio de ligação para a calmodulina (CaM) (Polverini et al., 2004), que quando ligada, juntamente com o  $\text{Ca}^{2+}$ , faz com que a MBP se desligue da actina (Boggs et al., 2005). A interação da MBP com a bicamada lipídica pode gerar um sinal do citosol para a membrana, causando mudanças na interação do citoesqueleto com a membrana (Boggs & Rangaraj, 2000) e, possivelmente, levando à fusão das membranas do prolongamento do oligodendrócito e compactação da bainha de mielina.

O padrão de distribuição da CNPase é alterado ao longo da diferenciação do oligodendrócito. A figura 3 representa o modelo proposto por Dyer (2002) de associações das principais proteínas de oligodendrócitos/mielina durante o desenvolvimento da mielinização *in vitro*. Durante o primeiro estágio da diferenciação, a CNPase se localiza distribuída pela membrana plasmática. No segundo estágio de desenvolvimento da bainha de mielina, as isoformas da MBP são depositadas em áreas ou domínios, localizadas entre a rede de microtúbulos (Brophy, 1992; Dyer, 2002). A CNPase migra de regiões que contêm MBP para as estruturas microtubulares semelhantes a nervuras; com isso, “nervuras de citoesqueleto” são compostas de uma parte central de microtúbulos envolvidos por CNPase na qual os filamentos de actina, agrupados em feixe, estão ligados (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).



**Figura 3 - Representação de um modelo proposto de desenvolvimento da mielina em culturas de oligodendrócitos.** Os diagramas mostram corte transversais das folhas de membrana representando a distribuição dos elementos em cada fase. Na fase 1 somente está presente a CNPase, disposta de maneira homogênea pela folha de membrana. Na fase 2, a MBP aparece distribuída em domínios de membrana, juntamente com a PLP. A CNPase é deslocada para as chamadas estruturas semelhantes a nervuras, que contêm fluido citoplasmático e microtúbulos. A fase 3 representa a estrutura da bainha compactada, a maioria do fluido citoplasmático é expulso. A CNPase permanece nas estruturas semelhantes

a nervuras. Ao lado de cada diagrama, microfotografias com aumento de 1000x de (*continuação*) oligodendrócitos imunorreagidos com o anticorpo anti-CNPase, representando a distribuição da CNPase em cada fase de diferenciação – Fase 1 (progenitores de oligodendrócitos com 3 dias *in vitro* em meio definido para oligodendrócitos); fase 2 (pré-oligodendrócito com 7 dias *in vitro* : observar as estruturas semelhantes a nervuras); fase 3 (oligodendrócito maduro com 10 dias *in vitro*: notar os véus de membrana pouco marcados com o anticorpo anti-CNPase, que se concentra mais nos chamados componentes radiais, setas). Adaptada de Dyer, 2002.

A regulação entre adesões firmes e adesões intermediárias é altamente regulada durante a diferenciação dos oligodendrócitos pelas interações célula-matriz. O estado de adesão intermediária em oligodendrócitos pode facilitar a morfogênese, permitindo uma remodelação celular necessária para a diferenciação terminal e para a mielinização. Este tipo de adesão é mediado por reguladores negativos de interações entre o oligodendrócitos e a matriz extracelular (MEC). Um exemplo é a fosfodiesterase-Ia/autotoxina (PD-Ia/ATX), um membro da família de nucleotídeos pirofosfatase/fosfodiesterase. Esta família de ectofosfodiesterases transmembrânicas é conhecida pelo sítio enzimaticamente ativo de fosfodiesterase (PDE). Foi demonstrado em oligodendrócitos que o PD-Ia/ATX, através de um fragmento protéico não identificado, desfosforila a cinase de adesão focal (FAK), fazendo com que haja o desligamento da integrina com o substrato da matriz extracelular (Fox et al., 2004). O estado fosforilado da FAK é considerado um determinante crítico na composição de complexos de adesões focais e na iniciação de eventos de sinalização, como a ativação da MAPK/ERK2 ras-dependente (Fox et al., 2004). Foi demonstrado, em culturas de oligodendrócitos, que a FAK é ativada no seu resíduo Tyr397 pela ligação da laminina com integrinas, induzindo assim, o crescimento dos prolongamentos. *In vivo*, este processo ocorre quando os prolongamentos dos oligodendrócitos entram em contato com a superfície do axônio (Hoshina et al., 2007).

A família das pequenas Rho – guanosina trifosfatases (Rho GTPases) possuem, entre outras funções, o papel de regular o citoesqueleto em resposta a fatores externos, como fatores de transcrição e receptores de adesão. A mielinização também é regulada pelas Rho GTPases 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. 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). A Fyn, uma cinase importante para a mielinização, pode fosforilar proteínas ativadoras de GTPases (GAPs), como a p190RhoGAP e a p259GAP em oligodendrócitos (Wolf et al., 2001; Taguchi et al., 2003). Ambas GAPs, quando fosforiladas em resíduos de tirosina, diminuem a atividade da RhoA e, conseqüentemente, aumentam a diferenciação dos oligodendrócitos (Kippert et al., 2007; Feltri et al., 2008).

### 1.5 Fatores envolvidos na diferenciação

Vários fatores tróficos e hormônios podem influenciar o verdadeiro destino do desenvolvimento de um progenitor ou de uma linhagem de células multipotentes da zona subventricular (Johe et al., 1996; Qian et al., 1997; Calver et al., 1998; Yandava et al., 1999).

O PDGF é secretado por astrócitos e neurônios, e promove o desenvolvimento de oligodendrócitos agindo como mitógeno em células precursoras e aumentando as chances de sobrevivência em oligodendrócitos pós-mitóticos (Hart et al., 1989; Grinspan, 2002). A localização do receptor de PDGF em oligodendrócitos varia em diferentes estágios da diferenciação, se colocalizando com integrinas  $\alpha\beta3$  ao liberar o sinal de proliferação, e depois migrando para regiões de microdomínios de membranas, ou cavéolas (*rafts*), se colocalizando com integrinas  $\alpha6\beta1$ , ao liberar o sinal de sobrevivência, através da via de sinalização da fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K) (Decker & French-Constant, 2004). O PDGF também é um potente quimioatraente de células progenitoras de oligodendrócitos, induzindo a migração celular através da ativação da via da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK), pertencente à família das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAP cinases ou MAPK) (Frost et al., 2009).

O fator básico de crescimento de fibroblastos (FGFb) estimula a proliferação de progenitores de oligodendrócitos e os impede de se diferenciarem através da interação com componentes da via de sinalização do Notch. Este efeito ocorre durante o desenvolvimento e também no processo de remielinização (Yasuda et al., 1995; Grinspan, 2002; Zhou & Armstrong, 2007). Estudos com células tronco demonstraram que o FGFb induz a geração da oligodendroglia através da via da MAP cinase e está relacionado com a indução do gene *Olig-2* (Chandran et al., 2003). Foi descrito recentemente que o receptor do FGFb (também

chamado de FGFR2 por alguns autores) também é encontrado em frações de *rafts* lipídicas no estado fosforilado, ativando a via da PI3K/Akt, mesmo na ausência do FGF, indicando assim, uma função deste receptor independente do ligante (Bryant et al., 2009).

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) -1 aumenta a proliferação de progenitores de oligodendrócitos amplificando a ação mitógena do FGFb (Jiang et al., 2001). O IGF-1 aumenta a sobrevivência e a síntese de proteínas em progenitores de oligodendrócitos através das vias PI3K/mTOR/Akt e MAPK/ERK (Cui & Almazan, 2007; Bibollet-Bahena & Almazan, 2009).

Além destes fatores, o fator de crescimento glial (GGF) -2 estimula a mitose de progenitores de oligodendrócitos, atrasando a diferenciação dos mesmos, tanto em animais neonatos como em adultos (Canoll et al., 1996; Shi et al., 1998). O fator de crescimento de hepatócitos (HGF) também atua no aumento da proliferação dos progenitores, inibindo a diferenciação de oligodendrócitos. Além disso, atua no crescimento de neuritos (Ohya et al., 2007).

As neurotrofinas também participam na diferenciação da linhagem oligodendrocítica, além de algumas serem expressas pelo próprio oligodendrócito, como o fator de crescimento de neurônios (NGF), o fator de crescimento derivado de cérebro (BDNF) e a neurotrofina (NT) -3 (Dai et al., 2003). A NT-3, por exemplo, induz a diferenciação de células precursoras indiferenciadas, em progenitores de oligodendrócitos aumentando a expressão de *Olig-1* (Hu et al., 2004). O BDNF induz a proliferação celular e a diferenciação através do seu receptor de tirosina cinase de alta afinidade TrkB e ativação da MAPK/ERK (Van't Veer et al., 2009).

Algumas citocinas também participam na diferenciação da oligodendroglia, como os membros da família das citocinas neuro-hematopoiéticas, que inclui o fator neurotrófico ciliar (CNTF), a interleucina (IL) -6 o fator inibidor de leucemia (LIF), a oncostatina M (OSM), a IL-11 e a cardiotrofina (CT) -1 (Stankoff et al., 2002). O CNTF, o LIF, a OSM e a CT-1, exercem efeitos pró-mielinizantes como formação de internodos em co-culturas de neurônios e oligodendrócitos maduros, e agem através da heterodimerização de seus receptores LIFR e gp130. Estes efeitos podem ser bloqueados com a inibição da via da JAK (Stankoff et al., 2002).

O ligante Notch está presente na superfície de progenitores de oligodendrócitos interagindo com axônios que expressam Jagged, um ligante de Notch que inibe a diferenciação de oligodendrócitos. Os oligodendrócitos começam a envolver os axônios, quando Jagged é infra-regulado. No estágio pré-mielinizante, os axônios apresentam canais de  $\text{Na}^+$  distribuídos ao longo de toda a sua membrana. Os oligodendrócitos, por sua vez, podem

controlar a organização de algumas proteínas neuronais, incluindo a paranodina, a anquirina G, e também os canais de sódio e potássio ao longo dos axônios, por mecanismos ainda não totalmente conhecidos (Peles & Salzer, 2000; Rasband & Shrager, 2000; Mathis et al., 2001). Tem sido sugerido que os oligodendrócitos, ao iniciarem o envolvimento dos axônios, secretam um fator que causa o agrupamento destes canais em sítios que vão ser os futuros nodos de Ranvier. Estudos com axônios de células ganglionares da retina mostraram que o agrupamento de canais de Na<sup>+</sup> pode ser induzido *in vitro* por fatores solúveis secretados em cultura de oligodendrócitos (Kaplan et al., 2001).

O hormônio tireoideano também tem um papel muito importante na regulação da diferenciação da oligodendroglia. Sua deficiência, durante um período crítico do desenvolvimento, provoca alterações permanentes e severas nas estruturas e no funcionamento do sistema nervoso, incluindo atraso na diferenciação neuronal (Bernal & Nunez, 1995) e da oligodendroglia (Rodriguez-Peña et al., 1993; Barradas et al., 2000), afetando o processo normal de mielinização (Rodriguez-Peña, 1999). A regulação dependente de T3 desses processos somente ocorre durante estágios discretos de desenvolvimento do oligodendrócito e, no mínimo, para a expressão gênica da mielina e sobrevivência dos oligodendrócitos, e estes efeitos são transitórios (Jones et al., 2003). T3 controla o tempo da diferenciação da célula progenitora oligodendrocítica *in vitro* (Baas et al., 1994; Barres et al., 1994), bloqueando a proliferação e promovendo a diferenciação de células progenitoras em oligodendrócitos. Em modelos de animais hipotireoideos, a expressão da MBP e da CNPase, sofre um atraso durante o desenvolvimento (Barradas et al., 2001), atingindo níveis normais na vida adulta do animal. Entretanto, outras proteínas expressas mais tardiamente durante a mielinogênese, a PLP e a MOBP, estão permanentemente alteradas pelo hipotireoidismo (Barradas et al., 2001). Além disso, 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). Algumas das alterações que ocorrem *in vitro* são muito rápidas, o que parece não corresponder ao mecanismo de ação genômica do T3. Foi descrito por Bergh e colaboradores (2005) um mecanismo de ação não genômica para o T3, através de um sítio de ligação com a integrina  $\alpha V\beta 3$ , o que explica a ação do T3 em eventos que não dependem de ativação gênica. Vários efeitos foram observados com relação à sinalização intracelular, ativando vias como a da MAPK, da proteína cinase (PK) A, PKC, PI3K, ativação de Ca<sup>2+</sup> intracelular, entre outros. O hormônio

tireoideano também é importante na regeneração da mielina em adultos (Calzà et al., 2005). Em modelos de lesões crônicas que tentam mimetizar o modelo de esclerose múltipla, foi visto que o tratamento com T3 melhorou o controle motor através do aumento do número de células progenitoras de oligodendrócitos, que, posteriormente, alcançaram as áreas lesionadas, se diferenciando e promovendo a remielinização. As etapas que se seguem até o processo de remielinização são comparáveis às etapas do desenvolvimento normal da mielina.

A MEC possui um papel crucial na regulação da sobrevivência dos oligodendrócitos durante o desenvolvimento. O número de oligodendrócitos é equiparado com o número de axônios que requerem a mielinização, levando então a uma razão de morte celular de 50% dos oligodendrócitos recém formados. A sobrevivência depende do contato axonal, que proporciona a interação com fatores reguladores de sobrevivência. As lamininas, por exemplo, são expressas na superfície dos axônios na época da mielinização e interagem com as integrinas  $\alpha\beta 1$  localizadas nos oligodendrócitos. Esta interação amplifica o sinal de sobrevivência liberado pelo PDGF (Cognato et al., 2002; Câmara & French-Constant, 2007).

### 1.5.1 Via da MAPK/ERK

A família das MAPK pode ser ativada em resposta a vários fatores de crescimento através de receptores tirosina cinases (RTK), ou a receptores acoplados à proteína G, através de uma via dependente de Ras/Raf (Bhat & Zhang, 1996; Bhat et al., 2007). A partir da ativação dos RTK na superfície celular ocorre uma dimerização dos receptores, que permite a autofosforilação destes em resíduos de tirosina, servindo como sítio de ancoragem para proteínas de alta afinidade, como as proteínas adaptadoras SH2 (proteína de domínio SH2). Ocorre então a ativação da Ras, através da troca de um GDP por um GTP. A ativação da Ras na membrana promove o recrutamento da Raf-1 para a membrana plasmática e sua subsequente ativação. A Raf-1 é a primeira cinase na via de sinalização intracelular que vai fosforilar e ativar a MEK1 (que é uma MAPK cinase ou MAPKK) e MEK2, as quais, em seguida, ativam as ERKs (ERK1 e 2). A ERK ativada promove fosforilação de seus alvos, tanto no núcleo, ativando a transcrição gênica de várias proteínas, quanto no citoplasma (Juliano et al., 2004; Rang et al., 2007).

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).

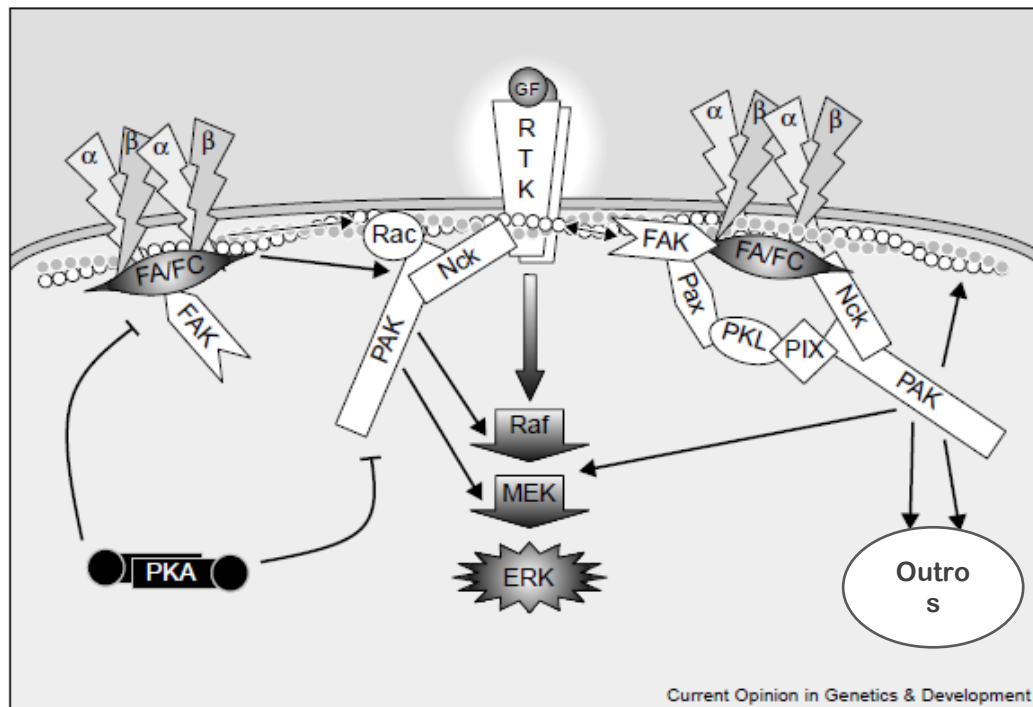
A ativação da ERK também pode ocorrer por um mecanismo alternativo que se dá por sinais de adesão. Neste caso, a ativação das MAPK pelas integrinas requer a autofosforilação da FAK, culminando na ativação da Ras, e consequentemente, da ERK (Pullikuth & Catling, 2007). Esta ativação depende de outras cinases como a cinase ativada pela p21 (PAK) e a PKA, como importantes reguladores desta cascata (Howe et al., 2002; Juliano et al., 2004). Estas proteínas participam na regulação do citoesqueleto de actina. Tem sido demonstrado, por exemplo, que a PAK pode ser importante para a formação de adesões estáveis nas extremidades celulares (Parsons et al., 2000) e sua atividade pode ser regulada pela Rac, da família das Rho-GTPase e pela proteína Nck, que é uma proteína adaptadora de SH2/SH3 (Bagrodia & Cerione, 1999; Li & She, 2000). Em células não aderentes, a atividade da Rac na membrana diminui, atenuando sua capacidade de se ligar à PAK (Howe et al., 2002). A PAK pode modular a ativação da ERK, dependente de adesão, através da fosforilação direta de cinases que fazem a regulação acima (*upstream*) da ERK, como a Raf e a MEK. Por outro lado, a PAK também pode contribuir para a ativação da ERK através da regulação do citoesqueleto de actina cortical, uma vez que este evento é necessário para uma ativação eficiente da ERK pelos fatores de crescimento. As vias ou efeitos dependentes da FAK e da PAK se convergem, uma vez que a FAK interage diretamente com a paxilina, a qual interage indiretamente com a PAK, via a cinase ligadora de paxilina (PKL) e pelo fator de troca de interação com a PAK (PIX). Além disso, muitos aspectos da atividade da FAK e da PAK, assim como a integridade do citoesqueleto de actina, podem ser regulados pela PKA (Aplin & Juliano, 1999; Howe et al., 2002) (Figura 4).

A ativação da ERK dependente de adesão é notavelmente mais fraca, porém estável quando comparada com a ativação robusta e transitória da ERK observada com a ativação de fatores de crescimento. Esta ativação estável reflete-se, aparentemente, na formação de múltiplas adesões durante o processo de espalhamento celular que é tempo-dependente (Zhu & Assoian, 1995). Em alguns tipos celulares, a inibição da MEK bloqueia o espalhamento celular e a migração, mas não a adesão celular, confirmando a importância da ERK na



formação de novos contatos célula-substrato durante o espalhamento celular (Cheresh et al., 1999; Fincham et al., 2000).

A via da ERK quando ativada por receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Gharami & Das, 2000; Gharami & Das, 2004) ou pelo hormônio tireoideano (Ghosh et al., 2005), também está relacionada com a transformação de astrócitos poligonais em astrócitos com prolongamentos. Além disso, em neurônios, esta via também está relacionada com a iniciação e crescimento de dendritos (Naska et al., 2006). Em células da linhagem PC12, a fosforilação da ERK pode estar relacionada com o citoesqueleto de actina e com a morfologia celular (Mi et al., 2006).



**Figura 4 - Mecanismos de ativação da ERK dependente da adesão celular.** A figura descreve os papéis da PKA, FAK e PAK regulando a via da ERK através da ativação dos RTK por fatores de crescimento (GF). A habilidade da FAK de se “encaixar” entre as adesões focais/complexos focais (FA/FC) e ativar os RTK, pode ser importante para seu papel na regulação da ativação da ERK dependente de adesão. A adesão celular pode modular também a atividade da PAK através do recrutamento de Rac ativas na membrana, e pelas interações PAK-Nck – um efeito que pode envolver FAK e elementos do citoesqueleto de actina cortical (monstrado na parte

inferior da membrana). (Pax – paxilina; PKL - cinase ligadora de paxilina; PIX - fator de troca de interação com a PAK). Modificada de Howe et al., 2002.

## **2 OBJETIVOS**

Neste trabalho tivemos como objetivos:

- 1) Avaliar o papel da via da MAPK/ERK sobre a diferenciação morfológica e antigênica da oligodendroglia, utilizando marcadores estágio-específicos, através da inibição da MEK pelos inibidores PD098059 ou U0126.
- 2) Estudo do papel da via da MAPK/ERK sobre a distribuição da CNPase e sua relação com o citoesqueleto e com a proteína de adesão celular FAK.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 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  $(25 \pm 1^\circ\text{C})$ . Todos os estudos com animais foram realizados de acordo com os princípios e procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética para uso de animais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

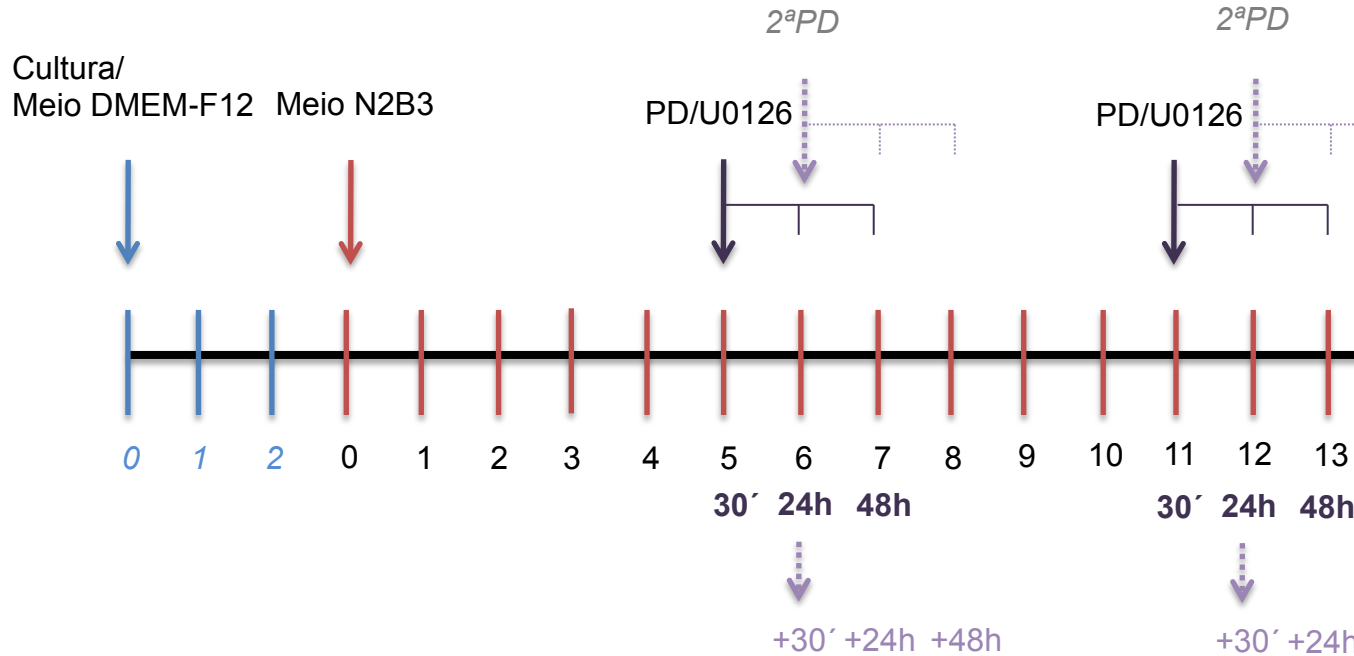
#### 3.2 Cultura primária de oligodendrócitos

Foram usados ratos Wistar, fêmeas, neonatos com no máximo 3 dias de vida pós-natal. Os animais foram decapitados e suas cabeças cortadas e levadas ao fluxo laminar. Os hemisférios cerebrais foram removidos e as meninges completamente retiradas. 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 decantação, foram retirados os três sobrenadantes e colocados em outro tubo Falcon. O conteúdo foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado, e o precipitado (rico em células) foi 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 (400 $\mu\text{l}$  / 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  $\mu\text{g/mL}$ ); biotina (10 ng/mL); putrescina (100  $\mu\text{M}$ ); insulina (5  $\mu\text{g/mL}$ ); glutamina (2 mM);

Triiodotironina (T3) (30 nM); bicarbonato de sódio (1,2 mg/mL) e soro fetal bovino (concentração final de 0,5%).

### 3.3 Avaliação da via de sinalização da MAPK/ERK

Para a avaliação da via da MAPK/ERK foram utilizados os inibidores da MEK, o PD098059 - PD - [10  $\mu$ M] (Calbiochem) ou o U0126 -U0- [1  $\mu$ M] (Cell Signaling) diluídos em dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma). Com 5 ou 11 dias em meio definido, as células foram tratadas com os inibidores por 30 minutos, 24 horas ou 48 horas. Como controle do veículo, células cultivadas foram expostas ao DMSO na mesma concentração pelos mesmos períodos. Em alguns experimentos, 24 horas após a administração do PD, o meio foi trocado e foi feita uma nova adição deste inibidor. As lamínulas foram fixadas com 30 minutos, 24 horas ou 48 horas da segunda dose (ver esquema na figura 5).



**Figura 5:** Esquema representativo do tratamento das culturas com os inibidores/ativadores utilizados. Os dias (div – dias *in vitro*) foram recontados a partir da

adição do meio definido para oligodendrócitos (meio N2B3 – seta vermelha). Na parte superior, estão indicados os tratamentos e na parte inferior os tempos de tratamento.

### 3.4 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% (para proteínas intracelulares somente, e no caso da FAK, foi feita somente uma lavagem com PBS-Triton 0,2% por 5 minutos). Foi realizado bloqueio para reações inespecíficas com PBS-BSA 5% por 30 minutos 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 secundários, por 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente. Para reações utilizando a técnica da biotina-avidina, seguiu-se com a incubação com a extravidina conjugada ao fluorocromo por 30 minutos a temperatura ambiente, após a incubação com o anticorpo secundário biotilado. Seguiu-se com lavagens com PBS, contra-coloração com o marcador de núcleo DAPI (Sigma – 0,02 mg/mL), lavagens com água destilada e montagem das lâminas com N-propil-galato.

#### 3.4.1 Anticorpos

##### **Anticorpos Primários**

<i>Anticorpo anti-</i>	<i>Marca</i>	<i>Isotipo</i>	<i>Origem</i>	<i>Diluição</i>
A2B5	Chemicon	Monoclonal IgM	camundongo	1:100
NG2	Chemicon	Policlonal IgG	coelho	1:150
CNPase	Sigma	Monoclonal IgG	camundongo	1:100
MBP	Serotec	Monoclonal IgG	camundongo	1:100
Tubulina total	Sigma	Policlonal IgG	coelho	1:100
Actina total	Sigma	Policlonal IgG	coelho	1:25
FAK	Santa Cruz	Policlonal IgG	coelho	1:150

### Anticorpos Secundários

<i>Anticorpo anti-</i>	<i>Conjugado a</i>	<i>Marca</i>	<i>Origem</i>	<i>Diluição</i>
IgG de coelho	Alexa 488	M.Probes	cabra	1:400
IgG de camundongo	CY3	Caltag	cabra	1:100
IgM camundongo	biotina	Caltag		1:100
Para revelação de anticorpos biotinizados				
Extravidina	Alexa 488	M.Probes		1:400
Extravidina	CY3	Zymed		1:200

**Tabela1: Anticorpos utilizados para a técnica de imunocitoquímica.** Nos anticorpos secundários: Em verde, Alexa 488 – fluorocromo emitido em verde; Em vermelho, CY3 - fluorocromo emitido em vermelho.

### 3.5 Análise e aquisição de imagens

As análises foram feitas a partir de imagens obtidas com o microscópio de epifluorescência Olympus BX40, acoplado a câmera de vídeo digital (Olympus DP71). Após a aquisição as imagens foram devidamente trabalhadas no Programa Adobe Photoshop.

### 3.6 Quantificação

A morfologia da oligodendroglia foi distinguida pela imunocitoquímica com marcadores oligodendrogliais estágio-específicos (NG2, CNPase e MBP), e classificada em diferentes estágios de maturação. Em ambas as culturas, controle (C) e tratadas (PD), as células foram contadas em imagens capturadas de dez campos distribuídos aleatoriamente em

cada lamínula. Diferentes estágios de maturação oligodendroglial (FENÓTIPOS) foram quantificados de acordo com as definições utilizadas em Baumann & Pham-Dinh (2001), representadas no esquema da Figura 2: células precursoras (P: células redondas com um prolongamento pequeno); progenitores de oligodendrócitos (OPC: dois prolongamentos); pré-oligodendrócitos (PO: com três a cinco prolongamentos); oligodendrócitos imaturos (IO: com mais de cinco prolongamentos sem véus de membrana); oligodendrócitos maduros (M: multiramificados com véus de membrana). Uma classificação adicional foi incluída (NC: não classificadas) devido à presença de células redondas e sem prolongamentos, particularmente presentes nas culturas tratadas, as quais não podiam ser classificadas pela morfologia em nenhum dos estágios mencionados acima.

### 3.7 Análise estatística

**NG2:** Dados relacionados ao número de células imunoreativas a NG2 em dez culturas (5 C e 5 PD) foram submetidos à medida de análise de variância de repetição global (ANOVA<sub>r</sub>). *TRATAMENTO* (C ou PD) foi considerado como fator de repetição. *TEMPO* (30 minutos, 24 horas ou 48 horas) e *FENÓTIPO* (P, OPC, PO ou IO) foram considerados como fatores da ANOVA<sub>r</sub>. Ao contrário do que foi observado nas culturas marcadas com os anticorpos anti-CNPase e anti-MBP, o anticorpo anti-NG2 consegue identificar células precursoras (P), porém não identifica células maduras (M) ou células não classificadas (NC).

**CNPase:** Dados relacionados ao número de células imunoreativas a CNPase em dez culturas (5 C e 5 PD) foram submetidas à ANOVA<sub>r</sub>. *TRATAMENTO* (C ou PD) foi considerado como fator de repetição. *TEMPO* (30 minutos, 24 horas ou 48 horas) e *FENÓTIPO* (OPC, PO, IO, M ou NC) foram considerados como fatores da ANOVA<sub>r</sub>.

**MBP:** Dados relacionados ao número de células imunoreativas a MBP em seis culturas (3 C e 3 PD) foram submetidos à ANOVA<sub>r</sub>. *TRATAMENTO* (C ou PD) foi considerado como fator de repetição. *TEMPO* (30 minutos, 24 horas ou 48 horas) e *FENÓTIPO* (OPC, PO, IO, M ou NC) foram considerados como fatores da ANOVA<sub>r</sub>.

**DAPI:** Dados relacionados ao número de células coradas com o marcador núcleo DAPI em dez culturas (5 C e 5 PD) foram submetidos à ANOVA<sub>r</sub>. *TRATAMENTO* (C ou PD) foi considerado como fator de repetição e *TEMPO* (30 minutos, 24 horas ou 48 horas) foi considerado como fator da ANOVA<sub>r</sub>.

**Aspectos globais dos dados analisados:** Os dados foram reunidos em médias e erro padrão. Para simplificar, os resultados foram reportados nas médias univariadas de testes F. A abordagem univariada é considerada mais potente do que os critérios multivariados (Huynh & Feldt, 1976). A hipótese de esfericidade foi testada pelo teste de Mauchly. A esfericidade assume igualdade de variâncias para todos os pares das medidas realizadas com repetição. Na situação de rejeição de esfericidade pode-se ainda, optar por corrigir o número de graus de liberdade da análise univariada através do parâmetro  $\epsilon$  (Huynh & Feldt, 1976). As ANOVAs de menor ordem foram feitas nos subgrupos apropriados. Testes -t protegidos foram usados para as análises de pós-hoc pelo Teste de Fisher (Fisher's Least Significant Difference – FPLSD). Efeitos foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (duas-caudas). Para interações com  $p < 0,10$ , também foram examinados se os efeitos principais de menor ordem fossem detectáveis após subdivisão de variáveis com interação (Snedecor & Cochran, 1967).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Morfologia celular

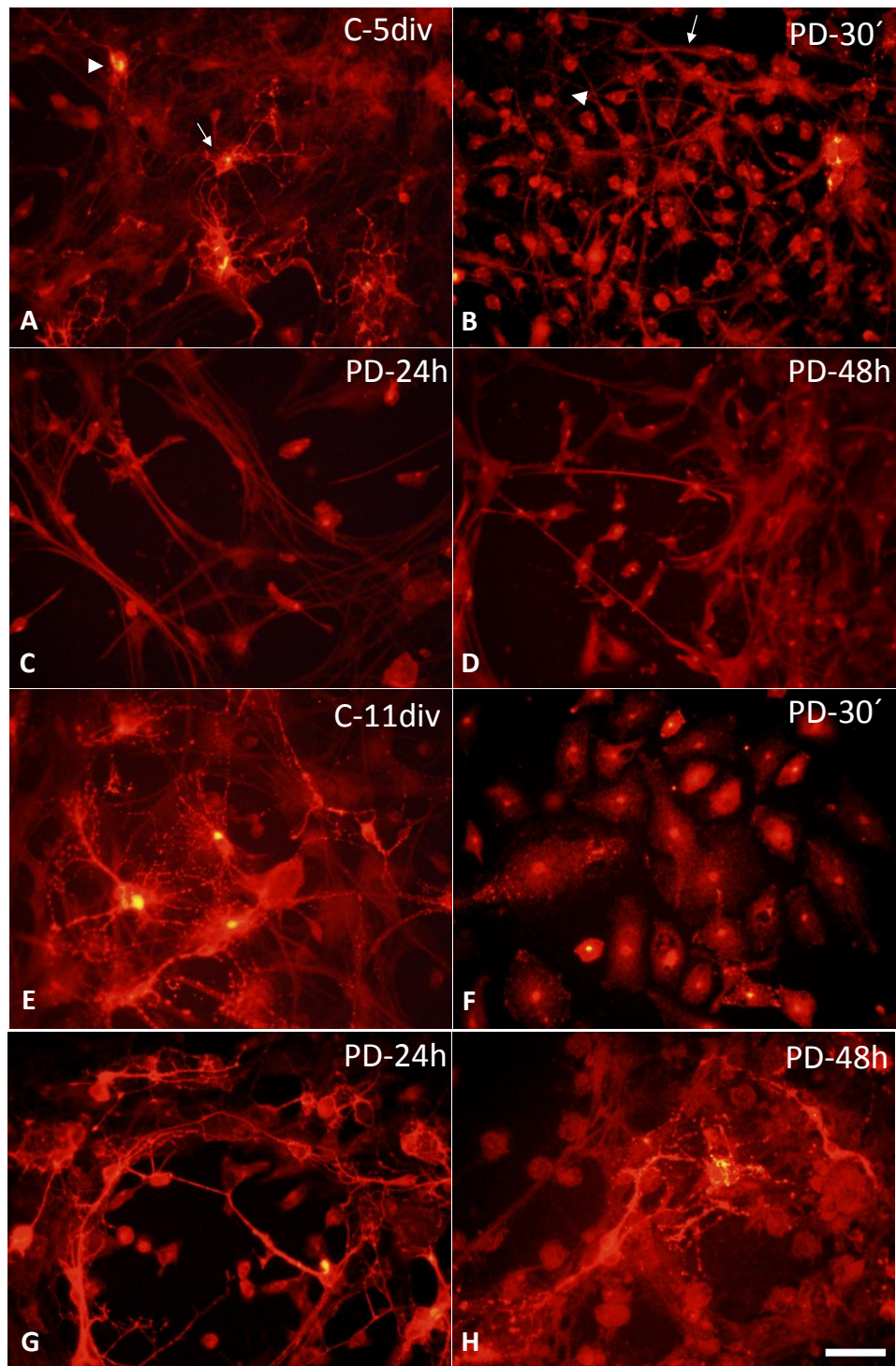
Aos 5div, culturas controle marcadas pelo anticorpo anti-CNPase exibiram células em todos os estágios de maturação, incluindo progenitores (OPC), oligodendrócitos imaturos (cabeça de seta na Figura 6A) e oligodendrócitos maduros com véus de membrana (seta na Figura 6A). Após 30min na presença do inibidor PD098059, foram observadas poucas células M. Além disso, o anticorpo anti-CNPase marcou um grupo de células redondas, as quais não puderam ser classificadas em nenhum dos estágios de maturação da linhagem oligodendroglial (NC – cabeças de seta na Figura 6B). Com 24h, os progenitores (OPC), caracterizados pela morfologia bipolar, eram o tipo celular predominante (Figura 6C). Com 48h, células em todos os estágios de maturação eram presentes, incluindo as células M (Figura 6D), sugerindo que o efeito na morfologia não era permanente.

Aos 11 dias nas culturas controle, oligodendrócitos maduros, com véus de membrana extensos, eram o tipo celular predominante. Foram observadas poucas células em estágios de maturação mais precoces (Figura 6E). Embora o tratamento tenha sido feito em um estágio mais avançado de desenvolvimento, a morfologia celular foi afetada de forma semelhante ao observado nas culturas de 5 div. Com 30min, um número considerável de células redondas (NC) marcadas com o anticorpo anti-CNPase estava presente. Além disso, os véus de membrana das células M nas culturas PD eram menos extensos e mais difíceis de serem observados quando comparadas às culturas controle (Figura 6F). Com 24h e 48h, várias células OPC e PO foram observadas (Figuras 6G e 6H). Células NC também estavam presentes 24 e 48 horas após a adição do PD embora, aparentemente, em menor número.

Também avaliamos se a oligodendroglia era afetada por um tratamento adicional com o inibidor PD98059 24 horas após o primeiro tratamento, um período em que a maioria das células apresentava morfologia bipolar, o que indicava que as células não estavam respondendo à concentração presente do inibidor neste tempo. Observamos que, 30 minutos após a segunda adição de 10  $\mu$ M de PD98059, a maioria das células apresentou novamente uma morfologia arredondada, sem prolongamentos (NC), em ambas as culturas tratadas, com 5 e 11div (Figuras 7C e 7D – observar as figuras de contraste de fase inseridas nas respectivas imagens de fluorescência). 24 horas após a segunda adição do PD, a maioria das células

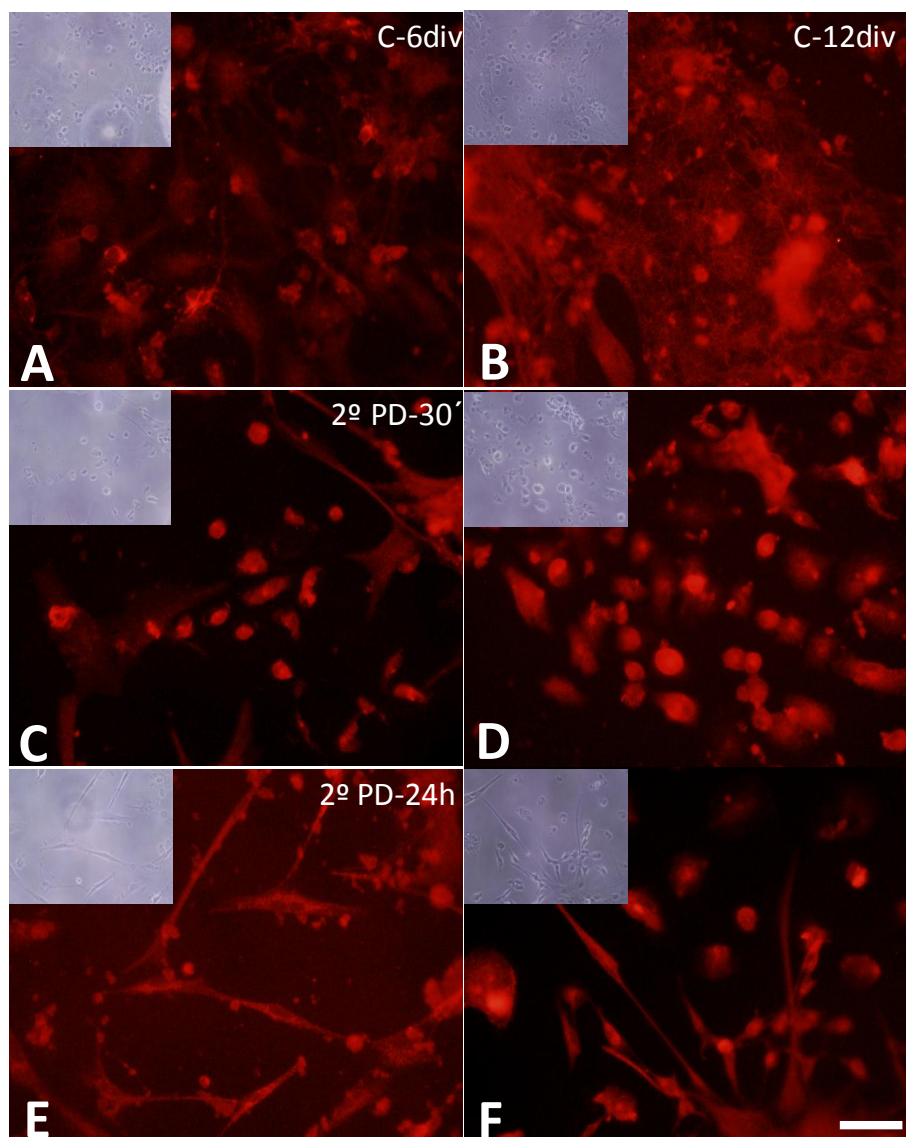
apresentou morfologia bipolar, reproduzindo o padrão observado com a primeira adição do inibidor por 24 horas (Figuras 7E e 7F).

Foi testado também outro inibidor da MEK, o U0126, pois é considerado mais específico e mais potente do que o PD98059 (Learish et al., 2000). Culturas controle de 5div e de 11div apresentaram células em diversos estágios de maturação, incluindo diversas células maduras (Figuras 8A e 8B, respectivamente - observar as figuras de contraste de fase inseridas nas respectivas imagens de fluorescência). Culturas tratadas com o U0126 – U0 (1  $\mu$ M) por 30min apresentaram células redondas CNPase+, tanto aos 5div (Figura 8C) como aos 11div (Figura 8D – observar as figuras de contraste de fase), semelhante ao observado com o mesmo tempo de tratamento com o PD98059.



**Figura 6 - Oligodendroglia imunoreagida aos 5div (A-D) e aos 11div (E-H) com o anticorpo anti-CNPase.** A/E – culturas controle; culturas tratadas com PD98059 por 30min (B/F), 24h (C/G) ou 48h (D/H). Em A, aos 5div, notar a presença de células multiramificadas, (*continuação*) como oligodendrócitos imaturos (cabeça de seta), e oligodendrócitos maduros com véus de membrana (seta), indicando um estágio avançado de diferenciação. Com 30min, as culturas mostraram células em estágios imaturos de diferenciação como progenitores (seta), e várias células arredondadas NC (cabeça de seta em B). Com 24h, a maioria das células tinha

morfologia bipolar, o que corresponde ao fenótipo de OPC (C). Com 48 horas, observamos células com fenótipos diversos, incluindo células IO e M (D). Em E, em um estágio mais avançado de diferenciação *in vitro*, as culturas controle exibem células maduras com prolongamentos e véus de membrana bem extensos. As culturas tratadas aos 11div seguiram um padrão semelhante ao observado aos 5div (comparar os tempos de tratamento de 5 e 11div 30min (B e F); 24h (C e G); 48 (D e H). Observar que as células NC também estão presentes em todos os tempos de tratamento. Barra de calibração: 50  $\mu$ m.



**Figura 7 - Efeitos de um segundo tratamento com PD98059.** Oligodendroglia imunoreagida com o anticorpo anti-CNPase, com as imagens de contraste de fase inseridas no canto superior de cada imagem de fluorescência. Coluna esquerda – 6-7div; coluna direita-

12-13div. A/B, culturas controle. Culturas tratadas com PD (10  $\mu$ M) aos 5div, com uma segunda adição do inibidor aos 6div (24horas após a primeira administração de PD) e fixadas com 30min (C/D) e com 24 horas (E/F) após o segundo tratamento. Notar que com 30min (C/D), as culturas apresentaram células com morfologia predominantemente arredondadas - NC (também mostrado na figura com contraste de fase), padrão semelhante às culturas tratadas com somente uma administração de PD com 30min (comparar com as fig.6B e 6F). Com 24 horas após a segunda administração do PD (E/F), as culturas apresentaram predominantemente células com morfologia bipolar, semelhante ao padrão observado nas (*continuação*) culturas tratadas com uma administração do PD com 24 horas (comparar com as fig. 6C e 6G). Barra de calibração: 50  $\mu$ m.

As culturas tratadas por 24 horas com o inibidor U0126 apresentaram várias células com morfologia bipolar tanto com 5div (Figura 8E) quanto com 11div (Figura 8F - observar as figuras de contraste de fase), novamente, semelhante ao tratamento com o PD. Com 48 horas de tratamento, as culturas apresentaram células em vários estágios de maturação, principalmente células imaturas. Ainda com este tempo de tratamento foram observadas várias células NC, tanto aos 5div (Figura 8G) como aos 11div (Figura 8H).

#### 4.1.1 Caracterização das células NC: expressão de marcadores

A fim de analisar se a distribuição da CNPase para os prolongamentos foi alterada nas células NC, foi feita a imunomarcação com o anticorpo anti-actina. As células NC CNPase<sup>+</sup>, tratadas com o PD por 30min aos 5div (Figura 9A) realmente não possuíam prolongamentos, como evidenciado pela imunomarcação para actina (Figura 9B).

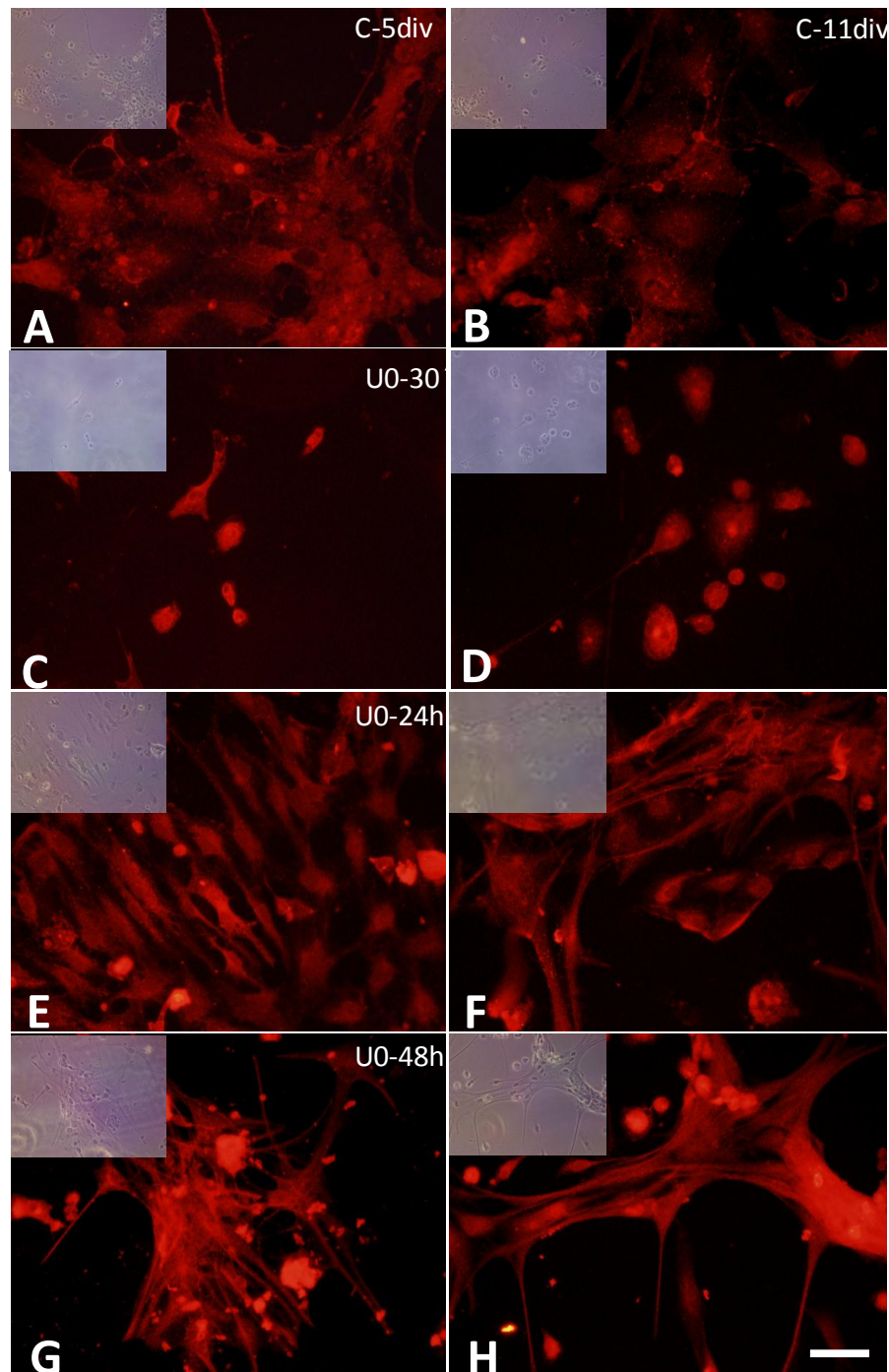
Foram utilizados marcadores estágio-específicos de diferenciação da oligodendroglia com o objetivo de classificar as células NC, uma vez que a proteína CNPase é expressa em diversos estágios, desde progenitores até em oligodendrócitos maduros. Células das culturas PD ou U0 tratadas por 30min em diferentes estágio de desenvolvimento (5div e 11div) foram imunoreagidas com os anticorpos contra marcadores de oligodendroglia imatura e precursores/progenitores 02A: anti-NG2 e A2B5, e com anticorpos que evidenciam oligodendroglia madura: anti-CNPase e anti-MBP.

Nas culturas tratadas com PD, as células NC CNPase<sup>+</sup> (Figuras 9C – 5div, 9E - 11div) não eram NG2<sup>+</sup> (Figuras 9D-5div, 9F-11div). Além disso, estas células não foram marcadas com o anticorpo A2B5 (Figuras 9H -5div, 9J-11div). No entanto, as células NC foram facilmente identificadas pelo anticorpo anti-MBP (Figuras 9G-5div, 9I-11div).

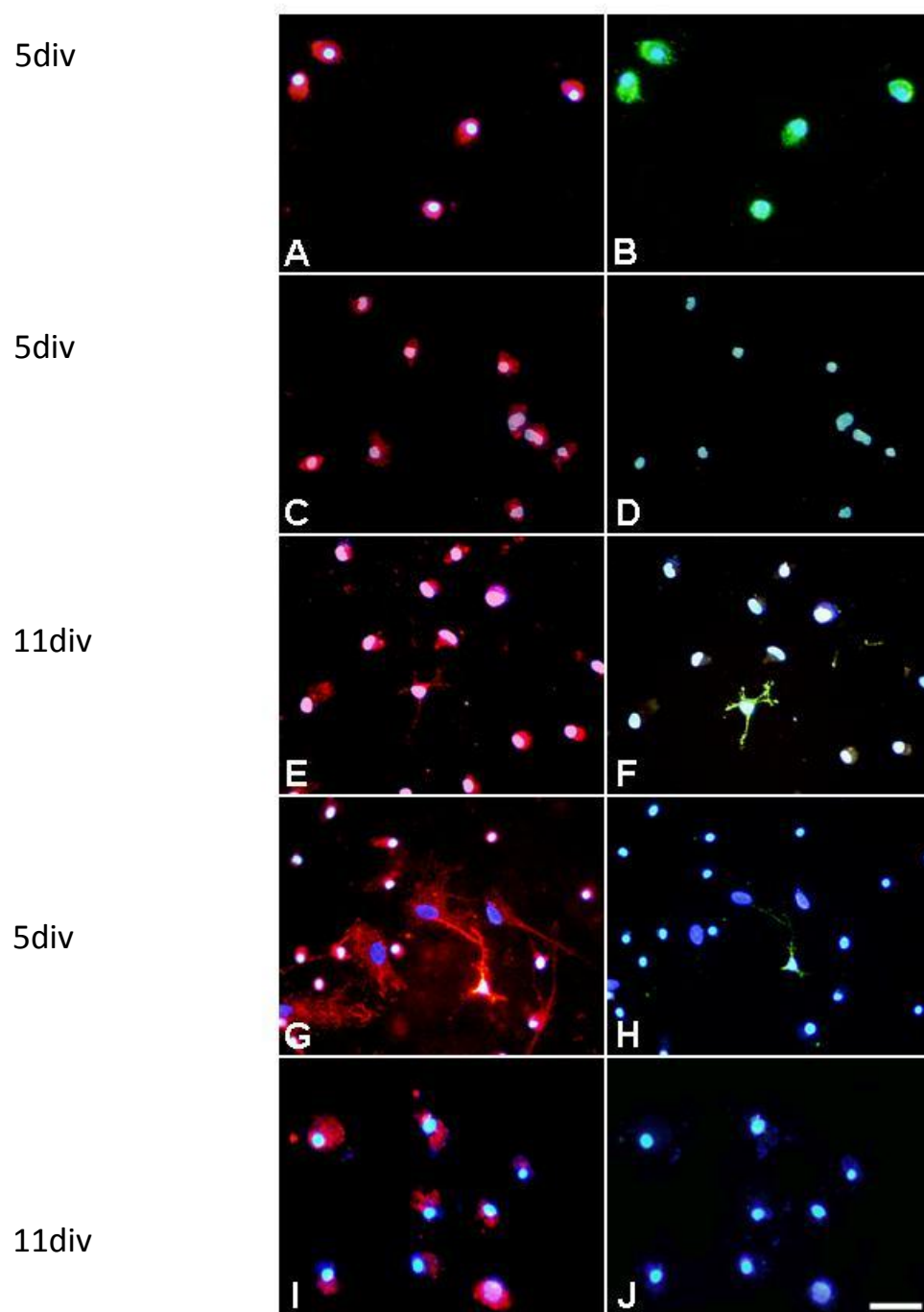
Nas culturas tratadas com o U0126, observamos o mesmo resultado, em que as células CNPase<sup>+</sup> não eram NG2<sup>+</sup> como também não foram marcadas com o anticorpo A2B5, sendo MBP<sup>+</sup> (dados não mostrados).

Estes resultados demonstraram que as células redondas não são oligodendroglia imatura, mas sugerem, sim, que são células maduras que não foram capazes de estender e/ou manter os prolongamentos na presença dos inibidores da MEK, uma vez que estas células eram NG2<sup>-</sup>/A2B5<sup>-</sup> e CNPase<sup>+</sup>/MBP<sup>+</sup>.





**Figura 8 - Efeitos do tratamento com U0126.** Oligodendroglia imunoreagida com o anticorpo anti-CNPase, com as imagens de contraste de fase inseridas no canto superior de cada imagem de fluorescência. Coluna esquerda – 5-7div; coluna direita- 11-13div. A/B, culturas controle. Culturas tratadas com U0126 (U0 – 1  $\mu$ M) por 30min (C/D), 24horas (E/F) e 48horas (G/H). Notar que as células das culturas tratadas com U0126 seguem o padrão das (*continuação*) células tratadas com PD98059 nos mesmos tempos, com morfologia predominantemente arredondada com 30min, bipolar com 24 horas e em diversos estágios de diferenciação com 48 horas (comparar com a Figura 6). Barra de calibração: 50  $\mu$ m.



**Figura 9 - Caracterização das células NC.** Células das culturas tratadas por 30min aos 5div(A/B, C/D, G/H) ou aos 11div (E/F, I/J), com PD98059 (10  $\mu$ M) imunorreagidas com marcadores estágio específico de oligodendroglia ou com actina e com os núcleos contra-corados com DAPI. As células CNPase+ (A) possuem morfologia arredondada confirmada (*continuação*) aqui pela marcação com o anticorpo anti-actina (B). As células NC foram todas marcadas com o anticorpo anti-CNPase (C/E), porém o anticorpo anti-NG2 (D/F) não marcou as células NC, mas marca células em estágio imaturo, como observado em F. As células NC



também foram marcadas com o anticorpo anti-MBP (G/I), porém não foram marcadas com o anticorpo A2B5 (H/J), que também só marcou células em estágio imaturo, como observado em H. Barra de calibração: 50  $\mu$ m.

## 4.2 Análise estatística

### 4.2.1 Células NG2<sup>+</sup>: de 5 a 7 div

A ANOVA global de repetição indicou um efeito significativo de *FENÓTIPO* (F= 11,7, d.f. = 1,4, p = 0,003) e uma interação significativa *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO* (F = 3,4, d.f. = 1,4, p = 0,08) (Figura 10A e Tabela 2). Com relação ao efeito, análises pós-hoc indicaram a seguinte classificação por número de células por fenótipo: P<OPC<PO=IO [FPLSD: < indicando comparações por pares significativos (p < 0,05)]. Considerando a interação *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO*, foram feitas duas análises pós-hoc separadas:

1) com o objetivo de analisar se existia alguma diferença entre os grupos com relação ao número de células de cada fenótipo, foi feita uma ANOVA multivariada (ANOVAm) usando *TRATAMENTO* como fator de repetição.

2) com o objetivo de determinar se diferentes subtipos existem em cada grupo, foram feitas ANOVAr de ordem inferior para cada grupo (C e PD) usando *FENÓTIPO* como fator de repetição. A ANOVAm não indicou diferenças significativas entre os fenótipos dos diferentes grupos. No entanto, a ANOVAr indicou um efeito significativo de *FENÓTIPO* somente no grupo controle (F = 16,4, d.f. = 3, p < 0,001), resultando, em termos de número de células por fenótipo, a seguinte ordem de classificação: P<OPC<PO=IO (FPLSD). Este padrão de resultados indicou que enquanto o número de células por fenótipo aumentou constantemente em direção às morfologias mais maduras (IO) no grupo controle, o mesmo não aconteceu no grupo PD.

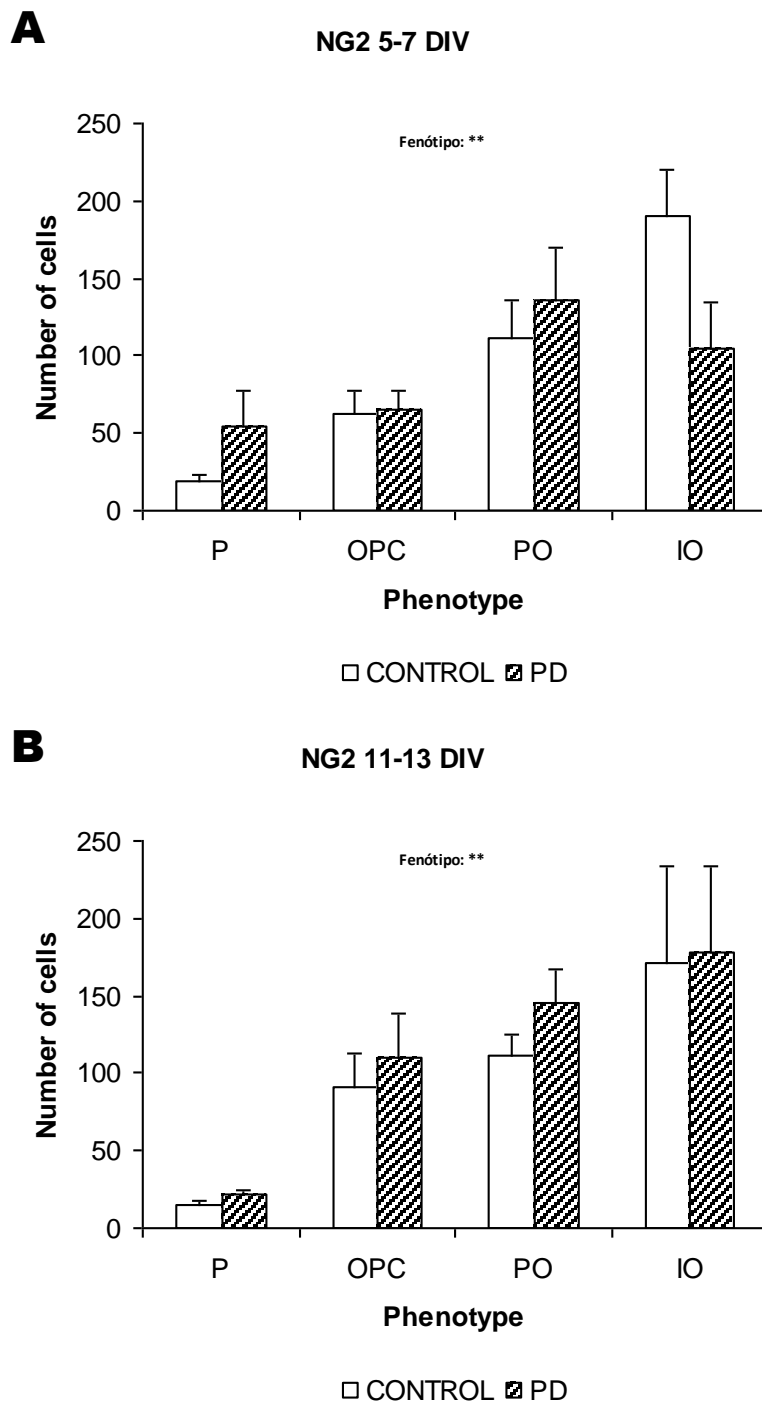
### 4.2.2 Células NG2<sup>+</sup>: de 11 a 13 div

A ANOVA global de repetição indicou um efeito significativo de *FENÓTIPO* ( $F= 7,0$ , d.f. = 1,3,  $p = 0,02$ ) (Figura 10B e Tabela 2). Análises pós-hoc indicaram a seguinte classificação por número de células por fenótipo:  $P < OPC = PO = IO$  (FPLSD). Estes resultados indicaram que o tratamento não exerceu efeito nos perfis de distribuição dos fenótipos celulares, como indicado de 5 a 7 div, porém apresentam tendência a um número maior de células com fenótipos correspondentes a morfologia mais maduras (PO, IO).

Tabela 2. Número de células por fenótipo nas culturas controle e tratadas com PD098059.

Imunocitoquímica	DIV	Fenótipo																
		P		OPC		PO		IO		M		NC						
		Grupo	30 min	24 h	48 h	30 min	24 h	48 h	30 min	24 h	48 h	30 min	24 h	48 h				
NG2	5-7	C	7.4	6.2	5.4	20.8	16.4	35.2	30.2	72.4	71.2	47.2	---	---	---	---	---	
			(±0.8)	(±1.5)	(±2.5)	(±8.9)	(±4.0)	(±3.8)	(±11.0)	(±8.3)	(±7.6)	(±21.4)	(±21.9)	(±14.6)	---	---	---	---
			18.8	18.6	17.0	22.4	23.8	49.4	39.4	47.0	39.0	34.0	31.0	---	---	---	---	---
11-13	C	4.2	5.2	5.8	32.8	30.0	28.2	29.8	32.2	49.6	49.8	64.4	56.6	---	---	---	---	
		(±0.9)	(±0.7)	(±1.2)	(±6.5)	(±9.4)	(±7.1)	(±2.5)	(±5.6)	(±8.3)	(±25.3)	(±27.5)	(±19.1)	---	---	---	---	
		7.0	7.8	6.4	22.4	46.4	40.6	36.6	40.8	67.6	53.2	65.8	58.6	---	---	---	---	
CNPase	5-7	C	95.0	75.0	86.8	67.2	61.4	54.8	85.8	101.8	75.2	155.2	172.2	156.2	5.8	5.6	30.6	
			(±8.9)	(±17.0)	(±13.6)	(±6.5)	(±16.0)	(±6.4)	(±10.9)	(±30.6)	(±5.9)	(±33.8)	(±56.9)	(±22.5)	(±1.9)	(±1.4)	(±23.9)	
			79.4	204.8	166.8	60.8	64.0	75.6	49.6	55.6	71.4	85.8	92.2	101.8	120.4	94.0	95.4	
11-13	C	59.4	68.2	68.6	33.8	48.0	51.4	64.4	76.2	93.8	312.8	327.6	378.2	5.0	3.4	3.8		
		(±11.4)	(±10.1)	(±20.9)	(±10.6)	(±11.0)	(±7.4)	(±21.8)	(±18.7)	(±10.1)	(±67.9)	(±59.6)	(±62.6)	(±0.9)	(±0.4)	(±0.5)		
		66.0	170.2	121.0	45.8	62.6	96.0	70.0	85.4	109.8	151.4	162.0	216.6	179.4	55.8	70.6		
MBP	5-7	C	6.3	7.0	5.7	4.3	6.0	3.7	10.7	16.3	5.7	95.7	147.3	143.0	2.3	2.3	1.7	
			(±1.5)	(±1.2)	(±0.7)	(±1.9)	(±2.0)	(±1.2)	(±2.7)	(±4.8)	(±0.9)	(±7.2)	(±45.7)	(±24.5)	(±0.3)	(±0.3)	(±0.3)	
			8.3	31.0	16.7	9.3	10.7	10.7	5.0	6.3	6.7	29.3	52.3	47.0	130.3	47.7	28.0	
11-13	C	16.3	12.0	15.0	8.3	4.0	9.3	23.0	8.3	18.7	250.0	290.0	391.0	3.0	3.0	2.7		
		(±5.8)	(±1.5)	(±2.1)	(±1.8)	(±0.6)	(±0.3)	(±8.5)	(±1.9)	(±4.4)	(±51.6)	(±56.3)	(±67.2)	(±0.6)	(±0.6)	(±0.3)		
		17.3	136.3	72.7	13.7	56.7	64.3	15.3	44.3	44.0	78.7	129.7	138.7	190.3	53.3	72.7		
11-13	C	4.3	3.3	50.9	35.2	3.8	13.3	9.6	9.2	18.4	18.9	47.5	32.0	27.3	45.8	7.2		
		(±3.3)	(±50.9)	(±35.2)	(±3.8)	(±13.3)	(±9.6)	(±9.2)	(±18.4)	(±18.9)	(±47.5)	(±32.0)	(±27.3)	(±45.8)	(±7.2)	(±13.1)		
		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		

DIV: Dias *in vitro*; P: precursor; OPC: progenitor de oligodendrócito; PO: pré-oligodendrócito; IO: oligodendrócito imaturo; M: oligodendrócito maduro; NC: células não classificadas.



**Figura 10 - Mudanças no número de células, agrupadas pelo fenótipo da oligodendroglia em culturas controle e culturas tratadas, indicadas pela expressão da NG2 e pela morfologia celular.** A) 5- 7div: o grupo controle apresentou um aumento no número de células por fenótipo em direção às morfologias mais maduras; B) 11-13div: não houve diferença entre os grupos com relação à distribuição do número de células por fenótipo. P: precursor; OPC: célula progenitora de oligodendrócitos; PO: pré-oligodendrócito; IO: oligodendrócito imaturo. \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.2.3 Células CNPase<sup>+</sup>: de 5 a 7 div

A ANOVA global de repetição indicou um efeito significativo de *FENÓTIPO* ( $F = 10,2$ , d.f. = 1,6,  $p = 0,003$ ) e uma interação significativa *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO* ( $F = 10,5$ , d.f. = 1,6,  $p = 0,003$ ) e uma interação significativa entre *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO*×*TEMPO* ( $F = 3,0$ , d.f. = 3,2,  $p = 0,04$ ) (Figura. 11A e Tabela 2). Com relação ao efeito, análises pós-hoc indicaram a seguinte classificação por número de células por fenótipo:  $NC=PO<IO<OPC=M$  (FPLSD). Considerando a interação *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO*, foi usado o mesmo procedimento descrito em NG2 5-7 div: 1) A ANOVAm indicou que o tratamento aumentou significativamente o número de OPC ( $F = 13,0$ , d.f. = 1,  $p = 0,007$ ) e células NC ( $F = 29,9$ , d.f. = 1,  $p = 0,001$ ). 2) A ANOVAr demonstrou que o número de células por fenótipo variou em cada grupo (PD:  $F = 6,7$ , d.f. = 4,  $p = 0,002$ . / C:  $F = 13,7$ , d.f. = 1,3,  $p = 0,01$ ) e que o grupo C teve uma ordem de classificação ( $NC<PO<OPC=IO=M$ , FPLSD) que é diferente da observada no grupo PD ( $IO=PO=M=NC=OPC$ , FPLSD). Este padrão de resultados indica que o número de células por fenótipo aumentou em direção às morfologias mais maduras no grupo C, sendo que este padrão não pode ser observado no grupo PD.

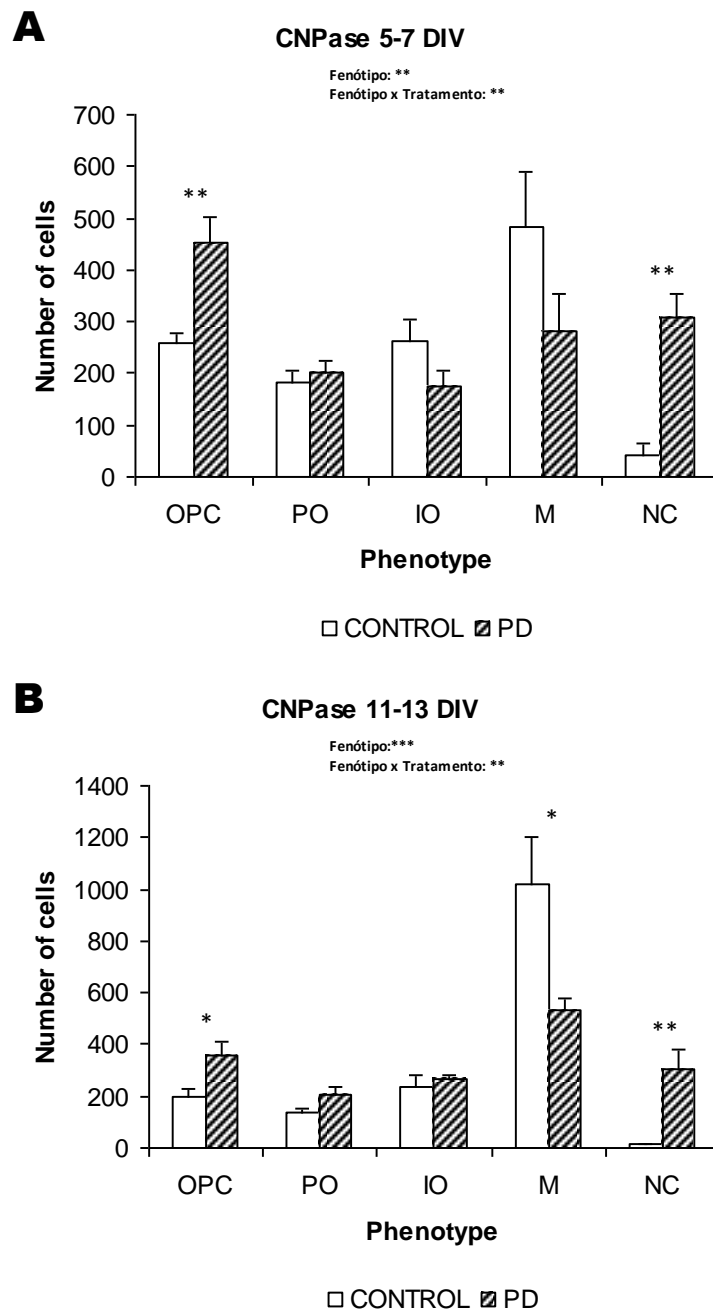
Para as interações *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO*×*TEMPO*, reagrupamos novamente em duas análises separadas: 1) analisando em cada tempo diferente, as ANOVAs de repetição de ordem inferior indicaram interações significativas de *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO* para os períodos de 30min ( $F = 11,4$ , d.f. = 2,2,  $p = 0,001$ ), 24h ( $F = 6,7$ , d.f. = 1,9,  $p = 0,009$ ) e 48h ( $F = 4,9$ , d.f. = 2,1,  $p = 0,02$ ); 2) Analisando cada grupo tratado separadamente, as ANOVAs de repetição de ordem inferior indicaram que enquanto uma interação significativa *FENÓTIPO*×*TEMPO* era observada no grupo PD ( $F = 4,0$ , d.f. = 2,4,  $p = 0,049$ ), nenhuma interação foi observada no grupo C. Este padrão de resultados indicou que os perfis de distribuição de fenótipos celulares do grupo C é significativamente diferente de todos os perfis observados em todos os tempos do grupo PD, indicou também que o grupo C apresentou um perfil relativamente estável em todos os tempos observados, enquanto o grupo PD mudou seu perfil desde o tempo inicial de tratamento (30min) até o último (48h). Esta mudança foi principalmente associada com um aumento no número de células OPC desde 30min até o tempo de 24h (FPLSD:  $p = 0,04$ ).

#### 4.2.4 Células CNPase<sup>+</sup>: de 11 a 13 div

A ANOVA global de repetição indicou um efeito significativo de *FENÓTIPO* ( $F = 39,6$ , d.f. = 1,5,  $p < 0,001$ ) e interações significativas entre *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO* ( $F = 13,5$ , d.f. = 1,5,  $p = 0,002$ ) e *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO*×*TEMPO* ( $F = 3,1$ , d.f. = 2,6,  $p = 0,058$ ) (Figura 11B e Tabela 2). Com relação ao efeito, análises de pós hoc indicaram a seguinte classificação de número de células por fenótipo: NC=PO<IO=OPC<M (FPLSD).

Considerando a interação *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO*: 1) A ANOVA m indicou que enquanto o tratamento aumentou significativamente o número de células OPC ( $F = 7,2$ , d.f. = 1,  $p = 0,03$ ) e NC ( $F = 16,7$ , d.f. = 1,  $p = 0,003$ ), também diminuiu o número de células M ( $F = 6,8$ , d.f. = 1,  $p = 0,03$ ). 2) As ANOVAs de repetição demonstraram que o número de células por fenótipo variou em cada grupo (PD:  $F = 11,6$ , d.f. = 1,6,  $p = 0,009$ . C:  $F = 30,3$ , d.f. = 1,0,  $p = 0,01$ ) e que o grupo C teve uma classificação de número de células por fenótipo (NC<PO<OPC=IO<M, FPLSD) que é diferente da observada no grupo PD (PO<IO=NC=OPC<M, FPLSD). Este padrão de resultados indicou que o número de células com morfologia mais madura era maior do que todas as outras, quase nenhuma célula NC foi identificada no grupo C, o que não era verdadeiro para o grupo PD.

Para as interações *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO*×*TEMPO*: 1) analisando cada tempo separadamente, as ANOVAs de repetição de ordem inferior indicaram interações *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO* para os períodos de 30min ( $F = 9,6$ , d.f. = 1,7,  $p = 0,003$ ), 24h ( $F = 12,3$ , d.f. = 1,9,  $p = 0,001$ ) e 48h ( $F = 8,2$ , d.f. = 1,7,  $p = 0,006$ ); 2) analisando cada grupo separadamente, as ANOVAs de repetição de ordem inferior indicaram que enquanto uma interação *FENÓTIPO*×*TEMPO* existia para o grupo PD ( $F = 5,4$ , d.f. = 1,9,  $p = 0,04$ ), nenhuma interação foi observada no grupo C. Este padrão de resultados indicou que os perfis de distribuição de fenótipos celulares do grupo C eram significativamente diferentes dos perfis do grupo PD em todos os tempos, também indicou que o grupo C apresentou um perfil estável em todos os tempos, enquanto o grupo PD mudou seu perfil desde o tempo inicial de tratamento (30min) até o último (48h). Esta mudança foi principalmente associada com um aumento no número de células PO desde 30min até o tempo de 48h (FPLSD:  $p = 0,04$ ).



**Figura 11 - Mudanças no número de células, agrupadas pelo fenótipo da oligodendroglia em culturas controle e culturas tratadas, indicadas pela expressão da CNPase e pela morfologia celular.** 5 -7div: o grupo PD apresentou um aumento no número de células com fenótipo NC e bipolar (OPC); 11-13div: o grupo C era caracterizado por um grande número de células com morfologia madura, enquanto o grupo PD apresentou um maior número de células com morfologia de progenitor e de células NC em relação ao grupo C. OPC: célula progenitora de oligodendrócitos; PO: pré-oligodendrócito; IO: oligodendrócito imaturo; M: oligodendrócito maduro; NC: células não classificadas. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.2.5 Células MBP<sup>+</sup>: de 5 a 7 div

A ANOVA global de repetição indicou um efeito significativo de *FENÓTIPO* ( $F = 19,3$ , d.f. = 4,  $p < 0,001$ ) e interações significativas entre *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO* ( $F = 13,1$ , d.f. = 4,  $p < 0,001$ ) (Figura 12A e Tabela 2). Com relação ao efeito, análises de pós hoc indicaram a seguinte classificação de número de células por fenótipo: OPC=PO=IO=NC<M (FPLSD).

Considerando a interação *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO*: 1) A ANOVAm indicou que enquanto o tratamento aumentou significativamente o número de células OPC ( $F = 8,3$ , d.f. = 1,  $p = 0,04$ ) e NC ( $F = 12,2$ , d.f. = 1,  $p = 0,02$ ), também diminuiu o número de células M ( $F = 8,7$ , d.f. = 1,  $p = 0,04$ ). 2) As ANOVAs de repetição demonstraram que o número de células por fenótipo variou somente no grupo C ( $F = 22,7$ , d.f. = 1,0,  $p = 0,04$ ) com a seguinte classificação de número de células por fenótipo NC<PO=OPC=IO<M (FPLSD). Este padrão de resultados indicou que o número de células por fenótipo era maior com relação às células com fenótipo mais maduro no grupo controle, o que não era verdadeiro para o grupo PD.

#### 4.2.6 Células MBP<sup>+</sup>: de 11 a 13 div

A ANOVA global de repetição indicou um efeito significativo de *FENÓTIPO* ( $F = 32,8$ , d.f. = 1,2,  $p = 0,002$ ) e interações significativas entre *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO* ( $F = 17,5$ , d.f. = 1,2,  $p = 0,008$ ) e *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO*×*TEMPO* ( $F = 5,3$ , d.f. = 2,1,  $p = 0,03$ ) (Figura 12B e Tabela 2). Com relação ao efeito, análises de pós hoc indicaram a seguinte classificação de número de células por fenótipo: IO=PO=OPC=NC<M (FPLSD).

Considerando a interação *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO*: 1) A ANOVAm indicou que enquanto o tratamento aumentou significativamente o número de células PO ( $F = 20,1$ , d.f. = 1,  $p = 0,01$ ) e NC ( $F = 55,9$ , d.f. = 1,  $p = 0,002$ ), e reduziu significativamente o número de células M ( $F = 9,1$ , d.f. = 1,  $p = 0,04$ ). 2) As ANOVAs de repetição indicaram que o número de células por fenótipo variou significativamente somente no grupo C ( $F = 31,1$ , d.f. = 1,0,  $p = 0,03$ ) com a seguinte classificação por número de células por fenótipo

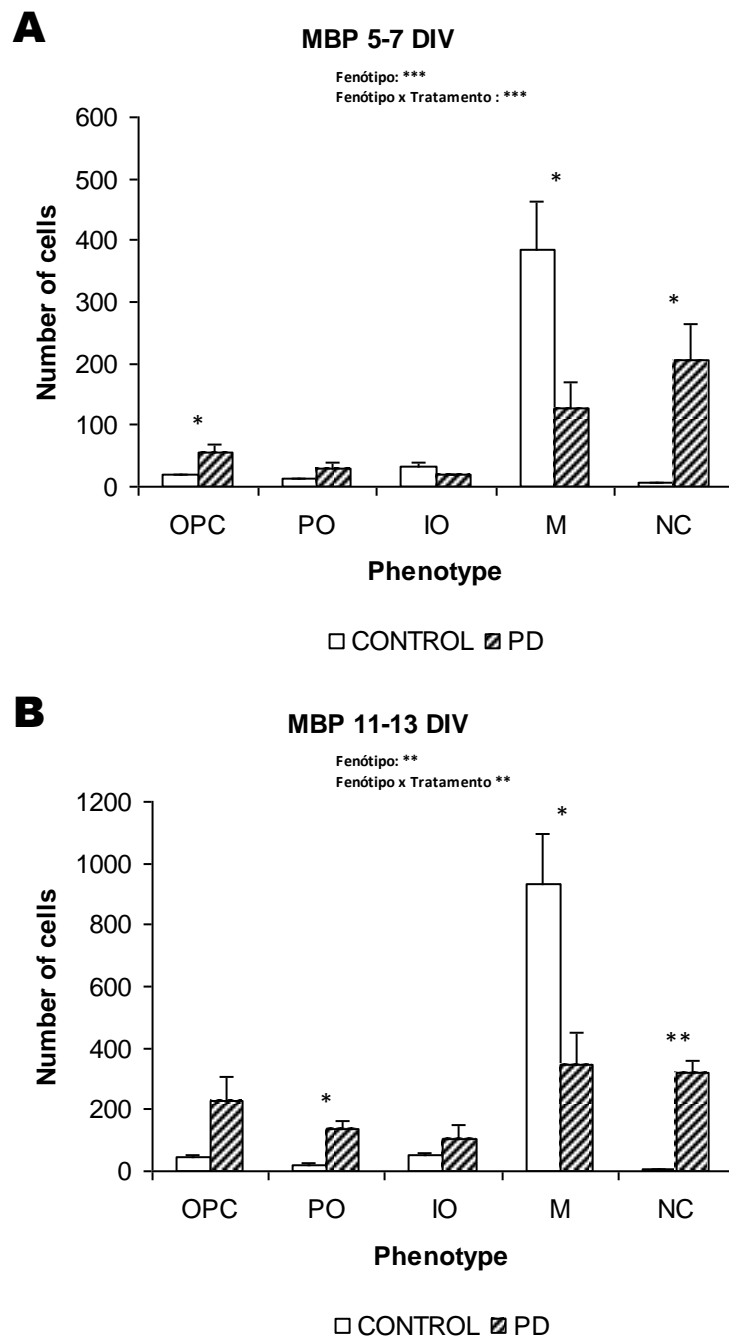


NC<PO=OPC=IO<M (FPLSD). Este padrão de resultados indica que enquanto o número de células por fenótipo era mais alto para as células com morfologia mais madura no grupo C, o mesmo não era verdade para o grupo PD.

Para as interações *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO*×*TEMPO*: 1) analisando cada tempo separadamente, as ANOVAs de repetição de ordem inferior indicaram interações *FENÓTIPO*×*TRATAMENTO* para os períodos de 30min (F = 12,9, d.f. = 1,6, p = 0,007), 24h (F = 10,7, d.f. = 1,9, p = 0,007) e 48h (F = 16,8, d.f. = 1,4, p = 0,006); 2) analisando cada grupo separadamente, as ANOVAs de repetição de ordem inferior indicaram que enquanto uma interação *FENÓTIPO*×*TEMPO* existia para o grupo PD (F = 6,2, d.f. = 1,6, p = 0,08), nenhuma interação foi observada no grupo C. Este padrão de resultados indicou que os perfis de distribuição de fenótipos celulares do grupo C eram significativamente diferentes dos perfis do grupo PD em todos os tempos, também indicou que o grupo C apresentou um perfil estável em todos os tempos, enquanto o grupo PD mudou seu perfil desde o tempo inicial de tratamento (30min) até o último (48h). Esta mudança foi principalmente associada com um aumento no número de células PO desde 30min até o tempo de 48h (FPLSD: p = 0,02).

#### 4.2.7 Marcação para DAPI: 5 a 7 div e 11 a 13 div

O tratamento não afetou o número total de células, sem considerar o fenótipo, nas culturas tanto nos períodos de 5-7 div (C: 876±105; PD: 733±87) como nos períodos de 11-13 div (C: 1154±129; PD: 1070±123) (ausência de efeitos do *TRATAMENTO* ou de interações *TRATAMENTO*×*TEMPO*: p > 0,10 em todos os casos).



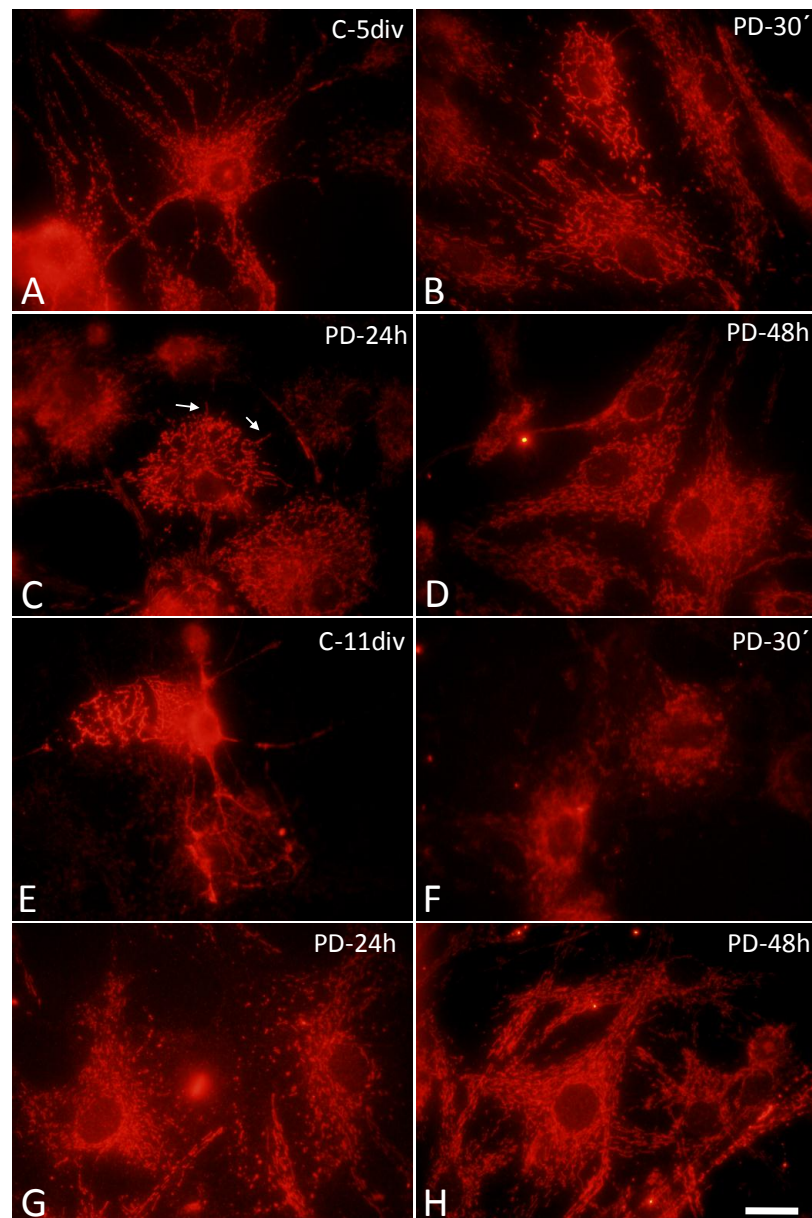
**Figura 12 - Mudanças no número de células, agrupadas pelo fenótipo da oligodendroglia em culturas controle e culturas tratadas, indicadas pela expressão da MBP e pela morfologia celular. 5 -7div: o grupo PD apresentou um aumento no número de células com fenótipo NC e bipolar (OPC); 11-13div: o grupo C era caracterizado por um grande número de células com morfologia madura, enquanto o grupo PD apresentou um maior número de células com morfologia de progenitor e NC em relação ao grupo C. OPC: célula progenitora de oligodendrócitos; PO: pré-oligodendrócito; IO: oligodendrócito imaturo; M: oligodendrócito maduro; NC: células não classificadas. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .**

### 4.3 Avaliação do papel da via da MAPK na distribuição de proteínas

#### 4.3.1 Distribuição da MBP

Nas culturas controle com 5div, a MBP estava distribuída ao longo do corpo celular e dos prolongamentos, organizada em traços discretos, contínuos, formando como se fossem pequenos “trilhos” ao longo dos prolongamentos (Figura 13A). Nas culturas tratadas com PD por 30min, a MBP estava distribuída aparentemente em traços maiores no corpo celular, e mais evidentes pela imunomarcação em comparação com as células das culturas controle (Figura 13B). Com 24 horas de tratamento, a distribuição da MBP é semelhante ao observado com 30 minutos, embora possam ser distinguida em porções proximais de prolongamentos (Figura 13C - setas). Com 48 horas, o padrão de distribuição da MBP se assemelha ao do grupo controle (Figura 13D).

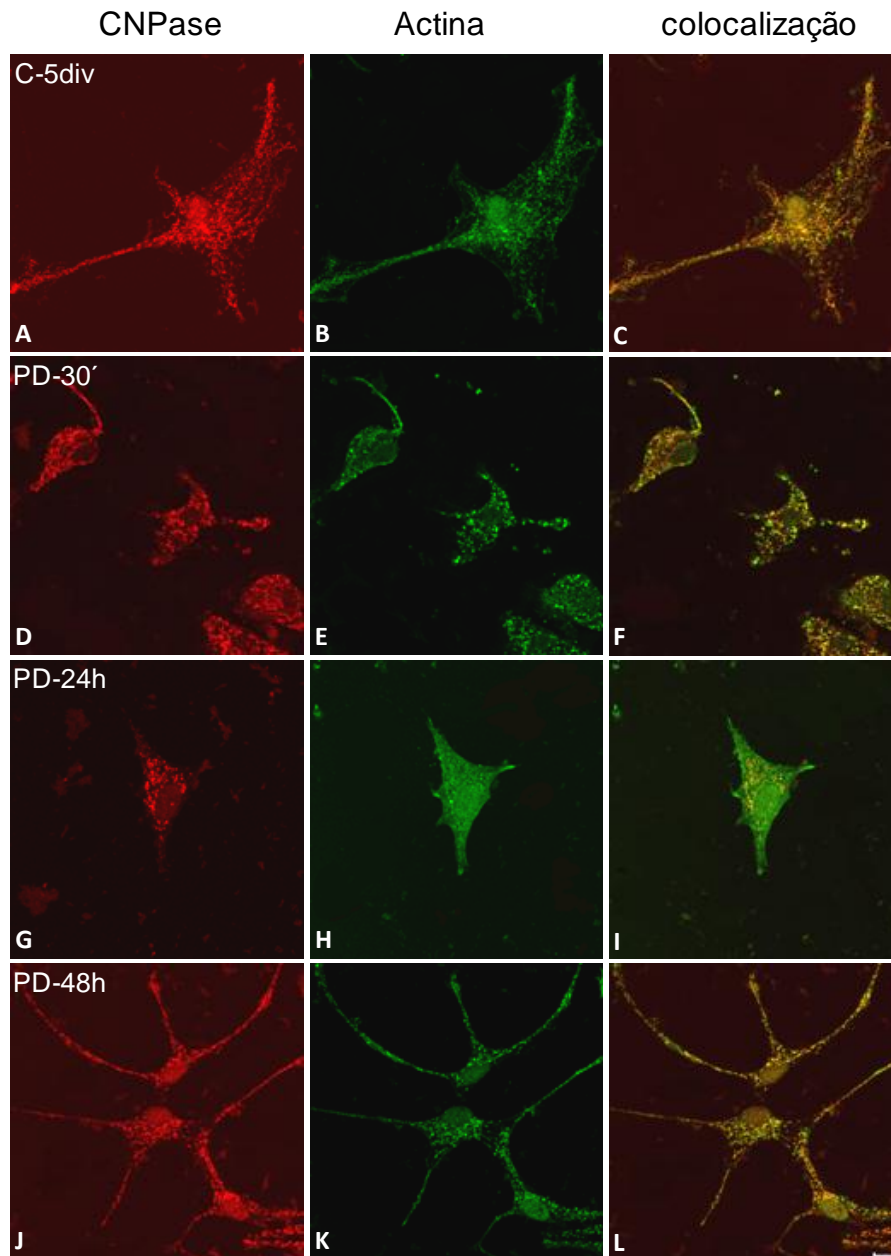
Em um estágio mais avançado, com 11div, as culturas controle apresentaram células com a MBP distribuída ao longo do corpo celular e nos prolongamentos, evidenciando também os véus de membrana (Figura 13E). Com 30min de tratamento, a MBP estava bem menos evidente do que o observado nas células das culturas controle, com uma marcação difusa e dispersa (Figura 13F). Com 24 horas, a MBP se encontrava em um padrão que se assemelhava mais com o observado nas culturas de 5div quando tratadas por 24h (Figura 13G). Com 48 horas de tratamento, a MBP era observada em traços contínuos e bem evidentes ao longo do corpo celular e dos prolongamentos (Figura 13H).



**Figura 13 - Distribuição da MBP: Oligodendroglia imunoreagida aos 5div e aos 11div com o anticorpo anti-MBP.** A/E – culturas controle; culturas tratadas com PD98059 por 30min (B/F), 24h (C/G) e 48h (D/H). Em A, aos 5div, notar que a MBP é organizada em traços ao longo do corpo celular e prolongamentos. Com 30min (B) e com 24h (C), a MBP estava distribuída de forma dispersa pelo corpo celular, sendo que com 24h, a MBP podia ser observada em regiões proximais de prolongamentos (setas). Com 48 horas, o padrão de distribuição da MBP se assemelha ao do grupo controle (D). Em E, em um estágio mais avançado de diferenciação *in vitro*, as culturas controle exibem células com a MBP pelo corpo celular, prolongamentos e nos véus de membrana. Com 30min, a MBP se distribuía de forma difusa pela célula (F). Com 24h (G), sua marcação era dispersa no corpo celular, enquanto que com 48h (H), já podia ser evidenciada nos prolongamentos. Barra de calibração: 20  $\mu$ m.

#### 4.3.2 Distribuição da CNPase e actina

Nas culturas controle aos 5div, a CNPase está distribuída em um padrão filamentar, ao longo das estruturas do citoesqueleto semelhante a nervuras, co-localizada com a actina, conforme observado em microscopia confocal (Figuras 14A-C). 30 minutos após o tratamento, a CNPase passou a apresentar um padrão puntiforme, co-localizado com a actina (Figuras 14D-F). Com 24 horas, a CNPase ainda era encontrada no padrão puntiforme, no entanto, a distribuição da actina parecia começar a se reorganizar e compor as estruturas semelhantes a nervuras (Figuras 14G-I). 48 horas após o tratamento, a CNPase voltou a mostrar um padrão e distribuição filamentar, co-localizada com a actina (Figuras 14J-L), similar ao das células controle sugerindo que o citoesqueleto é capaz de se reorganizar após a ação do inibidor.

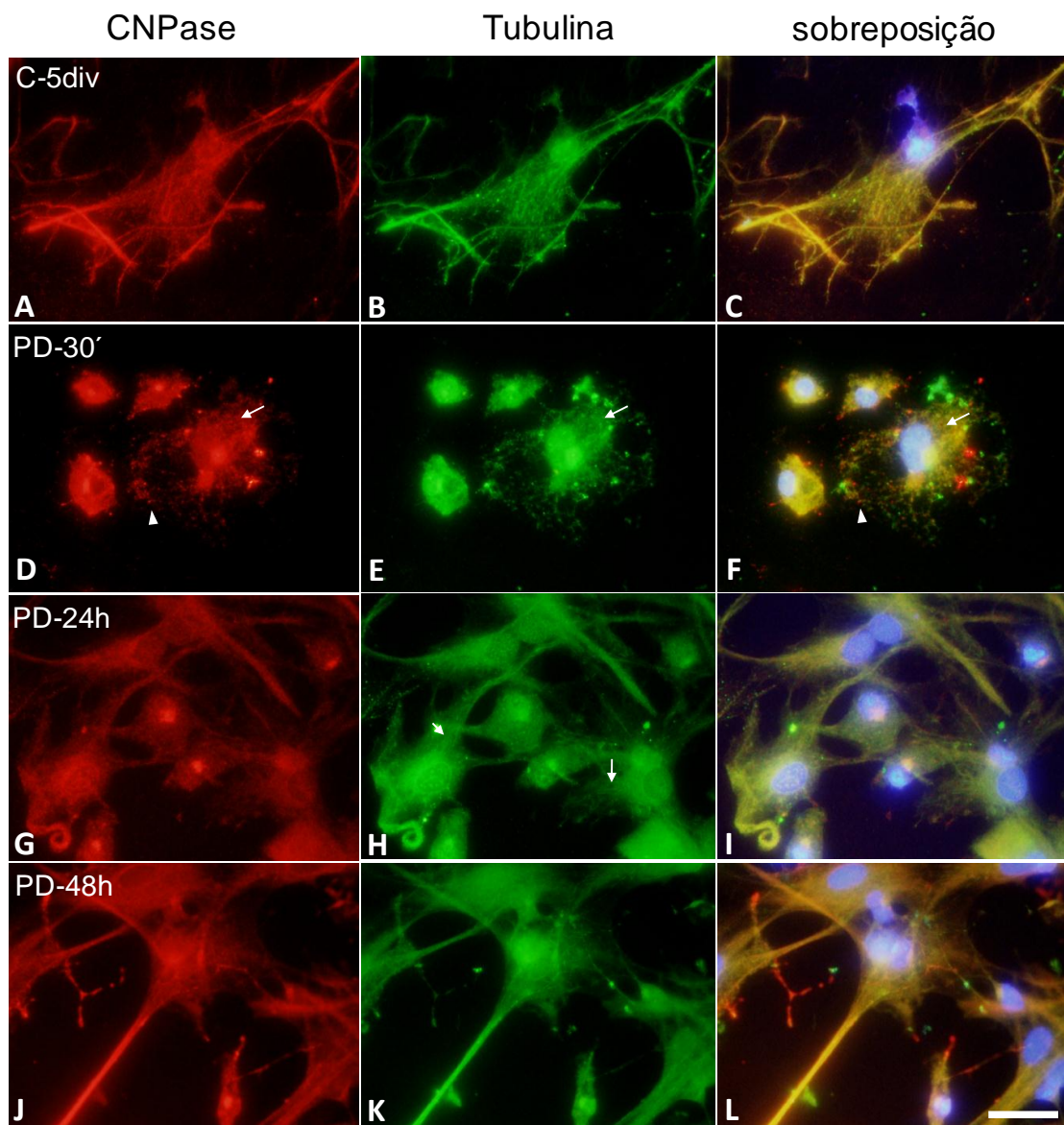


**Figura 14 - Efeitos do tratamento com PD na distribuição da CNPase e actina aos 5div.** Em todos os painéis: vermelho – CNPase; verde – actina; amarelo – imagens superpostas. A-C: Nas culturas controle, a CNPase tem a aparência filamentosa ao longo de estruturas de citoesqueleto semelhantes a nervuras, co-localizadas com actina. D-F: 30 minutos pós-tratamento, nota-se que a CNPase é presente em um padrão puntiforme. A actina é co-localizada com CNPase mostrando também uma distribuição puntiforme. G-I: 24 horas pós-tratamento, a CNPase se mantém distribuída com padrão puntiforme, contudo, a actina é distribuída ao longo das estruturas de citoesqueleto semelhantes a nervuras. J-L: Com 48 horas, ambos CNPase e actina se apresentam novamente em um padrão filamentoso, similar ao das células controle. Barra de calibração: 10  $\mu$ m.

### 4.3.3 Distribuição da CNPase e tubulina

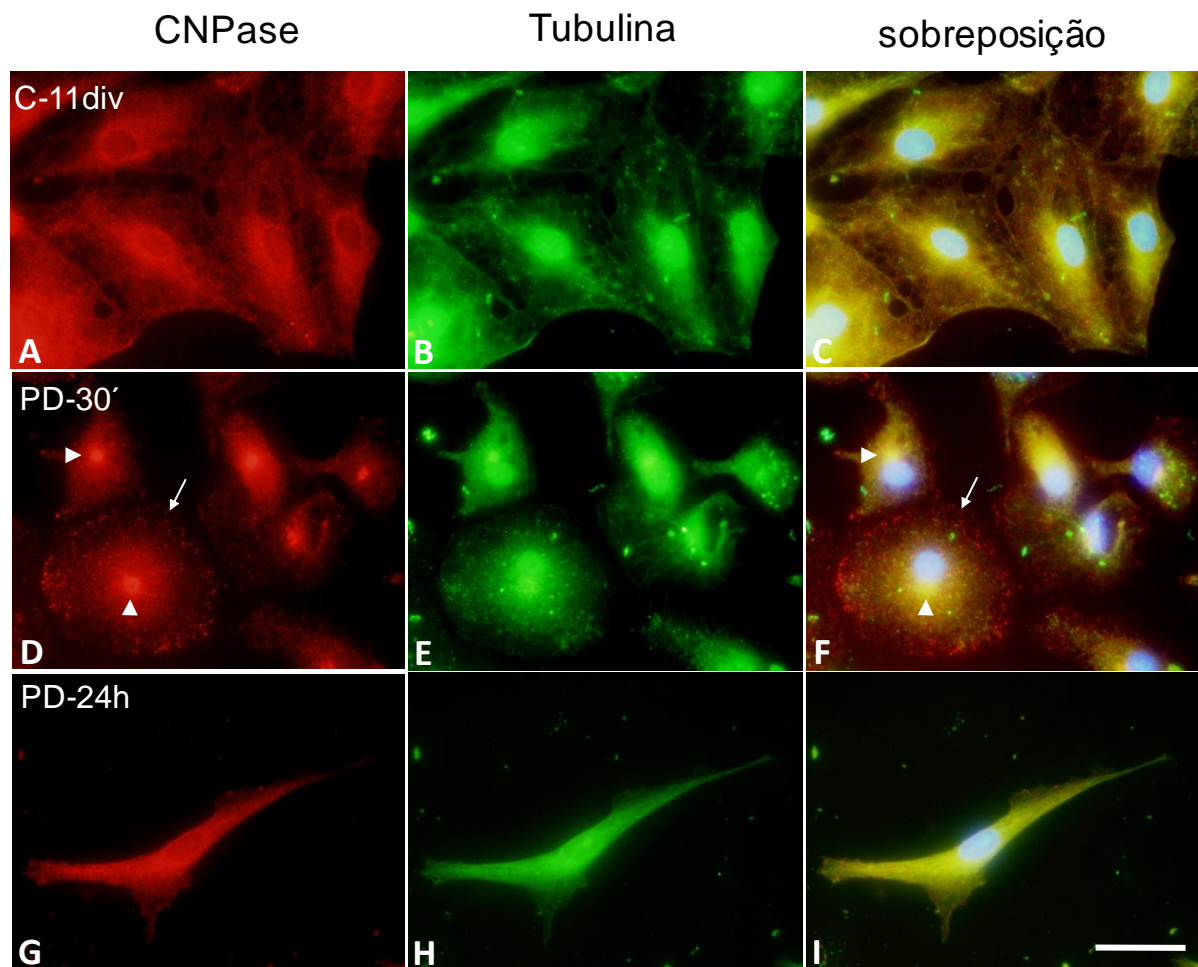
Nas células controle aos 5div, a tubulina se distribui aparentemente co-localizada com a CNPase em um padrão filamentar ao longo das estruturas semelhantes a nervuras (Figuras 15A-C). 30 minutos após o tratamento, CNPase e tubulina demonstram um padrão puntiforme, mas mantêm a co-localização na maior parte da região citoplasmática (setas Figuras 15D-F), embora na extremidade do véu de membrana a CNPase esteja evidente sem a presença de tubulina (cabeças de seta - Figuras 15D e F). Com 24 horas de tratamento, a CNPase parecia distribuída de forma puntiforme ao longo da célula (Figura 15G), porém, aparentemente distribuída ao longo dos microtúbulos (observar as imagens sobrepostas na Figura 15I). A tubulina parecia começar a se redistribuir nas estruturas semelhantes a nervuras, sendo que em algumas células este padrão era mais evidente (seta Figura 15H). Com 48 horas na presença do PD, a CNPase começava a se redistribuir em um padrão filamentar (Figura 15J) aparentemente co-localizada com a tubulina (Figuras 15J-L).

Em um estágio mais avançado de diferenciação, aos 11div, as estruturas semelhantes a nervuras já não eram tão evidentes pela CNPase ou pela tubulina (Figuras 16A-B). A CNPase e a tubulina estavam distribuídas por toda a célula, aparentemente co-localizadas, inclusive nas extremidades do véu de membrana (Figura 16C). Com 30min de tratamento com o PD, a CNPase continua em um padrão puntiforme, mas, apresenta-se concentrada em regiões próximas ao núcleo (cabeças de seta Figuras 16D e F) e nas extremidades do véu de membrana (setas Figura 16D e F). A tubulina estava aparentemente co-localizada com a CNPase, em um padrão preferencialmente puntiforme, porém não tão evidenciada nas extremidades quanto a CNPase (Figuras 16E-F). Com 24 horas, a CNPase e a tubulina podiam ser observadas ao longo de toda a célula, aparentemente co-localizadas, sendo que a tubulina apresentava um padrão mais filamentar que a CNPase (Figuras 16G-I).



**Figura 15- Efeitos do tratamento com PD na distribuição da CNPase e tubulina aos 5div.** Em todos os painéis: vermelho – CNPase; verde – tubulina; amarelo – imagens superpostas. A-C: Nas culturas controle, a CNPase tem a aparência filamentosa ao longo de estruturas de citoesqueleto semelhantes a nervuras, co-localizadas com a tubulina. D-F: Com 30min após o tratamento, nota-se que a CNPase é presente em um padrão puntiforme, assim como a tubulina, que aparentemente se colocaliza com a CNPase (setas), porém nas porções mais extremas das células podem ser observados pontos somente com a CNPase (cabeça de setas). G-I: Com 24h, o padrão de distribuição da CNPase ainda parecia disperso na membrana, contudo, a tubulina parece começar a se redistribuir em um padrão filamentar (setas). Além disso, é possível observar uma concentração da CNPase perto do núcleo. J-L: Com 48 horas, tanto a CNPase como a tubulina se apresentam novamente em um padrão filamentoso. Barra de calibração: 30  $\mu$ m.





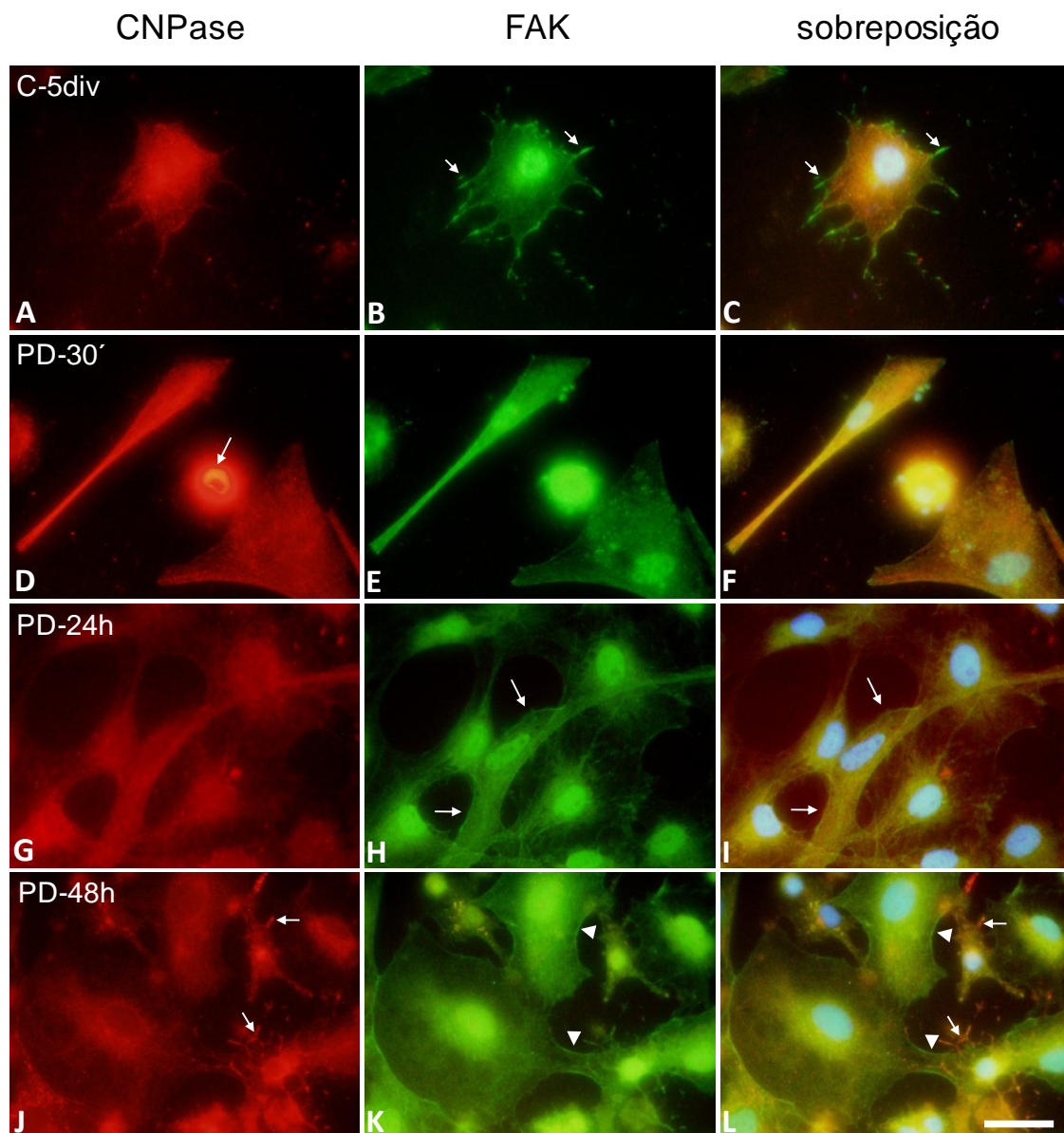
**Figura 16 - Efeitos do tratamento com PD na distribuição da CNPase e tubulina aos 11div.** Em todos os painéis: vermelho – CNPase; verde – tubulina; amarelo – imagens superpostas. A-C: Neste estágio de maturação nas culturas controle, as estruturas de citoesqueleto semelhantes a nervuras não são tão evidenciadas pela CNPase, sendo que CNPase e tubulina são distribuídas ao longo de toda a célula. Com 30min de tratamento com o PD (10  $\mu$ M) (D-F), tanto a CNPase quanto a tubulina se encontravam dispersas, em um padrão puntiforme, como em domínios na membrana, porém nos domínios localizados nas partes mais externas, somente a CNPase pode ser observada (setas em D e F). Além disso, a CNPase ficava mais concentrada em uma região ao lado do núcleo (cabeças de seta em D e F). Com 24h, a tubulina apresentava um padrão mais filamentar que a CNPase, em uma célula com morfologia de progenitor, que é a morfologia predominante com este tempo de tratamento (G-I). Barra de calibração: 30  $\mu$ m.

#### 4.3.4 Distribuição da CNPase e FAK

Aos 5div, nas células das culturas controle, a FAK podia ser observada organizada no corpo celular próximo ao núcleo e mais evidenciada nas extremidades da célula, em um padrão puntiforme, nos pontos de adesão focal, que podem estar tão próximos nas extremidades dos véus de membrana e prolongamentos, parecendo uma marcação contínua (setas na Figura 17B e C). A CNPase se apresentava distribuída por todo o corpo celular aparentemente não colocalizada com a FAK (Figuras 17A e C). Vale ressaltar que a marcação para CNPase nestes experimentos apresenta um padrão um pouco diferente do mostrado anteriormente, não evidenciando as estruturas semelhantes a nervuras, provavelmente devido às poucas lavagens com Triton, que tiveram que ser evitadas por causa da marcação para a FAK. Com 30min de tratamento, a CNPase podia ser observada por toda a célula (Figura 17D), assim como a FAK que, por sua vez, não era mais observada nas extremidades, e nem puderam ser mais observados pontos de adesão focal como nas culturas controle (Figura 17E). Na célula com morfologia arredondada, tanto a CNPase como a FAK possuíam marcação bem evidente, mais forte do que nas outras células, como se estivessem totalmente concentradas no corpo celular. Com 24 horas, a FAK ainda se encontrava preferencialmente nas regiões mais próximas ao núcleo (Figura 17G), porém, podendo ser observada também nas extremidades dos véus de membrana (setas Figuras 17H e I). Com 48 horas de tratamento, a FAK já está presente por toda a célula e nas extremidades dos véus de membrana (cabeça de seta Figura 17K), assim como em pequenos prolongamentos marcados também com a CNPase (setas Figuras 17J e L) sugerindo assim, que após um longo tempo da adição do inibidor, as células voltam a aderir, porém não alcançam, até o tempo de 48 horas, o padrão observado nas células das culturas controle.

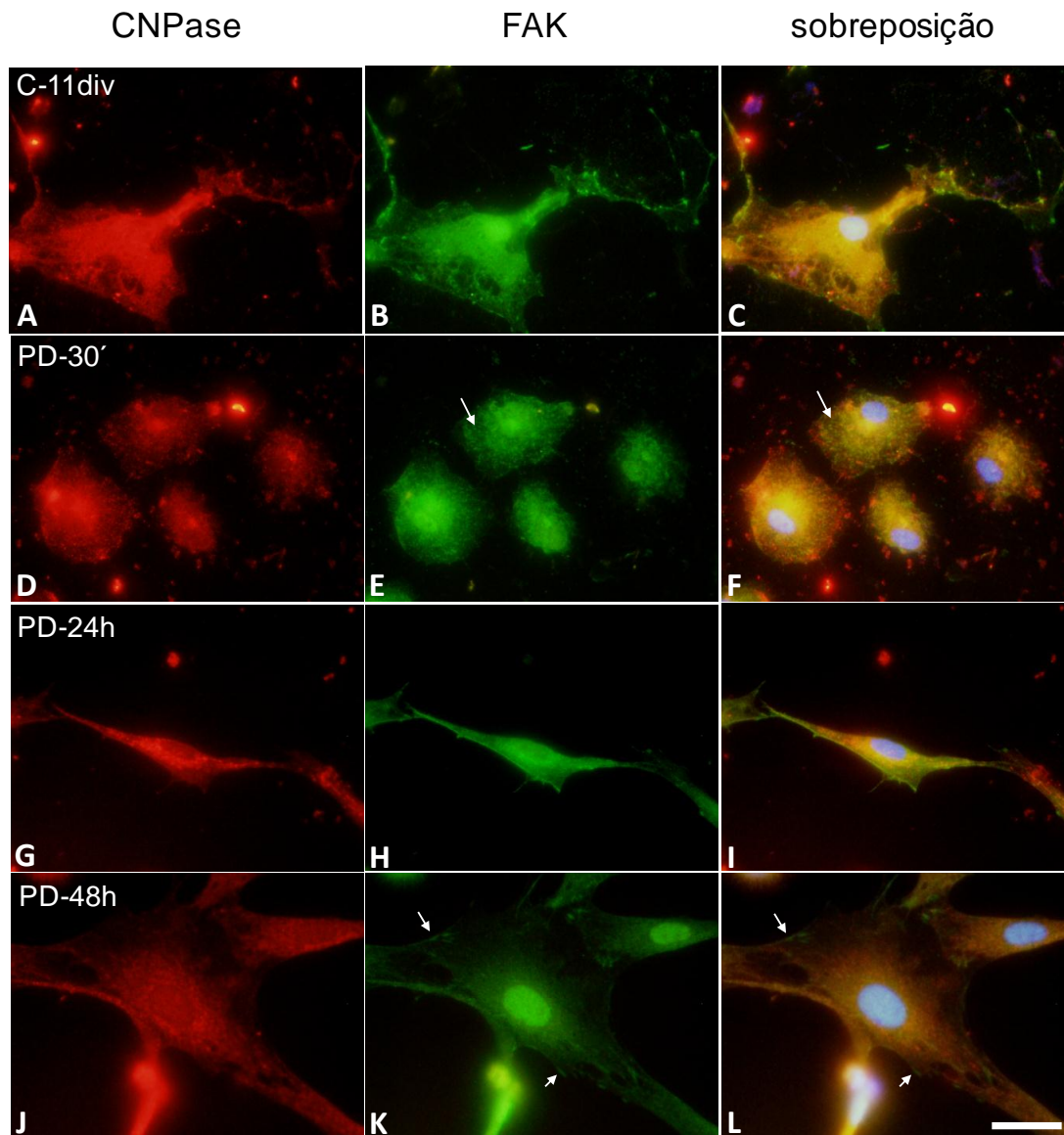
Aos 11div, nas células das culturas controle, a FAK podia ser observada por toda a célula, porém, sua marcação era mais evidente em alguns pontos, tanto no corpo celular como nas extremidades dos véus de membrana e também nos prolongamentos, evidenciando desta forma, pontos de adesão focal (Figura 18B). A CNPase se apresentava distribuída por todo o corpo celular aparentemente não co-localizada com a FAK (Figuras 18A, C). Com 30min de tratamento com PD, a CNPase podia ser observada distribuída de forma dispersa e puntiforme, sendo que nas extremidades celulares, era encontrada desta forma sem a marcação para FAK (Figuras 18D,F). Além disso, ficava mais concentrada em regiões próximas ao núcleo (Figura 18D). A FAK não era mais evidenciada nas extremidades

celulares como nas células controle, sendo mais distribuída perto do núcleo, e apresentava um padrão de marcação puntiforme. Pode ser observado também em uma célula, pontos mais fortes, como se fossem pequenos pontos de adesão focal, embora restritos ao corpo celular (setas Figuras 18E,F). Com 24 horas, a CNPase estava mais concentrada em uma região perto do núcleo em uma marcação forte e puntiforme, sendo que também podia ser evidenciada pelos prolongamentos, com um padrão de marcação menos puntiforme e mais segmentado (Figura 18G). Com este tempo de tratamento, a FAK já era mais distribuída por todo o corpo celular, sendo que podia ser evidenciada nas extremidades celulares (Figuras 18H,I) como se estivesse formando novos contatos para a adesão. Com 48 horas, a CNPase e a FAK já estavam mais distribuídas pelo corpo celular e evidenciando mais as extremidades celulares (Figuras 18J-L). Além disso, a FAK podia ser observada em pontos mais fortemente marcados, em pontos de adesão focal (setas Figuras 18K,L). Estes resultados sugerem que com o tratamento as células perdem o contato com a superfície da lamínula com poli-L-lisina, voltando a formar novos contatos de adesão após um período em que provavelmente o inibidor não exercia mais efeito.



**Figura 17 - Efeitos do tratamento com PD na distribuição da CNPase e FAK aos 5div.** Em todos os painéis: vermelho – CNPase; verde – FAK; amarelo – imagens superpostas. Nas culturas controle, observar a organização da FAK (B-C) em feixes na parte mais interna e nas extremidades da célula, como nas partes mais distais, evidenciando as regiões ou pontos de adesão focal (setas em B e C). Com 30min (E-F), a FAK, não era mais evidenciada nas extremidades celulares, e nem puderam ser mais observadas as regiões ou pontos de adesão focal. Nas células com morfologia madura (com véus de membrana), a FAK estava mais concentrada em um padrão puntiforme no corpo celular (cabeça de seta) e na célula com morfologia arredondada, tanto a CNPase como a FAK possuíam marcação totalmente concentradas no corpo celular, sendo que a CNPase novamente estava mais concentrada em uma região próxima ao núcleo (seta). Com 24 horas (G-I), a FAK já podia ser observada em

algumas regiões nas extremidades das células (setas). Com 48h, as extremidades celulares já podiam ser mais evidenciadas com a marcação para FAK (cabeça de seta em K/L), assim como em pequenos prolongamentos marcados também com a CNPase (setas J e L). Barra de calibração: 30  $\mu$ m.



**Figura 18 - Efeitos do tratamento com PD na distribuição da CNPase e FAK aos 11div.**

Em todos os painéis: vermelho – CNPase; verde – FAK; amarelo – imagens superpostas. Nas culturas controle (A-C), a marcação para FAK era mais evidente em alguns pontos, tanto no corpo celular como nas extremidades da membrana e também nos pelos prolongamentos, evidenciando os pontos de adesão focal. Com 30min (D-F), a CNPase e a FAK podiam ser observadas distribuídas de forma dispersa e puntiforme, como em domínios pela membrana, sendo que nas extremidades celulares, a FAK não estava presente. Esta ficava mais concentrada em regiões próximas ao núcleo ou em pontos mais fortes, como se fossem

pequenos pontos de adesão focal, restritos à parte mais interna do corpo celular (setas). Com 24h (G-I), a CNPase (G) estava mais concentrada em uma região perto do núcleo em uma marcação forte e puntiforme, sendo que também podia ser evidenciada pelos prolongamentos, com um padrão de marcação menos puntiforme e mais segmentado. A FAK (H/I) já era mais distribuída por todo o corpo celular e também nas extremidades celulares. Com 48 horas, a CNPase e a FAK já eram observadas distribuídas pelo corpo celular e nas extremidades celulares (J-L), onde a FAK podia ser observada em pontos mais fortemente marcados (setas em K e L). Barra de calibração: 30  $\mu\text{m}$ .



## 5 DISCUSSÃO

A oligodendroglia passa por diversas modificações morfológicas durante a diferenciação, e para este processo ocorrer, é necessária uma variedade de eventos coordenados sequencialmente, os quais vão permitir que a oligodendroglia em desenvolvimento alcance o estágio maduro e comprometido com a mielinização (Broughton et al., 2007). Com os resultados tanto qualitativos como quantitativos, baseados na imunocitoquímica para CNPase e MBP, assim como na morfologia, nós demonstramos que com a inibição da via da MAPK/ERK ocorre um aumento significativo o número de células NC. Este aumento é geralmente acompanhado por um aumento do número de células com morfologia imatura (OPC e PO) e redução no número de células com morfologia madura (M). O tratamento com PD na dose de 10  $\mu$ M resultou em mudanças nos perfis de distribuição de células por fenótipos: os efeitos mais evidentes foram observados logo após o tratamento com 30min. Quando utilizamos outro inibidor da MEK, o U0126, na dose de 1  $\mu$ M, os resultados observados foram semelhantes aos do tratamento com PD. O U0126 é considerado um inibidor mais específico e mais potente da MEK (Learish et al., 2000). Com o decorrer do tempo, os perfis morfológicos mudaram, indicando que as células estavam se recuperando do tratamento. É importante ressaltar que as células NC CNPase+/MBP+, como observado também pela análise qualitativa, são NG2-/A2B5-, indicando que são células maduras que não foram capazes de estender ou manter os prolongamentos.

Como mencionado, os efeitos com o PD parecem ser reversíveis. O aumento do número de células com perfil imaturo marcadas com o anticorpo anti-MBP com 24h e 48h pode sugerir que as células NC estão estendendo e ramificando seus prolongamentos novamente. O PD98059 se liga de forma não competitiva à forma inativa da MEK1 (Dudley et al., 1995) e seus efeitos podem ser rapidamente reversíveis quando o composto é removido do meio de cultura, indicando que o PD age de forma citostática e não citotóxica (Akella et al., 2008). Esta hipótese é confirmada por nossos resultados quando nenhuma alteração no número de células foi observada com a análise com DAPI. Também demonstramos que, 24 horas após o primeiro tratamento, um período em que a morfologia predominante era a das células bipolares, ao fazer outra administração de PD, as células eram afetadas novamente, exibindo uma morfologia predominantemente redonda, como após 30 minutos do primeiro tratamento.

A regulação temporal da ativação da MAPK em um sistema de células em desenvolvimento, o qual é o nosso caso em culturas primárias de oligodendrócitos, é esperada que seja mais complexo do que em culturas de linhagens de células estabelecidas (Bhat & Zhang, 1996). A inibição de outra proteína da família das MAPK, a p38, demonstrou que a apoptose é induzida somente nas células maduras, não ocorrendo este efeito nos progenitores de oligodendrócitos. Estes resultados foram obtidos tanto com culturas primárias como em culturas de linhagem de células glia central-4 (CG-4) (Hamanoue et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que a p38 é importante para a diferenciação dos progenitores em oligodendrócitos maduros (Baron et al., 2000). No entanto, deve ser ressaltado que o papel da p38 na sobrevivência celular era específico nos oligodendrócitos maduros, indicando um efeito estágio específico. Em nosso sistema de cultura, todos os estágios de diferenciação oligodendrogliais estavam presentes.

A via da MAPK/ERK foi descrita como importante tanto para a proliferação como para a diferenciação celular (Bhat & Zhang, 1996; Baron et al., 2000). Nossos resultados com células NG2+, aos 5div, mostraram que o número de células aumentou constantemente em direção aos fenótipos mais maduros no grupo controle. O mesmo perfil não foi observado no grupo PD, o que corrobora os achados anteriores que mostraram um efeito nos progenitores tardios da oligodendroglia (Baron et al., 2000). Por outro lado, o efeito na morfologia celular foi significativamente maior nas células maduras, indicando que o estágio maduro, o qual deveria ter prolongamentos bem extensos e ramificados, era o estágio mais afetado pelo tratamento. Estas observações sugerem que a via da MAPK/ERK participa dos eventos relacionados com o alongamento dos prolongamentos e com a adesão celular. Não existem dados na literatura com relação à ERK e extensão de prolongamentos diretamente. Foi demonstrado que o tratamento com NGF pode causar um aumento na atividade da ERK em oligodendrócitos de porco, aumentando assim a extensão dos prolongamentos (Althaus et al., 1992, 1997). Além disso, o tratamento com o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), um ativador da PKC, induz a extensão dos prolongamentos, e este efeito pode ser bloqueado com a inibição da ERK (Stariha & Kim, 2001; Stariha et al., 1997). Fincham e colaboradores (2000) demonstram em fibroblastos que a ERK está presente nas adesões celulares e pode ser alvo em sítios de adesões celulares onde está presente em sua forma ativa. A inibição da MEK pelo inibidor U0126 por 30min induziu o arredondamento celular. O espalhamento celular, mas não a adesão, foi afetado pela inibição da MEK, semelhante ao que vimos em nossas culturas quando inibimos a MEK. Observamos uma redução no espalhamento celular, porém



o número total de células não mudou com o tratamento com o PD, sugerindo que a adesão celular pode não ter sido afetada.

As alterações na morfologia celular foram acompanhadas por alterações no padrão de distribuição de proteínas. A MBP teve sua distribuição alterada, e estas alterações ocorreram de forma diferente aos 5 e aos 11div, pois o perfil de distribuição normal da MBP é alterado ao longo da diferenciação. Aos 5div, a MBP estava distribuída em traços discretos, formando como se fossem pequenos “trilhos” ao longo dos prolongamentos. A disposição da MBP ao longo destes “trilhos” está de acordo com a sua forma de distribuição. O transporte de RNAm de MBP, do corpo celular para os prolongamentos de oligodendrócitos, é dependente da associação com microtúbulos (Ainger et al. 1993). Foi proposto um tipo de transporte de RNAm de MBP via microtúbulos que vai da região peri-nuclear até os prolongamentos, através de experimentos com hibridização *in situ*. Este tráfego anterógrado observado em culturas de oligodendrócitos era direcionado por um mecanismo de translocação de grânulos em que estes eram alinhados com os microtúbulos (Ainger et al., 1997; Barbarese et al., 1999). Quando as células foram tratadas com o PD por 30min, a MBP ficou distribuída de forma dispersa no corpo celular, sem uma orientação contínua, provavelmente por uma perturbação na organização dos microtúbulos. Com o decorrer do tratamento, a MBP já começa a se distribuir de forma mais contínua, provavelmente após a reorganização dos microtúbulos. Como a tubulina também apresenta uma distribuição alterada após o tratamento com PD, estes resultados sugerem que a reorganização da MBP pode estar relacionada com a reorganização da distribuição da tubulina. Em um estágio mais avançado de diferenciação *in vitro*, aos 11div, a MBP já estava provavelmente inserida nos véus de membrana nas células das culturas controle. Este padrão pode ser observado durante a diferenciação, em que ocorre uma reorganização das proteínas no estágio mais maduro, quando a MBP é inserida na membrana. A inserção da MBP na membrana plasmática ocorre quando o citoesqueleto sub-membranoso (do qual fazem parte a CNPase, actina e tubulina) se desliga dos fosfolípidos de membrana, permitindo assim, a ligação destes com a MBP. Outro fator que favorece a inserção da MBP na membrana é a redistribuição de lipídeos com carga negativa para as regiões de domínio da MBP, uma vez que esta possui uma carga positiva muito forte (Brophy, 1992). Quando inibimos a MEK por 30min, a marcação para MBP parece difusa. De fato, mesmo quando a MBP fica inserida na membrana, ela continua ligada aos microtúbulos. A MBP é normalmente encontrada em múltiplos domínios pequenos espalhados pela membrana. Na presença de colchicina, droga que impede a polimerização dos microtúbulos, a MBP era difundida ao longo da membrana, sem a formação dos domínios, enquanto que na presença de

citocalasina B, droga que impede a polimerização dos filamentos de actina, a MBP formava grandes domínios aglomerados na membrana (Dyer & Benjamins, 1989). Com o decorrer do tratamento, a distribuição da MBP apresenta um padrão que é compatível com a presença desta proteína associada ao citoesqueleto. No entanto, é difícil imaginar que a MBP, que antes do tratamento se localizava inserida na membrana, após o tratamento com PD pudesse se reorganizar no citoplasma. Uma possibilidade é que, nesta fase, 24 ou 48 horas pós-tratamento, esteja ocorrendo uma nova síntese de MBP, e que esta já possa ser distribuída através dos microtúbulos que, nesta fase pós-tratamento, já são encontrados em uma disposição filamentar.

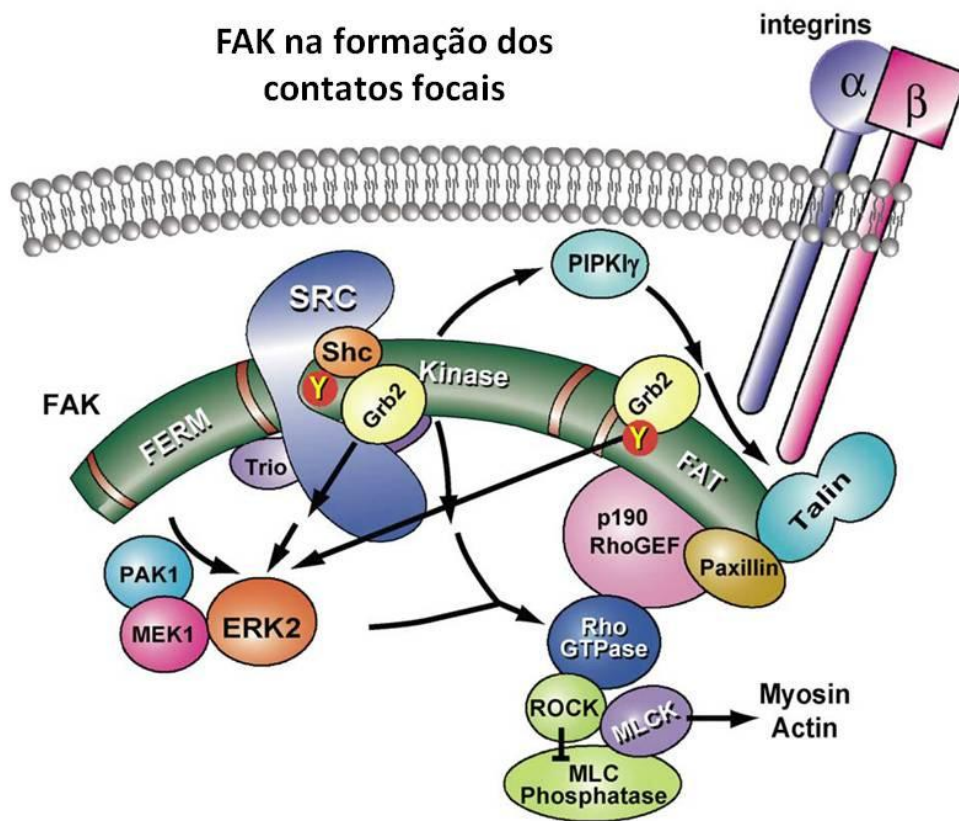
A MAPK está presente na membrana dos oligodendrócitos (Bhat and Zhang, 1996) e pode fosforilar a MBP em seu sítio Thr<sub>97</sub>. A fosforilação da MBP pode ser observada tanto *in vitro* como *in vivo* (Martenson et al., 1983; Erickson et al., 1990; Bhat and Zhang, 1996), sugerindo que esta via pode ser importante para a formação da mielina (Bhat and Zhang, 1996).

As distribuições da CNPase e do citoesqueleto também foram alteradas com o tratamento com o PD. Nas culturas controle aos 5div, a CNPase está distribuída em um padrão filamentar, ao longo das estruturas do citoesqueleto semelhante a nervuras, colocalizada com a actina (pela análise com microscopia de confocal) e aparentemente colocalizada com a tubulina. Este padrão de distribuição é descrito nas células neste estágio de desenvolvimento. A CNPase tem sua localização celular alterada, migrando da membrana plasmática para as chamadas estruturas semelhantes a nervuras, formando os componentes radiais juntamente com os filamentos de actina e os microtúbulos. À medida que a CNPase se desloca da membrana, dá lugar a MBP (Dyer & Benjamins, 1989; Dyer, 2002).

Com o tratamento por 30min, tanto a CNPase, quanto a actina e a tubulina tiveram suas distribuições alteradas, apresentando um padrão puntiforme por toda a célula. Essa desorganização do citoesqueleto explica as diferenças observadas na morfologia, com as células arredondadas, sugerindo que estas células na verdade tiveram uma retração de seus prolongamentos por causa desta perturbação no citoesqueleto. Alterações semelhantes no padrão de distribuição da CNPase e da tubulina foram observadas por nosso grupo em culturas cultivadas em deficiência de hormônio tireoideano, em que estas proteínas eram distribuídas de forma puntiforme e dispersa na membrana, porém, neste caso, a actina se manteve distribuída normalmente (Younes-Rapozo et al., 2006). Com 24h, a actina e a tubulina começam a se reorganizar, saindo daquele padrão puntiforme e começam a apresentar um padrão filamentar ainda de forma discreta. Esta redistribuição do citoesqueleto

sugere que o aumento do número de células com morfologia imatura observado neste tempo de tratamento pode ser devido ao fato que as células arredondadas NC começaram a estender seus prolongamentos novamente, o que seria permitido após a reorganização do citoesqueleto. Embora a tubulina e a actina já possam ser observadas redistribuídas com padrão filamentar, a CNPase ainda manteve um padrão puntiforme neste tempo de tratamento, sugerindo que, neste caso, a CNPase depende que o citoesqueleto de actina e os microtúbulos se reorganizem primeiro para depois ela se redistribuir ao longo da actina e tubulina para recompor as estruturas semelhantes a nervuras, como acontece 48 horas após o tratamento.

Foi proposto por Fincham e colaboradores (2000), no mesmo trabalho citado acima em que foi observado um arredondamento celular com a inibição da MEK com 30min, um mecanismo regulado de dentro para fora da célula, para que ocorra este efeito. Os autores observaram em culturas de fibroblastos que a MAPK/ERK fosforila a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK). A atividade desta cinase é necessária para a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC), a qual induz a contratibilidade da miosina, levando ao agrupamento de integrinas e, conseqüentemente, à formação das adesões focais (Burrige et al., 1997). A figura 19 resume a complexa sinalização envolvendo a ativação da ERK na manutenção dos contatos focais.



**Figura 19: Modelo que resume a complexa sinalização associada à FAK que leva à formação dos contatos focais.** Arranjos de fibras de *stress* de actina e contração celular estão associados com a formação dos sítios de adesão focal e aumento dos níveis de Rho-GTPases. Estas regulam indiretamente a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) pela ativação da cinase da MLC (MLCK) e inibindo a fosfatase da MLC. O aumento dos níveis de Rho-GTPases mediado pela FAK pode ocorrer através de múltiplos mecanismos. Um processo dependente de ERK-2 é regulado pela sinalização da Src-FAK por muitas vias, incluindo a ligação da Grb2 ao resíduo de tirosina 925 da FAK, formando o complexo Shc-Grb2, ou pela fosforilação da PAK1 no resíduo de serina-928 pela MEK1. A ativação de Rho-GTPases pela FAK através de vias de sinalização independentes da ERK2 inclui a ligação direta de fatores de troca Rho-GDP-GTP como a p190RhoGEF e o Trio da FAK. O papel direto da FAK em promover a ligação da talina com integrinas na formação do contato focal é pela ativação da PIPK1g (modificado de Schlaepfer et al., 2004) .

A ativação da ERK na adesão e migração celular em substratos da MEC é pouco compreendida. A ligação das integrinas ou o espalhamento celular é suficiente para ativar a

via de sinalização da ERK (Chen & Ko, 1994; Zhu & Assoian, 1995; Renshaw et al., 1996). A ativação da ERK dependente de adesão é notavelmente mais fraca, porém ocorre de forma mais sustentada quando comparada à ativação da ERK transiente e robusta observada com a ligação dos receptores com fatores de crescimento. Esta ativação ocorre provavelmente devido ao longo tempo necessário para a formação de múltiplas adesões celulares durante o processo de espalhamento celular (Zhu & Assoian, 1995).

O ancoramento celular é mediado pela ação das integrinas na sinalização dos complexos citosólicos da Raf-1, MEK e ERK. Esta sinalização depende da função de outras cinases, como a FAK, PAKs e PKA como reguladores desta cascata (Howe et al., 2002; Juliano et al., 2004). Estas proteínas são importantes reguladores da organização do citoesqueleto de actina. A FAK regula a liberação dos sinais da MEC para o citoesqueleto de actina e tem sido demonstrado que a PAK pode ser importante para a formação de adesões estáveis nas regiões terminais dos prolongamentos ou regiões de crescimento, sendo importante também na modulação da contração da actina-miosina que é importante para a transição das adesões dos complexos focais (Parsons et al., 2000).

Além disso, a inibição da MEK aboliu a ERK fosforilada nas adesões focais celulares (Fincham et al., 2000). A mielinização é altamente dependente do contato célula-substrato, neste caso, o contato dos prolongamentos dos oligodendrócitos com os axônios (Colognato et al., 2002; Câmara and French-Constant, 2007). Os oligodendrócitos mielinizantes dependem de um estado intermediário de adesão, pois são células envolvidas na remodelação tecidual (Fox et al., 2003).

Os resultados obtidos com a análise da distribuição da FAK em nossas culturas tratadas com PD98059 demonstraram que a inibição da MEK inibiu os contatos focais observados nas células das culturas controle. Nas culturas controle com 5div, a FAK estava distribuída em pontos por toda a célula, principalmente nas extremidades celulares, evidenciando as regiões de contatos focais. Nesta fase de desenvolvimento, em que a maioria das células estão se diferenciando, a FAK é importante pois regula o crescimento dos prolongamentos, via ativação de integrinas e proteínas cinases da família Src (Hoshina et al., 2007). Com 30min de tratamento, nas células com perfil de morfologia madura, a FAK já não era mais observada nas extremidades celulares, e alguns pontos de adesão foram observados no corpo celular. Nas células arredondadas NC, a FAK, juntamente com a CNPase, estava bem concentrada no corpo celular, sem observação de pontos de contato focal, sugerindo que estes foram inibidos com o tratamentos nestas células. Com 24 e 48h, a FAK já podia ser observada distribuída também pela periferia das células, indicando que estas células já

começavam a estabelecer novamente contatos com substrato. Nas culturas tratadas com 11div, as diferenças na distribuição da FAK seguiram um padrão semelhante às diferenças observadas nas culturas de 5div, de acordo com os tempos de tratamento observados, 30min, 24 e 48h.

Com 11div, a marcação da FAK nas células das culturas controle foi um pouco menor comparada às células das culturas controle com 5div. Esta diminuição da marcação coincide com o descrito na literatura em que os oligodendrócitos mielinizantes possuem um estágio intermediário de adesão celular, inclusive com a diminuição da fosforilação da FAK em seu resíduo de tirosina 925 (Fox et al., 2004). Foi descrito que os oligodendrócitos expressam uma proteína contra-adesiva, a fosfodiesterase-1 $\alpha$ /autotoxina (PD-1 $\alpha$ /ATX) (Fox et al., 2003), e que a modulação desta proteína está relacionada a um estado intermediário de adesão, o qual pode ser relevante para as mudanças típicas na morfologia dos oligodendrócitos que são observadas durante a mielinização. Os oligodendrócitos só são responsivos à PD-1 $\alpha$ /ATX após seu estágio migratório, reconhecido pelo anticorpo O4 (Fox et al., 2004). O tratamento com PD-1 $\alpha$ /ATX exógena reduziu a fosforilação da FAK e antagonizou a adesão dos oligodendrócitos O4<sup>+</sup>, sendo este último efeito mantido mesmo nos oligodendrócitos O1<sup>+</sup>, que corresponde ao início da diferenciação terminal. Estes resultados foram obtidos em culturas primárias de oligodendrócitos, como também em linhagens de células CG-4 (Fox et al., 2003, 2004). Supõe-se que esta ativação seja dependente da via da MAPK/ERK (Dennis et al., 2008; Yuelling & Fuss, 2008).

Investigações adicionais são necessárias para o entendimento dos mecanismos necessários, tanto para os oligodendrócitos fazerem contato e envolverem os axônios, como para a produção da bainha de mielina, eventos que certamente dependem da relação entre os oligodendrócitos/axônios/MEC e podem ser relacionados com diferentes vias de sinalização. Nossos resultados com relação à inibição da MEK em oligodendrócitos constituem evidências adicionais de que esta via é importante para a formação/manutenção dos prolongamentos e suas ramificações, e para a extensão dos véus de membrana, com consequências para a formação/ manutenção da bainha de mielina.

## 6 CONCLUSÕES

- 1) A via da MAPK/ERK possui um papel sobre a progressão da maturação da oligodendroglia imatura, como observado pela quantificação das células NG2<sup>+</sup>;
- 2) A inibição da MEK alterou a morfologia da oligodendroglia madura, indicando que a via da MAPK/ERK possui um efeito estágio-específico sobre a manutenção dos prolongamentos, pois observamos células redondas que são A2B5<sup>-</sup>/NG2<sup>-</sup> e CNPase<sup>+</sup>/MBP<sup>+</sup>;
- 3) O tratamento com PD98059 alterou o padrão de distribuição de proteínas de oligodendrócitos, como a MBP e a CNPase, e estas alterações ocorreram de acordo com o padrão de distribuição destas proteínas ao longo da diferenciação (5 ou 11div);
- 4) As mudanças morfológicas e a distribuição de proteínas foram acompanhadas por alterações no citoesqueleto, como observado com as distribuições da actina, tubulina e também da CNPase;
- 5) A inibição da MEK também inibiu os pontos de adesão focais, como demonstrado pela FAK;
- 6) Com o decorrer do tratamento, as alterações observadas na morfologia e na distribuição das proteínas MBP e CNPase pareciam ser reversíveis, assim como observamos uma reorganização do citoesqueleto e um aumento da marcação da FAK nos pontos de adesão focais.

## REFERÊNCIAS

- AINGER, K., AVOSSA, D., MORGAN, F. *et al.* Transport and Localization of Exogenous Myelin Basic Protein mRNA Microinjected into Oligodendrocytes. *Journal of Cell Biology*, v.2, p. 431-441,1993.
- AINGER, K., AVOSSA, D.,DIANA, A. S. *et al.* Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *Journal of Cell Biology*, v.138, n.5, p. 1077-1087, 1997.
- AKELLA R, MOON TM, GOLDSMITH EJ. Unique MAP Kinase binding sites. *Biochimica et Biophysica Acta*,v.1784, n.1, p. 548-55, 2008.
- ALLEN NJ, BARRES BA. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, v.15, n.5, p.542-548, 2005.
- ALTHAUS HH, KLOPPNER S, SCHMIDT-SCHULTZ T. *et al.* Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain. *Neuroscience Letters*, v.135, n.2, p.219-223, 1992.
- ALTHAUS HH, HEMPEL R, KLOPPNER S. *et al.* Nerve growth factor signal transduction in mature pig oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, v.50, n.5, p.729-742, 1997.
- AMUR-UMARJEE, S.G., DASU, R.G., CAMPAGNONI, A.T. Temporal expression of myelin specific components in neonatal mouse brain cultures: evidence that 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase appears prior galactocerebroside. *Developmental Neuroscience*, v.12, p. 251-262. 1990.
- APLIN AE, JULIANO RL. Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. *Journal of Cell Science*, v.112, n.5, p. 695-706, 1999.
- ARTAVANIS-TSAKONAS S, MATSUNO K, FORTINI ME. Notch signaling. *Science*, v.268, n.5208, p.225-232, 1995.
- BAAS D, FRESSINAUD C, ITTEL ME. *et al.* Expression of thyroid hormone receptor isoforms in rat oligodendrocyte cultures. Effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Neuroscience Letters*, v.176, n.1, p.47-51, 1994.
- BAGRODIA S, CERIONE RA. PAK to the future. *Trends in Cell Biology*, v. 9, n.9, p.350-355, 1999.
- BARBARESE, E.,BRUMWELL, C.,KWON, S. *et al.* RNA on the road to myelin. *Journal of Neurocytology*, v. 4, n.5, p. 263-270, 1999.
- BARON W, METZ B, BANSAL R. *et al.* PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiple intracellular signaling pathways. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v.15, n.3, p.314-329, 2000.



BARRADAS, P., GOMES, S.S., CAVALCANTE, L. CNPase expression in the developing opossum brain stem and cerebellum. *NeuroReport*, v. 6, p.289-292, 1995.

BARRADAS, P.C., GOMES, S.S., CAVALCANTE L.A. Heterogeneous Patterns of Oligodendroglial Differentiation in the Forebrain of the Opossum *Didelphis marsupialis*. *Journal of Neurocytology*, v.27, p. 15-25, 1998.

BARRADAS PC, FERRAZ AS, FERREIRA AA. *et al.* 2'3'Cyclic nucleotide 3'phosphodiesterase immunohistochemistry shows an impairment on myelin compaction in hypothyroid rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v.18, n.8, p.887-892, 2000.

BARRADAS PC, VIEIRA RS, DE FREITAS MS. Selective effect of hypothyroidism on expression of myelin markers during development. *Journal of Neuroscience Research*, v.66, n. 2, p.254-261, 2001.

BARRADAS, P.C., CAVALCANTE, L. A., GOMES F. A. *et al.* As células gliais. In: A célula. Hernandez (Editor) São Paulo, Editora Manole, 2005 . pp. 265-277.

BARRES BA, LAZAR MA, RAFF MC. A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development*, v.120, n.5, p.1097-1108, 1994.

BAUMANN N, PHAM-DINH D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews*, v.81, n.2, p.871-927, 2001.

BEN-HUR, T., ROGISTER, B., MURRAY, K. Growth and fate of PSA-NCAM+ precursor of the postnatal brain. *Journal of Neuroscience*, v.18, p.5777-5788, 1998.

BERGH JJ, LIN HY, LANSING L. *et al.* Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*, v.146, p.2864-2871, 2005.

BERNAL J, NUNEZ J. Thyroid hormones and brain development. *European Journal of Endocrinology*, v.133, p.390-39, 1995.

BHAT NR, ZHANG P. Activation of mitogen-activated protein kinases in oligodendrocytes. *Journal of Neurochemistry*, v.66, p.1986-1994, 1996.

BHAT NR, ZHANG P, MOHANTY SB. p38 MAP kinase regulation of oligodendrocyte differentiation with CREB as a potential target. *Neurochemistry Research*, v.32, p.293-302, 2007.

BIBOLLET-BAHENA O, ALMAZAN G. IGF-1-stimulated protein synthesis in oligodendrocyte progenitors requires PI3K/mTOR/Akt and MEK/ERK pathways. *Journal of Neurochemistry*, v. 09, p.1440-1451, 2009.

BIFULCO M, LAEZZA C, STINGO S. *et al.* 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a membrane-bound, microtubule-associated protein and membrane anchor for tubulin. *Proceedings of National Academy of Sciences, U S A*, v.99, 1807-1812, 2002.

BIFULCO M. Role of the isoprenoid pathway in ras transforming activity, cytoskeleton organization, cell proliferation and apoptosis. *Life Science*, v.77, p.1740-1749, 2005.

BOGGS JM, RANGARAJ G. Interaction of lipid-bound myelin basic protein with actin filaments and calmodulin. *Biochemistry*, v.39, p.7799-7806, 2000.

BOGGS JM, RANGARAJ G, HILL CM. *et al.* Effect of arginine loss in myelin basic protein, as occurs in its deiminated charge isoform, on mediation of actin polymerization and actin binding to a lipid membrane in vitro. *Biochemistry*, v.44, p.3524-3534, 2005.

BOISON , D., STOFFEL, W. Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proceedings of National Academy of Sciences*, v.9, p.11709-11713, 1994.

BOTTENSTEIN, J.E AND SATO, G.H. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proceedings of National Academy of Sciences*, v.76, p.514-517, 1979.

BRANDT R. Cytoskeletal mechanisms of axon outgrowth and pathfinding. *Cell Tissue Research*, v.292, p.181-189, 1998.

BROPHY, P. Interactions of lipids with proteins of myelin and its associated cytoskeleton. In: *Myelin-Biology and Chemistry*, R.E. Martenson. ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 197-211, 1992.

BROUGHTON SK, CHEN H, RIDDLE A. *et al.* Large-scale generation of highly enriched neural stem-cell-derived oligodendroglial cultures: maturation-dependent differences in insulin-like growth factor-mediated signal transduction. *Journal of Neurochemistry*, v.100, p.628-638, 2007.

BRYANT MR, MARTA CB, KIM FS. *et al.* Phosphorylation and lipid raft association of fibroblast growth factor receptor-2 in oligodendrocytes. *Glia*, v.57, p.935-946, 2009.

BUNGE,M.P., BUNGE, R.P., RIS, H. Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord. *Journal Biophysical Biochemical Cytology*, v. 10, p.67-94, 1961.

BUNGE, R.P. Glial cells and the central myelin sheath. *Physiological Reviews*, v.48, 197-210, 1968.

BURRIDGE K, CHRZANOWSKA-WODNICKA M, ZHONG C. Focal adhesion assembly. *Trends in Cell Biology*, v.7, p.342-347,1997.

BUTTS BD, HOUDE C, MEHMET H. Maturation-dependent sensitivity of oligodendrocyte lineage cells to apoptosis: implications for normal development and disease. *Cell Death and Differentiation*, v.15, p.1178-1186, 2008.

CALVER, A.R., HALL, A.C., YU, W.P. *et al.* Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron*, v.20, p.869-882, 1998.

CALZÀ L, FERNANDEZ M, GIULIANI A. *et al.* Thyroid hormone and remyelination in adult central nervous system: a lesson from an inflammatory-demyelinating disease. *Brain Research Brain Research Reviews*, v.48, p.339-346, 2005.

CÂMARA J, FFRENCH-CONSTANT C. Lessons from oligodendrocyte biology on promoting repair in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, v.254, p.115-122, 2007.

CANOLL, P. D., MUSACCHIO, J. M. HARDY, R. *et al.* GGF/neuregulin is a neuronal signal that promotes the proliferation and survival and inhibits the differentiation of oligodendrocyte progenitors. *Neuron*, v.17, p.229-243, 1996.

CAPELLO, E., VOSKUHL, R.R., MCFARLAND H.F. *et al.* Multiple sclerosis: re-expression of a developmental gene in chronic lesions correlates with remyelination. *Annual Neurology*, v.41, p. 797-805, 1997.

CHANDRAN S, KATO H, GERRELI D. *et al.* FGF-dependent generation of oligodendrocytes by a hedgehog-independent pathway. *Development*, v.130, p.6599-6609, 2003.

CHEN L, KO CP. Extension of synaptic extracellular matrix during nerve terminal sprouting in living frog neuromuscular junctions. *Journal of Neuroscience*, v.14, p.796-808, 1994.

CHERESH DA, LENG J, KLEMKE RL. Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *Journal of Cell Biology*, v.146, p.1107-1116, 1999.

COLOGNATO H, BARON W, AVELLANA-ADALID V. *et al.* CNS integrins switch growth factor signalling to promote target-dependent survival. *Nature Cell Biology*, v.4, p.833-841, 2002.

CUI QL, ALMAZAN G. IGF-I-induced oligodendrocyte progenitor proliferation requires PI3K/Akt, MEK/ERK, and Src-like tyrosine kinases. *Journal of Neurochemistry*, v.100, 1480-1493, 2007.

DAI X, LERCHER LD, CLINTON PM. *et al.* The trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain. *Journal of Neuroscience*, v.23, p.5846-5853, 2003.

DAWSON MR, LEVINE JM, REYNOLDS R. NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *Journal of Neuroscience Research*, v.61, p.471-479, 2000.

DECKER L, FFRENCH-CONSTANT C. Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. *Journal of Neuroscience*, v.24, p.3816-3825, 2004.

DEL RIO HORTEGA, P. Histogenesis y evolución normal; exodo y distribución regional de la microglia. *Memor Real Soc Esp Hist Nat*, v.14, p.5-122, 1921.

DENNIS J, WHITE MA, FORREST AD. *et al.* Phosphodiesterase-Ialpha/autotaxin's MORFO domain regulates oligodendroglial process network formation and focal adhesion organization. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v.37, p.412-424, 2008.

- DIEHL, H.J., SCHAICH, M., BUDZINSKI, R.M. *et al.* Individual exons encode the integral membrane domains of human myelin proteolipid proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v.83, p.9807-9811, 1986.
- DOETSCH F, GARCIA-VERDUGO JM, ALVAREZ-BUYLLA A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *Journal of Neuroscience*, v.17, p.5046-5061, 1997.
- DOETSCH F. The glial identity of neural stem cells. *Nature Neuroscience*, v.6, p.1127-1134, 2003.
- DUDLEY DT, PANG L, DECKER SJ. *et al.* A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v.92, p.17, 7686-7689, 1995.
- DUGAS JC, IBRAHIM A, BARRES BA. A crucial role for p57(Kip2) in the intracellular timer that controls oligodendrocyte differentiation. *Journal of Neuroscience*, v.27, p.6185-6196, 2007.
- DYER, C.A., BENJAMINS, J.A. Organization of oligodendroglial membrane sheets. I. Association of myelin basic protein and CNPase with cytoskeleton. *Journal of Neuroscience Research*, v. 24, p. 201-211, 1989.
- DYER, C.A. Novel Oligodendrocyte Transmembrane Signaling Systems - Investigations Utilizing Antibodies as Ligands. *Molecular Neurobiology*, v. 7, p. 1-22, 1993.
- DYER CA, PHILLBOTTE T, WOLF MK. *et al.* Regulation of cytoskeleton by myelin components: studies on shiverer oligodendrocytes carrying an Mbp transgene. *Developmental Neuroscience*, v.19, p.395-409, 1997.
- DYER CA. The structure and function of myelin: from inert membrane to perfusion pump. *Neurochem Research*, v.27, p.1279-1292, 2002.
- ESPOSITO C, SCRIMA M, CAROTENUTO A. *et al.* Structures and micelle locations of the nonlipidated and lipidated C-terminal membrane anchor of 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase. *Biochemistry*, v.47, p.308-319, 2008.
- FEIGENSON K, REID M, SEE J. *et al.* Wnt signaling is sufficient to perturb oligodendrocyte maturation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v.49, p.105-111, 2009.
- FELTRI ML, SUTER U, RELVAS JB. The function of RhoGTPases in axon ensheathment and myelination. *Glia*, v.56, p.1508-1517, 2008.
- FERREIRA AA, PEREIRA MJ, MANHAES AC. *et al.* Ultrastructural identification of oligodendrocyte/myelin proteins in corpus callosum of hypothyroid animals. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v.25, p.87-94, 2007.
- FEWOU SN, RAMAKRISHNAN H, BUSSOW H. *et al.* Down-regulation of polysialic acid is required for efficient myelin formation. *Journal of Biological Chemistry*, v.282, p.16700-16711, 2007.

- FINCHAM VJ, JAMES M, FRAME MC. *et al.* Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *Embo Journal*, v.19, p.2911-2923, 2000.
- FISHKIND DJ, WANG YL. New horizons for cytokinesis. *Current Opinion in Cell Biology*, v.7, p.23-31, 1995.
- FOX MA, COLELLO RJ, MACKLIN WB. *et al.* Phosphodiesterase-Ialpha/autotaxin: a counteradhesive protein expressed by oligodendrocytes during onset of myelination. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v.23, p.507-519, 2003.
- FOX MA, ALEXANDER JK, AFSHARI FS. *et al.* Phosphodiesterase-I alpha/autotaxin controls cytoskeletal organization and FAK phosphorylation during myelination. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v.27, p.140-150, 2004.
- FROST E, KIERNAN BW, FAISSNER A. *et al.* Regulation of oligodendrocyte precursor migration by extracellular matrix: evidence for substrate-specific inhibition of migration by tenascin-C. *Developmental Neuroscience*, v.18, p.266-273, 1996.
- FROST E, ZHOU Z, KRASNESKY K. *et al.* Initiation of oligodendrocyte progenitor cell migration by a PDGF-A activated extracellular regulated kinase (ERK) signaling pathway. *Neurochemistry Research*, v.34, p.169-181, 2009.
- FUKUI Y. Toward a new concept of cell motility: cytoskeletal dynamics in amoeboid movement and cell division. *International Reviews of Cytology*, v.144, p.85-127, 1993.
- GAO FB, APPERLY J, RAFF M. Cell-intrinsic timers and thyroid hormone regulate the probability of cell-cycle withdraw and differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *Development Biology*, v.197, p.54-66, 1998.
- GAVIN RH. Microtubule-microfilament synergy in the cytoskeleton. *International Reviews of Cytology*, v.173, p.207-242, 1997.
- GHARAMI K, DAS S. Thyroid hormone-induced morphological differentiation and maturation of astrocytes are mediated through the beta-adrenergic receptor. *Journal of Neurochemistry*, v.75, p.1962-1969, 2000.
- GHARAMI K, DAS S. Delayed but sustained induction of mitogen-activated protein kinase activity is associated with beta-adrenergic receptor-mediated morphological differentiation of astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, v.88, p.12-22, 2004.
- GHOSH M, GHARAMI K, PAUL S. *et al.* Thyroid hormone-induced morphological differentiation and maturation of astrocytes involves activation of protein kinase A and ERK signalling pathway. *European Journal of Neuroscience*, v. 22, p.1609-1617, 2005.
- GREER JM, LEES MB. Myelin proteolipid - the first 50 years. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.34, p. 211-215, 2002.
- GRINSPAN J. Cells and signaling in oligodendrocyte development. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v.61, p.297-306, 2002.

HAMANOUE M, SATO K, TAKAMATSU K. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase-induced apoptosis in cultured mature oligodendrocytes using SB202190 and SB203580. *Neurochemistry International*, v.51, p.16-24, 2007.

HARDY R, REYNOLDS R. Neuron-oligodendroglial interactions during central nervous system development. *Journal of Neuroscience Research*, v.36, p.121-126, 1993.

HARDY R, FRIEDRICH VL. Oligodendrocyte progenitors are generated throughout the embryonic mouse brain, but differentiate in restricted foci. *Development*, v.122, p.2059-2069, 1996.

HART IK, RICHARDSON WD, HELDIN CH. *et al.* PDGF receptors on cells of the oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) cell lineage. *Development*, v.105, p.595-603, 1989.

HAYDON PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, v.2, p.185-193, 2001.

HOSHINA N, TEZUKA T, YOKOYAMA K. *et al.* Focal adhesion kinase regulates laminin-induced oligodendroglial process outgrowth. *Genes Cells*, v.12, p.1245-1254, 2007.

HOWE AK, APLIN AE, JULIANO RL. Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. *Current Opinion on Genetic Development*, v.12, p.30-35, 2002.

HU X, JIN L, FENG L. Erk1/2 but not PI3K pathway is required for neurotrophin 3-induced oligodendrocyte differentiation of post-natal neural stem cells. *Journal of Neurochemistry*, v.90, p.1339-1347, 2004.

JACOBSON M. *Developmental neurobiology*. ix. Plenum Press; New York, p. 776pp, 1991.

JAKOVCEVSKI I, ZECEVIC N. Olig transcription factors are expressed in oligodendrocyte and neuronal cells in human fetal CNS. *Journal of Neuroscience*, v.25, p.10064-10073, 2005.

JAKOVCEVSKI I, MO Z, ZECEVIC N. Down-regulation of the axonal polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression coincides with the onset of myelination in the human fetal forebrain. *Neuroscience*, v.26, p.328-337, 2007.

JAKOVCEVSKI I, FILIPOVIC R, MO Z. *et al.* Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Frontiers in Neuroanatomy*, p.3:5, 2009.

JIANG F, FREDERICK TJ, WOOD TL. IGF-I synergizes with FGF-2 to stimulate oligodendrocyte progenitor entry into the cell cycle. *Developmental Biology*, v.232, p.414-423, 2001.

JOHE KK, HAZEL TG, MULLER T. *et al.* Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Development*, v.10, p.3129-3140, 1996.

JONES SA, JOLSON DM, CUTA KK. *et al.* Triiodothyronine is a survival factor for developing oligodendrocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.199, p.49-60, 2003.

JULIANO RL, REDDIG P, ALAHARI S. *et al.* Integrin regulation of cell signalling and motility. *Biochemical Society Transactions*, v.32, p.443-446, 2004.

KAPLAN MR, CHO MH, ULLIAN EM. *et al.* Differential control of clustering of the sodium channels Na(v)1.2 and Na(v)1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron*, v.30, p.105-119, 2001.

KETTENMANN, H; RANSOM, B.R. *Neuroglia* (2<sup>nd</sup> ed.), New York:Oxford University Press.; 624pp, 2004.

KIPPERT A, TRAJKOVIC K, RAJENDRAN L. *et al.* Rho regulates membrane transport in the endocytic pathway to control plasma membrane specialization in oligodendroglial cells. *Journal of Neuroscience*, v.28, p.3560-3570, 2007.

KLUGMANN M, SCHWAB MH, PUHLHOFER A. *et al.* Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron*, v.18, p. 59-70, 1997.

KNAPP PE, BARLETT WP, SKOFF RP. Culture oligodendrocytes mimic in vivo phenotypic characteristics: cell shape, expression of myelin specific antigens, and membrane production. *Development Biology*, v.120, p.356-365, 1987.

KONDO T, RAFF M(a). Basic helix-loop-helix proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Development*, v.127, p.2989-2998, 2000.

KONDO T, RAFF M(b). The Id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo Journal*, v.19, p.1998-2007, 2000.

LACHAPELLE F, DUHAMEL-CLERIN E, GANSMULLER A. *et al.* Transplanted transgenically marked oligodendrocytes survive, migrate and myelinate in the normal mouse brain as they do in the shiverer mouse brain. *European Journal of Neuroscience*, v.6, p.814-824, 1994.

LAURSEN LS, FFRENCH-CONSTANT C. Adhesion molecules in the regulation of CNS myelination. *Neuron Glia Biology*, v.3, p.367-375, 2007.

LEARISH RD, BRUSS MD, HAAK-FRENDSCHO M. Inhibition of mitogen-activated protein kinase blocks proliferation of neural progenitor cells. *Brain Research Developmental Brain Research*, v.122, p.97-109, 2000.

LEE J, GRAVEL M, ZHANG R. *et al.* Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *Journal of Cell Biology*, v.170, p.661-673, 2005.

LEES MB, BROSTOFF SW. Proteins of myelin. In: *Myelin* P. Morell, ed. Plenum Publishing Corp., New York, pp.197-224, 1984.

LEND AHL U, ZIMMERMAN LB, MCKAY RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, v.60, p.585-595, 1990.

- LI W, SHE H. The SH2 and SH3 adapter Nck: a two-gene family and a linker between tyrosine kinases and multiple signaling networks. *Histology and Histopathology*, v.15, p.947-955, 2000.
- LIANG X, DRAGHI NA, RESH MD. Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience*, v.24, p.7140-7149, 2004.
- LU QR, YUK D, ALBERTA JA. *et al.* Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron*, v.25, p.317-329, 2000.
- LU Z, KU L, CHEN Y. *et al.* Developmental abnormalities of myelin basic protein expression in fyn knock-out brain reveal a role of Fyn in posttranscriptional regulation. *Journal Biological Chemistry*, v.280, p.389-395, 2005.
- LUDWIN SK. The pathobiology of the oligodendrocytes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v.56, p.111-124, 1997.
- LUNN KF, BAAS PW, DUNCAN ID. Microtubule Organization and Stability in the Oligodendrocyte. *Journal of Neuroscience*, v.17, p.921-4932, 1997.
- MACKLIN WB, CAMPAGNONI CW, DEININGER PL. *et al.* Structure and expression of the mouse myelin proteolipid protein gene. *Journal of Neuroscience Research*, v.18, p.383-394, 1987.
- MATHIS C, DENISENKO-NEHRBASS N, GIRAULT JA. *et al.* Essential role of oligodendrocytes in the formation and maintenance of central nervous system nodal regions. *Development*, v.128, p.4881-4890, 2001.
- MATSUDA Y, KOITO H, YAMAMOTO H. Induction of myelin-associated glycoprotein expression through neuron-oligodendrocyte contact. *Brain Research Developmental Brain Research*, v.100, p.110-116, 1997.
- MCNULTY S, CROUCH M, SMART D. *et al.* Differentiation of bipolar CG-4 line oligodendrocytes is associated with regulation of CREB, MAP kinase and PKC signalling pathways. *Neuroscience Research*, v.41, p.217-226, 2001.
- MI Z, MIRNICS ZK, SCHOR NF. Bcl-2 overexpression disrupts the morphology of PC12 cells through reduced ERK activation. *Brain Research*, v.1112, p.46-55, 2006.
- MILLER RH. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Progress in Neurobiology*, v.67, p.451-467, 2002.
- MORELLO D, DAUTIGNY A, PHAM-DINH D. *et al.* Myelin proteolipid protein (PLP and DM-20) transcripts are deleted in jumpy mice. *EMBO Journal*, v.5, p.3489-3493, 1986.
- NASKA S, PARK KJ, HANNIGAN GE. *et al.* An essential role for the integrin-linked kinase-glycogen synthase kinase-3 beta pathway during dendrite initiation and growth. *Journal of Neuroscience*, v.26, p.13344-13356, 2006.



NDUBAKU U, DE BELLARD ME. Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochemica*, v.110, p.182-195, 2008.

NISHIYAMA A, LIN XH, GIESE N. *et al.* Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. *Journal of Neuroscience Research*, v.43, p.315-330, 1996.

O'NEILL RC, MINUK J, COX ME. *et al.* CNP2 mRNA directs synthesis of both CNP1 and CNP2 polypeptides. *Journal of Neuroscience Research*, v.50, p.248-257, 1997.

OHYA W, FUNAKOSHI H, KUROSAWA T. *et al.* Hepatocyte growth factor (HGF) promotes oligodendrocyte progenitor cell proliferation and inhibits its differentiation during postnatal development in the rat. *Brain Research*, v.1147, p.51-65, 2007.

ORENTAS DM, MILLER RH. A novel form of migration of glial precursors. *Glia*, v.16, p.27-39, 1996.

PARSONS JT, MARTIN KH, SLACK JK. *et al.* Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene*, v.19, p.5606-5613, 2000.

PEDRAZA L, OWENS GC, GREEN LA. *et al.* The active transport of myelin basic protein into the nucleus suggest a regulatory role in myelination. *Neuron*, v.18, p.579-589, 1997.

PELES E, SALZER J L. Molecular domains of myelinated axons. *Current Opinion on Neurobiology*, v.10, p.558-565, 2000.

PENFIELD, W. Neuroglia: normal and pathological. *Cytology and Cellular Pathology in the Nervous System*, v.2, p.421-479, 1932.

PETERS A, PALAY S, WEBSTER HF. *The Fine Structure of the Nervous System: the Neuron and the Supporting Cells*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press, 1991.

PFEIFFER SE. Oligodendrocyte development in cultures system. *Advances in Neurochemistry*, v.5, p.233-298, 1984.

PFEIFFER SE, WARRINGTON AE, BANSAL R. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends in Cell Biology*, Press, Ames, Iowa, 593 pp. v.3, p.191-197, 1993.

PRINGLE NP, RICHARDSON WD. A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development*, v.117, p.525-533, 1993.

PRIVAT A, JACQUE C, BOURRE J M. *et al.* Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse shiverer. *Neuroscience Letters*, v.12, p.107-112, 1979.

PULLIKUTH AK, CATLING AD. Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective. *Cell Signal*, v.19, p.1621-1632, 2007.

- QIAN Z, WANG Q, PU Y. Brain iron and neurological disorders. *Chinese Medical Journal (Engl)*, v.110, p.455-458, 1997.
- RAFF MC. Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science*, v.243, p.1450-1455, 1989.
- RAKIC S, ZECEVIC N. Emerging complexity of layer I in human cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, v.13, p.1072-1083, 2003.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *et al. Farmacologia* (6<sup>a</sup> ed.), Rio de Janeiro: Elsevier, 829p, 2007.
- RASBAND MN, SHRAGER P. Ion channel sequestration in central nervous system axons. *Journal of Physiology*, v.525, p.63-73, 2000.
- RASBAND MN, TAYLER J, KAGA Y. *et al.* CNP is required for maintenance of axon-glia interactions at nodes of Ranvier in the CNS. *Glia*, v.50, p.86-90, 2005.
- RENSHAW MW, TOKSOZ D, SCHWARTZ MA. Involvement of the small GTPase rho in integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, v.271, p.21691-21694, 1996.
- RICHTER-LANDSBERG C. The oligodendroglia cytoskeleton in health and disease. *Journal of Neuroscience Research*, v.59, p.11-18, 2000.
- RODRIGUEZ-PEÑA A, IBARROLA N, INIGUEZ MA. *et al.* Neonatal hypothyroidism affects the timely expression of myelin-associated glycoprotein in the rat brain. *Journal of Clinical Investigation*, v.91, p.812 – 818, 1993.
- RODRIGUEZ-PEÑA A. Oligodendrocyte development and thyroid hormone. *Journal of Neurobiology*, v.40, p.497-512, 1999.
- ROME LH, BULLOCK PN, CHIAPPELLI F. *et al.* Synthesis of a myelinated membrane by oligodendrocytes in culture. *Journal of Neuroscience Research*, v.15, p.49- 65, 1986.
- ROOTS BI, VERNADAKIS A. The Evolution of Myelinating Cells. From: *Neuron-Glia interrelations during Phylogeny: I. Phylogeny and Ontogeny of Glial Cells*, Eds. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1995.
- ROWITCH DH, LU QR, KESSARIS N. *et al.* An 'oligarchy' rules neural development. *Trends Neuroscience*, v.25, p.417-422, 2002.
- ROWITCH DH. Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nature Review Neuroscience*, v.5, p.409-419, 2004.
- SARLIÉVE LL, FABRE M, SUSZ J. *et al.* Investigations on myelination in vitro: IV. "Myelin-like" or premyelin structures in cultures of dissociated brain cells from 14--15-day-old embryonic mice. *Journal of Neuroscience Research*, v.10, p.191-210, 1983.
- SCHLAEPFER DD, MITRA SK. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Current Opinion on Genetic Development*, v.14, p.92-101, 2004.

SEE JM, GRINSPAN JB. Sending mixed signals: bone morphogenetic protein in myelination and demyelination. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v.68, p.595-604, 2009.

SEIFERT G, SCHILLING K, STEINHAUSER C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, v.7, p.194-206, 2006.

SHERMAN DL, BROPHY PJ. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nature Reviews Neuroscience*, v.6, p.683-690, 2005.

SHI J, MARINOVICH A, BARRES BA. Purification and characterization of adult oligodendrocyte precursor cells from the rat optic nerve. *Journal of Neuroscience*, v.18, p.4627-4636, 1998.

SIMPSON PB, ARMSTRONG RC. Intracellular signals and cytoskeletal elements involved in oligodendrocyte progenitor migration. *Glia*, v.26, p.22-35, 1999.

SNEDECOR GW, COCHRAN WG. *Statistical Methods* (6th ed.), Iowa State Univ, 1967.

SOLLY SK, THOMAS JL, MONGE M. *et al.* Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia*, v.18, p.39-48, 1996.

SOMMER I, SCHACHNER M. Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Developmental Biology*, v.83, p.311-327, 1981.

SONG J, ROLFE BE, CAMPBELL JH. *et al.* Changes in three-dimensional architecture of microfilaments in cultured vascular smooth muscle cells during phenotypic modulation. *Tissue Cell*, v.30, p.324-333, 1998.

SONG J, GOETZ BD, BAAS PW. *et al.* Cytoskeletal reorganization during the formation of oligodendrocyte processes and branches. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v.17, p.624-636, 2001.

SPRINKLE TJ. 2'3'-cyclic nucleotide-3-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Critical Review on Neurobiology*, v.4, p.235-301, 1989.

STANKOFF B, AIGROT MS, NOEL F. *et al.* Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *Journal of Neuroscience*, v.22, p.9221-9227, 2002.

STARHA RL, KIKUCHI S, SIOW YL. *et al.* Role of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in oligodendroglial process extension. *Journal of Neurochemistry*, v.68, p.945-953, 1997.

STARHA RL, KIM SU. Protein kinase C and mitogen-activated protein kinase signalling in oligodendrocytes. *Microscopy Research and Technique*, v.52, p.680-688, 2001.

- STOLT CC, REHBERG S, ADER M. *et al.* Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Development*, v.16, p.165-170, 2002.
- TAGUCHI K, YOSHINAKA K, YOSHINO KI. *et al.* Biochemical and morphologic evidence of oligodendrocyte membrane rafts with actin filaments. *Journal of Neuroscience Research*, v.81, p.218-225, 2005.
- TEMPLE S, RAFF MC. Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell*, v.44, p.773-779, 1986.
- TIMSIT S, MARTINEZ S, ALLINQUANT B. *et al.* Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *Journal of Neuroscience*, v.15, p.1012-1024, 1995.
- TSUKADA Y, KURIHARA T. 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase; molecular characterization and possible functional significance. In *Myelin: Biology and Chemistry*. Martenson RE (ed). Boca Raton: CRC Press, pp.449-480, 1992.
- TUASON MC, RASTIKERDAR A, KUHLMANN T. *et al.* Separate proteolipid protein/DM20 enhancers serve different lineages and stages of development. *Journal of Neuroscience*, v.28, p.6895-6903, 2008.
- VAN'T VEER A, DU Y, FISCHER TZ. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor effects on oligodendrocyte progenitors of the basal forebrain are mediated through trkB and the MAP kinase pathway. *Journal of Neuroscience Research*, v.87, p.69-78, 2009.
- VOGEL US, THOMPSON RJ. Molecular structure, localization and possible functions of the myelin-associated enzyme 2'3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase. *Journal of Neurochemistry*, v.50, p.1667-1677, 1988.
- WANG S, SDRULLA AD, DISIBIO G. *et al.* Notch receptor activation inhibits oligodendrocytes differentiation. *Neuron*, v.21, p.63-75, 1998.
- WILSON R, BROPHY PJ. Role for the oligodendrocyte cytoskeleton in myelination. *Journal of Neuroscience Research*, v.22, p.439-448, 1989.
- WOLF RM, WILKES JJ, CHAO MV. *et al.* Tyrosine phosphorylation of p190 RhoGAP by Fyn regulates oligodendrocyte differentiation. *Journal of Neurobiology*, v.49, p.62-78, 2001.
- YANDAVA BD, BILLINGHURST LL, SNYDER EY. "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v.96, p.7029-7034, 1999.
- YASUDA T, GRINSPAN J, STERN J. *et al.* Apoptosis occurs in the oligodendroglial lineage, and is prevented by basic fibroblast growth factor. *Journal of Neuroscience Research*, v.40, p.306-317, 1995.
- YOUNES-RAPOZO V, BERENDONK J, SAVIGNON T. *et al.* Thyroid hormone deficiency changes the distribution of oligodendrocyte/myelin markers during oligodendroglial

differentiation in vitro. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v.24, p.445-453, 2006.

YUELLING LM, FUSS B. Autotaxin (ATX): a multi-functional and multi-modular protein possessing enzymatic lysoPLD activity and matricellular properties. *Biochimic et Biophysica Acta*, v.1781, p.525-530, 2008.

YUMURA S, FUKU Y. Spatiotemporal dynamics of actin concentration during cytokinesis and locomotion in Dictyostelium. *Journal of Cell Science*, v.111, p. 2097-2108, 1998.

ZHOU Q, WANG S, ANDERSON DJ. Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron*, v.25, p.331-343, 2000.

ZHOU Q, ANDERSON DJ. The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell*, v.109, p.61-73, 2002.

ZHOU YX, ARMSTRONG RC. Interaction of fibroblast growth factor 2 (FGF2) and notch signaling components in inhibition of oligodendrocyte progenitor (OP) differentiation. *Neuroscience Letters*, v.421, p.27-32, 2007.

ZHU X, ASSOIAN RK. Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Molecular Biology of the Cell*, v.6, p.273-282, 1995.