RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/02/2018.

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 BIOCIÊNCIAS 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

Tessarin, 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 Tessarin. - 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 congelação. 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 significante 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 significante 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 postoperatory 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 ± 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

Cy^3- 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

$MgCl_2$ – 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

nn – 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 trancriptase 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

αDG – 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 Confecção 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 TENs 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 TENs 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 significante similaridade tem sido observada na região C-terminal das TENs 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 filogénetica (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.

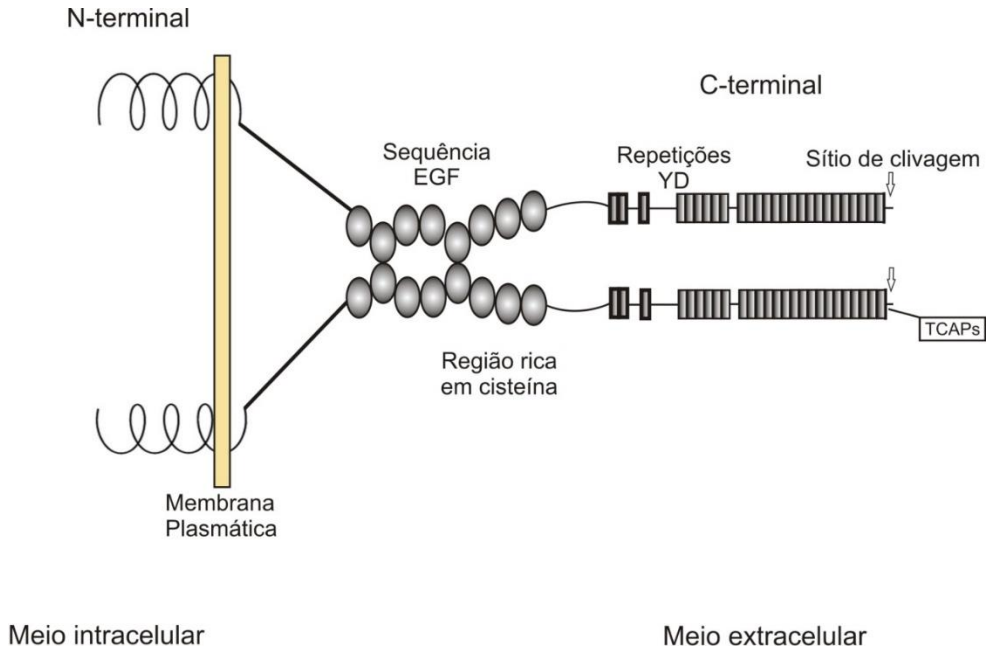

Figura 1. Modelo estrutural esquemático das teneurinas ilustrando a constituição e a organização dimérica (Ilustração extraída e adaptada de LOVEJOY et al., 2006).

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 amídala 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 outros 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-latrotoxina (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 hipocampais 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 β3, 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 demostrado 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 significantemente 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 morfologicamente 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).

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 significantemente, 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.; AKASSOGLOU, 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 αVβ3 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 PKCzeta. 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 fo 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 l7Rn3 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 extracelular 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.

PEKNY, 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 cytotactin 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 cytotactin 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. Neu-ropathol., 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.; WOLLSCHEID, 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.