



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

ISABELLA ZACARIN GUIATI

**“Identificação dos membros da família das teneurinas em órgãos de primatas
não-humanos e roedores”**

**Araçatuba – SP
2015**

ISABELLA ZACARIN GUIATI

**“Identificação dos membros da família das teneurinas em órgãos de primatas
não-humanos e roedores”**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do
título de Bacharel em
Odontologia.
Orientador: Prof. Dr. Cláudio
Aparecido Casatti

**Araçatuba – SP
2015**

Dedicatória

A Mariana Zacarin Guiati, minha irmã, por ser nos últimos 17 anos a razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar o maravilhoso dom da vida e iluminar meus caminhos todos os dias. Agradeço por minha saúde, minha família e por todas as oportunidades que me foram concedidas. Obrigada Pai, pela força e garra para continuar lutando todos os dias.

Aos meus pais, Luzia Marcia Zacarin Guiati e Ailton Álvaro Guiati, por toda a dedicação e paciência destinadas a mim durante todos esses anos. Obrigada pela oportunidade de poder me dedicar aos estudos aos quais vocês não puderam, mas me ensinaram a importância desde muito cedo. Prometo honrar todo o esforço e suor de vocês durante toda a minha vida profissional e pessoal.

A minha irmã, Mariana Zacarin Guiati, flor da minha vida. Sem você, esse mundo não faria o menor sentido. Obrigada por todo o amor, a parceria, todas as risadas e por tudo que compartilhamos todos os dias. Não existe pessoa nesse mundo que eu ame tanto quanto amo você.

Ao meu orientador, Cláudio Aparecido Casatti, por toda a paciência, ajuda e até mesmo pelos conselhos e piadas. O senhor não é apenas um grande professor, ou um grande orientador, mas também um grande homem. Agradeço também a equipe de professores da disciplina de Histologia e Embriologia por sempre terem me recebido tão bem, obrigada por todo o carinho e pelo auxílio, tanto nas atividades relacionadas à graduação, quanto à iniciação científica e até mesmo relacionadas à monitoria realizada na disciplina. Muito obrigada!

A todos os professores que em todos esses anos se dedicaram a nossa formação, não só como alunos, cirurgiões-dentistas, mas também como pessoas melhores. Em especial, agradeço de coração a todos os professores do departamento de Ciências Básicas por sempre terem feito com que eu me sentisse em casa em todos esses anos.

A doutoranda Kelly Regina Torres da Silva, seu marido André da Silva e o mestrando Gestter Willian Tessarin, por toda a imensa paciência e toda a ajuda em todos esses anos. Obrigada por todas as dicas e experiências passadas. Se não fossem vocês, esse TCC não estaria pronto.

A todos os servidores do departamento de Ciências Básicas, que contribuíram imensamente para a realização de nossas pesquisas.

A toda a minha família, avós, avôs, tios, tias, primos, primas. Em especial, agradeço minha madrinha Sueli Fátima Zacarin por todo o apoio, em todos os aspectos, e ao meu primo/irmão Diego Zacarin, pela grande parceria de vida.

A todos os meus amigos da universidade, em especial a minha querida Camila Ambrósio Dias, por todos esses dias compartilhados, todas as clínicas, os dias compridos no laboratório, até mesmo os fins de semana de trabalho. Poucas pessoas nesse mundo são tão boas quanto você. E a Érica Araújo de Oliveira, por todos os dias inesquecíveis que vivemos juntas durante esses cinco anos.

A todos os meus amigos que me acompanham desde a infância, em especial a minha primeira amiga, Milena Bacanelli, por todo o seu esforço para se manter próxima ainda que a 2000 km de distância, por toda a compreensão, carinho e zelo comigo. Agradeço também a Beatriz Leão por ter se aproximado exatamente quando a maioria se afastou. Fica aqui meu muito obrigada.

Agradeço também aos meus amigos Heitor Espicalquis Baptista e Rodrigo Aguiar Pagani, por todas as risadas que sempre deixaram a vida mais leve, Douglas Xavier, por toda a parceria e cuidado comigo e em especial, o meu querido Caio César Fernandes Disposti, por nunca me deixar desanimar e estar comigo em todos os momentos, bons ou ruins, e por nesse ano de 2015, ter mostrado para o mundo que a frase que sempre usou “Vá e vença”, nunca foi algo vão. Desde o primeiro dia eu sabia que você sairia dessa, muito obrigada por não desistir, minha vida não seria a mesma sem você comigo.

A minha melhor amiga, Daniela Scatamburlo Denadai, o meu muito obrigada. Obrigada por todos os momentos que vivemos, por todo o carinho, apoio e dedicação a nossa amizade. Obrigada por ouvir histórias odontológicas durante esses cinco anos, ainda que não tenha entendido nada. Obrigada por toda a irmandade. Te amo.

Não posso finalizar esses agradecimentos sem agradecer ao ano de 2015, queria agradecer ao ano de 2015 pela grande lição que me deu. Achamos que nossos problemas são grandes até nos depararmos com algo realmente assustador. Nesse ano descobri dentro de mim uma força que eu não sabia que tinha, aprendi a ter paciência e a crer quando tudo parece perdido, a ser forte para fortalecer um alguém que precisava de mim, a manter a coragem pulsando quando se está cheio de medo. Quase perder alguém próximo faz com que repensemos o quanto somos pequenos e voláteis, somos como uma folha, que o vento leva com um sopro em questão de segundos. Faz pensar o quanto somos egoístas e pequenos, e o quanto tudo isso é tão maior que a nossa pequenez humana. Obrigada 2015 por ter me dado essa rasteira, por ter me ensinado a esperar sem ao menos saber o que, logo eu, que nunca tive paciência nem para esperar o miojo ficar pronto. Saio de 2015 aliviada e agradecida, e com a certeza de que nada dessa vida fica, além daquilo que fazemos por quem amamos.

Ao O Núcleo de Procriação de Macacos-Prego, da Faculdade de Odontologia da Unesp (Universidade Estadual Paulista) de Araçatuba e ao professor José Américo de Oliveira pela disponibilização dos animais necessários para este projeto de pesquisa.

Ao Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela disponibilização dos animais necessários para este projeto de pesquisa.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociência de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pelo auxílio na aquisição das imagens obtidas em microscopia confocal.

A FAPESP(Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica sob o processo Nº 2013/01288-8, tornando possível a realização desse projeto.

**“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”**

Fernando Pessoa

GUIATI, I. Z. “**Identificação dos membros da família das teneurinas em órgãos de primatas não-humanos e roedores**”. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

As teneurinas (TENS) são compostas por quatro membros (teneurina 1 a 4) e foram descritas inicialmente em mamíferos. Esta família de proteínas apresenta expressão preferencialmente no sistema nervoso central e está conservada ao longo das espécies. Basicamente, as teneurinas são expressas principalmente durante a morfogênese em diferentes órgãos e tecidos, em especial durante a neurogênese. O objetivo do presente trabalho foi analisar e comparar a distribuição dos membros da família das TENS em tecidos e órgãos de roedores e primatas não-humanos (*Sapajus apella*) adultos, através da técnica de imuno-histoquímica, sendo que, a expressão gênica em alguns órgãos foi confirmada através do método convencional de RT-PCR. Os principais resultados mostraram que inúmeros tipos celulares apresentaram imunorreatividade a TENS em todos os sistemas estudados (endócrino, digestório, respiratório, circulatório, urinário e reprodutor). A imunorreatividade as TENS não estava restrita apenas a membrana celular, mas também mostrou distribuição homogênea em todo o citosol. A imunorreatividade a TEN3 mostrou-se conspícua, similar a um sistema peptidérgico neuroendócrino, sendo notadas células imunorreativas na região medular da adrenal, células neuroendócrinas do estômago e intestino, células parafoliculares da tireoide, adeno-hipófise, plexos mioentérico e submucoso do sistema digestório tanto em ratos como na espécie *Sapajus*, com exceção da marcação na membrana plasmática do sistema respiratório. A imunorreatividade a TEN1 mostrou-se homogênea nas células das ilhotas de Langerhans do pâncreas e punctiforme no citosol das células acinares do mesmo; enquanto, esta imunorreatividade mostrou-se restrita a determinados domínios das membranas plasmáticas das células do sistema respiratório e na região do centro celular das células absorptivas do intestino delgado. As imunorreatividades a TEN2 e 4 foram mais restritas, sendo interessante destacar a imunorreatividade a TEN2 na membrana celular do epitélio dos tratores respiratório e urinário, parte distal do epitélio do epidídimo e dispersa no citosol das células da região medular da adrenal em ambas as espécies de animais; enquanto a imunorreatividade a TEN4 estava presente em fibras nervosas pré-ganglionares do plexo

mioentérico, ilhotas de Langerhans, parte intermedia da hipófise e epitélio do trato respiratório. Alguns órgãos foram analisados quanto a expressão das TENS através do método convencional do RT-PCR, confirmando a maior parte dos achados imuno-histoquímicos.

Baseado nos dados imuno-histoquímicos e da expressão gênica, pode ser concluído que o sistema neuropeptidérgico das TENS apresenta distribuição extensiva em órgãos e tecidos de roedores, sendo conservada em primatas não-humanos (*Sapajus apella*). Inúmeros estudos serão necessários para substanciar possíveis aspectos funcionais destas proteínas, seja como uma proteína transmembrana, agindo na interação intercelular, ou como uma proteína secretora de ação autócrina, parácrina e/ou endócrina.

Palavras-chave: Ratos. Imuno-histoquímica. Órgãos.

GUIATI, I. Z. **“Teneurin identification in tissue and organs of non-human primates and rodents”**. 2015. 55 f. Final course assignment (Bachelor) – School of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

Teneurins are transmembrane proteins constituted by four homologous (TEN1-4) that are expressed preferentially in the central nervous system, during neurogenesis in invertebrates and vertebrates. However, studies on TEN expressions in non-neuronal tissue and organs are scarce and restricted to genic and protein databases, without detailed analysis. The purpose of the present study was to analyze and compare the distribution of TEN family members in tissues and organs of non-human primates (*Sapajus apella*) and adult rodents by immunohistochemical technique. In addition, genic expression analysis was performed in some organs to confirm the immunohistochemical data. The main results showed that several cell types are immunoreactive to TENs in all analyzed systems (endocrine, digestive, urinary, circulatory, reproductive and respiratory). This immunoreactivity was not restricted to cell membrane, but it was homogenously distributed in the cell cytosol. TEN3 immunoreactivity was the most interesting, as it was similar to a neuroendocrine peptidergic system, exhibiting immunoreactive cells in the adrenal medulla, neuroendocrine cells from epithelium layer of the digestive tract, thyroid parafollicular cells, adenohypophysis, myenteric and submucosal plexuses of digestive tract in rats and non-human primates. TEN3 immunoreactivity was present in the cell membrane only in the respiratory tract. TEN1 immunoreactivity was homogenous in islet of Langerhans and punctiform in acinar cells of the exocrine pancreas. TEN1 immunoreactivity was restricted to certain domains of the cell membrane in the epithelium layer of respiratory and digestive tracts. TEN2 and TEN4 immunoreactivities were more discrete, with interesting data for TEN2 immunoreactivity present in cell membrane of respiratory, urinary and distal part of the epididymis and some immunoreactivity in the adrenal medulla in rats and non-human primates. TEN4 immunoreactivity was only present in preganglionic nerve fibers in the myenteric plexus of digestive tract, islet of Langerhans, intermediate part of hypophysis and in the epithelium layer of respiratory tract. Some organs were analyzed through conventional RT-PCR, confirming the immunohistochemical data.

Based on immunohistochemical and genic expression, it can be concluded that the neuropeptidergic system of the teneurins showed extensive distribution in tissue and organs of rats and it is conserved in non-human primates. Several future studies in the endocrine, respiratory, urinary, digestive, reproductive, circulatory and immunological systems are necessary to support and add physiological data on teneurins, given that they are not only acting as transmembrane proteins, but they are playing an additional role, similar to that of the autocrine, paracrine and endocrine signal system.

Keywords: Rats. Immunohistochemical. Órgãos.

LISTA DE FIGURAS

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

1

Figura 2. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN1 no pâncreas (A-B), duodeno (D) e traqueia (E) do rato Wistar e no duodeno do Sapajus

17

Figura 3. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN2 no pulmão e estômago do Sapajus e no estômago, epídimo e adrenal do rato Wistar.

18

Figura 4. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 no pâncreas do rato (A-A') e a ausência de imunorreatividade nas reações controle através da omissão do anticorpo primário (B-B') e no teste de adsorção (C-C').

19

Figura 5. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 na adrenal do Sapajus (A-A') e do rato (B-B') e ausência de imunorreatividade nas reações controle através da omissão do anticorpo primário (C-C') e no teste de adsorção (D-D').

20

Figura 6. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 no estômago (A-A') e duodeno do Sapajus (B-B') e no estômago do rato (C-C') e ausência de imunorreatividade nas reações controle através do teste de adsorção (D-D').

21

Figura 7. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 na hipófise do Sapajus (A-A' e B-B') e ausência de imunorreatividade nas reações controle através do teste de adsorção (C-C').

22

Figura 8. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 no testículo do Sapajus (A-A' e B-B').

23

Figura 9. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 nos plexo nervoso mioentérico (A-A') e submucoso (B-B'), além da ausência de imunorreatividade na reação controle através do teste de adsorção (C-C').

24

Figura 10. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 no pulmão, em particular no epitélio de revestimento dos brônquios e bronquíolos do Sapajus (A-A') (B-B'), além da ausência de imunorreatividade na reação controle através do teste de adsorção (C-C').

25

Figura 11. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN3 na glândula tireoide (A), medular da adrenal (B), ilhota de Langerhans (C), estômago (D) e duodeno (E-F) do rato Wistar.

26

Figura 12. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN3 na adeno-hipófise (A), parte intermédia da hipófise (B), medular da adrenal (C), plexo mioentérico do estômago (D) e duodeno (E-F) do Sapajus.

27

Figura 13. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN4 nas ilhotas de Langerhans do pâncreas do Rato Wistar.

28

Figura 14. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para as TENs (TEN1-4) no rim do Sapajus e do rato Wistar.

29

Figura 15. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN1 em tecidos e órgãos de ratos Wistar, através do método da imunoperoxidase indireta.

32

Figura 16. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN1 em tecidos e órgãos de ratos Wistar, através do método da imunoperoxidase indireta.

33

Figura 17. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN1 em tecidos e órgãos de ratos Wistar, através do método da imunoperoxidase indireta.

34

Figura 18. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN2 em tecidos e órgãos de ratos Wistar, através do método da imunoperoxidase indireta.

35

Figura 19. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN3 em tecidos e órgãos de ratos Wistar, através do método da imunoperoxidase indireta.

36

Figura 20. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN4 em tecidos e órgãos de ratos Wistar, através do método da imunoperoxidase indireta.

37

Figura 21. Gel de agarose mostrando os produtos de amplificação do RT-PCR convencional obtidos pelo uso de primers para TENS/TCAPS e beta-actina e RNA total extraído do coração (A), Traquéia (B) e hipocampo (C) de ratos Wistar.

39

Figura 22. Gel de agarose mostrando os produtos de amplificação do RT-PCR convencional obtidos pelo uso de primers para TENS/TCAPS e beta-actina e RNA total extraído do rim (A), ovário (B) e epidídimo superior(C) de ratos Wistar.

40

Figura 23. Gel de agarose mostrando os produtos de amplificação do RT-PCR convencional obtidos pelo uso de primers para TENS/TCAPS e beta-actina e RNA total extraído do testículo (A), linfonodo (B) de ratos Wistar.

41

LISTA DE ABREVIATURAS

TEN = Teneurina

TEN1 = Teneurina 1

TEN2 = Teneurina 2

TEN3 = Teneurina 3

TEN4 = Teneurina 4

SNC = Sistema Nervoso Central

RGC = Células Ganglionares da Retina

PB = Pares de Base

Base C = Base Citosina

Base T = Base Timina

Base G = Base Guanina

Base A = Base Adenina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	5
3.1 ANIMAIS	5
3.2 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	6
3.2.1. MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	6
3.2.2 MÉTODO DE IMUNOPEROXIDASE INDIRETA.....	7
3.2.3. REAÇÕES CONTROLE – IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	9
3.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA	10
3.4 RT-PCR CONVENCIONAL	11
3.4.1 CONFEÇÃO DOS PRIMERS	11
3.4.2 EXTRAÇÃO DE RNA.....	12
3.4.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA E AMPLIFICAÇÃO GÊNICA	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1. ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	15
4.2. RT-PCR CONVENCIONAL	38
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ANEXOS:	49

1. INTRODUÇÃO

As teneurinas (TENSs) são uma família de proteínas transmembrana composta por quatro membros (teneurina 1 a 4) e descrita inicialmente em mamíferos em 1999. As TENSs são classificadas como proteínas transmembrana do tipo II por apresentarem terminal carboxila e amino com orientação extracelular e intracelular, respectivamente (figura 1). Entre as funções atribuídas as TENSs podemos citar a participação na interação homofílica entre células, orientação axonal, proliferação celular e regulação da transcrição gênica (Rubin, 2002; Rubin et al., 2002; Bagutti et al., 2003; Nunes et al., 2005; Tucker e Chiquet-Ehrismann, 2006; Kinel-Tahan, 2007; Leamey, 2008; Young and Leamey, 2009). Esta regulação gênica é possível uma vez que as TENSs possuem domínios intracelulares que são clivados frente a estímulos extracelulares, comportando-se como fatores de transcrição para outros genes (Bagutti et al., 2003; Nunes et al., 2005). Assim sendo, o domínio intracelular da teneurina pode interagir com componentes do citoesqueleto através de sua interação com uma proteína adaptadora denominada de CAP/ponsina, proteína citoplasmática que se liga ao citoesqueleto durante a interação intercelular (Nunes et al., 2005). Em prosseguimento, o domínio intracelular da teneurina sofre proteólise e interage com uma segunda classe de proteínas ligantes citoplasmáticas de ação nuclear denominadas de MBD1 (proteína 1 com domínio para ligação metil-CpG nuclear) ou zic (“zinc-finger transcription factor”), as quais têm atividade regulatória da transcrição gênica (Bagutti et al., 2003; Nunes et al., 2005).

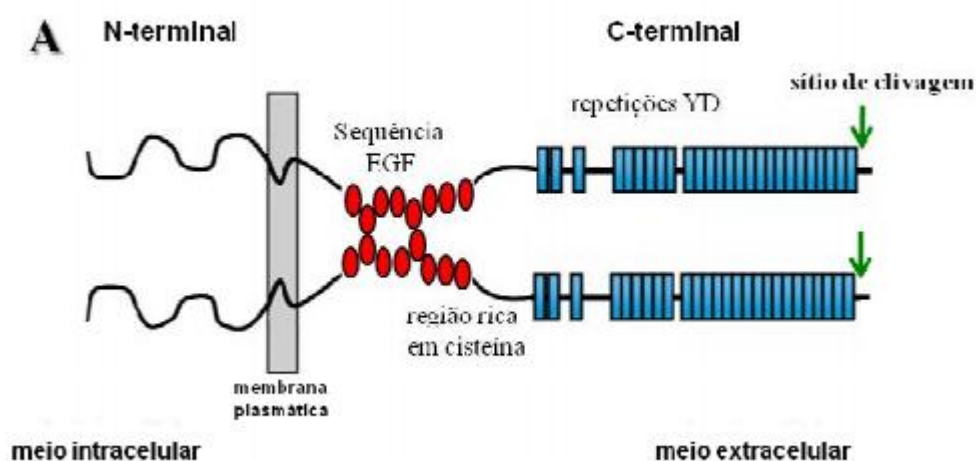


Figura 1. Modelo estrutural esquemático das proteínas teneurinas ilustrando a constituição e a organização dimérica (Ilustração extraída e adaptada de Lovejoy et al., 2006).

O gene da teneurina tem sido sequenciado e quatro homólogos têm sido caracterizados em vertebrados, assim como seus respectivos transcritos, denominados de TEN1, TEN2, TEN3 e TEN4 (Tucker e Chiquet-Ehrismann, 2006). Um dado interessante é que o gene da TEN1 está localizado na região Xq25, envolvida na Síndrome do X-frágil (Buervenich et al., 2001). Além disso, outras anormalidades mentais associadas a malformações faciais e dos membros têm sido mostradas em translocações e trissomias envolvendo o locus 5q34 que aloja o gene da TEN2 (Vik e Yatham, 1998 ; Dubovsky et al., 1994). Estes dados sugerem importante papel funcional desta família no que se refere à neurogênese e organogênese. Porém, é notado que a maioria dos trabalhos de distribuição das TENS destacam a sua distribuição no sistema nervoso central (SNC) que é o maior sítio de expressão; todavia, alguns trabalhos citam a distribuição em tecidos não-neuronais como coração, testículo, rim, fígado, timo, intestino, pulmão e baço, sendo estes dados advindos da análise da expressão proteica e são pouco explorados (Rubin et al., 1999, 2002; Minet et al., 1999; Oohashi et al., 1999; Ben-Zur et al., 2000; Tucker et al., 2001; Zhou et al., 2003). Esta participação no desenvolvimento de tecidos não neuronais foi evidenciada em embriões de camundongos mutantes para TEN4 nos quais foram verificados defeitos no padrão de formação, sobrevivência e proliferação celular durante a formação do tubo neural e organogênese (Lossie et al., 2005). Oohashi e colaboradores em 1999 avaliaram a distribuição dos membros da família das TENS em camundongos após 7 semanas de vida através da técnica de “Northern Blot” (Oohashi et al., 1999). Neste estudo foi verificado entre os resultados que a expressão do RNAm para TEN 1 foi acentuada nos rins e testículos, sendo nestes órgãos pouco expresso o RNAm da TEN 2. Porém, quanto a distribuição do RNAm das TEN 3 e TEN 4 foi notado que estes se encontram no fígado e testículo sendo verificado que a TEN 4 também foi expressa nos rins, musculatura esquelética, baço e timo. Neste mesmo trabalho foi verificada a localização *in situ* do RNAm para TEN1 nas células musculares lisas das artérias, brônquios e veias do pulmão, assim como a presença deste RNAm nos glomérulos renais e espermátides dos túbulos seminíferos do testículo. Estes resultados sugerem que as TENS, além de possuírem importante papel durante o desenvolvimento embrionário, estão presentes em tecidos de animais adultos jovens possivelmente atuando na manutenção da interação celular (Oohashi et al., 1999; Ben-Zur et al 2000; Tucker et al., 2000, 2001, 2007; Lossie et al., 2005).

Recentemente, um estudo relatou a distribuição morfológica e possível função das teneurinas em diversos tecidos. Em particular, no aparelho reprodutor de roedores machos foi encontrada imunorreatividade a TEN1 nas camadas do túbulo seminífero e dos túbulos que

compõe o epidídimo (Chand et al., 2013). Interessantemente, neste mesmo estudo utilizando-se da administração intravenosa (nove dias) de um peptídeo oriundo do terminal carboxila da TEN1, denominado de TCAP-1, foi induzido um aumento significativo das dimensões dos testículos, túbulos seminíferos e epididimários. Estes dados sugerem que os sistemas peptidérgicos das TEN1/TCAP-1 possam ter um papel amplo na regulação da morfologia e função gonadal de ratos adultos (Chand et al., 2013).

Outro estudo recente relata a distribuição e função da TEN3 na retina de peixes (Antinucci et al., 2013). Neste estudo foi mostrado que a TEN3 é necessária para que ocorra a formação de conexões morfológicas e funcionais nas células ganglionares da retina, afirmando também que a TEN3 desempenha um papel importante na formação e função do sistema visual de vertebrados (Antinucci et al., 2013). Estes achados na via visual foram subsidiados com um estudo recente que demonstrou que a TEN3 influencia nas projeções ipsilaterais do núcleo geniculado lateral tendo papel de apoio no mapeamento binocular. (Carr et al., 2014).

Além dos trabalhos citarem a presença das teneurinas nos órgãos e tecidos não neuronais em condições de normalidade, há também indícios da expressão alterada das teneurinas em tecidos tumorais (Ziegler et al., 2012). No câncer de esôfago, por exemplo, a expressão de TEN2 é menor do que no tecido esofágico sadio. O mesmo acontece com a TEN4 durante o carcinoma renal, reforçando o importante papel das TENs durante a interação e proliferação celular (Ziegler et al., 2012).

Recentemente foi demonstrado que a TEN4 inibe a diferenciação condrogênica e regula a expressão e ativação de moléculas importantes no processo de condrogênese. (Suzuki et al., 2014).

2. OBJETIVOS

O propósito do presente estudo foi analisar a distribuição das teneurinas em tecidos e órgãos de ratos e de primatas não-humanos (*Sapajus spp*) através do método de imunohistoquímica (imunoperoxidase e imunofluorescência indireta). Além disso, alguns órgãos foram analisados através do método convencional do RT-PCR para verificar a possível expressão gênica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Vale ressaltar que todos os protocolos experimentais foram avaliados e aprovados pelo comitê de ética (Ver em anexos).

Primata não-humano (*Sapajus apella*)

Os órgãos utilizados neste projeto foram obtidos em 2008 de macacos machos adultos jovens da espécie *Sapajus apella* (n=3) com peso aproximado de 2.200 a 2.700 g. O fornecimento para pesquisa desses animais foi fiscalizado e orientado segundo normas e procedimentos do Núcleo de Procriação de Macacos-prego associado ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia – UNESP, Campus de Araçatuba, segundo a portaria 016/94 do IBAMA, de 04 de abril de 1995. Ressaltamos que este material foi removido para a realização de projetos anteriores e foi adequadamente armazenado em sistema de congelação no setor de Morfologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP sob responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio A. Casatti.

O protocolo de sacrifício dos animais ocorreu da seguinte maneira: os animais foram tranquilizados com injeção intramuscular de cloridrato de ketamina (10 mg/ml) seguido de anestesia profunda pela injeção intraperitoneal de tiopental sódico (Thionembital®). Em seguida os procedimentos de fixação e preparo histológico do tecido seguiram os protocolos estabelecidos para macacos (Rosene et al., 1986). Os animais foram perfundidos através da parte ascendente da aorta por punção cardíaca, primeiramente com solução salina (0,9%) e em seguida com soluções fixadoras: formaldeído 4% preparado em tampão acetato 0,1 M (pH 6.5) e formaldeído a 4% em tampão tetraborato de sódio 0,1M (pH 9.5). Em sequência foi feita a remoção dos órgãos: coração (átrio e ventrículo), testículo, fígado, duodeno, adrenal, estômago, rim e baço os quais foram pós-fixados em solução fixadora constituída de formaldeído a 4% em tampão tetraborato de sódio

0,1M (pH 9.5) por 1 semana. Em seguida os órgãos foram incluídos em material crioprotetor (“tissue teck®”) e armazenados a -80°C.

Rattus norvegicus

Foram utilizados órgãos obtidos de ratos Wistar (n=5) pesando 280-300g. Estes animais foram, obtidos do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP e mantidos em gaiolas individuais sob condições de ciclo claro-escuro de 12-12 horas, temperatura ambiente de 22 ± 2 °C e com acesso livre a água e ração. Os animais foram submetidos ao seguinte protocolo de sacrifício: anestesia via intramuscular com cloridrato de cetamina (80mg /Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil) e submetidos a perfusão transcardíaca com salina 0,9% heparinizada, seguida de solução fixadora a 4°C constituída de 4% de formaldeído (Sigma, Saint Louis, MO, USA) em 0,1 M de tampão tetraborato de sódio 3,8% (Sigma, Saint Louis, MO, USA) (pH 9,5). Após a perfusão foram removidos os seguintes órgãos: coração (átrio e ventrículo), testículo, fígado, duodeno, adrenal, estômago, rim e baço e pós-fixados por imersão em solução fixadora de formaldeído a 4% por 3 dias. Em seguida os órgãos foram incluídos em material crioprotetor e armazenados a -86°C.

3.2 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Após a manipulação e sacrifício dos animais, os cortes histológicos em parafina (5 µm de espessura) de tecidos e órgãos de primatas e roedores foram submetidos ao método de imunofluorescência e imunoperoxidase indireta.

3.2.1. MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Inicialmente os cortes histológicos das amostras incluídas em parafina obtidos em micrótomo foram montados em lâminas e submetidos às seguintes etapas: A) Desparafinização, os cortes histológicos montados em lâminas foram mantidos em estufa por um período de 30 minutos a 56°C e, submetidos a uma sequência de banhos em xilol I-III, durante cinco minutos cada passagem; B) Desidratação, álcool 100% por dois minutos, álcool 95% por dois minutos e álcool 70% por dois minutos. C) Lavagens, seguiu-se uma sequência de três lavagens em PBS (0,1M, pH

7,4), PBS/Triton (PBS 0,1M acrescido de 0,03% de triton X-100), seguido por PBS 0,1M, durante cinco minutos cada passagem; D) Recuperação antigênica, os cortes em lâminas foram tratados em calor úmido em câmara pressurizada (Decloaking Chamber – Biocare Medical, CA, USA), empregando solução de 1% de tampão citrato (100x Citrate Buffer, pH=6,0, Spring Bioscience, CA, USA); E) Resfriamento: os recipientes foram retirados da câmara pressurizada e passaram por resfriamento em temperatura ambiente por um período de uma hora e trinta minutos; F) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; G) Bloqueio das marcações inespecíficas, através da incubação dos cortes em PBS/Triton, acrescido de 5% de leite em pó desnatado, durante duas horas em temperatura ambiente; H) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; I) Bloqueio das marcações inespecíficas, através da incubação dos cortes em PBS/Triton, acrescido de BSA (albumina de soro bovina, SIGMA, CA, USA), durante 2 horas. J) incubação em anticorpo primário (TEN1, 1:100, ABNO-H00010178-A01, ABNOVA, Taipei, Taiwan/ TEN2, 1:100, sc-165674, N-13, Santa Cruz Biotechnology CA, USA/ TEN3, 1:250, sc-136918, P-12, CA, USA/ TEN4, 1:500, sc-134883, H-50), durante 24 horas a 4°C; K) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; L) Incubação em anticorpo secundário biotinilado (1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluído em PBS/Triton, durante uma hora a temperatura ambiente; M) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; N) incubação em Cy3-Estreptavidina (1:500, Jackson Immunoresearch, PA, USA), durante uma hora; O) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; P) contra-coloração com DAPI, segundo orientações do fabricante (TR-100-FJ BIOSENSIS, CA, USA); Q) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; R) montagem com meio de montagem aquoso à base de glicerol e lamínulas de vidro.

3.2.2 MÉTODO DE IMUNOPEROXIDASE INDIRETA

Os cortes histológicos de tecidos e órgãos foram desparafinizados, inicialmente mantidos em estufa por um período de 30 minutos a 56°C e, submetidos a uma sequência de banhos em xilol I-III, durante cinco minutos cada passagem. Em prosseguimento, submetidos às seguintes etapas: A) Desidratação, álcool 100% por dois minutos, álcool 95% por dois minutos e álcool 70% por dois minutos; B) Lavagens, seguiu-se uma sequência de três lavagens em PBS (0,1M, pH 7,4), PBS/Triton (PBS 0,1M acrescido de 0,03% de triton X-100), seguido por PBS 0,1M, durante cinco minutos cada passagem; C) Recuperação antigênica, os cortes em lâminas foram tratados em calor úmido em câmara pressurizada (Decloaking Chamber – Biocare Medical,

CA, USA), empregando solução de 1% de tampão citrato (100x Citrate Buffer, pH=6,0, Spring Bioscience, CA, USA), com programação de 95°C por 5 minutos e 70°C por 3 minutos; D) Resfriamento: os recipientes foram retirados da câmara pressurizada e passaram por resfriamento em temperatura ambiente por um período de uma hora e trinta minutos; E) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; F) inibição da peroxidase endógena em solução de PBS, acrescido de 10% de H₂O₂; G) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; H) bloqueio das marcações inespecíficas, através da solução contendo PBS acrescido de 5% de leite em pó desnatado, durante 1h; H) Lavagem, em PBS 0,1M durante cinco minutos; I) bloqueio das marcações inespecíficas em PBS/Triton acrescido de 3% de soro normal de burro (Jackson ImmunoResearch, PA, USA), durante 24h; J) incubação no anticorpo primário diluído em solução PBS/Triton, acrescido de 2% soro normal de burro, além de um dos anticorpos primários anti-TENs (**os anticorpos primários utilizados estão relacionados na Tabela 1, os não destacados foram utilizados na primeira bateria de testes imuno-histoquímicos enquanto os destacados em amarelo foram utilizados na segunda bateria de testes**), durante 24hs a temperatura ambiente; K) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; L) Incubação com anticorpo secundário biotilado específico (1:800, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), durante 1h a temperatura ambiente; M) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; N) Incubação em solução do complexo avidina-biotina (1:500, ABC, Vector Laboratories, CA, USA), durante 1h a temperatura ambiente; O) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; P) Revelação da reação de imuno-histoquímica, através da solução de tampão PBS, acrescido de 0,05% de tetracloreto de diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical, MO, USA) e 0,001% de H₂O₂, sob inspeção de cada lâmina histológica em microscopia de luz; Q) lavagens em PBS e desidratação a temperatura ambiente, durante 24 horas. Em prosseguimento, as lâminas histológicas foram desidratadas, deslipidificadas e montadas com meio de montagem DPX (Sigma Chemical, MO, USA) e lamínulas de vidro.

PROTEÍNA	FABRICANTE	FONTE	TITULAÇÃO	EPÍTOPO/IMUNÓGENO
Teneurina 1	ABNOVA (ABNO-H00010178-A01)	camundongo	1:100	c-terminal - (2616-2725)
Tenenurina 1	R&D SYSTEMS (RD-AF6324)	ovelha	1:600	N-terminal - (1-317 aa)
Teneurina 2	Santa Cruz Biotech.(165674)	cabra	1:100	N-terminal - (50-100 aa)
Teneurina 2	R&D systems (AF4578)	ovelha	1:600	N-terminal - (1-183 aa)
Teneurina 3	Santa Cruz Biotech.(136918)	coelho	1:500	C-terminal - (2600-2650 aa)
Teneurina 3	Novus Biologicals (NBP1-20956)	cabra	1:600	C-terminal - (2390-2402 aa)

Teneurina 4	Santa Cruz Biotech. (H-50/ 134883)	coelho	1:1000	C-terminal - (2515-2564 aa)
Teneurina 4	Santa Cruz Biotech. (103484)	cabra	1:1000	C-terminal - (2500-2550)
Teneurina 4	R&D systems (AF6320)	ovelha	1:600	N-terminal - (61-340 aa)

Tabela 1. Lista de anticorpos empregados no projeto de pesquisa. Os itens em amarelo representam aqueles utilizados na segunda bateria de testes imuno-histoquímicos, enquanto os não destacados foram empregados na primeira bateria de testes.

3.2.3. REAÇÕES CONTROLE – IMUNO-HISTOQUÍMICA

3.2.3.1. TESTE DE ADSORÇÃO

Ressaltamos que o mesmo protocolo da técnica de imunoperoxidase ou imunofluorescência foi utilizado para estabelecer a concentração ideal do anticorpo primário através do teste de titulação e para determinar a especificidade do anticorpo primário empregado através do teste de adsorção ou omissão do anticorpo primário. No que se refere ao teste de adsorção, este é baseado no conceito de verificar se o anticorpo primário se liga especificamente ao antígeno de interesse. Para isso é realizada, antes das etapas iniciais da técnica de imunoperoxidase ou imunofluorescência, a ligação do anticorpo primário com seu respectivo antígeno (peptídeo obtido comercialmente) considerando a concentração ideal do anticorpo TEN1, TEN2 e TEN3, obtido no teste de titulação. Desta forma, como exemplo, para o anticorpo TEN2 foram preparadas soluções contendo concentrações decrescentes do peptídeo (0,1 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,001 mg/ml, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), mantendo-se constante a concentração do anticorpo anti-TEN2 (1:100 – imunofluorescência ou 1:500 para imunoperoxidase), durante 18hs a 4°C, sob agitação. Esta solução é empregada durante a incubação do anticorpo primário no protocolo de imuno-histoquímica.

Com relação à TEN4, o anticorpo comercial anti-TEN4 (H-50, fornecido pela empresa Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) não possui disponível comercialmente o peptídeo correspondente, impedindo a confirmação da sua especificidade pelo método de adsorção. Entretanto, em contato com o suporte técnico da Santa Cruz Biotechnology, assegurou-se que a especificidade deste anticorpo foi testada através de ensaios de *Western Blot*.

3.2.3.2. OMISSÃO DO ANTICORPO PRIMÁRIO

A omissão do anticorpo primário também é um dos métodos de controle da reação de imuno-histoquímica, conhecida como controle negativo, que visa determinar se o anticorpo secundário empregado é específico para reconhecer o anticorpo primário e não antígenos teciduais que poderiam gerar resultados falsos positivos. Para tanto, séries de cortes histológicos foram submetidas ao protocolo da técnica de imuno-histoquímica retirando apenas a etapa de incubação do anticorpo primário. Em nossos resultados verificamos que os anticorpos secundários comerciais anti-coelho e anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology®) não marcaram nenhuma região dos tecidos confirmando a especificidade dos anticorpos secundários em reconhecer apenas os anticorpos primários empregados na técnica de imuno-histoquímica.

3.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

As lâminas histológicas submetidas à imunofluorescência foram analisadas inicialmente em microscopia de epifluorescência (Axioplan, Leica Microsystem Inc.), sendo que os cortes histológicos que apresentaram marcação adequada foram reanalisados em microscopia confocal equipado com lasers diodo, Hélio-Neon e Argônio (modelo TCS-SP5 AOBS Tandem Scanner, LEICA, Germany), acoplado a um microscópio óptico invertido (Leica DMI 6000CS), no centro de microscopia eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (IBB - UNESP). A marcação de fundo (background) foi controlada em tempo real através do fotomultiplicador de voltagem e, ajustada para se obter o melhor resultado entre sensibilidade e inespecificidade. Foram utilizadas objetivas Planapochromat de 20x, 40x e 63x (abertura numérica 1,30) com imersão a óleo, que possibilitaram uma resolução de até ~150nm nos eixos x, y, além de ~300nm no eixo -z. As imagens digitais foram coletadas em formato TIFF.

Os cortes histológicos submetidos à imunoperoxidase foram analisados em microscópio de luz (Axioplan, Leica Microsystem Inc) acoplado com câmera digital (AxioCam MRc5, Carl Zeiss MicroImaging, GmbH) e com auxílio do sistema de aquisição de imagens AxioVision Rel 4.8.2. software (Carl Zeiss MicroImaging, GmbH). As imagens foram ajustadas conforme necessidade (brilho, contraste e intensidade), contudo sem alterar o padrão de imunomarcação através do software Corel Draw ou Adobe Photoshop.

3.4 RT-PCR CONVENCIONAL

3.4.1 CONFEÇÃO DOS PRIMERS

Inicialmente, para desenhar os *primers* que foram utilizados para a realização da técnica de RT-PCR, as sequências genômicas das TENs 1-4 e dos TCAPs 1-4 (expressos pelo último éxon das teneurinas) de humanos e roedores foram extraídas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) e/ou ENSEMBL (www.ensembl.org). Após a coleta de informações, foram desenhados os *primers*, seguindo os critérios já conhecidos e atestados por softwares específicos (Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>)). Os *primers* foram testados previamente através de uma PCR (dados não mostrados) a partir disso foram selecionados os que tiveram melhor resultado para realizar a RT-PCR, mostrados na tabela 2. Os tamanhos dos produtos de RT-PCR obtidos pela amplificação gênica são mostrados na tabela 3.

Ten1mo-E25(G)FWD	AAGAATCAAGCCCACCTGAATGACATGA
Ten1mo-E25(G)RVS	AAGTCCTGTGTTTCCTGGGTATGTCAT
Ten1mo-E25(P3)FWD	ACTGTAAATGGAACGCACCTACATAC
Ten1mo-E25(P3)RVS	CATTGCTACTTATGGTAAGCCAGTAG
TCAP1mo-E32(C)FWD	ACGTCAGTGTTGAATGGGAGGACTA
TCAP1mo-E32(C)RVS	CCTCCTGCCTATTTCACTCTGTCTCAT
Ten2mo-E23(G)FWD	TGTGACTGCAAAAACGATGTCAAC
Ten2mo-E23(G)RVS	TCCCATCATAAGTCATGAGGCCAGC
Ten2mo-E23(P3)FWD	AACGATGTCAACTGCATCTGCTAC
Ten2mo-E23(P3)RVS	GAGTCCAGTGTTCCCATCATAAGT
TCAP2mo-E28(C)FWD	GACAAGATGCACTACAGCATCGAG
TCAP2mo-E28(C)RVS	CCATCTCATTCTGTCTTAAGAACTGG
Ten3mo-E23(G)FWD	CCTCGCGATCAACCCCATGGATAAC
Ten3mo-E23(G)RVS	GAGAGGCAACTTCGTAAAAGTTCA
Ten3mo-E23 (P3)FWD	AACTCCATCTACGTCCTGGATAAT
Ten3mo-E23 (P3)RVS	TGTAGAGCTCTTGATCAGTTGGAG
Ten4mo-E23(G)FWD	GACCAATTCTGCTGAGCAAGGT
TCAP3H-E27(C)FWD	CAACAACGCCTTCTACCTGGAGAAC
TCAP3H-E27(C)RVS	CGATCTCGCTCTGCCGCAGGAACT
Ten4mo-E23(G)RVS	TGGTTACCCAGTATACCTGGCCA

Ten4mo-E23(P3)FWD	ACAGACTTAGCCATCAACCCAAT
Ten4mo-E23(P3)RVS	AGTTGTACAGGTAGTCCCCTGTG
TCAP4mo-E29(C)FWD	TTTGCCTCCAGTGGTTCCATCTT
TCAP4mo-E29(C)RVS	GGATATTGTTGGCGCTGTCTGAC

Tabela 2. Descrição do primers para realização de RT-PCR. Abreviaturas: Ten: teneurina; H:humano; E: éxon; G: *primer* desenhado em nosso laboratório, P3: *primer* obtido pelo Primer3plus; mo: mouse; C: TCAP (peptídeo associado ao terminal carboxila das teneurinas); FWD: forward; RVS: reverse; **primers* utilizado como controle (β -actina e GAPDH).

Sonda (roedores)	Pares de Base (bp)
Teneurina 1 e TCAP1	351
Teneurina 2 e TCAP2	496
Teneurina 3 e TCAP3	506
Teneurina 4 e TCAP4	601

Tabela 3. Número de pares de base (bp) dos produtos utilizadas para o presente estudo

Os *primers* foram obtidos comercialmente (Síntese Biotecnologia Ltda, MG, Brasil) e os mesmos foram reconstituídos em tampão TE (10mM Tris base, 1mM EDTA, pH 8,0) na concentração de 100mM e aliquotados em tubos para PCR de 0,2 ml (*PCR Tubes*, *Axygen Scientific*, USA). A alíquota empregada para as reações de RT-PCR foram novamente diluídas para obter uma concentração de trabalho de 10mM.

3.4.2 EXTRAÇÃO DE RNA

Para que pudesse ser iniciado o processo de extração do RNA total dos órgãos selecionados para o estudo, os animais foram pesados e anestesiados via injeção intramuscular com xilazina (Ceva Santé Animale, Paulínia-SP, Brasil) e ketamina (Ceva Santé Animale, Paulínia-SP, Brasil) na concentração de 0,01mg/g e 0,08mg/g, respectivamente. Após alcançar anestesia profunda dos animais, os mesmos foram submetidos ao processo de antissepsia com PVPI (iodopovidona) por fricção tripla e em seguida realizou-se tricotomia na região relacionada com a remoção do órgão alvo utilizando navalha acoplada a suporte específico com objetivo de remover toda a pelagem e assim evitar a contaminação dos órgãos que seriam submetidos ao processo de extração de RNA total. Realizada a tricotomia, novamente foi executada, por fricção tripla com PVPI, a antissepsia, objetivando o máximo de desinfecção e consequentemente evitar a

contaminação dos órgãos alvo dos animais. Em seguida, com o auxílio de uma lâmina de bisturi acoplada a cabo foi realizado um acesso cirúrgico com finalidade de alcançar os órgãos selecionados para o estudo. Por sua vez, alcançado o órgão alvo através do acesso cirúrgico, foi coletada uma pequena porção, a qual foi colocada sobre uma placa de Petri estéril para que pudesse ser realizada mais uma vez sua redução. Após esse processo, a pequena porção do órgão foi colocada dentro de um frasco de 2ml estéril (livre de RNase, DNase e pirogênio - Kasvi, USA) o qual foi previamente tarado em balança de precisão (Daigger, USA) alcançando no máximo 100mg de tecido alvo. Neste momento, foi adicionado 1ml de trizol (Ambion, Life Technologies, USA). O tecido alvo junto com a solução do trizol foi levado ao homogeneizador (Tissue-Tearor, Biospec Products, USA) durante 40 segundos para lise tecidual e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Decorrido esse tempo, foram adicionados 200ul de clorofórmio (Amresco, Biotechnology Grade, USA) para cada 1ml de trizol utilizado inicialmente e homogeneizado vigorosamente no vórtex (K40-1010, Multifuncional Vortex, Kasvi) durante 15 segundos e sequencialmente incubado no gelo durante 3-5 minutos. Após essa etapa e visualizado o processo inicial de separação de fases da solução foi realizada uma centrifugação (Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, Alemanha) durante 15 minutos a 12.000xg a 4°C. Este processo possibilitou uma maior separação de fases do eluato, onde permaneceu o RNA total na fase superior (fase aquosa) da solução. Em prosseguimento, a fase aquosa foi removida por pipetagem e transferida para um novo tubo de 2ml estéril (Kasvi, USA). Nesse novo tubo, no qual colocamos a fase aquosa, foi adicionado 0,5ml de isopropanol 100% (Sigma, USA) para cada 1ml de trizol utilizado inicialmente e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, realizou-se uma centrifugação a 12.000xg durante 10 minutos a 4°C resultando na formação de um pequeno *pellet* na parede do tubo, permitindo a remoção do sobrenadante, restando somente o *pellet* no tubo de 2ml. O *pellet* foi dissolvido em 1ml de álcool 75% (750ul de álcool 100% - Amresco, Biotechnology Grade, USA + 250ul de água ultra-pura, Sigma, USA) e homogeneizado brevemente no vórtex. Uma nova centrifugação (7.500xg) foi realizada durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, permanecendo no tubo somente o *pellet* novamente formado. Este *pellet* foi desidratado a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Decorrido esse tempo, foram adicionados 100ul de água RNase e DNase “free” para ressuspensão do RNA total e incubado em bloco de aquecimento a seco (Dry Bath Incubator, Major Science, USA) durante 15 minutos a 57°C. A solução de RNA total foi então submetida a uma nova etapa de purificação, descrita abaixo.

Objetivando alcançar uma purificação do RNA e uma melhor qualidade do mesmo para aplicações futuras, o RNA total extraído foi submetido a um processo de purificação utilizando o sistema de colunas do *kit Direct-zol™ RNA MiniPrep* (Zymo Research, USA) no qual foi adicionado a mesma quantidade em microlitros de álcool 100% diretamente no volume inicialmente ressuspendido de RNA total, alcançando um volume álcool/RNA total de 1:1. Após a adição, o tubo foi vigorosamente homogeneizado no vórtex e o eluato foi transferido para uma coluna de purificação de RNA presente no *kit*, posicionada dentro de um tubo coletor e centrifugado por 1 minuto a 16.000xg a 4°C. Decorrida a centrifugação o lavado foi descartado e foram adicionados 400ul de *Direct-zol™ RNA PreWash* no centro da coluna e centrifugado novamente por 1 minuto a 16.000xg a 4°C. Para alcançar uma lavagem mais eficiente da coluna e promover a remoção de possíveis contaminantes, este último passo foi repetido. Em seguida foram adicionados 700ul de *RNA Wash Buffer* na coluna e centrifugado a 16.000xg a 4°C durante 1 minuto. O lavado foi descartado e uma nova centrifugação nas mesmas condições foi realizada. Em prosseguimento, o tubo coletor juntamente com o lavado foi descartado e a coluna foi posicionada dentro de um novo tubo de 2ml estéril. Finalmente foram adicionados 100ul de água RNase e DNase “free” (presentes no *kit*) no centro da coluna e centrifugado a 16.000xg durante 1 minuto a 4°C. A solução final com o RNA total foi estocada em freezer -86C.

A quantidade de RNA foi mensurada através de espectrofotômetro (Optizen POP Series UV/Vis Espectro photo meter, Mecasys, Coréia) empregando microvolumes da amostra (1 µl). A qualidade do RNA (presença das subunidades 28S e 18S) foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose, nas condições citadas no subitem abaixo.

3.4.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA E AMPLIFICAÇÃO GÊNICA

Para as reações de RT-PCR foram empregadas as soluções do kit Verso 1-Step RT-PCR Hot-Star (#AB-1455/B, Thermo Scientific). As soluções do kit, assim como o RNA e os primers (TCAPs, TENs, β-actina) foram lentamente descongelados e mantidos em gelo, após serem retirados do freezer -20°C. As soluções de RT-PCR e o RNA foram previamente aliquotadas em tubos de PCR (0,2 ml PCR tubes, 3210105, Axygen) na seguinte sequência: a) 0,5ul de uma mistura de enzima transcriptase reversa e inibidor de RNase (Verso enzyme mix); b) 12,5ul de tampão contendo DNA polimerase (2X 1-Step PCR Hot-Star Master Mix); c) 1,25ul de solução para remover a contaminação por DNA (RT Enhancer); d) 0,5µl de cada primer (10nM); e) 2µl de template (RNA); f) 7,75ul de água RNase DNase “free”. Os tubos com as soluções

serão agitados por 20 segundos, centrifugados brevemente e posicionados no termociclador (Matercycler Gradient, Eppendorf), empregando o seguinte programa: a) síntese de cDNA a 50°C por 15 minutos; b) inativação da transcriptase reversa (verso enzyme mix) a 95°C por 15 minutos; c) desnaturação a 95°C por 20 segundos; d) anelamento a 53°C por 1 minuto; e) extensão a 72°C por 1 minuto; f) repetição as etapas *c*, *d* e *e* durante 50 vezes, g) extensão final a 72°C por 5 minutos; h) manutenção a 4°C. Após o término da amplificação gênica, os tubos foram agitados por 20 segundos, centrifugados e mantidos em gelo.

Para análise dos produtos da RT-PCR, foi confeccionado um gel de agarose (Agarose RA, AMRESCO, USA) na concentração de 1,5% em tampão 0,5x (Tampão TBE (45mM Tris base; 45mM ácido bórico; 1mM de EDTA, pH 8,0, SIGMA, USA) com 0,05µl/ml de brometo de etídeo (AMRESCO, USA). Em cada cavidade do gel de agarose foram depositados 15µl da amostra da RT-PCR acrescidos de 3µl de corante para DNA (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03% de azul de bromofenol; 0,03% de cianol FF xileno; 60% de glicerol; 60mM EDTA, 6x loading dye solution, SM 0241, Fermentas, Thermo Scientific, USA). Após a eletroforese de nucleotídeos em tampão TBE 0,5x, submetida a 40 volts por 120 minutos, o gel foi levado ao Image Quant LAS 500 (GE Healthcare, Japão) para análise ultravioleta e captura das imagens através de câmera acoplada ao Image Quant (GE Healthcare, Japão) e salvo em arquivo eletrônico.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

As imunomarcações obtidas empregando cortes de parafina (5 µm) mostraram marcações claras e precisas. Um ponto importante a ser destacado é que a imunorreatividade para as TENs mostrou-se peculiar, uma vez que frequentemente estava difusa pelo citosol, diferentemente dos estudos preliminares que relataram imunorreatividade principalmente associada à membrana (atuando como uma proteína transmembrana) ou vinculada ao núcleo (atuando como fator de transcrição gênica)

A especificidade dos anticorpos empregados foi testada através da omissão do anticorpo primário assim como em testes de adsorção, sendo verificada a ausência total de

imunomarcção (Figuras 4 (B, B', C e C'); figura 5 (C, C', D, D'); figura 6 (D, D'); figura 7 (C, C'), figura 9 (C, C'), figura 10 (C, C'))

Em resumo, os principais sítios de imunorreatividade a TEN1 foram o pâncreas endócrino (ilhas de Langerhans) e exócrino, células dos epitélios de revestimento dos tratos digestório (intestino delgado) e respiratório (traqueia, brônquios e bronquíolos) tanto do Sapajus assim como do rato Wistar . A distribuição da TEN2 também estava presente no trato digestório (membrana das células de revestimento; citosol das células parietais; e citosol das células neuroendócrinas) e trato respiratório (membrana das células de revestimento da traqueia, brônquios e bronquíolos), destacando também imunomarcção no polo apical das células do epidídimo e discreta presença na adrenal em ambas as espécies de animais. Além disso, a imunorreatividade a TEN2 foi interessante no rim, apresentando imunomarcção nas células do glomérulo renal em ratos Wistar e imunomarcção do polo apical dos túbulos contorcidos proximais e distais no Sapajus.

A distribuição da imunorreatividade para TEN3 foi mais generalizada e intensa na hipófise (adeno-hipófise e parte intermédia), adrenal (medular), pâncreas (ilhas de Langerhans), tireoide (células parafoliculares tipo C), tratos digestório (células parietais e neuroendócrinas; plexos mioentérico e submucoso) e respiratório (traqueia, brônquios e bronquíolos), testículo (células da linhagem espermatogênica e espermátides. Além disso, a imunorreatividade a TEN3 estava também presente no rim, apresentando imunomarcção predominantemente citosólica nos túbulos contorcidos proximais e distais do rato Wistar e no Sapajus.

A distribuição da TEN4 foi mais restrita, sendo possível identificar clara imunomarcção no pâncreas endócrino (ilhas de Langerhans) e citosólica nos túbulos contorcidos proximais e distais do rato Wistar e no Sapajus .

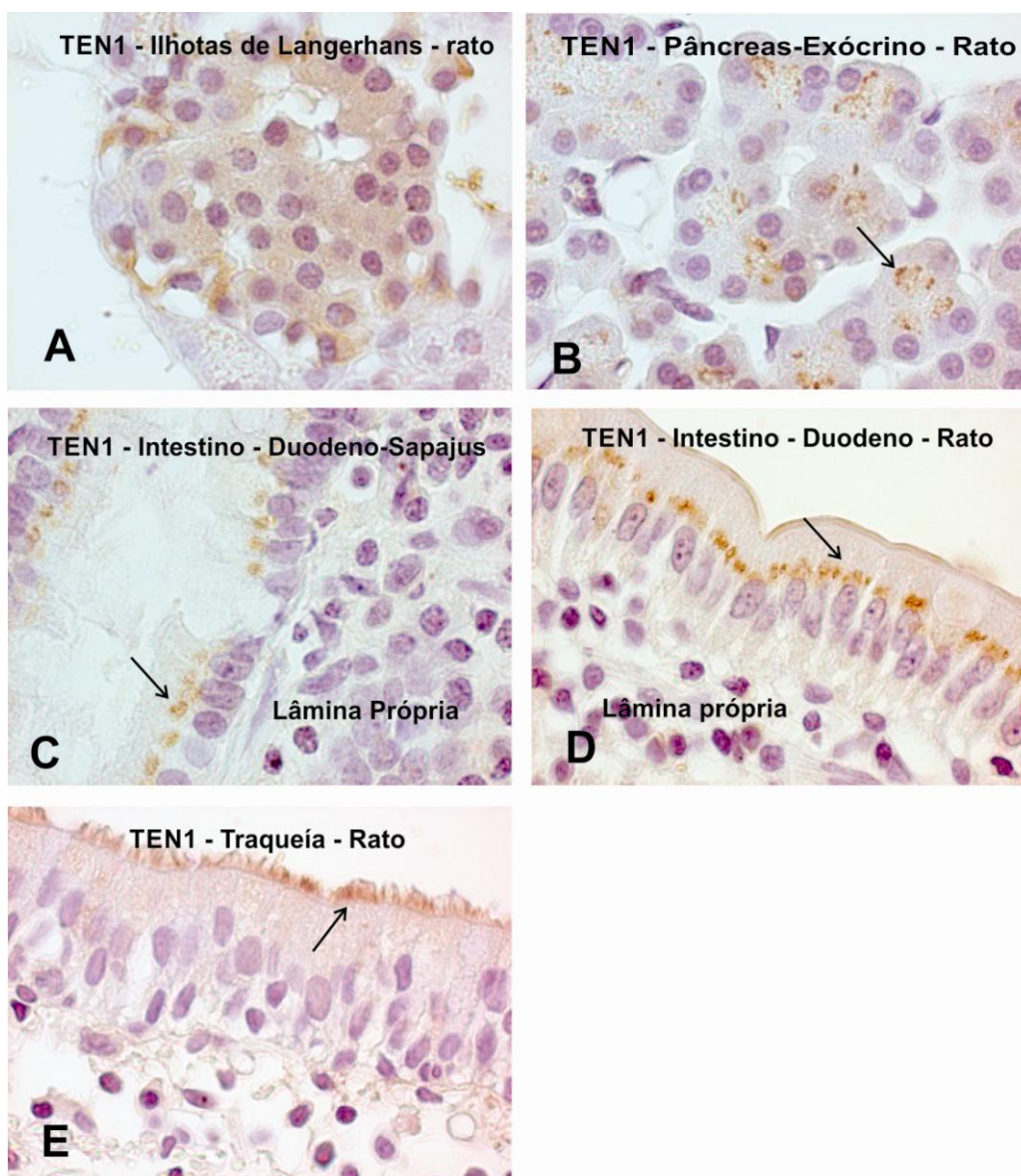


FIGURA 2. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN1 no pâncreas (A-B), duodeno (D) e traqueia (E) do rato Wistar e no duodeno do Sapajus (C). Observar que a imunorreatividade para TEN1 está visível nas ilhotas de Langerhans (A) e no polo apical (seta) das células acinares do pâncreas exócrino (B). As células absorptivas de revestimento do duodeno apresentam imunorreatividade limitada ao centro celular (seta), imediatamente apical ao núcleo, tanto no Sapajus (C), assim como no rato Wistar (D). Em E é mostrado que a imunorreatividade a TEN1 está limitada a membrana celular na região dos cílios do epitélio pseudoestratificado ciliado da traqueia no rato Wistar. Nota: imunoperoxidase revelado com DAB

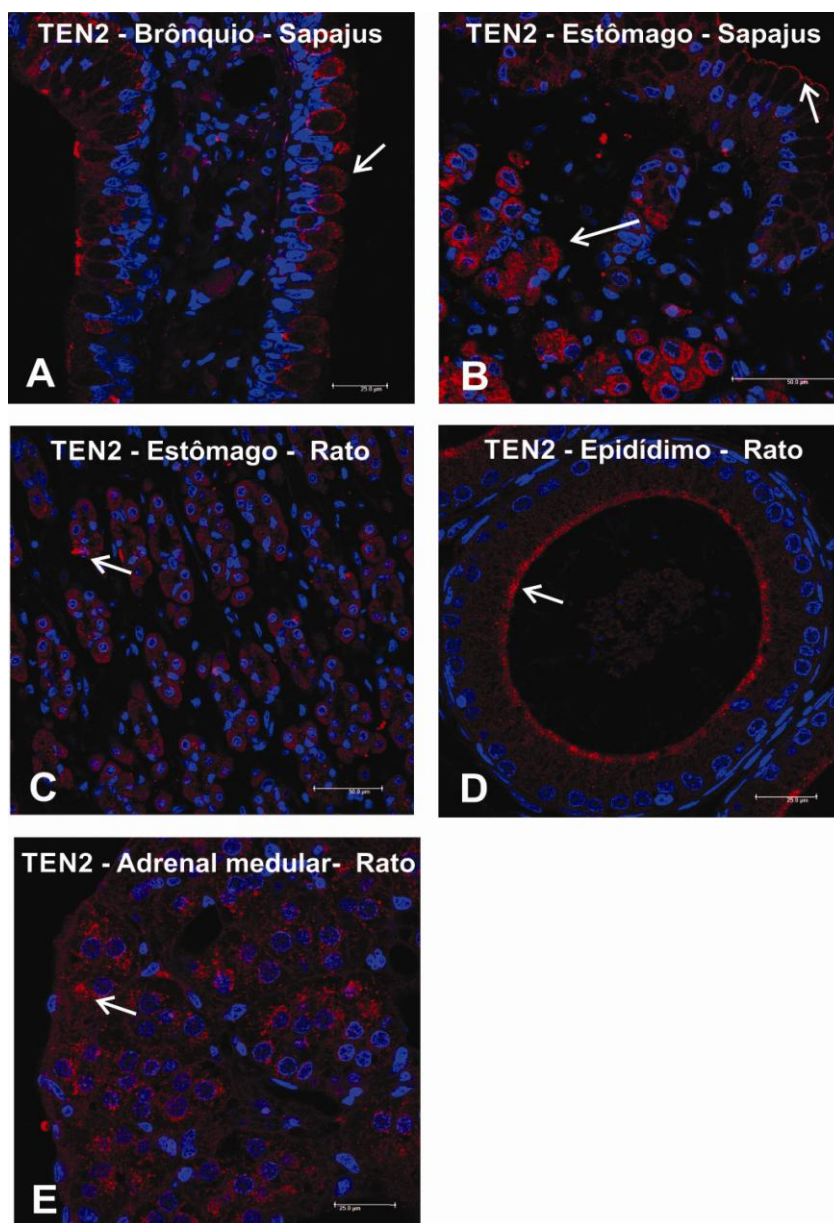


FIGURA 3. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN2 no pulmão e estômago do Sapajus e no estômago, epidídimo e adrenal do rato Wistar. Observar que a imunorreatividade a TEN2 está limitada a membrana celular das células de revestimento do brônquio (A – seta), células de revestimento do estômago (B – seta menor) e do epidídimo (D – seta); enquanto que existe imunorreatividade citosólica nas células glandulares mucosas do estômago (B – seta maior), células neuroendócrinas do estômago (C – seta) e nas células secretoras da adrenal (E – seta). Nota: Imunofluorescência - TEN2 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul.

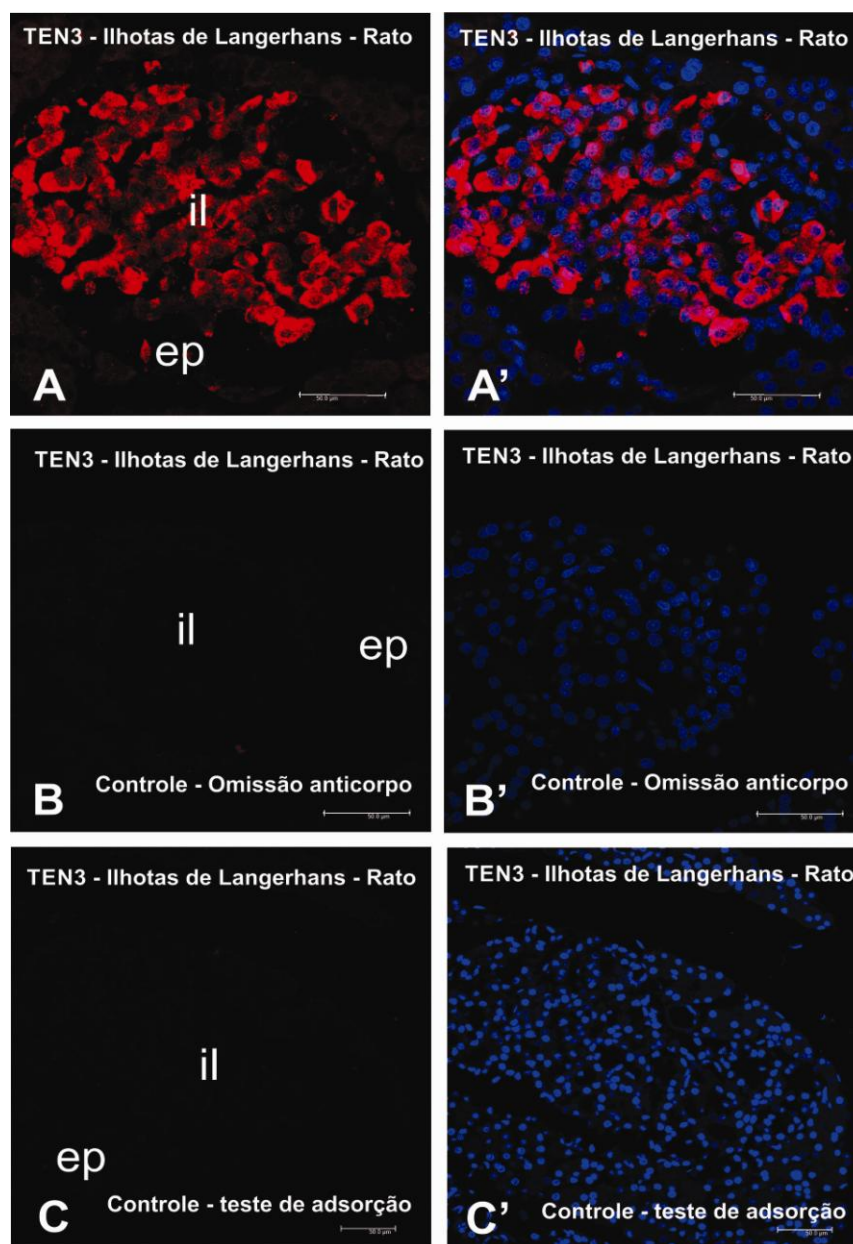


FIGURA 4. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 no pâncreas do rato (A-A') e a ausência de imunorreatividade nas reações controle através da omissão do anticorpo primário (B-B') e no teste de adsorção (C-C'). Observar a intensa imunorreatividade nas células da ilhota de Langerhans (A-A'). Abreviaturas: LI, ilhotas de Langerhans; EP, pâncreas exócrino. Nota: Imunofluorescência – TEN3 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul.

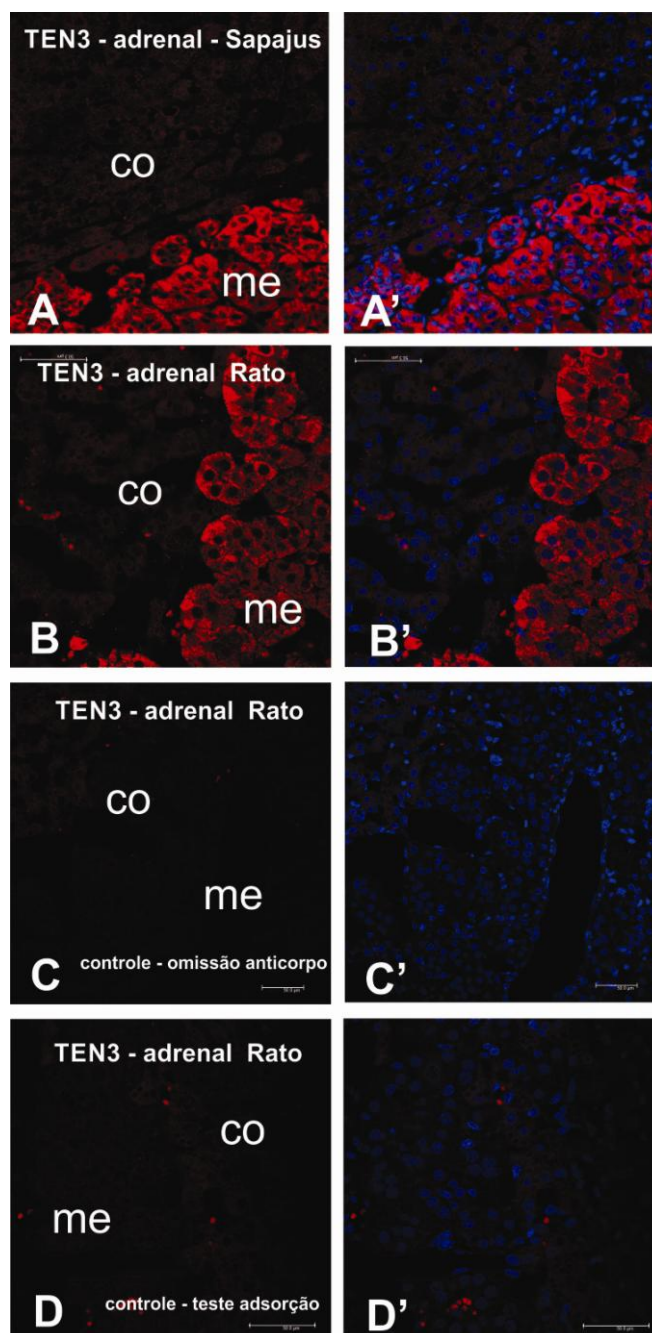


FIGURA 5. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 na adrenal do Sapajus (A-A') e do rato (B-B') e ausência de imunorreatividade nas reações controle através da omissão do anticorpo primário (C-C') e no teste de adsorção (D-D'). Observar a intensa imunorreatividade nas células da medular da adrenal no Sapajus (A-A') e do rato (B-B'). Abreviaturas: CO, cortical da adrenal; ME, medular da adrenal. Nota: Imunofluorescência - TEN3 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul.

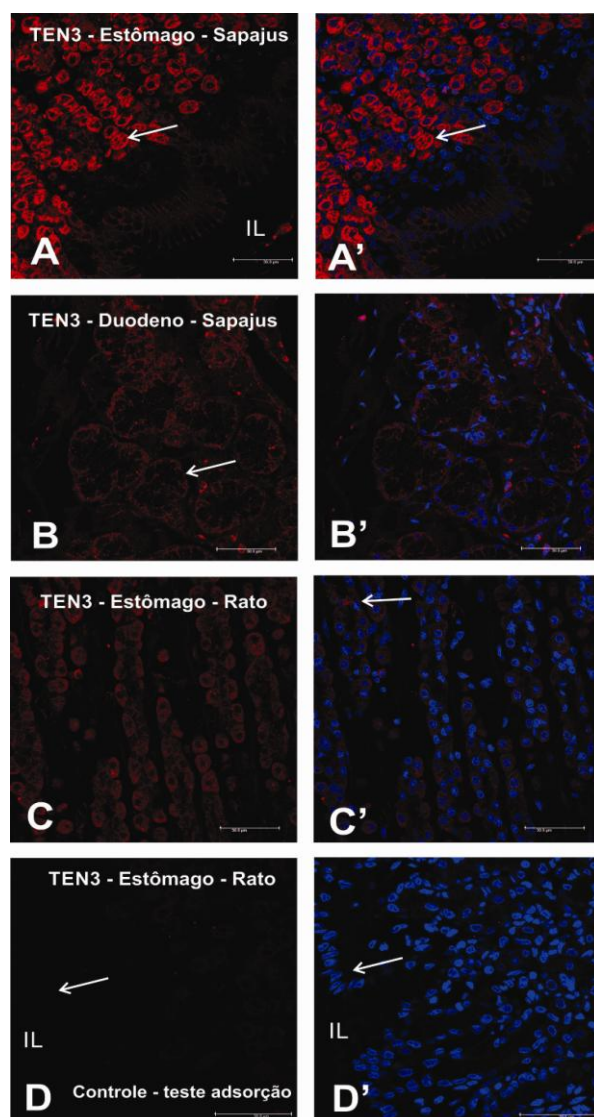


FIGURA 6. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 no estômago (A-A') e duodeno do Sapajús (B-B') e no estômago do rato (C-C') e ausência de imunorreatividade nas reações controle através do teste de adsorção (D-D', epitélio de revestimento está indicado pela seta). Observar a intensa imunorreatividade citosólica nas células parietais da mucosa do estômago (A-A', seta) e imunorreatividade próxima a membrana celular nas células glandulares da submucosa do duodeno (B-B'). Observar que a imunorreatividade no estômago do rato é discreta, sendo intensa nas células neuroendócrinas (C-C', seta). Abreviaturas: IL, luz intestinal Nota: Imunofluorescência - TEN3 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul.

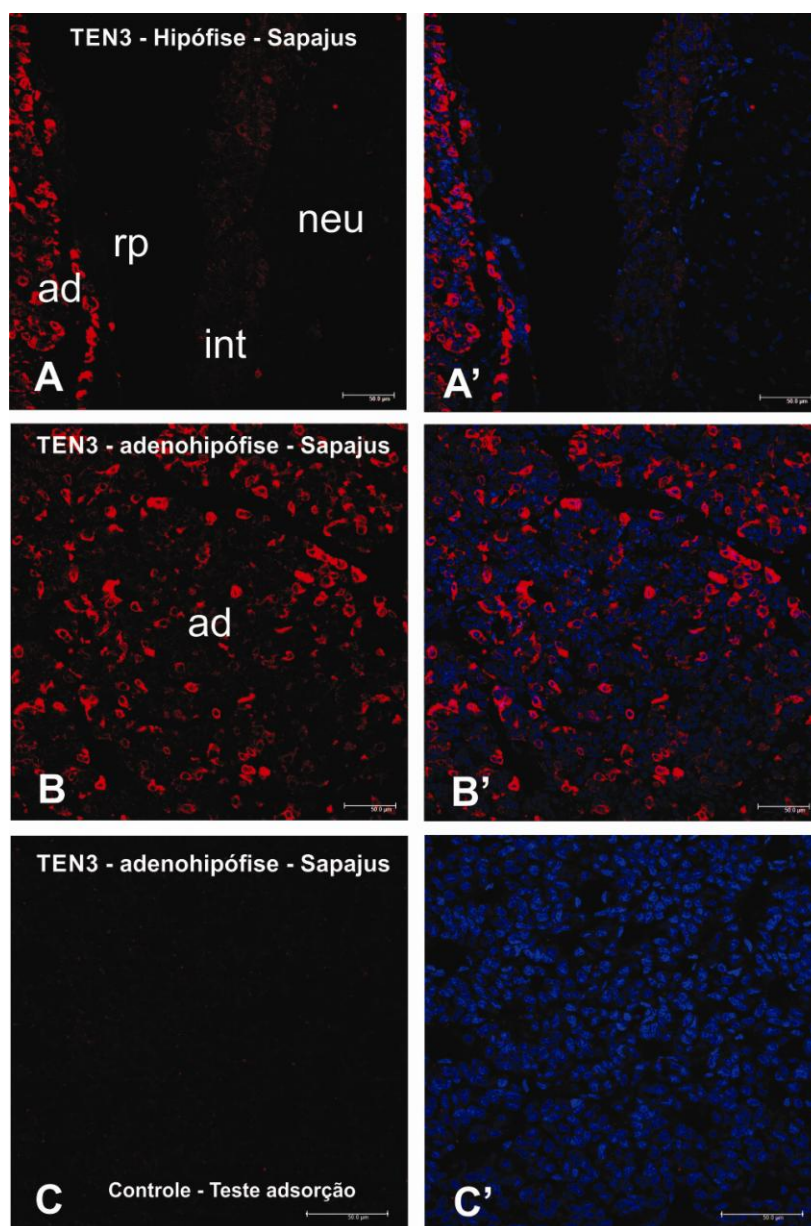


FIGURA 7. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 na hipófise do Sapajus (A-A' e B-B') e ausência de imunorreatividade nas reações controle através do teste de adsorção (C-C'). Observar a imunorreatividade citosólica em células da adeno-hipófise (ad) e discreta imunorreatividade na parte intermédia (int). Abreviaturas: ad, adeno-hipófise; int, parte intermédia; neu, parte nervosa; rp, bolsa de Rathke. Nota: Imunofluorescência - TEN3 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul.

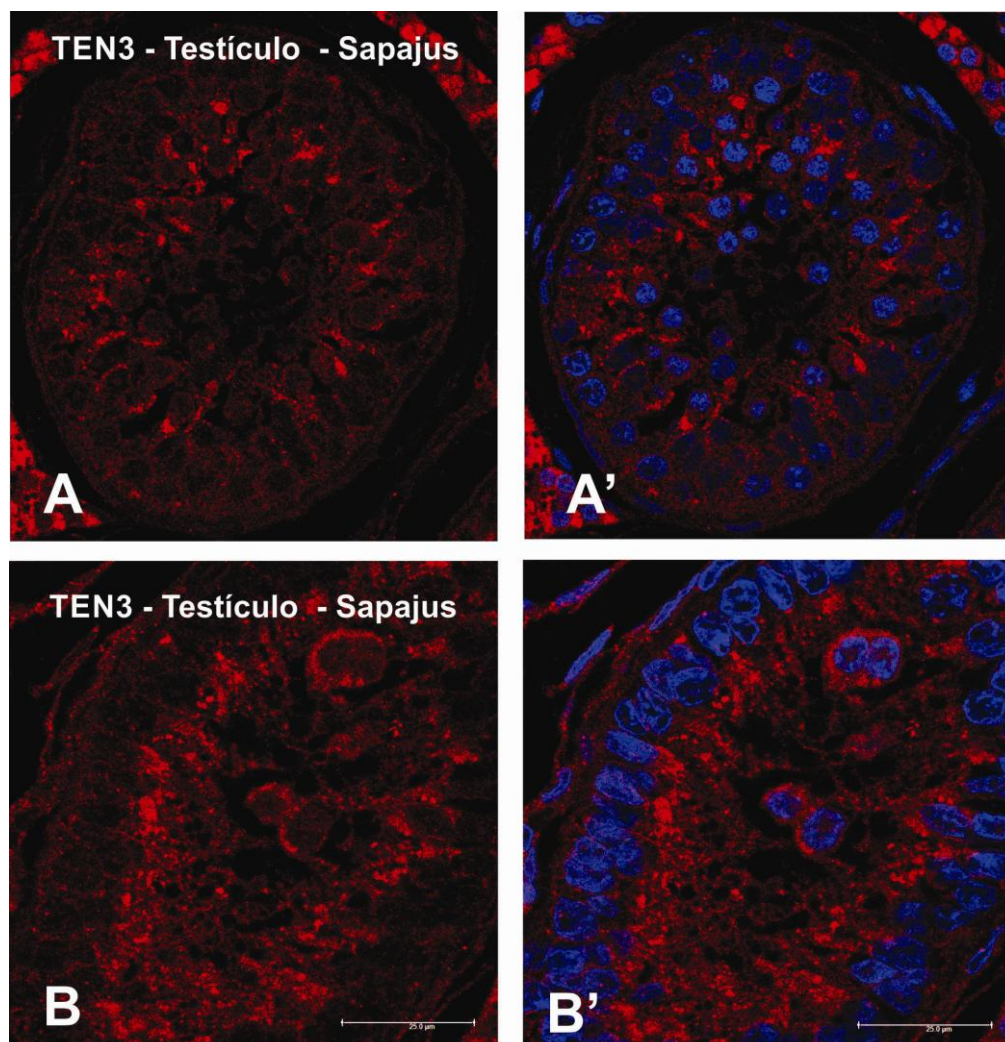


FIGURA 8. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 no testículo do Sapajus (A-A' e B-B'). Observar a imunorreatividade posicionada principalmente na membrana plasmática das células da linhagem espermatogênica. Nota: Imunofluorescência - TEN3 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul.

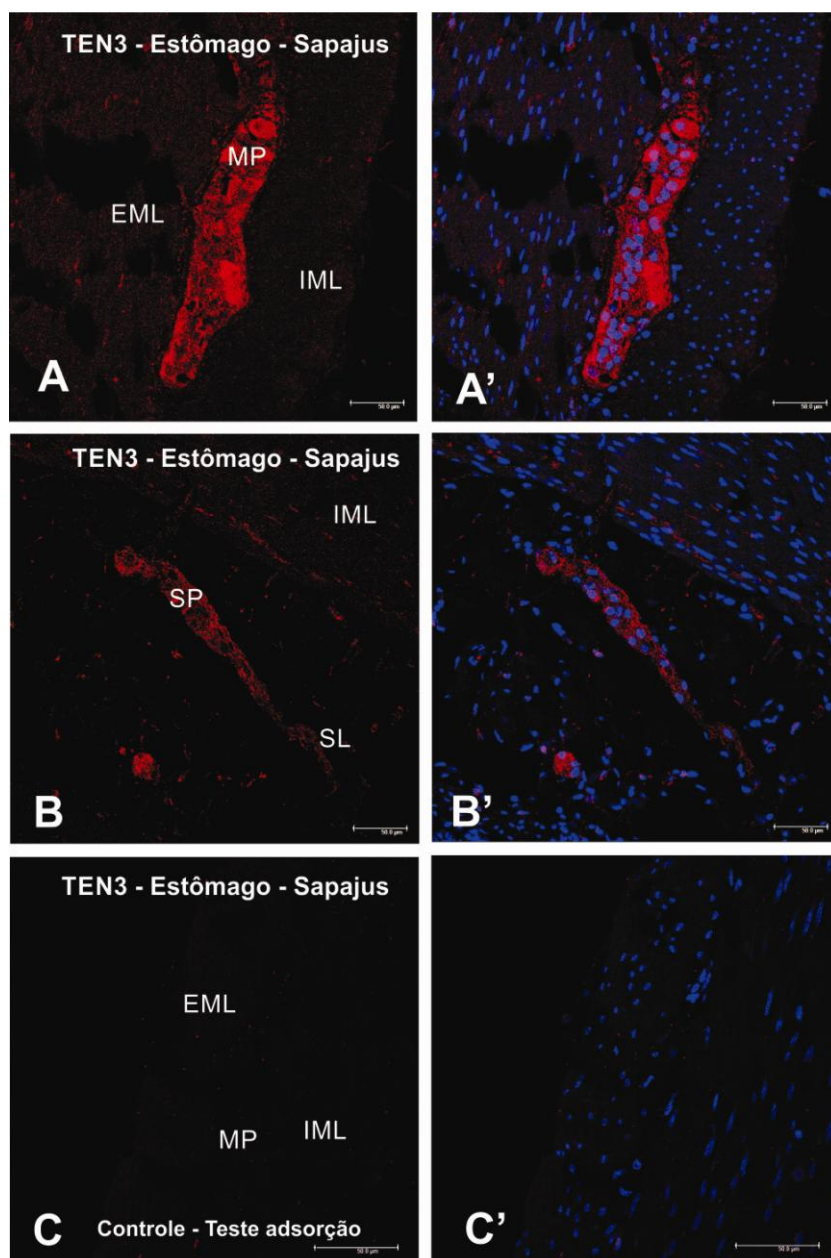


FIGURA 9. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 nos plexo nervoso mioentérico (A-A') e submucoso (B-B'), além da ausência de imunorreatividade na reação controle através do teste de adsorção (C-C'). Abreviaturas: EML, camada muscular externa; IML, camada muscular interna; MP, plexo mioentérico; SL, camada submucosa; SP, plexo submucoso. Nota: Imunofluorescência - TEN3 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul.

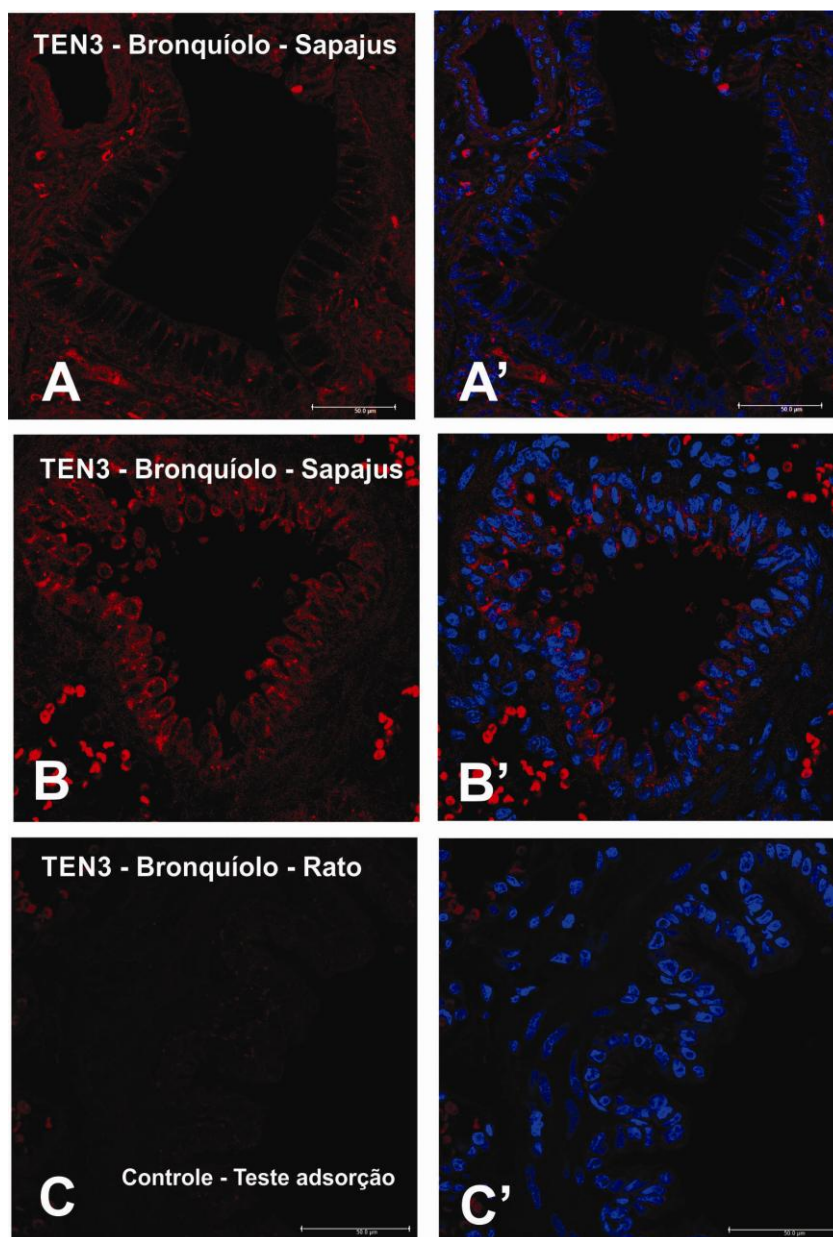


FIGURA 10. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN3 no pulmão, em particular no epitélio de revestimento dos brônquios e bronquíolos do Sapajus (A-A') (B-B'), além da ausência de imunorreatividade na reação controle através do teste de adsorção (C-C'). Nota: Imunofluorescência - TEN3 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul.

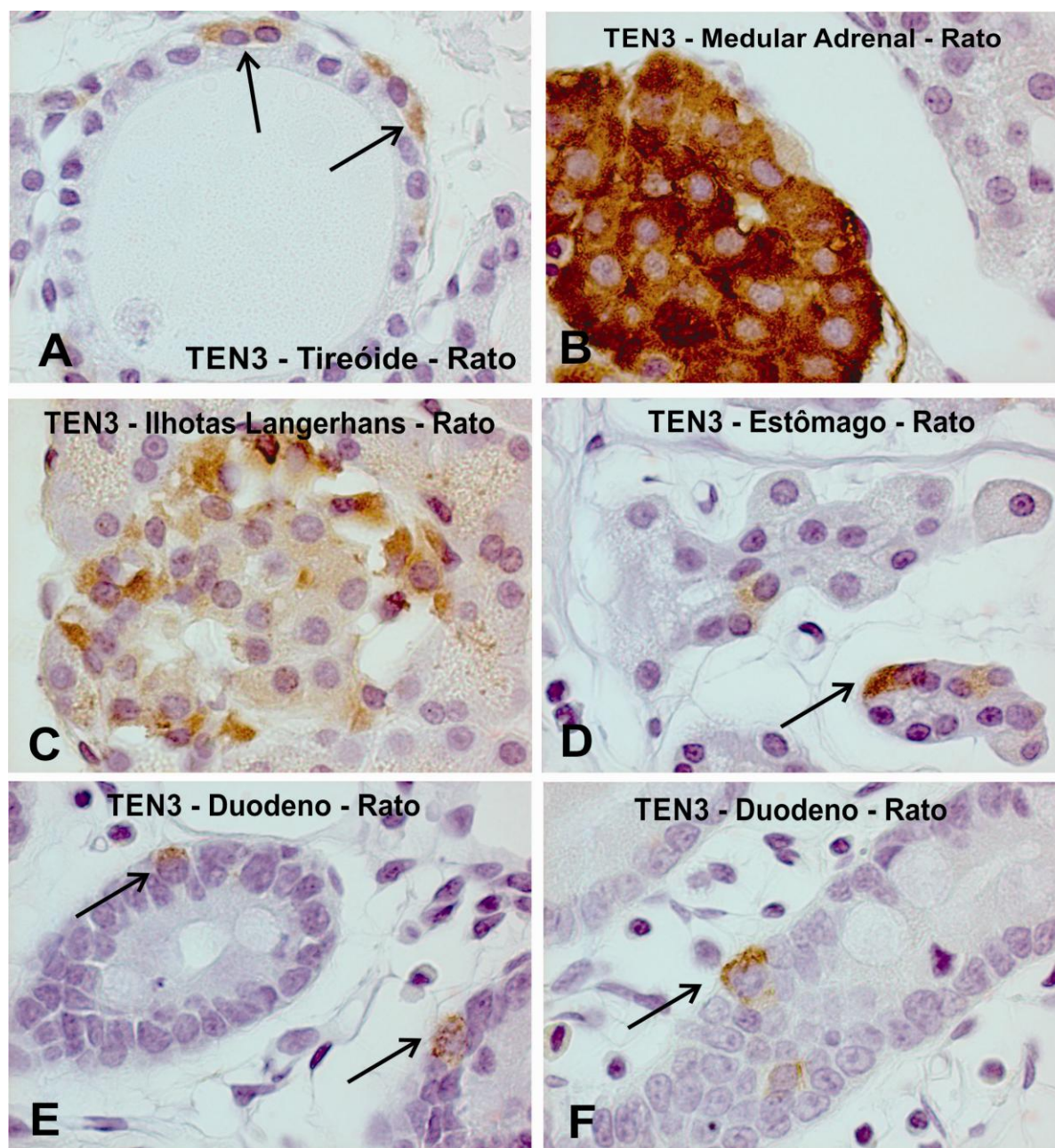


FIGURA 11. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN3 na glândula tireoide (A), medular da adrenal (B), ilhota de Langerhans (C), estômago (D) e duodeno (E-F) do rato Wistar. Observar que a imunorreatividade para TEN3 é preponderantemente citosólica marcando as células parafoliculares tipo C da tireoide (A – setas), células medulares da adrenal (B), algumas células da ilhota de Langerhans (C) e células neuroendócrinas do estômago (D – seta) e duodeno (E-F, setas). Nota: imunoperoxidase revelado com DAB.

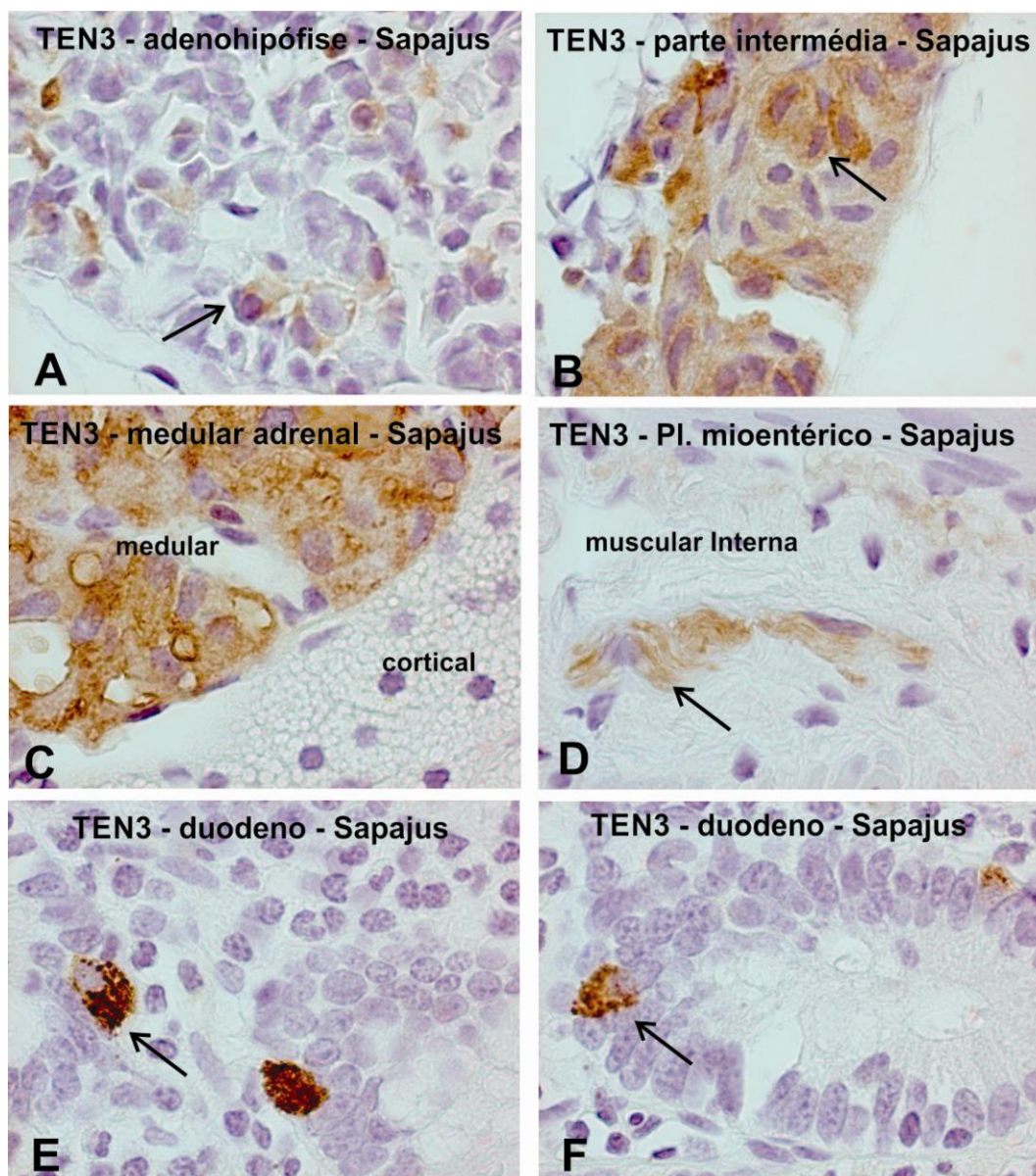


FIGURA 12. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN3 na adeno-hipófise (A), parte intermédia da hipófise (B), medular da adrenal (C), plexo mioentérico do estômago (D) e duodeno (E-F) do Sapajus. Observar que a imunorreatividade para TEN3 é preponderantemente citosólica marcando as células da hipófise (A-B, seta), adrenal, neurônios parassimpáticos do plexo mioentérico (D, seta) e células neuroendócrinas do intestino delgado (E-F, setas). Nota: imunoperoxidase revelado com DAB.

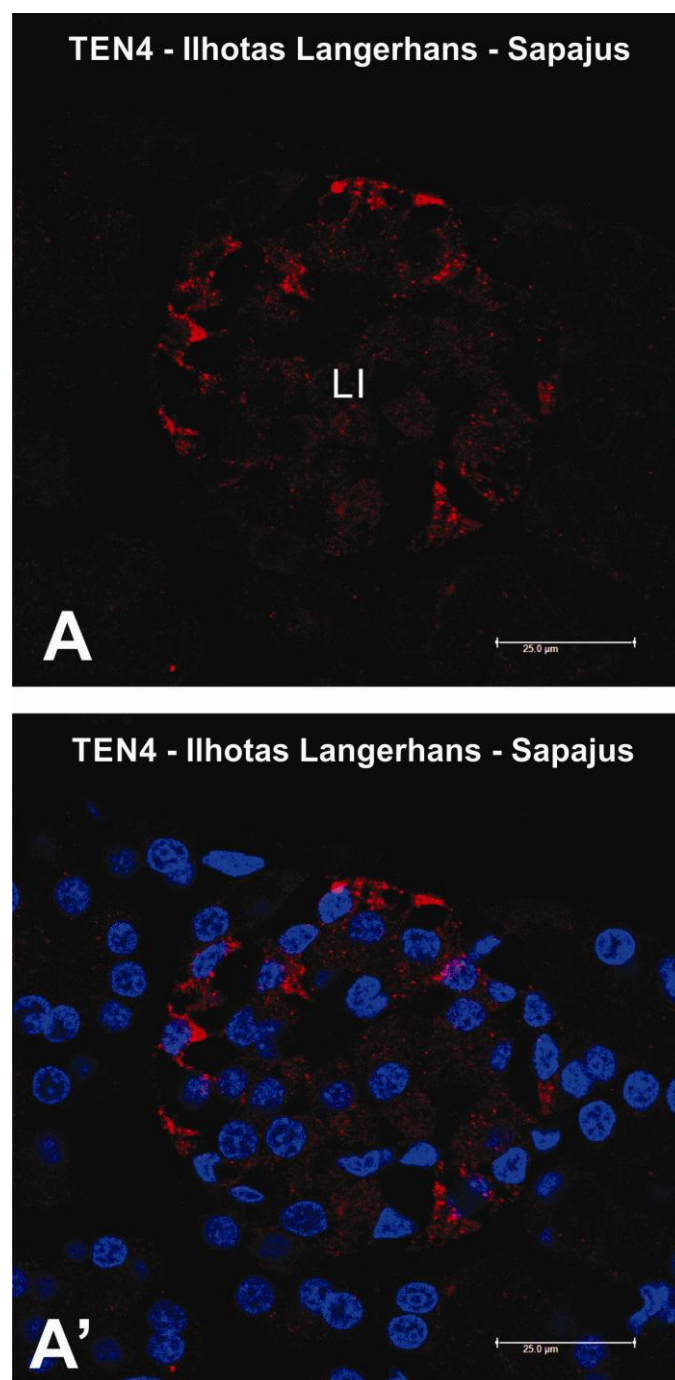


FIGURA 13. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN4 nas ilhotas de Langerhans do pâncreas do Rato Wistar. Nota: Imunofluorescência – TEN4 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul.

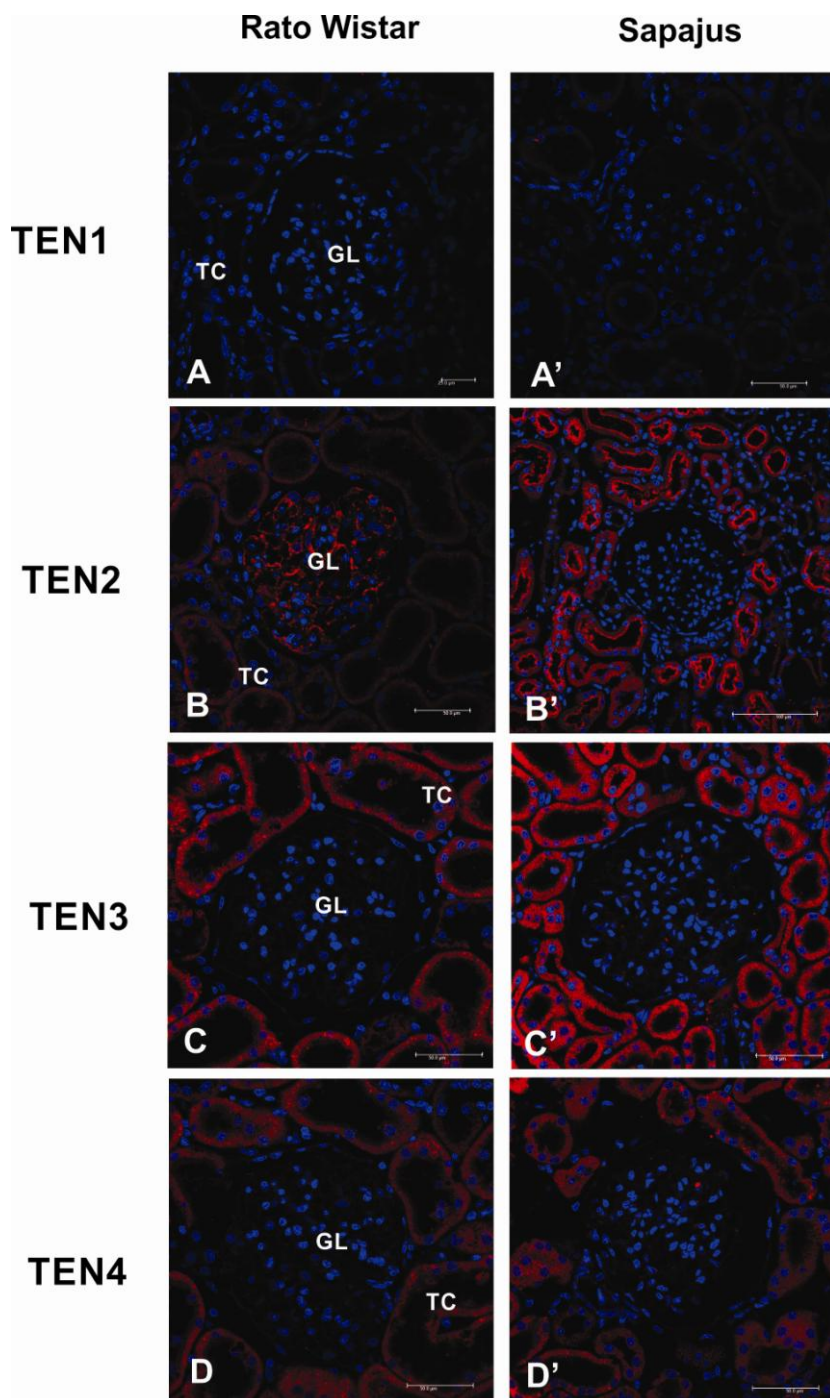


FIGURA 14. Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para as TENS (TEN1-4) no rim do *Sapajus* e do rato Wistar. Nota: Imunofluorescência - TEN3 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul.

Uma segunda bateria de testes imuno-histoquímicos empregou anticorpos que diferiram principalmente na posição dos epítomos (tabela de anticorpos – grafados em amarelo). Os anticorpos identificaram os epítomos, principalmente posicionados na extremidade amino terminal das TENs (com exceção da TEN3), cujo tamanho, processamento intracelular de translocamento nuclear (Nunes et al., 2005), podem ter mascarado alguns resultados imuno-histoquímicos, dificultando a visualização da precipitação do cromógeno. Além disso, este segundo lote de anticorpos são empregados principalmente na técnica de “Western Blotting”, na qual as proteínas são previamente denaturadas (permanecendo em sua conformação primária, facilitando a interação do anticorpo com o epítopo); portanto, o fato de alguns tecidos ou órgãos não exibirem imunorreatividade, similar àquelas obtidas e apresentadas nas figuras anteriores (Figuras 1-14), não significa que não exista a presença da proteína naqueles órgãos-alvo.

Vale ser ressaltado que a imunomarcção nos diversos órgãos (Figuras 15-20) apresentou um padrão similar aquele já descrito anteriormente, ou seja, a sua distribuição homogênea em toda a extensão celular, não havendo uma predileção pela membrana plasmática.

Um ponto que devemos destacar é que em alguns órgãos, a imunorreatividade as TENs, em particular a TEN4 (Figura 20), apresenta-se extremamente discreta e precisa na região da lâmina basal, entre os tecidos epitelial e conjuntivo. Este achado tem sido citado em outros estudos, apontando uma possível importância do sistema peptidérgico das teneurinas na interação entre células de tecidos distintos, tais como na lâmina basal do epitélio seminífero e no epidídimo (Chand et al., 2013). Este fato, tem sido explorado por nosso grupo de pesquisa e, em vista da presença desta imuno-marcção no pulmão de ratos e primatas não-humanos, temos observado que algumas neoplasias de pulmão (exemplo, carcinoma broncogênico e mesoteliomas, dados não publicados) apresentam uma atípica imunorreatividade as TENs. A imunomarcção tem se mostrado alterada entre as células cancerígenas e o tecido conjuntivo de sustentação (dados não publicados).

Em relação ao pulmão, também notamos a presença de macrófagos pulmonares imunorreativos a TEN1 (Figura 15). Entre os vários órgãos analisados, temos raramente observado a imunomarcção em células imunes. Salientamos que o linfonodo, baço e timo mostram padrões particulares de imunomarcações as TENs, que precisam ainda de uma análise criteriosa.

É interessante mencionar a imunomarcção para TEN1 no músculo estriado cardíaco (Figura 17). Esta imunomarcção apresenta-se no formato granular disperso por toda extensão celular e não é possível afirmar se está restrita a algum compartimento intracelular (exemplo, mitocôndria, vesícula de secreção) ou mesmo se tratar de algum complexo mutiproteico citosólico (Figura 17). Além disso, também destacamos a imunomarcção para TEN1 no gânglio trigeminal (gânglio sensorial), em particular nos pericários de pequeno diâmetro, sabidamente envolvidos no processamento nociceptivo (Figura 17), além do testículo, epidídimo e rim (Figura 16). As TEN2 e TEN3 mostraram imunorreatividade similar com estes anticorpos (Figuras 18 e 19).

Em que pese o fato das imunomarcções as TENs, aparentemente, terem se mostrado específicas e constantes; a expressão das TENs nestes órgãos-alvo somente será confirmada após a análise dos mesmos pelo método de hibridização *in situ*, ou mesmo através do RT-PCR.

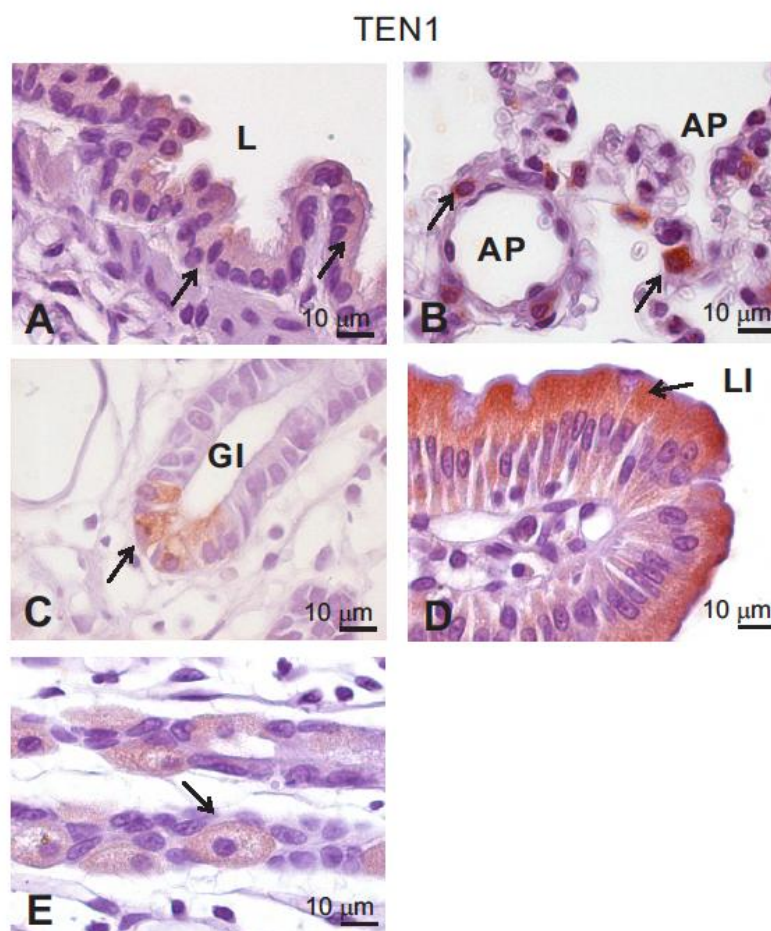


FIGURA 15. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN1 em tecidos e órgãos de ratos Wistar, através do método da imunoperoxidase indireta. A, imunorreatividade citosólica nas células do epitélio do bronquíolo terminal (setas). B, presença de macrófagos imunorreativos a TEN1 distribuídos entre os alvéolos pulmonares terminais. C, células neuroendócrinas imunorreativas a TEN1, posicionadas na base das glândulas intestinais do duodeno (seta). D, células absortivas exibindo distribuição homogênea de imuno-marcação (seta), posicionadas na vilosidade intestinal do duodeno. E, células principais (seta) do intestino, posicionadas nas glândulas intestinais exibindo imunorreatividade a TEN1. Nota: imunoperoxidase revelado com DAB. Abreviações: AP, arteríola pulmonar; GI, glândula intestinal; L, lúmen do bronquíolo terminal; LI, lúmen intestinal.

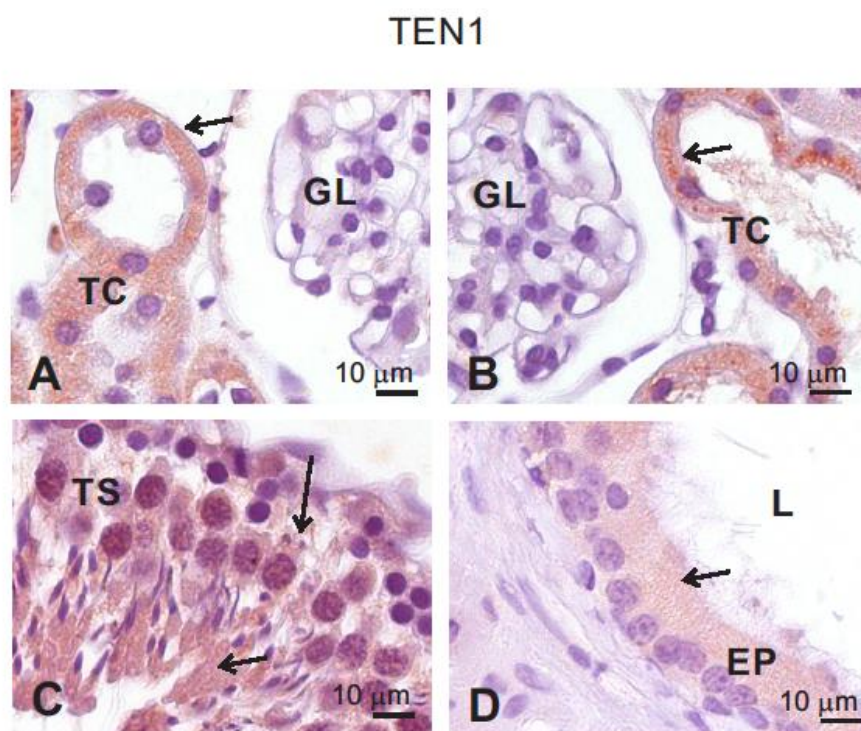


FIGURA 16. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN1 em tecidos e órgãos de ratos Wistar, através do método da imunoperoxidase indireta. A-B, células epiteliais renais (setas) do túbulo contorcido proximal imunorreativas a TEN1. C, células do epitélio seminífero reativo, mostrando inúmeros espermatócitos (setas). D, células epiteliais do epidídimo mostrando discreta imunorreatividade a TEN1. Nota: imunoperoxidase revelado com DAB. Abreviações: GL, glomérulo renal; TC, túbulo contorcido proximal; TS, túbulo seminífero; L, lúmen do epidídimo.

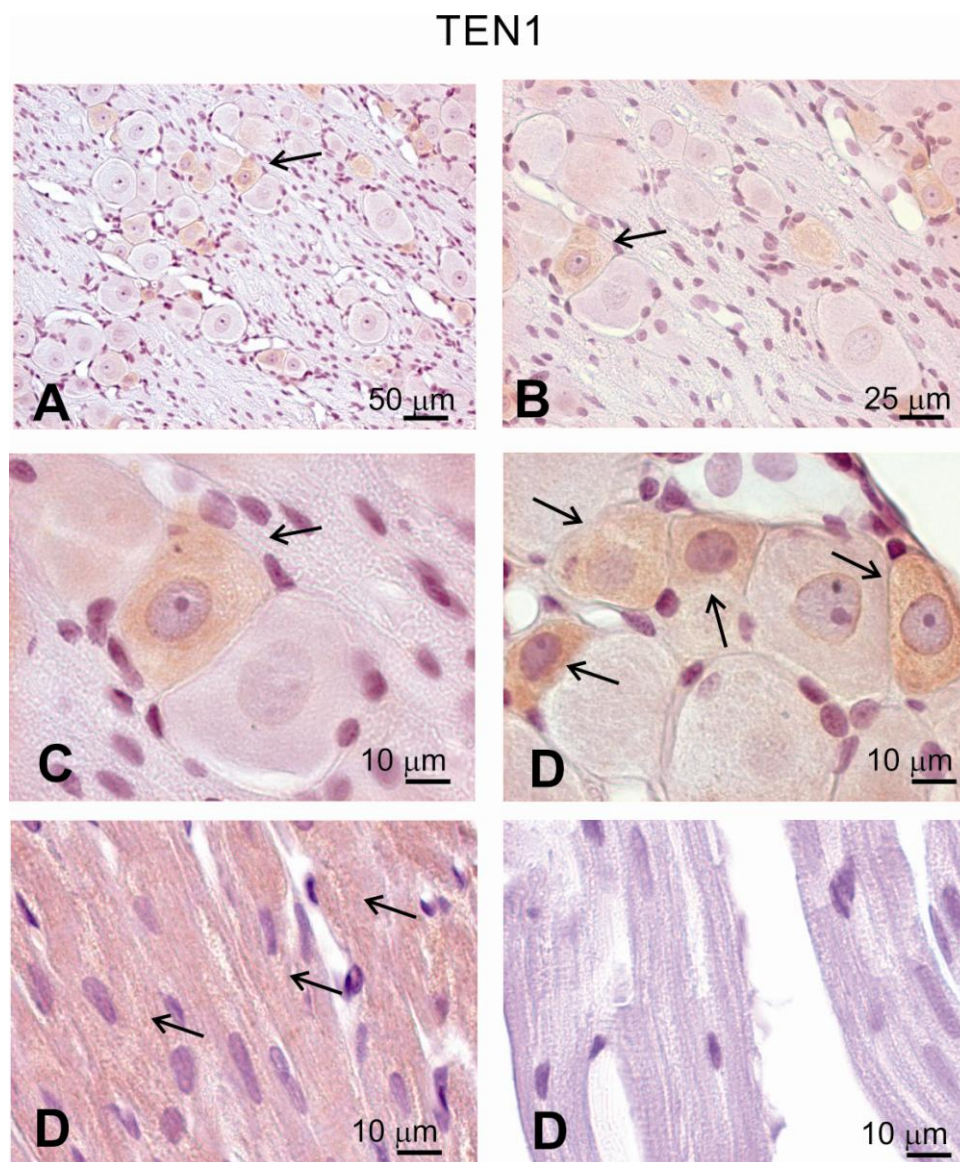


FIGURA 17. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN1 em tecidos e órgãos de ratos Wistar, através do método da imunoperoxidase indireta. Observar imunomarcção para TEN1 no gânglio trigeminal do rato Wistar (gânglio sensorial), em particular nos pericários de pequeno diâmetro (A-D, setas). E, células musculares estriadas ventriculares exibindo imunorreatividade citosólica granular. Para comparação é mostrado um corte histológico isento de imunorreatividade (F). Nota: imunoperoxidase revelado com DAB.

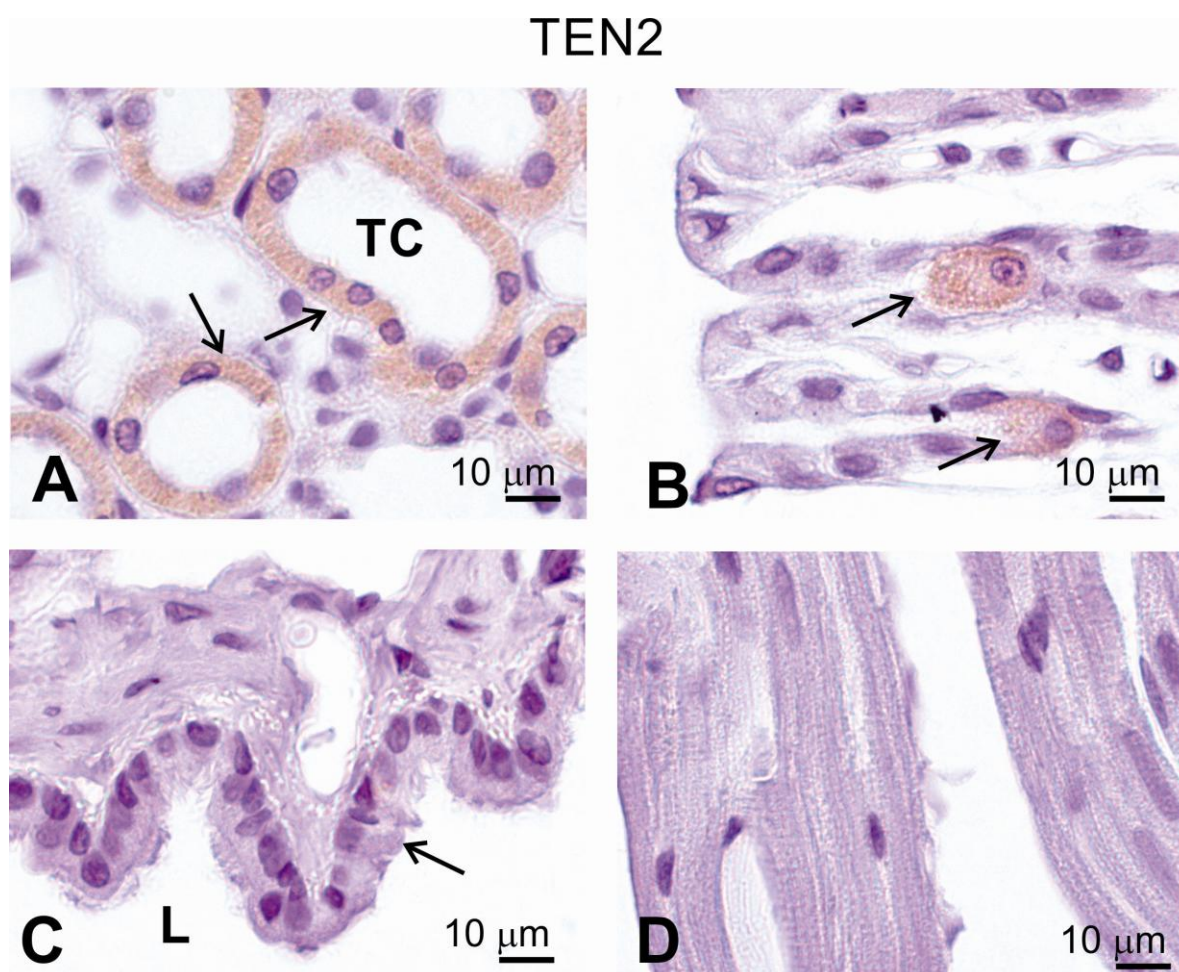


Figura 18. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN2 em tecidos e órgãos de ratos Wistar, através do método da imunoperoxidase indireta. A, células epiteliais renais do túbulo contorcido exibindo imuno-marcação para TEN2. B, células principais das glândulas intestinais também exibindo imunorreatividade. C-D, células epiteliais (seta) de revestimento do bronquíolo terminal e células musculares estriadas esqueléticas com ausência de imunorreatividade a TEN2. Nota: imunoperoxidase revelado com DAB. Abreviações: TC, túbulo contorcido proximal; L, lúmen do bronquíolo terminal.

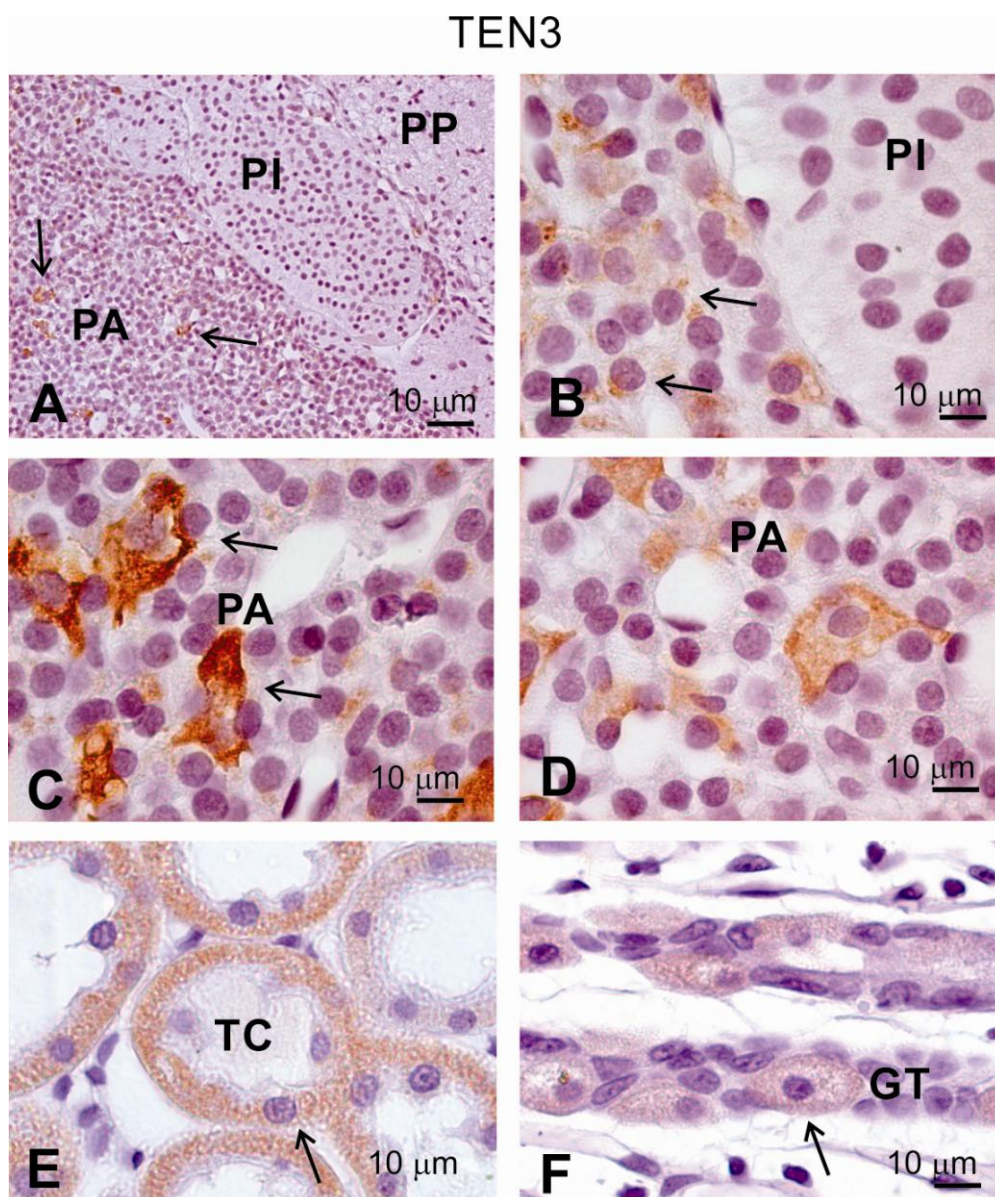


Figura 19. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN3 em tecidos e órgãos de ratos Wistar, através do método da imunoperoxidase indireta. A-D, observar imunorreatividade associada a hipófise, principalmente na região anterior (adenohipófise) (setas). E, células epiteliais renais exibindo imunorreatividade, posicionadas nos túbulos contorcidos proximais. F, células principais das glândulas intestinais também exibindo imunorreatividade a TEN3. Nota: imunoperoxidase revelado com DAB. Abreviações: PA: parte anterior da hipófise; PI, parte intermédia; PP: parte posterior; TC, túbulo contorcido proximal; GT, glândula intestinal.

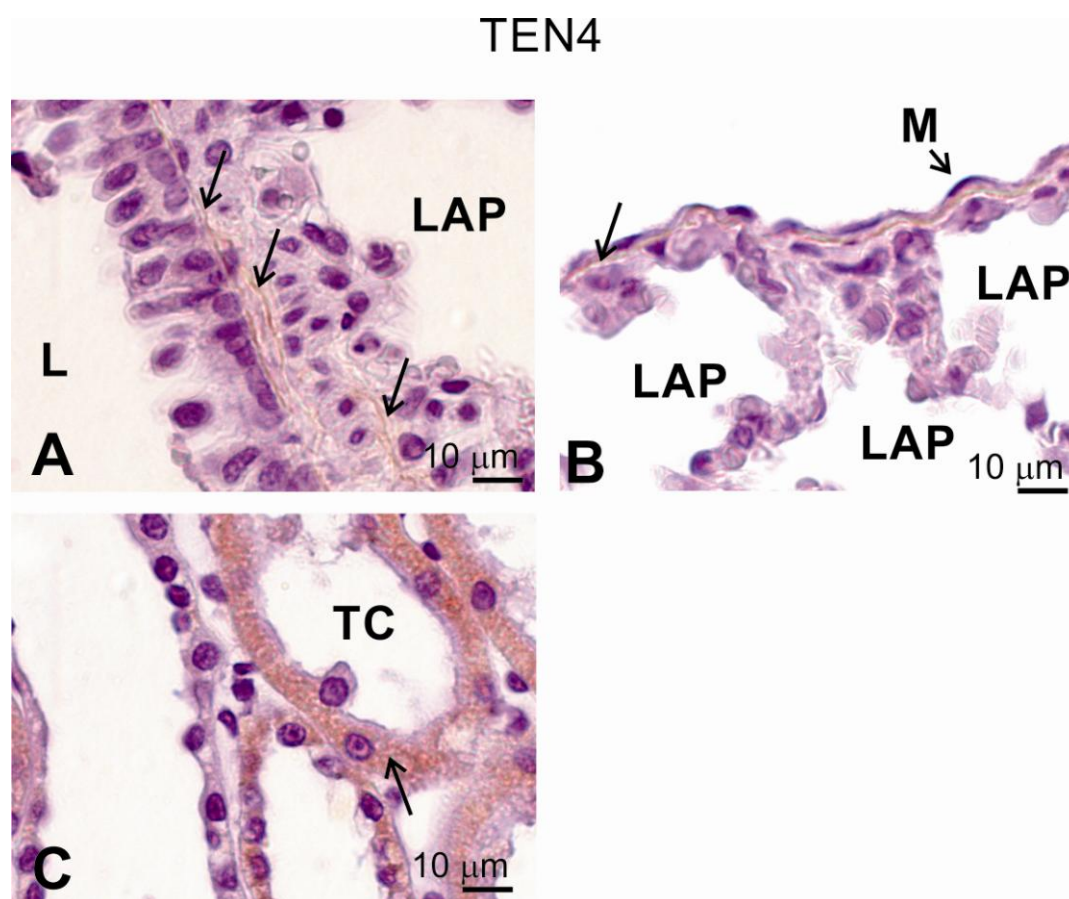


FIGURA 20. Fotomicrografia em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a TEN4 em tecidos e órgãos de ratos Wistar, através do método da imunoperoxidase indireta. Observar imunorreatividade discreta na região da lâmina basal, entre os tecidos epitelial e conjuntivo (A, bronquíolo terminal; B, folheto visceral, mesotélio). C, células epiteliais renais exibindo imunorreatividade, posicionadas nos túbulos contorcidos proximais. Nota: imunoperoxidase revelado com DAB. Abreviaturas: L, lúmen do bronquíolo terminal; LAP, lúmen do alvéolo terminal; TC, túbulo contorcido proximal. 21

4.2. RT-PCR CONVENCIONAL

A análise de expressão gênica pelo método do RT-PCR foi realizada em diversos tecidos e órgãos (córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, hipófise, tireoide/paratireoide, traqueia, pulmão, timo, coração, fígado, estômago, pâncreas, duodeno, intestino grosso, baço, linfonodo, testículo, epidídimo, próstata, vesícula seminal, ovário, útero, tuba uterina) de espécimes advindas de ratos. Alguns resultados são apresentados (Figuras 21 a 23) mostrando que as TENs são expressadas diferentemente nos diversos tecidos e órgãos. Além disso, as expressões dos TCAPs (associado a porção carboxila das teneurinas) podem ocorrer independentemente das TENs (Figuras 21 a 23). Em resumo, observamos que a expressão gênica tem comprovado os achados imuno-histoquímicos, com raras exceções.

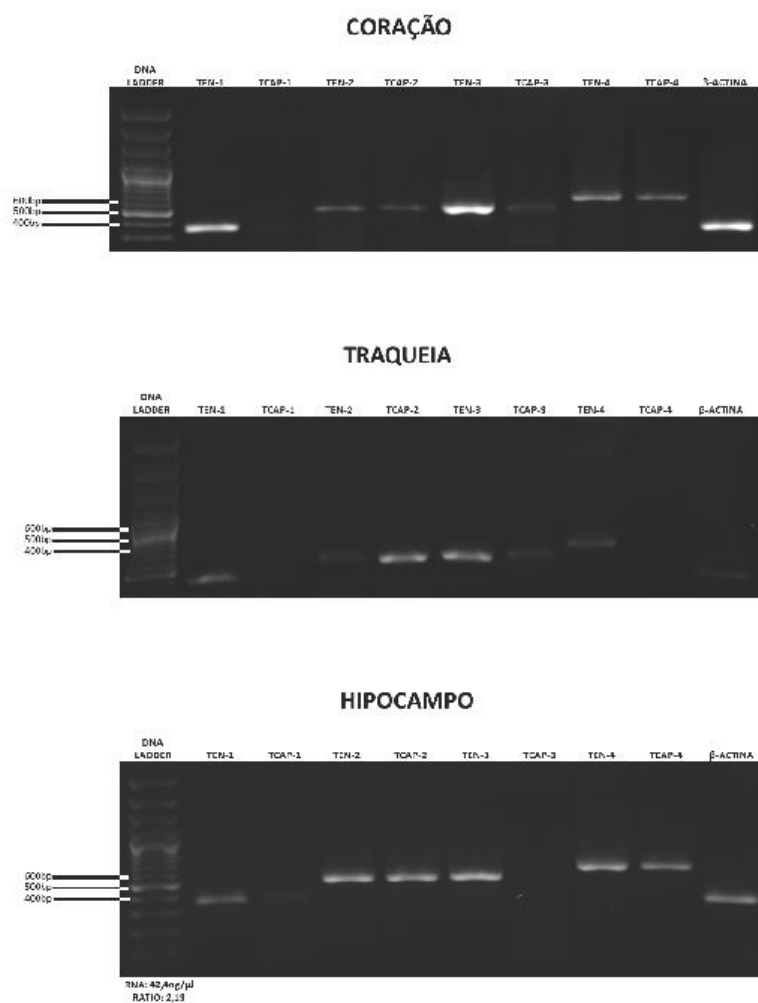


FIGURA 21. Gel de agarose mostrando os produtos de amplificação do RT-PCR convencional obtidos pelo uso de primers para TENS/TCAPS e beta-actina e RNA total extraído do coração (A), Traquéia (B) e hipocampo (C) de ratos Wistar.

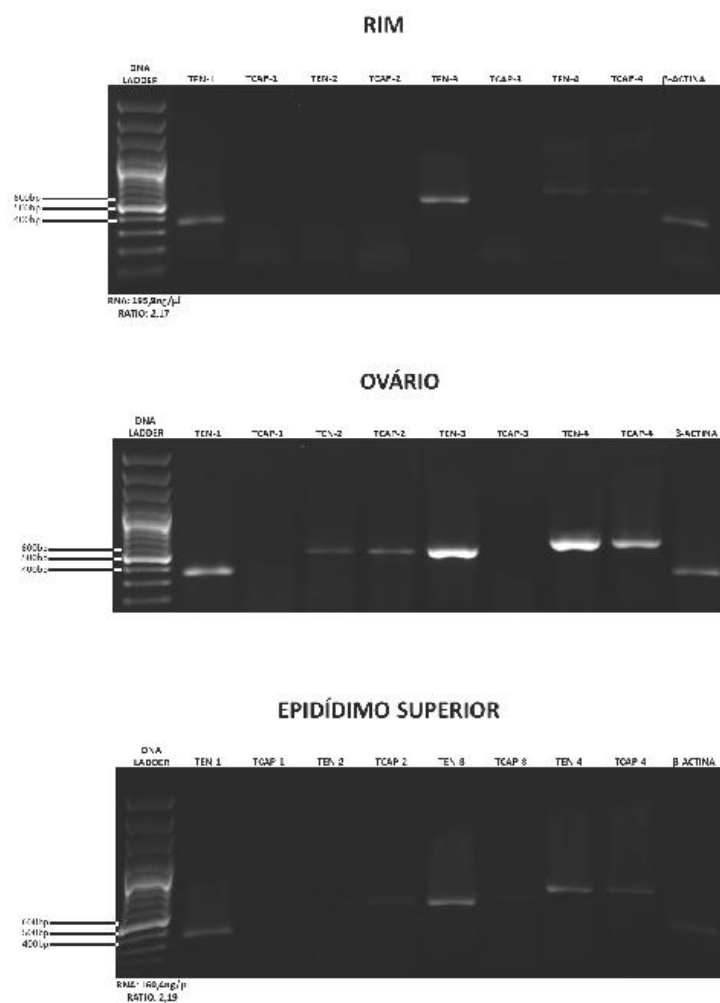


FIGURA 22. Gel de agarose mostrando os produtos de amplificação do RT-PCR convencional obtidos pelo uso de primers para TENs/TCAPS e beta-actina e RNA total extraído do rim (A), ovário (B) e epidídimo superior(C) de ratos Wistar.

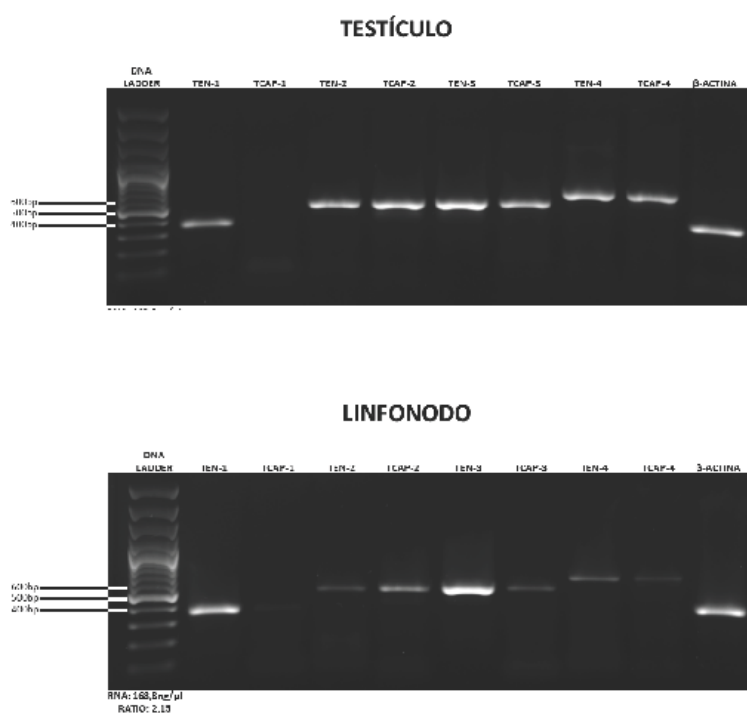


FIGURA 23. Gel de agarose mostrando os produtos de amplificação do RT-PCR convencional obtidos pelo uso de primers para TENs/TCAPS e beta-actina e RNA total extraído do testículo (A), linfonodo (B) de ratos Wistar.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a distribuição das teneurinas em diversos tecidos e órgãos de ratos e primatas não-humanos (*Sapajus appela*), evidenciando que esta família de peptídeos tem distribuição extensiva e está preservada em primatas não-humanos. Um fato importante é que a imunorreatividade as TENs não estava restrita a membrana celular, como deveria ser previsto, haja vista que se trata de uma proteína transmembrana.

Os estudos iniciais apontaram as TENs como proteínas transmembranas envolvidas principalmente no estabelecimento e manutenção de circuitos sinápticos durante a neurogênese, como por exemplo, no sistema visual. Esta interação intercelular é dependente de interações homofilicas e/ou heterofilicas entre as TENs dos prolongamentos de neurônios que estabelecem sinapses (Oohasi et al., 1999; Minet et al., 1999; Rubin et al., 1999; Tucker e Chiquet-Ehrismann, 2006; Tucker et al. 2007; Kenzelmann et al. 2007; Young and Leamey 2009; Antinucci et al., 2014; Leamey e Sawatari, 2014; Tran et al., 2015; Mosca et al., 2015). Contudo, outros estudos recentes também demonstraram que a interação intercelular pode ser de aspecto heterofilico, entre uma teneurina e outras proteínas transmembranas, tais como as distroglicanas, integrinas e receptores denominados de latrofilinas (receptor de membrana que interage com a alfa-latrotóxina de aracnídeo (Silva et al., 2012; Chand et al., 2012; Chand et al., 2014; Boucard et al., 2014; Woelfle et al., 2015; Mosca et al., 2015). Além desta complexidade de interação do sistema das teneurinas com outras proteínas transmembranas, existem estudos indicando que alguns genes das teneurinas podem apresentar *splice variants* gerando transcritos que podem ser translocados para outras partes da célula ou mesmo secretados para o meio extracelular (Tucker et al., 2001; Leamey e Sawatari, 2014), tais como os peptídeos associados ao terminal carboxila das teneurinas, denominados de TCAPs (Wang et al., 2005; Lovejoy et al., 2009; Chand et al., 2013). Finalmente, as teneurinas apresentam vários domínios de sua parte extracelular que podem ser clivados e, possivelmente, mediar uma ação extracelular (Tuckey et al., 2006; Lovejoy et al., 2009).

Recentemente, tem sido demonstrado que as TENs, também estão envolvidas em processo de regeneração muscular. Assim sendo, foi demonstrado que as células musculares satélites do músculo estriado esquelético apresentam imunorreatividade a TEN4 durante o processo de regeneração celular (Ishii et al., 2015). Além disso, o estabelecimento da placa motora em *Drosophila* é dependente da interação heterofilica das TENs (Mosca et al., 2012). Estudos de nosso grupo de pesquisa mostraram, pela primeira vez, que astrócitos expressam TEN2 durante o

processo de regeneração nervosa no córtex cerebral de ratos submetidos a lesão traumática (manuscrito em preparação para submissão, 2015). Existem também indícios que as TENs possam estar envolvidas em processos de degeneração nervosa do SNC, como no mal de Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, desordens bipolares, entre outras (Heinrich et al., 2013; Ivorra et al., 2014; Bastia-Candias et al., 2015;) ou malformações congênitas, como microftalmia (Scholer et al., 2015).

Portanto, o entendimento do sistema peptidérgico das TENs está se ampliando nos últimos anos. Além disso, o envolvimento das TENS com diversos órgãos periféricos também tem resultado em vários estudos, associados ou não com alterações patológicas, tais como tumores pulmonares, adenoma na hipófise e linfomas em humanos (Vinatzer et al., 2008; Ziegler et al., 2012; Zhang et al., 2014; Vater et al., 2015) e, possível ação dos TCAPs no controle da glicemia em ratos (Lovejoy et al., 2015, manuscrito em revisão). Nosso grupo de pesquisa, baseado nos achados morfológicos do presente estudo, tem mostrado a presença de TENs na hipófise de ratos e de primatas não-humanos, assim como no sistema respiratório. Estes dados tem dado suporte para direcionar nossas análises em tumores de pâncreas, pulmão e adrenal de humanos a fim de correlacionar alterações da imunorreatividade das teneurinas com estas neoplasias (estudos em andamento). Além disso, a presença das TENs e do TCAP1 (associado a teneurina) nas ilhotas de Langerhans, tanto de ratos quanto de primatas não-humanos, forneceram suporte para os estudos, indicando uma ação hipoglicêmica deste sistema em ratos (Lovejoy et al., 2015, manuscrito em revisão).

Vale ser destacado que nossos dados apontam também que a TEN3 pode ser parte de um sistema neuroendócrino, haja vista sua ampla distribuição em células com características neuroendócrinas da hipófise, tireoide, adrenal e pâncreas de ratos e primatas não-humanos. Estes dados têm suportado nossos resultados no SNC de primatas e ratos, cuja distribuição dos neurônios imunorreativos a TEN3 esta principalmente localizada na região hipotalâmica (dados ainda não publicados). Isto posto, entendemos, que nossos estudos com hibridização *in situ*, que estão em andamento, poderão confirmar a expressão da TEN3 nestes tecidos e órgãos e seu papel endócrino como uma proteína secretora, independente de sua localização transmembrana, talvez através de um mecanismo de *splice variant* que resulta em transcritos que podem ser secretados no SNC e em órgãos endócrinos.

Alguns trabalhos citam a distribuição em tecidos não-neuronais, principalmente através do método de western blotting, tais como: coração, testículo, rim, fígado, timo, intestino, pulmão e baço, sendo estes dados advindos da análise da expressão proteica e são pouco explorados (Rubin et al., 1999, 2002; Minet et al., 1999; Oohashi et al., 1999; Ben-Zur et al., 2000; Tucker et al., 2001; Zhou et al., 2003). Estes dados suportam nossos achados imuno-histoquímicos e através da expressão gênica pelo método do RT-PCR convencional.

Finalmente, torna-se difícil discutir uma parte significativa de nossos dados que mostraram que a imunorreatividade as TENS não está restrita as membranas celulares, como supostamente entendíamos, previamente a este estudo. Possivelmente, novos estudos deverão indicar que as TENS não são apenas proteínas transmembranas, mas apresentam inúmeros mecanismos de processamento, permitindo atuar no meio extracelular como um sinalizador intercelular.

6. CONCLUSÕES

O sistema neuropeptidérgico das teneurinas tem ampla distribuição em tecidos e órgãos periféricos de roedores, permanecendo preservado em primatas não-humanos. O padrão de marcação das células imunorreativas as teneurinas sugerem que estes peptídeos devem atuar também como sinalizadores autócrinos, parácrinos ou mesmo endócrinos, além de atuarem como proteínas transmembrana. Estudos de hibridização *in situ*, ou mesmo em RT-PCR são necessários para a confirmação dos dados obtidos até o presente momento. Acreditamos que a extensa quantidade de resultados obtidos neste trabalho de pesquisa deverá dar suporte para avaliar com outras metodologias o sistema peptidérgico das teneurinas nos sistemas reprodutor, endócrino, cardiovascular, respiratório, urinário, imunológico e gastrointestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, n. 3, p. 582-592, nov. 2013.

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.*, n. 116, n. 14, p. 2957-66, aug. 2003.

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.*, n. 217, n. 1, p. 107-120, jan. 2000.

BOUCARD, AA; MAXEINER, S; SÜDHOF, TC. Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, v. 289, n. 1, p. 387-402, jan. 2014.

BUERVENICH, S.; XIANG, F.; SYDOW, O.; JONSSON, 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, n. 5, p. 435-436, may 2001.

DUBOVSKY, SL; 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, n. 5, p. 229-234, feb. 1994.

KINEL-TAHAN, Y; WEISS, H; DGANY, O; LEVINE, A; WIDES, R. *Drosophila* odz gene is required for multiple cell types in the compound retina. *Dev. Dyn.*, v. 236, n. 9, p. 2541-54, sep. 2007.

LEAMEY, CA; GLENDINING, KA; KREIMAN, G; KANG, ND; WANG, KH; FASSLER, R; SAWATARI, A; TONEGAWA, S; SUR, M. Differential gene expression between sensory neocortical areas: potential 12 roles for Ten_m3 and Bcl6 in patterning visual and somatosensory pathways. *Cereb Cortex*, v. 18, n. 1, p. 53-66, jan. 2008.

LOSSIE, AC; NAKAMURA, H; THOMAS, SE; JUSTICE, MJ. Mutation of 17Rn3 shows that Odz4 is required for mouse gastrulation. *Genetics*, v. 169, n. 1, p. 285-99, jan. 2005.

LOVEJOY, DA; AL CHAWAF, A; CADINOUCHE, MZ. 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, n. 3, p. 299-305, sep. 2006.

MINET, AD; RUBIN, BP; TUCKER, RP; 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, n. 12, p. 2019-32, jun. 1999.

MOSCA, TJ. On the Teneurin track: a new synaptic organization molecule emerges. *Front Cell. Neurosci.*, v. 27, n. 9, p. 204, may 2015.

NUNES, SM; FERRALLI, J; CHOI, K; BROWN-LUEDI, M; MINET, AD; 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, n. 1, p. 122-32, apr. 2005.

OOHASHI, T; ZHOU, XH; FENG, K; RICHTER, B; MÖRGELIN, M; PEREZ, MT; SU, WD; 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, n. 3, p. 563-77, may 1999.

RUBIN BP; TUCKER RP; 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, n. 1, p. 195-209, dec. 1999.

RUBIN, BP; TUCKER, RP; BROWN-LUEDI, M; MARTIN, D; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurin 2 is expressed by the neurons of the thalamofugal visual system in situ and promotes hemophilic cell-cell adhesion in vitro. *Development*, v. 129, n. 20, p. 4697-705, oct. 2002.

TUCKER, RP; MARTIN, D; KOS, R; CHIQUET-EHRISMANN, R. The expression of teneurin-4 in the avian embryo. *Mech. Dev.*, v. 98, n. 1-2, p. 187-91, nov. 2000.

TUCKER, RP; CHIQUET-EHRISMANN, R; CHEVRON, MP; MARTIN, D; HALL, RJ; RUBIN, BP. 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, n. 1, p. 27-39, jan. 2001.

TUCKER, RP; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurins: A conserved family of transmembrane proteins involved in intercellular signaling during development. *Dev. Biol.*, v. 290, n. 2, p. 237-45, feb. 2006.

TUCKER, RP; KENZELMANN, D; TRZEBIATOWSKA, A; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurins: transmembrane proteins with fundamental roles in development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 39, n. 2, p. 292-7, 2007.

TUCKER, RP; BECKMANN, J; LEACHMAN, NT; SCHÖLER, J; CHIQUET-EHRISMANN, R. Phylogenetic analysis of the teneurins: conserved features and premetazoan ancestry. *Mol. Biol. Evol.*, v. 29, n. 3, p. 1019-29, may 2012.

VIK, A; YATHAM, LN. Calcitonin and bipolar disorder: a hypothesis revisited. *J. Psychiatry Neurosci.*, v. 23, n. 2, p. 109-117, may 1998.

WOELFLE, R; D'AQUILA, AL; PAVLOVIĆ, T; HUSIĆ, M; LOVEJOY, DA. Ancient interaction between the teneurin C-terminal associated peptides (TCAP) and latrophilin ligand-receptor coupling: a role in behavior. *Front Neurosci.*, v. 24, n. 9, p. 146, apr 2015.

YOUNG, TR; LEAMEY, CA. Teneurins: important regulators of neural circuitry. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 41, n. 5, p. 990-3, may 2009.

ZHOU, XH; BRANDAU, O; FENG, K; OOHASHI, T; NINOMIYA, Y; RAUCH, U; FÄSSLER, R. The murine *Tenm/Odz* genes show distinct but overlapping expression patterns during development and in adult brain. *Gene Expr. Patterns*, v. 3, n. 4, p. 397-405, aug. 2003.

ANEXOS:



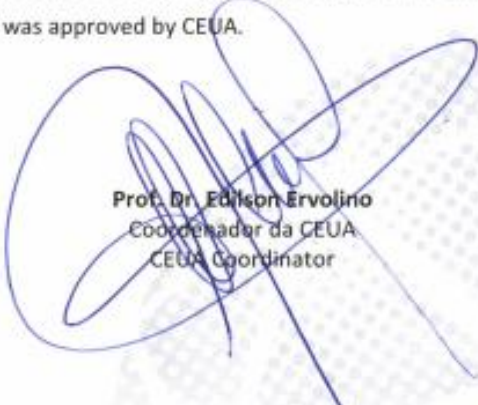
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "*Identificação das teneurinas em tecidos e órgãos de roedores*" sob responsabilidade do Pesquisador **CLÁUDIO APARECIDO CASATTI** e colaboração de Kelly Regina Torres está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 02401-2012.

CERTIFICATE

We certify that the research "*Identification of teneurins in tissue and organs of rodents*", process number 02401-2012, under responsibility of **CLÁUDIO APARECIDO CASATTI** and with collaboration of Kelly Regina Torres agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

