



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



AVALIAÇÃO DA TENEURINA-2 (Ten-2) NOS ASTRÓCITOS DO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS ADULTOS APÓS LESÃO MECÂNICA. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO E DE EXPRESSÃO GÊNICA.

GESTTER WILLIAN LATTARI TESSARIN

Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

Botucatu – SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DA TENEURINA-2 (Ten-2) NOS ASTRÓCITOS DO
CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS ADULTOS APÓS LESÃO
MECÂNICA. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO E DE EXPRESSÃO
GÊNICA.

Gestter Willian Lattari Tessarin

Cláudio Aparecido Casatti

Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

Botucatu – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tessarín, Gestter Willian Lattari.

AVALIAÇÃO DA TENEURINA-2 (Ten-2) NOS ASTRÓCITOS DO
CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS ADULTOS APÓS LESÃO MECÂNICA.
ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO E DE EXPRESSÃO GÊNICA. / Gestter
Willian Lattari Tessarín. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Cláudio Aparecido Casatti

Capes: 20100000

Palavras-chave: Astrócito; Córtex cerebral; Lesão
mecânica; Ratos; Teneurina.

GESTTER WILLIAN LATTARI TESSARIN

**AVALIAÇÃO DA TENEURINA-2 (Ten-2) NOS ASTRÓCITOS DO CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS ADULTOS APÓS LESÃO MECÂNICA. ESTUDO
IMUNO-HISTOQUÍMICO E DE EXPRESSÃO GÊNICA.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Orientador: Professor Doutor Cláudio Aparecido Casatti

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia
UNESP/Araçatuba

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências
UNESP/Botucatu

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez

Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia
USP/São Paulo

Botucatu, 22 de fevereiro de 2016.

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Fernando e Delaine**,

para mais essa etapa concluída vocês foram, como sempre, essenciais. Como no decorrer de toda minha trajetória, vocês incessantemente estavam presentes para me estenderem as mãos. Pelo amor, paciência, compreensão, entendimento, carinho e dedicação de uma vida. Aprendi que não temos a necessidade de sermos somente alguém com amplo conhecimento de uma área escolhida, mas também que necessitamos ser ora criança ora adulto. Tudo o que alcancei até o presente momento devo a vocês. Palavras não existem para declarar a gratidão e o amor. Muito obrigado pelas horas dedicadas a mim. Para todas as surpresas que a vida me trará, sei que posso contar com vocês. Pai e mãe, amo vocês.

Ao meu irmão **Bremer**,

que apesar da distância sempre esteve ao meu lado. Saiba que em muitas condutas meu espelho é você. Sua dignidade, honestidade e hombridade contribuíram para construir meu caminho e solidificar os planos traçados no passado. Tenho orgulho de ser seu irmão e poder dividir todos meus momentos contigo. Conte comigo sempre, independente do momento ou ocasião, pois juntos venceremos. Eu amo você.

À minha namorada **Anelise**,

que felizmente entrou na minha história e participou deste sonho. Acompanhou de perto os momentos mais complexos de todo esse projeto de vida. Seu apoio, entendimento e benevolência nessa conquista foram, de forma incontestável, imprescindíveis. Cresço cada dia com seus ensinamentos. Tu és meu exemplo de caráter, conduta e superação. Admirações

infinitas pela sua pessoa e pelo seu amor que me surpreendem a cada dia. Agradeço constantemente por ter te conhecido. De forma indiscutível, meus agradecimentos sinceros.

Amo-te.

Agradecimentos

Especiais

Agradecimentos especiais

A **Deus**,

por iluminar meus passos e ter tornado tudo isso que inicialmente pareceu impossível, possível. Sou infinitamente grato pelas pessoas que colocastes em meu caminho e pelas experiências magníficas que me proporcionou. Agradeço-te pelas dificuldades que fixou na minha trajetória, pois foram fundamentais para o aprendizado. Obrigado pelas oportunidades de exercitar a humildade, fé, dignidade e sabedoria.

Ao grande amigo e professor **Dr. Cláudio Aparecido Casatti**,

pela paciência, sabedoria e tranquilidade com que conduziu a orientação nesses anos de convivência. Pouquíssimos e raros foram os instantes de dificuldade, porém acredito que estiveram presentes para superação, estimular o conhecimento e fortalecer a amizade. Além disso, saiba que jamais influenciou negativamente em qualquer aspecto. Aprendi muito ao seu lado. Com certeza é e será meu exemplo de como exercer um doutorado e uma possível docência. Mais uma vez, muito obrigado.

Ao meu sogro **Itamar** e a minha sogra **Maria**,

que compreenderam todos meus momentos difíceis e de estresse para a realização deste sonho, que em partes, alimentará o passado. Com vocês aprendi que em tudo ainda existe algo a ser desvendado e que aqui não estamos apenas por uma simples passagem. Obrigado por me receberem como um filho e se tornarem os pais presenciais que aqui não possuí. Agradecimentos eternos.

Aos amigos **Kelly Regina Torres da Silva e André Valério da Silva**

pois todo esse trabalho não seria realizado sem as inúmeras colaborações advindas de vocês. Saibam que contribuíram imensamente com minha formação, não somente acadêmica e científica, mas também como pessoa. Educação, honestidade, companheirismo e palavras tonaram o ambiente de trabalho algo fantástico. Sentia alegria em me deslocar até o local de trabalho e encontrá-los. As longas viagens à Botucatu, apesar de complexas e intermináveis, assim como a permanência, com vocês se tornaram um passeio. Sem dúvida, coisas boas estão escondidas atrás das cortinas que se abrirão no teatro da vida. Obrigado.

Ao amigo e professor **Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Junior**

que, sempre de maneira solícita, esteve com as portas abertas de seu laboratório para contribuir com meus conhecimentos e realização deste sonho que se concretiza. Além, gostaria de agradecê-lo pelo companheirismo, amizade e compreensão no momento em que precisamos de sua ajuda. Obrigado por participar deste sonho e por não ter fechado a porta para uma realização futura. Agradecimentos cordiais.

Ao amigo **Miguel Antônio Xavier de Lima,**

que foi o grande responsável pelo início de todo o trabalho e o grande “despertador” para a desenvoltura da minha carreira científica. Participou ativamente dos meus primeiros passos científicos, ajudando e colaborando com tudo. Mesmo estando distante, traçando seu destino, ainda contribui ativamente com minhas conquistas intelectuais. Mais do que um amigo, um irmão. Sou muito grato a você. Obrigado.

Ao amigo **Rafael Dezotte da Silva,**

que em todos os momentos complicados e difíceis estendeu a mão e articulou palavras positivas, as quais foram fundamentais para continuar a caminhada. Suas poucas vindas à Araçatuba tornaram os momentos inesquecíveis. É ilustre saber que posso contar contigo sempre. Tornou-se mais do que um amigo, e então, posso lhe chamar de irmão. Serei eternamente grato a você. Muito obrigado.

Aos amigos **Márcio Luiz Ferro Alves, Renato Felipe Pereira, Luiz Henrique Ferreira dos Santos Bonfietti, Guilherme Bergamo Brandão de Oliveira, Ricardo Dezotte da Silva e Victor Lattari Mateus,**

pela confiança, respeito e irmandade construída nesse período de graduação e pós-graduação. Pelos bons momentos compartilhados em Araçatuba. Torço por vocês e tenho certeza que construímos uma amizade sólida, incontestável.

Agradecimentos

Agradecimentos

Agradeço ao **Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e a Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, em especial ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, pela oportunidade de realização deste projeto e por permitir o acúmulo de conhecimento.

A **CAPES** (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) pela concessão de bolsa de pós-graduação (mestrado), tornando possível o desenvolvimento deste âmbito de vida e fundamentalmente a realização do curso de pós-graduação.

À **FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)**, pela concessão de Auxílio Regular (**processo n. ° 12/03067-6**), tornando possível a realização desse projeto de pesquisa.

Ao **Professor Titular Dr. José Américo de Oliveira, Professor Assistente Dr. Paulo Roberto Botacin, Professor Adjunto Roelf Justino Cruz Rizzolo e a Professora Assistente Dra. Roberta Okamoto**, da **Disciplina de Anatomia** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA - UNESP, que possibilitaram a acúmulo de conhecimento em anatomia humana, deixando as portas abertas do laboratório para fundamentação do aprendizado.

À **Professora Assistente Dra. Alaíde Gonçalves e a Professora Assistente Dra. Mariza Akemi Matsumoto** da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, pelas oportunidades

durante a realização do curso de mestrado e pela consolidação do conhecimento adquirido.

Muito obrigado.

Ao **Professor Assistente Dr. Edilson Ervolino**, da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, pela ajuda laboratorial e capturas de imagens e edição. Pela sabedoria. Muito obrigado.

Aos **Servidores do Departamento de Ciências Básicas**, Arnaldo César dos Santos, Sandra Aparecida dos Santos Pinheiro, Eliseide Maria Ferreira Silva Navega que contribuíram com respeito e humildade não só para a realização desta pesquisa, mas também para com minha formação profissional. Em especial agradeço **José Ari Gualberto Junqueira e André Luís Mattos Piedade** que também fizeram parte dos meus conhecimentos adquiridos frente às técnicas laboratoriais utilizadas em Anatomia e Histologia, oferecendo imagens de alta qualidade para ilustrar algumas aulas durante a graduação e pós-graduação, assim como peças anatômicas e lâminas histológicas, nas quais pude estudar de forma profunda. Obrigado.

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP** pelo auxílio no desenvolvimento deste projeto. Em especial, gostaria de agradecer cordialmente a assistente de suporte acadêmico **Shelly Favorito de Carvalho** que sempre esteve presente e disponível nos momentos que precisei, dedicando seu tempo para execução deste sonho.

Epígrafe

Estamos irrevogavelmente em um caminho que nos levará às estrelas. A não ser que, por uma monstruosa capitulação ao egoísmo e à estupidez, acabemos nos destruindo.

Carl Sagan.

RESUMO

TESSARIN, G. W. L. **Avaliação da teneurina-2 (Ten-2) nos astrócitos do córtex cerebral de ratos adultos após lesão mecânica. Estudo imuno-histoquímico e de expressão gênica.**

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

As teneurinas (TENS) pertencem a uma família de proteínas transmembrana do tipo II constituída por quatro membros homólogos, estruturalmente conservados entre as espécies. Essas proteínas estão presentes no SNC, principalmente durante a neurogênese, colaborando na estabilização dos circuitos neurais. Estudos neuroanatômicos mostraram que as TENS apresentam distribuição similar em peixes, aves e roedores durante o desenvolvimento e maturação do SNC, permanecendo em algumas regiões em animais adultos. A participação das TENS durante reparação tecidual tem sido pobremente explorada; entretanto a presença neurestina (uma proteína homóloga a Ten-2) foi notada em neurônios do bulbo olfatório de ratos adultos, após indução de lesão química na mucosa olfatória. O propósito do presente estudo foi verificar possíveis alterações na Ten-2 após indução de lesão mecânica no córtex cerebral de ratos adultos empregando técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) e reação em cadeia da polimerase (PCR convencional). Para isso, ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, n=32) foram divididos em grupo controle (n=4, IHQ; n=4, PCR), grupo lesão 12 horas pós-operatório (n=4, IHQ; n=4, PCR), grupo lesão 24 horas (n=4, IHQ; n=4, PCR) e grupo lesão 48 horas (n=4, IHQ; n=4, PCR). A lesão mecânica foi realizada usando agulha hipodérmica de metal (0,8mm de diâmetro) acoplada ao aparelho estereotáxico (coordenadas AP: +10,21 mm; DV: -2,5 mm e ML: +1,5 mm). Os animais do grupo controle não foram submetidos aos processos cirúrgicos. Para as análises imuno-histoquímicas, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca usando paraformaldeído tamponado a 4% e os cortes histológicos foram obtidos utilizando micrótomo de congelamento. Os cortes histológicos foram submetidos às técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase indiretas usando anticorpos para identificar proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e Ten-2, seguido por análises em microscopias de campo claro ou confocal. Para análises de expressão gênica, os animais foram sacrificados, o córtex cerebral foi imediatamente coletado para extração e purificação do RNA total. O

RNA foi usado para amplificar a Ten-2 e o neurofilamento de cadeia leve (Nefl, para normalização) através de PCR convencional e as análises semi-quantitativas foram realizadas pela mensuração da densidade óptica das bandas em gel de agarose. Os principais resultados indicaram um aumento significativo em astrócitos imunorreativos para a Ten-2 em todos os grupos lesões, especialmente no grupo lesão 48 horas ($p < 0,001$), comparado com o grupo controle. As análises de expressão gênica mostraram aumento significativo para a expressão de Ten-2, principalmente no grupo lesão 48 horas ($p < 0,01$), comparado com os demais grupos com lesão. O presente estudo demonstrou pela primeira vez a presença de Ten-2 em astrócitos, após indução de lesão mecânica no córtex cerebral de ratos adultos. Estudos futuros são necessários para elucidar se a Ten-2 presente nos astrócitos exerce um papel facilitatório ou inibitório no reparo tecidual do SNC após lesões mecânicas.

Palavras-chave: Astrócitos; Córtex cerebral; Lesão mecânica; Ratos; Teneurina.

ABSTRACT

TESSARIN, G. W. L. Teneurin-2 (Ten-2) evaluation in astrocytes from cerebral cortex of adults rats after mechanically induced lesion. Immunohistochemical and gene expression analysis. Thesis (Master of Science) – Biosciences Institute of Botucatu, Sao Paulo State University, Botucatu, 2016.

Teneurins (TENs) constitute a type II transmembrane protein family with four homologues structurally preserved among the species. These proteins are present in the central nervous system (CNS), mainly during neurogenesis, collaborating in the establishment of neuronal circuits. Neuroanatomic studies showed that TENs have compatible distribution among fish, chicken and rodents, during development and maturation of the CNS, remaining in a few regions in adult animals. The participation of TENs during tissue repair in the CNS has been scarcely explored; however, the unusual presence of neurestin (a homologue Ten-2 protein) was noticed in neurons of adult rat olfactory bulb, after chemically induced lesion in the olfactory mucosa. The purpose of the present study was to verify possible Ten-2 alterations after induced mechanical lesion in the adult rat cerebral cortex using immunohistochemistry (IHQ) and conventional polymerase chain reaction (PCR) techniques. For this, adult male rats (*Rattus norvegicus*, n=32) were divided into control group (n=4, IHQ; n=4, PCR) and 12h lesion (n=4, IHQ; n=4, PCR), 24h lesion (n=4, IHQ; n=4, PCR) and 48h postoperative lesion (n=4, IHQ; n=4, PCR) groups. The mechanical lesion was created using a hypodermic metal needle (0.8 mm of diameter) coupled with stereotaxic apparatus (coordinates: AP, +10.21 mm; DV, -2.5 mm; ML, +1.5 mm). Animals from control group were not submitted to surgical procedures. For IHQ analysis, animals were submitted to transcardiac perfusion using 4% buffered formaldehyde and 30 µm histological sections were obtained using a freezing microtome. Sections were submitted to indirect immunofluorescence or immunoperoxidase methods using antibodies to identify glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Ten-2-like immunoreactivity, followed by confocal or light microscope analysis. For genic expression analysis, the animals were sacrificed and the cerebral cortex was immediately collected for total RNA extraction and purification. The RNA was used to amplify Ten-2 and light chain

neurofilament (for normalization) by conventional PCR and semi-quantitative analysis was made from agarosis gel analysis bands. The main results indicated a significant increase in astrocyte cell profiles immunoreactive to Ten-2 in all lesion groups, especially in the 48h lesion group ($p<0.001$), compared with the control group. The genic expression analysis showed significant increase of Ten-2 expression mainly in the 48h lesion group ($p<0.01$) compared with the other lesion groups. The present study showed for the first time the presence of Ten-2 in astrocytes after mechanically induced lesion in the cerebral cortex of adult rats. Further studies are necessary to elucidate whether Ten-2 in astrocytes exerts a facilitatory or inhibitory role in CNS tissue repair after mechanical brain lesions.

Keywords: Astrocytes; Cerebral cortex; Mechanical lesion; Rats; Teneurins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo estrutural esquemático das teneurinas ilustrando a constituição e a organização dimérica.

Figura 2. Representação esquemática das coordenadas utilizadas para realização de lesão mecânica nos animais dos grupos experimentais.

Figura 3. Fotomicrografias em microscopia confocal mostrando corte histológico do encéfalo de animal do grupo controle submetido à dupla imunofluorescência indireta para detecção de GFAP (marcado com FITC, fluorescência verde) Ten-2 (marcada com Cy3, fluorescência vermelha) e contra corados com DAPI (marcação nuclear, fluorescência azul).

Figura 4. Fotomicrografias em microscopia confocal mostrando corte histológico do encéfalo dos animais pertencentes aos grupos controle (A), lesão 12h (B), lesão 24h (C) e 48h (D) submetidos à dupla imunofluorescência indireta para detecção de GFAP (marcado com FITC, fluorescência verde) Ten-2 (marcada com Cy3, fluorescência vermelha) e contra corados com DAPI (marcação nuclear, fluorescência azul).

Figura 5. Número de perfis celulares duplamente imunomarcados para GFAP/Ten-2 para os grupos controle, 12, 24 e 48h pós-lesão.

Figura 6. Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando corte histológico do encéfalo de animal pertencente ao grupo lesão 48h, submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de Ten-2.

Figura 7. Análise qualitativa do RNA total extraído da região do córtex cerebral dos ratos pertencentes aos grupos experimentais, após a eletroforese de nucleotídeos em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio.

Figura 8. Eletroforese dos produtos de amplificação gênica para Ten-2 e Nefl em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio.

Figura 9. Eletroforese dos produtos de amplificação gênica para Ten-2 e Nefl das amostras dos diferentes grupos experimentais em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio.

Figura 10. Análise semi-quantitativa dos valores de densidade óptica obtidas pela técnica de PCR convencional da expressão gênica de Ten-2 (normalizados em relação ao Nefl) dos diferentes grupos experimentais (média \pm erro padrão).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos pares dos iniciadores para realização da técnica de PCR convencional e tamanho dos produtos amplificados.

Tabela 2. Dados referentes ao número médio de perfis celulares de astrócitos imunorreativos a GFAP e a Ten-2 no córtex cerebral dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

Tabela 3. Dados semi-quantitativos da densidade óptica da amplificação gênica da Ten-2 (normalizados em relação ao Nefl) obtidos pela técnica de PCR convencional para cada animal dos grupos experimentais.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - por cento

°C – graus Celsius

μl – microlitro

μM – micro molar

μm – micrômetro

AKT – proteína kinase B (protein kinase B)

AP – anteroposterior

ATP – adenosina trifosfato

BSA – albumina de soro bovino (Bovine Serum Albumin)

cDNA – DNA complementar

CEUA – Comissão de ética no uso e experimentação animal

CG – citosina/guanina

cm – centímetro

CRF – fator liberador de corticotrofina (Corticotropin-releasing fator)

C-terminal – carboxi-terminal

Cy³ - Cianina

DAB – 3'3' diaminobenzidina

DAPI – 4', 6-diamino-2-fenilindole

DNA – ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)

DTAF – fluoresceína de diclorotriazinolamina (dichlorotriazinylamino fluorescein)

DV – dorsoventral

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF – fator de crescimento epidermal (Epidermal growth fator)

FOA – faculdade de odontologia de Araçatuba

GAPDH – glicerol-3-fosfato desidrogenase

GFAP – proteína ácida fibrilar glial

h – hora

ICV – intracerebroventricular

kDa – kilodalton

kg – quilograma

LPHN-1 – latrofilina-1

LPHN-2 – latrofilina-2

LPHN-3 – latrofilina-2

LPHNs – latrofilinas

M – molar

mg – miligrama

MgCl₂ – cloreto de magnésio

ML – médio-lateral

ml – mililitro

mm – milímetros

mM – milimolar

n°. – número

NAS – sulfato de níquel amônia

Nefl – neurofilamento de cadeia leve

ng - nanograma

nm – nanômetros

N-terminal – amino-terminal

pb – pares de base

PBS – tampão fosfato-salino (phosphate-buffered saline)

PCR – reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)

pH – potencial hidrogênio

PVP-I – iodopovidona ou povidona-iodo

RNA – ácido ribonucleico (ribonucleic acid)

RNAm – RNA mensageiro

rpm – rotação por minuto

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (Reverse transcription polymerase chain reaction)

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

TBE – tampão tris-borato-EDTA

TCAP-1 – peptídeo associado ao terminal carboxila das teneurina-1

TCAPs – peptídeo associado ao terminal carboxila das teneurinas (Teneurin C-terminal-associated peptides)

TE – tampão tris-EDTA

Ten-1 – teneurina-1

Ten-2 – teneurina-2

Ten-3 – teneurina-3

Ten-4 – teneurina-4

Ten-a – proteína acessória semelhante à tenascina (tenascin-like protein accessory)

Ten-m – proteínas principal semelhante à tenascina (tenascin-like protein major)

TENs - teneurinas

TnC – tenascina-C

TRIS – tris(hidroximetil)aminometano

u – unidade

V – volt

YD – tirosina/ácido aspártico

α – alfa

α DG – alfa-distroglicana

β – beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Animais	44
4.2 Procedimentos cirúrgicos para indução de trauma no córtex cerebral	44
4.3 Perfusão transcardíaca	46
4.4 Pós-fixação, crioproteção e microtomia	47
4.5 Dupla imunofluorescência e imunoperoxidase indiretas	47
4.6 Formas de análise dos resultados, aquisição e edição das imagens imuno-histoquímicas	49
4.7 Confeção dos iniciadores para reação em cadeia da polimerase (PCR)	50
4.8 Extração de RNA total	51
4.9 Síntese de cDNA	53
4.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	54
4.11 Curva de amplificação gênica	55
4.12 Forma de análise dos produtos de PCR convencional	56
RESULTADOS	57
5.1 Análise imuno-histoquímica da distribuição da Ten-2 no córtex cerebral	58
5.2 Distribuição dos astrócitos imunorreativos para Ten-2	62
5.3 Análise da expressão gênica para Ten-2	63
6. DISCUSSÃO	67
6.1 Considerações sobre a técnica imuno-histoquímica	68

6.2 Considerações sobre a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).....	69
6.3 Teneurinas e lesão cortical.....	71
7. CONCLUSÃO.....	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
9. APÊNDICE	97

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

As teneurinas (TENS) foram inicialmente caracterizadas em *Drosophila melanogaster*, sendo denominadas de Ten-a (*tenascin-like protein accessory*) e Ten-m (*tenascin-like protein major* – BAUMGARTNER e CHIQUET-EHRISMANN, 1993; BAUMGARTNER et al., 1994; LEVINE et al., 1994; MINET et al., 1999). Estas proteínas foram descobertas através de estudos que buscavam encontrar proteínas homólogas as tenascinas, as quais representam uma família de glicoproteínas da matriz extracelular (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1991 BAUMGARTNER e CHIQUET-EHRISMANN, 1993; BAUMGARTNER et al., 1994). Posteriormente, foi demonstrado que as TENSs são conservadas nos vertebrados e invertebrados, sendo essa família composta por um membro nos nematelmintos, denominado de teneurina-1 (Ten-1) e quatro membros nos cordados, denominados de Ten- 1, 2, 3 e 4 (Ten-1, Ten-2, Ten-3, Ten-4) (OOHASHI et al., 1999; MINET e CHIQUET-EHRISMANN, 2000; ZHOU et al., 2003; DRABIKOWSKI et al., 2005; TUCKER et al., 2007).

Estruturalmente as TENSs são constituídas entre 2.500 a 2.800 aminoácidos, apresentando peso molecular aproximado de 300 kDa e exibindo inúmeros domínios funcionais (MINET et al., 1999; RUBIN et al., 1999; FENG et al., 2002; LEAMEY et al., 2007a). Estas proteínas apresentam seus terminais carboxila e amino com orientações extra e intracelular, respectivamente, característica pela qual permite classificá-las como proteínas transmembrana do tipo II (Figura 1). Os domínios intracelular (N-terminal) e transmembrana são relativamente curtos, compostos por 300-375 e 300-400 aminoácidos, respectivamente (BAGUTTI et al. 2003; NUNES et al., 2005; TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006; SCHÖLER et al., 2015). Por sua vez, o domínio extracelular (C-terminal) é constituído por 2.300 aminoácidos com vários resíduos que possuem afinidade às moléculas da matriz extracelular, apresentando oito domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor-like* – EGF) similar aos das tenascinas, seguido por uma região rica em cisteínas e sequências repetidas de aminoácidos tirosina e ácido aspártico (Figura 1, região YD; TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006). Uma significativa similaridade tem sido observada na região C-terminal das TENSs em relação ao tamanho e a estrutura, quando comparadas entre invertebrados e vertebrados (OOHASHI et al., 1999; TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006; KENZELMANN et al., 2008). Além disso, a análise de semelhança mostra que entre os vertebrados existe entre 60% a 98% de sequência de

aminoácidos idênticos, enquanto que em relação à comparação entre as TENs dos vertebrados e invertebrados esse percentual oscila entre 33% a 41%, revelando uma considerável conservação na escala filogenética (TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006).

As TENs apresentam diferentes sítios de clivagem proteolítica na região extracelular (KENZELMANN et al., 2008). Um desses pontos, especificamente na região C-terminal, resulta em um fragmento de 40-41 aminoácidos, exibindo características de peptídeo bioativo (Figura 1). Estes oligopeptídeos foram denominados de peptídeos associados ao terminal carboxila das teneurinas (TCAPs; do inglês, *Teneurin C-terminal-Associated Peptides*) (QIAN et al., 2004; WANG et al., 2005). Além da clivagem, a qual origina os TCAPs, é proposto que esses peptídeos bioativos podem ser transcritos separadamente a partir do último éxon do gene de cada teneurina (LOVEJOY et al., 2009; CHAND et al., 2013). Desta forma, independentemente do modo de como esses peptídeos bioativos são originados, através da clivagem ou transcrição de parte do gene das TENs (“*splice variants*”), sua atividade funcional parece ser a mesma.

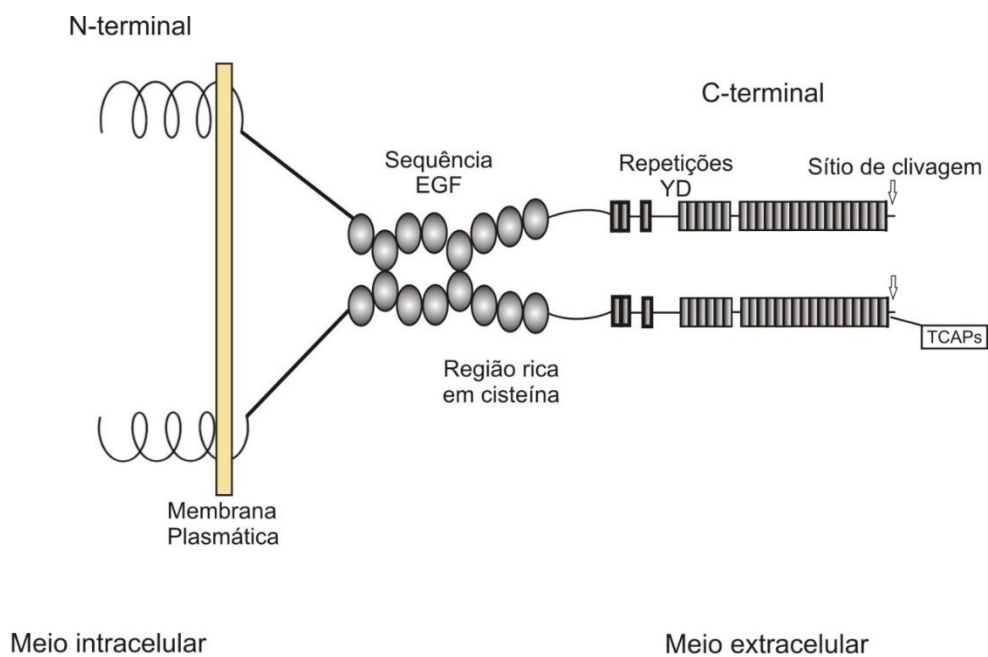


Figura 1. Modelo estrutural esquemático das teneurinas ilustrando a constituição e a organização dimérica (Ilustração extraída e adaptada de LOVEJOY et al., 2006).

Os TCAPs possuem uma semelhança estrutural de 20% com o fator liberador de corticotropina (CRF – QIAN et al., 2004; WANG et al., 2005; LOVEJOY et al., 2006; LOVEJOY, 2009) e, estudos têm demonstrado que a injeção de TCAP-1 e CRF intracerebroventricular (ICV) apresentam um potente efeito na modulação do estresse (QIAN et al., 2004; WANG et al., 2005; LOVEJOY et al., 2006; AL CHAWAF et al., 2007a; TAN et al., 2008, 2009; LOVEJOY et al., 2009). O TCAP-1, após administração ICV, foi potencialmente capaz de reduzir a imunorreatividade para a *c-fos* em neurônios do hipocampo e na amígdala de ratos adultos após administração de CRF (TAN et al., 2009). Além disso, tomado de forma isolada, o TCAP-1 pode funcionar como um novo fator neurotrófico no cérebro de ratos através de uma distroglicana que modula mecanismos intracelulares kinase-dependente, regulando elementos do citoesqueleto (TAN et al., 2012; CHAND et al., 2013). Estudos comportamentais demonstraram que a injeção ICV de TCAP-1 em ratos adultos foi capaz de modular respostas ao estresse induzido pelo CRF (WANG et al., 2005; AL CHAWAF et al., 2007a; LOVEJOY et al., 2006; LOVEJOY et al., 2009).

Os estudos que analisaram a distribuição das TENs foram principalmente restritos ao SNC de roedores e aves, predominantemente durante a neurogênese, quando estas proteínas apresentam significante expressão (LEVINE et al., 1994; BEN-ZUR et al., 2000; TUCKER et al., 2007). Com relação aos TCAPs, existe apenas um estudo demonstrando a distribuição do TCAP-1 no SNC de ratos adultos (WANG et al., 2005). Por outro lado, pouco se sabe sobre as distribuições e funções das TENs e dos TCAPs em tecidos e/ou órgãos não neurais (SUZUKI et al., 2012; ZIEGLER et al., 2012; LOVEJOY et al., 2013; CHAND et al., 2014; SUZUKI et al., 2014; ISHII et al., 2015).

A distribuição da Ten-1 no SNC de embriões de aves tem sido observada, principalmente no sistema visual, como na retina e o teto óptico, além da expressão no tálamo, hipocampo, bulbo olfatório, córtex cerebelar e tronco encefálico (RUBIN et al., 1999; KENZELMANN et al., 2008), enquanto que no SNC de camundongos adultos, estudos têm revelado a expressão do RNAm para a Ten-1 na retina, córtex cerebral, tálamo, hipocampo, cerebelo (córtex e núcleo cerebelares) e tronco encefálico (OOHASHI et al., 1999; ZHOU et al., 2003). Em tecidos e/ou órgãos não neurais, como nos testículos de ratos adultos, existe uma considerável presença da Ten-1, exclusivamente na túnica própria dos túbulos seminíferos e circundantes as células intersticiais (células de Leydig) (CHAND et al., 2014). Um único estudo tem mostrado que a Ten-1 é importante para a gametogênese, pois a

interferência na expressão desta proteína mostrou alterações no desenvolvimento das gônadas em *Caenorhabditis elegans* (DRABIKOWSKI et al., 2005).

Por sua vez, o estudo da expressão da Ten-2 através da técnica de hibridização *in situ* em embriões de aves revelou a presença do RNAm no placódio óptico, processos maxilares e mandibulares em desenvolvimento, além do tubo neural (TUCKER et al., 2001). Áreas cerebrais envolvidas na via visual, como talamofugal, além das regiões do diencéfalo, mesencéfalo e hipocampo também apresentaram expressão de Ten-2 (TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006). Tucker et al. (2001) relataram a presença do RNAm para a Ten-2 nos brotos de desenvolvimento dos membros, especificamente no ectoderma apical.

A Ten-3 foi detectada na região CA2 no hipocampo (camada piramidal - ZHOU et al., 2003) e na retina, durante a neurogênese do *Danio rerio* (ANTINUCCI et al., 2013). A presença da Ten-3 também foi evidenciada em outras regiões do SNC durante a neurogênese, como por exemplo, no núcleo estriado de camundongos, sugerindo a participação desta proteína na conectividade e função desta região (LEAMEY et al., 2007a). A Ten-3 possui uma participação crítica na formação da visão binocular, atuando fundamentalmente como uma proteína para o crescimento e orientação axonal (DHARMARATNE et al., 2012).

A Ten-4, assim como a Ten-3, também está presente em tecidos relacionados com o desenvolvimento das vias visuais, bem como no desenvolvimento dos membros das aves (TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006; KENZELMANN-BROZ et al., 2010). A presença de Ten-4 também foi descrita no sistema reprodutor, na qual é sugerido que esta proteína está diretamente relacionada com o processo de gastrulação em embriões de ratos (LOSSIE et al., 2005). A presença de RNAm para Ten-4 também foi detectado no rim, pulmão e baço de camundongos, porém de forma discreta (SUZUKI et al., 2012).

Estudos têm sugerido que as TENs apresentam um papel fundamental no desenvolvimento de embriões da *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans*, uma vez que animais mutantes para as TENs mostraram alterações durante as fases de desenvolvimento embrionário e organogênese (BAUMGMARTNER et al., 1994; LEVINE et al., 1994; DRABIKOWSKI et al., 2005; LOSSIE et al., 2005). Além disso, vale ressaltar que o gene da Ten-1 está localizado na região Xq25, envolvida na síndrome do X-frágil (BUERVENICH et al., 2001) e que outras anormalidades mentais associadas às malformações faciais e dos membros têm sido mostradas em translocações e trissomias envolvendo o locus 5q34 que aloja o gene da Ten-2 (DUBOVSKY et al., 1994; VIK e YATHAM, 1998). Estes

dados sugerem importante papel funcional desta família no que se refere à neurogênese e organogênese.

Em relação a outras funções atribuídas às TENs, tem sido indicada participações nas interações homofílicas e heterofílicas entre as células, orientação axonal, proliferação celular e regulação da transcrição gênica (RUBIN, 2002; BAGUTTI et al., 2003; NUNES et al., 2005; TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006; KINEL-TAHAN et al., 2007; LEAMEY et al., 2008; YOUNG e LEAMEY, 2009). Esta última somente é possível, pois as TENs possuem domínios intracelulares que são clivados frente a estímulos extracelulares, comportando-se como fatores de transcrição gênica, como descrito anteriormente (BAGUTTI et al., 2003; NUNES et al., 2005; SCHÖLER et al., 2015). Vale ser ressaltado que um dos “*splice variants*” da Ten-2, denominada de Lasso, pode apresentar capacidade de ligação com outra classe de proteínas, conhecidas como latrofilinas (LPHNs), resultando em alterações na concentração de cálcio intracelular (SILVA et al., 2011). A Ten-4 também está envolvida no processo de formação dos processos celulares dos oligodendrócitos, pois células oriundas de camundongos “*knockout*” para Ten-4 em cultura celular apresentaram alterações na formação dos processos celulares (SUZUKI et al., 2012). Recentemente, Ishii et al. (2015) tem demonstrado que as TENs, em especial a Ten-4, está envolvida em processos de crescimento da musculatura esquelética, onde ratos mutantes para esta proteína apresentaram perturbações no crescimento muscular pós-natal. Além disso, perturbações gênicas para a Ten-4 em modelos experimentais para lesão de musculatura estriada esquelética revelou alterações no processo de regeneração celular da musculatura esquelética (ISHII et al., 2015).

As TENs exercem sua atividade através de suas interações com outras moléculas ligantes, desencadeando uma sinalização em cascata, resultando em fosforilação e interações não-covalentes, fundamentais para modificações no citoesqueleto (CHAND et al., 2013). Deste modo, tem sido proposto que as TENs possuem capacidade de interação com um grupo de proteínas conhecidas como latrofilinas (LPHNs), que são proteínas de membrana que possuem capacidade de ligação com a alfa-latrotóxina (toxina de aracnídeos; BOUCARD et al., 2014; WOELFLE et al., 2015). Estudos têm mostrado a presença de três isoformas de LPHNs (LPHN-1, LPHN-2 e LPHN-3). A LPHN-1, -2 e -3 são principalmente expressas no SNC, enquanto a LPHN-2 também apresenta expressão em tecidos e/ou órgãos não neurais (SILVA e USHKARYOV, 2010). Existem dados mostrando a interação entre a LPHN-1 e um “*splice variant*” da Ten-2, denominado de Lasso, nos contatos sinápticos entre neurônios em

cultura celular, resultando em alterações nos níveis de cálcio nos neurônios pré-sinápticos (SILVA et al., 2012; BOUCARD et al., 2014). A região C-terminal da Ten-2 é fundamental para a interação Ten-2/LPHN-1, permitindo o influxo de cálcio no terminal pré-sináptico (SILVA et al., 2011; BOUCARD et al., 2014). Além disso, tem sido sugerido que a interação do TCAP-1 com as LPHNs seria o mecanismo supostamente responsável pelos efeitos fisiológicos e comportamentais observados nos estudos do TCAP-1 (WOELFLE et al., 2015).

Dado a complexidade da interação entre as LPHNs e TENS, acredita-se que outras proteínas, como as integrinas, distroglicanas e neurexinas, podem fazer parte desse sistema de adesão e sinalização (SUGITA et al., 2001; O'SULLIVAN et al., 2014). Recentes descobertas têm mostrado que as distroglicanas são importantes para o desenvolvimento cerebral, sinaptogênese, plasticidade neural, interações gliais, integridade da barreira hematoencefálica e manutenção da membrana basal (PENG et al., 1999; JACOBSON et al., 2001; ZACCARIA et al., 2001; SAITO et al., 2003; NICO et al., 2003). Além disso, as distroglicanas funcionam como proteínas de interação intercelular em diversos tecidos, as quais podem ser clivadas, originando fragmentos α e β . A subunidade α é extracelular e está exposta a inúmeras proteínas da matriz extracelular, como por exemplo, as lamininas. (SUGITA et al., 2001). A subunidade β (β -distroglicana) consiste em uma porção transmembrana com um prolongamento citoplasmático, o qual possui capacidade de ligação com a distrofina e utrofina, ambas com afinidade para interação com a actina do citoesqueleto (HENRY e CAMPBELL 1998). Este prolongamento citoplasmático também pode participar na transdução de várias vias de sinalização, resultando em alterações na organização dos prolongamentos celulares, na plasticidade sináptica e na morfologia celular (IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA et al., 1992; SPENCE et al., 2004). Em relação à interação entre TENS e distroglicanas, estudos prévios tem mostrado a possível interligação entre essas duas proteínas em *Caenorhabditis elegans* (DRABIKOWSKI et al., 2005; TRZEBIATOWSKA et al., 2008). Posteriormente, CHAND et al., (2014) descreveram pela primeira vez a interação do TCAP-1 com as distroglicanas no testículo de ratos adultos, sugerindo uma possível participação desta proteína em um complexo composto por distroglicana-laminina-integrina, atuando, possivelmente, na manutenção da integridade da membrana basal das gônadas. A mesma colocalização entre distroglicana e o TCAP-1 foi observada na membrana plasmática de células hipocâmpais imortalizadas (CHAND et al., 2014).

As TENS também podem promover interações com as integrinas (TRZEBIATOWSKA, 2008; TOPF e CHIQUET-EHRISMANN, 2011). Estas proteínas possuem subunidades α e β que pode interagir com os filamentos de actina e atuar como receptores para células adjacentes (HYNES, 2002). Além disso, podem colaborar no estabelecimento da conexão entre terminais pré e pós-sinápticos (CLEGG et al., 2003; SINGHAL e MARTIN, 2011), juntamente com o complexo distroglicana-distrofina (FRISCHKNECHT et al., 2014) e participar dos processos de sinalização e migração celular (WICKSTRÖM e FÄSSLER, 2011). As integrinas, em especial a integrina $\alpha_6\beta_4$, podem contribuir ativamente na fixação dos pés vasculares do astrócitos com células endoteliais, contribuindo com a manutenção da integridade da barreira hematoencefálica (del ZOPPO e MILNER, 2006). É proposto que nessa interação exista a participação de uma distroglicana, onde integrina e distroglicana trabalham juntas para contribuição na interação dos pés vasculares dos astrócitos com as células endoteliais (HUBER et al., 2001; del ZOPPO e MILNER, 2006). Além dessas interações, as integrinas também podem interagir com moléculas da matriz extracelular, tais como fibronectina, vitronectina, tenascinas e fibrilinas (HANBURGUER e CALDERWOOD, 2009). Muitas integrinas, em especial aquelas que apresentam a subunidade β_3 , não são constitutivamente expressas, entretanto, podem ser sintetizadas após a indução por estímulos intra ou extracelulares (HANBURGUER e CALDERWOOD, 2009; HYNES, 2002). A partir da possibilidade de ativação das integrinas na presença de estímulos intra ou extracelulares, Robel et al., (2009) sugeriram que uma sinalização mediada por integrinas pode estar presente nos processos de proliferação de astrócitos reativos. Além de vias mediadas por integrinas nos processos de proliferação astrocitária frente a estímulos locais, tem sido sugerido que essa via pode estar relacionada com os processos de alteração da morfologia dos astrócitos (ROBEL et al., 2009). Estudos anteriores demonstraram uma possível interação entre integrinas e TENS na manutenção das membranas basais de *Caenorhabditis elegans*, durante o desenvolvimento embrionário (TRZEBIATOWSKA, et al., 2008; TOPF e CHIQUET-EHRISMANN, 2011). Vale ressaltar que a interação das integrinas com outras proteínas ocorre na região de arginina-glicina-ácido aspártico (RUOSLAHTI, 1996), sendo essa região não conservada nas TENS de vertebrados e camundongos (LOVEJOY et al, 2006) fato que sugere que as possíveis interações possuem diferenças. Além disso, a possível interação entre integrinas e TENS em situações adversas ainda não foram avaliadas, como por exemplo, em processos neuroinflamatórios.

Embora muitos estudos tenham analisado a distribuição das TENS no SNC em condições de normalidade, principalmente durante a neurogênese, pouco se sabe sobre o comportamento dessas proteínas durante a regeneração do SNC frente a lesões mecânicas, isquêmicas ou relacionadas com outros mecanismos nocivos.

Todas as células da neuroglia são fundamentais para a manutenção da função do SNC. Entre estas células, os astrócitos são responsáveis pela regulação na concentração de íons intra e extracelular, pelo catabolismo de aminoácidos seletivos, pela síntese de novas moléculas, pelo transporte de nutrientes e metabólitos dos neurônios (MARAGAKIS e ROTHSTEIN, 2006). Além disso, os astrócitos tem um papel fundamental na formação e manutenção da barreira hematoencefálica. Recentemente, estudos têm demonstrado que além de funções básicas, os astrócitos estão diretamente relacionados com a sinaptogênese e com a neurotransmissão (MATYASH e KETTENMANN, 2010; ALLAMAN et al., 2011).

Os astrócitos também participam nas respostas multicelulares de traumas e doenças do SNC, tornando-se significativamente reativos, sendo este processo denominado de astrogliose (SOFRONIEW, 2014). Nestas condições, os astrócitos que são na sua maioria células nativas da região lesionada, possuem papel fundamental na prevenção de morte neuronal e reparo na barreira hematoencefálica, assim como limitam o quadro inflamatório após a existência de quadros lesivos no SNC (BUSH et al., 1999; PEKNY, 1999; FAULKNER et al., 2004; OKADA et al., 2006; HERRMANN et al., 2008; SUSARLA et al., 2014). Um dos mecanismos presentes no processo de ativação pode estar diretamente relacionado com a ativação de canais iônicos pela deformação da membrana plasmática, onde canais catiônicos e de potássio podem contribuir para o influxo de cálcio e sódio extracelular, resultando em estresse iônico nos astrócitos (RZIGALINSKI et al., 1997; FLOYD et al., 2005). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a astrogliose induzida por lesões mecânicas pode estar relacionada com a sinalização de proteínas que pertencem às vias das kinase e kinase B (AKT), elevações dos níveis intracelulares de cálcio e adenosina tri-fosfática (ATP; AHMED et al., 2000; VERDERIO e MATTEOLI, 2001; NEARY et al., 2003, 2005). Alterações da matriz extracelular também possuem contribuições de grande valia que podem alterar a resposta celular, não necessariamente após a existência de injúrias mecânicas relacionadas com o sistema nervoso, mas também com fatores relacionados com a idade ou doenças do SNC (LAU et al., 2013).

Vários estudos têm relatado as modificações ocorridas após injúrias do tecido nervoso. O estudo pioneiro foi o de Cajal (1928) que demonstrou as diferenças entre a regeneração dos neurônios afetados por injúria no SNC e sistema nervoso periférico (SNP). Em prosseguimento, vários estudos se direcionaram para entender os mecanismos envolvidos nos processos neuroinflamatórios no SNC e SNP, causados por injúrias mecânicas ou de outras naturezas. É sabido que após a lesão no SNC há uma frequente reação dos astrócitos e formação de uma cicatriz ao redor do sítio tecidual lesionado, a qual é amplamente vista como um impedimento para a regeneração dos circuitos neuronais (FITCH e SILVER, 2008). Além disso, células sanguíneas, como macrófagos, leucócitos e linfócitos invadem o local lesado e passam a sintetizar e secretar várias moléculas que podem interferir com o processo de reparo tecidual (DONNELLY e POPOVICH, 2008; MERRILL e BENVENISTE, 1996). É interessante salientar que contribuindo com as mudanças moleculares após alguns dias da lesão, fibroblastos oriundos das meninges lesionadas penetram no sítio lesionado, proliferam e secretam moléculas da matriz extracelular, como por exemplo, colágeno tipo IV, fibronectina e laminina, resultando na formação de uma cicatriz conjuntiva. A existência deste quadro possui papel importante para a proteção do tecido lesionado, reestabelecimento da barreira hematoencefálica e, contudo, isola os demais tecidos neurais circundantes, exercendo papel protetor para o SNC (BERRY et al., 1983; MATHEWSON e BERRY, 1985; MAXWELL et al., 1990a).

No processo de formação da cicatriz astrocitária, os astrócitos sofrem mudanças fenotípicas (RIDET et al., 1997), proliferação e hipertrofia celular, sendo este um processo neuroinflamatório típico compartilhado em muitas lesões teciduais, inclusive em doenças neurodegenerativas (SERRANO-POZO et al., 2011; BARCIA et al., 2012). Por sua vez, essa cicatriz, composta também de outras células gliais é morfológicamente composta por uma dobra da lâmina basal rodeada por uma densa malha de processos de astrócitos incorporado em uma matriz extracelular (WINDLE, 1956; CLEMENTE, 1964; ENG et al., 1987; BERRY, 1982; MCGRAW et al., 2001; LOGAN e BERRY, 2002; RAGHUPATHI et al., 2004). Esta estrutura complexa promove uma barreira física e bioquímica para regeneração e plasticidade, atuando como um fator inibitório que afeta o reestabelecimento dos circuitos neuronais (DAVIES et al., 1996; SILVER e MILLER, 2004). Outros fatores que podem estar relacionados com o insucesso na regeneração tecidual nervosa podem estar interligados com moléculas da bainha de mielina, uma vez que algumas moléculas que fazem parte desta

estrutura podem funcionar como fatores inibidores do crescimento dos prolongamentos neuronais (BERRY, 1982). Por outro lado, os astrócitos também podem inibir o processo de regeneração tecidual nervosa, mediado por algumas moléculas, como por exemplo, as proteoglicanas de sulfato de condroitina associada à mielina e as tenascinas (MANSOUR et al., 1990; RUDGE e SILVER, 1990; SNOW et al., 1990; LETOURNEAU et al., 1994; LEMONS et al., 1999; BECKER et al., 2000). Estas moléculas apresentam características repulsivas para o crescimento axonal *in vitro*, apresentando funções importantes para orientação axonal e desenvolvimento do SNC (McKEON et al, 1991).

Uma possível participação das TENs durante regeneração tecidual nervosa e estresse celular foi proposta no SNC de ratos (OTAKI e FIRESTEIN, 1999). Estes autores verificaram que a neurestina (do inglês, *neurestin*), proteína homóloga à Ten-2, é expressa nos neurônios em tufos do bulbo olfatório de ratos, somente durante o desenvolvimento neuronal. Esta expressão pode ser reativada nestes neurônios, após injúria química da mucosa olfatória de ratos adultos. Estes dados sugerem que a Ten-2 pode estar envolvida na regeneração neuronal do SNC. Estudos preliminares em nosso laboratório, em colaboração com o Prof. Dr. Alan D. Lovejoy (Universidade de Toronto, ON, Canada), têm indicado uma possível expressão da Ten-2 no SNC após injúria mecânica no córtex cerebral de ratos adultos (dados não publicados).

2. JUSTIFICATIVA

2. Justificativa

Este estudo inicial visou comprovar a presença da Ten-2 em astrócitos após lesão de mecânica no SNC. A descoberta do envolvimento desta proteína no processo de cicatrização tecidual do SNC conduz à exploração do papel da Ten-2 como uma molécula facilitatório ou inibitória no processo de regeneração nervosa. Disto posto, o uso de substâncias capazes de estimular ou inibir a expressão da Ten-2 poderão atuar como terapias adjuvantes em processos neuroinflamatórios do SNC, associados à desestruturação da barreira hematoencefálica.

3. OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O propósito do presente estudo foi analisar a presença da Ten-2 no SNC de ratos adultos (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*) após indução experimental de lesão mecânica na interface entre córtex motor e somatossensorial primários. Para tal, foram empregadas as técnicas de imuno-histoquímica (dupla imunofluorescência indireta ou imunoperoxidase indireta) e de reação em cadeia da polimerase (PCR convencional).

3.2 Objetivos específicos

O presente estudo analisou:

a) A imunorreatividade da Ten-2 em astrócitos na interface entre córtex motor e somatossensorial primários após a indução experimental de lesão de ordem mecânica, nos períodos pós-operatórios de 12h, 24h e 48h;

b) A expressão gênica da Ten-2 em amostras de RNA total extraídas da interface entre o córtex motor e somatossensorial primários após a indução experimental de lesão mecânica, nos períodos pós-operatórios de 12h, 24h e 48h.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e Métodos

4.1 Animais

O presente estudo utilizou ratos adultos jovens, com aproximadamente 60 dias de vida (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, n=32) com peso corporal de 280-300g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA – UNESP. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão local de ética em experimentação animal (CEUA, protocolo n 2015-00318). Os animais foram mantidos em gaiolas nas condições de ciclo claro-escuro de 12-12h, temperatura ambiente de 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) com acesso a água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em grupos controle e lesões, conforme descritos abaixo:

Grupo Controle (n=8): os animais não foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de abertura craniana, exposição do encéfalo e lesão mecânica;

Grupo Lesão 12h (n=8): os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de abertura craniana e exposição do encéfalo, com realização de lesão mecânica. Estes animais foram sacrificados 12h após a lesão;

Grupo Lesão 24h (n=8): os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de abertura craniana e exposição do encéfalo, com realização de lesão mecânica. Estes animais foram sacrificados 24h após a lesão;

Grupo Lesão 48h (n=8): os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de abertura craniana e exposição do encéfalo, com realização de lesão mecânica. Estes animais foram sacrificados 48h após a lesão.

Vale ser ressaltado que após a execução da lesão experimental os animais foram individualmente separados em gaiolas, mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente. Neste momento, cuidados pós-operatórios foram adotados.

4.2 Procedimentos cirúrgicos para indução de trauma no córtex cerebral

Para a realização de lesão mecânica, os animais foram inicialmente anestesiados via intramuscular com cloridrato de cetamina (80mg/Kg, Francotar[®], Virbac, SP, Brasil) e

cloridrato de xilazina (10 mg/Kg, Rompum[®], Bayer, RS, Brasil). Uma vez confirmada o quadro de anestesia cirúrgica, os animais foram submetidos à tricotomia da região superior da cabeça e em seguida posicionados em aparelho estereotáxico (51600, Stoelting, WL, USA). Uma incisão no plano sagital mediano de aproximadamente 3 cm de extensão anteroposterior foi realizada na superfície dorsal da cabeça do animal, com o auxílio de lâmina de bisturi, seguido da divulsão dos planos teciduais, os quais foram afastados para exposição da superfície dos ossos parietais e frontal. Neste momento os pontos craniométricos bregma e lambda foram aferidos e ajustados em mesmo nível. Em seguida foi realizada craniotomia para exposição da dura-máter, com o auxílio de uma broca esférica diamantada sem refrigeração (KG Sorensen, SP, Brasil) acoplada em uma peça reta em motor de baixa rotação (Micro Motor Handpiece, Saeshin, Coréia do Sul). Uma discreta incisão da dura-máter foi realizada, a partir das medidas craniométricas e uma agulha hipodérmica (Becton Dickinson, SP, Brasil) de metal com 0,8 mm de diâmetro e ponta biselada (fixada no aparato estereotáxico) foi introduzida na interface cortical entre o córtex motor e somatossensorial primários, baseadas em coordenadas anteroposterior (AP, +10,21 mm, baseado no ponto craniométrico lambda), médio-lateral (ML, +1,5 mm) e dorsoventral (DV, -2,5 mm), de acordo com o atlas estereotáxico *“The Rat Brain – in stereotaxic coordinates”* (PAXINOS e WATSON, 2007) (Figura 2). Vale ser ressaltado que a coordenada DV foi calculada em relação à superfície da dura-máter, ou seja, no momento em que a ponta da agulha entrou em contato com a dura-máter, foi estabelecida a profundidade de penetração para realização da lesão mecânica. Uma vez que a agulha foi introduzida no córtex cerebral do animal, a mesma foi mantida por 5 minutos, para completa lesão tecidual local. Finalmente a agulha foi removida, os tecidos divulsionados foram reposicionados e suturados com fio de seda 4-0 (Seda Silk, Ethicon, SP, Brasil). Neste momento foram tomados cuidados pós-operatórios com o intuito de minimizar a dor e o sofrimento dos animais. Para tal, foi administrado morfina (2,5 mg/kg, Cristália, SP, Brasil) imediatamente e a cada 8h após o término da cirurgia. Este cuidado com os animais foi respeitado até o término do tempo experimental máximo (grupo experimental de 48h), ou seja, até o momento que os animais foram submetidos à eutanásia.

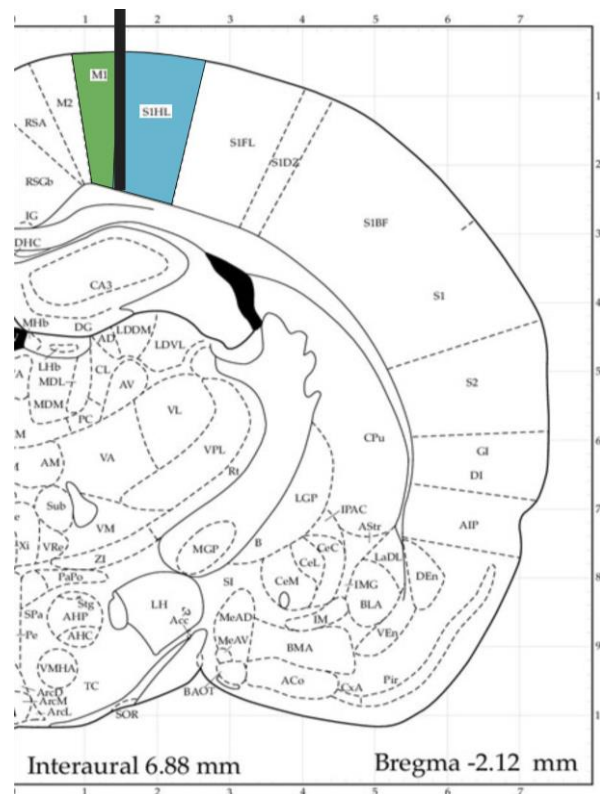


Figura 2. Representação esquemática das coordenadas utilizadas para realização de lesão mecânica nos animais dos grupos experimentais. Barra negra representa agulha hipodérmica de 0,8 mm de diâmetro. Áreas coloridas representam, respectivamente, área motora primária (verde) e área somatossensorial primária (azul). Adaptado “*The Rat Brain – in stereotaxic coordinates*” (PAXINOS e WATSON, 2007).

Decorrido o tempo experimental, os animais do grupo controle (n=4) e dos grupos lesões (12h, n=4; 24h, n=4; 48h, n=4) foram novamente anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca para coleta do encéfalo e processamento imuno-histoquímico. De maneira semelhante, os demais animais foram submetidos à coleta da área de lesão mecânica do córtex cerebral para extração do RNA total e procedimentos de PCR convencional.

4.3 Perfusão transcardíaca

Os animais, cujos encéfalos foram utilizados para técnica de imuno-histoquímica, foram inicialmente anestesiados (como descrito anteriormente) até alcançar o estado de anestesia cirúrgica, seguido de uma incisão no plano sagital mediano, levando em consideração o manúbrio do esterno. Seguidamente as costelas foram rebatidas para exposição da caixa torácica com finalidade de exposição do coração. Em prosseguimento, foi injetado solução anticoagulante (0,1 ml, SKUP6242, Hemofol[®], 5000 U. I., Cristália, SP,

Brasil) no ventrículo esquerdo do coração para evitar coagulação sanguínea que dificultaria os procedimentos de perfusão da solução fixadora. Em prosseguimento, o ventrículo esquerdo foi puncionado com uma cânula acoplada a um sistema de perfusão com bomba peristáltica (77200-62, Cole-Parmer Instrument Company, IL, USA) até alcançar a aorta ascendente, seguida pela fixação da cânula no músculo cardíaco com auxílio de pinça hemostática curva. Neste momento, para permitir a drenagem de toda a solução infundida no animal, uma pequena secção foi realizada no átrio direito. Inicialmente, foi infundida 150 ml de solução salina (7647-14-5, Sigma-Aldrich, MO, USA) com finalidade de promover remoção de todo o sangue existente no sistema circulatório sanguíneo, seguido da infusão de 500 ml de solução fixadora constituída de formaldeído a 4% (76240, Sigma-Aldrich, MO, USA) em tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1M, pH 7,4 a 4°C. Em prosseguimento, os encéfalos foram removidos da caixa craniana com auxílio de um osteótomo.

4.4 Pós-fixação, crioproteção e microtomia

Após a remoção dos encéfalos, os mesmos foram submetidos à pós-fixação na mesma solução fixadora, durante 4h a 4°C. Os espécimes foram submetidos ao procedimento de crioproteção em solução de sacarose a 30% diluídos em PBS 0,1M pH 7,4 durante 48h a 4°C. Em seguida, cortes histológicos coronais com 30 µm de espessura foram obtidos em micrótomo de congelação adaptado (SM 2000R, Leica, HE, Alemanha). Os cortes histológicos foram recolhidos sequencialmente em uma série de 12 frascos e armazenados em solução anticongelante constituída 30% de etilenoglicol (00E1020. 06. BC, Synth, SP, Brasil) e 20% de glicerol (5092-08, Synth, SP, Brasil) diluídos em PBS 0,1M pH 7,4 e mantidos a -20°C até o momento da realização de técnica imuno-histoquímica.

4.5 Dupla imunofluorescência e imunoperoxidase indiretas

Uma série de cortes histológicos foi submetida à técnica de imuno-histoquímica (dupla imunofluorescência indireta). Para tanto, foram empregados os anticorpos anti-Ten-2 (1:100, sc-165674, Santa Cruz Biotechnology, Tx, USA) e anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP; 1:500, AB5804, Millipore, HE, Alemanha). O protocolo padronizado para a reação imuno-histoquímica pelo método de dupla imunofluorescência indireta seguiu as seguintes

etapas: a) lavagem dos cortes histológicos em PBS 0,1M por 24h para remoção da solução anticongelante, na qual os cortes estavam armazenados; b) três lavagens de 10 minutos em PBS; c) bloqueio das marcações inespecíficas com solução contendo PBS com 0,3% de Triton X-100 (PBS “loaded”; X-100; Sigma-Aldrich, MO, USA) e 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé®, SP, Brasil) durante 1h; d) três lavagens em PBS; e) bloqueio das marcações inespecíficas com PBS “loaded” acrescido de 1,5% de albumina de soro bovino (BSA, A7906, Sigma-Aldrich, MO, USA), durante 1h; f) três lavagens em PBS durante 10 minutos cada; g) incubação em solução de PBS “loaded” acrescido de 2% soro normal de burro (D9663, Sigma-Aldrich, MO, USA) durante 24h; h) incubação com anticorpo primário anti-Ten-2 (1:100, sc-165674, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluído em PBS “loaded” acrescido de 2% soro normal de burro, durante 24h a temperatura ambiente; i) três lavagens em PBS durante 10 minutos cada; j) incubação em solução de anticorpo secundário biotilado (1:800, sc-2042, Santa Cruz Biotechnology, Tx, USA) diluído em PBS, durante 1h; k) incubação em solução de Cy³ conjugado com estreptavidina (1:500, Jackson Immunoresearch, PA, USA), diluído em PBS, durante 1h; l) três lavagens em PBS durante 10 minutos cada; m) incubação com anticorpo primário anti-GFAP (1:500, AB5804, Millipore, HE, Alemanha) diluído nas mesmas condições utilizadas para incubação do anticorpo anti-Ten-2 durante 24h, seguindo das etapas descritas em *i* e *j*. Deve ser ressaltado que o segundo anticorpo secundário biotilado utilizado estava conjugado com DTAF (1:200, Jackson Immunoresearch, PA, USA). Finalmente, os cortes histológicos foram contra corados com DAPI (TR-100-FJ, Biosensis, SA, Austrália) seguindo as orientações do fabricante, lavados em PBS, montados em lâminas gelatinizadas, desidratados a temperatura ambiente e protegidos com meio de montagem a base de glicerol e lamínula de vidro.

Por sua vez, para a realização da técnica de imunoperoxidase indireta os cortes foram lavados inicialmente em PBS 0,1M pH 7,4 durante 24h com finalidade de remoção de toda a solução anticongelante. Em seguida, os espécimes foram submetidos a uma lavagem em PBS, uma lavagem em PBS acrescido de 0,001% de Triton X-100 (PBS/loaded; X-100, Sigma-Aldrich, MO, USA) e uma lavagem em PBS, durante 5 minutos cada uma. Os cortes histológicos foram submetidos à inativação da peroxidase endógena com solução de PBS acrescido de 0,03% de peróxido de hidrogênio (7722-84-1, Dinâmica, SP, Brasil) durante 1h. Decorrido esse tempo, os cortes foram novamente submetidos aos procedimentos de lavagem, como descrito anteriormente e, então, foi realizado o bloqueio das reações inespecíficas com

PBS/loaded acrescido de 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé[®], SP, Brasil) durante 1h, seguido por lavagens em PBS, PBS/loaded e PBS (5 minutos cada). Um novo bloqueio das reações inespecíficas com PBS/loaded e 5% de BSA (A7906, Sigma-Aldrich, MO, USA) foi realizado durante 24h. Decorrido esse tempo, três novas lavagens de 5 minutos em PBS, PBS/loaded e PBS foram realizadas e, posteriormente, foi incubado o anticorpo primário anti-Ten-2 (1:100, sc-165674, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) por 24h. Em seguida os espécimes foram lavados em PBS, PBS/loaded e PBS durante 5 minutos em cada solução, incubados com anticorpo secundário biotilado (1:800, sc-2042, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) durante 1h e submetidos a novas lavagens em PBS, PBS/loaded e PBS. Em prosseguimento os cortes histológicos foram incubados no complexo ABC (1:200, PK-6200, Vector Laboratories, CA, USA) durante 120 minutos. A revelação da reação de imuno-histoquímica foi realizada através da solução de PBS e tetracloreto de diaminobenzidina (DAB, 0,02%, 91-95-2, Sigma-Aldrich, MO, USA MO, USA) acrescido de peróxido de hidrogênio a 30%. Para intensificação da coloração, foi adicionado sulfato de níquel amônia (NAS, A1827, Sigma-Aldrich, MO, USA) a 5%, diluído em tampão acetato junto à solução de revelação. Após a revelação, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratados à temperatura ambiente, seguido de lavagens em séries crescentes de álcool e xilol (50% a 70% - banhos de 2 minutos; álcool 95% - banhos de 4 minutos; álcool 100% - 3 banhos de 5 minutos; banhos de xilol de 5, 10 e 15 minutos, respectivamente), protegidos com meio de montagem (Entellan, 107961, Merckmillipore, HE, Alemanha) e lamínula de vidro.

O controle da reação imuno-histoquímica foi realizada através das omissões dos anticorpos primários Ten-2 e GFAP. Além disso, testes de adsorção do anticorpo/peptídeo foram realizados em outros estudos do SNC, desenvolvidos em nosso laboratório.

4.6 Formas de análise dos resultados, aquisição e edição das imagens imuno-histoquímicas

A captura das imagens da técnica de dupla imunofluorescência indireta foi realizada através do uso de microscópio confocal (TCS-SP5 AOBS Tandem Scanner, Leica, HE, Alemanha) acoplado a um microscópio óptico invertido (DMI 6000CS, Leica, HE, Alemanha) do centro de microscopia eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB – UNESP). Os cortes histológicos foram avaliados e os campos visuais foram capturados com

objetiva de Planapochromat de 25x com imersão a óleo que possibilitam uma resolução de até ~150 nm nos eixos x, y e ~300 nm no eixo z. As imagens digitais capturadas (cinco campos microscópicos da área circundante a lesão mecânica de cada corte histológico de um total de quatro cortes - equidistantes 360 µm) foram gravadas no formato eletrônico TIFF e trabalhadas em relação ao contraste, brilho e balanço de cores empregando-se o software Adobe Photoshop CS5 (*Adobe Systems Incorporated, CA, USA*).

A análise quantitativa dos astrócitos que apresentaram imunorreatividade para o GFAP quanto imunorreatividade para a Ten-2 foi realizada manualmente com auxílio do programa eletrônico Image J (*National Institute of Mental Health, NIMH*), contabilizados e expressos em média (erro padrão) dos números de perfis celulares de astrócitos para cada grupo experimental. Vale ser ressaltado que a contabilização foi feita perante a existência de fluorescência amarela (imagens conjugadas) ou pela simultânea visualização individual das imagens. A contagem foi realizada por experimentador previamente calibrado quanto ao padrão de marcação, sendo que o mesmo não tinha conhecimento se estavam contando as imagens obtidas do grupo controle ou dos animais pertencentes aos grupos lesões (teste duplo-cego). Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico de análise de variância simples (One way ANOVA) e pós-teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ como significativo, utilizando o software GraphPad Prism 6.1 (*GraphPad Software, CA, USA*).

4.7 Confeção dos iniciadores para reação em cadeia da polimerase (PCR)

Inicialmente foi necessária a confeção de pares (“*forward*” e “*reverse*”) de iniciadores (“*primers*”) para a realização da técnica de PCR convencional. Para desenhá-los, a sequência genômica da Ten-2 (NM_011856.2; *Mus musculus* - BALB/c) de roedores foi extraída do banco de dados ENSEMBL (www.ensembl.org). Após a coleta de informações, foram desenhados os pares de iniciadores, baseado nos seguintes critérios: a) ocorrência repetida de sequência de nucleotídeos em posições consecutivas; b) tamanho do iniciador; c) porcentagem de CG e extremidade 3'; d) desenhar um iniciador de maneira que o primeiro códon codifique um único aminoácido; e) evitar iniciadores com leucina, serina e arginina posicionada no primeiro códon.

Além da confeção dos iniciadores, como descrito anteriormente, também foram utilizadas programas computacionais de domínio público, como o Iniciadore3Plus

(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/iniciadore3plus/iniciadore3plus.cgi/>) para a obtenção de um segundo par de iniciador (“*forward*” e “*reverse*”). Neste caso, o programa foi alimentado com os mesmos parâmetros descritos acima. Uma vez obtido as duplas de iniciadores, ambos foram testados em reações de PCR convencional e aqueles que apresentaram o melhor resultado, foram selecionados para o estudo (Tabela 1). Vale ressaltar que o par de iniciador do neurofilamento de cadeia leve (Nefl) empregado neste estudo foi extraído de prévios trabalhos. O tamanho em pares de base (pb) dos produtos oriundos da técnica de PCR convencional são mostrados na tabela 1.

Gene	Iniciadores	Tamanho do produto (pb)
Ten-2 NM_011856.2	5'-aacgatgtcaactgcatctgctac-3' 3'-gagtccagtggtcccatcataagt-5'	495
Nefl* BC016436.1	5'-atcagcaacgacctcaagtctatccgc-3' 3'-ttctctgaggcttcgttcataccc-5'	761

Tabela 1. Sequência dos pares dos iniciadores para realização da técnica de PCR convencional e tamanho dos produtos amplificados. Abreviaturas: Ten, teneurina; pb, pares de base; *iniciadores utilizados como controle (Nefl).

Os iniciadores foram obtidos comercialmente (Síntese Biotecnologia Ltda., MG, Brasil) no estado liofilizado e foram reconstituídos em tampão tris-EDTA (TE; 10 mM Tris base, 1 mM EDTA, pH 8,0) na concentração de 100 µM, aliquotados em tubos para PCR (#PCR-02-C-500, Axygen Scientific, CA, USA) de 0,2 ml e estocados a -20°C. A alíquota empregada para as reações da técnica de PCR foi novamente diluída para obter uma concentração de trabalho de 10 µM.

4.8 Extração de RNA total

Para tal propósito, os animais foram anestesiados nas mesmas condições descritas inicialmente. Após alcançar anestesia profunda, os mesmos foram submetidos ao processo de antisepsia com PVP-I (iodopovidona, Rioquímica, SP, Brasil) na região superior da cabeça seguida da amplificação da tricotomia com lâmina de navalha, objetivando o máximo de desinfecção e consequentemente evitando a contaminação dos encéfalos dos animais. Em

seguida, os animais, individualmente, foram posicionados novamente no aparelho estereotáxico para facilitar os procedimentos de coleta da área de lesão cortical. Após a fixação da cabeça do animal no aparelho estereotáxico, foi realizada a ruptura do fio de sutura e exposição da área cirúrgica, seguida pela remoção de todo o tecido cicatricial (quando presente) em processo de formação, inclusive o coágulo, o qual dificultaria a visualização do campo operacional. Por sua vez, alcançado a área cortical de interesse, esta foi dissecada com margem de 1 mm ao redor da lesão induzida com agulha. Este fragmento cortical foi transferido para uma placa de Petri estéril para que pudesse ser realizada trimagem adicional, se necessária. Imediatamente após esse processo, o fragmento do córtex cerebral foi transferido para um tubo de 2 ml estéril (livre de RNase, DNase e pirogênio - Kasvi, PR, Brasil) o qual foi previamente pesado em balança de precisão (APX-200, Denver Instruments, NY, USA), sendo coletado um volume máximo de 100 mg de tecido nervoso (média de 60 mg). Em prosseguimento, foi adicionado 1 ml de trizol (15596-018, Ambion, Life Technologies, CA, USA) e as amostras foram homogeneizadas a 30000 rpm (Tissue-Tearor, Biospec Products, OK, USA) durante 40 segundos para lise tecidual, seguido de incubação a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 200 µl de clorofórmio (0757, Amresco, Biochemicals Life Science Research Products, OH, USA), para cada 1 ml de trizol utilizado e homogeneizado vigorosamente em agitador vórtex (K40-1010, Kasvi, PR, Brasil) durante 15 segundos, seguido de incubação no gelo durante 3-5 minutos. Após essa etapa e visualizado o processo inicial de separação de fases da solução, as amostras foram submetidas à centrifugação (Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, BW, Alemanha) durante 15 minutos a 12000 xg a 4°C, facilitando a separação de fases do eluato, no qual o RNA total permaneceu na fase superior (fase aquosa) da solução. A fase superior do eluato foi removida por pipetagem e transferida para um novo tubo de 2 ml estéril (Kasvi, PR, Brasil), sendo acrescentado 0,5 ml de isopropanol 100% (67-63-0, Sigma-Aldrich, MO, USA), para cada 1 ml de trizol utilizado inicialmente. Esta solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C para formação de um discreto precipitado de RNA na parede do tubo. Neste momento o sobrenadante foi descartado. O RNA foi ressuspenso em 1 ml de álcool 75% (E193, Amresco, Biochemicals Life Science Research Products, OH, USA) e homogeneizado brevemente no vórtex. Uma nova centrifugação (7500 xg) foi realizada durante 5 minutos a 4°C, sendo descartado o sobrenadante e mantendo-se o RNA precipitado. Finalmente, o RNA foi desidratado a

temperatura ambiente durante 5-10 minutos, seguido da adição de 100 µl de água livre de RNase e DNase (W1754, Sigma-Aldrich, MO, USA) para ressuspensão da solução final de RNA total. Esta solução foi incubada em bloco de aquecimento a seco (MD-01N, Major Science, CA, USA) durante 15 minutos a 57°C.

As amostras de RNA total foram novamente submetidas a um processo de purificação utilizando o sistema de colunas do *kit Direct-zol™ RNA MiniPrep* (R2052, Zymo Research, CA, USA). Para tanto, foi adicionado a mesma quantidade em microlitros de álcool 100% (E193, Amresco, Biochemicals Life Science Research Products, OH, USA) diretamente no volume inicialmente ressuspendido de RNA total, alcançando um volume álcool/RNA total de 1:1. Após a adição do álcool, o tubo foi vigorosamente homogeneizado no vórtex e o eluato foi transferido para uma coluna de purificação de RNA presente no *kit*, posicionado dentro de um tubo coletor e centrifugado por 1 minuto a 16000 xg a 4°C. O lavado foi descartado e 400 µl de *Direct-zol™ RNA PreWash* (presente no *kit*) foram adicionados no centro da coluna, seguido de centrifugação por 1 minuto a 16000 xg a 4°C. Uma lavagem adicional foi realizada para remoção de possíveis contaminantes que ainda permaneciam na coluna. Em seguida, foram adicionados 700 µl de *RNA Wash Buffer* (presente no *kit*) na coluna e centrifugada a 16000 xg a 4°C durante 1 minuto, descartado o lavado e resubmetido a centrifugação. A coluna foi posicionada dentro de um novo tubo de 2 ml estéril e 100 µl de água livre de RNase e DNase (presentes no *kit*) foi adicionada no centro da coluna, seguido da centrifugação a 16000 xg durante 1 minuto a 4°C. O eluato com o RNA total purificado foi estocado em freezer -80°C.

A quantidade de RNA extraído e purificado foi mensurada através de espectrofotômetro (Optizen POP Nano Bio, Mecasys, Coréia do Sul) empregando-se microvolumes da amostra (1 µl). A qualidade do RNA (presença das subunidades 18s e 28s) foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (1239-45-8, Sigma Aldrich, MO, USA).

4.9 Síntese de cDNA

Para a realização da técnica de PCR convencional, é necessária a conversão do RNA total extraído em DNA complementar (cDNA). Para tanto, utilizamos o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (4368813, Applied Biosystem, CA, USA), cujas

soluções do *kit* foram lentamente descongeladas e mantidas em gelo. As soluções para a conversão do RNA total em cDNA foram previamente aliquotadas em tubos para PCR (#PCR-02-C-500, Axygen, CA, USA) na seguinte sequência: a) 2,0 µl de tampão (10x RT Buffer); b) 0,8 µl de nucleotídeos (25x dNTP Mix, 100mM); c) 2,0 µl de iniciadores (10x RT Random *primers*); d) 1,0 µl de enzima transcriptase reversa (MultiScribe™ Reverse Transcriptase); e) 1,0 µl de inibidor de RNase (*RNase Inhibitor*); f) 3,2 µl de água ultra pura; g) 10 µl do RNA total extraído de cada amostra utilizada para o estudo. Os tubos foram agitados em vórtex, centrifugados e posicionados no termociclador (6325 000.510P, Matercyler Pro S, Eppendorf, USA), obedecendo a seguinte programação: a) 25 minutos a 10°C; b) 120 minutos a 37°C; c) 5 minutos a 85°C. Finalmente os tubos foram armazenados em *freezer* a -20°C.

4.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para as reações da técnica de PCR convencional foram empregadas as soluções do *kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (#C1141, Promega, WI, USA). As soluções do *kit*, assim como o cDNA e os iniciadores (Ten-2 e Nefl) foram lentamente descongelados e mantidos em gelo, após serem retirados do *freezer* -20°C. As soluções do *kit* para técnica de PCR e o cDNA foram previamente aliquotadas em tubos de PCR (#PCR-02-C-500, Axygen Scientific, CA, USA) na seguinte sequência: a) 5 µl de tampão (5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer); b) 1,5 µl de cloreto de magnésio (MgCl₂ Solution, 1,5 mM); c) 0,5 µl de nucleotídeos (dNTP MIX, 0,2 mM); d) 0,5 µl de cada iniciador (0,2 µM); e) 0,125µl de enzima DNA polimerase (GoTaq® DNA Polymerase, 1,25 u); f) 2,0 µl de cada amostra (cDNA); g) 14,875 µl de água livre de RNase DNase. Os tubos com as soluções foram agitados por 20 segundos, centrifugados brevemente e posicionados no termociclador (6325 000.510P, Matercyler Pro S, Eppendorf, HH, USA), empregando o seguinte programa: a) desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; b) desnaturação a 95°C por 1 minuto; c) anelamento a 44,4°C (para Ten-2) ou 50°C (para Nefl) por 1 minuto; d) extensão a 72°C por 1 minuto; e) repetição das etapas *b*, *c*, e *d* por 43 ciclos para a Ten-2 ou 36 ciclos para o Nefl; f) extensão a 72°C por 5 minutos; g) manutenção a 4°C. Após o término da amplificação gênica, os tubos foram agitados por 20 segundos, centrifugados e mantidos em gelo.

O teste controle (controle negativo) para a técnica de PCR convencional foi realizada através da omissão do cDNA em PCR.

Para análise dos produtos oriundos da técnica de PCR convencional, foi confeccionado um gel de agarose (9012-36-6, AMRESCO, Biotechnology Grade, OH, USA) na concentração de 1,5% em tampão tris-borato-EDTA 0,5x (TBE: 45 mM Tris base; 45 mM ácido bórico; 1 mM de EDTA, pH 8,0, SIGMA, USA) com 0,05 µl/ml de brometo de etídio (1239-45-8, Sigma Aldrich, MO, USA). Em cada cavidade do gel de agarose foram depositados 15 µl da amostra oriundos da técnica de PCR convencional acrescidos de 3 µl de corante para DNA (R0611, Thermo Scientific, MA, USA). As amostras foram submetidas à eletroforese de nucleotídeos em tampão TBE 0,5x com corrente de 40 volts (V) durante 120 minutos (#B1, Horizontal Minigel Systems, Thermo Scientific, MA, USA). Em prosseguimento, o gel de agarose foi transferido para o fotodocumentador Image Quant LAS 500 (29005063, GE Healthcare, IL, USA) para análise em luz ultravioleta, captura das imagens através de câmera acoplada ao Image Quant (GE Healthcare, IL, USA) e gravação em arquivos eletrônicos no formato TIFF.

4.11 Curva de amplificação gênica

Com o intuito de realizar uma análise semi-quantitativa dos genes de interesse, uma curva de amplificação foi estabelecida, variando o número de ciclos (desnaturação, anelamento e extensão). Para tanto, inicialmente realizamos uma técnica de PCR convencional (60 ciclos) com todas as amostras e analisamos em gel de agarose corado com brometo de etídio. A partir de então, foi escolhido à amostra do animal que apresentou o menor produto de amplificação (banda mais discreta). Deste modo, eliminaríamos a possibilidade de alguma reação de amplificação gênica resultasse em produto de amplificação impossível de ser mensurada (por ausência de banda visível). Para a curva de amplificação da Ten-2, as amostras foram amplificadas com 41, 43, 45 e 47 ciclos; enquanto as amostras foram amplificadas com 32, 34, 36, 38 e 40 ciclos para a Nefl. A programação para a amplificação gênica foi similar aquela da PCR convencional (descrita anteriormente), após a padronização da temperatura de anelamento. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese de gel de agarose e analisadas como descrito anteriormente. Os ciclos adotados

para a amplificação de Ten-2 e Nefl foram baseados no ponto médio da curva de amplificação, conforme análise de densidade óptica das bandas obtidas no gel de agarose.

4.12 Forma de análise dos produtos de PCR convencional

Para análise dos produtos oriundos da técnica de PCR convencional foi usado o programa ImageQuant LAS 500 (29005063, GE Healthcare, IL, USA), onde os valores de densidade óptica foram contabilizados e expressos em média (erro padrão) para cada grupo experimental. Cada valor originado da intensidade de banda para cada amostra (cada animal) da Ten-2 foi contabilizada e posteriormente normalizado sobre a intensidade de banda do Nefl (do animal correspondente). Os dados semi-quantitativos obtidos foram submetidos aos testes estatístico de análise de variância simples (One way ANOVA) e pós-teste de Tukey, considerando $p < 0,05$, como significantes, utilizando o GraphPad Prism 6.1 (GraphPad Software, CA, USA).

5. RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Análise imuno-histoquímica da distribuição da Ten-2 no córtex cerebral

No presente estudo foram utilizados ratos adultos jovens, os quais foram submetidos à indução de lesão mecânica na interface entre o córtex motor e somatossensorial primários e, posteriormente, os encéfalos foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica (dupla imunofluorescência indireta ou imunoperoxidase indireta) utilizando anticorpos anti-Ten-2 e anti-GFAP. Por outro lado, os animais do grupo controle não sofreram procedimentos cirúrgicos. Os resultados advindos da técnica imuno-histoquímica permitiram identificar nos animais de todos os grupos experimentais (grupos controle e lesões) uma discreta imunomarcção em neurônios para a Ten-2 no córtex cerebral (Figura 3). Os neurônios imunorreativos a Ten-2 exibiram imunomarcção principalmente associada à membrana celular (Figura 3). Além disso, estes neurônios estavam posicionados preponderantemente nas camadas V-VI (camada piramidal interna e camada fusiforme, respectivamente) do córtex (dados não mostrados). Testes controles da reação imuno-histoquímica através das omissões dos anticorpos primários não resultaram em imunomarcções (dados não mostrados).

As análises dos cortes histológicos submetidos à dupla imunofluorescência indireta (GFAP/Ten-2) evidenciou, ocasionalmente, uma discreta imunorreatividade à Ten-2 presente em alguns astrócitos ($18,95 \pm 4,14$ perfis celulares/ $10^5 \mu\text{m}^2$) nos animais do grupo controle (Figura 4A). Esta discreta imunomarcção dos astrócitos não foi evidente em cortes histológicos submetidos à imunoperoxidase indireta (dados não mostrados). Os astrócitos imunorreativos ao GFAP, nos animais do grupo controle, estavam uniformemente dispersos no córtex cerebral, exibindo corpo celular com diâmetro discreto e poucos prolongamentos celulares (Figura 4A).

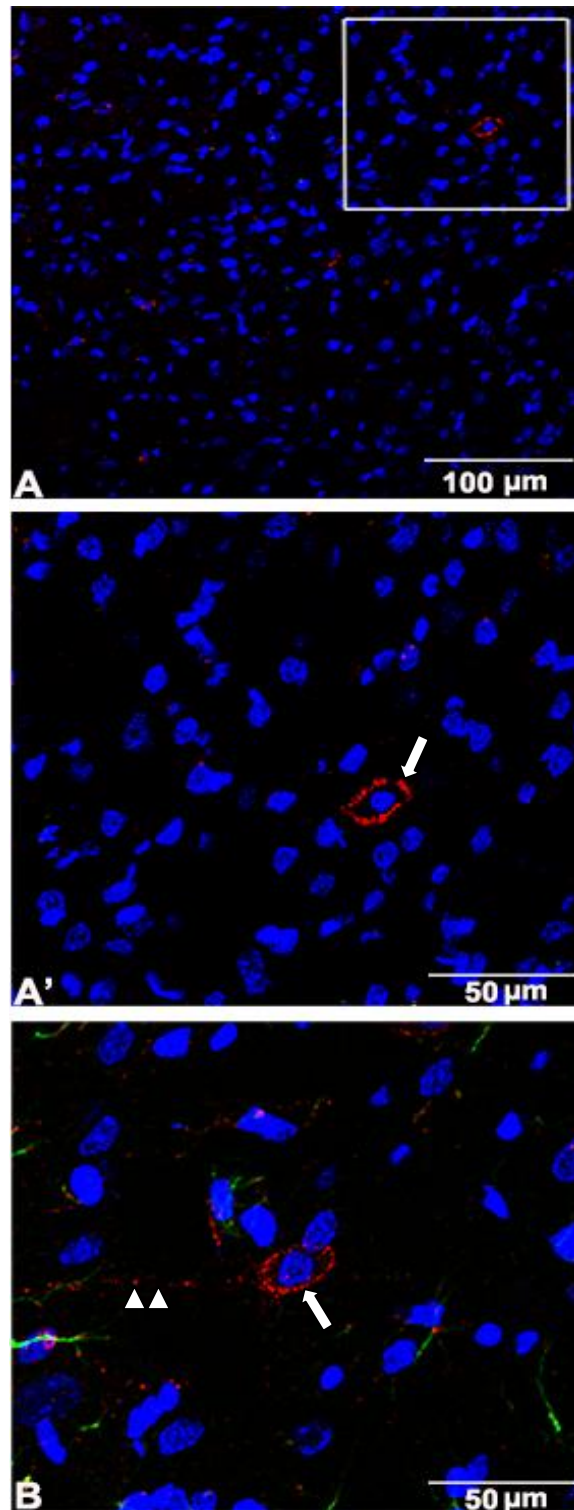


Figura 3. Fotomicrografias em microscopia confocal mostrando corte histológico do encéfalo de animal do grupo controle submetido à dupla imunofluorescência indireta para detecção de GFAP (marcado com FITC, fluorescência verde) Ten-2 (marcada com Cy³, fluorescência vermelha) e contra corados com DAPI (marcação nuclear, fluorescência azul). Observar em A-B, a presença de neurônios com imunorreatividade a Ten-2, presente principalmente associada a membrana celular (seta), além de imunorreatividade em seu prolongamento axonal (cabeças de setas, B).

As imunomarcações de GFAP e Ten-2 nos astrócitos dos animais pertencentes ao grupo lesão 12h foram relativamente brandas em relação ao grupo controle. Os astrócitos apresentaram uma mudança fenotípica leve, sugerindo o início de uma astrogliose (Figura 4B). Por outro lado, foi observado um aumento de perfis celulares ($165,94 \pm 3,70 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) de astrócitos GFAP imunorreativos a Ten-2 (Figuras 4B e 6; Tabela 2). Este aumento de perfis celulares de astrócitos GFAP/Ten-2 foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$), quando comparado com os animais do grupo controle (Figura 5).

Nos animais pertencentes ao grupo lesão 24h, as alterações da imunorreatividade ao GFAP e Ten-2 nos astrócitos foram mais evidentes em relação aos grupos controle e lesão 12h (Figura 4C). Os astrócitos nitidamente exibiram corpo celular e prolongamentos celulares mais intensamente imunorreativos ao GFAP, evidenciando uma evolução da ativação astrocitária (Figura 4C). Apesar de dados morfométricos não terem sido avaliados nos astrócitos, existe um claro aumento no diâmetro do seu corpo celular, assim como os prolongamentos citoplasmáticos tornaram-se hipertróficos, mostrando-se longos e ramificados (Figura 4C). Na quantificação dos perfis celulares ($154,83 \pm 7,32 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) de astrócitos GFAP/Ten-2, foi notado um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) em relação aos animais pertencentes ao grupo controle (Figura 5; Tabela 2).

Nos animais do grupo lesão 48h, foi notado um aumento significativo da imunorreatividade ao GFAP nos perfis celulares dos astrócitos, assim como da dupla imunomarcacão para GFAP e Ten-2 ($216,02 \pm 17,62 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) (Figura 4D e 5; Tabela 2). A análise quantitativa revelou diferenças estatisticamente significantes entre este grupo em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) e grupo lesão 24h ($p < 0,05$) (Figura 5; Tabela 2).

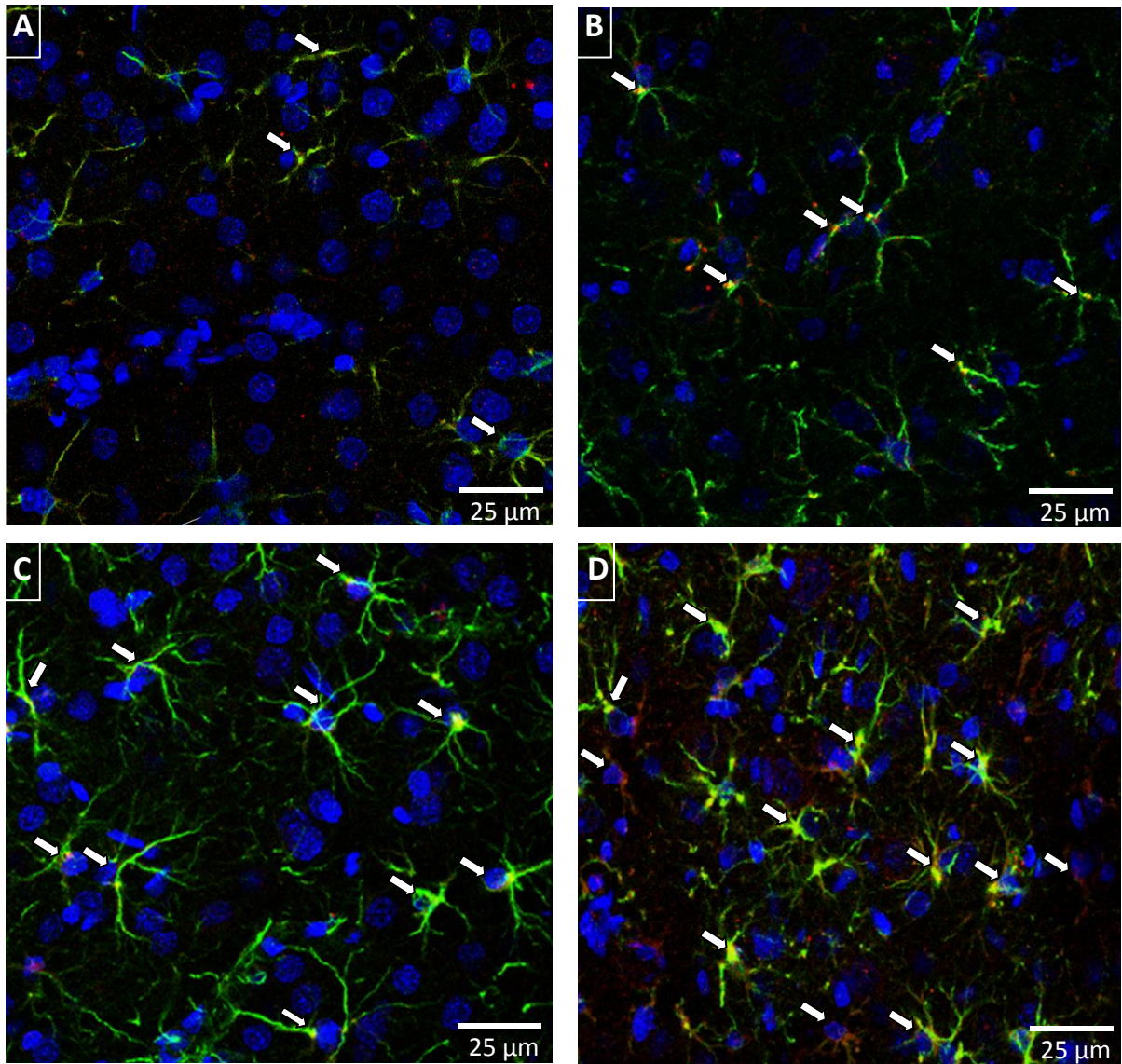


Figura 4. Fotomicrografias em microscopia confocal mostrando corte histológico do encéfalo dos animais pertencentes aos grupos controle (A), lesão 12h (B), lesão 24h (C) e 48h (D) submetidos a dupla imunofluorescência indireta para detecção de GFAP (marcado com FITC, fluorescência verde) Ten-2 (marcada com Cy³, fluorescência vermelha) e contra corados com DAPI (marcação nuclear, fluorescência azul). Observar em A, astrócitos não reativos exibindo imunomarcção para GFAP (setas). Em B, C e D são evidenciados astrócitos reativos exibindo imunomarcção para Ten-2 (setas indicando colocização de GFAP e Ten-2, fluorescência amarela/avermelhada). Observar claramente a sequencial hipertrofia dos astrócitos exibindo imunorreatividade para GFAP e Ten-2 nos grupos lesões em relação ao grupo controle.

GRUPO	ANIMAIS				MÉDIA (erro padrão)
Controle	9,57	28,46	15,16	22,61	18,95 ($\pm 4,14$)
12 horas pós-lesão	146,86	140,74	176,39	199,80	165,94 ($\pm 13,70$) ^A
24 horas pós-lesão	174,52	139,41	154,84	150,58	154,83 ($\pm 7,32$) ^A
48 horas pós-lesão	180,91	209,64	264,98	208,58	216,02 ($\pm 17,62$) ^{A/B}

Tabela 2. Dados referentes ao número médio de perfis celulares de astrócitos imunorreativos a GFAP e a Ten-2 no córtex cerebral dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. Abreviaturas: A, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$); B, diferença estatisticamente significativa em relação ao 24h ($p < 0,05$).

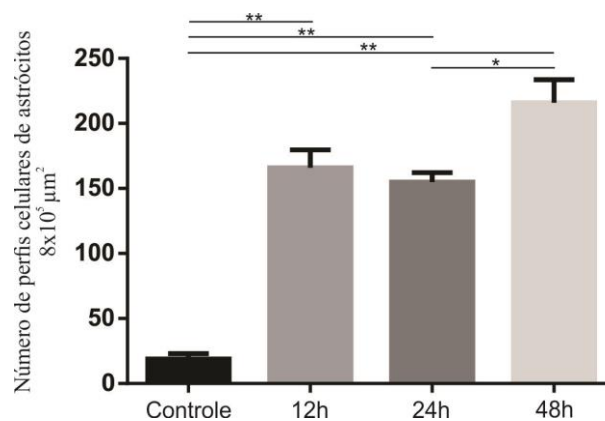


Figura 5. Número de perfis celulares duplamente imunomarcados para GFAP/Ten-2 para os grupos controle, 12, 24 e 48h pós-lesão. Os dados foram submetidos ao teste estatístico de análise de variância simples (One way ANOVA), com pós-teste de Tukey considerando $p < 0,05$ como significativo. Abreviaturas: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$.

5.2 Distribuição dos astrócitos imunorreativos para Ten-2

As análises dos cortes histológicos submetidos à técnica de imunoperoxidase indireta permitiram uma avaliação mais detalhada da distribuição dos astrócitos imunorreativos à Ten-2, após a indução de lesão mecânica na interface entre o córtex motor e somatossensorial primários. Estes astrócitos estavam concentrados ao redor da área lesionada, subjacentes à área de penumbra (Figura 6). Esta característica foi claramente evidenciada nos animais pertencentes ao grupo lesão 48h (Figura 6). Nenhuma imunomarcção para Ten-2 em astrócitos foi evidente nos animais pertencentes ao grupo controle, submetidos ao método da imunoperoxidase indireta (dados não mostrados).

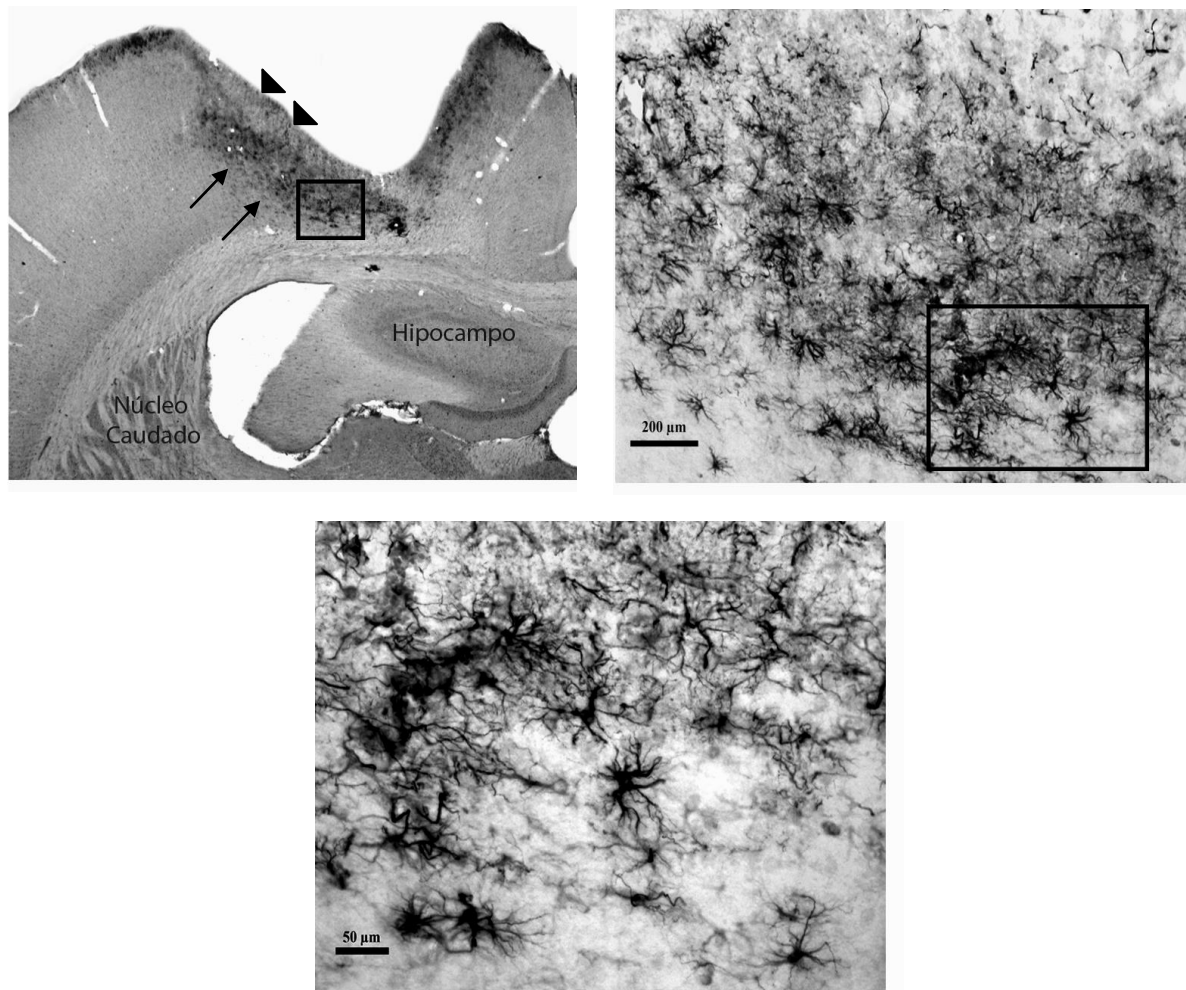


Figura 6. Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando corte histológico do encéfalo de animal pertencente ao grupo lesão 48h, submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de Ten-2. Observar a elevada quantidade de astrócitos reativos (setas) e imuno-reativos a Ten-2 no córtex cerebral, posicionados subjacente à área de penumbra (cabeças de seta).

5.3 Análise da expressão gênica para Ten-2

Inicialmente, o RNA total das amostras foi mensurado quanto à qualidade (relação A260/280nm) e quantidade em espectrofotômetro (Figura 7). Adicionalmente, a qualidade do RNA total foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose para identificar a presença e integridade das subunidades 18s e 28s do RNA ribossômico (Figura 7).

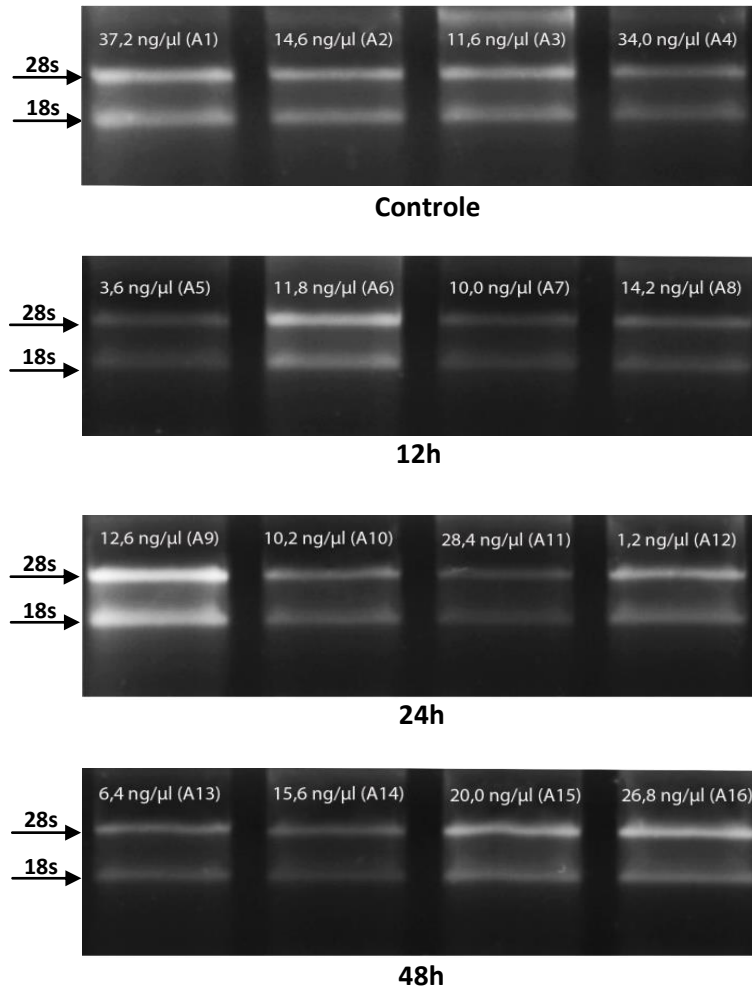


Figura 7. Análise qualitativa do RNA total extraído da região do córtex cerebral dos ratos pertencentes aos grupos experimentais, após a eletroforese de nucleotídeos em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio. Observar a presença e integridade das bandas 18s e 28s do RNA ribossômico das amostras. Os valores em ng/μl foram obtidos através espectrofotometria. Abreviatura: A, número do animal experimental.

A curva de amplificação gênica para a determinação do número de ciclos adotados na técnica de PCR convencional para a Ten-2 e do Nefl foi estabelecida após análise densitométrica de eletroforese de nucleotídeos em gel de agarose. O número de ciclos adotados para a amplificação gênica da Ten-2 e do Nefl foi de 43 e 36 ciclos, respectivamente (Figura 8).

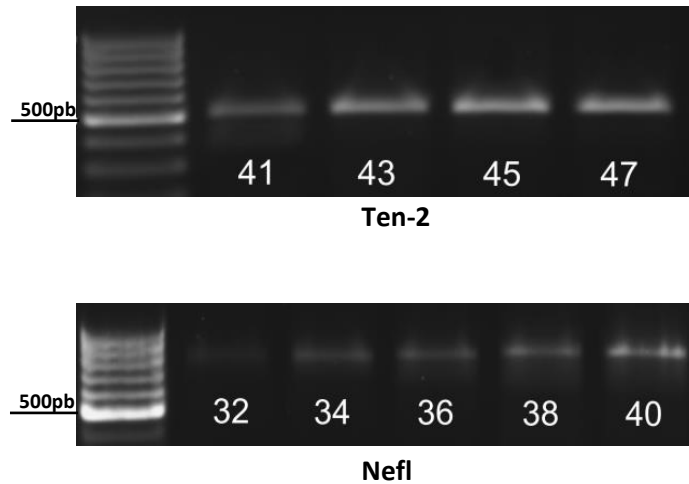


Figura 8. Eletroforese dos produtos de amplificação gênica para Ten-2 e Nefl em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio. Observar o gradativo aumento dos produtos de amplificação após técnica de PCR convencional, paralelamente ao aumento do número de ciclos de amplificação.

Na análise dos produtos oriundos da técnica de PCR convencional foi possível observar a amplificação gênica para Ten-2 nos animais pertencentes ao grupo controle, assim como nos animais dos grupos lesões (Figura 9). A análise semi-quantitativa dos dados de densitometria óptica mostrou um aumento estatisticamente significativo no grupo lesão 48h quando comparado com os demais grupos (Figura 10; Tabela 3). Os testes controles da PCR, através da omissão do cDNA na reação, não mostraram a presença das bandas em géis de agarose para Ten-2 ou Nefl (dados não mostrados).

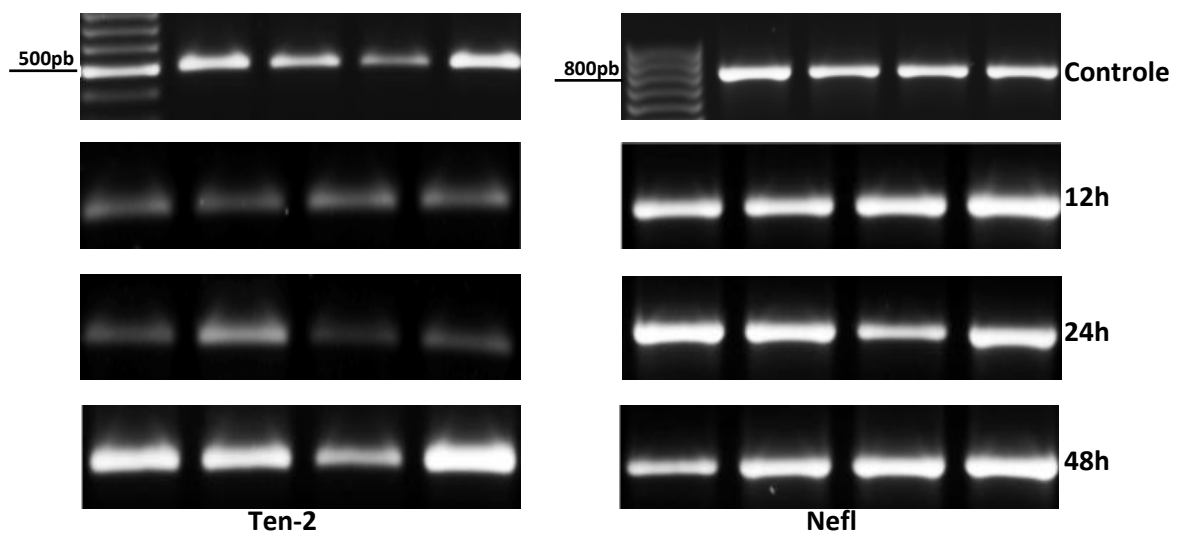


Figura 9. Eletroforese dos produtos de amplificação gênica para Ten-2 e Nefl das amostras dos diferentes grupos experimentais em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio.

GRUPO	ANIMAIS				MÉDIA (erro padrão)
Controle	0,937	0,6426	0,5232	1,5647	0,958175 ($\pm 0,0582$) ^B
12 horas pós-lesão	0,8997	0,7624	0,7502	1,2838	0,77075 ($\pm 0,0993$) ^A
24 horas pós-lesão	0,8682	0,6239	0,7317	1,024	0,7064 ($\pm 0,0639$) ^A
48 horas pós-lesão	1,1278	1,0541	0,8205	1,6705	1,38575 ($\pm 0,1455$)

Tabela 3. Dados semi-quantitativos da densidade óptica da amplificação gênica da Ten-2 (normalizados em relação ao Nefl) obtidos pela técnica de PCR convencional para cada animal dos grupos experimentais. Teste estatístico de análise de variância simples (One way ANOVA), com pós-teste de Tukey considerando $p < 0,05$. Abreviaturas: A, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 48h ($p < 0,01$); B, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 48h ($p < 0,05$).

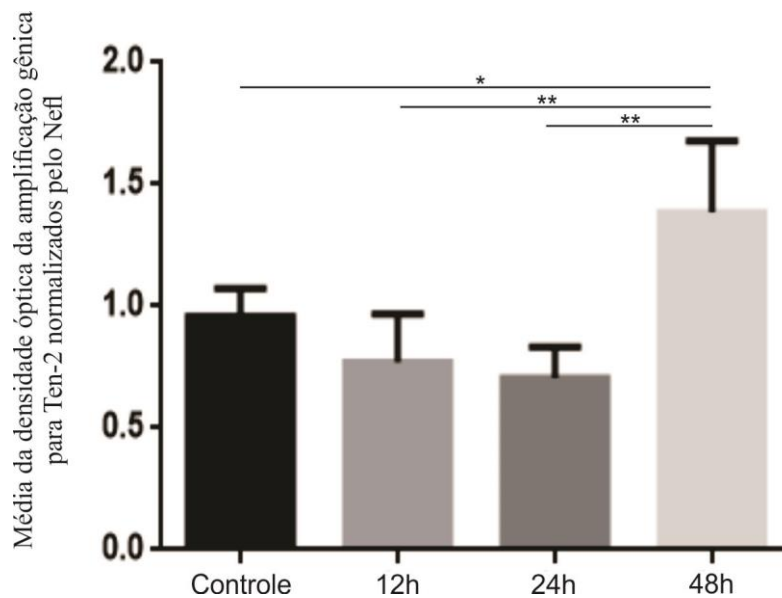


Figura 10. Análise semi-quantitativa dos valores de densidade óptica obtidas pela técnica de PCR convencional da expressão gênica de Ten-2 (normalizados em relação ao Nefl) dos diferentes grupos experimentais (média \pm erro padrão). Teste estatístico de análise de variância simples (One way ANOVA), com pós-teste de Tukey considerando $p < 0,05$ como significativo. Abreviaturas: **, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 48h ($p < 0,01$); *, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 48h ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

6. Discussão

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a presença de Ten-2 em astrócitos frente à indução de lesão mecânica no córtex cerebral de ratos adultos, através do emprego das técnicas imuno-histoquímicas e da reação em cadeia da polimerase (PCR convencional).

6.1 Considerações sobre a técnica imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica é amplamente utilizada para evidenciação de proteínas, principalmente em cortes histológicos e culturas celulares. O principal propósito dessa técnica em cortes histológicos é elucidar a presença e localização de determinada proteína para subsidiar estudos morfológicos, funcionais ou mesmo de diagnóstico histopatológico (LIN e CHEN, 2014).

A confirmação ou validação dos resultados advindo da técnica de imuno-histoquímica necessita da realização de testes prévios com os anticorpos primários, tais como os testes de titulação, adsorção, omissão dos anticorpos primário e secundário, “*immunoblotting*”, além da comparação de resultados com anticorpos de diversas marcas que reconhecem o mesmo antígeno (BURRY, 2011; LORINCZ e NUSSER, 2008). O anticorpo comercial anti-Ten-2, empregado neste estudo foi anteriormente testado por nosso grupo de pesquisa quanto aos testes preconizados para a confirmação da especificidade da imunomarcção. Desta forma, foram constatados resultados favoráveis para o uso do anticorpo anti-Ten-2 da Santa Cruz Biotechnology na concentração de 1:100, empregado no presente estudo. Além disso, o teste de adsorção também revelou que o anticorpo reconhece o antígeno, sem resultar em marcações inespecíficas nos cortes histológicos do SNC de primatas e roedores (dados não mostrados). Os dados do fabricante mostraram que o anticorpo anti-Ten-2 identificava uma proteína com peso molecular 308 kDa em ensaios de “*western blotting*”, coincidente com o peso molecular da Ten-2. Disto posto, pode ser sugerido que as imunomarcações presentes nos astrócitos reativos são oriundas da presença da Ten-2, entretanto, não pode ser eliminada a possibilidade deste anticorpo também identificar outros transcritos da Ten-2 que podem ser gerados pela transcrição de “*splice variants*” ou através da proteólise de certas partes da Ten-2, uma vez que esta proteína exhibe sequências

susceptíveis a clivagem (TUCKER et al., 2001; BAGUTTI et al., 2003; NUNES, et al., 2005; LOVEJOY et al., 2009; SILVA et al., 2011; BOUCARD et al., 2014).

Em relação à técnica de imunofluorescência indireta, além de todos os cuidados citados acima, outros cuidados adicionais foram tomados quanto à utilização dos fluorocromos conjugados com a estreptavidina ou com o anticorpo secundário. Os fluorocromos (Cy³, absorção de 548 nm e excitação de 562 nm; DTAF, absorção de 492 nm e excitação de 520 nm) empregados apresentam espectro de absorção/excitação luminosa distintos, evitando a sobreposição da fluorescência entre as imunomarcações e, conseqüentemente, resultados falso-positivos de colocalizações. A marcação de fundo foi controlada em tempo real através do fotomultiplicador de voltagem e ajustada para se obter as melhores condições em relação à inespecificidade e sensibilidade durante a análise de microscopia confocal. O ajuste da marcação de fundo foi mantido inalterado para a coleta de todas as imagens dos grupos experimentais.

Além disso, possíveis artefatos nas imagens digitais foram extraídos seguindo a preconização de Schenk et al., (1999) e Saper (1999) para preparação de imagens com fins de análise e publicação científica, facilitando a interpretação dos dados, sem influenciar nos resultados para fins de quantificação de perfis celulares dos astrócitos imunorreativos a GFAP e a Ten-2.

6.2 Considerações sobre a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi inicialmente empregada na década de 90, possibilitando uma alteração radical na área das ciências biológicas (MULLIS, 1990). Em prosseguimento, a técnica de PCR e suas modificações tornaram-se amplamente utilizada para ampliações, sequenciamento e clonagem de sequências genômicas, diagnósticos de doenças, entre outros (GARIBYAN e AVASHIA, 2013). Por outro lado, como as demais técnicas utilizadas na biologia molecular, a técnica de PCR pode conter algumas limitações, como por exemplo, a indução de erros a partir da atividade da enzima polimerase ao iniciar a amplificação, erros em relação ao anelamento dos iniciadores, a necessidade de obtenção de informações preliminares para o desenho dos iniciadores utilizados para o início da reação de amplificação (GARIBYAN e AVASHIA, 2013), entre outras. Desta maneira, para o desenvolvimento deste estudo foram desenhados os iniciadores

para a Ten-2, por meio de nossos conhecimentos e baseados em critérios pré-estabelecidos, além da utilização de programas eletrônicos de domínio público. Os iniciadores foram posteriormente testados em PCR convencional, sendo selecionados aqueles que proporcionaram melhores resultados, quanto à especificidade. Além disso, testes em relação as quantidade de amostra, concentrações de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e concentrações de nucleotídeos utilizados para a reação foram realizados para se obter as melhores condições para o desenvolvimento da técnica. De forma semelhante, também foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (temperatura de “*Melting*”) para otimização dos iniciadores.

Para a realização desta técnica é necessária à adequada coleta do material que será submetido inicialmente à extração do RNA total. Esta etapa foi crucial no presente estudo, uma vez que os neurônios do córtex cerebral expressam Ten-2, sobrepondo aos astrócitos reativos que expressam a Ten-2 nos animais dos grupos lesões. Disto posto, a padronização da área cortical delimitada para coleta foi dificultosa, uma vez que somente a porção de córtex cerebral circundante à lesão seria de principal interesse, pois esta é constituída por elevada quantidade de astrócitos que expressam Ten-2 após a indução de lesão mecânica. Assim sendo, acreditamos que ao realizar a coleta do material, muitos neurônios advindos de áreas adjacentes que não sofreram com a indução experimental de injúria tecidual foram coletados e, conseqüentemente, seu RNAm para Ten-2 também foi amplificado, além do RNAm dos astrócitos que expressam Ten-2. É fato que isto interferiu nas análises dos nossos dados, pois para o grupo controle amplificamos o RNAm predominantemente dos neurônios que expressam Ten-2 e, por outro lado, quando amplificamos o RNAm dos animais dos grupos com lesões, amplificamos predominantemente o RNAm dos astrócitos (que expressam a Ten-2 após a indução experimental de lesão mecânica) em maior quantidade na área lesionada. Baseado nesta inferência e para minimizar a influência da expressão gênica da Ten-2 pelos neurônios, as análises semi-quantitativas da amplificação gênica foram normalizadas através da amplificação do neurofilamento de cadeia leve (Nefl), um marcador constitutivo neuronal. Exemplificando, animais com elevada expressão de Ten-2 e baixa expressão de Nefl indicariam que a Ten-2 é preponderantemente oriunda da expressão gênica em astrócitos; enquanto animais com elevada expressão de Ten-2 e Nefl indicariam que a expressão da Ten-2 seria oriunda preponderantemente de neurônios.

De maneira geral, quando são comparadas as expressões gênicas de determinadas proteínas entre grupos experimentais, através de PCR convencional, RT-PCR e PCR em

tempo real, são empregados principalmente os marcadores constitutivos como o glicerol-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) ou beta-actina (β -actina) (SANDVIG et al., 2004, LÖÖV et al, 2013; TIMARU-KAST et al., 2015). Inicialmente, na fase de padronização da técnica de PCR convencional no presente estudo, foi checada a possibilidade de adotar o GAPDH e/ou β -actina para normalização dos dados advindos da expressão de Ten-2, porém os resultados apontaram que esta normalização prejudicaria as interpretações dos resultados. Isto ocorreu pelo fato dos animais dos grupos lesões apresentarem uma rica população de células nativas e migrantes, tais como células inflamatórias que também expressam esses marcadores constitutivos na região lesionada do córtex cerebral (SANDVIG et al., 2004; SOFRONIEW e VINTERS, 2010; LÖÖV et al, 2013; SOFRONIEW, 2014; TIMARU-KAST et al., 2015). Baseado nestas informações foi adotado a normalização pelo Nefl, além de subtrair a amplificação gênica da Ten-2 advinda dos neurônios adjacentes à área lesionada, como anteriormente discutido.

6.3 Teneurinas e lesão cortical

As injúrias do SNC são acompanhadas por uma rápida proliferação celular, expressão de proteínas e demais fatores que possuem função de recuperar o tecido lesado e promover proteção neural ao redor da lesão (SOFRONIEW e VINTERS, 2010; NASH et al., 2011). Dentre os componentes celulares, os astrócitos, que são as células mais abundantes no SNC, são responsáveis pela manutenção da homeostase e amplamente ativados após a existência de injúrias, exercendo papel fundamental para a manutenção da integridade local (NASH et al., 2011). Além dessas células, micróglia e células progenitoras aumentam em número, expressam e liberam várias substâncias bioativas que possuem papel importante na inflamação, reparo da barreira hematoencefálica e proteção neural (ROLLS et al., 2009).

Uma vez estabelecido um processo de injúria tecidual no SNC, os astrócitos tornam-se hipertróficos (SIBSON et al., 2008), migram e circunscvem a área lesionada, sendo este processo denominado de astrogliose (SALMAN et al., 2004 SIBSON et al., 2008). A grande maioria dos astrócitos envolvidos neste processo, predominantemente na fase inicial, representam células nativas da região lesionada (SUSARLA et al., 2014), enquanto que alguns poucos astrócitos envolvidos no processo de astrogliose são provenientes da diferenciação de células mesenquimais (SUSARLA et al., 2014). Este processo de astrogliose

está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, sendo notada uma hipertrofia dos astrócitos imunorreativos a GFAP, que foi mais significativa 48h após a indução da lesão mecânica. Além disso, o presente estudo também observou que o número de perfis celulares de astrócitos imunorreativos a GFAP não aumentou significativamente nos grupos lesionados em relação ao grupo controle (dados não mostrados); corroborando os dados da literatura que reportaram a não proliferação de astrócitos nas primeiras horas após a indução de lesão mecânica do córtex cerebral (SOFRONIEW e VINTERS, 2010; SUSARLA et al., 2014).

No presente estudo foi também notado que os astrócitos imunorreativos ao GFAP apresentam uma distribuição espacial diferente entre os animais do grupo controle e grupos com lesão do córtex cerebral. Nos animais controle, os astrócitos imunorreativos ao GFAP apresentaram distribuição homogênea na região cortical estudada, enquanto que, nos animais com indução experimental de lesão mecânica, estas células estavam concentradas em uma região subjacente a área de penumbra. Este padrão de distribuição dos astrócitos corroboram com os dados encontrados por Susarla et al. (2014), o qual também analisaram a proliferação astrocitária após lesão do SNC.

É sabido que a família das TENs é amplamente expressa no tecido nervoso durante a neurogênese, sendo preservada em algumas áreas do SNC durante a fase adulta. Por outro lado, o possível envolvimento dessas proteínas em situações de adversas no SNC é pobremente estudado. Existe apenas um estudo indicando uma possível participação das TENs em processos de regeneração no SNC (OTAKI e FIRESTEIN, 1999). Estes autores relataram a expressão de neurestina (proteína expressa durante a neurogênese, similar a Ten-2) em neurônios em tufo do bulbo olfatório, após lesão química da mucosa olfatória de ratos adultos, sugerindo de forma pioneira que a Ten-2 pode estar envolvida nos processos de regeneração do SNC. Recentemente, foi constatado o envolvimento da Ten-4 na regeneração do músculo estriado esquelético, sendo demonstrado que esta proteína participa nos processos de crescimento e formação das fibras da musculatura esquelética, assim como pode estar envolvida com o processo regenerativo destas células (ISHII et al., 2015). Além disso, estudos desenvolvidos em nosso laboratório mostram que a Ten-2 é negativamente regulada nos odontoblastos durante lesão dentária. Vale ressaltar que os odontoblastos expressam Ten-2 durante seu processo de diferenciação.

É interessante destacar que a TENs foram descobertas durante estudos que buscavam a existência de possíveis proteínas homólogos às tenascinas (BAUMGARTNER e

CHIQUET-EHRISMANN, 1993; BAUMGARTNER et al., 1994; MINET et al., 1999). As tenascinas são proteínas da matriz extracelular, distintas das TENs que são proteínas transmembrana do tipo II (TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2015; MOSCA, 2015). As tenascinas pertencem a uma família de seis membros que são expressos principalmente durante a embriogênese e organogênese (TONGIORGI et al., 1995; METZGER et al., 2006; TRELOAR et al., 2009). Entre os membros que pertencem à família das tenascinas, a tenascina C (TnC) é expressa por astrócitos imaturos, em especial nas células da glia radial durante os processos de diferenciação celular e migração cortical (CROSSIN et al., 1986; PRIETO et al., 1990; TUCKER et al., 1994; YUASA, 1996). Em animais adultos, a expressão das tenascinas no córtex cerebral é discreta (RETTIG et al., 1992). Por outro lado, injúria mecânica no córtex cerebral e cerebelar de ratos adultos resultou na expressão de tenascina (LAYWELL et al., 1992). Segundo estes autores, esta expressão de tenascina ocorreu nos astrócitos reativos, sendo mais significativa até três dias após a lesão mecânica, diminuindo progressivamente a partir deste período pós-operatório (LAYWELL et al., 1992). Entretanto, comparando a quantidade de astrócitos imunorreativos a GFAP com aqueles que expressam tenascina, pode ser notado que apenas uma pequena população deste tipo celular expressa tenascina (LAYWELL et al. 1992). Em contraste, nosso estudo mostrou que aproximadamente 100% dos astrócitos imunorreativos a GFAP também apresentam imunorreatividade a Ten-2, nos animais dos grupos lesões (dados não mostrados).

Baseado nos dados anteriores poderia ser discutido a possibilidade que os nossos resultados apresentem alguma correlação com as tenascinas, tais como reação cruzada entre o anticorpo anti-Ten-2 e a proteína tenascina, ou mesmo, a possibilidade dos iniciadores para amplificação gênica da Ten-2 poderiam hibridizar com alguma sequência da tenascinas. É interessante ressaltar que o anticorpo utilizado no presente estudo reconhece a porção intracelular da Ten-2 (epítipo situado entre as posições 50-100 da cadeia peptídica) a qual não exibe nenhuma similaridade com qualquer sequência das tenascinas. Adicionalmente, os testes de adsorção mostraram que o anticorpo apresenta especificidade à Ten-2, como previamente discutido. Além disso, o presente estudo empregou iniciadores que amplificaram a sequência exônica do RNAm da Ten-2, relacionada a transcrição da porção extracelular desta proteína (éxon 23, situado entre as posições 1514-1679 da cadeia peptídica), a qual também não apresenta qualquer similaridade com as tenascinas.

Os estudos envolvendo as TENs estão sendo ampliados consideravelmente nos últimos anos, principalmente com relação as suas interações homofílicas e heterofílicas, relacionadas com o desenvolvimento de conexões neuronais e manutenções das conexões sinápticas (MOSCA, 2015; WOELFLE et al., 2015). Alguns estudos têm apontado interações homofílicas entre moléculas das Ten-2 no estabelecimento de circuitos neurais das vias visuais, durante o desenvolvimento do SNC de galinhas (RUBIN et al., 2002). Essas interações homofílicas também foram confirmadas em estudos *in vitro*, empregando culturas celulares (HT1080) transfectadas com diferentes sequências de Ten-2, resultando em uma agregação celular mediada por essa proteína (RUBIN et., 2002). Recentemente, um estudo utilizando células (HEK923) transfectadas com Ten-1 ou Ten-2, revelou que o domínio NHL da região extracelular dessas proteínas é importante para interações homofílicas durante o crescimento neuronal (BECKMANN et al., 2013). Bagutti et al., (2003) mostraram que a partir de interações homofílicas da Ten-2 entre células neuronais, uma sequência de sinalização intracelular foi ativada resultando na extensão do prolongamento neuronal até o estabelecimento do contato intercelular. Por outro lado, não poder ser descartado que a existência de demais interações homofílicas e/ou heterofílicas estão envolvidas nesta sinalização. A possibilidade da existência de interações homofílicas da Ten-2 entre astrócitos reativos durante lesão do SNC necessita de estudos mais detalhados, uma vez que as extremidades dos prolongamentos celulares dos astrócitos não podem ser visualizadas com exatidão em microscopia de luz ou confocal.

Por outro lado, interações heterofílicas mediadas pelas TENs tem sido evidenciadas. Entre essas interações, foi proposto que as TENs podem fazer associações com as latrofilinas (LPHNs) e/ou as proteínas pertencentes às famílias das integrinas e distroglicanas (BOUCARD et al., 2014; MOSCA et al., 2015; WOELFLE et al., 2015). As LPHNs constituem uma família de GPCRs (receptores acoplados a proteína G) constituída por três membros (LPHN-1, -2 e -3) (SILVA e USHKARYOV, 2010). Desses três membros, a LPHN-1 e a LPHN-3 são expressas no encéfalo, enquanto que a LPHN-2, além de expressão encefálica, estudos tem mostrado sua localização em tecidos não neurais (SILVA e USHKARYOV, 2010). As LPHNs estão relacionadas com a liberação pré-sináptica de neurotransmissores, além da participação na estabilidade neuronal a partir da interação com as TENs (SILVA et al., 2011). É interessante salientar que um “*splice variant*” da Ten-2, denominado de Lasso, interage com a LPHN-1 modulando o influxo de cálcio no terminal

pré-sináptico, sendo fundamental nesta interação a parte terminal da Ten-2, denominada de TCAP-2 (SILVA et al., 2011; WOELFLE et al., 2015). Estudos preliminares desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa evidenciou o aumento da imunorreatividade para LPHN-1, -2 e -3 em astrócitos reativos após indução experimental de lesão mecânica (dados não mostrados), reforçando o papel das interações heterofílicas da TENs no SNC.

Uma possível interação heterofílica entre a Ten-2 dos astrócitos reativos com as proteínas da família das integrinas pode ser discutida. Inicialmente, é interessante ressaltar que todas as TENs possuem um domínio NHL que pode interagir com as integrinas (LÖER et al., 2008). Além disso, tem sido demonstrado que as integrinas também interagem com a distroglicanas para manter a estabilidade dos componentes das sinapses (PILGRAM et al., 2010). Outros estudos apontaram a importância da interação da Ten-1 com o complexo integrina/distroglicana na regulação do colágeno IV, mantendo estável a membrana basal, durante a fase embrionária do *Caenorhabditis elegans* (TRZEBIATOWSKA et al., 2008; TOPF e CHIQUET-EHRISMANN, 2011). Existem estudos mostrando o envolvimento das integrinas no SNC, tanto em condições de normalidade, assim como em estados de injúria tecidual (ELLISON et al., 1998; 1999; DRABIKOWSKI et al., 2005; TRZEBIATOWSKA et al. 2008; KOYAMA, 2014). As integrinas são proteínas da matriz extracelular constituídas por duas subunidades (subunidade α e β), essenciais para os processos de migração, interação e diferenciação celular (HARBURGER e CALDERWOOD, 2009; CAMPBELL e HUMPHRIES, 2011; ETIENNE-MANNEVILLE e HALL, 2001; MORSE et al., 2014). As integrinas estão presentes em todas as células envolvidas diretamente ou indiretamente no estabelecimento da barreira hematoencefálica, tais como células endoteliais, astrócitos, pericitos e micróglia (BAETEN e AKASSOGLU, 2011). Durante o processo de ativação astrocitária e cicatrização glial, ocorrem alterações celulares frente a migrações e interações celulares, assim como alterações na expressão de integrinas (ELLISON et al., 1998; 1999; SOFRONIEW e VINTERS, 2010). As integrinas, em especial a integrina $\alpha_v\beta_3$ e a $\alpha_v\beta_5$, apresentam expressão mais significativa no endotélio da microvasculatura cerebral, após lesão cortical (ELLISON et al., 1998; 1999). Além disso, a integrina $\alpha_6\beta_4$ participa na interação dos pé-vasculares dos astrócitos com o endotélio (del ZOPPO e MILNER, 2006). Baseado nos dados que mostraram que as integrinas são fundamentais para a migração dos astrócitos na neurogênese e durante lesão do SNC, é possível que a Ten-2 possa estar envolvida na cascata de eventos celulares que permite os processos de interação e migração

dos astrócitos para o reestabelecimento da barreira hematoencefálica, assim como na astrogliose. Isto pode ser fundamentado, uma vez que nossos dados mostraram que a imunorreatividade e o aumento da expressão gênica da Ten-2 ocorreu desde os momentos iniciais da lesão mecânica do córtex cerebral. A Ten-2 dos astrócitos poderia mostrar interação heterofílica com as integrinas expressas nos próprios astrócitos, assim como em células endoteliais, pericitos e micróglia. Estudos adicionais são necessários a fim de confirmar possível correlação da Ten-2 dos astrócitos com as integrinas durante lesão cortical.

De maneira similar, é possível que as TENs possam exercer interações heterofílicas com as distroglicanas (PILGRAM et al., 2010; CHAND et al., 2014; MOSCA, 2015; WOELFLE et al., 2015). As distroglicanas são proteínas passíveis de clivagem que podem originar duas subunidades, a α -distroglicana e β -distroglicana. A α -distroglicana (α DG; porção extracelular) possui capacidade de interação com a laminina- α 2 e outras proteínas, assim como interações não covalentes com a β -distroglicana (SCIANDRA et al., 2013). Esta, por sua vez, possui uma porção transmembrana com um prolongamento citoplasmático passível de interação com a distrofina e urotrofina, que interagem com o citoesqueleto (HENRY e CAMPBELL, 1998). As distroglicanas são expressas nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, assim como em astrócitos perivasculares e em neurônios, sendo importantes para os contatos intercelulares, sinapses e manutenção da barreira hematoencefálica (ZACCARIA et al., 2001; MILNER et al., 2008). Estudos anteriores mostraram que a imunorreatividade para β -distroglicana estava presente ao redor dos vasos sanguíneos do córtex cerebral de ratos adultos, sendo que esta imunorreatividade foi completamente eliminada logo após a indução de injúria do SNC, concomitante ao desencadeamento da astrogliose e aumento da imunorreatividade da laminina ao redor dos vasos sanguíneos (SZABÓ E KÁLMÁN, 2008; KÁLMÁN et al., 2011). Além disso, a imunorreatividade a β -distroglicana foi novamente reestabelecida à medida que a astrogliose regredia, assim como diminua a imunorreatividade para a laminina (SZABÓ E KÁLMÁN, 2008; KÁLMÁN et al., 2011). Em um modelo experimental de isquemia cerebral focal moderada em ratos adultos, foi observado que a imunorreatividade a β -distroglicana foi significativamente reduzida na região terminal dos prolongamentos dos astrócitos (pés-vasculares) no centro da lesão e na área de penumbra adjacente (STEINER et al., 2012).

Estudos prévios têm apontado que a Ten-1 interage com o complexo integrina/distroglicanas para regular a síntese de colágeno tipo IV, como previamente

mencionado (TRZEBIATOWSKA et al., 2008; TOPF e CHIQUET-EHRISMANN et al., 2011). Além disso, a região C-terminal da Ten-1 (denominado de TCAP-1) é colocalizado com a β -dístroglicana, enquanto que a Ten-1 é colocalizada com a α -dístroglicana nos testículos de ratos, possivelmente regulando o tamanho desta estrutura, assim como a síntese de testosterona (CHAND et al., 2012; 2014). No SNC, o TCAP-1 é colocalizado com a β -dístroglicana em células hipocámpais, regulando a organização do citoesqueleto (CHAND et al., 2012). Uma vez que a expressão de dístroglicana é reduzida nos astrócitos e nas células endoteliais na injúria tecidual, é plausível considerar a possibilidade que este processo esteja correlacionado com a indução da expressão da Ten-2 nos astrócitos, até a estabilização do reparo tecidual, tais como reestabelecimento da barreira hematoencefálica.

7. CONCLUSÃO

7. Conclusão

Os dados do presente estudo permitem concluir:

1- Astrócitos reativos apresentam imunorreatividade para Ten-2, principalmente 48 horas após indução experimental de lesão mecânica no córtex cerebral de ratos adultos;

2- A expressão gênica de Ten-2 no córtex cerebral aumentou significativamente, principalmente em 48h após indução da lesão no córtex cerebral;

3- Estudos adicionais são necessários para elucidar o papel da Ten-2 nos astrócitos durante lesão mecânica no SNC de animais adultos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

AL CHAWAF, A; XU, K.; TAN, L. A.; VACCARINO, F. J.; LOVEJOY, D. A.; ROTZINGER, S. Corticotropin-releasing factor (crf)-induced behaviors are modulated by intravenous administration of teneurin C-terminal associated peptide-1 (tcap-1). *Peptides*, v. 28, p. 1406-1415, 2007a.

ALLAMAN, I.; BELANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. Astrocyte-neuron metabolic relationships: For better and for worse. *Trends Neurosci.*, v. 34, p. 76–87, 2011.

AHMED, S.M., RZIGALINSKI, B.A., WILLOUGHBY, K.A., SITTERDING, H.A., ELLIS, E.F. Stretch- 696 induced injury alters mitochondrial membrane potential and cellular ATP in cultured astrocytes and neurons. *J. Neurochem.*, v. 74, p. 1951-1960, 2000.

ASSOCIATION, A. V. M. Avma guidelines for the euthanasia of animals. 2013.

ANTINUCCI, P.; NIKOLAOU, N.; MEYER, M. P.; HINDGES, R. Teneurin-3 specifies morphological and functional connectivity of retinal ganglion cells in the vertebrate visual system. *Cell Rep.*, v. 5, p. 582-592, 2013.

BAETEN, K. M.; AKASSOGLU, K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Dev. Neurobiol.*, v. 71, p. 1018-1039, 2011.

BAGUTTI, C.; FORRO, G.; FERRALLI, J.; RUBIN, B.; CHIQUET-EHRISMANN R. The intracellular domain of teneurin-2 has a nuclear function and represses zic-1-mediated transcription. *J. Cell Sci.*, v. 116, p. 2957-2966, 2003.

BARCIA, C.; ROS, C. M.; ANNESE, V.; GÓMEZ, A.; ROS-BERNAL, F.; AGUADO-YEAR, D.; MARTÍNEZ-PAGÁN, M. E.; DE PABLOS, V.; FERNANDEZ-VILLALBA, E.; HERRERO, M. T. IFN- γ signaling, with the synergistic contribution of TNF-alpha, mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of parkinson's disease. *Cell Death. Dis.*, v. 3, 2012. DOI: 10.1038/cddi.

BAUMGARTNER, S.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Ten a, a Drosophila gene related to tenascin, shows selective transcript localization. *Mech. Dev.*, v. 40, p. 165-176, 1993.

BAUMGARTNER, S.; MARTIN, D.; HAGIOS, C.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Ten m, a Drosophila gene related to tenascin, is a new pair-rule gene. *EMBO. J.*, v. 13, p. 3728-3740, 1994.

BECKER, T.; ANLIKER, B.; BECKER, C. G.; TAYLOR, J.; SCHACHNER, M.; MEYER, R. L.; BARTSCH, U. Tenascin-r inhibits regrowth of optic fibers in vitro and persists in the optic nerve of mice after injury. *Glia*, v. 29, p. 330-346, 2000.

BECKMANN, J.; SCHUBERT, R.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; MÜLLER, D. J. Deciphering teneurin domains that facilitate cellular recognition, cell-cell adhesion, and neurite outgrowth using atomic force microscopy-based single-cell force spectroscopy. *Nano. Lett.*, v. 13, p. 2937-2946, 2013.

BEN-ZUR, T.; FEIGE, E.; MOTRO, B.; WIDES, R. The mammalian Odz gene family: homologs of a *Drosophila* pair-rule gene with expression implying distinct yet overlapping developmental roles. *Dev. Biol.*, v. 217 p. 107-20, 2000.

BERRY, M. Post-injury myelin-breakdown products inhibit axonal growth: An hypothesis to explain the failure of axonal regeneration in the mammalian central nervous system. *Bibl. Anat.*, v.23, p. 1-11, 1982.

BERRY, M.; MAXWELL, W. L.; LOGAN, A.; MATHEWSON, A.; MCCONNELL, P.; ASHHURST, D. E.; THOMAS, G. H. Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta. Neurochir. Suppl.*, v. 32, p. 31–53, 1983.

BOUCARD, A. A.; MAXEINER, S.; SÜDHOF, T. C. Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, v. 289, p. 389–402, 2014.

BUERVENICH, S.; XIANG, F.; SYDOW, O.; JÖNSSON, E. G.; SEDVALL, G. C.; ANVRET, M.; OLSON, L. Identification of four novel polymorphisms in the calcitonin/alpha-cgrp (calca) gene and an investigation of their possible associations with parkinson disease, schizophrenia, and manic depression. *Hum. Mutat.*, v. 17, p. 435-444, 2001.

BURRY, R. W. Controls for immunocytochemistry: an update - *J. Histochem. Cytochem.*, v. 59, p.6-12, 2011.

BUSH, T. G.; PUVANACHANDRA, N.; HORNER, C. H.; POLITO, A.; OSTENFELD, T.; SVENDSEN, C. N.; MUCKE, L.; JOHNSON, M. H.; SOFRONIEW, M. V. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*, v. 23, p. 297–308, 1999.

CAJAL, S. R. Y. Part II - Degeneration and regeneration of the nervous system, Oxford University Press, 1928.

CAMPBELL, I. D.; HUMPHRIES, M. J. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, v. 3, 2011 DOI: 10.1101/cshperspect.a004994.

CHAND, D.; CASATTI, C. A.; DE LANNOY, L.; SONG, L.; KOLLARA, A.; BARSYTE-LOVEJOY, D.; BROWN, T. J.; LOVEJOY, D. A. C-terminal processing of the teneurin proteins: Independent actions of a teneurin c-terminal associated peptide in hippocampal cells. *Mol. Cell Neurosci.*, v. 52, p. 38-50, 2013.

CHAND, D.; COLACCI, M.; DIXON, K.; KOLLARA, A.; BROWN, T. J.; LOVEJOY, D. A. C-terminal region of teneurin-1 co-localizes with the dystroglycan complex in adult mouse testes and regulates testicular size and testosterone production. *Histochem. Cell Biol.*, v. 141, p.191-211, 2014.

CHAND, D.; SONG, L.; DELANNOY, L.; BARSYTE-LOVEJOY, D.; ACKLOO, S.; BOUTROS, P. C.; EVANS, K.; BELSHAM, D. D.; LOVEJOY, D. A. C-Terminal region of teneurin-1 co-localizes with dystroglycan and modulates cytoskeletal organization through an extracellular signal-regulated kinase-dependent stathmin- and filamin A-mediated mechanism in hippocampal cells. *Neuroscience*, v. 219, p. 255-270, 2012.

CHIQUET-EHRISMANN R.; MATSUOKA Y.; HOFER U.; SPRING J.; BERNASCONI C.; CHIQUET M. Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. *Cell Regul.*, v. 2, p. 927-938, 1991.

CLEGG, D. O.; WINGERD, K. L.; HIKITA, S. T.; TOLHURST, E. C. Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. *Front. Biosci.*, v. 8, p. 723-750, 2003.

CLEMENTE, C. D. Regeneration in the vertebrate central nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.*, v. 6, p. 257-301, 1964.

CROSSIN, K. L.; HOFFMAN, S.; GRUMET, M.; THIERY, J. P.; EDELMAN, G. M. Site-restricted expression of cytotactin during development of the chicken embryo. *J. Cell Biol.*, v. 102, p. 1917–1930, 1986.

CROSSIN, K. L.; HOFFMAN, S.; TAN, S. S.; EDELMAN, G. M. Cytotactin and its proteoglycan ligand mark structural and functional boundaries in somatosensory cortex of the early postnatal mouse. *Dev. Biol.*, v. 136, p. 381–392, 1989.

DAVIES, S. J.; FIELD, P. M.; RAISMAN, G. Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways. *Exp. Neurol.*, v. 142, p. 203-16, 1996.

del ZOPPO, G. J.; MILNER, R. Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, v. 26, p. 1966-1975, 2006.

DHARMARATNE, N.; GLENDINING, K. A.; YOUNG, T. R.; TRAN, H.; SAWATARI, A.; LEAMEY, C. A. Ten-m3 is required for the development of topography in the ipsilateral retinocollicular pathway. *PLoS One*, v. 7, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0043083.

DONNELLY, D. J.; POPOVICH, P. G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinalcord injury. *Exp. Neurol.*, v. 209, p. 378-388, 2008.

DRABIKOWSKI, K.; TRZEBIATOWSKA, A.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Ten-1, an essential gene for germ cell development, epidermal morphogenesis, gonad migration, and neuronal pathfinding in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, v. 282, p. 27-38, 2005.

DUBOVSKY, S. L.; THOMAS, M.; HIJAZI, A.; MURPHY, J. Intracellular calcium signalling in peripheral cells of patients with bipolar affective disorder. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, v. 243, p. 229-234, 1994.

ELLISON, J. A.; BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Matrix remodeling after stroke. De novo expression of matrix proteins and integrin receptors. *Ann. NY. Acad. Sci.*, v. 890, p. 204-222, 1999.

ELLISON, J. A.; VELIER, J. J.; SPERA, P.; JONAK, Z. L.; WANG, X.; BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Osteopontin and its integrin receptor $\alpha V\beta 3$ are upregulated during formation of the glial scar after focal stroke. *Stroke*, v. 29, p. 1698-1707, 1998.

ENG, L. F.; REIER, P. J.; HOULE, J. D. Astrocyte activation and fibrous gliosis: Glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue. *Prog. Brain Res.*, v. 71, p. 439-455, 1987.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell*, v. 106, p. 489-498, 2001.

FAULKNER, J. R.; HERRMANN, J. E.; WOO, M. J.; TANSEY, K. E.; DOAN, N. B.; SOFRONIEW, M. V. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v. 24, p. 2143–2155, 2004.

FENG, K.; ZHOU, X. H.; OOHASHI, T.; MÖRGELIN, M.; LUSTIG, A.; HIRAKAWA, S.; NINOMIYA, Y.; ENGEL, J.; RAUCH, U.; FÄSSLER, R. All four members of the ten-m/odz family of transmembrane proteins form dimers. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 26128-26135, 2002.

FITCH, M. T.; SILVER, J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp. Neurol.*, v. 209, p. 294-301, 2008.

FLOYD, C. L.; GORIN, F. A.; LYETH, B. G. Mechanical strain injury increases intracellular sodium and reverses Na⁺/Ca²⁺ exchange in cortical astrocytes. *Glia*, v. 51, p. 35–46, 2005.

FRISCHKNECHT, R.; CHANG, K. J.; RASBAND, M. N.; SEIDENBECHER, C. I. Neural ECM molecules in axonal and synaptic homeostatic plasticity. *Prog. Brain Res.*, v. 214, p. 81-100, 2014.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.*, v. 133, p. 1-4, 2013.

HARBURGER, D. S.; CALDERWOOD, D. A. Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.*, v. 122, p. 159-163, 2009.

HENRY, M. D.; CAMPBELL, K. P. A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell*, v. 95, p. 859-870, 1998.

HERRMANN, J. E.; IMURA, T.; SONG, B.; QI, J.; AO, Y.; NGUYEN, T. K.; KORSAK, R. A.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SOFRONIEW, M.V. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v. 28, p. 7231–7243, 2008.

HUBER, J. D.; EGLETON, R. D.; DAVIS, T. P. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. *Trends Neurosci.*, v. 24, p. 719–725, 2001.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, v. 110, p. 673-687, 2002.

IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O.; ERVASTI, J. M.; LEVEILLE, C. J.; SLAUGHTER, C. A.; SERNETT, S. W.; CAMPBELL, K. P. Primary structure of

dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, v. 355, p. 696-702, 1992.

ISHII, K.; SUZUKI, N.; MABUCHI, Y.; ITO, N.; KIKURA, N.; FUKADA, S. I.; OKANO, H.; TAKEDA, S.; AKAZAWA, C. Muscle satellite cell protein Teneurin-4 regulates differentiation during muscle regeneration. *Stem Cells*, 2015. DOI: 10.1002/stem.2058.

JACOBSON, C.; COTE, P. D.; ROSSI, S. G.; ROTUNDO, R. L.; CARBONETTO, S. The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J. Cell Biol.*, v. 152, p. 435-450, 2001.

KÁLMÁN, M.; MAHALEK, J.; ADORJÁN, A.; ADORJÁN, I.; PÓCSAI, K.; BAGYURA, Z.; SADEGHIAN, S. Alterations of the perivascular dystrophin-dystroglycan complex following brain lesions: an immunohistochemical study in rats. *Histol. Histopathol.*, v. 26, p. 1435-1452, 2011.

KENZELMANN, D.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; LEACHMAN, N. T.; TUCKER, R. P. Teneurin-1 is expressed in interconnected regions of the developing brain and is processed in vivo. *BMC Dev. Biol.*, 2008. DOI: 10.1186/1471-213X-8-30.

KENZELMANN-BROZ, D.; TUCKER, R. P.; LEACHMAN, N. T.; CHIQUET-EHRISMANN, R. The expression of teneurin-4 in the avian embryo: potential roles in patterning of the limb and nervous system. *Int. J. Dev. Biol.*, v. 54, p. 1509-1516, 2010.

KINEL-TAHAN, Y.; WEISS, H.; DGANGY, O.; LEVINE, A.; WIDES, R. *Drosophila* odz gene is required for multiple cell types in the compound retina. *Dev. Dyn.*, v. 236, p. 2541-2554, 2007.

KOYAMA, Y. Signaling molecules regulating phenotypic conversions of astrocytes and glial scar formation in damaged nerve tissues. *Neurochem. Int.*, v. 78, p. 35-42, 2014.

LAU, L. W.; CUA, R.; KEOUGH, M. B.; HAYLOCK-JACOBS, S.; YONG, V. W. Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 14, p. 722-729, 2013.

LAYWELL, E. D.; DÖRRIES, U.; BARTSCH, U.; FAISSNER, A.; SCHACHNER, M.; STEINDLER, D. A. Enhanced expression of the developmentally

regulated extracellular matrix molecule tenascin following adult brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 89, p. 2634-2638, 1992.

LEAMEY, C. A.; MERLIN, S.; LATTOUF, P.; SAWATARI, A.; ZHOU, X.; DEMEL, N.; GLENDINING, K. A.; OOHASHI, T.; SUR, M.; FÄSSLE, R. R. Ten-m3 regulates eye-specific patterning in the mammalian visual pathway and is required for binocular vision. *PLoS Biol.*, v. 5, 2007a. DOI: 10.1371/journal.pbio.005024.

LEAMEY, C. A.; GLENDINING, K.A.; KREIMAN, G.; KANG, N.D.; WANG, K.H.; FÄSSLER, R.; SAWATARI, A.; TONEGAWA, S.; SUR, M. Differential gene expression between sensory neocortical areas: Potential roles for ten-m3 and bc16 in patterning visual and somatosensory pathways. *Cereb. Cortex*, v. 18, p. 53-66, 2008.

LEMONS, M. L.; HOWLAND, D. R.; ANDERSON, D. K. Chondroitin sulfate proteoglycan immunoreactivity increases following spinal cord injury and transplantation. *Exp. Neurol.*, v. 160, p. 51-65, 1999.

LETOURNEAU, P. C.; CONDIC, M. L.; SNOW, D. M. Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. *J. Neurosci.*, v. 14, p. 915-928, 1994.

LEVINE, A.; BASHAN-AHREND, A.; BUDAI-HADRIAN, O.; GARTENBERG, D.; MENASHEROW, S.; WIDES, R. Odd Oz: a novel *Drosophila* pair rule gene. *Cell*, v. 77, p. 587-598, 1994.

LIN, F.; CHEN, Z. Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 138, p. 1564-1577, 2014.

LÖER, B.; BAUER, R.; BORNHEIM, R.; GRELL, J.; KREMMER, E.; KOLANUS, W.; HOCH, M. The NHL-domain protein Wech is crucial for the integrin-cytoskeleton link. *Nat. Cell Biol.*, v. 10, p. 422-428, 2008.

LOGAN, A.; BERRY, M. Cellular and molecular determinants of glial scar formation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 513, p. 115-158, 2002.

LÖÖV, C.; SHEVCHENKO, G.; GEEYARPURAM NADADHUR, A.; CLAUSEN, F.; HILLERED, L.; WETTERHALL, M.; ERLANDSSON, A. Identification of injury specific proteins in a cell culture model of traumatic brain injury. *PLoS One*, v. 8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0055983.

LORINCZ, A.; NUSSER, Z. Specificity of immunoreactions: The importance of testing specificity in each method. *J. Neurosci.*, v. 28, p. 9083-9086, 2008.

LOSSIE, A. C.; NAKAMURA, H.; THOMAS, S. E.; JUSTICE, M. J. Mutation of 17Rn3 shows that Odz4 is required for mouse gastrulation. *Genetics*, v. 169, p. 285-299, 2005.

LOVEJOY, D. A. Structural evolution of urotensin-i: Reflections of life before corticotropin releasing factor. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 164, p. 15-19, 2009.

LOVEJOY, D. A.; AL CHAWAF, A.; CADINOUCHE, M. Z. Teneurin c-terminal associated peptides: An enigmatic family of neuropeptides with structural similarity to the corticotropin-releasing factor and calcitonin families of peptides. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 148, p. 299-305, 2006.

LOVEJOY, D. A.; ROTZINGER, S.; BARSYTE-LOVEJOY, D. Evolution of complementary peptide systems: Teneurin c-terminal-associated peptides and corticotropin-releasing factor superfamilies. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 1163, p. 215-220, 2009.

MANSOUR, H.; ASHER, R.; DAHL, D.; LABKOVSKY, B.; PERIDES, G.; BIGNAMI, A. Permissive and non-permissive reactive astrocytes: Immunofluorescence study with antibodies to the glial hyaluronate-binding protein. *J. Neurosci. Res.*, v. 25, p. 300-311, 1990.

MARAGAKIS N. J. e ROTHSTEIN J. D. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, v.2, p. 679-689, 2006.

MATHEWSON, A. J.; BERRY, M. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res.*, v. 327, p. 61-69, 1985.

MATYASH, V.; KETTENMANN, H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res. Rev.*, v. 63, p. 2-10, 2010.

MAXWELL, W. L.; FOLLOWS, R.; ASHHURST, D. E.; BERRY, M. The response of the cerebral hemisphere of the rat to injury. I. The mature rat. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.*, v. 328, p. 479-500, 1990a.

McGRAW, J.; HIEBERT, G. W.; STEEVES, J. D. Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J. Neurosci. Res.*, v. 63, p. 109-115, 2001.

McKEON, R. J.; SCHREIBER, R. C.; RUDGE, J. S.; SILVER, J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.*, v. 11, p. 3398-3411, 1991.

MERRILL, J. E.; BENVENISTE, E.N. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci.*, v. 19, p. 331-338, 1996.

METZGER, M.; BARTSCH, S.; BARTSCH, U.; BOCK, J.; SCHACHNER, M.; BRAUN, K. Regional and cellular distribution of the extracellular matrix protein tenascin-C in the chick forebrain and its role in neonatal learning. *Neuroscience*, v. 141, p. 1709–1719, 2006.

MILNER, R.; HUNG, S.; WANG, X.; BERG, G. I.; SPATZ, M.; del ZOPPO, G. J. Responses of endothelial cell and astrocyte matrix-integrin receptors to ischemia mimic those observed in the neurovascular unit. *Stroke*, v. 39, p. 191-197, 2008.

MINET, A. D.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Phylogenetic analysis of teneurin genes and comparison to the rearrangement hot spot elements of *e. Coli*. *Gene*, v. 257, p. 87-97, 2000.

MINET, A. D.; RUBIN, B. P.; TUCKER, R. P.; BAUMGARTNER, S.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurin-1, a vertebrate homologue of the drosophila pair-rule gene ten-m, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain. *J. Cell Sci.*, v. 112, p. 2019-2032, 1999.

MORSE, E. M.; BRAHME, N. N.; CALDERWOOD, D. A. Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry*, v. 53, p. 810-820, 2014.

MOSCA, T. J. On the Teneurin track: a new synaptic organization molecule emerges. *Front. Cell. Neurosci.* 9:204, 2015. DOI: 10.3389/fncel.2015.00204.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American.*, v. 262, p. 56–61, 1990.

NASH, B.; THOMSON, C. E.; LININGTON C.; ARTHUR, A.T.; MCCLURE, J.D.; MCBRIDE, M.W.; BARNETT, S. C. Functional duality of astrocytes in myelination, *J. Neurosci.*, v. 31, p. 13028–13038, 2011.

NEARY, J. T.; KANG, Y.; TRAN, M.; FELD, J. Traumatic injury activates protein kinase B/Akt in cultured astrocytes: role of extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J. Neurotrauma*, v. 22, p. 491-500, 2005.

NEARY, J.T.; KANG, Y.; WILLOUGHBY, K.A.; ELLIS, E.F. Activation of extracellular signal- regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J. Neurosci.*, v. 23, p. 2348–2356, 2003.

NICO, B.; FRIGERI, A.; NICCHIA, G. P.; CORSI, P.; RIBATTI, D.; QUONDAMATTEO, F.; HERKEN, R.; GIROLAMO, F.; MARZULLO, A.; SVELTO, M.;

RONCALI, L. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia*, v. 42, p. 235-251, 2003.

NUNES, S. M.; FERRALLI, J.; CHOI, K.; BROWN-LUEDI, M.; MINET, A. D.; CHIQUET-EHRISMANN, R. The intracellular domain of teneurin-1 interacts with mbd1 and cap/ponsin resulting in subcellular codistribution and translocation to the nuclear matrix. *Exp. Cell Res.*, v. 305, p. 122-132, 2005.

OKADA, S.; NAKAMURA, M.; KATOH, H.; MIYAO, T.; SHIMAZAKI, T.; ISHII, K.; YAMANE, J.; YOSHIMURA, A.; IWAMOTO, Y.; TOYAMA, Y.; OKANO, H. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat. Med.*, v. 12, p. 829–834, 2006.

OOHASHI, T.; ZHOU, X. H.; FENG, K.; RICHTER, B.; MÖRGELIN, M.; PEREZ, M. T.; SU, W. D.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; RAUCH, U.; FÄSSLER, R. Mouse ten-m/odz is a new family of dimeric type II transmembrane proteins expressed in many tissues. *J. Cell Biol.*, v. 145, p. 563-577, 1999.

O'SULLIVAN, M. L.; MARTINI, F.; von DAAKE, S.; COMOLETTI, D.; GHOSH, A. Lphn3, a presynaptic adhesion-gpcr implicated in adhd, regulates the strength of neocortical layer 2/3 synaptic input to layer 5. *Neural Dev.*, v. 9:7, 2014. DOI:10.1186/1749-8104-9-7.

OTAKI, J. M.; FIRESTEIN, S. Neurestin: Putative transmembrane molecule implicated in neuronal development. *Dev. Biol.*, v. 212, p. 165-181, 1999.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam: Elsevier, 2007.

PEKKNY, M.; JOHANSSON, C. B.; ELIASSON, C.; STAKEBERG, J.; WALLÉN, A.; PERLMANN, T.; LENDAHL, U.; BETSHOLTZ, C.; BERTHOLD, C. H.; FRISÉN, J. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J. Cell Biol.*, v. 145, p. 503–514, 1999.

PENG, H. B.; XIE, H.; ROSSI, S. G.; ROTUNDO, R. L. Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J. Cell. Biol.*, v. 145, p. 911 -921, 1999.

PILGRAM, G. S.; POTIKANOND, S.; BAINES, R. A.; FRADKIN, L. G.; NOORDERMEER, J. N. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Mol. Neurobiol.*, v. 41, p. 1-21, 2010.

PRIETO, A. L.; JONES, F. S.; CUNNINGHAM, B. A.; CROSSIN, K. L.; EDELMAN, G. M. Localization during development of alternatively spliced forms of cytotoxin mRNA by in situ hybridization. *J. Cell Biol.*, v. 111, p. 685–698, 1990.

QIAN, X.; BARSYTE-LOVEJOY, D.; WANG, L.; CHEWPOY, B.; GAUTAM, N.; AL CHAWAF, A.; LOVEJOY, D. A. Cloning and characterization of teneurin c-terminus associated peptide (tcap)-3 from the hypothalamus of an adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp. Endocrinol.*, v. 137, p. 205-216, 2004.

RAGHUPATHI, R.; MEHR, M. F.; HELFAER, M. A.; MARGULIES, S. S. Traumatic axonal injury is exacerbated following repetitive closed head injury in the neonatal pig. *J. Neurotrauma*, v. 21, p. 307-316, 2004.

RETTIG, W. J.; HOFFMAN, S.; SU, S. L.; GARIN-CHESA, P. Species diversity of neuronectin and cytotoxin expression patterns in the vertebrate central nervous system. *Brain Res.*, v. 590, p. 219-228, 1992.

RIDET, J. L.; MALHOTRA, S. K.; PRIVAT, A.; GAGE, F. H. Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.*, v. 20, p. 570–577, 1997.

ROBEL, S.; MORI, T.; ZOUBAA, S.; SCHLEGEL, J.; SIRKO, S.; FAISSNER, A.; GOEBBELS, S.; DIMOU, L.; GOTZ, M. Conditional deletion of beta1-integrin in astroglia causes partial reactive gliosis. *Glia*, v. 57, p. 1630–1647, 2009.

ROLLS, A.; SHECHTER, R.; SCHWARTZ, M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 10, p. 235–241, 2009.

RUBIN, B. P.; TUCKER, R. P.; MARTIN, D.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurins: A novel family of neuronal cell surface proteins in vertebrates, homologous to the *Drosophila* pair-rule gene product ten-m. *Dev. Biol.*, v. 216, p. 195-209, 1999.

RUBIN, B. P.; TUCKER, R.P.; BROWN-LUEDI, M.; MARTIN, D.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurin 2 is expressed by the neurons of the thalamofugal visual system in situ and promotes homophilic cell-cell adhesion in vitro. *Development*, v. 129, p. 4697-4705, 2002.

RUDGE, J. S.; SILVER, J. Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J. Neurosci.*, v. 10, p. 3594-3603, 1990.

RUOSLAHTI, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v. 12, p. 697-715, 1996.

RZIGALINSKI, B.A.; LIANG, S.; MCKINNEY, J.S.; WILLOUGHBY, K.A.; ELLIS, E.F. Effect of Ca²⁺ 960 on in vitro astrocyte injury. *J. Neurochem.*, v. 68, p. 289–296, 1997.

SAITO, F.; MOORE, S. A.; BARRESI, R.; HENRY, M. D.; MESSING, A.; ROSS-BARTA, S. E.; COHN, R. D.; WILLIAMSON, R. A.; SLUKA, K. A.; SHERMAN, D. L.; BROPHY, P. J.; SCHMELZER, J. D.; LOW, P. A.; WRABETZ, L.; FELTRI, M. L.; CAMPBELL, K. P. Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. *Neuron*, v. 38, p. 747-758, 2003.

SALMAN, H.; GHOSH, P.; KERNIE, S. G. Subventricular zone neural stem cells remodel the brain following traumatic injury in adult mice. *J. Neurotrauma*, v. 21, p. 283–292, 2004.

SANDVIG, A.; BERRY, M.; BARRETT, L. B.; BUTT, A.; LOGAN, A. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*, v. 46, p. 225-251, 2004.

SAPER, C. B. Image is everything. *J. Comp. Neurol.*, v. 412, p. 381-382, 1999.

SCHENK, M. P.; MANNING, R. J.; PAALMAN, M. H. Going digital: Image preparation for biomedical publishing. *Anat. Rec.*, v. 257, p. 128-36, 1999.

SCHÖLER, J.; FERRALLI, J.; THIRY, S.; CHIQUET-EHRISMANN, R. The intracellular domain of teneurin-1 induces the activity of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) by binding to transcriptional repressor HINT1. *J. Biol. Chem.*, v. 290, p. 8154-8165, 2015.

SCIANDRA, F.; BOZZI, M.; BIGOTTI, M. G.; BRANCACCIO, A. The multiple affinities of α -dystroglycan. *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 14, p. 626–634, 2013.

SERRANO-POZO, A.; MIELKE, M. L.; GÓMEZ-ISLA, T.; BETENSKY, R. A.; GROWDON, J. H.; FROSCH, M. P.; HYMAN, B. T. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, v. 179, p. 1373-1384, 2011.

SIBSON, N. R.; LOWE, J. P.; BLAMIRE, A. M.; MARTIN, M. J.; OBRENOVITCH, T. P.; ANTHONY, D. C. Acute astrocyte activation in brain detected by MRI: new insights into T(1) hypointensity. *J Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 28, p. 621–632, 2008.

SILVA, J. P.; LELIANOVA, V.G.; ERMOLYUK, Y.S.; VYSOKOV, N.; HITCHEN, P.G.; BERNINGHAUSEN O.; RAHMAN, M.A.; ZANGRANDI, A.; FIDALGO, S.; TONEVITSKY, A.G.; DELL, A.; VOLYNSKI, K.E.; USHKARYOV, Y.A. Latrophilin 1 and its endogenous ligand lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 108, p. 12113-12118, 2011.

SILVA, J. P.; USHKARYOV, Y. A. The latrophilins, “split personality” receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* v. 706, p. 59–75, 2010.

SILVER, J.; MILLER, J. H. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 5, p. 146-156, 2004.

SINGHAL, N.; MARTIN, P. T. Role of extracellular matrix proteins and their receptors in the development of the vertebrate neuromuscular junction. *Dev. Neurobiol.*, v. 71, p. 982-1005, 2011.

SNOW, D. M.; LEMMON, V.; CARRINO, D. A.; CAPLAN, A. I.; SILVER, J. Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.*, v. 109, p. 111-130, 1990.

SOFRONIEW, M. V. Astrogliosis. *Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.*, v. 7, 2014. DOI: 10.1101/cshperspect.a020420.

SOFRONIEW, M.V.; VINTERS, H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.*, v.119, p. 7–35, 2010.

SPENCE, H. J.; DHILLON, A. S.; JAMES, M.; WINDER, S. J. Dystroglycan, a scaffold for the ERK-MAP kinase cascade. *EMBO Rep.*, v. 5, p. 484-489, 2004.

STEINER, E.; ENZMANN, G. U.; LIN, S.; GHAVAMPOUR, S.; HANNOCKS, M. J.; ZUBER, B.; RÜEGG, M. A.; SOROKIN, L.; ENGELHARDT, B. Loss of astrocyte polarization upon transient focal brain ischemia as a possible mechanism to counteract early edema formation. *Glia*, v. 60, p. 1646-1659, 2012.

SUGITA, S.; SAITO, F.; TANG, J.; SATZ, J.; CAMPBELL, K.; SÜDHOF, T. C. A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *J. Cell Biol.*, v. 154, p. 435-445, 2001.

SUSARLA, B. T.; VILLAPOL, S.; YI, J. H.; GELLER, H. M.; SYMES, A. J. Temporal patterns of cortical proliferation of glial cell populations after traumatic brain injury in mice. *ASN Neuro.*, v. 6, p. 159-170, 2014.

SUZUKI, N.; FUKUSHI, M.; KOSAKI, K.; DOYLE, A. D.; DE VEGA, S.; YOSHIZAKI, K.; AKAZAWA, C.; ARIKAWA-HIRASAWA, E.; YAMADA, Y. Teneurin-4 is a novel regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination of small-diameter axons in the CNS. *J. Neurosci.*, v. 32, p. 11586-11599, 2012.

SUZUKI, N.; MIZUNIWA, C.; ISHII, K.; NAKAGAWA, Y.; TSUJI, K.; MUNETA, T.; SEKIYA, I.; AKAZAWA, C. Teneurin-4, a transmembrane protein, is a novel regulator that suppresses chondrogenic differentiation. *J. Orthop. Res.*, v. 32, p. 915-922, 2014.

SZABÓ, A.; KÁLMÁN, M. Post traumatic lesion absence of beta-dystroglycan-immunopositivity in brain vessels coincides with the glial reaction and the immunoreactivity of vascular laminin. *Curr. Neurovasc. Res.*, v. 5, p. 206-213, 2008.

TAN, L. A.; CHAND, D.; DE ALMEIDA, R.; XU, M.; DE LANNOY, L.; LOVEJOY, D. A. Modulation of neuroplastic changes and corticotropin-releasing factor-associated behavior by a phylogenetically ancient and conserved peptide family. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 176, p. 309-313, 2012.

TAN, L. A.; XU, K.; VACCARINO, F. J.; LOVEJOY, D. A.; ROTZINGER, S. Repeated intracerebral teneurin c-terminal associated peptide (tcap)-1 injections produce enduring changes in behavioral responses to corticotropin-releasing factor (crf) in rat models of anxiety. *Behav. Brain Res.*, v. 188, p. 195-200, 2008.

TAN, L. A.; XU, K.; VACCARINO, F. J.; LOVEJOY, D. A.; ROTZINGER, S. Teneurin c-terminal associated peptide (tcap)-1 attenuates corticotropin-releasing factor (crf)-induced c-fos expression in the limbic system and modulates anxiety behavior in male wistar rats. *Behav. Brain Res.*, v. 201, p. 198-206, 2009.

TIMARU-KAST, R.; HERBIG, E. L.; LUH, C.; ENGELHARD, K.; THAL, S. C. Influence of Age on Cerebral Housekeeping Gene Expression for Normalization of Quantitative Polymerase Chain Reaction after Acute Brain Injury in Mice. *J. Neurotrauma*, v. 32, p. 1777-1788, 2015.

TONGIORGI, E.; BERNHARDT, R. R.; ZINN, K.; SCHACHNER, M. Tenascin-C mRNA is expressed in cranial neural crest cells, in some placodal derivatives, and in discrete domains of the embryonic zebrafish brain. *J. Neurobiol.*, v. 28, p. 391-407, 1995.

TOPF, U.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Genetic interaction between *Caenorhabditis elegans* teneurin ten-1 and prolyl 4-hydroxylase phy-1 and their function in

collagen IV-mediated basement membrane integrity during late elongation of the embryo. *Mol. Biol. Cell*, v. 22, p. 3331-3343, 2011.

TRELOAR, H. B.; RAY, A.; DINGLASAN, L. A.; SCHACHNER, M.; GREER, C. A. Tenascin-C is an inhibitory boundary molecule in the developing olfactory bulb. *J. Neurosci.*, v. 29, p. 9405–9416, 2009.

TRZEBIATOWSKA, A.; TOPF, U.; SAUDER, U.; DRABIKOWSKI, K.; CHIQUET-EHRISMANN, R. *Caenorhabditis elegans* teneurin, ten-1, is required for gonadal and pharyngeal basement membrane integrity and acts redundantly with integrin ina-1 and dystroglycan dgn-1. *Mol. Biol. Cell*, v. 19, p. 3898-3908, 2008.

TUCKER, R. P.; BRUNSO-BECHTOLD, J. K.; JENRATH, D. A.; KHAN, N. A.; POSS, P. M.; SWEATT, A. J.; XU, Y. Cellular origins of tenascin in the developing nervous system. *Perspect. Dev. Neurobiol.*, v. 2, p. 89–99, 1994.

TUCKER, R. P.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurins: A conserved family of transmembrane proteins involved in intercellular signaling during development. *Dev. Biol.*, v. 290, p. 237-245, 2006.

TUCKER, R. P.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; CHEVRON, M. P.; MARTIN, D.; HALL, R. J.; RUBIN, B. P. Teneurin-2 is expressed in tissues that regulate limb and somite pattern formation and is induced in vitro and in situ by FGF8. *Dev. Dyn.*, v. 220, p. 27-39, 2001.

TUCKER, R. P.; KENZELMANN, D.; TRZEBIATOWSKA, A.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurins: Transmembrane proteins with fundamental roles in development. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, v. 39, p. 292-7, 2007.

TUCKER, R., P.; CHIQUET-EHRISMANN, RUTH. Tenascin-C: Its functions as an integrin ligand. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 65, p. 165-168, 2015.

VERDERIO, C.; MATTEOLI, M. ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN-gamma. *J. Immunol.*, v. 166, p. 6383–6391, 2001.

VIK, A.; YATHAM, L. N. Calcitonin and bipolar disorder: A hypothesis revisited. *J Psychiatry Neurosci.*, v. 23, p. 109-17, 1998.

WANG, L.; ROTZINGER, S.; AL CHAWAF, A.; ELIAS, C. F.; BARSYTE-LOVEJOY, D.; QIAN, X.; WANG, N. C.; DE CRISTOFARO, A.; BELSHAM, D.; BITTENCOURT, J. C.; VACCARINO, F.; LOVEJOY, D. A. Teneurin proteins possess a

carboxy terminal sequence with neuromodulatory activity. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, v. 133, p. 253-265, 2005.

WICKSTRÖM, S. A.; FÄSSLER, R. Regulation of membrane traffic by integrin signaling. *Trends Cell Biol.*, v. 21, p. 266-273, 2011.

WINDLE, W. F. Regeneration of axons in the vertebrate central nervous system. *Physiol. Rev.*, v. 36, p. 427-440, 1956.

WOELFLE, R.; D'AQUILA, A. L.; PAVLOVIĆ, T.; HUSIĆ, M.; LOVEJOY, D. A. Ancient interaction between the teneurin C-terminal associated peptides (TCAP) and latrophilin ligand-receptor coupling: a role in behavior. *Front. Neurosci.* v. 9, 2015. DOI: 10.3389/fnins.2015.00146.

YOUNG, T. R.; LEAMEY, C. A. Teneurins: Important regulators of neural circuitry. *Int J. Biochem. Cell Biol.*, v. 41, p. 990-993, 2009.

YUASA, S. Bergmann glial development in the mouse cerebellum as revealed by tenascin expression. *Anat. Embryol. (Berl.)*, v. 194, p. 223–230, 1996.

ZACCARIA, M. L.; PERRONE-CAPANO, C.; MELUCCI-VIGO, G.; GAETA, L.; PETRUCCI, T. C.; PAGGI, P. Differential regulation of transcripts for dystrophin Isoforms, dystroglycan, and alpha3AChR subunit in mouse sympathetic ganglia following postganglionic nerve crush. *Neurobiol. Dis.*, v. 8, p. 513-524, 2001.

ZIEGLER, A.; CORVALÁN, A.; ROA, I.; BRAÑES, J. A.; WOLLSCHIED, B. Teneurin protein family: an emerging role in human tumorigenesis and drug resistance. *Cancer Lett.*, v. 326, p. 1-7, 2012.

ZHOU, X. H.; BRANDAU, O.; FENG, K.; OOHASHI, T.; NINOMIYA, Y.; RAUCH, U.; FÄSSLER, R. The murine ten-m/odz genes show distinct but overlapping expression patterns during development and in adult brain. *Gene Expr. Patterns*, v. 3, p. 397-405, 2003.

9. Apêndice



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



FLS. 55
PROD. 318/15
RUB. *[Handwritten]*

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação das teneurinas (TENS) e das latrofilinas (LPHNs) no sistema nervoso central após lesão traumática em ratos adultos**", Processo FOA nº 2015-00318, sob responsabilidade de Claudio Aparecido Casatti apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 25 de março de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 06 de Abril de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 06 de Maio de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of teneurins (TENS) and latrophilins (LPHNs) in central nervous system of adult rats after traumatic injury**", Protocol FOA nº 2015-00318, under the supervision of Cláudio Aparecido Casatti presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 25, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 06, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 06, 2017.

[Handwritten Signature]
Profa. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator