



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


Luiz Otávio Ribeiro de Lemos Felgueiras

**A modulação da vida do AMPc/PKA altera a morfologia da
oligodendroglia e a distribuição das proteínas CNPase e MAG *in*
*vitro***

Rio de Janeiro
2012

Luiz Otávio Ribeiro de Lemos Felgueiras

A modulação da via do AMPc/PKA altera a morfologia da oligodendroglia e a distribuição das proteínas CNPase e MAG *in vitro*



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

Orientadora: Prof.^a Dra. Penha Cristina Barradas Daltro-Santos

Rio de Janeiro

2012

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

F316 Felgueiras, Luiz Otávio Ribeiro de Lemos.
A modulação da via do AMPc/PKA altera a morfologia da oligodendroglia e a distribuição das proteínas CNPase e MAG in vitro. / Luiz Otávio Ribeiro de Lemos Felgueiras – 2012.
68f.

Orientadora: Penha Cristina Barradas Dalto Santos.

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

1. Oligodendroglia - Teses. 2. Proteínas da Mielina. 3. 2',3'-Nucleotídeo Cíclico 3'-Fosfodiesterases. 4. 3',5'-AMP Cíclico Fosfodiesterases. I. Santos, Penha Cristina Barradas Dalto Santos. 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 dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Luiz Otávio Ribeiro de Lemos Felgueiras

A modulação da via do AMPc/PKA altera a morfologia da oligodendroglia e a distribuição das proteínas CNPase e MAG *in vitro*

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

Aprovada em 5 de março de 2012.

Orientadora: Prof.^a Dra. Penha Cristina Barradas Daltro Santos

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Elizabeth Giestal de Araújo
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Iolanda Marguerita Fierro
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Dra. Luciana Nogaroli Cavalcante
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação àquele que possa vir necessitar dela como fonte de consulta.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo à Deus pelo força de sempre.

Aos meus pais, Dona Lucia e Seu Luiz pela preocupação e carinho de sempre.

À minha irmã Thaíssa por se preocupar comigo.

À futura senhora L.O., Ana Cláudia simplesmente por tudo! Pelo carinho, pela paciência, por entender os momentos em que eu não poderia dar atenção direito, por se preocupar comigo e por sempre levantar a minha moral.

À Professora Penha, por me aceitar no laboratório e pelas ajudas na dissertação e no projeto.

À Vivi, pela ajuda de sempre, não vai ser um corredor que irá nos separar.

Ao Frank, por sempre querer ensinar algo e pelas dicas cinematográficas.

Aos professores Olga e Marcos pelas conversas.

Ao Tiagão pelos momentos gordinhos no CASAF ou no MegaMatte.

À sempre horrorosa Gabriela Skinner por ter entendido o meu projeto no final do mestrado e por achar que precisava abrir minha mente.

Aos doutorandos Bruna e Paulinho, pelas conversas, desabafos, risos, gargalhadas, ajudas, dúvidas sanadas, músicas, enfim por tudo que engloba uma vida no mestrado.

Ao João que chegou no meio do caminho e tentou me auxiliar sempre que pode.

Ao Michael e Gabizinha que sempre perguntam como eu estou e se está tudo bem.

Ao Professor Alex pelas ajudas e perguntas pertinentes durante o mestrado.

Aos ICs Bela (besta), Guedes e à mestranda Marta pelas risadas.

À professora Beth sempre atenciosa.

Ao ex-BBB Tiago pelas caronas, preocupações e amizade.

Por fim, todos que possam ter contribuído de alguma forma para esse projeto andar e ser terminado.

Sou mais Deus do que as ondas de medo que abalam o coração. Sou mais eu do que as ondas de medo que abalam o coração.

Noite e Dia – Allan Filho

RESUMO

FELGUEIRAS, Luiz Otávio Ribeiro de Lemos. *A modulação da via do AMPc/PKA altera a morfologia da oligodendroglia e a distribuição das proteínas CNPase e MAG in vitro*. 2012. 68f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A diferenciação da oligodendroglia depende de alterações coordenadas no citoesqueleto e na sua relação com a membrana plasmática, um componente importante para a formação da bainha de mielina. A 2'3' nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase (CNPase) está relacionada com a organização do citoesqueleto, sendo uma proteína ancoradora de microtúbulos na membrana plasmática. *In vitro*, a CNPase compõe, com a F-actina e os microtúbulos, as estruturas semelhantes a nervuras ou os componentes radiais. A glicoproteína associada a mielina (MAG), também é importante para a formação dos véus de membrana e está associada a CNPase e a tubulina. Além disso, as três proteínas podem ser reguladas pela via de sinalização do AMPc/PKA. Buscando avaliar os efeitos da via do AMPc/PKA na regulação da diferenciação oligodendroglial, culturas de hemisférios cerebrais com 5 dias foram tratadas por 30 min ou 24 h com o inibidor (SQ22356-SQ [1 µM]) ou com o ativador (forskolina [10µM]) da adenilato ciclase ou com o inibidor da PKA, H-89 [1 µM]. A oligodendroglia foi identificada pelo anticorpo anti-CNPase e por sua morfologia. Com 30 min de tratamento com forskolina, as células das culturas tratadas apresentaram prolongamentos maiores e menos véus de membrana quando comparadas às culturas controle. O tratamento com SQ também causou um aumento no tamanho dos prolongamentos e o tratamento com H-89 causou a redução no tamanho dos prolongamentos e nos véus de membrana. Com 24 h, as células tratadas com forskolina apresentaram poucos prolongamentos, já as culturas tratadas com SQ apresentaram um aumento no tamanho do prolongamento e as tratadas com H-89 demonstraram redução no véu de membrana. Observamos também alterações na distribuição da CNPase, tubulina e MAG, a primeira apresentou uma concentração próxima ao núcleo depois dos dois tempos de tratamento com H-89, o mesmo ocorreu com a tubulina. A CNPase adquiriu ainda um padrão puntiforme depois de 24 h de tratamento com ambos os inibidores. A MAG apresentou um aumento na concentração próximo ao núcleo depois de 30 min de tratamento com forskolina e SQ. O tratamento com SQ também reduziu a distribuição da MAG nos véus de membrana. A mesma redução foi observada depois de 24 h de tratamento com H-89. Esses resultados reforçam a participação da via do AMPc/PKA no desenvolvimento da oligodendroglia, incluindo a formação dos prolongamentos, suas ramificações e ainda a formação dos véus de membrana, com prováveis consequências na formação e manutenção da bainha de mielina.

Palavras-chave: Oligodendrócitos. Desenvolvimento. Via do AMPc/PKA. Proteínas de mielina.

ABSTRACT

FELGUEIRAS, Luiz Otávio Ribeiro de Lemos. *The modulation of AMPc/PKA pathway changes the oligodendroglia morphology and proteins CNPase and MAG distribution in vitro*. 2012. 68f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Oligodendroglial differentiation depends on coordinated changes in the cytoskeleton and on its relationship with the plasmatic membrane, a critical site regarding the formation of the myelin sheath. 2'3'cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase (CNPase) is related to cytoskeleton modulation, anchoring microtubules to the plasmatic membrane. In vitro, CNPase composes, together with F-actin and microtubules, the vein-like structures or radial components in myelin sheath. Myelin associated glycoprotein (MAG) is important to membrane vellum formation and is associated with CNPase and tubulin. Besides, the AMPc/PKA pathway can regulate these three proteins. In order to evaluate the effects of the cAMP/PKA pathway modulation on oligodendroglial differentiation, cultures of cerebral hemispheres were treated for 30 min or 24 h with the adenylyl cyclase inhibitor SQ22536 – SQ [1 IM] or with its activator forskolin [10 IM], or with the PKA inhibitor H-89 [1 IM]. Oligodendroglia was identified using anti-CNPase antibody as also by morphology. At 30 min, the cells treated with forskolin showed bigger processes and a shorter membrane vellum when compared to control cultures, the treatment with SQ caused an increase in the processes length, the H-89 treatment reduced the processes length and the membrane vellum. At 24 h, cultures treated with forskolin showed few processes when compared to control cultures. Cultures treated with SQ showed an increase in the processes length and after H89 treatment oligodendroglial cells presented a reduction in the membrane vellum. We also observed alterations in the distribution of CNPase, tubulin and MAG, the first showed an increase in the distribution closest to nucleus in both periods of H-89 treatment, the same pattern occurred for tubulin. The CNPase acquired a punctiform pattern after 24 hours of treatment with both inhibitors. The MAG also showed an increase closest to nucleus after 30 minutes of treatment with forskolin and SQ. The SQ treatment also caused a reduction in the protein distribution to membrane vellum. The same reduction is observed after 24 hours of treatment with H-89. These findings reinforce a role for AMPc/PKA pathway in oligodendroglial differentiation including the processes extension and arborization as also the formation of membranar vellum, with possible consequences in the formation and maintenance of myelin sheath.

Keywords: Oligodendrocyte. Development. AMPc/PKA pathway. Myelin proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema representativo da classificação morfológica nas diferentes fases de maturação.....	18
Figura 2 -	Esquema do oligodendrócito e sua bainha de mielina.....	24
Figura 3 -	Representação esquemática de um modelo proposto de desenvolvimento em culturas de oligodendrócito.....	27
Figura 4 -	Representação esquemática da interação entre as vias da MAPK/ERK e do AMPc/PKA.....	32
Figura 5 -	Esquema representativo da via do AMPc/PKA, MAPK/ERK e do AMPc/PKA.....	34
Figura 6 -	Oligodendrócitos com 5 div imunorreagidos com o anticorpo anti-CNPase.....	42
Figura 7 -	Oligodendrócitos com 6 div imunorreagidos com o anticorpo anti-CNPase.....	43
Figura 8 -	Oligodendrócitos com 5 e 6 div imunorreagidos com os anticorpos anti-CNPase e anti-tubulina e corados com DAPI.....	45
Figura 9 -	Oligodendrócitos com 5 e 6 div imunorreagidos com os anticorpos anti-CNPase e anti-tubulina e corados com DAPI.....	46
Figura 10 -	Oligodendrócitos com 5 e 6 div imunorreagidos com os anticorpos anti-CNPase e anti-tubulina e corados com DAPI.....	47
Figura 11 -	Oligodendrócitos com 5 e 6 div imunorreagidos com os anticorpos anti-CNPase e anti-MAG e corados com DAPI.....	49
Figura 12 -	Oligodendrócitos com 5 e 6 div imunorreagidos com os anticorpos anti-CNPase e anti-MAG e corados com DAPI.....	50
Figura 13 -	Oligodendrócitos com 5 e 6 div imunorreagidos com os anticorpos anti-CNPase e anti-MAG e corados com DAPI.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Anticorpos utilizados para a técnica de imunocitoquímica.....	40
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A2B5 -	Poligangliosídeo de superfície
AKAP -	Proteínas de ancoragem cinase-A
AMPc -	Monofosfato de adenosina cíclico
bFGF -	Fator de crescimento de fibroblasto básico
BSA -	Albumina Bovina sérica
CNPase -	2',3' nucleotídeo- cíclico 3'fosfodiesterase
div -	Dias <i>in vitro</i>
Dcc -	Receptor de neutrina-1 deletado em carcinoma colorretal
DMEM–F12 -	Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco
DMSO -	Dimetil sulfóxido
ECM -	Matriz extracelular
Epac -	Proteína de troca diretamente ativada pelo AMPc
ERK -	Cinase regulada por sinais extracelulares
FAK -	Cinase de adesão focal
GalC -	Galactocerebrosídeo
GD3 -	Gangliosídeo 9-O-acetil
GGF -	Fator de crescimento glial
GTP -	Guanosina tri-fosfato
HGF -	Fator de Crescimento de Hepatócitos
MAG -	Glicoproteína associada à mielina
MAPK -	Cinase ativada por mitógenos
MBP -	Proteína Básica de Mielina
MMP -	Metaloproteína
MOBP -	Proteína Básica de Oligodendrócito associada à Mielina
MOG -	Glicoproteína de oligodendrócito e mielina
MRF -	Fator regulatório do gene da mielina
NG2 -	Proteoglicanos sulfatados
OPC -	Célula precursora de oligodendrócito
PAK -	Cinase ativada por p21
PBS -	Salina tamponada por tampão fosfato
PDGF -	Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGFR α -	Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas
PKA -	Proteína cinase dependente de AMPc
PLP -	Proteína Proteolipídica
POA -	Antígeno pró-oligodendroblasto
PSA-NCAM -	Forma embrionária polisialilada da molécula de adesão celular neural
Rho GTPases -	Rho – Guanosina trifosfatases
ROCK -	Rho Cinase
RNA _m -	Ácido Ribonucléico mensageiro
SNC -	Sistema Nervoso Central
SNP -	Sistema Nervoso Periférico
SQ -	SQ22356
SVZ -	Zona subventricular
T3 -	Triiodotironina

LISTA DE SÍMBOLOS

mL – Mililitro
μL – Microlitro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	OBJETIVOS.....	37
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1	Obtenção dos animais.....	38
2.2	Cultura primária de oligodendrócitos.....	38
2.3	Avaliação da via de sinalização do AMPc/PKA.....	39
2.4	Reação imunocitoquímica.....	39
2.5	Análise e aquisição de imagens.....	40
3	RESULTADOS.....	41
4	DISCUSSÃO.....	52
	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59

INTRODUÇÃO

O surgimento dos oligodendrócitos mielinizantes no sistema nervoso central e das células de Schwann no sistema nervoso periférico compõe um grande avanço evolutivo que permitiu a formação e desenvolvimento de funções mais complexas. Além do embainhamento dos axônios, que facilita a condução elétrica, os oligodendrócitos cumprem diversos papéis como o desenvolvimento correto de neurônios, manutenção da integridade axonal e a participação em vias de sinalização com neurônios. (Baumann & Pham-Dihn, 2001, Bergles et al., 2000, Lin & Bergles, 2004). Foi del Rio Hortega quem introduziu o termo *oligodendroglia* em 1921; esta palavra passou então a identificar o grupo de células com as seguintes características: poucos prolongamentos, corpos celulares esféricos ou poligonais, núcleos celulares que podem ser redondos, ovais ou ainda irregulares. Como o núcleo celular dos oligodendrócitos geralmente se encontra excêntrico, uma grande quantidade de citoplasma pode acabar se localizando em um polo da célula (Peters et al., 1991). Quando comparados às outras células da glia, como os astrócitos, é fácil distinguir as células da oligodendroglia pela grande densidade do citoplasma e do núcleo, a ausência de fibrilas e glicogênio no citoplasma e a presença de um grande número de microtúbulos nos prolongamentos (Peters et al., 1991).

Os oligodendrócitos formam prolongamentos que entram em contato com o axônio e o envolvem em um trecho (Bunge et al., 1962, Bunge, 1968), como resultado é formada uma pilha de membranas fortemente ligadas entre si por suas superfícies citosólicas e externas (Waxman, 2006). Uma única célula é capaz de envolver mais de 50 segmentos de axônios, sendo que em um mesmo axônio, diferentes segmentos pertencem a diferentes oligodendrócitos (Baumann & Pham-Dihn, 2001).

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

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

Os progenitores de oligodendrócitos migram grandes distâncias pelo sistema nervoso central antes de terminarem a sua diferenciação na forma de oligodendrócitos mielinizantes (Small et al., 1987). Assim como ocorre com os neurônios, a migração dos oligodendrócitos recebe a influência e o controle de várias moléculas da matriz extracelular (ECM). A tenascina-C, por exemplo, é expressa em grandes níveis na junção do nervo óptico com a retina em ratos, local por onde os oligodendrócitos não migram, o que previne o acesso de células mielinizantes às células da retina (Ffrench-Constant et al., 1988). Por isso, acredita-se que a tenascina-C possa ser uma barreira para os oligodendrócitos migratórios neste local (Bartsch et al., 1994). Os progenitores também expressam um grupo diferente de integrinas (Milner et al., 1996) que podem modular interações específicas da célula com os componentes da matriz, como a trombospondina-1 que pode estar envolvida na regulação da migração (Scoot-Drew & Ffrench-Constant, 1997).

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

Estágios de desenvolvimento do oligodendrócito

Como a diferenciação dos oligodendrócitos no SNC ocorre de forma tardia, o desenvolvimento desse grupo de células sofre a influência de diferentes sinais que podem ser oriundos dos diversos tipos celulares, pois todos secretam moléculas específicas que atuam como moléculas de sinalização para as células vizinhas. Os neurônios, por exemplo, liberam o Fator de Crescimento Glial (GGF), os astrócitos por sua vez liberam o Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico (bFGF) e ambos liberam o Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) e o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF). PDGF e bFGF são fatores que atuam na regulação da proliferação de células precursoras de oligodendrócitos (OPC), iniciação do crescimento de prolongamentos primários e a migração celular dependente de Ca^{2+} (Simpson & Armstrong, 1999). Estes fatores são capazes ainda de inibir a diferenciação celular.

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

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

Entre os marcadores de progenitores, temos: gangliosídeos de superfície identificados pelo anticorpo A2B5 (Raff, 1989); o receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGFR α (Hart et al., 1989; Decker & French-Constant, 2004); os proteoglicanos sulfatados (NG2) (Nishiyama, et al., 1996), que aparecem logo depois do PDGFR α e se co-localizam com este tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Nishiyama et al., 1996); a forma embrionária polisialilada da molécula de

adesão celular neural (PSA-NCAM); a nestina, uma proteína que distingue linhagens de células neuroepiteliais (Lendahl et al., 1990); e o RNAm da 2',3' nucleotídeo cíclico 3'fosfodiesterase (CNPase), que é o primeiro marcador protéico específico de oligodendrócito a surgir.

No SNC de mamíferos, os progenitores se dispõem pelos tratos das fibras onde será formada a substância branca e então se desenvolvem os pré-oligodendrócitos. Estas células passam a ter mais prolongamentos, continuam tendo capacidade proliferativa, apresentam o marcador O4 (Sommer and Schachner, 1981) e também o antígeno pró-oligodendroblasto (POA). Nesta etapa do desenvolvimento, as células ficam menos móveis (Orentas & Miller, 1996) ou até mesmo pós-migratórias (Pfeffer et al., 1993), e deixam de apresentar resposta mitogênicas ao PDGF (Gao et al., 1998, Hart et al., 1989, Pringle & Richardson, 1993). Então, os pré-oligodendrócitos se tornam oligodendrócitos imaturos. Em ratos, essas células são caracterizadas pelo surgimento do antígeno galactocerebrosídeo (GalC), pelas perdas da expressão dos antígenos gangliosídeo 9-O-acetil (GD3) e poligangliosídeo de superfície (A2B5) na superfície celular (Raff, 1989), e pela perda da PSA-NCAM (Fewou et al., 2007).

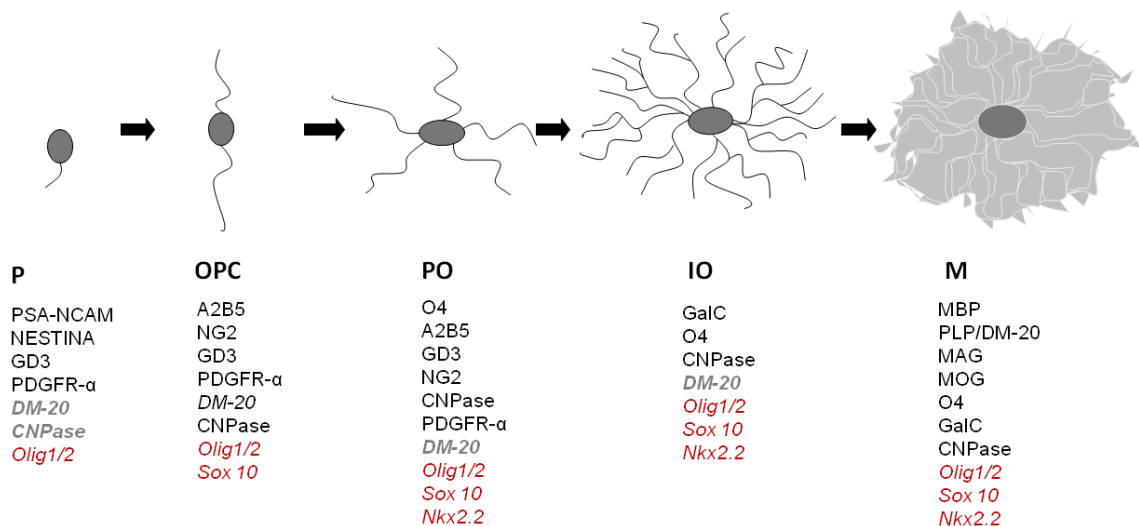
Existem alguns estágios que caracterizam o oligodendrócito maduro, como o aparecimento da proteína básica de mielina (MBP), a troca da expressão do DM-20 pela isoforma PLP, que é um sinal do começo do processo de mielinização (Kidd et al., 1990, Trapp et al., 1997), o surgimento da glicoproteína de oligodendrócito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

Como os oligodendrócitos maduros migram menos, a prevenção da diferenciação prematura da linhagem oligodendroglial é fundamental para garantir que os progenitores de oligodendrócitos cheguem ao local correto da maturação celular. O término da maturação é realmente prevenido por vários mecanismos de inibição, capazes de regular a localização e a extensão da oligodendroglionogênese, restringindo a especificação das células precursoras de oligodendrócitos e a sua

diferenciação (See & Grinspan, 2009). Uma via responsável por esta regulação é a via da Notch (Shrager & Novakovic, 1995).

Durante a diferenciação, ocorre a perda de antígenos de superfície ou intracelulares, a aquisição de novos antígenos, além da expansão e alongamento de diversos prolongamentos que interagem com axônios e são capazes de formarem membranas mielinizantes (Hardy & Reynolds, 1993; Baumann & Pham-Dinh, 2001). A figura 1 resume as mudanças morfológicas e a aquisição de marcadores fenotípicos ao longo da linhagem oligodendroglial.

Figura 1- Esquema representativo da classificação morfológica nas diferentes fases de maturação oligodendrocítica



Legenda: P – precursor; OPC - célula progenitora de oligodendrócitos; PO - pré-oligodendrócito; IO - oligodendrócito imaturo; M - oligodendrócito maduro com véus de membrana.

Nota: Seguem listadas as proteínas expressas em cada estágio específico (em preto), os RNA mensageiros (em cinza) e os fatores de transcrição (em vermelho).

Fonte: Adaptado de Younes-Rapoço 2009.

Análises *in vitro* sugerem que a maturação dos oligodendrócitos do estágio de precursor para célula madura em cultura é idêntica ao *in vivo*, mesmo na ausência de neurônios. Sugerindo assim que a capacidade dos progenitores de oligodendrócitos em se diferenciarem em oligodendrócitos maduros é intrínseca da linhagem (Temple & Raff, 1986). Na ausência de neurônios, os oligodendrócitos são capazes de formar uma membrana semelhante à mielina (Sarlieve et al., 1983). Porém, em co-culturas com neurônios, a expressão de genes de mielina como *p1p*, *mbp* e *mag* aumentam (Macklin et al., 1986, Matsuda et al., 1997). Já a presença da

MOG mantém a relação com os estágios mais tardios de desenvolvimento do oligodendrócito (Solly et al., 1996).

Já em relação à geração das células, os oligodendrócitos possuem diferentes origens que estão relacionadas aos diferentes estágios do desenvolvimento neural do indivíduo. Em mamíferos nas etapas tardias da gestação e em períodos precoces pós-natais, podem ser encontrados na zona subventricular (SVZ), a maior fonte de astrócitos, que podem se originar também da glia radial, e de oligodendrócitos. A maturação desses dois tipos celulares acontece em sua grande maioria em períodos precoces pós-natais (Baumann & Pham-Dihn, 2001). No córtex de mamíferos, tanto neurônios quanto a glia têm origem nas células neuroepiteliais do ventrículo telencefálico e na SVZ (Doetsch et al., 1997). A SVZ é um conjunto de precursores de linhagem restrita ou multipotentes (Levison & Goldman, 1993) e vários fatores irão influenciar no destino, escolha e sobrevivência de todas as células (Jensen & Raff, 1997). Acredita-se que mesmo após o final do desenvolvimento, a via da Notch ajude a manter células-tronco e precursores em tecidos adultos, impedindo que estas células se diferenciem, deixando em aberto a possibilidade de que novas células sejam geradas para renovação ou em tecidos danificados (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). Como através da adição de fatores tróficos as condições do ambiente podem ser fornecidas *in vitro*, as células gliais, quando se diferenciam, apresentam uma plasticidade considerável ao longo da linhagem, o que não é observado *in vivo* (Skoff, 1990).

Mielinização

No sistema nervoso de humanos, a mielinização começa na segunda metade da vida fetal na medula espinhal e se completa após o nascimento até cerca de 2 anos de idade, tendo o seu pico de mielinização durante o primeiro ano após o nascimento (Peters et al., 1991). A mielinização pode continuar até os 20 anos de idade em algumas fibras corticais, principalmente nas áreas associativas. Em roedores, se inicia no período pós-natal e pode se prolongar, como no caso do corpo caloso, pelo menos até os 90 dias pós-natal. A formação da mielina geralmente tem origem perto do corpo celular e avança ao longo do axônio em direção a sua

terminação (Yakovlev & Lecours, 1966). A quantidade total de mielina no SNC aumenta do nascimento à maturidade e algumas fibras individuais tornam-se muito mais mielinizadas durante o período de crescimento (Peters et al., 1991). No cérebro, a mielinização ocorre caudorostralmente, enquanto na medula espinhal ocorre rostrocaudalmente (Yakovlev & Lecours, 1966).

Para que o processo de mielinização ocorra, além do processo migratório do oligodendrócito, é necessária a ligação dos prolongamentos do oligodendrócito com o axônio, a espiralação do prolongamento ao redor do axônio, com um número de membranas já pré-determinado e o reconhecimento de espaços não mielinizados que formarão os nódulos de Ranvier (Baumann & Pham-Dihn, 2001).

Ainda existem lacunas no que se refere ao que define se um axônio será mielinizado ou não. Um dos fatores seria a espessura do axônio, em geral é necessário um calibre mínimo em torno de $1\mu\text{m}$. Uma possível razão para isso é o fato de que a condução saltatória pode não ser tão efetiva em axônios com calibres pequenos. (Sherman & Brophy, 2005). O axônio escolhido não é mielinizado em todo seu comprimento ao mesmo tempo, isto nos permite inferir que existam outros fatores além do diâmetro que definam quando o axônio será mielinizado ou não (Suzuki & Raisman, 1994). Mas é sabido que um único oligodendrócito amadurece todos os seus prolongamentos ao mesmo tempo e em um mesmo comprimento (Butt & Ranson, 1989). Evidências demonstraram que no nervo óptico de ratos, o controle da diferenciação dos oligodendrócitos e da mielinização é realizado pela via da Notch (Baumann & Pham-Dihn, 2001), a mesma via responsável por manter células-tronco para reserva.

É possível que o axônio tenha participação no controle da regulação da espessura da bainha de mielina, já que um oligodendrócito é capaz de mielinizar vários axônios com diferentes tamanhos, formando bainhas mais grossas ao longo de axônios mais grossos (Waxman & Sims, 1984). Isto indica que de alguma maneira o axônio controle o número de lamelas formadas. Como a quantidade de mielina produzida por um oligodendrócito pode variar bastante, um número pequeno de oligodendrócitos não indica necessariamente uma pouca quantidade de mielina (Skoff & Guandour, 1995).

Este processo exige dos oligodendrócitos uma grande capacidade de sintetizar membranas em um tempo específico, correto para cada espécie e região do SNC (Schwab & Schnell, 1989). Para se ter a idéia de como este processo é regulado, as

etapas da mielinização são tão precisas que a idade do feto pode ser definida apenas observando quais etapas da mielinização já foram cumpridas. Isto sugere que há mecanismos de sinalização regulando não só as etapas da diferenciação do oligodendrócito, mas também o processo de mielinização em si (Baumann & Pham-Dihn, 2001).

Mielina

A bainha de mielina, quando comparada com as membranas plasmáticas de outras células eucarióticas, é uma das que possui a maior porcentagem de lipídeos, algo entre 73% e 81% da massa seca (Chrast et al., 2011), sendo o colesterol um dos principais constituintes dela. Camundongos com oligodendrócitos incapazes de sintetizar colesterol apresentaram um atraso na mielinização (Saher et al., 2005).

A sua composição rica em lipídeos e a proporcionalmente baixa porção de água permite o isolamento elétrico dos axônios. Já a sua composição fragmentada permite a condução saltatória do impulso nervoso. Essas características acabam por traçar as três principais vantagens que a mielina forneceu aos vertebrados: a alta velocidade da condução do impulso nervoso, a fidelidade da transferência do sinal em longas distâncias e a economia de espaço (Baumann & Pham-Dihn, 2001, Hartline, 2008).

A biogênese da mielina requer uma grande remodelagem da membrana plasmática do oligodendrócito, sendo necessário o controle progressivo e bem coordenado de cada fator relacionado. A síntese da maioria dos componentes da mielina tem início quando as células precursoras de oligodendrócito se transformam em oligodendrócitos pré-mielinizantes (Chrast et al., 2011), ou seja, quando a célula já apresenta um comprometimento com a linhagem oligodendroglial. A bainha de mielina é uma das membranas mais estudadas em mamíferos não só pela sua importância, mas também pela sua abundância e pelo fácil isolamento de frações de mielina enriquecidas (Sherman & Brophy, 2005). É formada pela exclusão do citoplasma dos prolongamentos dos oligodendrócitos após o contato com o axônio (Baumann & Pham-Dihn, 2001). Isto leva a crer inclusive que o axônio determine quando o oligodendrócito começa a sintetizar as proteínas de mielina, mas não foi

ainda encontrado nada que possa ser identificado como o regulador desse processo nos axônios (Chrast et al., 2011). E a maioria dos estímulos oriundos do axônio identificados é inibitória à formação da bainha (Piaton et al., 2010, Taveggia et al., 2010).

Ainda sobre a formação da mielina, os fatores intrínsecos que promovem a expressão gênica dos genes relacionados à mielina são muito complexos. Existindo uma variedade de fatores, como Sox5/6, Hes5 e Id2/4, que previnem os precursores de oligodendrócitos de entrarem nas etapas finais de diferenciação (Emery, 2010). Existem ainda fatores que regulam a expressão dos genes de mielina em oligodendrócitos pós-mitóticos, como o fator regulatório do gene da mielina (MRF) que aparenta ter papel importante na biogênese da mielina, sendo necessário para a expressão dos genes de mielina, mas não para a especialização ou diferenciação das células em si (Emery et al., 2009). Estudos em culturas de oligodendrócitos mostraram que a expressão da maioria dos componentes estruturais da membrana de mielina não é induzida ao mesmo tempo, sendo as diferentes expressões ativadas progressivamente com a maturidade celular (Chrast et al., 2011).

A mielina é formada por um grupo de camadas empilhadas umas sobre as outras de maneira uniforme. Possui uma estrutura característica que alterna camadas eletro-densas e leves, ambas concêntricas e que se revezam entre si. A primeira é formada pela superfície da membrana expandida pelos oligodendrócitos, a segunda é formada pelos dois folhetos externos, formando a linha intraperiódica (Baumann & Pham-Dihn, 2001).

Os axônios são envolvidos pela bainha de mielina, mas existem espaços onde não há esta capa envolvendo-o, formando assim os Nódulos de Ranvier. São esses espaços “nus” em companhia com os espaços mielinizados os responsáveis pela condução saltatória do impulso nervoso. Como a mielina é encontrada exclusivamente em vertebrados, ela acaba sendo considerada como um componente importante na evolução das funções nervosas mais complexas (Sherpherd, 1988).

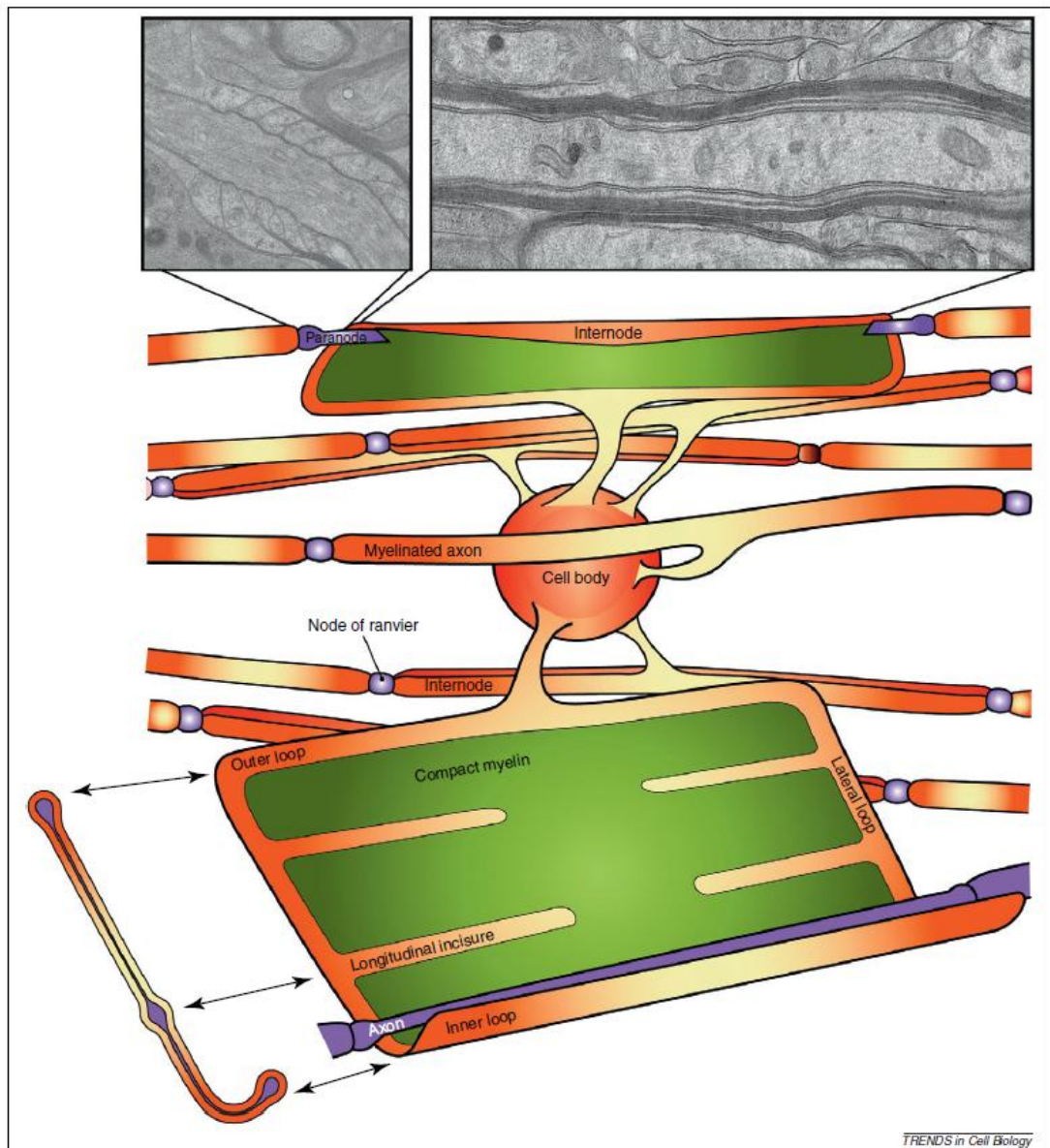
Nos nódulos de Ranvier está localizada a maquinaria necessária para a propagação dos potenciais de ação, incluindo uma grande concentração de canais de sódio voltagens dependentes (Sherman & Brophy, 2005). Isso, associado ao fato da bainha de mielina tem grande resistência elétrica e pouca capacitância (Sherpherd, 1988), permite que o impulso siga pela fibra até o próximo nódulo e a

bainha de mielina assegura que a despolarização ocorra apenas nos nódulos. Como resultado, a condução pelo axônio é rápida e saltatória, do latim *saltare* significando pular. Evidências têm mostrado que a junção axo-gliol paranodal não é essencial para a formação dos nódulos, mas que provavelmente auxilie na manutenção do conjunto formado pelos componentes dos nódulos no axônio maduro (Sherman & Brophy, 2005).

A compactação entre as camadas é justa resultando em uma periodicidade de 12 nm. Dentro de cada segmento de mielina existem pequenas regiões de mielina não-compacta chamadas de alças internas e alças externas e paranodais (Figura 2). Cada segmento de mielina nos axônios mede aproximadamente 150 μm , interrompidos apenas por pequenos espaços, os nódulos de Ranvier, que possuem uma grande densidade de canais de sódio (Aggarwal et al., 2011).

A organização espacial da bainha de mielina não é regulada por informações genéticas, mas sim por interações epigenéticas dos produtos de diferentes genes (Aggarwal et al., 2011). Existem dois tipos de sistemas básicos de organização, o sistema estático e o sistema dinâmico (Misteli, 2008, Whitesides & Grzybowski, 2002). Aqui daremos atenção apenas ao primeiro sistema que é o utilizado pela bainha de mielina. O sistema estático se utiliza de interações de componentes que estão em equilíbrio termodinâmico e, assim, estão em um estado estático de utilização mínima da energia, não havendo a geração de entropia. Neste sistema, os componentes estão livres e acham sua posição baseando-se no balanço de forças de atração fracas e forças de repulsão (Aggarwal et al., 2011). No sistema nervoso central, a mielina possui meia-vida da ordem de várias semanas a meses (Saher & Simons, 2010).

Figura 2 - Esquema do oligodendrócito e sua bainha de mielina



Nota: A mielina é mostrada desenrolada. Ao topo: Micrografia eletrônica mostrando uma secção longitudinal da mielina compacta (direita) e as alças paranodais (esquerda).

Tradução: Paranodes-Paranodos; Internodes-Internodos; Myelinated axon-Axônio mielinizado; Cell body-Corpo celular; Node of Ranvier-Nódulos de Ranvier; Outer loop-Alça externa; Compact myelin-Mielina Compacta; Lateral loop-Alça lateral; Longitudinal incisure-Incisuras longitudinais; Axon-Axônio; Inner loop-Alça interna.

Fonte: Aggarwal, 2011.

Proteínas constituintes da mielina

As proteínas compõem 30% do peso seco da mielina (Campagnoni & Macklin, 1988) e são componentes específicos de mielina e de oligodendrócitos. A MBP e a PLP, com sua isoforma DM-20, são as principais proteínas da mielina em termos de quantidade, sendo responsáveis por 80% do total de proteínas (Baumann & Pham-Dihn, 2001). É importante ressaltar a presença ainda da CNPase, responsável por 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). A atividade desta proteína não foi demonstrada apenas no SNC, mas também no baço, pulmão, fígado, eritrócitos, linfócitos e plaquetas. Contudo, a presença do seu substrato não foi confirmada nos diferentes tecidos aonde a proteína é encontrada, por isso a atividade enzimática da CNPase é questionada (Tsukada & Kurihara, 1992).

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

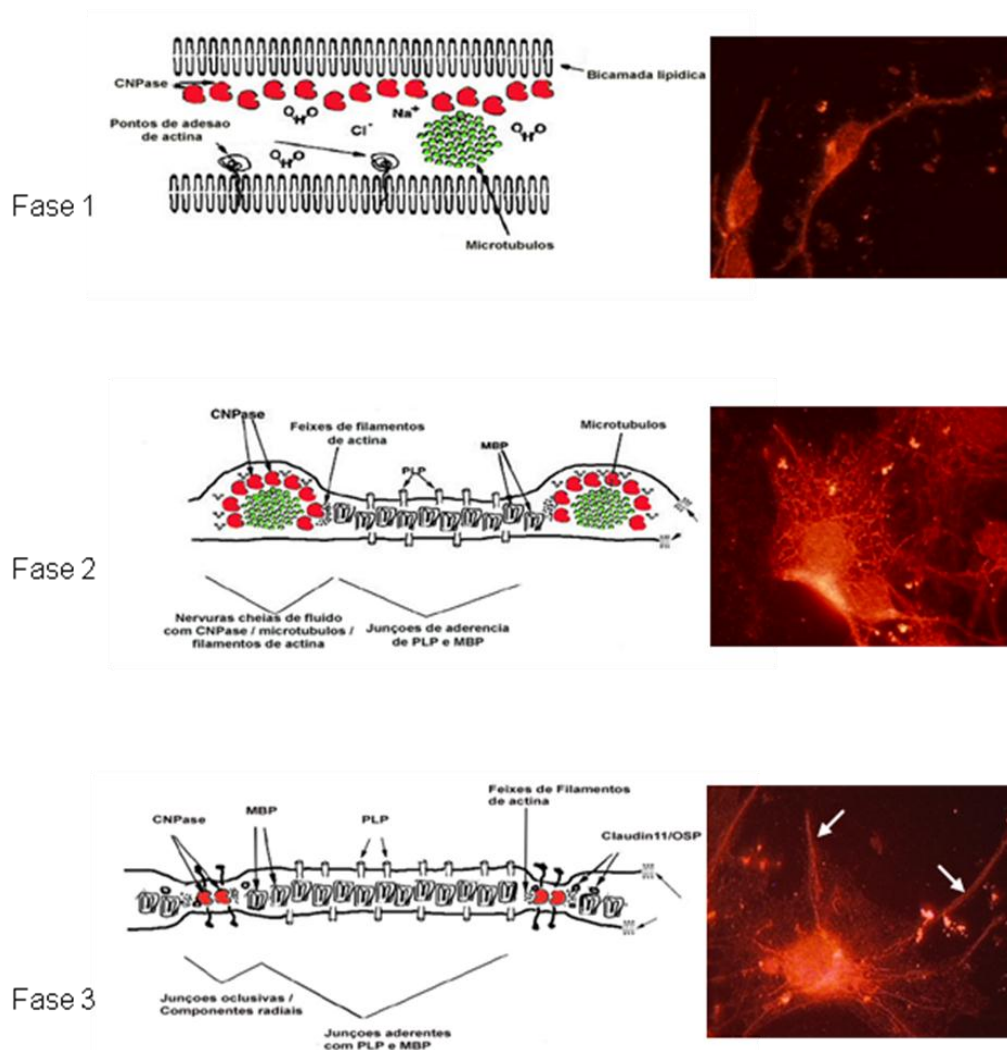
A CNPase também atua no crescimento dos prolongamentos dos oligodendrócitos, induzindo a reorganização precoce das proteínas de citoesqueleto. Em estágios avançados de desenvolvimento do oligodendrócito, a CNPase se localiza nas porções de mielina não compacta, como as alças paranodais, e atuam na manutenção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

No estágio seguinte do desenvolvimento, as isoformas da MBP são expressas e localizadas em domínios entre as redes de microtúbulos (Brophy, 1992; Dyer, 2002). A característica hidrofóbica da MBP propicia a forte interação desta com fosfolipídeos de membrana, deslocando a CNPase. A CNPase então, migra de

regiões com MBP para as estruturas microtubulares semelhantes a nervuras, assim as nervuras de citoesqueleto possuem uma parte central de microtúbulos envolto pela CNPase onde os filamentos de actina estão ligados e agrupados em forma de feixe (Dyer et al., 1997). Assim, o segundo estágio de desenvolvimento da bainha parece resultar na compactação de regiões da bainha de mielina contendo MBP, com o fluido permanecendo nas estruturas de citoesqueleto semelhantes a nervuras (incisuras de Schmidt-Lanterman). O estágio final de desenvolvimento da bainha de mielina *in vivo* ocorre quando o fluido nas “nervuras de citoesqueleto” é perdido, e a junção dos domínios MBP acontece. Após esses eventos, somente uma pequena quantidade de fluido, nas incisuras Schmidt-Lanterman e nas alças interna e externa, permanece na mielina (Dyer, 2002). 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*.

Essas relações com as proteínas de citoesqueleto torna a CNPase uma das constituintes do complexo molecular capaz de regular e modular a expansão e migração da membrana do oligodendrócito. Já foi demonstrado que este complexo é funcionalmente ativo antes e durante o processo de formação da mielina *in vivo*. A interação com outras proteínas e a translocação para a membrana são favorecidas pelo fato da CNPase ser isoprenilada (Bifulco, 2005; Lee et al., 2005; Esposito et al., 2008).

Figura 3 - Representação esquemática de um modelo proposto de desenvolvimento da mielina em culturas de oligodendrócito



Nota: Os diagramas acima mostram representações de 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 contém 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, segue microfotografias com aumento de 1000x de oligodendrócitos imunoreagidos com o anticorpo anti-CNPase, representando 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 *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).

Fonte: Adaptado de Dyer, 2002.

Contudo, existem várias outras proteínas que constituem a mielina e uma delas é a MAG, que se apresenta em menor quantidade, cerca de 1% do total de proteínas existentes. Essa proteína apresenta dois domínios: um transmembrana e um extracelular contendo cinco domínios com homologia interna semelhante a domínios de imunoglobulinas (Salzer et al., 1987).

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

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

Acredita-se que a L-MAG possa agir como receptor e isso é reforçado pela sua participação na ativação da tirosina cinase Fyn (Umemori et al., 1994), pelo seu

sítio de fosforilação da tirosina (Jaramillo et al., 1994) e por sua interação com a proteína de ligação do cálcio S100-beta (Kursula et al., 1999). Já a S-MAG tem o papel de molécula de adesão que liga a superfície axonal com o citoesqueleto do oligodendrócito, isso se dá pelo fato dessa isoforma interagir com a tubulina e com os microtúbulos (Kursula et al., 2001). Experimentos *in vitro* demonstraram que a MAG estimula o crescimento de neuritos em neurônios em estágios precoces de desenvolvimento, mas inibe esse mesmo crescimento em estágios mais maduros do desenvolvimento de neurônios (Mukhopadhyay et al., 1994; DeBellard et al., 1996).

Polarização celular

Com o começo da síntese da mielina, os oligodendrócitos precisam se organizar para enviar diferentes componentes para bainha de mielina em desenvolvimento. Durante este processo as células entram em um impressionante processo de polarização (Chrast et al., 2011). Este processo também é decisivo para a grande variedade de funções que são importantes para o desenvolvimento, funcionamento e regeneração de neurônios (Etienne-Manneville, 2008). Mesmo em culturas de oligodendrócitos sem a presença de neurônios, as células assumem uma morfologia assimétrica e formam grandes véus de mielina que não possuem elementos citosólicos e têm composição semelhante a mielina compacta, tendo a MBP papel importante neste processo (Aggarwal et al., 2011).

A polaridade celular é fundamental para diversas atividades, como divisões assimétricas, migrações e outras funções altamente especializadas de células diferenciadas, como as epiteliais e os neurônios (Martin-Belmonte & Mostov, 2008, Dow & Humbert, 2007, Arimura & Kaibuchi, 2007, Krummel & Macara, 2006). Se não todos, grande parte dos tipos celulares polarizam em algum momento da existência da célula, seja para se dividir assimetricamente, se diferenciar ou ainda para desenvolver alguma atividade específica. Sua definição se dá quando a organização intracelular se encontra assimétrica ao longo de um eixo de polaridade. O eixo núcleo-centrossomo, elementos de citoesqueleto, os aparatos de Golgi e o tráfego de vesículas se encontram ao longo desse eixo (Siegrist & Doe, 2007, Higginbotham & Gleeson, 2007). Isto resulta em uma distribuição polarizada das proteínas, RNAs e

componentes de membrana, essenciais para as funções celulares de células polarizadas, como a propagação dos potenciais de ação nos neurônios, migração de astrócitos, mielinização dos axônios pelos oligodendrócitos e células de Schwann (Etienne-Manneville, 2008).

Ainda sobre as atividades dependentes da polaridade celular, temos a polaridade baso-apical das células epiteliais e a da migração dos leucócitos através de gradientes quimiotáticos. Os mecanismos moleculares dessas atividades foram bem descritos, sendo caracterizadas proteínas fundamentais para polaridade e que foram conservadas evolutivamente como as proteínas Par e as Rho GTPases (Assemat et al., 2008, Charest & Firtel, 2007, Goldstein & Macara, 2007). Além disso, evidências têm mostrado que este grupo de proteínas também possui papel fundamental nas funções de células da glia polarizadas (Etienne-Manneville, 2008).

Em neurônios, o eixo polarizado é evidente devido a morfologia polarizada da célula com os dendritos claramente discerníveis do axônio. Já os astrócitos e oligodendrócitos geralmente formam numerosos prolongamentos irregulares que irão interagir com outros tipos celulares do sistema nervoso central. Além dessa diferença marcante causada pela morfologia celular, as células gliais polarizam para cumprir suas funções. Dentre as diversas funções da glia, especialmente a mielinização, que depende de interações com matriz extracelular e do envolvimento dos axônios pelos prolongamentos embainhantes/mielinizantes, é uma função onde a polaridade celular desempenha papel de extrema relevância.

Vias de sinalização intracelular

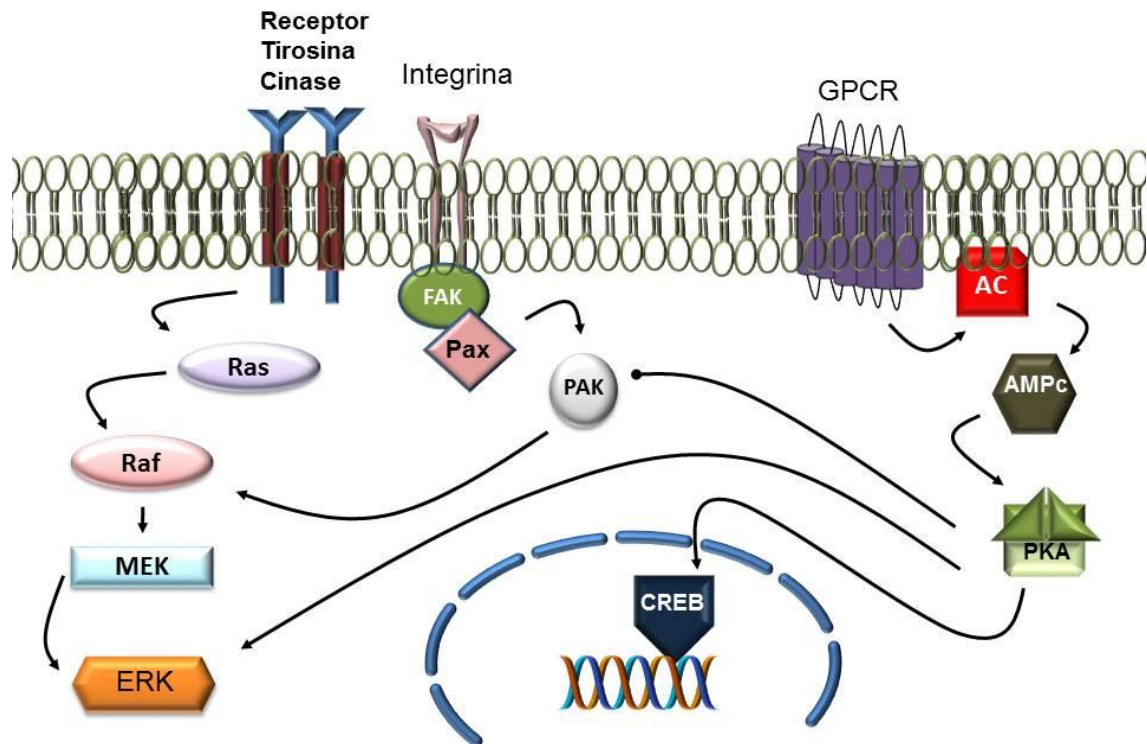
As células necessitam das informações extracelulares para conseguirem se adaptar e se desenvolver, mas para isso essas informações precisam ser convertidas em respostas intracelulares. Isto pode resultar em reprogramação da expressão gênica, estabilidade do RNAm ou tradução protéica. Esta atividade se utiliza de uma rede de cascatas de sinalização interconectadas, com as proteínas cinases sendo elementos chave. Muitas doenças tem o seu começo em alterações das vias de sinalização, incluindo aterosclerose, diabetes e câncer. Por esta razão,

as proteínas cinases e outras enzimas relacionadas as vias de sinalização se tornaram alvos para o desenvolvimento terapêutico (Palacios et al., 2007).

Younes-Rapozo e colaboradores demonstraram em 2009 que a inibição da via da proteína cinase ativada por mitógenos e cinase regulada por sinal extracelular (MAPK/ERK) em oligodendrócitos *in vitro* causa alterações morfológicas nos oligodendrócitos e no desenvolvimento celular. Após o tratamento com PD98059, as células apresentaram um aumento no número de células com morfologia imatura e ainda um aumento de células com morfologia arredondada e sem prolongamentos. 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 CREB, um fator chave comumente envolvido no crescimento celular em resposta a fatores de crescimento e implicado na expressão de genes relacionados à mielina (Baron et al., 2000; McNulty et al., 2001; Bhat et al., 2007).

É sabido que a ativação da via da MAPK/ERK pode ser regulada pela PKA (proteína cinase dependente de AMPc), pois a PKA é fortemente, porém transitoriamente, ativada pelo desadesão celular. Quando esta atividade é inibida pode ocorrer o atraso da inativação de certas proteínas ativadas por adesão celular como a cinase ativada por p21 (PAK), a cinase de adesão focal (FAK), paxilina e da ativação da ERK (Howe et al., 2000). Muitos aspectos da atividade da FAK e da PAK, assim como a integridade do citoesqueleto de actina, podem ser regulados pela PKA (Figura 4) para que ocorra a ativação da ERK em resposta a sinais de adesão (Aplin & Juliano, 1999; Howe et al., 2002).

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



Fonte: FELGUEIRAS, 2011.

A via do AMPc/PKA

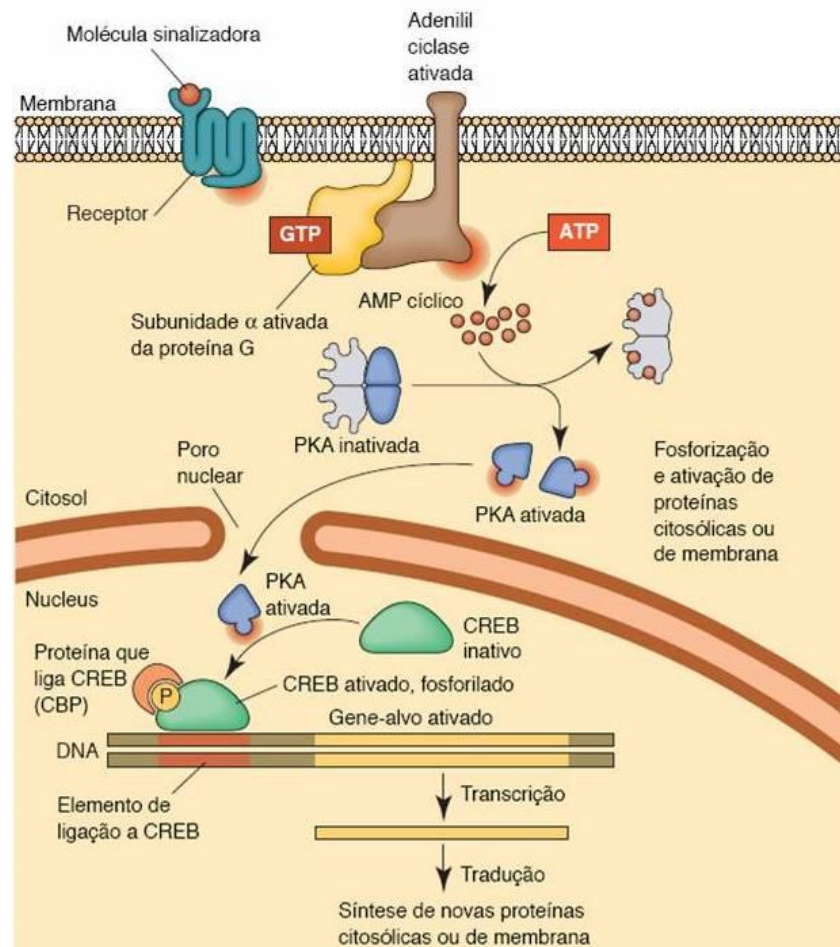
A regulação diferencial e a distribuição distinta nos tecidos das diferentes isoformas da adenilato ciclase permitem a estas enzimas integrar e interpretar sinais celulares frequentemente opostos, tornando-as enzimas chave de suas vias de sinalização (Scholich et al., 1999, Patel et al., 2001, Scholich et al., 2001, Pierre et al., 2004), como a via do AMPc/PKA, por exemplo. A adenilato ciclase é constituída por uma pequena e variável terminação amino, seguida por um par (M1 e M2) de seis porções transmembrana e dois domínios citoplasmáticos formadores do sítio catalítico de aproximadamente 40kDa cada (C1 e C2) (Tang et al., 1995, Tesmer et al., 1997, Tesmer et al., 1999). A estrutura terciária dos domínios citoplasmáticos é quase idêntica e, juntas, formam uma enzima pseudossimétrica (Tesmer et al., 1997; Zhang et al., 1997).

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

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

Quanto à composição da PKA, ela é uma enzima heterotetramérica formada por duas unidades regulatórias (R) e mais duas catalíticas (C). Nas duas unidades R existem quatro subunidades que são codificadas por quatro genes (RIa, RIh, RIIa e RIIh). O tipo de PKA – tipo I e tipo II – são definidos pelo tipo de subunidade R que elas possuem. Essas subunidades apresentam como função: manter a holoenzima inativa inserindo um pseudo-substrato (para subunidades RI) ou um substrato real (para subunidades RII) na fenda catalítica da subunidade C; traduzir os níveis do AMPc dentro da célula em atividade fosfodiesterase, pois elas liberam a subunidade C ativa através da ligação cooperativa de duas moléculas de AMPc por uma molécula de R; o N-terminal de cada subunidade R medeia a dimerização, o que dirige a formação da holoenzima heterotetramérica e é crucial para a ligação cooperativa do AMPc interagir com as proteínas de ancoragem cinase-A ou AKAPs (Howe, 2004). A subunidade C, por sua vez é codificada por três genes (a, h e g).

Figura 5 - Esquema representativo da via do AMPc/PKA



Fonte: Adaptado de Alberts, 2004.

A PKA é ativa em vários compartimentos celulares (Shabb, 2001), com alvos na membrana, citoplasma, mitocôndria, núcleo e em quase toda família da rede de citoesqueleto, incluindo microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos de actina (Howe, 2004). São várias as consequências da atividade dessa proteína cinase assim como seus alvos, por isso é importante cada vez mais se focar ou especificar a atividade desta proteína cinase.

Estudos mostraram sinais distintos do AMPc ocorrendo em diferentes regiões subcelulares (Zaccolo et al., 2002) e que a PKA do tipo I possui mais afinidade com o AMPc em relação a PKA do tipo II (Francis et al., 1999). Isto permite uma hipótese simples, porém altamente plausível na qual a baixa afinidade da PKA do tipo II permite a enzima ancorada a responder apenas a concentrações locais e elevadas

do AMPc. Este efeito acaba por criar locais-específicos para a interpretação e disseminação espacial de diferentes sinais do AMPc. Isto é importante para a sinalização espacial na mielinização, uma atividade que necessita da distribuição de diferentes atividades enzimáticas em diferentes localizações subcelulares.

Em relação à linhagem oligodendroglial, especificamente o AMPc e a ativação da PKA são sinais que levam a expressão dos genes da MBP e da CNPase (Gravel et al., 2000; Clark et al., 2002). Além disso, o AMPc também está relacionado a fosforilação da CNPase (Agrawal et al., 1994). Em células da glia embainhante olfatória (células que produzem envoltórios de axônios sem, no entanto, produzirem lamelas compactas de mielina), cultivadas *in vitro*, foi demonstrado que a produção do AMPc altera tanto a morfologia celular como o padrão de imunorreatividade da CNPase, que passa de um padrão puntiforme para um padrão tracejado, formando nervuras (Santos-Silva, 2003). Já em culturas de motoneurônios, Aglah e colaboradores (2008) demonstraram que o AMPc promove o crescimento e extensão de neuritos via adenilato ciclase e PKA. Dados na literatura indicam que a adesão celular mediada por integrinas utiliza a PKA para modular os eventos como a dinâmica e migração do citoesqueleto de actina (Howe, 2004).

A PKA é capaz de modular, direta ou indiretamente, a atividade das Rho – guanosina trifosfatases (Rho GTPases) (Howe, 2004). A PKA fosforila diretamente a Rho inibindo-a, e também pode ativar, indiretamente, a Rac1 e a Cdc42 (por mecanismos ainda não conhecidos). Esses componentes da via do AMPc/PKA são proteínas associadas ao citoesqueleto, sendo uma das suas funções regula-lo em resposta a fatores externos, como fatores de transcrição e moléculas de adesão. Em astrócitos, Rac1 e Cdc42 se localizam na ponta dos prolongamentos e são importantes para uma migração eficiente (Bacon et al., 2007).

Na oligodendroglia, as Rho GTPases são capazes de regular a mielinização de forma refinada e orquestrada (Feltri et al., 2008). *In vitro*, progenitores de oligodendrócitos expressam RhoA e, com o avanço da diferenciação, aumenta a expressão de Cdc42 e Rac1. Estes possuem papel oposto ao primeiro, a RhoA é um regulador negativo da diferenciação de oligodendrócitos, que inibe a extensão dos prolongamentos, enquanto Cdc42 e Rac1 agem como reguladores positivos da diferenciação morfológica, induzindo a extensão e ramificação dos prolongamentos (Liang et al., 2004). Além disso, a ablação de *cdc42* ou *rac1* leva a um fenótipo particular de mielina, caracterizado por acúmulo anormal de grande quantidade de

citoplasma nas alças internas e lamelas mais internas dos prolongamentos embainhantes de oligodendrócito com a concomitante formação de mielina irregular (Thurnherret al., 2006).

Também existem evidências que indicam o papel da Cdc42 na regulação da migração e na morfologia da oligodendroglia (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Goveket al., 2005). A ativação da GTPase Rac promove a protrusão de membranas e formação de lamelipódios (Hall, 1998), enquanto o Cdc 42 está associado com a formação de filopódios e com o estabelecimento da polaridade celular (Howe, 2004). Foi observado que a ativação da via AMPc/PKA, pode ativar Cdc42 em neurônios (Leemhuis et al., 2004).

O AMPc também parece estar relacionado com a produção da proteína MAG. Um trabalho com cultura de uma linhagem transfectada com um oncogene que mantém as células em estado de precursores (Olig-Neu) demonstrou que antes das células serem estimuladas com AMPc, a L-MAG era a isoforma predominante, porém, após o tratamento com AMPc, a S-MAG passou a ser a isoforma majoritária nessas células (Erb et al., 2003).

Diante das informações expostas que demonstram a importância das alterações morfológicas do oligodendrócitos durante a diferenciação celular, a importância da CNPase e da MAG no processo de mielinização e, por último, a relação da via do AMPc/PKA com estes dois fatores, se torna interessante avaliar os efeitos do bloqueio e da ativação da via, na distribuição da CNPase e da MAG e na morfologia dos oligodendrócitos.

2 OBJETIVOS

Neste trabalho tivemos como objetivos:

1. Avaliar o papel da via da AMPc/PKA na diferenciação morfológica da oligodendroglia;
2. Avaliar se a modulação da via da AMPc/PKA interfere na distribuição da CNPase e da MAG na oligodendroglia.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos animais

Ratos Wistar foram mantidos em ciclo de claro-escuro (luzes desligadas de 7 da noite às 7 da manhã) e em temperatura de $(25\pm 1^\circ\text{C})$. 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.

2.2 Cultura primária de oligodendrócitos

Foram usados ratos Wistar, fêmeas, neonatos com no máximo 3 dias de vida pós-natal. Os animais foram decapitados, os hemisférios cerebrais foram removidos em fluxo laminar 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 min. O sobrenadante foi retirado, e o precipitado (rico em células) diluído em volume conhecido de meio DMEM-F12 com 10% de soro bovino. As células foram ressuspensas, contadas em câmara de Neubauer, e plaqueadas de 200.000 a 400.000 células por lamínula. As lamínulas foram previamente tratadas com poli-L-lisina (400 μl / poço), e acondicionadas em placas contendo 24 poços. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 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 μM); 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%).

2.3 Avaliação da via de sinalização do AMPc/PKA

Para a avaliação da via do AMPc/PKA foram utilizados o inibidor da PKA, o H-89 [1 μM] (Calbiochem), o inibidor da adenilato ciclase, o SQ22356 [1 μM] (Biomol) e o ativador da adenilato ciclase, a forskolina [10 μM] (Cell Signaling) diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma). Com 5 dias *in vitro* (div), em meio definido, as células foram tratadas com os inibidores por 30 min ou 24 h. Como controle do veículo, células cultivadas foram expostas ao DMSO na mesma concentração pelos mesmos períodos. Após o tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 15 min e depois lavadas 3 vezes por 5 min com solução de PBS. Foram utilizadas três lamínulas de cinco culturas diferentes para cada tempo de tratamento.

2.4 Reação imunocitoquímica

Após a fixação, as lamínulas foram lavadas em solução de PBS 0,1M em pH 7,4. Para a marcação de antígenos intracelulares, as lamínulas foram permeabilizadas com PBS-Triton 0,3%. Foi realizado bloqueio para reações inespecíficas com PBS-BSA 5% por 30 min e, após, incubação com os anticorpos primários diluídos em PBS-BSA 1% durante a noite a 4°C. No dia seguinte, procedeu-se às lavagens com PBS, incubação com os anticorpos secundários, por 1 h em câmara úmida a temperatura ambiente. Seguiu-se com lavagens com PBS, e após, as lamínulas foram contra-coradas com o marcador de núcleo DAPI (0,2 $\mu\text{g/mL}$ - Sigma). Após, foram feitas lavagens com água destilada e montagem das lâminas utilizando N-propil-galato.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para a técnica de imunocitoquímica

Anticorpos Primários

<i>Anticorpo anti-</i>	<i>Marca</i>	<i>Isotipo</i>	<i>Origem</i>	<i>Diluição</i>
CNPase	Sigma	Monoclonal IgG	Camundongo	1:100
MAG	Invitrogen	Policlonal IgG	Coelho	1:100
Tubulina total	Sigma	Policlonal IgG	coelho	1:100

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	Alexa 555	M.Probes	Cabra	1:400

Nota: Nos anticorpos secundários: Em verde, Alexa 488 – fluorocromo emitido em verde; Em vermelho, Alexa 555 - fluorocromo emitido em vermelho.

Fonte: Felgueiras, 2011.

2.5 Análise e aquisição de imagens

As análises foram feitas a partir de imagens obtidas com o microscópio de epifluorescência Olympus BX40, acoplado à câmera de vídeo digital (Olympus DP71). Após a aquisição as imagens foram devidamente trabalhadas no Programa Adobe Photoshop 7.0.1.

3 RESULTADOS

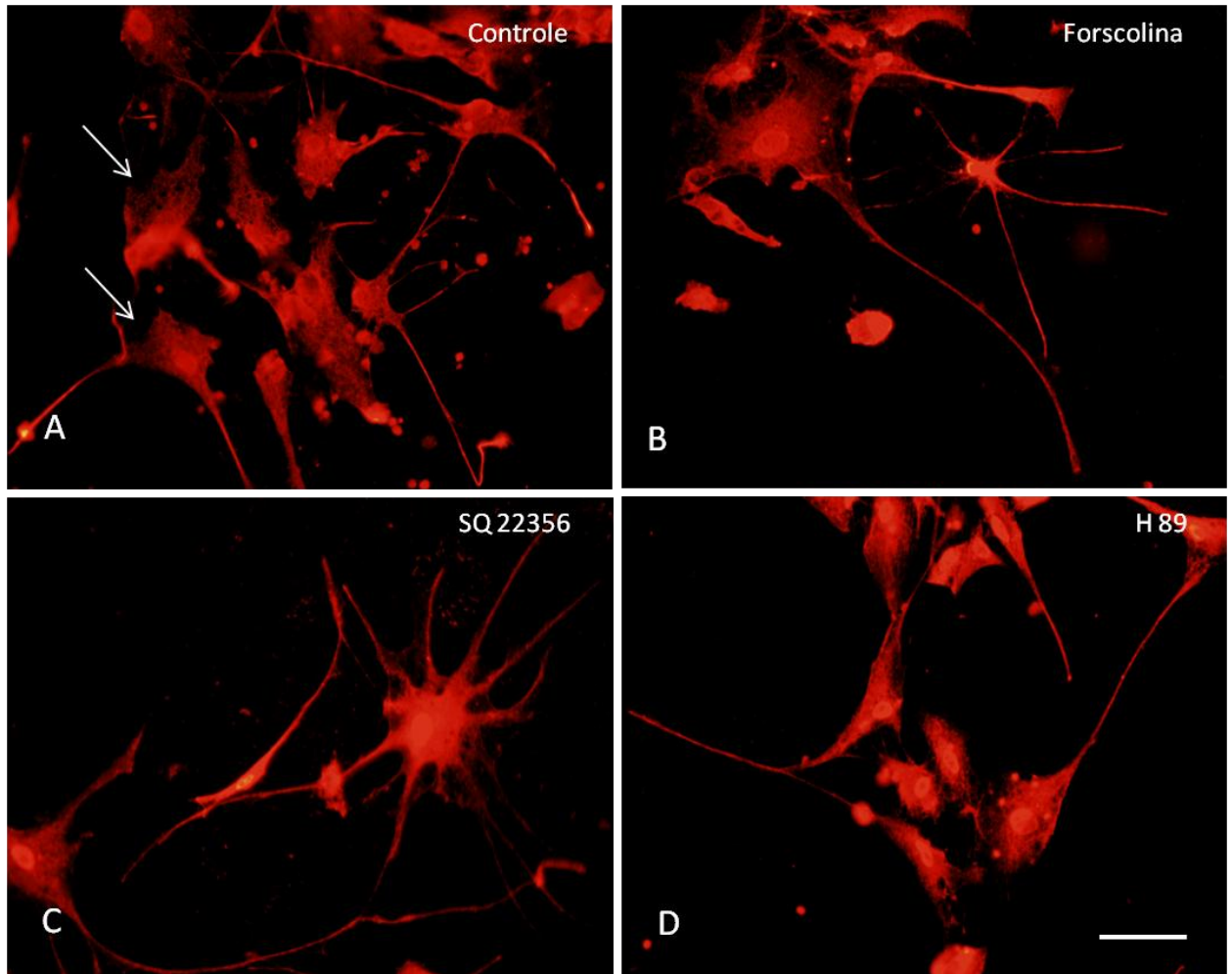
Após cinco div, as culturas controle apresentaram células CNPase positivas (CNPase+) com morfologias variadas, desde a bipolar, característica de progenitores de oligodendrócitos, até a bem ramificada e com véus de membrana, características de oligodendrócitos maduros (Figura 6A).

Quando observamos a morfologia da oligodendroglia após os tratamentos podemos notar que estas apresentaram alterações. Após 30 min de tratamento com a forskolina (Figura 6B), as células apresentam um aparente aumento no tamanho dos seus prolongamentos. Ocorreu também uma redução no número dos prolongamentos e é possível notar ainda uma redução nos véus de membrana.

A oligodendroglia também apresenta alterações no tamanho dos prolongamentos após o tratamento com o SQ 22356 (SQ), por 30 min. Observamos células CNPase+ com prolongamentos maiores (Figura 6C). Quando tratadas com o H-89, por sua vez, apresentam prolongamentos aparentemente menores quando comparadas às células controle além de redução nos véus de membrana (Figura 6D).

Com seis div, ou seja, após 24 h de tratamento, as culturas controle continuaram a apresentar células CNPase+ em diferentes estágios de desenvolvimento, mas com predominância de estágios mais maduros (Figura 7A). No tratamento com forskolina, os prolongamentos celulares aparentam estar maiores quando comparados as células da cultura controle e ainda com redução dos véus de membrana (Figura 7B). Observamos também uma aparente redução da arborização secundária. O tratamento com SQ apresentou mais uma vez alterações morfológicas com algumas células apresentando prolongamentos bem maiores que os oligodendrócitos das culturas controle (Figura 7C). O tratamento com o inibidor da PKA (H-89) causa predominantemente uma redução dos véus de membrana CNPase+ (Figura 7D).

Figura 6 – Oligodendrócitos com 5 div imunorreagidos com o anticorpo anti-CNPase

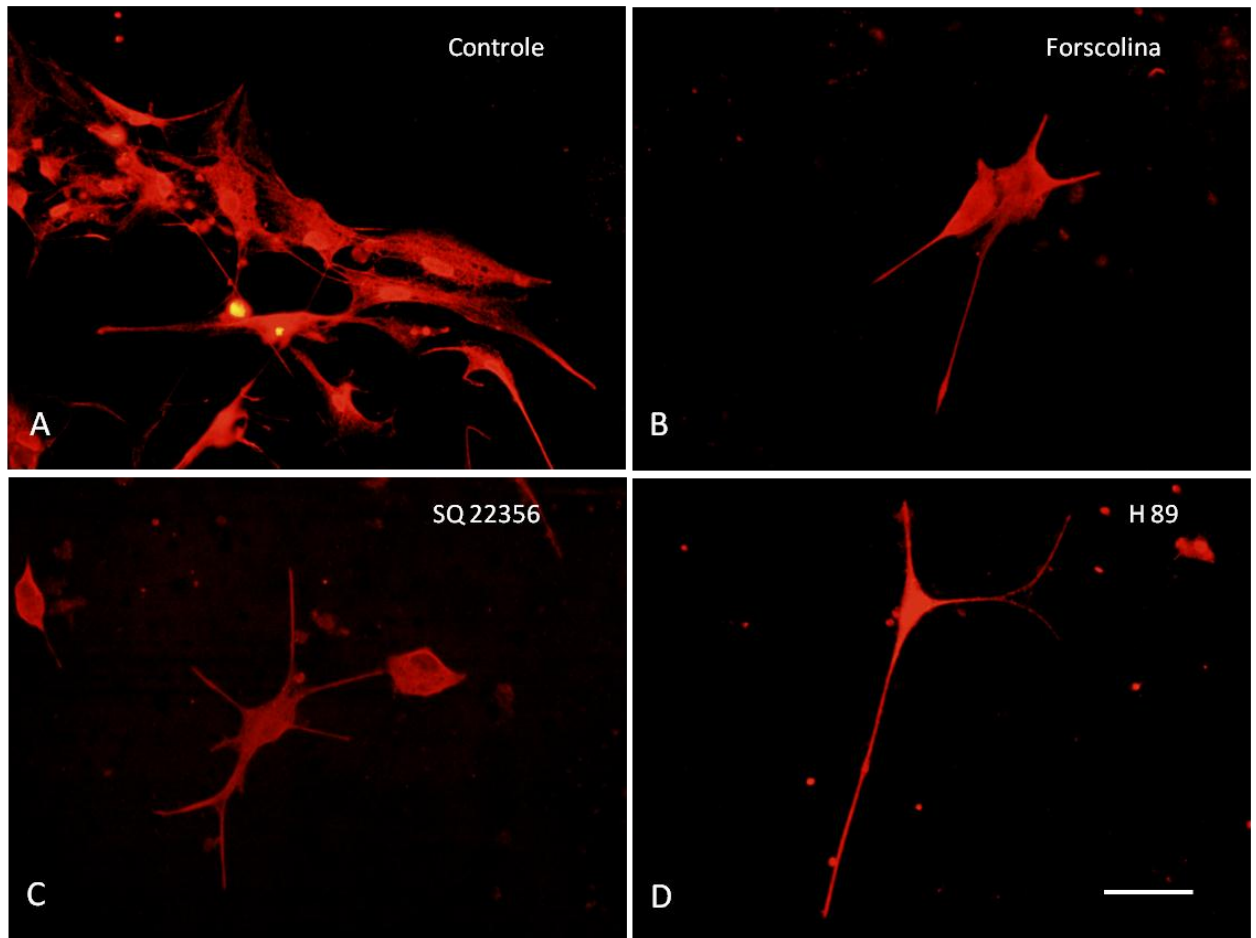


Legendas: A – Controle; B – Culturas tratadas com forskolina; C – Culturas tratadas com SQ22356; D – Culturas tratadas com H-89.

Nota: Em A, observamos oligodendrócitos com morfologias diversas, indicando diferentes estágios de desenvolvimento, algumas inclusive com formação de véus de membrana (setas). Após 30 minutos as células tratadas com forskolina (B) apresentaram prolongamentos maiores e redução dos véus de membrana. As culturas tratadas com SQ22356 (C) apresentaram células com morfologia diversa e algumas células apresentam a formação de véus de membrana, semelhante aos da cultura controle. As células das culturas que passaram pelo tratamento com H-89 (D) apresentam prolongamentos menores, em relação ao controle e também redução nos véus de membrana. Barra de calibração: 50 μ m.

Fonte: FELGUEIRAS, 2011.

Figura 7 – Oligodendrócitos com 6 div imunorreagidos com o anticorpo anti-CNPase



Legendas: A – Controle; B – Culturas tratadas com forskolina; C – Culturas tratadas com SQ22356; D – Culturas tratadas com H-89.

Nota: Em A, é possível notar oligodendrócitos com morfologia variada, indicando diferentes estágios de desenvolvimento. Depois de 24h de tratamento com a forskolina (B) observamos prolongamentos maiores e mais finos e que aparentam estar em menor quantidade, quando comparadas às culturas controles. O tratamento com SQ22356 (C) causou alterações morfológicas variadas nas células que, na sua maioria apresentavam prolongamentos maiores. Por último, o tratamento com H-89 (D) apresentou células com redução nos véus d membrana. Barra de calibração: 50µm.

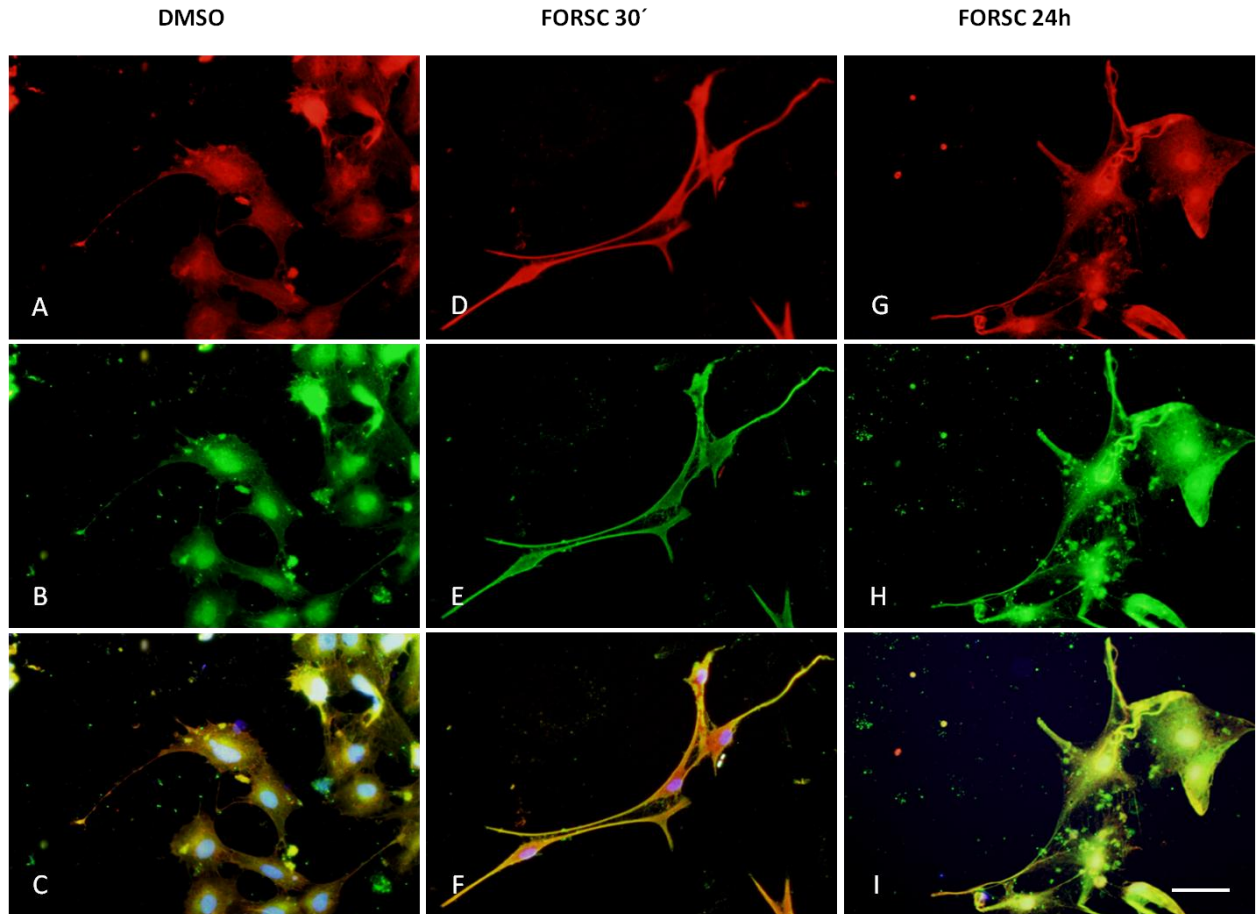
Fonte: FELGUEIRAS, 2011.

Ao observarmos a distribuição da CNPase nas células das culturas controle aos 5div, observamos a proteína distribuída de maneira uniforme pelo corpo celular, com um padrão filamentar (Figura 8A, 9A, 10A), que é semelhante ao padrão de distribuição da tubulina (Figura 8B, 9B, 10B). Após o tratamento com forscolina por 30 min, notamos que a CNPase manteve o seu padrão de marcação filamentar (Figura 8D), o mesmo se deu com a tubulina (Figura 8E), distribuído em toda a célula, padrão que se manteve após 24 h de tratamento (Figura 8G e 8H).

Quando as células foram tratadas com o inibidor SQ por 30 min não foi possível observar alterações na distribuição e no padrão de marcação da CNPase (Figura 9D) e também não foram observadas alterações na distribuição da tubulina (Figura 9E), ambas demonstrando um padrão filamentar de distribuição. Com 24 h de tratamento com SQ, a marcação da CNPase adquiriu um padrão puntiforme (Figura 9G), enquanto a tubulina manteve o padrão filamentar (Figura 9H).

O inibidor H-89 causou alterações na distribuição da CNPase com 30 min de tratamento com um aparente aumento da concentração da CNPase próximo ao núcleo (Figura 10D), a mesma alteração foi observada na distribuição da tubulina (Figura 10E), esta foi a única alteração, mantendo o padrão filamentar como nas células das culturas controle. Já as células tratadas com H-89 por 24 h continuaram a apresentar a CNPase próxima ao núcleo e passou a ter um padrão de distribuição puntiforme (Figura 10G). A tubulina também apresentou maior concentração próxima ao núcleo, mas o padrão continuou filamentar (Figura 10H).

Figura 8 - Oligodendrócios com 5 e 6 div imunoreagidos com anticorpos anti-CNPase e anti-tubulina e corados com DAPI: tratamento com forscolina

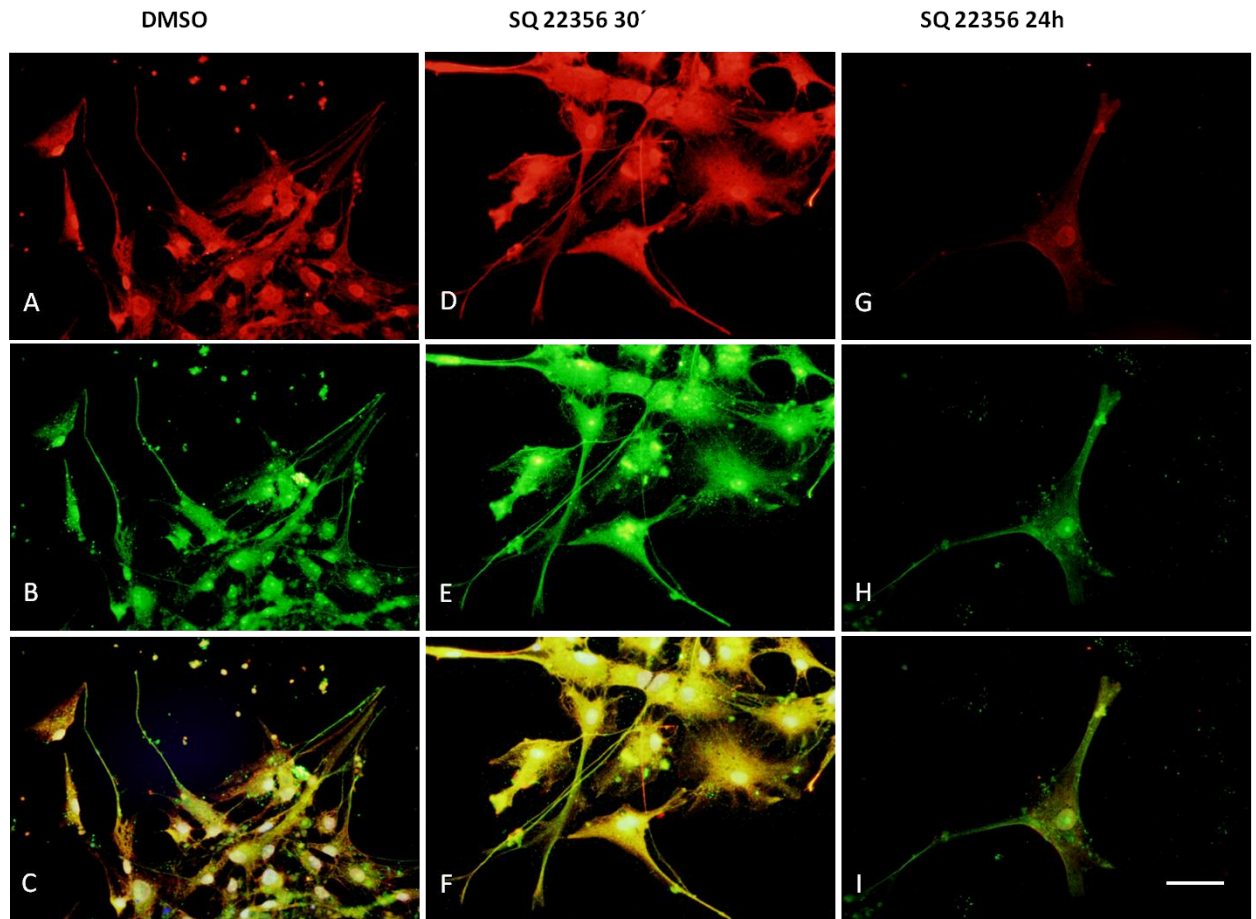


Legenda: A-C – Controle, imunoreagidos com anti-CNPase (A), anti-tubulina (B) e sobrepostas (C); D-F – Culturas tratadas por 30 minutos com forscolina, imunoreagidas com anti-CNPase (D), anti-tubulina (E), sobrepostas (F); G-I – Culturas tratadas por 24 horas com forscolina, imunoreagidas com anti-CNPase (G), anti-tubulina (H) e sobrepostas (I).

Nota: Em A, podemos observar a CNPase distribuída uniformemente no corpo celular com um padrão filamentar. Em B, a tubulina apresenta padrão semelhante à CNPase. D apresenta a CNPase distribuída de modo uniforme pela célula com padrão filamentar e em E a tubulina apresenta o padrão semelhante ao da CNPase. G apresenta a CNPase distribuída de modo uniforme pela célula com padrão filamentar. Em H a tubulina apresenta padrão semelhante ao da CNPase. Barra de calibração: 50µm.

Autor: FELGUEIRAS, 2011.

Figura 9 - Oligodendrócios com 5 e 6 div imunoreagidos com anticorpos anti-CNPase e anti-tubulina e corados com DAPI: tratamento com SQ22356

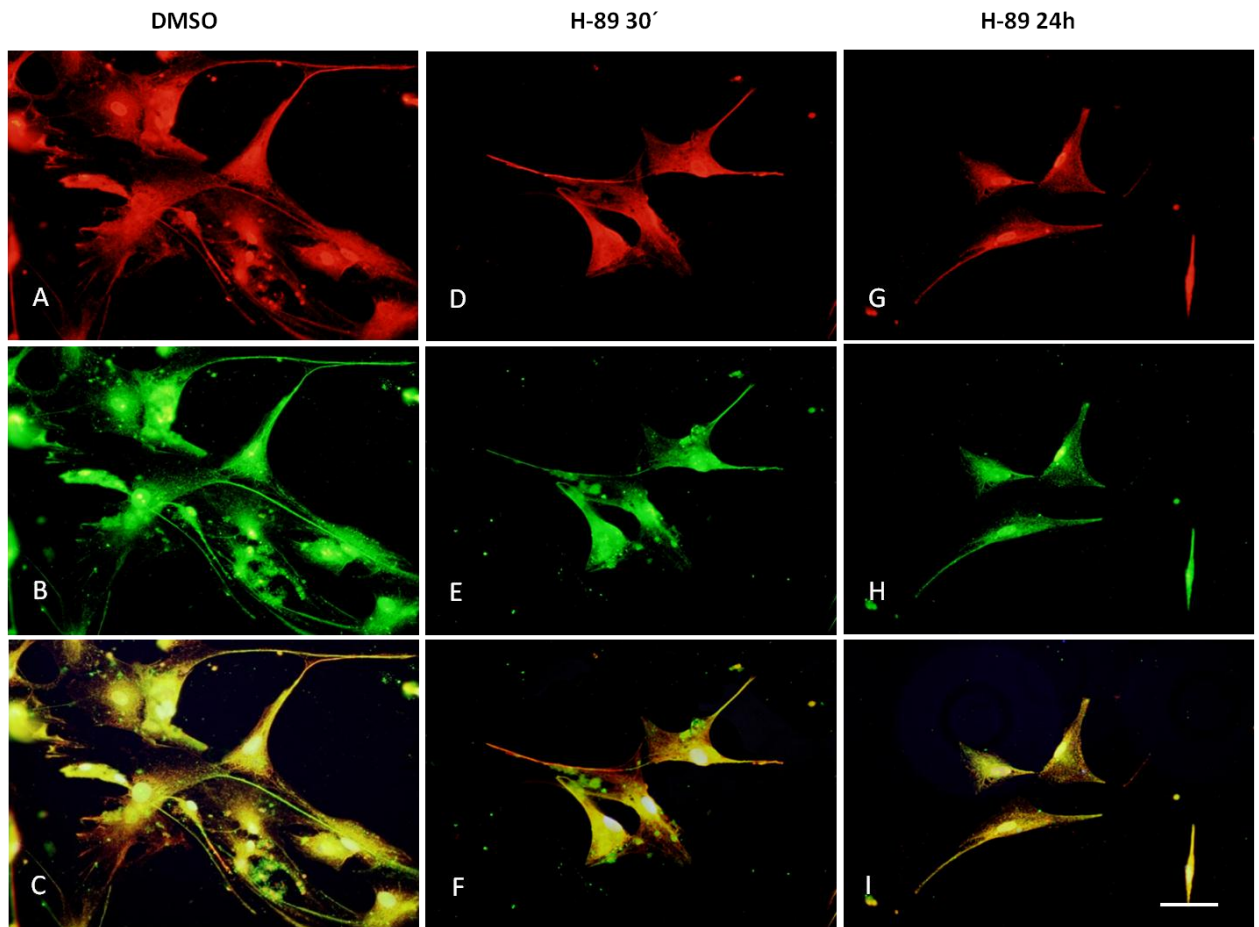


Legenda: A-C – Controle, imunoreagidos com anti-CNPase (A), anti-tubulina (B) e sobrepostas (C); D-F – Culturas tratadas por 30 minutos com SQ22356, imunoreagidas com anti-CNPase (D), anti-tubulina (E), sobrepostas (F); G-I – Culturas tratadas por 24 horas com SQ22356, imunoreagidas com anti-CNPase (G), anti-tubulina (H) e sobrepostas (I).

Nota: Em A, observamos a CNPase distribuída uniformemente no corpo celular com um padrão filamentar. B apresenta a tubulina com o padrão semelhante à CNPase. Em D e E, com 30 minutos de tratamento com SQ, não há modificação na distribuição de CNPase e tubulina. Em G, com 24 horas de tratamento a CNPase apresenta um padrão puntiforme de marcação. Em H, a tubulina mantém o padrão filamentar semelhante ao controle. Barra de calibração: 50µm.

Fonte: FELGUEIRAS, 2011.

Figura 10 - Oligodendrócios com 5 e 6 div imunoreagidos com anticorpos anti-CNPase e anti-tubulina e corados com DAPI: tratamento com H-89



Legenda: A-C – Controle, imunorreagidos com anti-CNPase (A), anti-tubulina (B) e sobrepostas (C); D-F – Culturas tratadas por 30 minutos com SQ22356, imunorreagidas com anti-CNPase (D), anti-tubulina (E), sobrepostas (F); G-I – Culturas tratadas por 24 horas com SQ22356, imunorreagidas com anti-CNPase (G), anti-tubulina (H) e sobrepostas (I).

Nota: Em A observamos a CNPase distribuída uniformemente no corpo celular com um padrão filamentar. Em B, a tubulina apresenta padrão semelhante à CNPase. Em D, encontramos a CNPase concentrada no corpo celular com seu padrão filamentar e a tubulina apresenta um padrão semelhante a CNPase (E). Em G, com 24 horas de tratamento a CNPase apresenta um padrão puntiforme e está mais concentrada próxima ao núcleo, enquanto a tubulina mantém um padrão filamentar (H) semelhante ao controle. Barra de calibração: 50 μ m.

Fonte: FELGUEIRAS, 2011.

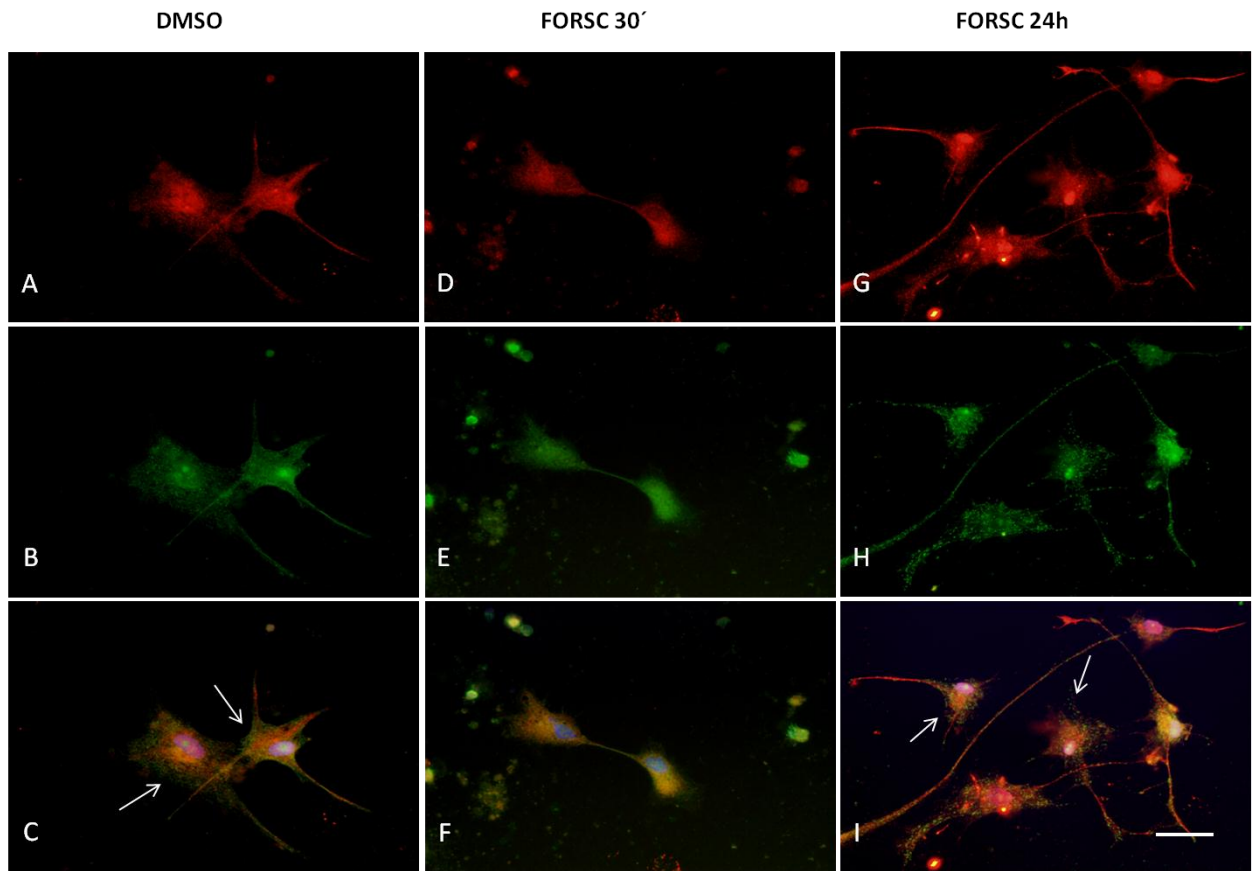
Ao compararmos o padrão de distribuição da CNPase com o da MAG, após os tratamentos por 30 min ou 24 h, observamos um efeito diferenciado na distribuição destas proteínas. A distribuição da CNPase nas culturas controle onde observamos a proteína distribuída de maneira uniforme pelo corpo celular, com um padrão filamentar (10A, 11A, 12A, 13A) e os efeitos dos tratamentos sobre a distribuição da CNPase, já foram descritos e estão demonstrados de forma representativa (Figuras 11D e G, Figuras 12D e G, Figuras 13D e G).

Quando observamos a distribuição da MAG é possível notar nas culturas controle aos 5/6 div que a MAG se encontrou distribuída pela célula também nas extremidades dos prolongamentos e véus de membrana de maneira uniforme, mas com um padrão puntiforme de distribuição (Figuras 11B, 12B e 13B). O tratamento com a forskolina após 30 min não causou alterações no padrão puntiforme, mas causou uma concentração da proteína no corpo celular apesar dela está distribuída pela célula, é possível notar também que ela se distribui nos véus em regiões mais distais que a CNPase (Figuras 11E e F). Depois de 24 h, a MAG mantém o padrão puntiforme por toda a célula, continua indo além da CNPase, contudo não há mais a concentração da proteína próximo ao núcleo (Figuras 11H e I).

O tratamento com o inibidor SQ por 30 min não alterou o seu padrão puntiforme de distribuição e havia a maior concentração no corpo celular, mas a proteína não se expandiu para porções além da marcação da CNPase nos véus de membrana (Figuras 13E e F). Não foram observadas alterações em relação às culturas controle após 24 h (Figuras 13H e I).

Quando observamos após 30 min de tratamento com o H-89 é possível notar que a MAG manteve o padrão puntiforme estando espalhada pela célula, além disso, a proteína continua bem distribuída nos véus de membrana (Figuras 14E e F). Após 24 h de tratamento não há alterações na distribuição e na localização da proteína, contudo não se expandiu para porções mais distais dos véus de membrana (Figuras 14H e I).

Figura 11 – Oligodendrócitos com 5 e 6 div imunoreagidos com os anticorpos anti CNPase e anti-MAG e corados com DAPI: tratamento com forskolina

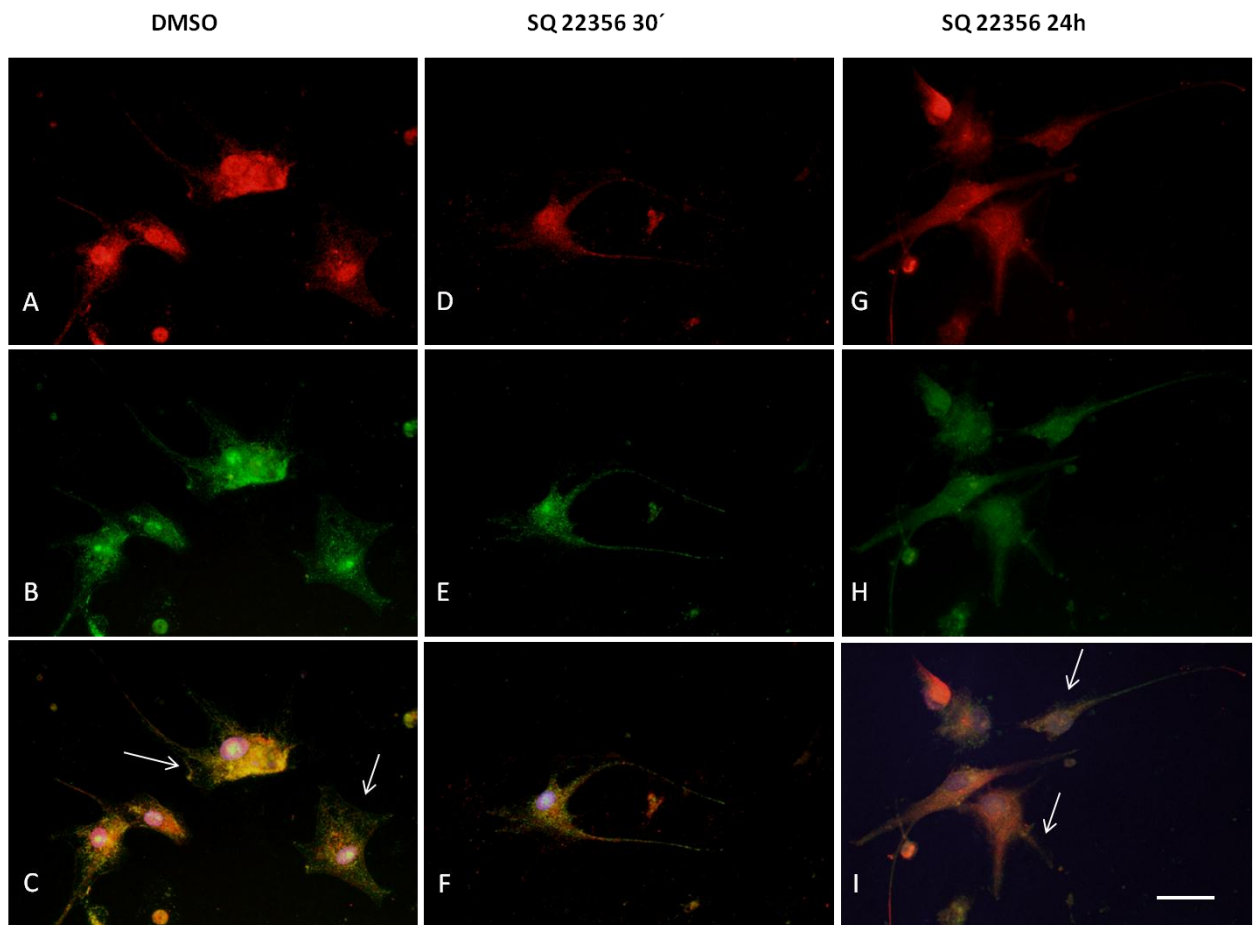


Legenda: A-C – Controle, imunorreagidos com anti-CNPase (A), anti-MAG (B) e sobrepostas (C); D-F – Culturas tratadas por 30 minutos com forskolina, imunorreagidas com anti-CNPase (D), anti-MAG (E), sobrepostas (F); G-I – Culturas tratadas por 24 horas com foscolina, imunorreagidas com anti-CNPase (G), anti-MAG (H) e sobrepostas (I).

Nota: Em A, observamos a CNPase distribuída uniformemente no corpo celular com um padrão filamentar. Em B, a MAG também está distribuída de maneira uniforme pela célula, mas com um padrão puntiforme. Em C, na sobreposição das imagens é possível ver a MAG indo além da distribuição da CNPase (setas). Em D, com 30 minutos de tratamento o padrão de distribuição da CNPase não se modifica, porém a MAG, apesar de estar distribuída por toda a célula, fica mais concentrada no corpo celular e mantém o padrão puntiforme (E). Em G, com 24 horas de tratamento observamos mais uma vez que a distribuição da CNPase não se modifica, que as alterações observadas na distribuição da MAG são revertidas e em I observamos na sobreposição das imagens que a marcação da MAG se expande além da CNPase (setas). Barra de calibração: 50 μ m.

Fonte: FELGUEIRAS, 2011.

Figura 12 - Oligodendrócitos com 5 e 6 div imunoreagidos com os anticorpos anti-CNPase e anti-MAG e corados com DAPI: tratamento com SQ22356

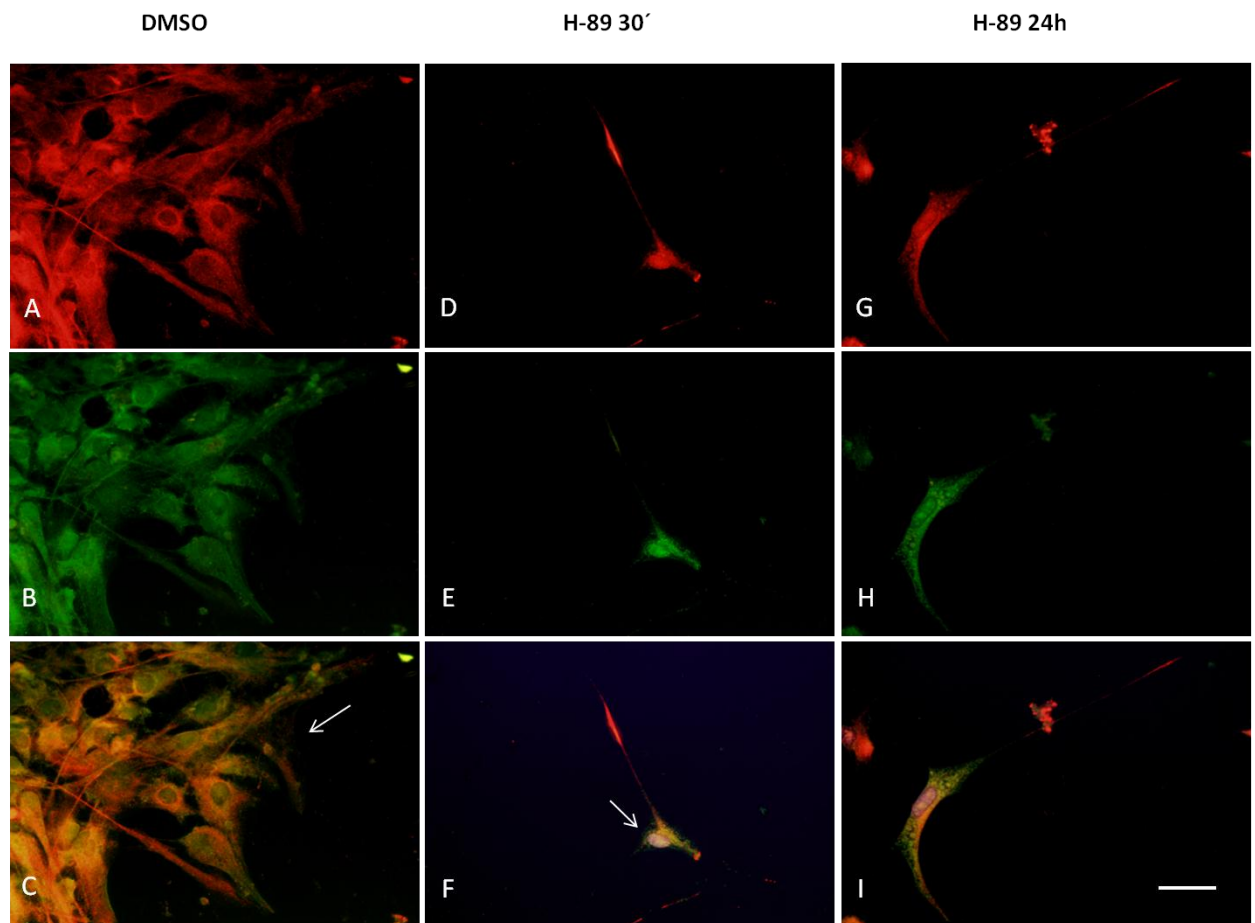


Legenda: A-C – Controle, imunoreagidos com anti-CNPase (A), anti-MAG (B) e sobrepostas (C); D-F – Culturas tratadas por 30 minutos com SQ22356, imunoreagidas com anti-CNPase (D), anti-MAG (E), sobrepostas (F); G-I – Culturas tratadas por 24 horas com SQ22356, imunoreagidas com anti-CNPase (G), anti-MAG (H) e sobrepostas (I).

Nota: Em A, observamos a CNPase distribuída uniformemente no corpo celular com um padrão filamentar. Em B, a MAG também está distribuída de maneira uniforme pela célula, mas com um padrão puntiforme. Em C, com a sobreposição é possível ver a MAG indo além da distribuição da CNPase (setas). Como já mostrado com 30 minutos de tratamento a CNPase mantém padrão filamentar semelhante ao controle (comparar D com A). Em E, a MAG se apresenta distribuída pela célula, porém mais concentrada no corpo celular e mantendo o padrão puntiforme e em F observamos na sobreposição que a MAG não se expande além da CNPase. Em G, com 24 horas de tratamento a CNPase passou a ter um padrão puntiforme de distribuição da MAG são revertidas (H). Em I, observamos na sobreposição que a MAG volta a se distribuir nos véus de membrana além da CNPase (setas). Barra de calibração: 50 μ m.

Fonte: FELGUEIRAS, 2011.

Figura 13 - Oligodendrócitos com 5 e 6 div imunoreagidos com os anticorpos anti-CNPase e anti-MAG e corados com DAPI: tratamento com H-89



Legenda: A-C – Controle, imunorreagidos com anti-CNPase (A), anti-MAG (B) e sobrepostas (C); D-F – Culturas tratadas por 30 minutos com SQ22356, imunorreagidas com anti-CNPase (D), anti-MAG (E), sobrepostas (F); G-I – Culturas tratadas por 24 horas com SQ22356, imunorreagidas com anti-CNPase (G), anti-MAG (H) e sobrepostas (I).

Nota: Em A, observamos a CNPase distribuída uniformemente no corpo celular com um padrão filamental. Em B, a MAG também está distribuída de maneira uniforme pela célula, mas com padrão puntiforme. Em C, na sobreposição é possível ver, mais uma vez, a MAG indo além da distribuição da CNPase (setas). Em D, com 30 minutos de tratamento com H-89, a CNPase fica mais concentrada no corpo celular, mas mantém o padrão filamental. Em E, a MAG mantém o padrão semelhante ao controle (B). Em F, observamos na sobreposição que a MAG se expande além da CNPase (setas). Em G, com 24 horas de tratamento a CNPase apresenta padrão puntiforme e mais concentrada no corpo celular. Em H, observamos a MAG distribuída por toda a célula e com o padrão puntiforme, porém observamos na sobreposição que a MAG não se expande além da CNPase (I). Barra de calibração: 50µm.

Fonte: FELGUEIRAS, 2011.

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a via do AMPc/PKA tem papel fundamental na diferenciação da oligodendroglia, na morfologia celular da linhagem oligodendroglial, na distribuição das proteínas CNPase e MAG e, conseqüentemente, no processo de mielinização. Isso se dá porque pudemos observar que a ativação da adenilato ciclase, ou seja, o aumento nos níveis de AMPc leva ao aumento do comprimento dos prolongamentos e a uma aparente redução nos véus de membrana, isto já com 30 min de tratamento com a forskolina. Com 24 h, o tratamento com a forskolina também causou o aumento dos prolongamentos. Esses resultados são semelhantes aos obtidos em motoneurônios que tiveram o aumento no comprimento dos neuritos após 12 e 24 h de tratamento com forskolina (Aglah et al., 2008). O tratamento com o inibidor SQ leva ao aumento do tamanho dos prolongamentos, tanto após 30 min quanto 24 h. O tratamento com o H-89 causou uma redução no tamanho dos prolongamentos e dos véus de membrana.

Para a linhagem oligodendroglial, as alterações nas dimensões e no número dos prolongamentos é um fator decisivo, já que é papel dos prolongamentos reconhecer o ambiente aonde a célula se localiza, e aderir e envolver o axônio para que o processo de mielinização tenha início. Com isso, é possível que as modificações nos tamanhos dos prolongamentos possam influenciar tanto o processo de adesão como a mielinização em si. Foi observada também uma diminuição da arborização secundária, que é ainda mais grave, já que isso acaba reduzindo o número de axônios localizados e reconhecidos pelos oligodendrócitos, o que pode reduzir o embainhamento/mielinização e, conseqüentemente, axônios que deveriam se manter estáveis e vivos podem acabar degenerando.

É provável que a sinalização celular via RhoGTPases seja um dos caminhos utilizados pela oligodendroglia para a regulação da sua diferenciação. Como são proteínas associadas ao citoesqueleto, atuam como interruptores moleculares. Além disso, a mielinização é altamente dependente da polarização que é regulada pelas RhoGTPases (Etienne-Manneville, 2008). Foi observado em fibroblastos que as fibras de estresse e os complexos de adesão focal estão organizados quando a Rho está ativa (Hall, 1998). Foi demonstrado também que com 15 min de inativação da

Rho, não é mais visto o acúmulo de integrinas na superfície celular (Hotchin & Hall, 1995). Foi notado ainda que as estruturas de actina induzidas pela Rac e pela Cdc42 estão associadas com os complexos de adesão das integrinas (Nobes & Hall, 1995).

As RhoGTPases podem ser ativadas por integrinas (Luo et al., 2007), como já foi descrito em astrócitos *in vitro*, a Cdc42 e a Rac1 são ativadas e recrutadas até o limite da polarização dos astrócitos (Etienne-Manneville & Hall, 2001). Contudo, quando as integrinas foram inibidas não ocorreram a ativação e o recrutamento da Cdc42. Essa polarização celular é importante, por exemplo, para o transporte de vesículas de RNAm. Assim, se ocorre uma falha na polarização, o transporte fica comprometido. O caso específico da Cdc42 é ainda mais complicado porque esta RhoGTPase é fundamental para o controle da orientação da célula; quando ela é inibida, o centróssomo, a protrusão e a migração celular passam a ter uma orientação aleatória (Etienne-Manneville & Hall, 2001). O Cdc42 ainda está relacionado a um complexo importante para o transporte de vesículas, crescimento dos prolongamentos e da arborização em oligodendrócitos (Anitei et al., 2006). Isso pode ser uma possível explicação para o aparente aumento dos prolongamentos após o tratamento com a forskolina e ainda a redução do número de prolongamentos. Já foi descrito que camundongos com ablação para os genes da Cdc42 e Rac1 apresentaram mielina aberrante com o acúmulo de citoplasma nas alças internas da mielina. Estudos mostraram que a Cdc42 e a Rac1 atuam em sinergia e que ambos são capazes de interferir, separados ou em conjunto, na mielinização, sem afetar a proliferação e diferenciação da oligodendroglia (Thurnherr et al., 2006).

Outra possibilidade está associada a RhoA e seu efetor a Rho cinase (ROCK), uma vez que, em conjunto, têm papel chave como reguladores da morfologia e extensão celular no processo de mielinização em oligodendrócitos. A RhoA pode ser inibida pela cinase Fyn pertencente à família Src, e esta inibição leva ao amadurecimento dos oligodendrócitos (Wolf et al., 2001). Já foi demonstrado que componentes da mielina inativam a Fyn para que a RhoA seja ativada, inibindo assim a diferenciação celular (Baer et al., 2009). A neutrina-1, importante fator de diferenciação do oligodendrócito, inibe a RhoA através da ativação da Fyn para que haja o amadurecimento celular com o crescimento e elaboração dos prolongamentos (Rajasekharan et al., 2009). A RhoA é inibida pela PKA e é possível que a inibição

da PKA pelo H-89 ative esta RhoGTPase, justificando assim a redução no tamanho dos prolongamentos nas culturas tratadas com este inibidor.

Rajasekharan e colaboradores demonstraram em 2010 que o desenvolvimento do oligodendrócito com a sua diferenciação morfológica passa pelo balanço entre a ativação e desativação da RhoA controlado pela neutrina-1. Quando o precursor de oligodendrócito está migrando, a ativação da RhoA e da ROCK dependente do receptor de neutrina-1 deletado em carcinoma colorretal (Dcc) pela neutrina-1 reduzem o tamanho dos prolongamentos e, quando o precursor para de migrar e se diferencia em célula madura, a neutrina-1 leva a uma redução da atividade da RhoA. É interessante observar que o mesmo fator pode levar a resultados diferentes dependendo do caminho utilizado e do estágio de desenvolvimento da célula. É interessante notar também que a Fyn participa da inativação da RhoA e da Rock, mas participa da ativação da Cdc42 causando a extensão dos prolongamentos.

Sobre os véus de membrana, a CNPase é correlacionada com a mielinização (Jarjour et al., 2012), mas nossos resultados demonstram que ela pode não evidenciar toda a extensão dos véus de membrana *in vitro*. É interessante observar que a CNPase é uma proteína de mielina não compacta e que é encontrada nas estruturas semelhantes a nervuras nos estágios mais maduros do desenvolvimento da oligodendroglia *in vitro*. Ao observarmos a morfologia das células com a CNPase, temos a impressão de que os tratamentos com forskolina e H-89 causaram redução dos véus de membrana e que o SQ não. Contudo, quando observamos as imagens com maior aumento, observamos através da MAG que o efeito no véu foi justamente o contrário. A forskolina e o H-89 causaram alterações apenas na localização da CNPase, já o SQ esse sim causou alteração no tamanho do véus de membrana.

Qualquer alteração na formação dos véus de membrana ou nos comprimentos dos prolongamentos é algo relevante dada a estabilidade da mielina. É válido lembrar que no SNC intacto os componentes da membrana da mielina possuem meia-vida que podem alcançar desde várias semanas até meses. Estima-se que a meia-vida do colesterol, importante componente da membrana da mielina, seja maior que 8 meses (Saher & Simnos, 2010). Contudo, a estabilidade da mielina tem como uma de suas razões o fato dela ser um sistema fechado onde seus componentes estão livres e encontram a sua localização através do balanço entre forças elétricas atrativas fortes e repulsivas (Aggarwal et al., 2011). É possível que com a alterações na distribuição tanto da CNPase, que será analisado a seguir, e da

MAG, os demais componentes possam realocar-se para manter a estabilidade da membrana da mielina.

Em relação a distribuição da CNPase, as culturas controle apresentaram um padrão filamentar de distribuição, nenhum tratamento alterou esse padrão de distribuição após 30 min, mas pudemos notar que ela sofreu alteração após 24 h de tratamento com SQ e com H-89, passando a apresentar um padrão puntiforme. Em relação à localização da CNPase, apenas o tratamento com H-89 apresentou alteração, com a proteína se concentrando mais no corpo celular. Isto indica que tanto o AMPc quanto a PKA estão relacionados a síntese da CNPase. Contudo, a PKA parece ser fundamental para que a síntese e/ou distribuição da CNPase ocorra de forma precisa.

Gravel e colaboradores demonstraram em 2000 que a inibição da PKA em culturas de oligodendrócitos que receberam dbcAMP reduz a transcrição da isoforma CNP1 e ainda que a PKA é necessária para a indução do acúmulo de RNAm da isoforma CNP1. Agrawal e colaboradores afirmaram em 1994 que a isoforma CNP2 seria supregulada por ativadores da PKA. Quando foram analisadas as sequências primárias do N-terminal da mesma isoforma, existiam três resíduos serina com regiões para a ligação da PKA ou da PKC. Foi sugerido ainda que a fosforilação da CNP2 seria capaz de regular a interação dela com o citoesqueleto (O'neil & Braun, 2000). Sobre a localização da proteína, lembramos que, no oligodendrócito, o RNAm da CNPase também é transportado para determinados sítios antes de ser transcrito (Braun et al., 1988; Trapp et al., 1988), o que também depende dos microtúbulos (Brumwell et al., 2002), e o tratamento com H-89 pelo mesmo período causou alterações na localização da tubulina, que ficou mais concentrada no corpo celular. Isso talvez possa explicar o padrão de distribuição puntiforme da CNPase após os tratamentos com SQ e H-89.

Alterações semelhantes a estas na distribuição da CNPase já foram observadas em trabalho anterior do nosso grupo em culturas com deficiência de T3. Como já foi mencionado, também foram observadas alterações na distribuição da CNPase em culturas de oligodendrócitos tratadas com os inibidores da via da MAPK/ERK, PD098059 e UO126 (Younes-Rapozo et al., 2009). Esta via também desenvolve um importante papel na proliferação e na diferenciação celular (Bhat & Zhang, 1996; Baron et al., 2000). Younes-Rapozo e colaboradores (2009) também sugeriram que esta via de sinalização tenha relação com o alongamento dos

prolongamentos de oligodendrócitos e com a adesão celular. Também já foi dito e explicado como a PKA pode regular a via da MAPK/ERK. Assim, fica claro que a via do AMPc/PKA tem papel importante em pelo menos dois aspectos envolvidos no desenvolvimento e na diferenciação morfológica do oligodendrócito.

Quanto a MAG, nas culturas controle a proteína se encontra puntiforme, por toda a célula, nas extremidades e nos véus de membrana. Após 30 min de tratamento com forskolina e SQ foi observado o aumento da concentração da proteína no corpo celular. Além disso, o tratamento com a forskolina parece não ter alterado a formação do véu de membrana. É possível que essa maior concentração possa ser fruto de uma maior transcrição gênica. Sabendo que a MAG é uma das proteínas responsáveis por ajudar os prolongamentos dos oligodendrócitos a reconhecerem se o axônio será mielinizado (Li et al., 1994, Montag et al., 1994), é passível de questionamento se o aumento na concentração ou produção da MAG possa interferir neste reconhecimento. Contudo, nos parece ser mais grave quando observamos que o tratamento com o SQ resultou na concentração da MAG no corpo celular e na redução dos véus de membrana. Isto nos permite crer que a concentração da proteína neste caso se dê pela redução do véu, não tendo para onde a proteína ser transportada. Podemos nos questionar então se a inibição da adenilato ciclase pode interferir na mielinização não apenas pela redução do véu de membrana, mas também pela alteração da distribuição da proteína. O tratamento com H-89 por 24 h também causou a redução dos véus de membrana.

O RNAm da MAG é transportado em vesículas pela célula e transcrito nos prolongamentos (Quarles & Trapp, 1984) e, em 2002, Brumwell e colaboradores relacionaram esse transporte com os microtúbulos. Quando a distribuição da tubulina foi avaliada após o tratamento com SQ pelo mesmo período não apresentou alteração da distribuição dela, indicando que a redução da MAG no véu de membrana não é causada pela desorganização da tubulina que levaria a uma falha no transporte do RNAm. Erb e colaboradores sugeriram em 2003 que o *splicing* alternativo da MAG e a diferenciação morfológica dos oligodendrócitos possam ser regulados ao mesmo nível de ação do AMPc. Os resultados com o H-89 por sua vez, demonstraram que o tratamento com o inibidor faz com que a tubulina se localize mais concentrada no corpo celular também e que, talvez, esse fato possa ter influência na formação do véu de membrana.

Como o tratamento com o SQ causou um efeito mais rápido do que o tratamento com o H-89 na distribuição da MAG, é possível então que além da PKA o AMPc possua outro caminho, inclusive mais rápido, para influenciar na formação dos véus de membrana e na distribuição da MAG. Em cones de crescimento de neurônios, quando os níveis de AMPc são elevados, a proteína de troca diretamente ativada pelo AMPc (Epac) é ativada, mas quando os níveis de ativação da PKA são baixos, a Epac então deixa de atuar e a PKA se torna ativa (Murray et al., 2009).

Novas investigações são necessárias para que possamos compreender de maneira efetiva como se dá a formação dos prolongamentos dos oligodendrócitos, o contato com os axônios e a formação da bainha de mielina. Todos os processos citados dependem da relação da linhagem oligodendroglial com os sinais extracelulares e estão relacionados com as vias de sinalização. Nossas observações em relação a ativação e inibição da via do AMPc/PKA nos oligodendrócitos reforçam a participação desta via no desenvolvimento do oligodendrócito, incluindo a formação dos prolongamentos, suas ramificações e ainda a formação dos véus de membrana, que terão consequências na formação e manutenção da bainha de mielina.

CONCLUSÕES

1. Os tratamentos por 30 min com o ativador e o inibidor da adenilato ciclase, forskolina e SQ22356 respectivamente, e com o inibidor da PKA, o H-89, alteraram a morfologia dos oligodendrócitos, com aumento dos prolongamentos pela modulação da adenilato ciclase e redução dos prolongamentos com a inibição da PKA;
2. O tratamento por 24 h com o inibidor da PKA H-89 causa redução dos véus de membrana;
3. O tratamento por 30 min com o ativador e o inibidor da adenilato ciclase causaram um aumento na concentração da MAG no corpo celular;
4. Após 24 h, o tratamento com o ativador da adenilato ciclase, a forskolina, aumenta as concentrações da CNPase e da tubulina no corpo celular, mas causa a redução da concentração da MAG na mesma região. Com o mesmo tempo, tratamentos com os inibidores da adenilato ciclase, o SQ22356, e da PKA, o H-89, alteram o padrão de distribuição da CNPase;
5. Os resultados observados confirmam a relação existente entre a via do AMPc/PKA com a diferenciação da oligodendroglia, a expressão/distribuição da CNPase, da MAG e da tubulina; podendo haver consequências na formação da bainha de mielina.

REFERÊNCIAS

- Aggarwal S, Yurlova L, Simons M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol.* 2011; 21(10): 585-593.
- Aggarwal S, Yurlova L, Snaidero N, Reetz C, Frey S, Zimmermann J, et al. A size barrier limits protein diffusion at the cell surface to generate lipid-rich myelin-membrane sheets. *Dev Cell.* 2011; 21(3): 445-456.
- Aglah C, Gordon T, Posse de Chaves EI. cAMP promotes neurite outgrowth and extension through protein kinase A but independently of Erk activation in cultured rat motoneurons. *Neuropharmacology.* 2008; 55(1):8-17.
- Agrawal HC, Sprinkle TJ, Agrawal D. In vivo phosphorylation of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase(CNP): CNP in brain myelin is phosphorylated by forskolin- and phorbol ester-sensitive protein kinases. *Neurochem Res.* 1994; 19(6):721-728.
- Amur-Umarjee, SG, Dasu, RG, Campagnoni, AT. Temporal expression of myelin specific components in neonatal mouse brain cultures: evidence that 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase appears prior galactocerebroside. *Developmental Neuroscience.* 1990; 12: 251-262.
- Aplin AE, Juliano RL. Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. *J Cell Sci.* 1999; 112 (Pt 5):695-706.
- Arimura N, Kaibuchi K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8: 194-205.
- Assemat E, Bazellieres E, Pallesi-Pocachard E, le Bivic A, Massey-Harroche D. Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1778:614-630.
- Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp Neurol.* 2009; 513(5): 532-541.
- Bacon C, Lakics V, Machesky L, Rumsby M. N-WASP regulates extension of filopodia and processes by oligodendrocyte progenitors, oligodendrocytes, and Schwann cells — implications for axon ensheathment at myelination. *Glia.* 2007; 55:844-858.
- Baron W, Metz B, Bansal R, Hoekstra D, de Vries H. PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiple intracellular signaling pathways. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2000; 15(3): 314-329.

- Baron-Van Ecercooren A, Avellana-Adalid V, Ben-Younes-Chennoufi A, Gansmuller A, Nait-Ousmemar B, Vignais L. Cell-cell interactions during the migration of myelin-forming cells transplanted in the demyelinated spinal cord. *Glia*. 1996; 16: 147–164.
- Barradas PC, Gomes SS, Cavalcante LA. CNPase expression in the developing opossum brain stem and cerebellum. *Neuroreport*. 1995; 6(2):289-292.
- Barradas PC, Gomes SS, Cavalcante LA. Heterogeneous patterns of oligodendroglial differentiation in the forebrain of the opossum *Didelphis marsupialis*. *J Neurocytol*. 1998; 27(1):15-25.
- Barres BA, Raff MC. Axonal control of oligodendrocyte development. *J Cell Biol*. 1999 147: 1123–1128.
- Barres BA, Lazar MA, Raff MC. A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development*. 1994; 120: 1097–1108.
- Bartsch U, Faissner A, Trotter J, Dörries U, Bartsch S, Mohajer H, et al. Tenascin demarcates the boundary between the myelinated and non-myelinated part of the retinal ganglion cell axons in the developing and adult mouse. *J Neurosci*. 1994; 14: 4756–4768.
- Bauer NG, Richter-Landsberg C, Ffrench-Constant C. Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. *Glia*. 2009; 57(16):1691-1705.
- Baumann N, Pham-Dihn D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*. 2001; 81: 871-927
- Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature*. 2000; 405:187–191.
- Bhat NR, Zhang P. Activation of mitogen-activated protein kinases in oligodendrocytes. *Journal of Neurochemistry*. 1996; 66(5): 1986-1994.
- Bifulco M. Role of the iporenoic pathway in ras transforming activity, cytoskeleton organization, cell proliferation and apoptosis. *Life Science*. 2005; 77(14): 1740-1749.
- Brophy P. Interactions of lipids with proteins of myelin and its associated cytoskeleton. In: *Myelin-Biology and Chemistry*, R.E. Martenson. Boca Raton: Ed. CRC Press; 1992, pp. 197-211.
- Bunge MB, Bunge RP, Pappas GD. Electron microscopic demonstration of the connections between glia and myelin sheath in the developing mammalian central nervous system. *J Cell Biol*. 1962; 12: 448-459.
- Bunge RP. Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev*. 1968; 48: 197-210.

- Butt AM, Ransom B. Visualization of oligodendrocytes and astrocytes in the intact rat optic nerve by intracellular injection of Lucifer Yellow and horseradish peroxidase. *Glia*. 1989; 2: 470–475.
- Campagnoni AT, Macklin WB. Cellular and molecular aspects of myelin protein gene expression. *Mol Neurobiol*. 1988; 2: 41–89.
- Charest PG, Firtel RA. Big Roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem J*. 2007; 401: 377-390.
- Chrast R, Saher G, Nave KA, Verheijen MH. Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. *J Lipid Res*. 2011; 52: 219-434.
- Clark RE Jr., Miskimins WK, Miskimins R. Cyclic AMP inducibility of the myelin basic protein gene promoter requires the NF1 site. *Int J Dev Neurosci*. 2002; 20(2): 103-111.
- Colognato H, Baron W, Avellan-Adalid V, Relvas JB, Baron-Van Evercooren A, Georges-Labouesse E, et al. CNS integrins switch growth factor signaling to promote target-dependent survival. *Nature Cell Biology*. 2002; 4(11): 833-841.
- Curtis R, Cohen J, Fok-Seang J, Hanley MR, Gregson NA, Reynolds R, et al. Development of macroglial cells in rat cerebellum. I. Use of antibodies to follow early in vivo development and migration of oligodendrocytes. *J Neurocytol*. 1988; 17: 43–54.
- DeBellard ME, Tang S, Mukhopadhyay G, Shen YJ, Filbin MT. 1996. Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. *Mol Cell Neurosci* 7: 89 –101.
- Decker L, French-Constant C. Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. *J Neurosci*. 2004; 24(15): 3816-3825.
- Dyer CA, Phillbotte T, Wolf MK, Billings-Gagliardi S. Regulation of cytoskeleton by myelin components: studies on shiverer oligodendrocytes carrying an Mbp transgene. *Dev Neurosci*. 1997; 19(5): 395-409.
- Dyer CA. The structure and function of myelin: from inert membrane to perfusion pump. *Neurochem Research*. 2002; 27(11): 1279-1292.
- Emery B, Agalliu D, Cahoy JD, Watkins TA, Dugas JC, Mulinyawe SB, et al. Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination. *Cell*. 2009; 138: 172–185.
- Emery, B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science*. 2010; 330: 779–782.

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

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

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

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

Ffrench-Constant C, Miller RH, Burne JF, Raff MC. Evidence that migratory oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells are kept out of the rat retina by a barrier at the eye-end of the optic nerve. *J Neurocytol.* 1988; 17: 13–25.

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

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

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

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

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

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

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

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998; 279(5350): 509-514.

- Hang P, Mohanty. p38 MAP kinase regulation of oligodendrocyte differentiation with CREB as a potential target. *Neurochem Res.* 2007; 32(2): 293-302.
- Hardy R, Reynolds R. Proliferation and differentiation potential of rat forebrain oligodendroglial progenitors both in vitro and in vivo. *Development.* 1991; 111: 1061–1080.
- Hardy R, Reynolds R. Neuron-oligodendroglial interactions during central nervous system development. *J Neurosci Res.* 1993; 36(2): 121-126.
- Hardy RJ, Friedrich VL. Progressive remodeling of the oligodendrocyte process arbor during myelinogenesis. *Dev Neurosci.* 1996; 18: 243–254.
- Hart IK, Richardson WD, Bolsover SR, Raff MC. PDGF and intracellular signaling in the timing of oligodendrocyte differentiation. *J Cell Biol.* 1989; 109: 3411–3417.
- Hartline DK. What is myelin? *Neuron Glia Biol.* 2008; 4: 153–163.
- Holz A, Schaeren-Wiemers N, Schaefer C, Pott U, Colello RJ, Schwab ME. Molecular and developmental characterization of novel cDNAs of the myelin-associated/oligodendrocytic basic protein. *J Neurosci.* 1996; 16(2): 467-77.
- Hotchin NA, Hall A. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol.* 1995; 131(6 Pt 2): 1857-1865.
- Howe AK, Aplin AE, Juliano RL. Anchorage-dependent ERK signaling-mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev.* 2002; 12(1): 30-35.
- Howe AK. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1692(2-3): 159-174.
- Jaramillo ML, Afar DE, Almazan G, Bell JC. Identification of tyrosine 620 as the major phosphorylation site of myelin-associated glycoprotein and its implication in interacting with signaling molecules. *J Biol Chem.* 1994; 269: 27240 –27245
- Jarjour AA, Zhang H, Bauer N, Ffrench-Constant C, Williams A. In vitro modeling of central nervous system myelination and remyelination. *Glia.* 2012; 60(1): 1-12.
- Kidd GJ, Hauer PE, Trapp BD. Axons modulate myelin protein messenger RNA levels during central nervous system myelination in vivo. *J Neurosci Res.* 1990; 26: 409–418.
- Kirby BB, Takada N, Latimer AJ, Shin J, Carney TJ, Kelsh RN, et al. In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat Neurosci.* 2006; 9(12): 1506-1511.
- Kursula P, Lehto VP, Heape AM. The small myelin-associated glycoprotein binds to tubulin and microtubules. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001; 87: 22–30.

Kursula P, Tikkanen G, Lehto VP, Nishikimi M, Heape AM. Calcium-dependent interaction between the large myelin-associated glycoprotein and S100beta. *J Neurochem.* 1999; 73: 1724–1732.

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

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

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

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

Li C, Tropak MB, Gerlai R, Clapoff S, Abramow-Newerly W, Trapp B, et al. Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature.* 1994; 369(6483): 747-750.

Liang X, Draghi NA, Resh MD. Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *J Neurosci.* 2004; 24(32): 7140-7149.

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

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

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

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

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

Milner R, Edwards G, Streuli C, French-Constant C. A role in migration for the alpha V beta 1 integrin expressed on oligodendrocyte precursors. *J Neurosci.* 1996; 16: 7240–7252.

Misteli, T. The concept of self-organization in cellular architecture. *J. Cell Biol.* 2001; 155: 181–185

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

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

Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB. Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. *J Neurosci Res*. 1996; 43(3): 315-330.

Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB. Colocalization of NG2 proteoglycan and PDGF a-receptor on O-2A progenitor cells in the developing rat brain. *J Neurosci Res*. 1996; 43: 299–314.

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

O'Neill RC, Braun PE. Selective synthesis of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase isoform 2 and identification of specifically phosphorylated serine residues. *J. Neurochem*. 2000; 74(2): 540-546.

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

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

Orentas DM, Miller RH. The origin of spinal cord oligodendrocytes is dependent on local influences from the notochord. *Dev Biol*. 1996; 177: 43–53.

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

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

Piaton G, Gould RM, Lubetzki C. Axon–oligodendrocyte interactions during developmental myelination, demyelination and repair. *J. Neurochem*. 2010; 114: 1243–1260.

Pringle NP, Richardson WD. A singularity of PDGF alphareceptor expression in the dorso-ventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development*. 1993; 117: 525–533.

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

Saher G, Brügger B, Lappe-Siefke C, Möbius W, Tozawa R, Wehr MC, et al. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci*. 2005; 8(4): 468–475.

Saher, G., Simons, M. Cholesterol and myelin biogenesis. *Subcell. Biochem*. 2010; 51: 489–508.

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

Santos-Silva, A. Propriedades da glia embainhante olfatória: expressão de proteínas da mielina, motilidade e vias de sinalização. [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: UFRJ; 2003.

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

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

Scott-Drew S, Freberg-Constant C. Expression and function of thrombospondin-1 in myelinating glial cells of the central nervous system. *J Neurosci Res*. 1997; 50: 202–214.

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

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

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

Sherpherd GM. *Neurobiology*. 2nd ed. New York: Oxford Univ. Press; 1988

Shrager P, Novakovic SD. Control of myelination, axonal growth, and synapse formation in spinal cord explants by ion channels and electrical activity. *Brain Res*. 1985; 88: 68–78.

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

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

Skoff RP. Increased proliferation of oligodendrocytes in the hypomyelinated mouse mutant-jimpy. *Brain Res.* 1982; 248: 19–31.

Small RK, Riddle P, Noble M. Evidence for migration of oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature.* 1987; 328: 155–157.

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

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

Song J, Goetz BD, Baas PW, Duncan ID. Cytoskeletal reorganization during the formation of oligodendrocyte processes and branches. *Mol Cell Neurosci.* 2001; 17(4): 624–636.

Sprinkle TJ. 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Crit Rev Neurobiol.* 1989; 4(3): 235–301.

Suzuki M, Raisman G. Multifocal pattern of postnatal development of the macroglial framework of the rat fimbria. *Glia.* 1994; 12: 294–308.

Taveggia C, Feltri ML, Wrabetz L. Signals to promote myelin formation and repair. *Nat. Rev. Neurol.* 2010; 6: 276–287.

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

Thurnherr T, Benninger Y, Wu X, Chrostek A, Krause SM, Nave KA, et al. Cdc42 and Rac1 Signaling Are Both Required for and Act Synergistically in the Correct Formation of Myelin Sheaths in the CNS. *J. Neurosci.* 2006; 26(40): 10110–10119.

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

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

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

Tsukada Y, Kuruwara T. 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase; molecular characterization and possible functional significance. In *Myelin: Biology and Chemistry*. Martensin RE (ed). Boca Raton: CRC Press; 1992, pp. 449–480.

Uhm JH, Dooley NP, Oh LYS, Yong VW. Oligodendrocytes utilize a matrix metalloproteinase, MMP-9, to extend processes along an astrocyte extracellular matrix. *Glia*. 1988; 22: 53–63.

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

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

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

Whitesides GM, Grzybowski B. Self-assembly at all scales *Science*. 2002; 295: 2418–2421.

Yakovlev PI; Lecours AR. The myelinogenic cycles of regional maturation of the brain. In: *Regional Development of the Brain in Early Life*, edited by Minkovski A. Oxford: Blackwell 1966, p.3–70.

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

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