



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**HORMÔNIO DA TIREÓIDE (T<sub>3</sub>) E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR:  
EFEITOS NA INTERAÇÃO ASTRÓCITO-NEURÔNIO**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Carla Inês Tasca

Departamento de Bioquímica – CCB/UFSC

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – CCB/UFSC

Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – CCB/UFSC

Florianópolis, fevereiro de 2003



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**HORMÔNIO DA TIREÓIDE (T<sub>3</sub>) E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR:  
EFEITOS NA INTERAÇÃO ASTRÓCITO-NEURÔNIO**

Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do título de  
Mestre em Neurociências

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Carla Inês Tasca  
Departamento de Bioquímica – CCB/UFSC

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Andréa Gonçalves Trentin  
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – CCB/UFSC

Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar  
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – CCB/UFSC

Florianópolis, fevereiro de 2003



Aos meus filhos,  
Felipe, Beatriz e Isabela.  
Ao meu esposo,  
Lúcio

*Acreditar em algo e não o viver é desonesto.  
(Gandhi)*

## AGRADECIMENTOS

À Carla, que antes de ser uma grande orientadora, é uma grande amiga. Você é daquelas pessoas que não nos deixam sair de perto sem estarmos nos sentindo melhor. Obrigada por ter me adotado, pelas preocupações divididas e por todo o seu empenho. E, vamos continuar os trabalhos, ou você achou que iria se livrar de mim assim tão fácil?

À Andréa, minha querida orientadora e amiga, que me emprestou sua linha de pesquisa e me fez ver o quanto ela é fascinante e que acreditou na minha capacidade; ao Márcio, também pela amizade e por sempre saber as respostas das nossas dúvidas. Obrigada aos dois pela confiança depositada. Este ano longe de vocês foi duro, mas a experiência tirada é tão importante na minha vida quanto o meu trabalho.

À Yara, minha professora e coordenadora do curso de Pós-graduação em Neurociências, muito obrigada por tudo e ao Nivaldo, por todo o apoio.

Ao professor Vivaldo, meu ídolo, que abrindo as portas do seu laboratório para mim, fez com que novas perspectivas surgissem na minha vida. Muito obrigada!

Aos meus queridos amigos do laboratório:

Bruno, sem você este trabalho não teria acabado. Muito obrigada por toda a ajuda que você me deu. Desde o início você mostrou ser um grande pesquisador e com certeza terá muito sucesso na vida.

Giordano, meu querido amigo e afilhado. Você me ensinou os primeiros passos no laboratório! Ao longo de todos esses anos, fomos aprendendo um com o outro, mas, o mais importante e acredite, essencial para mim, foi que aprendemos a diminuir nossas diferenças, a gostar um do outro e a construir uma grande e bela amizade. E, além disso, foi por seu intermédio que conheci uma das amigas mais doces que podem existir, a minha afilhada linda, Eloísa. Adoramos vocês e vamos sentir muito a sua falta. Mas estaremos torcendo sempre por vocês!

Ricardo, meu grande amigo e parceiro de paper. Você é o cara mais pesquisador que conheço e um dia com certeza estará entre os “grandes nomes”. Obrigada pelo auxílio em todos os experimentos e claro, por todos os momentos de descontração e musicais. Sabrina, obrigada pela amizade (e pelos momentos de fofoca também).

Marco, meu grande amigo e assessor de estatística e de cultura. Obrigada por toda a sua ajuda e por todas as conversas. Marcele, a mais nova componente do grupo, seja bem-vinda!

Evaldo, meu grande amigo, o homem PCR, obrigada por ter sido meu guia no Rio e por ter vindo pra Florianópolis trazendo novos conhecimentos para o nosso laboratório. Obrigada também por todos os bate-papos e por ter sido um ombro amigo. Defino você e sua alegria em uma frase: “oba, vai ter festa? Não sei quando e nem onde, mas eu vou!”

E, aos mais novos do lab, Carlos (o fashion), Ezequiel (o turista), Aloísio (nosso major) e Fabíola (minha parceira da ala feminina do lab), obrigada por todo o esforço e por entrarem no clima. Vocês são ótimos e com certeza, de uma forma ou de outra, contribuíram com o meu trabalho.

À Laudete, obrigada pelo apoio técnico e pela amizade.

À Michela, minha colega de curso e grande amiga. Obrigada por dividir comigo os momentos negros, mas principalmente, obrigada pelos momentos maravilhosos vividos em sala de aula ou não.

Aos alunos do laboratório de Neuroquímica, Karina, Sheila, Carla, Tiago, Helena, Dani e Rossana, pela amizade e por me receberem de braços abertos. Simone, obrigada por dividir todo o estresse final da dissertação e por dividir a orientadora.

Aos professores da graduação de Ciências Biológicas, principalmente Margherita, Afonso, Risoleta, Kay, Paulinho Simões, Paulo Hoffmann e Gareth. Vocês estão diretamente ligados à conclusão deste trabalho, pois formaram a base da minha carreira científica.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Neurociências, principalmente Nelson Gabilan e Rodrigo Bainy Leal, obrigada por todo o conhecimento e amizade.

Ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia, principalmente aos professores Mário Steindel e Edmundo Grisard, que possibilitaram a realização deste trabalho pelo empréstimo do microscópio de fluorescência.

Aos meus amigos da UFRJ: Fábio, Jane, Rose, Luciana, Sheila, dona Ivone. Vocês são amigos muito especiais na minha vida, obrigada por me receberem tão bem, por me fazerem sentir em casa em pleno Rio de Janeiro.

À Sandra, minha querida amiga francesa, obrigada por ser uma das melhores amigas que alguém pode ter. Do fundo do meu coração, muito obrigada por tudo mesmo!

À minha sogra, Lúcia e ao meu sogro, Beda, obrigada por todo o apoio pessoal e financeiro e pela ajuda em concretizar o nosso sonho.

Ao meu cunhado, Luciano e à minha cunhada Vanessa, obrigada por todo apoio e incentivo e pela força na conclusão do trabalho.

Ao vô Azizo e todos os tios e tias, primos e primas. Obrigada por sempre torcerem por mim e por formarem a família mais maravilhosa do mundo!

Ao meu pai, Luiz, e à minha vó Ester, que não ocupam mais o seu lugar físico conosco, mas que são presença constante em minha vida. Muito obrigada!

À minha mãe, Aidée, obrigada por sempre nos incentivar a estudar e por ter orgulho disso. Obrigada também por toda a ajuda habitacional, financeira e pelo auxílio-creche.

Ao meu irmão Daniel, obrigada por ter sido uma das pessoas mais importantes na minha decisão de voltar a estudar. Você é um dos responsáveis pela realização deste trabalho. Tenho muito orgulho de você! Dafni, valeu a força! Adoro vocês.

Ao meu amado esposo, Lúcio, que com certeza é a pessoa a quem eu mais preciso agradecer. Nos momentos em que eu pensei em desistir, foi o Lúcio quem me incentivou a continuar. Nos momentos de mérito, foi o Lúcio quem ficou mais feliz. Quando o cansaço tomava conta, o Lúcio foi o meu colo. Por isso Lúcio, eu não tenho palavras pra te agradecer. Só posso falar que eu te amo, e que eu espero que algum dia eu possa retribuir tudo o que você fez por mim!

Aos meus amados filhos, Felipe (o gênio da casa), Beatriz (a ternura em forma de gente), Isabela (a nossa artista), que todos os dias me perguntavam impacientes, “mãe, acabou a tese?”, agora eu posso responder: “acabou”. Quero agradecer a vocês três, primeiro por existirem na minha vida. Segundo, porque vocês sofreram pela minha ausência, mas souberam compreender com bondade e carinho. Por isso meus amores, agradeço de coração a vocês. Amo vocês!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 – AS CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC).....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 – CITOESQUELETO .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1 – Filamentos intermediários .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 - MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1 – Laminina .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2 – Fibronectina .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.3 – Proteoglicanos .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 – FATOR DE CRESCIMENTO BÁSICO DE FIBROBLASTOS (bFGF) .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 – HORMÔNIO DA TIREÓIDE (T<sub>3</sub>) .....</b>	<b>12</b>
<b>2 - OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 – ANIMAIS .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 – MATERIAIS .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 – EQUIPAMENTOS .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 – MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.1 - Cultura de células .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.2 - Tratamento com 3, 3',5' Triiodo-L-tironina (T<sub>3</sub>) .....</b>	<b>22</b>

3.4.3 - Tratamento com fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF)....	23
3.4.4 - Tratamento com anticorpo neutralizante de bFGF .....	23
3.4.5 – Imunocitoquímica .....	23
3.4.6 - Dosagem de proteínas .....	24
3.4.7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	24
3.4.8 – Eletrotransferência e imunodeteccção .....	25
3.4.9 - Ensaio de tripsinização .....	25
3.4.10 - Análise estatística .....	26
<b>4 – RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
4.1 – ANÁLISE DO TIPO CELULAR .....	27
4.2 – ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR .....	27
4.3 – ANÁLISE DOS EFEITOS DE T <sub>3</sub> SOBRE A ORGANIZAÇÃO E A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE MEC .....	29
4.3.1 – Organização de laminina .....	29
4.3.2 – Organização de fibronectina .....	32
4.3.3 - Expressão de laminina e fibronectina .....	32
4.4 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO bFGF NA ORGANIZAÇÃO DE MEC .....	37
4.4.1 – Efeitos do tratamento com bFGF .....	37
4.4.2 – Efeitos do tratamento com anticorpo anti-bFGF .....	43
4.5 - ANÁLISE DOS EFEITOS DO T <sub>3</sub> NA ADESÃO CELULAR .....	46
4.6 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO NEURONAL E NEURITOGÊNESE MEDIADO POR ASTRÓCITOS .....	48
<b>5 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
5.1 – ASPECTOS GERAIS DA AÇÃO DO T <sub>3</sub> .....	50
5.2 – FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS E MORFOLOGIA.....	51
5.3 – EFEITOS DO T <sub>3</sub> NA ORGANIZAÇÃO E EXPRESSÃO DE LAMININA E FIBRONECTINA .....	52
5.4 – EFEITOS DO T <sub>3</sub> NA ADESÃO CELULAR .....	55

<b>5.5 – EFEITO DO bFGF NA ORGANIZAÇÃO DE LAMININA E FIBRONECTINA .....</b>	<b>55</b>
<b>6 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 – Representação esquemática de matriz extracelular .....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 2 – Esquema de ativação e inativação metabólica de hormônios da tireóide, através da ação das enzimas 5'-desiodases.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 3 – Representação esquemática de ligação do T<sub>3</sub> ao seu receptor nuclear.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 4 – Marcação de GFAP em cultura de astrócitos cerebelares.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 5 – Efeitos do T<sub>3</sub> na organização de vimentina.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 6 – Fotografia de microscopia de contraste de fase de astrócitos cerebelares em cultura.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 7 – Efeitos do T<sub>3</sub> na organização de laminina em astrócitos cerebelares. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 8 – Efeitos de diferentes concentrações de T<sub>3</sub> na organização de laminina....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 9 – Efeitos de diferentes concentrações de T<sub>3</sub> na organização de fibronectina. ....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 10 – Efeitos do T<sub>3</sub> na expressão de laminina e fibronectina.....</b>	<b>36</b>

<b>Figura 11 – Efeitos do bFGF na organização de laminina. ....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 12 – Efeitos do bFGF na organização de laminina.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 13 – Efeitos do bFGF na organização de fibronectina. ....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 14 – Efeitos do bFGF na organização de fibronectina.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 15 – Efeitos do anticorpo neutralizante de bFGF na organização de laminina. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 16 – Efeitos do anticorpo neutralizante de bFGF na organização de fibronectina. ....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 17 – Efeitos do T<sub>3</sub> sobre a adesão celular.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 18 – Fotografia de microscopia de contraste de fase de co-cultura de astrócitos e neurônios cerebelares. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 19 - Modelo do efeito do T<sub>3</sub> no desenvolvimento neuronal mediado pelos astrócitos cerebelares.....</b>	<b>58</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

aFGF: fator ácido de crescimento de fibroblastos

ATP: trifosfato de adenosina

bFGF: fator básico de crescimento de fibroblastos

BSA: albumina sérica bovina

DAB: di-amino-benzidina-tetra-hidrocloro

DAPI: di-amino-fenil-indol

DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTT: ditioneitol

ECL: quimioluminescência

EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético

GAGs: glicosaminoglicanos

GFAP: proteína glial ácida fibrilar

GTP: trifosfato de guanosina

HEPES: ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etanosulfônico

IL-3: interleucina-3

MEC: matriz extracelular

PBS: salina tamponada por fosfato

PGs: proteoglicanos

rT<sub>3</sub>: T<sub>3</sub> reverso

RXR: receptor de 9-cis-ácido retinóico

SBF: soro bovino fetal

SDS: dodecil sulfato de sódio

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

T<sub>2</sub>: diiodotironina

T<sub>3</sub>: triiodotironina

T<sub>4</sub>: tiroxina

TBS-T: tampão Tris-salina com Tween

TNF- $\beta$ : fator de necrose tumoral  $\beta$

TRE: elemento de resposta ao hormônio da tireóide

TRs: receptor do hormônio da tireóide

## RESUMO

O hormônio da tireóide,  $T_3$ , é essencial para o desenvolvimento e diferenciação em muitos órgãos, inclusive no SNC. Durante o período neonatal, a deficiência em  $T_3$  pode resultar em retardo mental e físico, conhecido em humanos como cretinismo. É possível que a carência de  $T_3$  provoque uma falha nas sinalizações intra e extracelulares, interferindo no crescimento e diferenciação de células gliais e neurônios, inclusive no estabelecimento de sinapses e, conseqüentemente, no desenvolvimento normal do SNC. Estas falhas podem estar relacionadas com o padrão de organização de moléculas de matriz extracelular, como laminina e fibronectina, já que estas proteínas são envolvidas em processos celulares como diferenciação, proliferação, migração e adesão. O bFGF pode ser um mediador dos efeitos do  $T_3$ , por ser o principal fator de crescimento encontrado no meio condicionado de astrócitos tratados com  $T_3$ . Neste estudo, demonstramos que  $T_3$  promove reorganização e aumento na expressão de laminina e fibronectina em astrócitos cerebelares de ratos neonatos e que estes efeitos são reproduzidos parcialmente pelo tratamento com bFGF. A adição de anticorpo neutralizante de bFGF reverteu as alterações na organização de laminina e fibronectina promovidas pelo  $T_3$  para a organização dessas moléculas observadas nas células controle. O tratamento com  $T_3$  promoveu um menor destacamento de astrócitos do seu substrato de adesão. Neurônios cultivados sobre monocamadas astrocitárias tratadas com  $T_3$  foram mais numerosos e apresentaram mais neuritos do que os cultivados sobre astrócitos controles. Os efeitos do  $T_3$  na atividade astrocitária podem influenciar o desenvolvimento neuronal por diferentes mecanismos que não são exclusivos: fatores de crescimento solúveis, matriz extracelular e/ou contatos diretos célula-célula.

**ABSTRACT**

The thyroid hormone, T<sub>3</sub>, plays crucial roles in the growth and differentiation of many organs, including the central nervous system (CNS). Deficiency of T<sub>3</sub> during the neonatal period results in severe mental and physical retardation, known in humans as cretinism. T<sub>3</sub> deficiency may induce a failure in cellular signaling, interfering with growth and differentiation of glial cells and neurons, including synapse formation and consequently in the normal development of CNS. These failures may be related to the organization pattern of extracellular matrix molecules as laminin and fibronectin, proteins which are involved in cellular processes as differentiation, proliferation, migration and adhesion. bFGF may be a mediator of T<sub>3</sub> effects, considering it is the main growth factor present in the conditioned medium of T<sub>3</sub>-treated astrocytes. In this study, we showed that T<sub>3</sub> induces reorganization and increases the expression of both laminin and fibronectin in cerebellar astrocytes from newborn rats. These effects are partially reproduced by bFGF. In addition, the reorganization of both laminin and fibronectin observed in T<sub>3</sub>-treated astrocytes was abolished by the neutralizing anti-bFGF. Moreover, the number of detached astrocytes following trypsinization of T<sub>3</sub>-treated cells was significantly lower than that of controls. Regarding neuron-astrocytes interaction, cerebellar neurons co-cultured on T<sub>3</sub>-treated astrocytes are more numerous and presented longer neurites. These effects of thyroid hormone on astrocyte activity may influence neuronal development by diverse mechanisms as secretion of growth factors, extracellular matrix and/or direct cell to cell contacts.

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 – AS CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

As funções do SNC baseiam-se na atividade coordenada de dezenas de bilhões de neurônios, mediando desde funções primitivas, como reações reflexas a estímulos simples do ambiente, até a complexa percepção do meio externo, mecanismos de atenção e o controle de movimentos delicados e precisos (AIRES, 1999). Vários tipos celulares são integrados anatômica, bioquímica e fisiologicamente para produzir o funcionamento normal do tecido nervoso (ZIGMOND *et al.* 1999). As células que compõem o SNC são os neurônios e as células da glia.

Neurônios são células altamente polarizadas, os quais são responsáveis pela transmissão de impulsos elétricos, através de modificações do potencial elétrico de membrana (KANDELL *et al.* 1991; ZIGMOND *et al.* 1999). Em geral, um neurônio possui quatro regiões distintas: corpo celular ou pericário, dendritos, axônio e terminais axonais. O corpo celular corresponde à região onde se localizam o núcleo e muitas das organelas celulares. Na superfície do corpo celular são encontrados os dendritos, estruturas especializadas em receber sinais de células sensoriais ou de axônios de outros neurônios. Dependendo do tipo de neurônio, pode haver desde apenas algumas centenas até 200.000 destas conexões. O axônio, normalmente único em um neurônio, é altamente especializado na transmissão de impulso elétrico ou potencial de ação, ao longo de todo o seu comprimento. O terminal axonal ou botão terminal localiza-se extremidade final do axônio e é o local onde o axônio tem contato com outros neurônios ou outras células, transmitindo a informação a elas (DARNELL *et al.* 1990; BEAR *et al.* 1996; GUYTON & HALL, 1996; ZIGMOND *et al.*, 1999). O corpo celular dos neurônios e os axônios são envolvidos por

células gliais, que não são apenas essenciais para o processamento das informações, mas também exercem outros papéis fundamentais no SNC (KANDELL *et al.*, 1991).

A neuroglia é classificada em endotélias, a microglia e a macroglia, sendo que a micro e macroglia corresponde a 50% da massa cerebral em vertebrados (LAMING *et al.*, 2000). As células endotélicas têm função de revestimento das cavidades ventriculares cerebrais e o canal central da medula espinhal, estando em contato direto com o líquido cefalorraquidiano encontrado nessas cavidades (BEAR *et al.*, 1996; GILBERTS, 2000). A microglia possui fenótipo de monócitos e macrófagos, e tem propriedade de proteção ao tecido nervoso contra danos e infecções. No início do desenvolvimento, a microglia apresenta uma morfologia amebóide e realiza fagocitose dos debrís de células que sofrem morte celular programada, como parte do desenvolvimento. A microglia também secreta citocinas e fatores de crescimento que são importantes para a gliogênese e angiogênese. Após o período de desenvolvimento, a microglia apresenta prolongamentos curtos, que lhe confere um aspecto espinhoso, e assim persiste ao longo da vida adulta (BEAR *et al.* 1996; ZIGMOND *et al.*, 1999).

A macroglia é composta pelos oligodendrócitos e pelos astrócitos. Os oligodendrócitos são assim chamados apenas no SNC. No sistema nervoso periférico (SNP) são chamados de células de Schwann. Tanto no SNC como no SNP estas células gliais são responsáveis pela mielinização dos axônios, o que potencializa a propagação do impulso nervoso ao longo do axônio. Os oligodendrócitos e as células de Schwann dispõem-se ao redor dos neurônios, emitindo prolongamentos que envolvem os seus axônios, formando assim a bainha de mielina. Esta é interrompida periodicamente em pontos, chamados nódulos de Ranvier, onde a membrana axonal tem contato direto com o espaço extracelular. Cada oligodendrócito pode contribuir com a formação da bainha de mielina de vários neurônios, enquanto que cada célula de Schwann

forma a bainha de mielina de apenas um axônio (DARNELL *et al.*, 1990; BEAR *et al.*, 1996; ZIGMOND *et al.*, 1999).

Os astrócitos são as células gliais mais numerosas e de maior tamanho no SNC. São células com muitos prolongamentos, que se encontram muito próximas aos neurônios, por cerca de 20 nm. Muitos dos seus prolongamentos se espessam nas regiões terminais, formando dilatações chamadas de pés vasculares e envolvendo a parede endotelial dos vasos sanguíneos. Os astrócitos também formam uma interface com o plexo coróide, estando em íntimo contato com o líquido cefalorraquidiano. Desta forma, podem regular trocas iônicas entre o plasma, líquido cefalorraquidiano e o tecido nervoso (LAMING *et al.*, 2000). A astroglia também é implicada na fisiologia dos nódulos de Ranvier, devido a seus processos perinodais que estão em contato íntimo com a membrana dos axônios (WAXMAN & BLACK, 1984). As membranas dos processos perinodais apresentam uma alta densidade de canais de sódio, sugerindo uma importante função dos astrócitos na regulação do ambiente nodal e na propagação do potencial de ação (VERNADAKIS, 1996). O metabolismo da glicose é outro exemplo do importante papel dos astrócitos sobre a atividade neuronal. Nos astrócitos, através da glicólise, a glicose é convertida em lactato, que quando liberado no espaço extracelular é utilizado como substrato metabólico pelos neurônios (TSACOPOULOS & MAGESTRETI, 1999). Os astrócitos também têm um importante papel na regulação da concentração iônica extracelular, nível de neurotransmissores e de substâncias neuroativas, pois apresentam em sua superfície junções do tipo “gap”, que permitem a passagem de íons e pequenas moléculas entre células acopladas. Além disso, apresentam também receptores para diversos neurotransmissores (CARMIGNOTO, 2000). Os astrócitos podem também regular a concentração extracelular de íons potássio, cálcio e de prótons. Esta regulação serve como um mecanismo sinalizador entre neurônios e glia, através do qual os astrócitos podem modular a atividade neuronal (LAMING *et al.*, 2000). Os astrócitos

participam ativamente do ciclo glutamato-glutamina. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, mas sua concentração deve ser mantida baixa na fenda sináptica, pois a excessiva ativação de seus receptores pode ser tóxica para as células neurais (LIPTON & ROSENBERG, 1994). O glutamato é recaptado principalmente pelos astrócitos, onde é convertido à glutamina, em um processo dependente de ATP. A glutamina é captada pelos neurônios e então transformada em glutamato, que será novamente liberado na fenda sináptica (DANBOLT, 2001). Além disso, os astrócitos guiam a migração neuronal e o crescimento axonal e modulam a diferenciação neuronal (GARCIA-SEGURA *et al.*, 1996; VERNADAKIS, 1996; TRENTIN, 1997; GILBERTS, 2000). Essas interações neurônio-glia, particularmente astrócitos, exercem um importante papel na manutenção da homeostase energética e plasticidade no cérebro (VERNADAKIS, 1996; TSACOPOULOS & MAGISTRETTI, 1996; CARMIGNOTO, 2000; DANBOLT, 2001).

Atualmente é bastante evidente que as funções cerebrais dependem de uma íntima sinalização de neurônios para glia e da glia para neurônios, influenciando-se mutuamente durante a diferenciação, desenvolvimento e metabolismo (GARCIA-SEGURA *et al.*, 1996; TRENTIN, 1997). Estas interações dependem dos fatores secretados por estas células e podem estar relacionadas com a organização e expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC), bem como de proteínas de citoesqueleto.

## **1.2 – CITOESQUELETO**

As proteínas que constituem o citoesqueleto são responsáveis pelo deslocamento e manutenção de organelas e vesículas intracelulares, além de ancorarem muitos elementos de membrana, como por exemplo receptores, em seus locais apropriados na superfície celular. O

citoesqueleto também determina a morfologia celular, além de participar de processos celulares como divisão, motilidade e emissão de prolongamentos. O citoesqueleto de células eucarióticas é formado por três classes de proteínas fibrilares: microtúbulos, que medem aproximadamente 24 nm de diâmetro, formados por subunidades de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  e  $\zeta$ -tubulinas; microfilamentos de actina, que medem de 4 a 6 nm de diâmetro; e, filamentos intermediários, que medem de 8 a 12 nm de diâmetro. Essas três classes de proteínas de citoesqueleto interagem entre elas e com outras estruturas celulares, formando uma dinâmica estrutura. Esse agregado de proteínas confere às células propriedades que formam a base de determinação de morfologia celular e plasticidade no SNC (DARNELL *et al.*, 1990; KANDELL *et al.*, 1991; ZIGMOND *et al.*, 1999).

Microtúbulos e microfilamentos de actina são amplamente distribuídos nas células eucarióticas, enquanto que os filamentos intermediários apresentam distintos padrões de expressão, específicos de cada tipo celular e do estágio de desenvolvimento. Neste estudo serão analisados os filamentos intermediários, vimentina e proteína glial ácida fibrilar (GFAP), marcadores de astrócitos, e neurofilamentos, marcadores de neurônios.

### **1.2.1 – Filamentos intermediários**

Os filamentos intermediários são responsáveis pela manutenção da estabilidade mecânica e/ou pela integração da citoarquitetura. Porém, atualmente sabe-se que essas proteínas estão envolvidas em outras funções não muito bem compreendidas (HERRMANN & AEBI, 2000). Os filamentos intermediários apresentam, normalmente, especificidade de tecido e muitas vezes, do estágio de desenvolvimento celular. Dessa forma, sugere-se que estejam envolvidos com funções

específicas de cada tipo celular, além de funções relacionadas com o estágio de diferenciação da célula (WEINSTEIN *et al.*, 1991).

Os filamentos intermediários são classificados em 6 tipos (Classes I-VI). Os tipos I e II (queratinas acídica e básica) são expressos em células epiteliais e endoteliais. Em astrócitos os filamentos intermediários pertencem à Classe III. As subunidades protéicas da Classe III incluem a vimentina (57 KDa) e a GFAP (50 KDa) (ZIGMOND *et al.*, 1999). A vimentina é expressa no início do desenvolvimento, em glioblastos. Apresenta uma organização radial, que se estende a partir do centro celular para a periferia. Tal localização sobrepõe-se parcialmente com a organização de microtúbulos, e por isso tem sido sugerido que esses dois sistemas de filamentos interagem entre si (CLARKE & ALLAN, 2002). A GFAP é um filamento intermediário expresso quase que exclusivamente em astrócitos, além de ser um marcador da diferenciação astrocitária (PERZEL'OVA & MARES, 1993; MORITA *et al.*, 1997; KÁLMÁN & AJTAI, 2001; GARCIA *et al.*, 2002). Os níveis de expressão de GFAP são altamente variáveis durante o desenvolvimento do SNC. A expressão de vimentina por astrócitos imaturos é substituída por GFAP, ao longo da maturação (ENG, 1985). A formação de prolongamentos estáveis e diferenciação astrocitários, processos críticos na sobrevivência e crescimento neuronal, são dependentes da expressão e organização de GFAP (GESSER & HATTEN, 1990; WEINSTEIN *et al.*, 1991; LIMA *et al.*, 1997). Na Classe III de filamentos intermediários também são incluídas a desmina e a periferina, expressas respectivamente, em células do músculo liso e em alguns neurônios periféricos e centrais.

Os neurofilamentos são filamentos intermediários encontrados especificamente em neurônios e pertencem à Classe IV de filamentos intermediários. São formados de três subunidades de diferentes pesos moleculares, chamadas de “tripleto de neurofilamentos”: subunidades de alto peso molecular (180 a 200 KDa); subunidades de médio peso molecular (130 a 170 KDa); e subunidades de baixo peso molecular (60-70 KDa) (ZIGMOND *et al.*, 1999). A formação de uma rede normal de neurofilamentos requer a expressão de todas as três

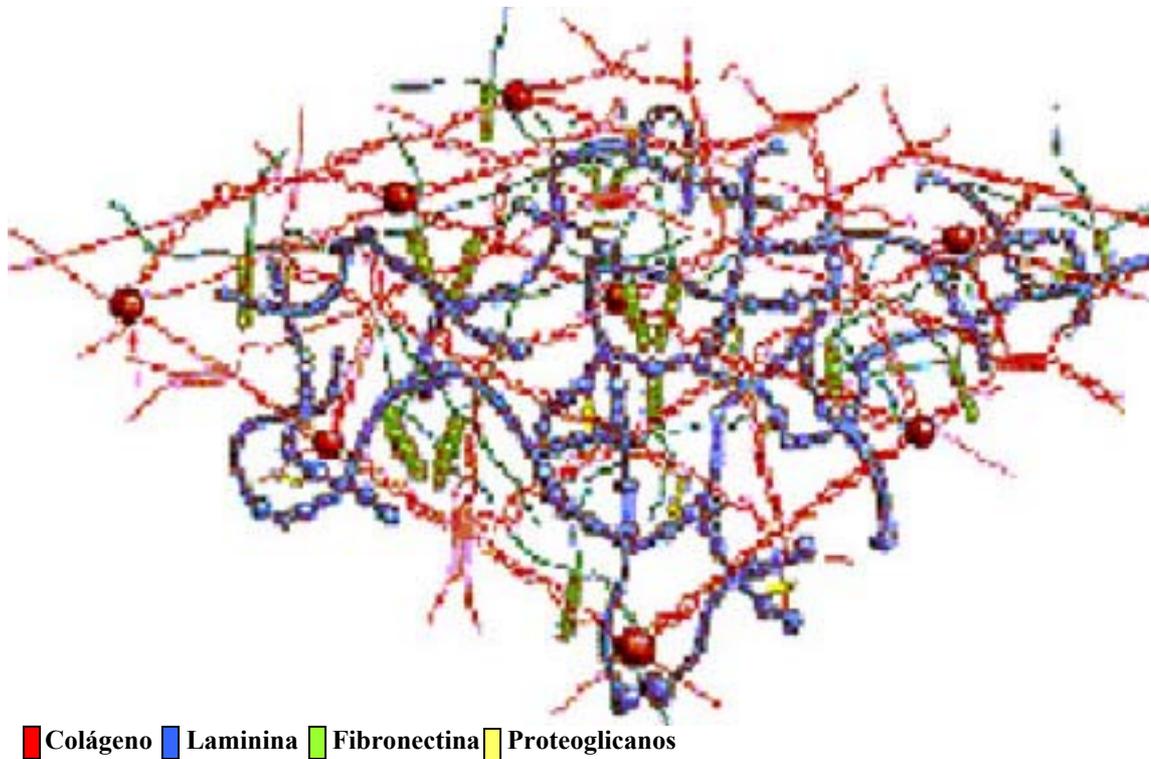
subunidades em uma razão balanceada. Por exemplo, a carência de subunidades de médio peso molecular resulta em um acúmulo de subunidades de baixo e de alto peso molecular no corpo celular e uma redução de neurofilamentos nos axônios (CHOU *et al.*, 2001). Dentro da Classe IV de filamentos intermediários, é conhecida também a  $\alpha$ -internexina, expressa em neurônios em desenvolvimento. Na Classe V são incluídas as lâminas nucleares e na Classe VI, a nestina, expressa em neuroblastos (ZIGMOND *et al.*, 1999).

### **1.3 - MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)**

A MEC corresponde a um complexo multifuncional de proteínas e proteoglicanos (PGs), produzidos pelas próprias células, altamente organizados para providenciar a integridade estrutural do organismo (VENSTROM & REICHARDT, 1993). Apesar do clássico papel estrutural da MEC, atualmente é bastante documentado que esta estrutura não tem papel meramente de barreira física. O dinâmico reconhecimento entre células e a MEC, assim como a mobilização de diversos fatores de crescimento por remodelação da MEC, resulta em transdução de sinal, regulação da expressão gênica e modificação de processos celulares como diferenciação, proliferação, adesão e migração (SECHLER & SCHWARZBAUER, 1998; STREULI, 1999; PESHEVA & PROBSTMEIER, 2000).

Os efeitos da MEC nos processos celulares são mediados principalmente por receptores de superfície celular chamados integrinas. Durante a transdução de sinal pela MEC, as integrinas podem ativar cascatas de sinalização formando um complexo sistema de integração de sinal. A sinalização das integrinas envolve mudanças no citoesqueleto bem como modificações em proteínas GTPases e quinases (KUCHENBAUER *et al.*, 2001).

Estudos realizados na última década têm revelado que várias moléculas de MEC, como laminina, fibronectina, colágenos, tenascinas e PGs, amplamente presentes em todos os tecidos, são detectáveis principalmente durante os estágios iniciais do desenvolvimento do SNC (VENSTROM & REICHARDT, 1993; PESHEVA & PROBSTMEIER, 2000). Laminina e fibronectina são amplamente expressas no SNC e serão abordadas neste trabalho.



**Figura 1 – Representação esquemática de matriz extracelular** (adaptado de ALBERTS *et al.* 2002).

### 1.3.1 – Laminina

Depois dos colágenos, a laminina é o maior componente de MEC. A laminina mede aproximadamente 70 nm de comprimento e é formada por uma cadeia  $\alpha$ , de 400 KDa e por duas cadeias  $\beta$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , de aproximadamente 215 KDa e 205 KDa, respectivamente. As cadeias  $\alpha$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$  associam-se por pontes dissulfeto, formando uma estrutura cruciforme. A molécula de laminina possui domínios de ligação de alta afinidade a outras proteínas de MEC, como colágeno IV, PGs de sulfato de heparana e receptores celulares para laminina, as integrinas, o que promove a adesão da célula à matriz (HARALSON & HASSEL, 1995; ALBERTS *et al.*, 2002). A laminina é sintetizada e secretada pelos astrócitos, depositada nos espaços extracelulares e fixada na superfície celular através da ligação das integrinas (HYNES, 1987; REICHARDT & TOMASELLI, 1991; TRENTIN & MOURA NETO, 1995; FARWELL *et al.* 1995). A regionalização das moléculas de laminina na MEC é determinada pelos pontos de contatos focais. Estes são complexos macromoleculares formados pelo agrupamento de integrinas ligadas a microfilamentos de actina (REICHARDT & TOMASELLI, 1991; FARWELL *et al.* 1995).

A organização da laminina em padrões específicos na superfície celular promove orientação direcional para o crescimento de neuritos (LIESI, 1990; LETOURNEAU *et al.*, 1994; GARCIA-ABREU, *et al.*, 1995; FARWELL & DUBORD-TOMASETTI, 1999a). Em culturas de neurônios cerebelares de ratos hipotireoideos, observaram-se alterações no padrão de organização da laminina, causadas pela carência de  $T_3$ . Esse efeito promoveu uma migração incompleta dos neurônios cerebelares, causando um aumento na morte desses neurônios em comparação às culturas provenientes de animais normais (DUSSAULT & RUEL, 1987; PORTERFIELD & HENDRICH, 1993). Como a laminina é expressa em várias regiões de crescimento axonal de muitos neurônios do SNC e SNP durante o desenvolvimento (ZIGMOND *et*

*al.*, 1999), a deficiência em hormônios da tireóide pode levar a uma diminuição na expressão dessa proteína, que é um importante substrato para essas células.

### **1.3.2 – Fibronectina**

A fibronectina é uma glicoproteína homodimérica de 460 KDa, composta de duas subunidades unidas entre si por duas pontes dissulfeto, próximo às extremidades C-terminal. Apresenta domínios específicos para outras proteínas de matriz, para glicosaminoglicanos (GAGs) e para receptores de superfície celular (integrinas) (ZAGRIS, 2001). Tais domínios são requeridos para a manutenção da integridade da MEC. Deleções ou mutações em sítios específicos para fibronectina podem afetar a estrutura e organização da MEC. Além disso, a arquitetura da fibronectina na MEC pode também regular eventos de sinalização intracelular, alterando a razão de divisão celular (SECHLER & SCHWARZBAUERS, 1998; SCHWARZBAUERS & SECHLER, 1999). A fibronectina exerce papel importante na adesão celular, mas pode também estar envolvida na manutenção da morfologia celular, devido à sua ligação em outros componentes da MEC e em integrinas, que estão intimamente ligadas ao citoesqueleto (SECHLER & SCHWARZBAUERS, 1998; SCHWARZBAUERS & SECHLER, 1999; ZAGRIS, 2001).

### **1.3.3 – Proteoglicanos**

A matriz extracelular compõe-se, também, de uma mistura heterogênea de glicoconjugados. Os PGs correspondem aos maiores glicoconjugados encontrados na superfície

celular e nos espaços extracelulares, sendo constituídos por um centro protéico com uma ou mais cadeias laterais de GAGs, ligadas covalentemente (DOW & WANG, 1998). Os GAGs são cadeias de polissacarídeos não ramificadas, formadas de repetições de dissacarídeos, sendo um dos açúcares aminado, geralmente sulfatado (com exceção do ácido hialurônico), que pode ser N-acetil-glicosamina ou N-acetil-galactosamina e sendo o outro açúcar um ácido urônico. Os GAGs são carregados negativamente devido aos radicais sulfato e aos radicais carboxila, o que atrai uma nuvem de cátions, como o sódio, e que lhes confere caráter hidrofílico. Essas características promovem a formação de um gel na matriz. Os principais GAGs são o ácido hialurônico, sulfato de dermatana, sulfato de condroitina, sulfato de heparana e sulfato de queratana (ALBERTS *et al.*, 2002). A sulfatação é um determinante crítico na densidade de carga do GAG, a qual pode ser essencial para as interações moleculares do GAG com a superfície celular ou com a MEC. Os PGs, além de hidratarem o espaço extracelular, parecem exercer papel importante na sinalização química entre as células, ligando-se a moléculas sinalizadoras, como o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 1993).

#### **1.4 – FATOR DE CRESCIMENTO BÁSICO DE FIBROBLASTOS (bFGF)**

O bFGF é um fator que pode estimular crescimento, proliferação, motilidade e diferenciação celular (BIKFALVI *et al.*, 1997). Os receptores do bFGF são tirosina-quinases, aos quais o fator se liga com alta afinidade. Por outro lado, o bFGF pode também se ligar, com baixa afinidade, a PGs de sulfato de heparana, também de superfície celular (ROGHANI *et al.*, 1994; SCHLESSINGER *et al.* 1995; GÓMEZ-PINILLA, *et al.*, 1996; GREMO & PRESTA, 2000). Outros estudos demonstram que a ligação do bFGF nestes PGs estabiliza a molécula de bFGF e a

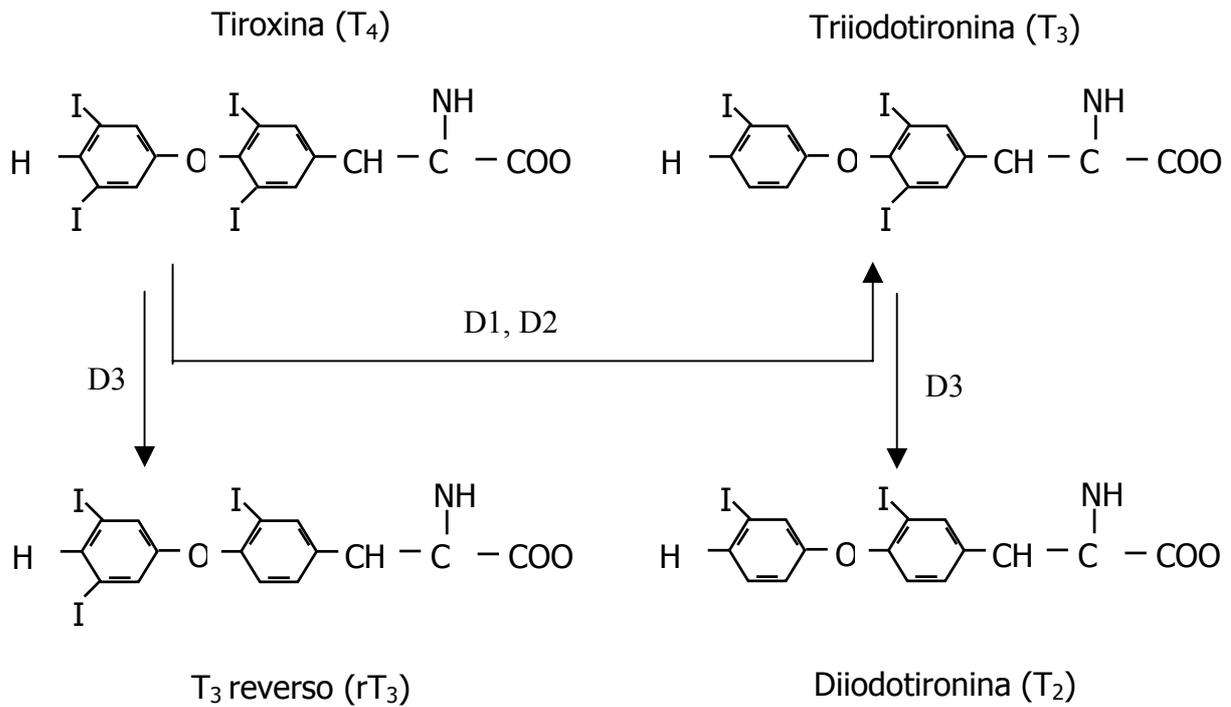
protege da degradação proteolítica, dessa forma aumentando a sua eficácia. Além disso, PGs associados ao bFGF servem como um reservatório desses fatores, que podem ser liberados por enzimas que degradam PGs (SAKSELA & RIFKIN, 1990; ALVAREZ-SILVA *et al.*, 1993; STREULI, 1999). Essa ligação do bFGF ao PG de sulfato de heparana parece ser necessária para a potencialização da transdução do sinal desencadeada pela interação do fator de crescimento com o receptor (MASON, 1994). KLAGSBRUN & BAIRD (1991) propuseram que a ligação do bFGF a este PG é requerida para a apresentação das moléculas de bFGF aos seus receptores, transmitindo a sinalização através da membrana plasmática, desencadeando as respostas biológicas induzidas por esse fator (SCHLESSINGER *et al.* 1995).

As interações entre fatores de crescimento e proteínas de MEC são fundamentais para o desenvolvimento do SNC. Dessa forma, fatores de crescimento, como o bFGF, podem também mediar efeitos de outras moléculas, como por exemplo o hormônio da tireóide.

### **1.5 – HORMÔNIO DA TIREÓIDE (T<sub>3</sub>)**

Atualmente está bem documentado o papel essencial do hormônio da tireóide – a triiodotironina ou T<sub>3</sub> - no crescimento, desenvolvimento e metabolismo em mamíferos.

O principal produto secretado pela glândula tireóide é a tiroxina ou T<sub>4</sub>. Este, em comparação a T<sub>3</sub>, é praticamente inativo, sendo por isso considerado por muitos autores como um pró-hormônio. T<sub>4</sub> é convertido por desiodação do anel externo em T<sub>3</sub>, biologicamente ativo, por enzimas desiodases (Figura 2) (UTIGER, 1987; PUYMIRAT, 1992; DARRAS *et al.*, 1999).

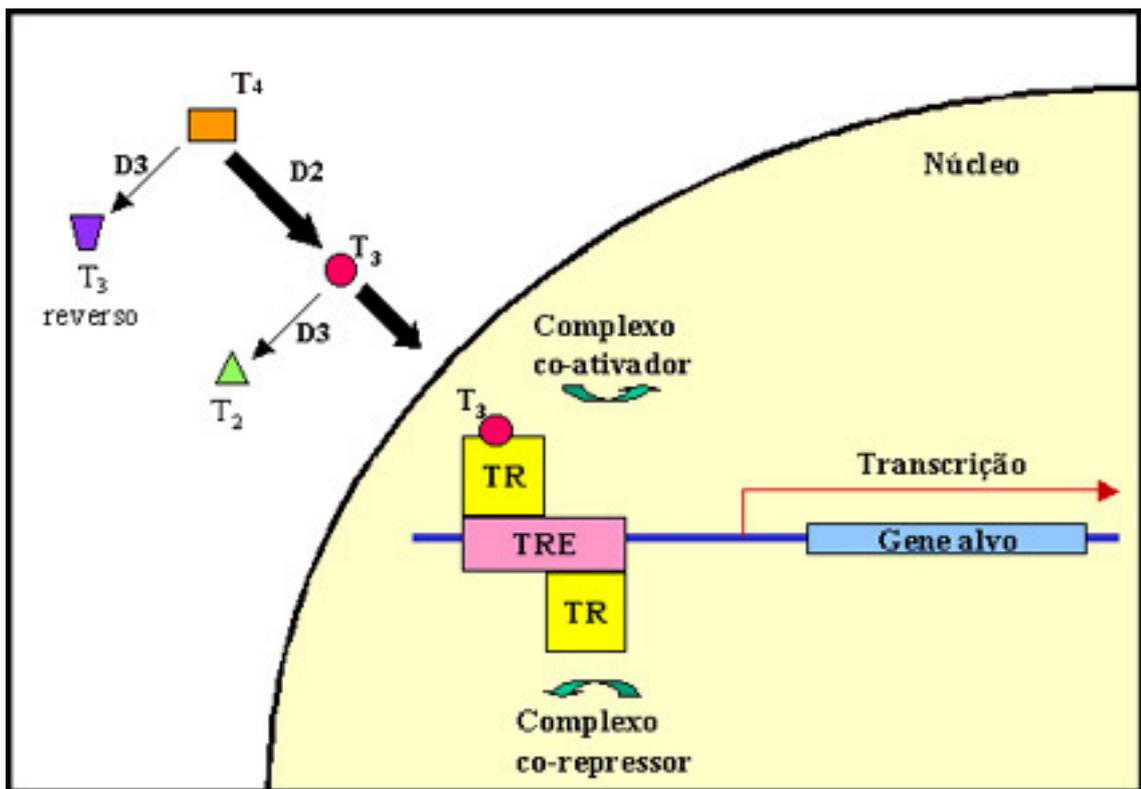


**Figura 2 – Esquema de ativação e inativação metabólica de hormônios da tireóide, através da ação das enzimas 5'-desiodases.**

As desiodases de iodotironinas são enzimas que regulam a distribuição local do  $T_3$  para seus receptores nucleares. O tipo I de desiodase é presente predominantemente no fígado, rins, tecidos tireoideos e é menos abundante no SNC (BERRY *et al.*, 1991; MANDEL *et al.*, 1992; DARRAS *et al.*, 1999; BIANCO *et al.* 2002). O tipo II de desiodase cataliza a monodesiodação do  $T_4$  e do  $rT_3$  ( $T_3$  reverso) para  $T_3$  e para diiodotironina ( $T_2$ ), respectivamente (CHAN *et al.*, 2002). Então, como no cérebro o suprimento do hormônio ativo  $T_3$  depende da captação celular deste ou da desiodação intracelular de  $T_4$  pela desiodase tipo II, esta enzima é muito importante para a manutenção da ação do  $T_3$  no SNC (MOL & VISSER, 1985). A desiodase tipo III catalisa a desiodação do  $T_4$  em  $rT_3$  e do  $T_3$  em  $T_2$ . Como  $rT_3$  e  $T_2$  têm pouca atividade biológica, essa enzima é a responsável pela regulação da concentração intracelular de  $T_3$  e tem um essencial papel na maturação e função cerebral (CROTEAU *et al.*, 1996; CHAN *et al.*, 2002).

$T_3$  atua nas células alvo através de seus receptores nucleares, TRs. Esses receptores são produtos do protooncogene *c-erbA* e homólogos ao oncogene *v-erbA*. São conhecidas duas

isoformas desses receptores, TR $\alpha$  e TR $\beta$ . Estes receptores ligam-se a regiões específicas do DNA, conhecidas como elementos de resposta ao hormônio da tireóide (TREs), na forma de monômeros, homodímeros ou mais comumente, como heterodímeros formados entre o TR e o receptor de 9-cis-ácido retinóico (RXR). O complexo TR/RXR é considerado por muito autores como mediador chave nos efeitos biológicos do T<sub>3</sub> e a sua ligação ao TRE é independente da presença ou não do hormônio, controlando assim a expressão gênica, ou seja, aumentando (se o T<sub>3</sub> estiver presente) ou reprimindo (se o T<sub>3</sub> estiver ausente) a expressão de genes (Figura 3) (PUYMIRAT, 1992; TRENTIN, 1997; KOIBUCHI & CHIN, 2000; WU & KOENING, 2000; ANDERSON, 2001; FORREST *et al.*, 2002; SHI *et al.*, 2002).



**Figura 3 – Representação esquemática de ligação do T<sub>3</sub> ao seu receptor nuclear.** TR: receptor nuclear; TRE: elemento de resposta ao hormônio da tireóide; D2: desidase Tipo II; D3: desidase Tipo III.

Além disso, existem diferenças nos padrões de expressão desses receptores, de acordo com o estágio de desenvolvimento. Em geral, TR $\alpha$  é expresso em altos níveis no início do desenvolvimento, enquanto a expressão de TR $\beta$  é bastante aumentada no final do desenvolvimento cerebral (ANDERSON, 2001; FORREST *et al.*, 2002). A presença de TRs nos astrócitos pode explicar os efeitos do T<sub>3</sub> em vários aspectos da função astrocitária *in vitro*, incluindo transporte de glicose, secreção proteica, proliferação e diferenciação morfológica (AIZENMAN & DE VELLIS, 1987; TRENTIN *et. al.*, 1995; TRENTIN & MOURA NETO, 1995). Alterações estruturais em animais hipotireoideos podem resultar de persistente repressão da transcrição promovida pelo TRE quando não ligado ao T<sub>3</sub> (HASHIMOTO *et al.*, 2001).

T<sub>3</sub> é essencial para o desenvolvimento e diferenciação em muitos órgãos, inclusive no SNC. Durante o período neonatal, a deficiência de T<sub>3</sub> pode resultar em retardo mental e físico, conhecido em humanos como cretinismo (LEGRAND, 1982; PUYMIRAT, 1992; PORTERFIELD & HENDRICH, 1993; TRENTIN, 1997; DARRAS *et al.* 1999; KOIBUCHI & CHIN, 2000). É possível que a carência de T<sub>3</sub> provoque uma falha nas sinalizações intra e extracelulares, interferindo no crescimento e diferenciação de células gliais e neurônios, inclusive no estabelecimento de sinapses e, conseqüentemente, no desenvolvimento normal do SNC. Trabalhos demonstraram que T<sub>3</sub> regula o número de astrócitos *in vivo* (CLOS & LEGRAND, 1973), e que animais hipotireoideos apresentam defeitos na glia de Bergmann, células estas que além de promover migração neuronal também promovem sinalização trófica para os neurônios. Experimentos de eliminação de células da glia durante o desenvolvimento mostraram que os precursores de neurônios granulares sofriam morte celular em grande escala, talvez explicando essa imperfeição na glia de Bergmann (CLOS *et al.*, 1980). Foi também demonstrado que o hipotireoidismo em cérebro de ratos em desenvolvimento está associado ao estresse oxidativo. Nestes animais, observou-se um acúmulo de neurofilamentos intraneuronais, que pode ser comparado àqueles

vistos em várias doenças neurodegenerativas (RAHAMAN *et al.*, 2001). Em relação às proteínas de MEC, foi observado que a expressão de fibronectina em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotireoideos não foi alterada quando comparada com os animais normais. Entretanto, em mesencéfalo, a expressão de fibronectina teve uma redução significativa nos animais hipotireoideos (CALLONI *et al.* 2000). Estudos *in vitro*, demonstraram que T<sub>3</sub> induziu alterações tanto morfológicas, como na proliferação de astrócitos de diferentes regiões cerebrais. Em culturas de hemisférios cerebrais e mesencéfalos de animais neonatos, T<sub>3</sub> induziu aumento na expressão de GFAP, bem como alteração na sua organização. T<sub>3</sub> também alterou a organização de proteínas da MEC como fibronectina (TRENTIN *et al.*, 1995; TRENTIN & MOURA NETO, 1995; LIMA *et al.* 1997; LIMA *et al.*, 1998). Foi demonstrado também que T<sub>3</sub> induziu astrócitos cerebelares a secretarem uma combinação de fatores de crescimento, como bFGF, fator ácido de crescimento de fibroblastos (aFGF), fator de necrose tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) e interleucina-3 (IL-3), que foram parcialmente responsáveis pela proliferação de astrócitos e de células do glioma C6 de ratos. Apesar desses fatores atuarem coordenadamente, o principal fator mitogênico secretado pelos astrócitos cerebelares foi o bFGF (TRENTIN *et al.*, 2001). Utilizando o mesmo modelo, foi demonstrado que em condições fisiológicas, os efeitos de T<sub>3</sub> sobre a glia têm importantes conseqüências no desenvolvimento, metabolismo e atividade neuronal, bem como formação e plasticidade de conexões sinápticas (GARCIA-SEGURA *et al.*, 1996; MOURA NETO *et al.*, 1996). Foi demonstrado também, um aumento significativo no número de neurônios cerebelares, na presença de meio condicionado obtido de astrócitos tratados com T<sub>3</sub> (GOMES *et al.*, 1999).

Estes resultados demonstram que os efeitos do T<sub>3</sub> sobre os astrócitos podem modular sobrevivência, migração, proliferação e diferenciação, tanto de neurônios como de células gliais. Estes efeitos podem ser diretos ou indiretos, promovendo um mecanismo de regulação dos hormônios da tireóide na morfogênese do sistema nervoso (KÖNIG & MOURA NETO, 2002).

Neste estudo, enfocaremos a avaliação do efeito de T<sub>3</sub> sobre a expressão e organização de proteínas de MEC relacionadas ao desenvolvimento do SNC em astrócitos e interações entre astrócitos e neurônios de cerebelo, por ser esta uma estrutura dramaticamente afetada pela carência de T<sub>3</sub>.

## **2 - OBJETIVO GERAL**

Verificar os efeitos do  $T_3$  sobre proteínas da matriz extracelular em culturas de astrócitos cerebelares de ratos neonatos e se estes efeitos são mediados pelo fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF). Além disto, iremos avaliar o desenvolvimento de neurônios cerebelares em co-cultura com astrócitos tratados com  $T_3$ .

### **2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar se o tratamento com  $T_3$  promove alterações morfológicas nos astrócitos cerebelares, através da avaliação de proteínas de citoesqueleto, como GFAP e vimentina.
- Estudar o efeito de  $T_3$  sobre a expressão e organização das proteínas de MEC, laminina e fibronectina, em culturas de astrócitos cerebelares.
- Verificar os efeitos do bFGF sobre a organização de laminina e fibronectina a fim de estudar o envolvimento deste fator na mediação dos efeitos do  $T_3$ .
- Observar os efeitos do  $T_3$  sobre a adesão dos astrócitos cerebelares.
- Analisar como o tratamento com  $T_3$  nas culturas astrocitárias influencia o desenvolvimento neuronal em co-culturas cerebelares de astrócitos e neurônios.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 – ANIMAIS

Para a realização das culturas celulares foram utilizados ratos Wistar recém-nascidos (0-3 dias) de ambos os sexos. Fêmeas prenhas foram obtidas no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidas no biotério do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, em ciclo de claro/escuro de 12 horas e temperatura entre 22 e 25°C, com água e ração *ad libitum*, até o nascimento dos filhotes. Os filhotes foram mortos por decapitação, de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela CEUA/UFSC (nº 062/CEUA-23080.001057/2001-78).

#### 3.2 – MATERIAIS

Ácido acético, ácido clorídrico, hidróxido de sódio e metanol, adquiridos da REAGEN.

Ácido etileno-dinitrilo-tetracético (EDTA), Ácido hidroxietil-piperazina-etanosulfônico (HEPES), acrilamida, albumina sérica bovina (BSA), anticorpo anti-peroxidase, anticorpo policlonal anti-GFAP, anticorpo policlonal anti-laminina, anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (FITC), anticorpo secundário anti-IgG de coelho (TriTC), azul de coomassie R-250, di-amino-benzidina-tetra-hidrocloride (DAB), di-amino-fenilindol (DAPI), entelan, fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), glicerol, glutamina, n-propil-galacto-glicerol, poli-ornitina, soro normal de cabra, triiodotironina (T<sub>3</sub>) e tripsina, adquiridos da SIGMA.

Anticorpo monoclonal anti-vimentina e anticorpo policlonal anti-fibronectina, adquiridos da DAKO.

Anticorpo neutralizante de bFGF, adquirido da R&D SYSTEMS.

Anticorpo policlonal anti-neurofilamento, adquirido da FRANÇA BIOMAKOV.

Cloreto de Potássio, Cloreto de Sódio, ditioneítról (DTT), Fosfato de Potássio, Fosfato de Sódio Dibásico, Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/F12), Soro Bovino Fetal (SBF) e adquiridos da GIBCO.

Dodecil sulfato de sódio (SDS), kit para quimioluminescência (ECL), membranas de nitrocelulose, padrões de peso molecular, película Hyperfilm, Tris e Tween, adquiridos da AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH.

Glicose e Peróxido de Hidrogênio, adquiridos da MERCK.

Paraformaldeído, adquirido da VETEC.

### **3.3 – EQUIPAMENTOS**

- Agitador magnético, QUIMIS – Q-221-2.
- Banho Maria, BENFER – dbm 120.
- Centrífuga, CONTINENTAL – VI.
- Centrífuga, EPPENDORF – 5415 D.
- Câmara de Neubauer, HIRSCHMANN TECHCOLOR.

- Cuba de eletrotransferência miniVE Vertical Electrophoresis System, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH.
- Espectrofotômetro - Ultrospec 3000, PHARMACIA BIOTECH.
- Estufa úmida de CO<sub>2</sub>, NUAIRE.
- Fluxo laminar, VECO.
- Microscópio epifluorescente, OLYMPUS
- Microscópio óptico, OLYMPUS.
- Potenciômetro, SENSORTECHNIK – TM 38.
- Scanner – UL 1950, LOGITECH.

### **3.4 - MÉTODOS**

#### **3.4.1 - Cultura de células**

As culturas primárias de astrócitos foram obtidas de cerebelos de ratos neonatos. Os animais foram decapitados e os cérebros foram retirados dentro do fluxo laminar, em salina tamponada por fosfato (PBS)-glicose. Os cerebelos foram separados e as meninges retiradas. O tecido foi picotado e dissociado manualmente com pipeta pasteur em PBS-glicose. As células foram precipitadas por centrifugação e ressuspensas em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 5 % de soro bovino fetal (SBF). As células então foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> na concentração de 5 x 10<sup>6</sup> células, ou sobre lamínulas de vidro de

13 mm em placas de cultura de 4 poços, a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células, ou ainda em placas de 96 poços, com plaqueamento de  $7,5 \times 10^4$  células por poço. As garrafas de placas de cultura foram tratadas com  $1,5 \mu\text{g/ml}$  de poli-ornitina em PBS, antes do plaqueamento das células. As culturas foram mantidas em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$  a 5% de  $\text{CO}_2$  até a confluência (10-14 dias). Para a realização das co-culturas, os neurônios foram preparados da mesma maneira que os astrócitos e plaqueados com densidade de  $1 \times 10^5$  células sobre uma monocamada de astrócitos confluentes e previamente tratada. Os neurônios foram cultivados por 24 horas, quando foi realizada a imunocitoquímica, conforme descrito no item 3.4.10.

### **3.4.2 - Tratamento com 3, 3',5' Triiodo-L-tironina ( $\text{T}_3$ )**

Após a confluência, os astrócitos foram mantidos em DMEM/F12 desprovido de SBF, suplementado com 50 nM de  $\text{T}_3$ . Para as curvas de  $\text{T}_3$ , as células foram tratadas com 5, 10, 50 e 100 nM  $\text{T}_3$ . Para todas as concentrações de  $\text{T}_3$ , as culturas foram tratadas por três dias, com renovação diária de meio e hormônio, com exceção do terceiro dia. As células foram mantidas com esse meio por mais 48 horas, quando os experimentos foram realizados.

### **3.4.3 - Tratamento com fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF)**

Astrócitos cerebelares foram plaqueados sobre lamínulas de vidro em placas de cultura, conforme descrito acima. Após a confluência, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS. Foi adicionado a cada poço, DMEM F12 sem SBF enriquecido com bFGF nas

concentrações de 2, 5 e 10 ng/ml (DHANDAPANI *et al.*, 2002). Após 6 e 12 horas de tratamento com o bFGF, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4 % e a seguir, procedeu-se a imunofluorescência para laminina e fibronectina, conforme descrito no item 3.4.5.

#### **3.4.4 - Tratamento com anticorpo neutralizante de bFGF**

Astrócitos cerebelares foram plaqueados sobre lamínulas de vidro em placas de cultura, conforme descrito acima. Após a confluência, as células receberam o tratamento de 3 dias com 50 nM de T<sub>3</sub>, na presença de anticorpo neutralizante de bFGF, produzido em cabras, na concentração de 1 µg/ml (conforme instruções do fabricante). Após 48 horas foram realizadas as imunofluorescências para laminina e fibronectina, conforme descrito no item 3.4.5.

#### **3.4.5 - Imunocitoquímica**

Os ensaios imunocitoquímicos foram realizados para análise da organização de moléculas da MEC, laminina e fibronectina, e de filamentos intermediários do citoesqueleto, vimentina, proteína fibrilar acídica glial (GFAP) e neurofilamentos. As monocamadas de astrócitos foram fixadas com paraformaldeído a 4 % durante 20 minutos e a seguir lavadas uma vez com PBS-Triton (0,3 %) e duas vezes com PBS (pH 7,6), à temperatura ambiente. Para a imunocitoquímica para neurofilamentos, a peroxidase endógena das células foi inativada por 20 minutos no escuro com 0,25 % de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em PBS-Triton. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5 % de soro normal de cabra em PBS durante 1 hora. As

células foram então lavadas com PBS e incubadas, por 12 horas, com os anticorpos correspondentes preparados em PBS, a 4°C, em câmara úmida, como segue: anticorpo policlonal anti-laminina 1:200; anticorpo policlonal anti-fibronectina 1:100; anticorpo monoclonal anti-vimentina 1:50; anticorpo policlonal anti-GFAP 1:100; anticorpo policlonal anti-neurofilamento 1:100. Após nova lavagem com PBS, as células incubadas com anticorpos anti-laminina, anti-fibronectina e anti-GFAP foram incubadas com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho, conjugado à rodamina (TriTC) em PBS, enquanto as células incubadas com anti-vimentina foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:100), em PBS. As células incubadas com anticorpo anti-neurofilamento foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário contra coelho, conjugado à peroxidase 1:300 em PBS. A incubação secundária foi mantida por 1 hora, à temperatura ambiente para todas as imunocitoquímicas. Para as imunofluorescências, as células foram lavadas com PBS, e no caso da GFAP, mantidas por 30 segundos no marcador de núcleo DAPI. As lâminas foram montadas com n-propil-galacto-glicerol, observadas e fotografadas em microscópio epifluorescente. Para a imunocitoquímica para neurofilamentos, a revelação foi realizada com di-amino-benzidina-tetra-hidroclorato (DAB). As lâminas foram montadas em entelan e observadas e fotografadas em microscópio óptico. Foram analisados oito campos para cada lâmina de co-cultura.

#### **3.4.6 - Dosagem de proteínas**

Para quantificar o conteúdo protéico de extratos provenientes das culturas de astrócitos, foi utilizado o método de BRADFORD (1976), utilizando-se como padrão a albumina sérica bovina (BSA). As amostras foram quantificadas a 595nm.

### 3.4.7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada sobre um gel de entrada de 4 % e de 10 % para o gel de separação de acordo com o sistema de LAEMMLI (1970). Os extratos celulares obtidos foram preparados em tampão contendo 4,2 mM de ditionitrotol (DTT), 40 % de glicerol e 10 % de SDS. As amostras foram, então, aplicadas no gel e a separação realizada por 2 horas e 30 minutos, utilizando-se 120 V e 25 mA, a temperatura ambiente. O gel foi corado com 0,2 % de azul de Coomassie R-250 durante 30 minutos, e descorado durante 12 horas com solução contendo 50 % de metanol e 10 % de ácido acético. A determinação da expressão proteica foi realizada com base na migração obtida pelas frações utilizando-se padrões de laminina e fibronectina.

### 3.4.8 – Eletrotransferência e Imunodeteção

A eletrotransferência das proteínas presentes no gel SDS-PAGE para membrana de nitrocelulose foi realizada a 4°C por 1 hora e 30 minutos, a 25 V e 400 mA, de acordo com TOWBIN *et al.* (1979). A membrana de nitrocelulose foi removida e incubada por 1 hora a temperatura ambiente em tampão Tris-Tween (TBS-T) pH 7,5, contendo 5% de leite desnatado em pó. A seguir, a membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpos anti-laminina 1:20.000 e anti-fibronectina 1:20.000. Depois de lavada com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário contra coelho, conjugado à peroxidase 1:20.000 em PBS, por 1 hora a temperatura ambiente. A imunodeteção foi realizada pelo método de quimioluminescência (ECL). Os reagentes foram incubados durante 1 minuto sobre a

nitrocelulose e a película Hyperfilm foi exposta por 30 segundos. Os filmes foram escaneados e as bandas protéicas imunorreativas foram analisadas por densitometria através da utilização do programa de computador Scion Image (National Institutes of Health). Foram utilizados padrões de laminina e fibronectina.

### **3.4.9 - Ensaio de tripsinização**

Para verificar o efeito do T<sub>3</sub> sobre a capacidade dos astrócitos de manterem a adesão sobre o substrato, foi realizado um ensaio de tripsinização. Astrócitos cerebelares foram plaqueados, em uma densidade de  $7,5 \times 10^4$  células por poço, em placa de cultura de 96 poços, tratada previamente com poli-ornitina. Quando confluentes, as células foram tratadas com 5, 50 e 100 nM de T<sub>3</sub>. Após o período de tratamento, conforme descrito acima, foram adicionados a cada poço 50 µl de tripsina (0,125 %). As células que se destacaram do substrato pela ação da tripsina foram contadas em câmara de Neubauer, nos tempos de 0, 15 e 30min depois da adição da protease e comparadas com o controle.

### **3.4.10 - Análise estatística**

A análise estatística foi realizada pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Newmann-Keuls, ou pelo teste t de Student, quando necessário.

## **4 – RESULTADOS**

### **4.1 – ANÁLISE DO TIPO CELULAR**

A GFAP é um filamento intermediário expresso quase que exclusivamente em astrócitos, além de ser um marcador da diferenciação astrocitária (PERZEL'OVA & MARES, 1993; MORITA *et al.*, 1997; KÁLMÁN & AJTAI, 2001; GARCIA *et al.*, 2002). Desta forma, a imunofluorescência para GFAP foi realizada, a fim de se verificar que as culturas de células investigadas neste trabalho são culturas de astrócitos (Figura 4). Através da marcação de GFAP em comparação às células coradas com DAPI, observamos que aproximadamente 95% das células totais correspondem a astrócitos, após 10 a 14 dias de cultura. Os 5% de células restantes correspondem a neurônios, oligodendrócitos e microglia.

### **4.2 – ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR**

A vimentina corresponde a um filamento intermediário de citoesqueleto que é distribuída uniformemente no citoplasma, a partir da membrana nuclear até a membrana plasmática, acompanhando a morfologia celular. Tal proteína é expressa em astrócitos durante o período perinatal, ou seja, em astrócitos indiferenciados. Ao longo da diferenciação, a vimentina é substituída progressivamente por GFAP. Entretanto, em cultura, pode-se encontrar a vimentina em astrócitos diferenciados, acompanhando a GFAP (BOVOLENTA *et al.*, 1984).



**Figura 4 – Marcação de GFAP em cultura de astrócitos cerebelares.** Astrócitos em confluência foram incubados com anticorpo anti-GFAP e avaliados por imunofluorescência, conforme descrito nos Materiais e Métodos. 95 % das células totais foram marcadas pelo anticorpo anti-GFAP. Barra = 10  $\mu$ m. Aumento 200x.

Astrócitos de hemisférios cerebrais de ratos neonatos, em cultura, alteram sua morfologia após o tratamento com 50 nM de  $T_3$ , enquanto que em astrócitos cerebelares esse hormônio não promove alterações na morfologia (TRENTIN et al. 1995). De acordo com esses resultados, a imunofluorescência para vimentina demonstrou que a organização dessa proteína não foi modificada nos astrócitos após o tratamento com 50nM de  $T_3$  (Figura 5). A análise através de contraste de fase também demonstrou que  $T_3$  não promove alterações morfológicas nas culturas de astrócitos cerebelares (Figura 6).

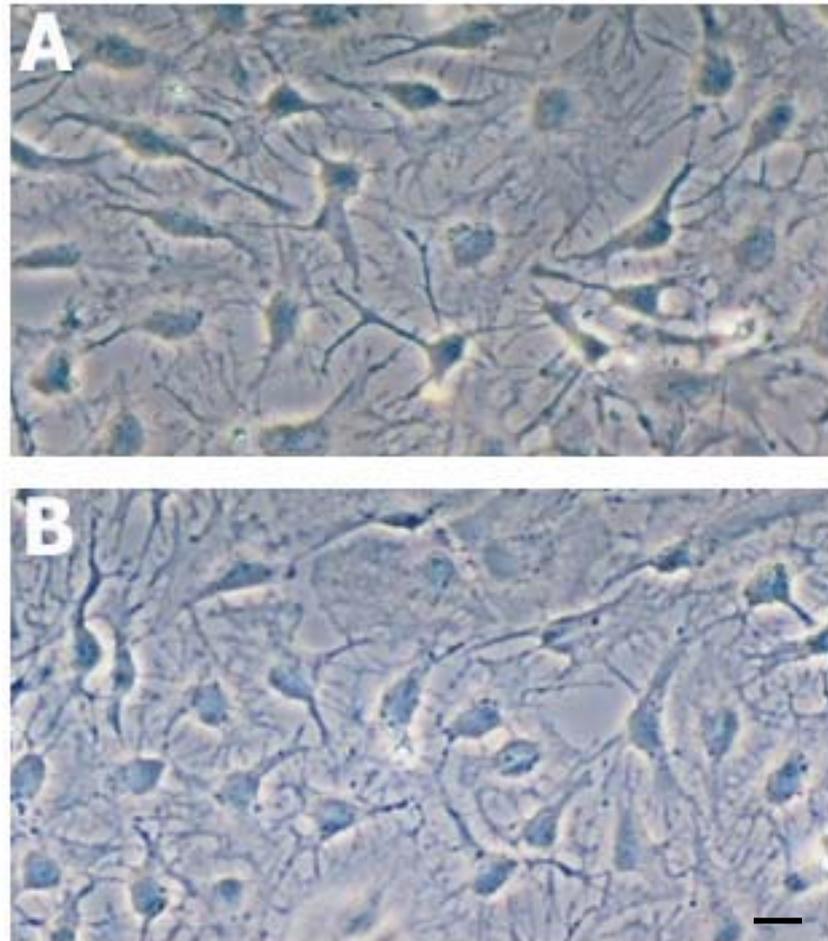
#### **4.3 – ANÁLISE DOS EFEITOS DE $T_3$ SOBRE A ORGANIZAÇÃO E A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE MEC**

Estudos anteriores demonstraram que a proliferação de astrócitos cerebelares aumentou significativamente após o tratamento com  $T_3$  (TRENTIN et al., 1995; TRENTIN & MOURA NETO, 1995). Os efeitos do  $T_3$  em processos como proliferação, adesão e migração celular, podem estar relacionados com a organização e expressão de proteínas de MEC, como a laminina e fibronectina.

##### **4.3.1 – Organização de laminina**

A imunofluorescência para laminina demonstrou que em astrócitos mantidos nas condições de controle, essa proteína apresentou uma marcação pouco intensa, com distribuição puntual. Após o tratamento com 50nM de  $T_3$ , a marcação para laminina apresentou-se mais evidente, com organização fibrilar, indicando uma maior complexidade na

**Figura 5 – Efeitos do T<sub>3</sub> na organização de vimentina.** Astrócitos cerebelares mantidos em condições controle ou tratados com 50 nM de T<sub>3</sub>, conforme descrito nos Materiais e Métodos, foram incubados com anticorpo anti-vimentina e analisados por imunofluorescência. (A) Células controle; (B) Células tratadas com T<sub>3</sub>. Fotografias representativas de dois experimentos realizados em duplicatas. Barra = 10 µm. Aumento: 1000x.



**Figura 6 – Fotografia de microscopia de contraste de fase de astrócitos cerebelares em cultura.** Conforme descrito nos Materiais e Métodos, as células foram tratadas com 50 nM de  $T_3$  ou mantidas nas condições controle. No quinto dia de tratamento, as culturas foram analisadas por microscopia de contraste de fase. (A) Células controle; (B) Células tratadas com  $T_3$ . Fotografias representativas de dois experimentos realizados em duplicatas. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . Aumento: 400x.

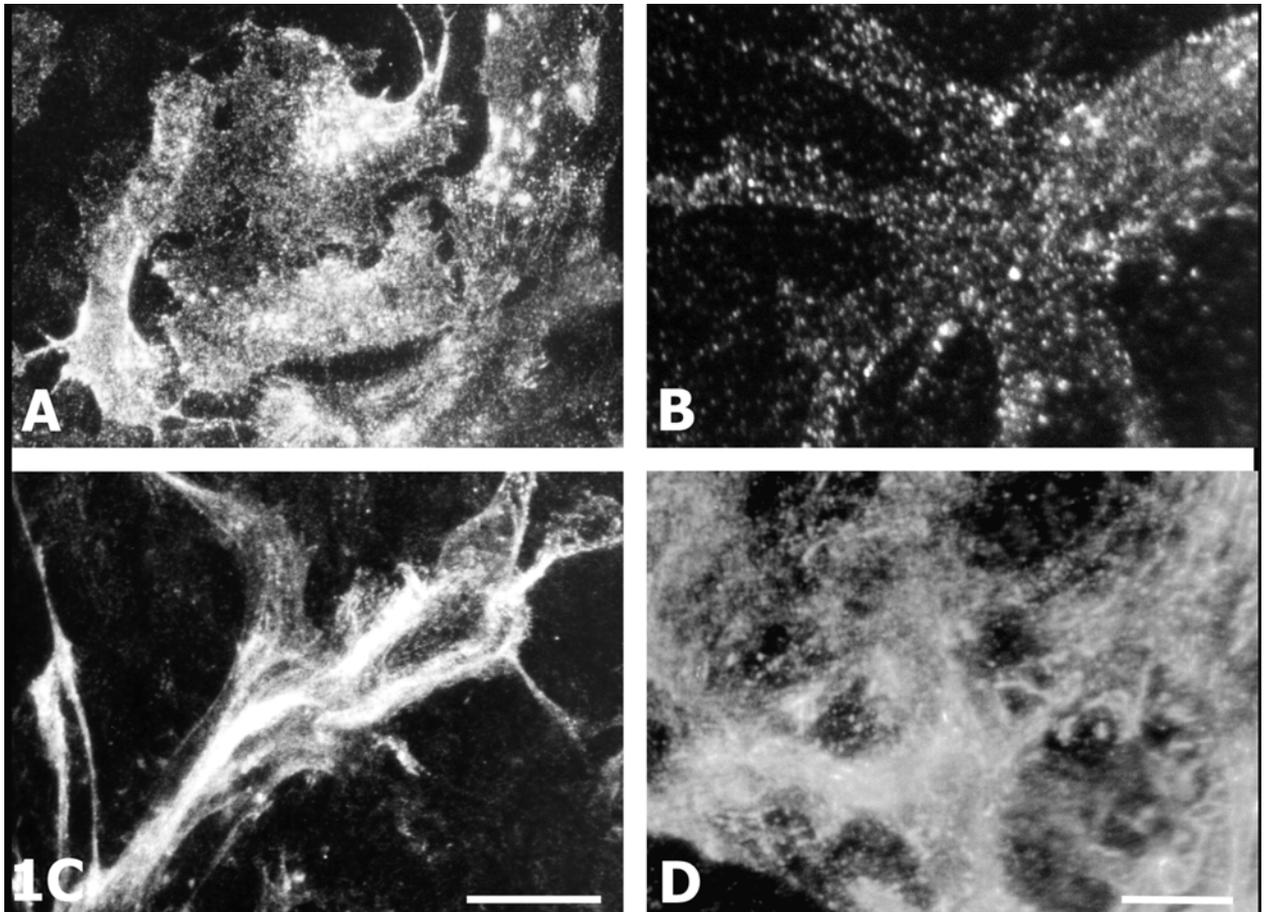
MEC (Figura 7). Para verificar em qual concentração de  $T_3$  essa alteração é visível, realizamos uma curva de concentração de  $T_3$  (Figura 8). Observamos que  $T_3$  na concentração de 5 nM não promoveu alterações significativas na organização de laminina. A partir de 10 nM,  $T_3$  promove alteração na organização de laminina, que apresenta-se em grumos. Com 100 nM de  $T_3$  a organização da laminina é distribuída em grumos.

#### **4.3.2 – Organização de fibronectina**

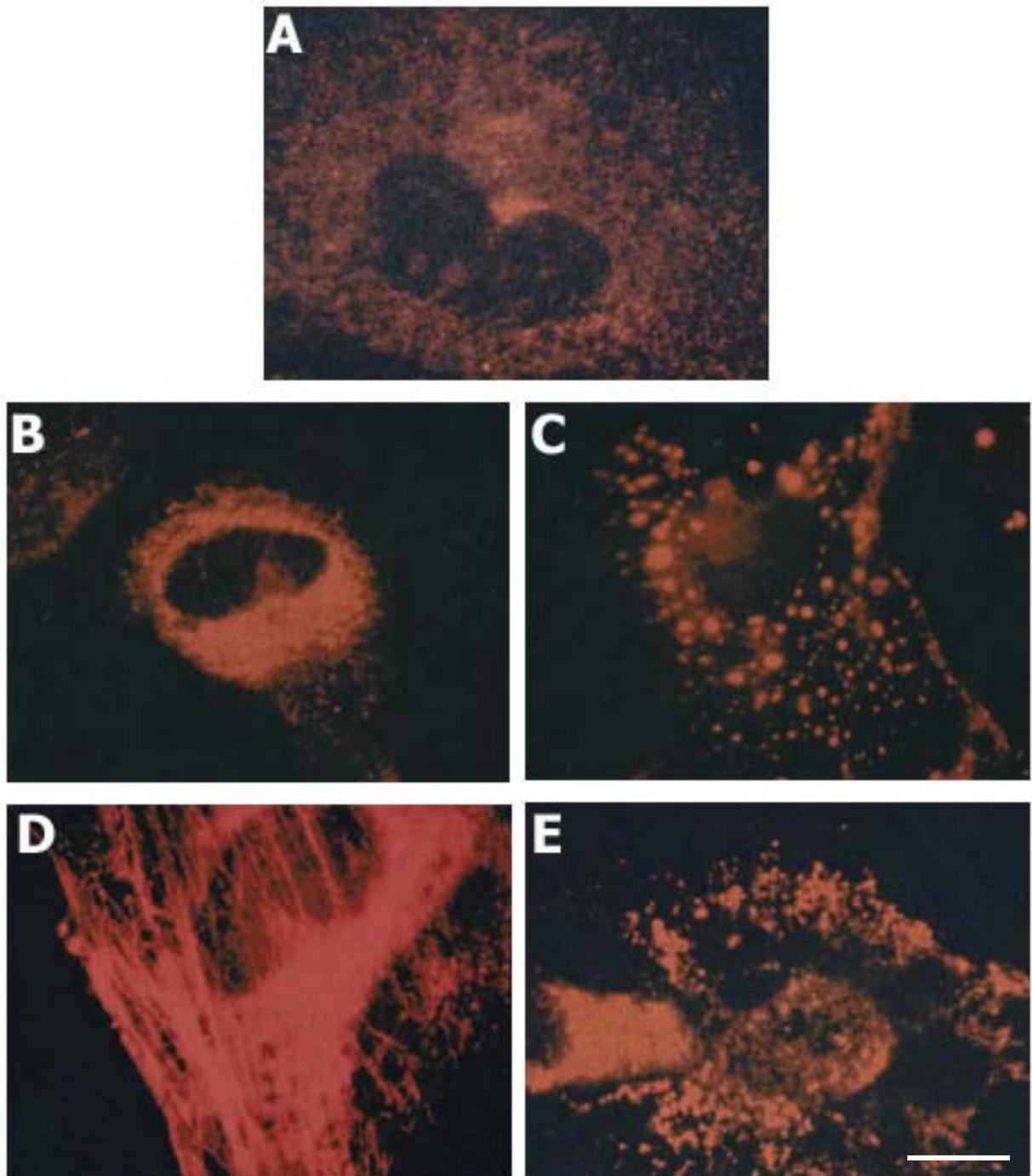
TRENTIN *et al.* (1995) demonstraram que 50 nM de  $T_3$  alterou a organização de fibronectina. Para demonstrar em qual concentração de  $T_3$  esse efeito começa a ser observado, realizamos uma curva de  $T_3$  (Figura 9). Através de imunofluorescência, pode-se observar que em 5 nM de  $T_3$  a presença de algumas fibras de fibronectina, enquanto nas concentrações de 50 e 100 nM observamos formação de uma rede filamentosa dessa proteína. Nas condições de controle, observa-se a presença de poucas fibras de fibronectina.

#### **4.3.3 - Expressão de laminina e fibronectina**

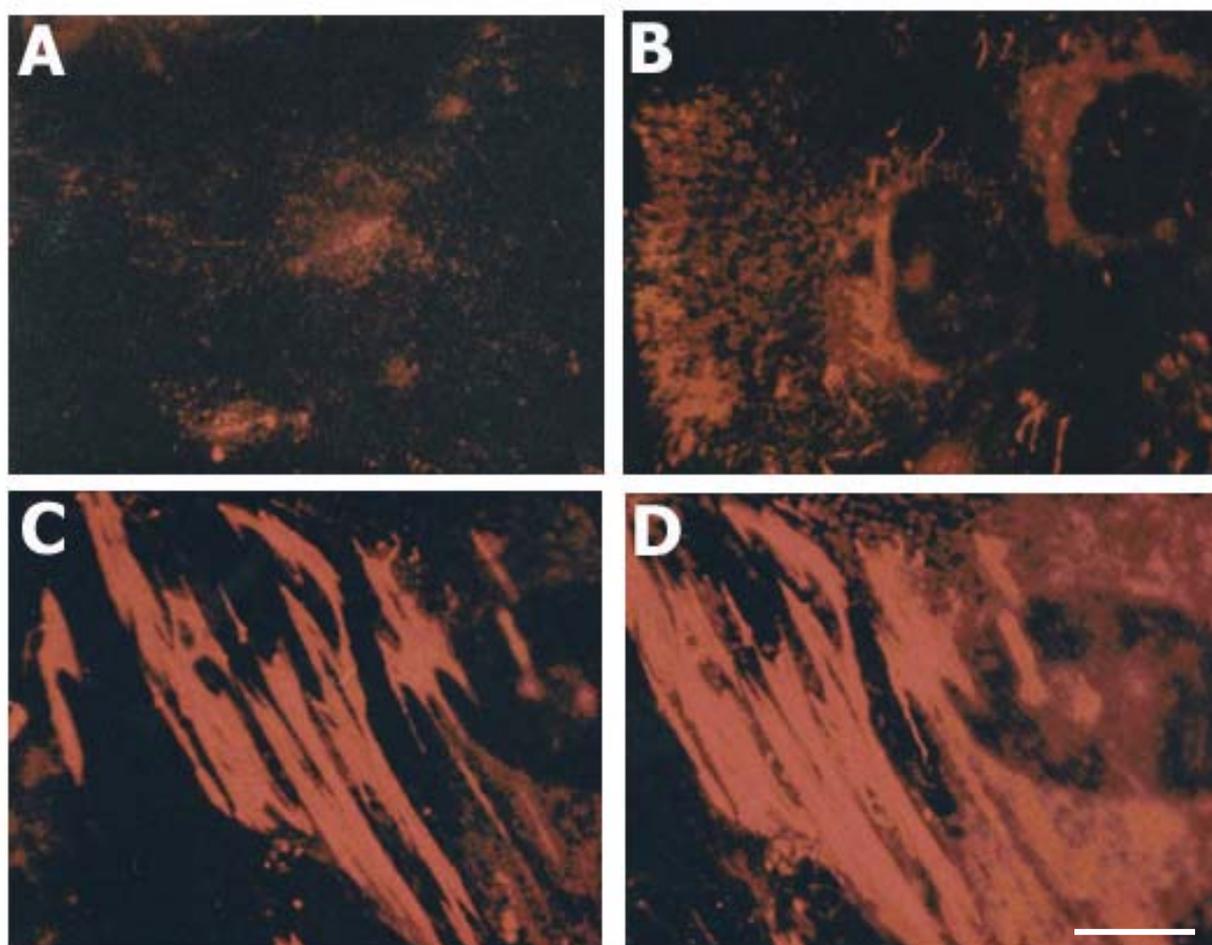
Para verificar se as alterações na organização de proteínas de MEC são acompanhadas por diferenças de expressão nos níveis dessas proteínas, realizamos a avaliação de seu imunocontéudo (Figura 10). Observamos que após o tratamento com 50 nM de  $T_3$  houve um significativo aumento de 60 % ( $\pm 0,5$ ) na expressão de fibronectina e de 74 % ( $\pm 0,6$ ) na expressão de laminina, em relação às culturas controle. Esses resultados demonstram que o  $T_3$  exerce efeitos expressivos na transcrição e tradução de laminina e fibronectina, ou na taxa de degradação dessas proteínas.



**Figura 7 – Efeitos do  $T_3$  na organização de laminina em astrócitos cerebelares.** Conforme descrito nos Materiais e Métodos, as células foram tratadas com 50 nM de  $T_3$  ou mantidas nas condições controle. As culturas foram incubadas com anticorpo anti-laminina e analisadas por imunofluorescência. (A, B) Células controle; (C, D) Células tratadas com  $T_3$ . Fotografias representativas de quatro experimentos realizados em duplicatas. Barra = 10 $\mu$ m (magnificação: A=C; B=D).

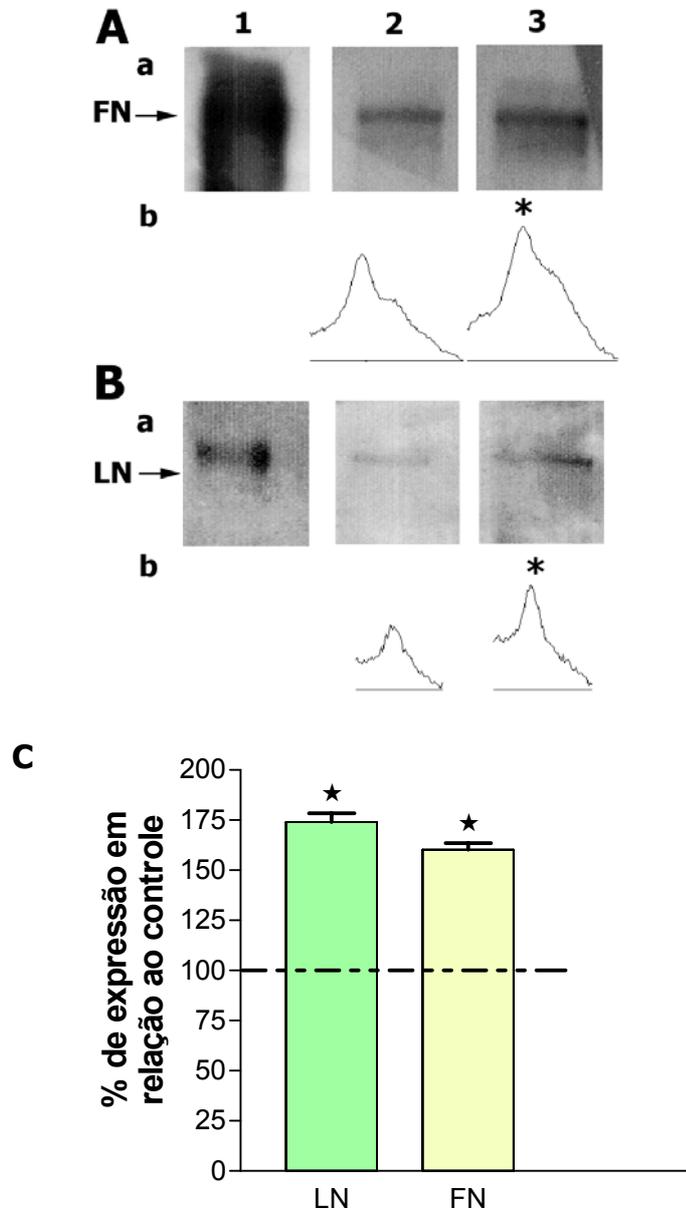


**Figura 8 – Efeitos de diferentes concentrações de T<sub>3</sub> na organização de laminina.** Conforme descrito nos Materiais e Métodos, astrócitos cerebelares foram tratados com diferentes concentrações de T<sub>3</sub> (5, 10, 50 ou 100 nM) ou mantidos nas condições controle. As culturas foram incubadas com anticorpo anti-laminina e analisadas por imunofluorescência. (A) Controle; (B) 5 nM; (C) 10 nM; (D) 50 nM; (E) 100 nM de T<sub>3</sub>. Fotografias representativas de dois experimentos realizados em duplicatas. Aumento: 1000x.



**Figura 9 – Efeitos de diferentes concentrações de T<sub>3</sub> na organização de fibronectina.**

Conforme descrito nos Materiais e Métodos, astrócitos cerebelares foram tratados com diferentes concentrações de T<sub>3</sub> (5, 50 ou 100 nM) ou mantidos nas condições controle. As culturas foram incubadas com anticorpo anti-fibronectina e analisadas por imunofluorescência. (A) Controle; (B) 5nM; (C) 50nM; (D) 100nM de T<sub>3</sub>. Fotografias representativas de dois experimentos realizados em duplicatas. Barra: 10 µm. Aumentos: A e B: 400x; C e D: 1000x.



**Figura 10 – Efeitos do  $T_3$  na expressão de laminina e fibronectina.** (a) Imunodeteção representativa de fibronectina (A) e laminina (B). Conforme descrito nos Materiais e Métodos, as culturas de astrócitos cerebelares foram tratadas com 50 nM de  $T_3$  ou mantidas em condições controle. As proteínas foram extraídas e dosadas para a realização da imunodeteção. Coluna 1 – Padrões de laminina e fibronectina; Coluna 2 – controles; Coluna 3 – tratamento com  $T_3$ . (b) Densitometria. C - Histograma representativo de três experimentos realizados em duplicatas, das bandas imunorreativas de laminina e fibronectina, onde a linha pontilhada representa os controles (100%). \*  $p < 0.0001$ , quando comparado aos controles (teste t de Student).

#### **4.4 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO bFGF NA ORGANIZAÇÃO DE MEC**

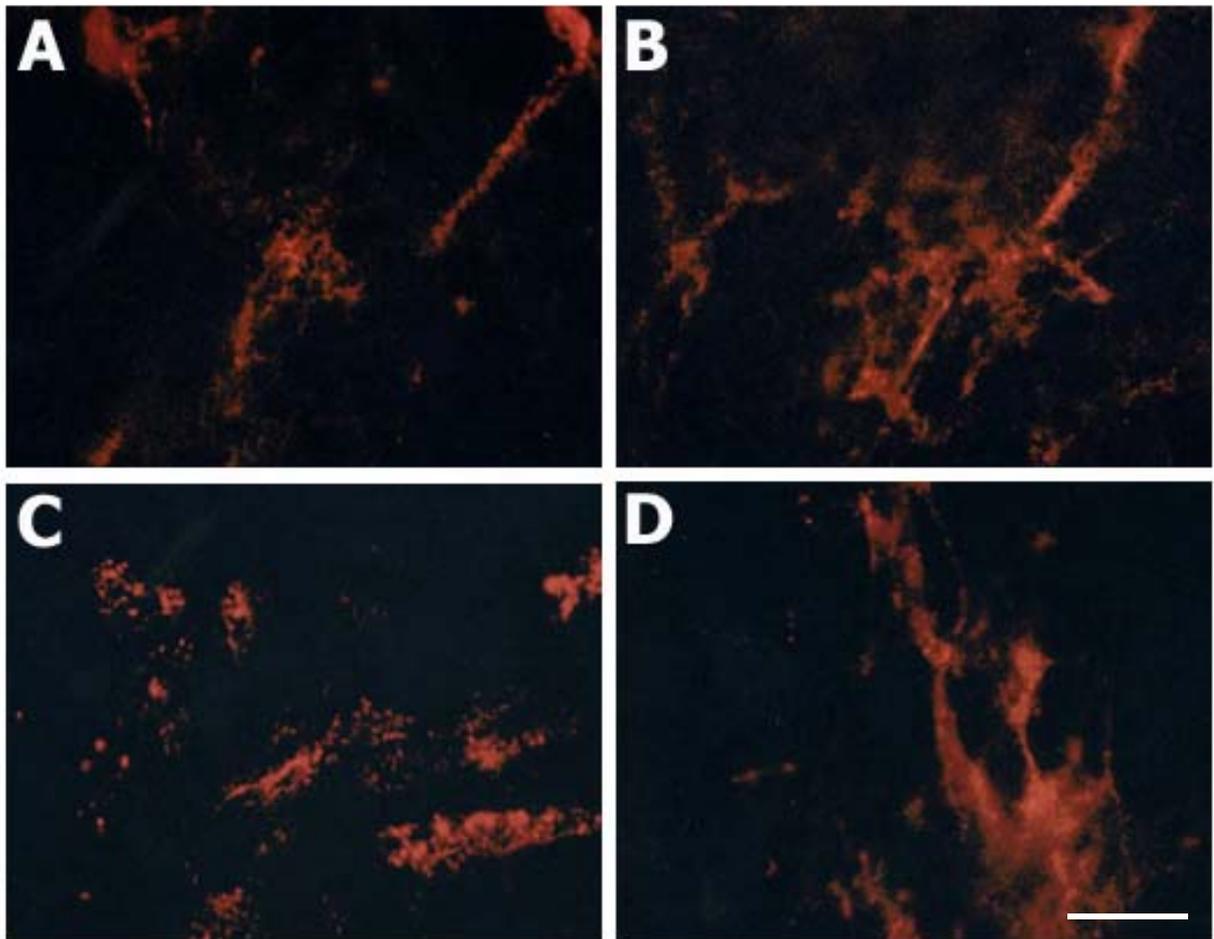
O bFGF é o principal fator de crescimento presente no meio condicionado de astrócitos cerebelares tratados com T<sub>3</sub> (TRENTIN et al., 2001). Com o objetivo de analisarmos se os efeitos do T<sub>3</sub> na organização de laminina e fibronectina são mediados pelo bFGF, realizamos os tratamentos com bFGF e com um anticorpo neutralizante do bFGF, para verificar se a organização dessas proteínas seguia o mesmo padrão que o observado em astrócitos tratados com T<sub>3</sub>.

##### **4.4.1 – Efeitos do tratamento com bFGF**

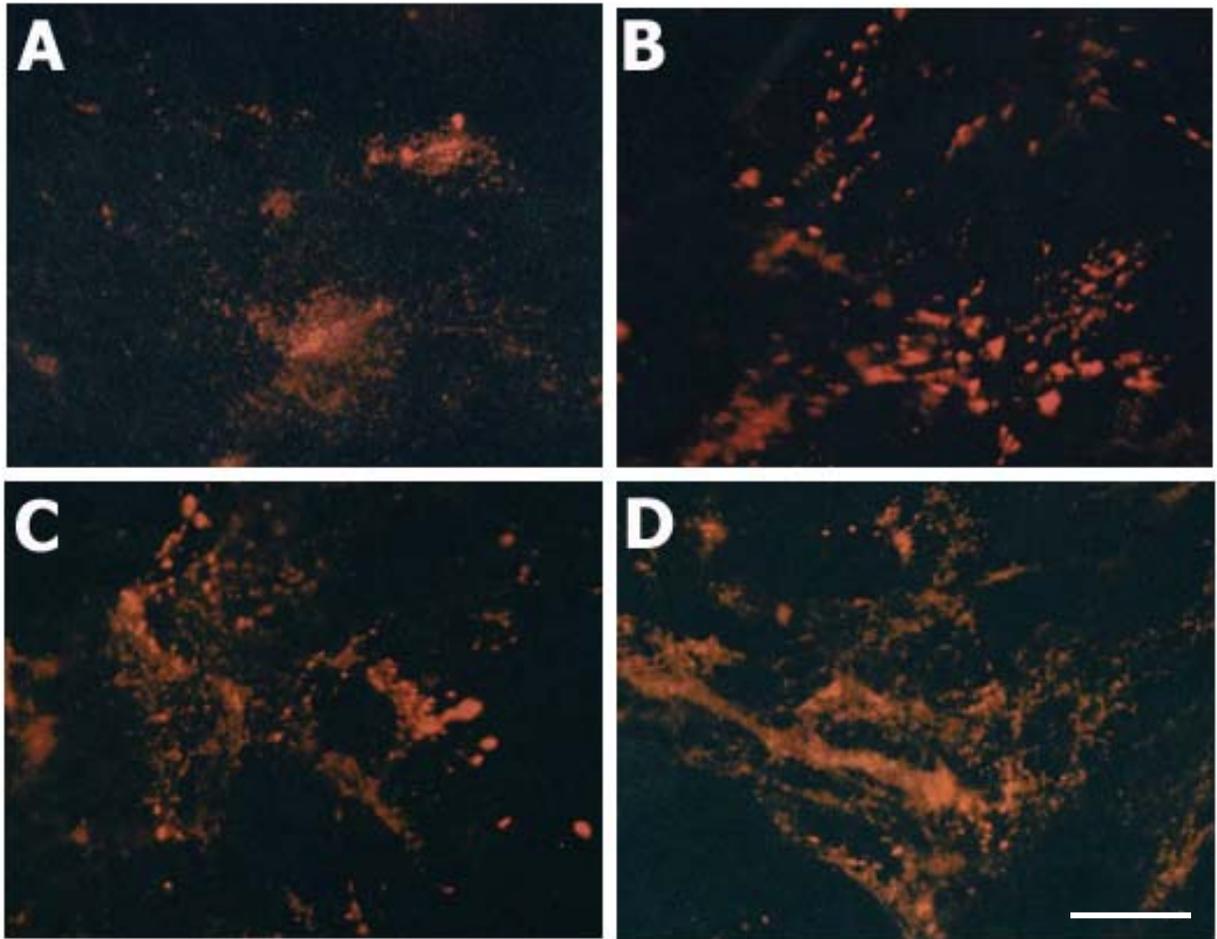
O tratamento com bFGF promoveu uma progressiva diferença na organização tanto de laminina como de fibronectina, em relação ao controle, de acordo com a concentração e com o tempo de tratamento.

A imunofluorescência para laminina revelou baixa intensidade de marcação nas células controle e na concentração de 2 ng/ml de bFGF, após 6 horas de incubação (Figura 11). Essa marcação apresentou-se em grumos, utilizando-se bFGF na concentração de 5 ng/ml. O tratamento de 10 ng/ml de bFGF por 6 horas revelou uma fina rede de laminina.

Após 12 horas de tratamento (Figura 12), a marcação para laminina é pontual e fraca nos controles. Na concentração de 2 ng/ml de bFGF, observa-se a formação de grumos de



**Figura 11 – Efeitos do bFGF na organização de laminina.** Conforme descrito nos Materiais e Métodos, astrócitos cerebelares em confluência foram tratados com diferentes concentrações de bFGF durante 6 horas, incubados com anticorpo anti-laminina e analisados por imunofluorescência. (A) Controle; (B) 2 ng/ml; (C) 5 ng/ml; (D) 10 ng/ml de bFGF. Fotografias representativas de dois experimentos realizados em duplicatas. Barra = 10  $\mu$ m. Aumento: 1000x.

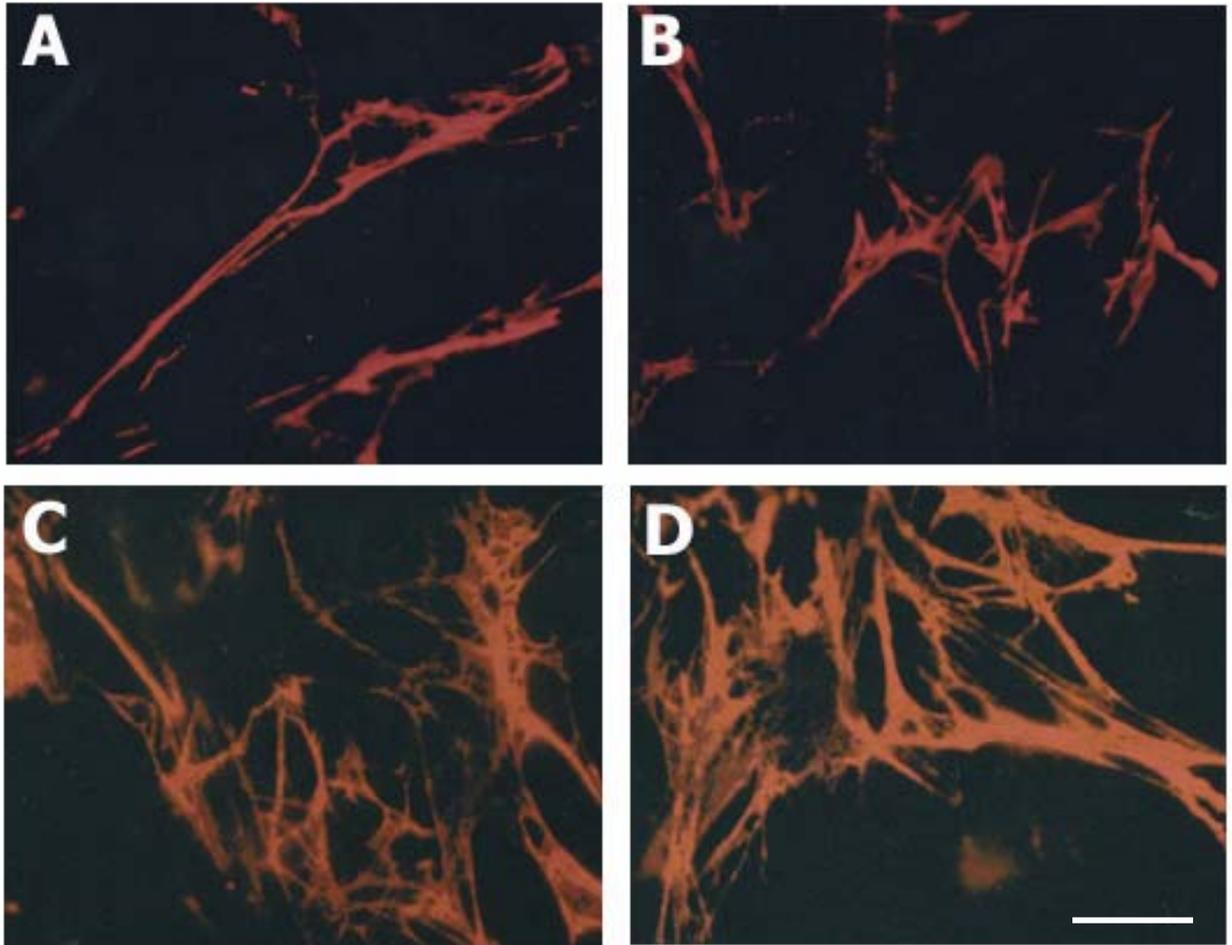


**Figura 12 – Efeitos do bFGF na organização de laminina.** Conforme descrito nos Materiais e Métodos, astrócitos cerebelares em confluência foram tratados com diferentes concentrações de bFGF durante 12 horas, incubados com anticorpo anti-laminina e analisados por imunofluorescência. (A) Controle; (B) 2 ng/ml; (C) 5 ng/ml; (D) 10 ng/ml de bFGF. Fotografias representativas de dois experimentos realizados em duplicatas. Barra = 10  $\mu$ m. Aumento: 1000x.

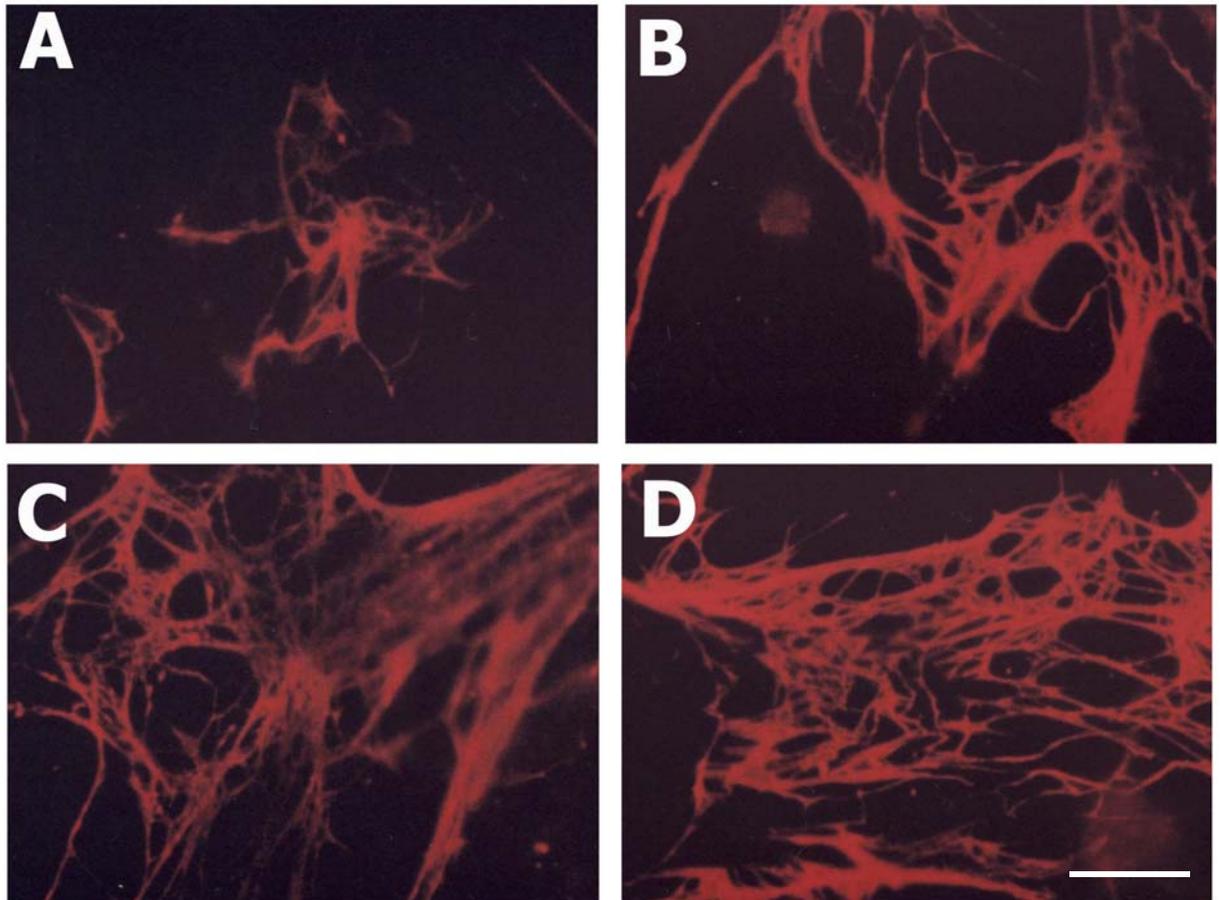
laminina. Esse efeito torna-se mais evidente nas concentrações de 5 ng/ml e de 10 ng/ml de bFGF, sendo que nessa última pode-se notar que a laminina parece formar uma rede mais complexa.

A imunofluorescência para fibronectina revelou, nas células em condição de controle, poucas fibras de fibronectina. Observamos um aumento na imunomarcção da fibronectina de acordo com a concentração de bFGF (2, 5 e 10 ng/ml), tanto no tempo de 6 horas quanto no tempo de 12 horas de incubação (Figuras 13 e 14). Esse efeito é mais evidente no tempo de 12 horas de tratamento, nas concentrações de 5 e 10 ng/ml de bFGF, onde a fibronectina é fortemente marcada como uma complexa rede proteica.

Portanto, apesar destes expressivos resultados, o tratamento com bFGF não reproduz exatamente os mesmos efeitos que o tratamento com T<sub>3</sub>, principalmente na organização da laminina.



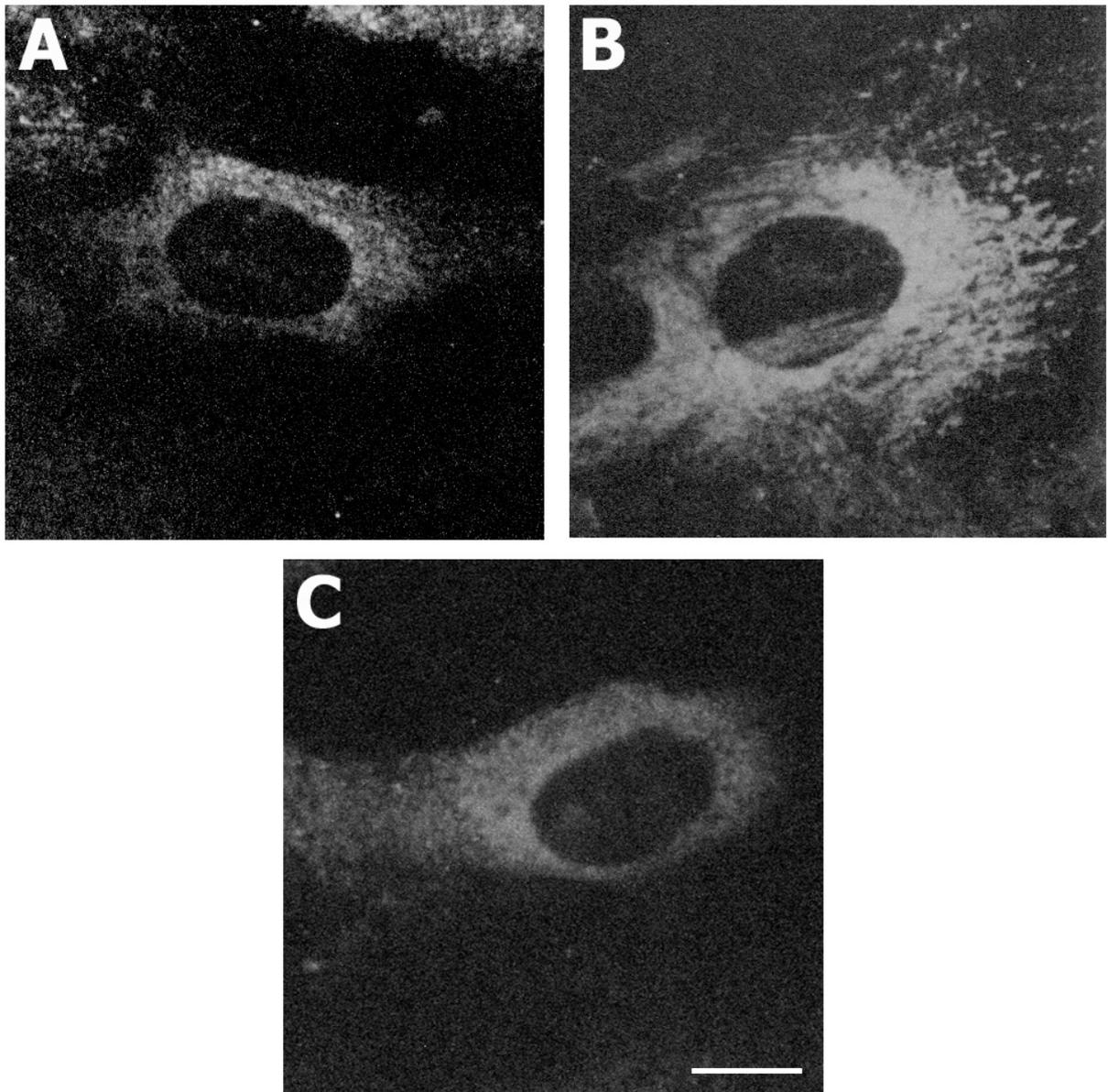
**Figura 13 – Efeitos do bFGF na organização de fibronectina.** Conforme descrito nos Materiais e Métodos, astrócitos cerebelares em confluência foram tratados com diferentes concentrações de bFGF durante 6 horas, incubados com anticorpo anti-fibronectina e analisados por imunofluorescência. (A) Controle; (B) 2 ng/ml; (C) 5 ng/ml; (D) 10 ng/ml de bFGF. Fotografias representativas de dois experimentos realizados em duplicatas. Barra = 10  $\mu$ m. Aumento: 1000x.



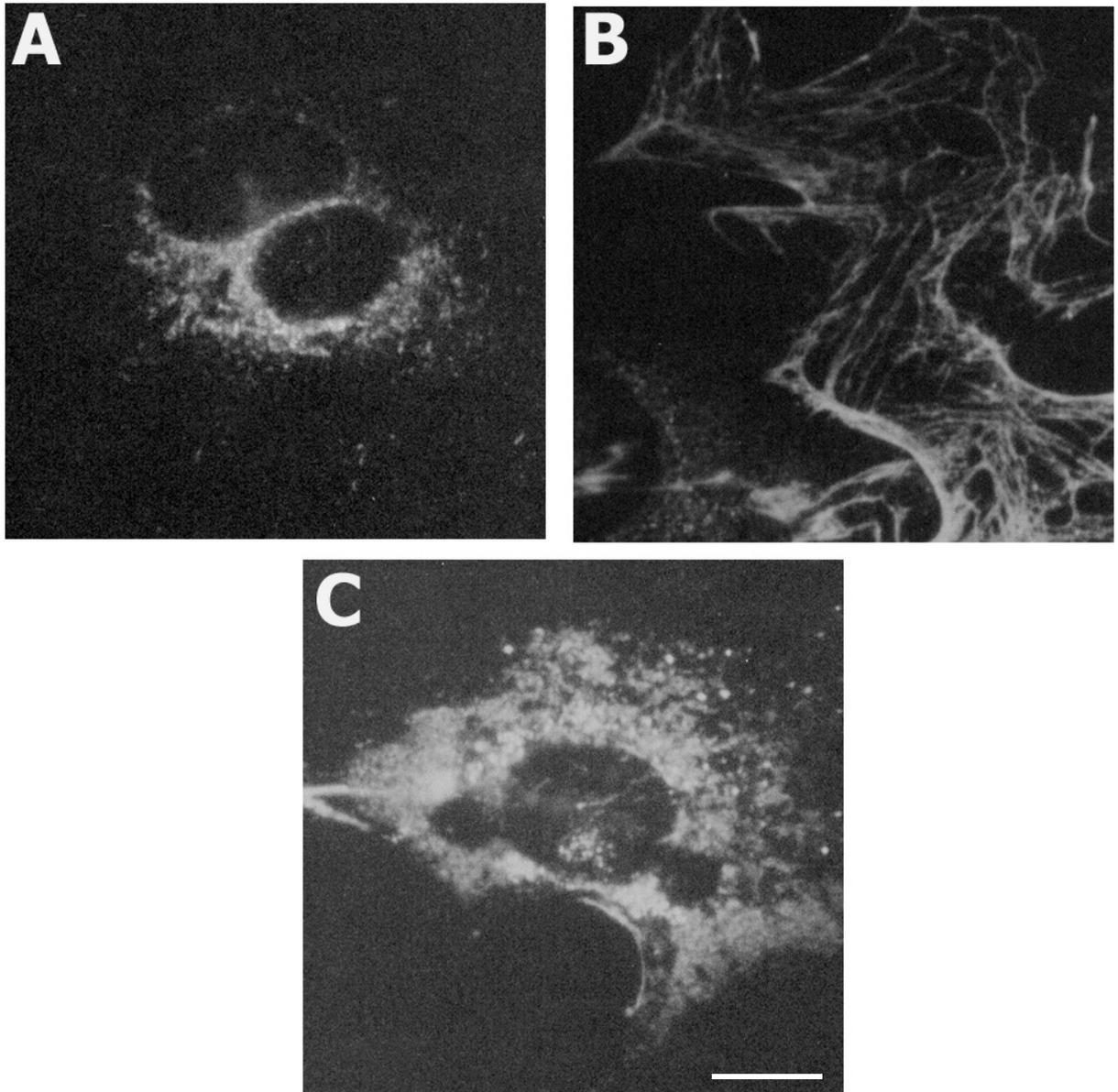
**Figura 14 – Efeitos do bFGF na organização de fibronectina.** Conforme descrito nos Materiais e Métodos, astrócitos cerebelares em confluência foram tratados com diferentes concentrações de bFGF durante 12 horas, incubados com anticorpo anti-fibronectina e analisados por imunofluorescência. (A) Controle; (B) 2 ng/ml; (C) 5 ng/ml; (D) 10 ng/ml de bFGF. Fotografias representativas de dois experimentos realizados em duplicatas. Barra = 10  $\mu$ m. Aumento: 1000x.

#### **4.4.2 – Efeitos do tratamento com anticorpo anti-bFGF**

Com o objetivo de confirmar a ação do bFGF sobre a alteração na organização de laminina e fibronectina de astrócitos cerebelares induzida pelo tratamento com  $T_3$ , foi realizada a incubação com anticorpo neutralizante de bFGF. As Figuras 15 e 16 mostram que, com a adição do anticorpo neutralizante de bFGF, a organização tanto de laminina como de fibronectina apresenta aspecto semelhante ao das células em condições controle, ou seja, sem formação fibrilar, sugerindo que o bFGF é um importante mediador dos efeitos do  $T_3$  sobre a organização de laminina e fibronectina.



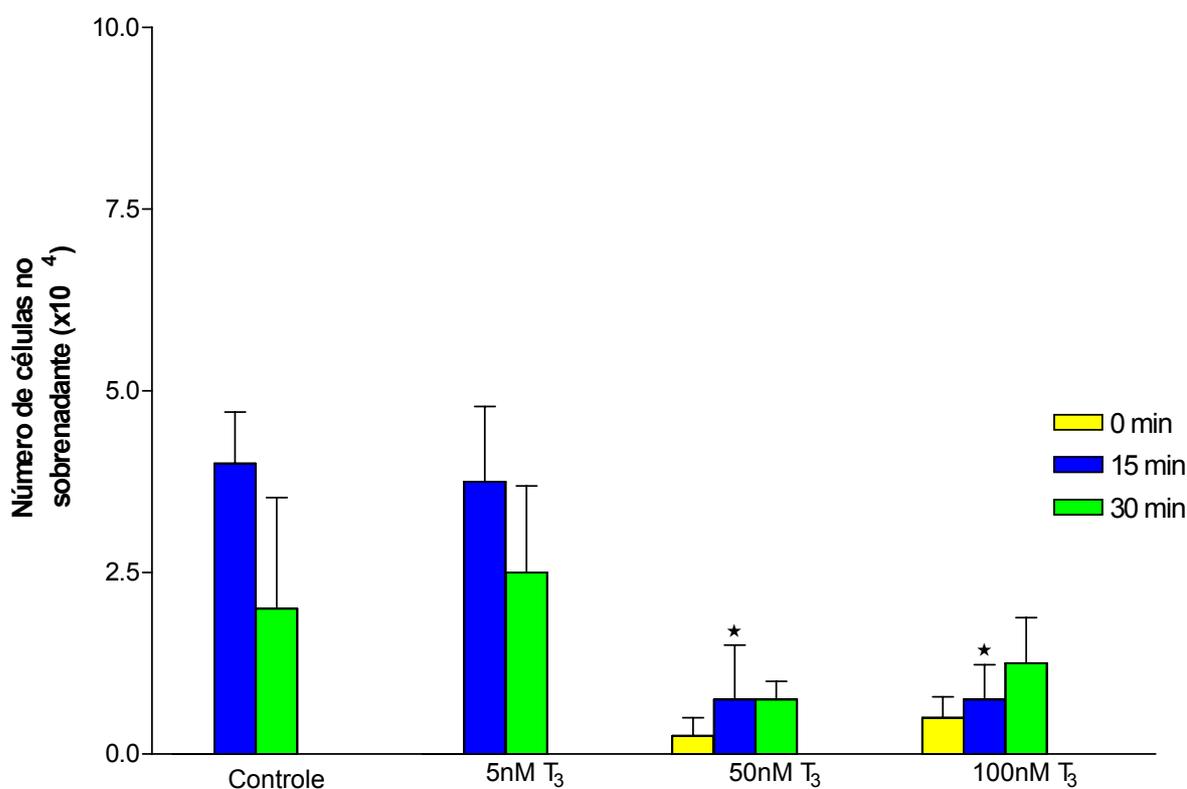
**Figura 15 – Efeitos do anticorpo neutralizante de bFGF na organização de laminina.** O anticorpo neutralizante de bFGF foi adicionado ao meio de cultura na presença de 50 nM de T<sub>3</sub>. Os astrócitos cerebelares receberam este tratamento, ou foram somente tratados com 50 nM de T<sub>3</sub> ou mantidos em condições controle. As culturas foram incubadas com anticorpo anti-laminina e analisadas por imunofluorescência. (A) Células controle; (B) Células tratadas com 50nM de T<sub>3</sub>; (C) Células tratadas com 50nM de T<sub>3</sub> e anticorpo neutralizante de bFGF. Fotografias representativas de dois experimentos realizados em duplicatas. Barra = 10 µm. Aumento: 1000x.



**Figura 16 – Efeitos do anticorpo neutralizante de bFGF na organização de fibronectina.** O anticorpo neutralizante de bFGF foi adicionado ao meio de cultura na presença de 50 nM de T<sub>3</sub>. Os astrócitos cerebelares receberam este tratamento, ou foram somente tratados com 50 nM de T<sub>3</sub> ou mantidos em condições controle. As culturas foram incubadas com anticorpo anti-fibronectina e analisadas por imunofluorescência. (A) Células controle; (B) Células tratadas com 50nM de T<sub>3</sub>; (C) Células tratadas com 50nM de T<sub>3</sub> e anticorpo neutralizante de bFGF. Fotografias representativas de dois experimentos realizados em duplicatas. Barra = 10µm. Aumento: 1000x.

#### 4.5 - ANÁLISE DOS EFEITOS DO T<sub>3</sub> NA ADESÃO CELULAR

Para verificar se as alterações nas proteínas de MEC poderiam estar relacionadas com a adesão dos astrócitos ao substrato, realizamos um ensaio de tripsinização (Figura 17). Após a tripsinização, o número de células destacadas presentes no meio sobrenadante, aumentou de acordo com os tempos de incubação com tripsina (0, 15 e 30 minutos). Entretanto, o número de células observado no meio sobrenadante de astrócitos tratados com T<sub>3</sub> foi significativamente menor do que o observado nos controles. Além disso, esse efeito parece ser dependente da concentração dentro de um mesmo tempo de incubação, pois foi observada uma tendência de o número de células no sobrenadante diminuir quando se aumentou a concentração de T<sub>3</sub>. Esses dados sugerem uma maior resistência dos astrócitos tratados com T<sub>3</sub> no destacamento celular causado pela digestão das proteínas de MEC pela tripsina e uma possível maior aderência dessas células ao substrato.



**Figura 17 – Efeitos do T<sub>3</sub> sobre a adesão celular.** O ensaio de tripsinização foi realizado conforme descrito nos Materiais e Métodos, em astrócitos controles e tratados com as diferentes concentrações de T<sub>3</sub>. Os valores representam as médias ± erro padrão de três experimentos realizados em quadruplicatas. \* p<0,05, quando comparados ao controle nos respectivos tempos de tripsinização (ANOVA seguida de Newmann-Keuls).

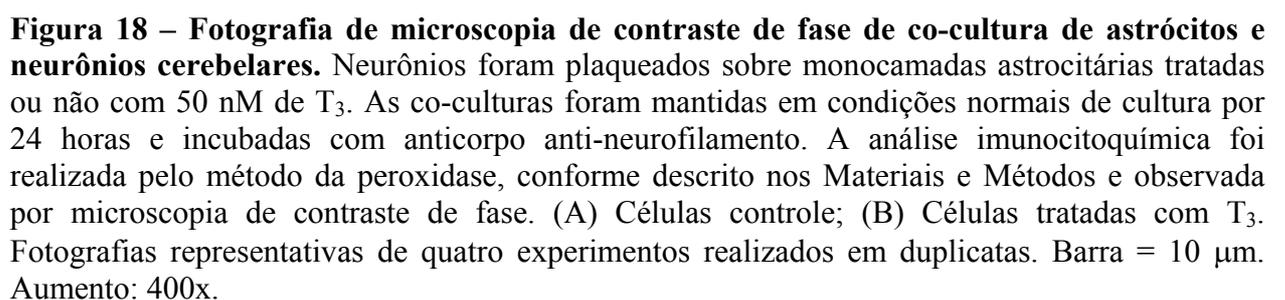
#### 4.6 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO NEURONAL E NEURITOGÊNESE MEDIADO POR ASTRÓCITOS

Foi demonstrado que o meio condicionado de astrócitos cerebelares tratados com T<sub>3</sub> induziu proliferação neuronal mediada por fatores de crescimento (GOMES *et al.*,1999). Para verificar se astrócitos cerebelares tratados com T<sub>3</sub> poderiam ser um substrato adequado para o crescimento neuronal, realizamos co-culturas desses dois tipos celulares (Figura 18). Assim, foi observado um maior número de neurônios sobre os astrócitos tratados com T<sub>3</sub> em relação às culturas controle (Tabela 1). Além disso, os neurônios cultivados sobre astrócitos tratados com T<sub>3</sub> apresentaram neuritos mais longos do que os cultivados sobre astrócitos não tratados (Tabela 1). Por outro lado, os neurônios cultivados sobre astrócitos controle apresentaram mais neuritos por célula, embora mais curtos e com aspecto multipolar (Tabela 1). Os efeitos do hormônio da tireóide sobre os astrócitos poderiam influenciar o desenvolvimento neuronal através de diferentes mecanismos que não são exclusivos: fatores de crescimento solúveis, interação célula-MEC e/ou célula-célula.

**Tabela 1. Astrócitos cerebelares tratados com T<sub>3</sub> modulam a neurogênese.**

<b>Tratamento</b>	<b>Número de neurônios/campo</b>	<b>Tamanho do neurito (µm)</b>	<b>Neurito/célula</b>
<b>Controle</b>	4.3 ± 0.2	31.9 ± 3.2	3.12 ± 0.2
<b>T<sub>3</sub></b>	10.0 ± 0.6 *	56.0 ± 3.1 *	1.7 ± 0.07 *

Neurônios cerebelares foram plaqueados sobre monocamadas astrocitárias tratadas ou não com 50 nm de T<sub>3</sub> e mantidos em condições normais de cultura por 24 horas, quando foram realizadas a imunocitoquímica e as análises. \* p< 0.001 em relação ao controle (teste t).

A phase-contrast microscopy image showing the co-culture of astrocytes and cerebellar neurons. The image displays a dense layer of cells with varying morphologies, including some larger, more rounded cells and smaller, more elongated cells. The cells are arranged in a somewhat organized manner, with some appearing to be in contact with each other. The background is a light, uniform color, suggesting a well-cultured monolayer. A scale bar is visible in the bottom right corner of the image area.

**Figura 18 – Fotografia de microscopia de contraste de fase de co-cultura de astrócitos e neurônios cerebelares.** Neurônios foram plaqueados sobre monocamadas astrocitárias tratadas ou não com 50 nM de T<sub>3</sub>. As co-culturas foram mantidas em condições normais de cultura por 24 horas e incubadas com anticorpo anti-neurofilamento. A análise imunocitoquímica foi realizada pelo método da peroxidase, conforme descrito nos Materiais e Métodos e observada por microscopia de contraste de fase. (A) Células controle; (B) Células tratadas com T<sub>3</sub>. Fotografias representativas de quatro experimentos realizados em duplicatas. Barra = 10 μm. Aumento: 400x.

## 5 – DISCUSSÃO

### 5.1 – ASPECTOS GERAIS DA AÇÃO DO T<sub>3</sub>

O hormônio da tireóide, T<sub>3</sub>, é essencial para o desenvolvimento e metabolismo do SNC. O cretinismo, doença caracterizada por retardo mental e físico, é resultado da deficiência em T<sub>3</sub> durante o período neonatal (LEGRAND, 1982; PUYMIRAT, 1992; PORTERFIELD & HENDRICH, 1993; TRENTIN, 1997; DARRAS *et al.* 1999; KOIBUCHI & CHIN, 2000). As sinalizações intra e extracelulares podem ser prejudicadas pela falta de T<sub>3</sub>, comprometendo o crescimento e a diferenciação das células gliais e dos neurônios. Isto pode dificultar o estabelecimento de sinapses e, conseqüentemente, o desenvolvimento normal do SNC. Muitos trabalhos têm sido realizados, *in vivo* e *in vitro*, para compreender os efeitos do T<sub>3</sub> ou da carência dele, sobre o desenvolvimento do SNC. Estudos *in vivo* com ratos tireoidectomizados tanto ao nascimento como também quando adultos, demonstraram menor desenvolvimento intelectual desses animais do que em animais normais (EAYRS & LEVINE, 1963; HENDRICH *et al.*, 1984).

Estudos anteriores *in vitro*, demonstraram alguns efeitos do T<sub>3</sub> em células gliais e em neurônios. Os efeitos de T<sub>3</sub> sobre a glia têm importantes conseqüências no desenvolvimento, metabolismo e atividade neuronal, bem como formação e plasticidade de conexões sinápticas (GARCIA-SEGURA *et al.*, 1996; MOURA NETO *et al.*, 1996). T<sub>3</sub> induz alterações morfológicas, proliferação de astrócitos de diferentes regiões cerebrais e aumento na expressão de GFAP, além de reorganização dessa proteína e de fibronectina (TRENTIN *et al.*, 1995; TRENTIN & MOURA NETO, 1995; LIMA *et al.* 1997; LIMA *et al.*, 1998). É provável que T<sub>3</sub> promova esses efeitos através da ação e secreção autócrina de fatores de crescimento, bem como de interações células-

células e/ou células-MEC (TRENTIN *et al.*, 1995; TRENTIN & MOURA NETO, 1995; LIMA *et al.* 1997; LIMA *et al.*, 1998). T<sub>3</sub> também induziu astrócitos cerebelares a secretarem fatores de crescimento, principalmente bFGF, mas também aFGF, TNF- $\beta$  e IL-3. Esses fatores foram parcialmente responsáveis pela proliferação de astrócitos e de células do glioma C6 de ratos (TRENTIN *et al.*, 2001). Foi demonstrado também, um aumento significativo no número de neurônios cerebelares, na presença de meio condicionado obtido de astrócitos tratados com T<sub>3</sub> (GOMES *et al.*, 1999).

No presente estudo demonstramos que o hormônio da tireóide, T<sub>3</sub>, promove reorganização e aumento na expressão de laminina e fibronectina em astrócitos cerebelares de ratos neonatos e que estes efeitos são reproduzidos parcialmente pelo tratamento com bFGF. A adição de anticorpo neutralizante de bFGF reverteu as alterações na organização de laminina e fibronectina promovidas pelo T<sub>3</sub>, para a organização dessas moléculas observadas nas células controle. T<sub>3</sub> também promoveu alterações na adesão celular, pois astrócitos tratados com T<sub>3</sub> destacaram do substrato em uma razão menor dos que os controles. Neurônios cultivados sobre monocamadas astrocitárias tratadas com T<sub>3</sub> são mais numerosos e apresentam neuritos mais longos do que os cultivados sobre astrócitos controles.

## **5.2 – FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS E MORFOLOGIA**

Para verificar se nossas culturas celulares correspondiam a culturas de astrócitos, realizamos a imunofluorescência para GFAP. Esta proteína faz parte do citoesqueleto, sendo um filamento intermediário expresso quase que exclusivamente em astrócitos, além de ser um marcador da diferenciação astrocitária (PERZEL'OVA & MARES, 1993; MORITA *et al.*, 1997;

KÁLMÁN & AJTAI, 2001; GARCIA *et al.*, 2002). Em comparação aos núcleos totais corados com DAPI, observamos que aproximadamente 95 % das células foram marcadas pela imunofluorescência para GFAP, correspondendo a astrócitos. TRENTIN & MOURA NETO (1995) demonstraram que T<sub>3</sub> alterou a organização do GFAP em astrócitos cerebelares, efeito que pode estar relacionado às alterações observadas na proliferação celular.

Através da análise pelo contraste de fase e da imunofluorescência para vimentina, no presente trabalho demonstramos que o T<sub>3</sub> não promove alterações na morfologia dos astrócitos cerebelares (Figuras 5 e 6). Entretanto, observamos alguns astrócitos com morfologia alongada e com mais processos em campos com menor densidade celular nas culturas tratadas com T<sub>3</sub> (dados não mostrados). Astrócitos em confluência apresentam morfologia poligonal e achatada, evidenciando a importância dos contatos célula/célula, conforme já havia sido descrito (TRENTIN *et al.*, 1995). Estes autores demonstraram que apesar de não promover alterações morfológicas nos astrócitos cerebelares, o tratamento com T<sub>3</sub> promoveu reorganização na fibronectina e aumentou significativamente a proliferação destas células (TRENTIN & MOURA NETO, 1995). Isto demonstra que processos como proliferação, adesão e migração celular podem estar relacionados com a estrutura tridimensional formada pelas moléculas de MEC.

### **5.3 – EFEITOS DO T<sub>3</sub> NA ORGANIZAÇÃO E EXPRESSÃO DE LAMININA E FIBRONECTINA**

No presente trabalho, demonstramos que T<sub>3</sub> promove reorganização e aumento na expressão tanto de laminina como de fibronectina em culturas de astrócitos cerebelares de ratos recém-nascidos. Proteínas de MEC como fibronectina e laminina formam distintas redes tecido-específicas que regulam o comportamento celular (SCHWARZBAUER & SECHLER, 1999).

Demonstramos que nos astrócitos controle, a fibronectina concentrou-se de maneira puntual na superfície celular. Após o tratamento com 50 nM de T<sub>3</sub>, esta molécula apresentou-se reorganizada em fibras (Figura 9) e sua expressão teve um significativo aumento de 60 % (Figura 10). Considerando as alterações na organização de fibronectina promovidas por este hormônio, resolvemos investigar a partir de que concentração o T<sub>3</sub> exerce efeitos sobre esta proteína. T<sub>3</sub> na concentração de 5 nM promove a formação de algumas fibras de fibronectina, porém pouco significativas em relação ao controle. Na concentração de 100 nM de T<sub>3</sub>, observamos formação de uma rede filamentosa dessa proteína. As alterações nos níveis e na organização da fibronectina, promovidas pelo T<sub>3</sub>, poderiam promover modificações na proliferação, bem como na adesão celular, pois a fibronectina participa da adesão, expansão e migração de muitos tipos celulares (YONEDA *et al.*, 1995; WALKER & GALLAGHER, 1996). Além disso, interações entre a matriz de fibronectina e fatores de crescimento podem regular a diferenciação e a migração celular (SCHWARZBAUER & SECHLER, 1999).

FARWELL & DUBORD-TOMASETTI (1999a) demonstraram que o tratamento com T<sub>4</sub> em culturas de astrócitos cerebelares induziu secreção e organização extracelular de laminina em arranjos lineares, enquanto que o tratamento com T<sub>3</sub> promoveu somente pequenos depósitos de laminina na superfície celular em um padrão difuso e desorganizado. Em nossos experimentos, demonstramos que culturas de astrócitos controle exibiram a laminina distribuída em uma configuração puntual e após o tratamento com 50 nM de T<sub>3</sub> esta organização foi alterada para fibrilar (Figuras 7 e 8), similarmente aos resultados de FARWELL & DUBORD-TOMASETTI (1999a) depois do tratamento com T<sub>4</sub>. Observamos também um significativo aumento na expressão da laminina (74 %) depois do tratamento com T<sub>3</sub> (Figura 10). Diferenças nos protocolos experimentais poderiam explicar as diferenças entre esses resultados. Enquanto que em nossos experimentos utilizamos somente culturas primárias cerebelares, FARWELL & DUBORD-

TOMASETTI (1999a) utilizaram de uma a três passagens de monocamadas astrocitárias. Como descrito anteriormente, estas culturas respondem de maneira diferente ao hormônio (TRENTIN *et al.*, 1995). Além disso, o tratamento de T<sub>3</sub> que utilizamos é mais longo (três dias com adição diária de meio de cultura e T<sub>3</sub>, mais dois dias mantendo as células com o mesmo meio de cultura e sem adição de hormônio), enquanto que o tratamento de FARWELL & DUBORD-TOMASETTI (1999a) é de 36 horas. Este tempo de tratamento reduzido poderia ser insuficiente para a reorganização da laminina em filamentos. Além disso, demonstramos que T<sub>3</sub> na concentração de 5 nM não apresentou alterações significativas na organização de laminina. Com 10 nM de T<sub>3</sub>, podemos observar já o início da formação de grumos de laminina, promovendo talvez o início da organização em fibras. Esta concentração pode ser suficiente para que o T<sub>3</sub> aumente a taxa de transcrição de laminina, ou diminua a taxa de degradação desta proteína. Com 100nM de T<sub>3</sub>, a organização da laminina também apresenta-se em grumos (Figura 8).

Estudos recentes enfatizam um importante papel da laminina no crescimento de neuritos, além de sobrevivência e migração neuronal (LETOURNEAU *et al.*, 1994; GARCIA-ABREU *et al.*, 1995). O padrão de distribuição de laminina promove orientação para o crescimento de neuritos (LIESI, 1990; GARCIA-ABREU *et al.*, 1995). GARCIA-ABREU e colaboradores (1995) observaram um padrão puntual de laminina em astrócitos da linha média, região não permissiva para o crescimento de neuritos, enquanto no mesencéfalo lateral, região permissiva para o crescimento de neuritos, observou-se uma configuração fibrilar de laminina. Neste estudo, demonstramos que neurônios cerebelares cultivados sobre astrócitos tratados com T<sub>3</sub> são mais numerosos e apresentam neuritos maiores do que os cultivados sobre astrócitos controle (Figura 18). Dessa forma, astrócitos tratados com T<sub>3</sub> poderiam ser um melhor substrato para o crescimento neuronal do que culturas controle. O efeito do T<sub>3</sub> sobre a expressão de laminina poderia ser uma das ações celulares deste hormônio morfogenético sobre o desenvolvimento neuronal. Os efeitos do T<sub>3</sub>

poderiam afetar diretamente o crescimento neuronal, ou indiretamente, através de produção endócrina de fatores, como por exemplo o bFGF.

#### **5.4 – EFEITOS DO T<sub>3</sub> NA ADESÃO CELULAR**

Com o objetivo de analisarmos se os efeitos do T<sub>3</sub> sobre as modificações na organização e expressão de moléculas de MEC, interferem na capacidade das células de se manterem aderidas à placa de cultura, realizamos o ensaio de tripsinização. Verificamos que os astrócitos tratados com T<sub>3</sub> foram destacados da placa de cultura em uma razão menor do que os astrócitos controles (Figura 17). É provável que a formação de redes proteicas de laminina e fibronectina induzidas por T<sub>3</sub> tenha promovido uma maior adesão celular ao substrato, através do fortalecimento dos pontos focais e maior quantidade de ligações dessas moléculas às integrinas. FARWELL & DUBORD-TOMASETTI (1999a) demonstraram que em culturas de astrócitos, T<sub>4</sub> induziu a formação de agregados de integrinas e de contatos focais nos astrócitos aderidos à laminina. A adesão dos astrócitos tratados com T<sub>3</sub>, relacionada com a laminina e a fibronectina, poderia estar associada à organização de microfilamentos de actina e sua interação com as integrinas e com as moléculas de MEC. Além disso, estes efeitos podem ser mediados pelo bFGF e por outros fatores de crescimento.

## 5.5 – EFEITO DO bFGF NA ORGANIZAÇÃO DE LAMININA E FIBRONECTINA

Moléculas de MEC podem ligar-se a vários fatores de crescimento presentes no SNC e regular sua difusão, estabilidade e atividade (VENSTROM & REICHARDT, 1993; ALVAREZ-SILVA *et al.*, 1993; ALVAREZ-SILVA *et al.*, 1996). Como o bFGF foi o principal fator de crescimento encontrado no meio condicionado de astrócitos tratados com T<sub>3</sub> e com efeito predominante sobre a proliferação celular (TRENTIN *et al.*, 2001), resolvemos investigar os efeitos diretos do bFGF sobre a organização de laminina e fibronectina dos astrócitos cerebelares. Verificamos que o bFGF promoveu alterações na organização tanto de laminina como de fibronectina, mas não exatamente idênticas às causadas pelo T<sub>3</sub> (Figuras 11, 12, 13 e 14). Tais diferenças podem ser devidas à presença de outros fatores de crescimento presentes no meio condicionado dos astrócitos tratados com T<sub>3</sub> (TRENTIN *et al.*, 2001). Adicionalmente, enquanto o tratamento com T<sub>3</sub> foi administrado por cinco dias, o tratamento com bFGF foi realizado por apenas 6 ou 12 horas. As concentrações e os tempos de tratamento do bFGF foram realizados de acordo com DHANDAPANI e colaboradores (2002), que demonstraram um efeito expressivo do bFGF nas concentrações de 2, 5 e 10 ng/ml em aumentar os níveis de TGFβ1 secretados por células de glioma C6 de ratos.

Para comprovar a mediação do bFGF nos efeitos do T<sub>3</sub>, realizamos um ensaio de neutralização do bFGF (Figuras 15 e 16). Verificamos que a adição de anticorpo neutralizante anti-bFGF durante o tratamento com T<sub>3</sub> reverteu a reorganização de fibronectina e laminina. Enquanto os astrócitos tratados com 50 nM de T<sub>3</sub> apresentaram laminina e fibronectina fibrilares, as células tratadas com T<sub>3</sub> na presença de anti-corpo neutralizante anti-bFGF apresentaram-se semelhantes às células controle, ou seja, laminina e fibronectina distribuídas de maneira puntual. Portanto, podemos sugerir que o bFGF tem um importante papel na mediação dos efeitos do T<sub>3</sub>

sobre a organização de moléculas de MEC e conseqüentemente sobre o comportamento dos astrócitos e neurônios cerebelares.

As observações realizadas neste estudo são consistentes com os dados relatados na literatura. Dessa forma, sugerimos um mecanismo de ação do  $T_3$  sobre a atividade astrocitária e por conseqüência, no desenvolvimento neuronal (Figura 19).  $T_3$  pode induzir os astrócitos a secretarem uma combinação de fatores de crescimento, principalmente bFGF, que autocrinamente estimula a proliferação celular.  $T_3$  promove alterações na expressão e organização de matriz extracelular, o que é acompanhado pela adesão e expansão celular. Estes efeitos do hormônio da tireóide,  $T_3$ , sobre os astrócitos podem influenciar o desenvolvimento neuronal por diferentes mecanismos que não são exclusivos: fatores de crescimento solúveis, matriz extracelular e/ou contatos diretos célula-célula.

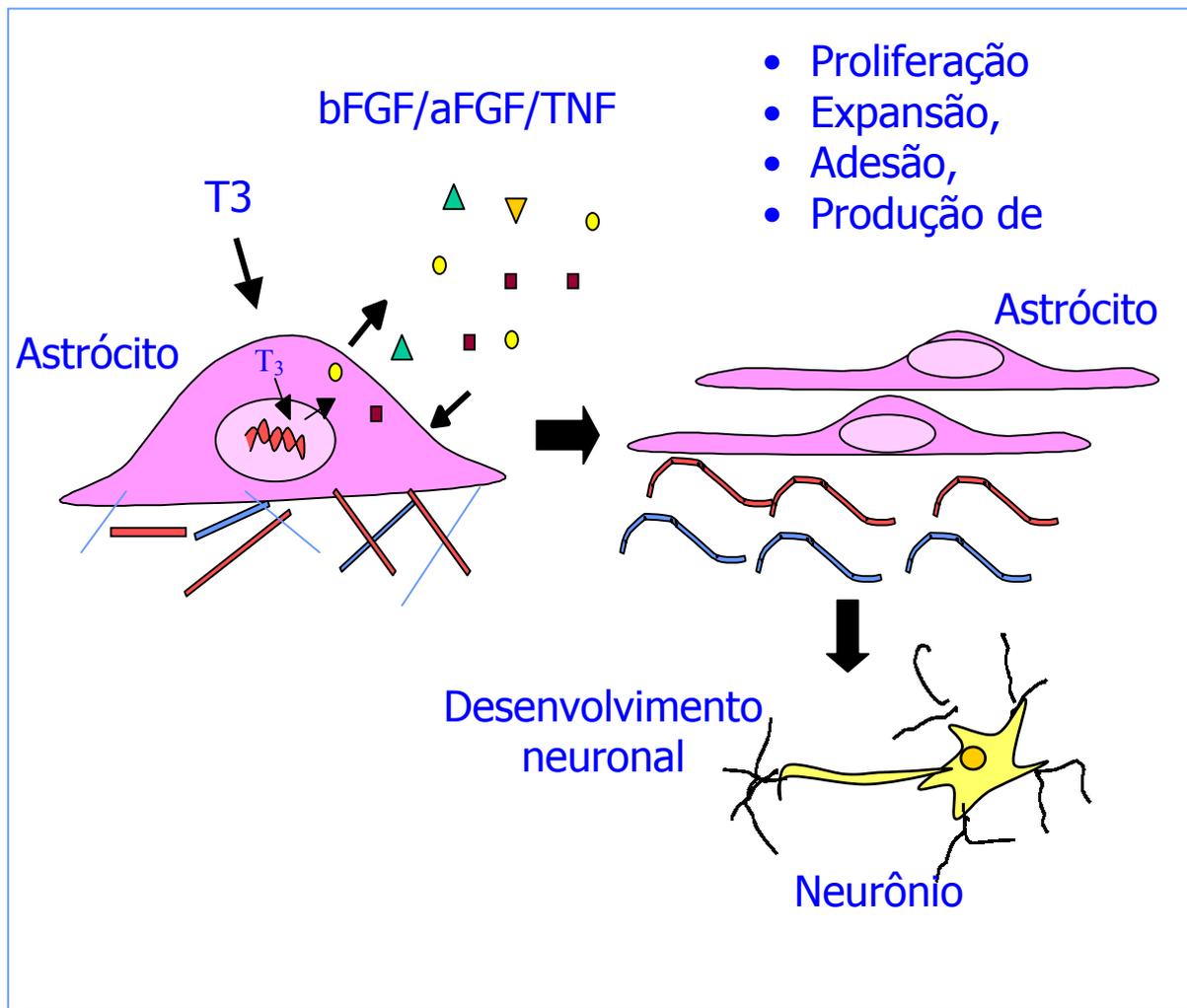


Figura 19 - Modelo do efeito do  $T_3$  no desenvolvimento neuronal mediado pelos astrócitos cerebelares.

## 6 – CONCLUSÕES

O tratamento de astrócitos cerebelares em cultura com o hormônio da tireóide, T<sub>3</sub>, não promove alterações na morfologia destas células.

A organização de laminina foi alterada significativamente com 50 nM de T<sub>3</sub>, demonstrando um padrão fibrilar. Em astrócitos tratados com as concentrações de 10 e 100 nM de T<sub>3</sub>, observou-se pequena alteração na organização de laminina, de puntual, como observada nas culturas controle, para grumosa.

As alterações na organização de fibronectina, de um padrão puntual para fibrilar, foram observadas a partir de 5 nM e tornaram-se mais proeminentes com o aumento da concentração de T<sub>3</sub>.

As alterações na organização de moléculas de MEC foram acompanhadas por um significativo aumento na expressão de laminina (74 %) e de fibronectina (60 %) com o tratamento de 50 nM de T<sub>3</sub>.

O tratamento com bFGF promoveu também alterações na organização de laminina e fibronectina. Porém, essas alterações não foram tão proeminentes como as observados com o tratamento de 50 nM de T<sub>3</sub>.

O bFGF é um mediador dos efeitos do T<sub>3</sub>. A organização fibrilar de laminina e fibronectina observada com o tratamento de 50 nM de T<sub>3</sub> foi revertida para a organização observada nos controles com a adição de anticorpo neutralizante para bFGF.

O tratamento com T<sub>3</sub> promove um menor destacamento dos astrócitos de seu substrato, do que o observado nos controles, após o ensaio de tripsinização. É provável que as alterações nas moléculas de MEC promovidas pelo T<sub>3</sub>, promovam também maior adesão das células ao substrato.

Neurônios cultivados sobre monocamadas astrocitárias tratadas com  $T_3$ , apresentaram-se em maior número e com neuritos maiores do que quando cultivados sobre astrócitos controle. Os efeitos do  $T_3$  sobre a matriz extracelular dos astrócitos, influenciam direta ou indiretamente o desenvolvimento neuronal, através da secreção de fatores e/ou contatos célula/célula e célula/matriz extracelular.

**6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AIRES, M.M (1999). Fisiologia. *Guanabara Koogan*. 2ed. 934p.

AIZENMAN, Y.; DE VELLIS, J. (1987). Synergistic action of thyroid hormone, insulin and hydrocortisone on astrocyte differentiation. *Brain Res.* **414**:301-308.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2002). Molecular biology of the cell. *Garland Science*. 4ed.1463p.

ALVAREZ-SILVA, M., BOROJEVIC, R. (1996). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-3 (IL-3) activities in schistosomal liver granulomas are controlled by stroma-associated heparan sulfate proteoglycans. *J.Leuk.Biol.* **59**:435-441.

ALVAREZ-SILVA, M., SILVA, L.C.F., BOROJEVIC, R. (1993). Cell membrane-associated proteoglycans mediate extramedullar myeloid proliferation in granulomatous inflammatory reactions to schistosome eggs. *J.Cell Sci.* **104**:477-484.

ANDERSON, G.W. (2001). Thyroids hormones and the brain. *Front. Neuroendocrinol.* **22**:1-17.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. (2002). Neurociências – desvendando o sistema nervoso. *Artes Médicas*. 2ed. 855p.

BERRY, M.J.; KIEFFER, J.D.; HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R. (1991). Selenocysteine confers the biochemical properties characteristic of the type I iodothyronine deiodinase. *J.Biol.Chem.* **266**:14155-14158.

- BIANCO A.C.; SALVATORE, D.; GEREKEN, B.; BERRY, M.J.; LARSEN, P.R. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr.Rev.* **23**:38-89.
- BIKFALVI, A.; KLEIN, S.; PINTUCCI, G.; RIFKIN, D.B. (1997). Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endoc.Rev.* **18**:1:26-45.
- BOVOLENTA, P.; LIEM, R.K.; MASON, C.A. (1984). Development of cerebellar astroglia: transitions in form and cytoskeletal content. *Dev.Biol.* **102**:248-59.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.
- CALLONI, G.W., ALVAREZ-SILVA, M., VITURI, C., TRENTIN, A.G. (2001). Thyroid hormone deficiency alters extracellular matrix protein expression in rat brain. *Dev. Brain. Res.* **126**:121-124.
- CARMIGNOTO, G. (2000). Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. *Prog.Neurobiol.* **62**:561-581.
- CHAN, S.; KACHILELE, S.; MCCABE, C.J.; TANNAHILL, L.A.; BOELAERT, K.; GITTOES, N.; VISSER, T.J.; FRANKLYN, J.A.; KILBY, M.D. Early expression of thyroid hormone deiodinases and receptors in human fetal cerebral cortex. *Develop. Brain Res.* **138**:109-116.
- CHOU, Y.H.; HELFAND, B.T.; GOLDMAN, R.D. (2001). New horizons in cytoskeletal dynamics: transport of intermediate filaments along microtubule tracks. *Curr.Opin.Cell Biol.* **13**:106-109.

- CLARKE, E.J.; ALLAN, V. (2002). Intermediate filaments: vimentin moves in. *Curr.Biol.* **12**:596-598.
- CLOS, J.; LEGRAND, J. (1973). Effects of thyroid deficiency on the different cell populations of the cerebellum in the young rat. *Brain Res.* **63**:450-455.
- CLOS, J.; LEGRAND, C.; LEGRAND, J. (1980). Effects of thyroid state on the formation and early morphological development of Bergmann glia in the developing rat cerebellum. *Dev.Neurosci.* **3**:199-208.
- CROTEAU, W.; DAVEY, J.C.; GALTON, V.A.; ST. GERMAIN, D.L. (1996). Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase: a selenoprotein differentially expressed and regulated in human and a rat brain and other human tissues. *J.Clin.Invest.* **98**:405-417.
- DANBOLT, C.N. (2001). Glutamate uptake. *Prog.Neurobiol.* **65(1)**:1 – 105.
- DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. (1990). Molecular Cell Biology. *Scientific American Books*. New York, U.S.A.. 2ed. 1105p.
- DARRAS, V.M.; HUME, R.; VISSER,T.J. (1999). Regulation of thyroid hormone metabolism during fetal development. *Molec.Cell.Endocrinol.* **151**:37-47.
- DHANDAPANI, K.M.; WADE, M.F.; MAHESH, V.B.; BRANN, D.W. (2002). Basic fibroblast growth factor induces TGF-beta release in an isoform and glioma-specific manner. *Neuroreport.* **11,13(2)**:239-241.
- DOW, K.E.; WANG, W. (1998) Cell biology of astrocyte proteoglycans. *Cell.Mol.Life Sci.* **54**:567-581.
- DUSSAULT, J.H.; RUEL, J. (1987). Thyroid hormones and brain development. *Annu.Rev.Physiol.* **49**:321-334.

- EAYRS, J.T.; LEVINE, S. (1963). Influence of thyroidectomy and subsequent replacement therapy upon conditioned avoidance learning in the rat. *J.Endocrinol.* **25**:505-513.
- ENG, L.F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J.Neuroimmunol.* **8**:203-214.
- FARWELL, A.P.; TRANTER, M.P.; LEONARD, J.L. (1995). Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. *Endocrinol.* **136**:3909-3915.
- FARWELL, A.P.; DUBORD-TOMASETTI, S. (1999). Thyroid hormone regulates the extracellular organization of laminin on astrocytes. *Endocrinol.* **140**:5014-5021.
- FARWELL, A.P., DUBORD-TOMASETTI, S.A. (1999). Thyroid hormone regulates the expression of laminin in the developing rat cerebellum. *Endocrinol.* **140**:4221-4227.
- FORREST, D.; REH, T.A.; RÜSCH, A. (2002). Neurodevelopmental control by thyroid hormone receptors. *Curr. Op.Neurobiol.* **12**:49-56.
- GARCIA-ABREU, J., MOURA NETO, V., CARVALHO, S.L, CAVALCANTE, L.A. (1995). Regionally specific properties of midbrain glia: I. Interactions with midbrain neurons. *J.Neurosci.Res.* **40**:471-477.
- GARCIA S.J.; SEIDLER, F.J.; QIAO, D.; SLOTKIN, T.A. (2002). Chlorpyrifos targets developing glia: effects on glial fibrillary acidic protein. *Develop. Brain Res.* **133**:151-161.
- GARCIA-SEGURA, L.M.; CHOWEN, J.A.; NAFTOLIN, F. (1996). Endocrine glia: roles of glial cells in the brain actions of steroid and thyroid hormones and in the regulation of hormone secretion. *Front.Neuroendocrinol.* **17**:180-211.
- GESSER, V.E.; HATTEN, M.E. (1990). Central nervous system neurons migrate on astroglial fibers from heterotypic brain regions in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **87**:4543-4547.

- GILBERT, S.F. (2000). *Developmental biology. Sinauer Associates, Massachusetts.* 6ed. 750p.
- GOMES, F.C.A.; MAIA, C.G.; MENEZES, J.R.L. DE; MOURA NETO, V. (1999). Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. *Glia* **25**:247-255.
- GÓMEZ-PINILLA, F.; MILLER, S.; CHOI, J., COTMAN, C.W. (1996). Heparan sulfate potentiates the autocrine action of basic fibroblast growth factor in astrocytes: an *in vivo* and *in vitro* study. *Neurosci.* **76(1)**:137-145.
- GREMO, F.; PRESTA, M. (2000). Role of fibroblast growth factor-2 in human brain: a focus on development. *Int.J.Devl.Neurosci.* **18**:271-279.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. (1997). *Tratado de fisiologia médica. Guanabara Koogan.* 9ed. 1014p.
- HARALSON, M.A.; HASSEL, J.R. (1995). *Extracellular Matrix – a practical approach. Oxford University Press, New York, U.S.A..* 404p.
- HASHIMOTO, K.; CURTY, F.H.; BORGES, P.P.; LEE, C.E.; ABEL, E.D; ELMQUIST, J.K.; COHEN, R.N.; WONDISFORD, F.E. (2001). An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **98**:3998-4003.
- HENDRICH, C.E.; JACKSON, W.J.; PORTERFIELD, S.P. (1984). Behavioral testing of progenies of Tx (hypothyroid) and growth hormone – treated Tx rats: an animal model for mental retardation. *Neuroendocrinol.* **38**:429-437.
- HERRMANN, H.; AEBI, U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr.Opin.Cell Biol.* **12(1)**:79-90.

- HSU, J.H.; BRENT, G.A. (1998). Thyroid hormone receptor gene knockouts. *Trends Endocrinol. Metab.* **9**:103-112.
- HYNES, R.O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* **48**:4 549-54.
- KÁLMÁN, M.; AJTAI, B.M. (2001). A comparison of intermediate filament markers for presumptive astroglia in the developing rat neocortex: immunostaining against nestin reveals more detail, than GFAP or vimentin. *Int.J.Devl.Neurosci.* **19**:101-108.
- KANDELL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. (1991). Principles of neural science. *Prentice Hall International*. U.S.A.. 3ed. 1137p.
- KLAGSBRUN, M.; BAIRD, A. (1991). A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell.* **67**:2 229-31.
- KOIBUCHI, N.; CHIN, W.W. (2000). Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol.Metab.* **11**,4:123-128.
- KÖNIG, S.; MOURA NETO, V. (2002). Thyroid hormone actions on neural cells. *Cell.Molec. Neurobiol.* **22**:56:501-528.
- KUCHENBAUER, F.; HOPFNER, U.; STALLA, J.; ARZT, E.; STALLA, G.K.; PÁEZ-PEREDA, M. (2001). Extracellular matrix components regulate ACTH production and proliferation in corticotroph tumor cells. *Molec.Cell.Endocrinol.* **175**:1-2:141 – 148
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t 4. *Nature* **227**:680-685.
- LAMING, P.R.; KIMELBERG, H.; ROBINSON, S.; SALM, A.; HAWRYLAK, N.; MÜLLER, C.; ROOTS, B.; NG, K. (2000). Neuronal–glial interactions and behaviour. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **24**:3:295-340

- LEGRAND, J. (1982). Hormones thyroïdiennes et maturation du système nerveux. *J.Physiol.* **78**:603-652.
- LETOURNEAU, P.C., CONDIC, M.L, SNOW, D.M. (1994). Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. *J. Neurosci.* **14**:915-928.
- LIESI, P. (1990). Extracellular matrix and neuronal movement. *Experientia.* **46**:9 900-7
- LIMA, F.R.S.; TRENTIN, A.G.; ROSENTHAL, D.; CHAGAS, C. (1997). Thyroid hormone induces protein secretion and morphological changes in astroglial cells with an increase in expression of glial fibrillary acidic protein. *J.Endocrinol.* **154**:167-175.
- LIMA, F.R.; GONÇALVES, N.; GOMES, F.C.; DE FREITAS, M.S.; MOURA NETO, V. (1998). Thyroid hormone action on astroglial cells from distinct brains regions during development. *Int.J.Dev.Neurosci.* **16**:19-27.
- LIPTON, S.A., & ROSENBERG, P.A. (1994). Mechanisms of disease. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *The New Eng. J. Med.* **330**: 613-622.
- MANDEL, S.J.; BERRY, M.J.; KIEFFER, J.D.; HARNEY, J.W.; WARNE, R.L.; LARSEN, P.R. (1992). Cloning and in vitro expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **75**:1133-1139.
- MASON, I. (1994). Do adhesion molecules signal via FGF receptors? *Curr.Biol.* **4**:1158-1161.
- MOL, J.A.; VISSER, T.J. (1985). Synthesis and some properties of sulfate ester and sulfamates of iodothyronines. *Endocrinol.* **117**:1-7.
- MORITA, N.; NAKAHIRA, K.; BABA, H.; AKITA, H.; KUMADA, T.; OGAWA, M.; NAKAJIMA, K.; KAWATA, M.; MIKOSHIBA, K.; IKENAKA, K. (1997). Astrocytic lineage analysis by detection of GFAP promoter activity in vitro. *Develop. Neurosci.* **19**:210-218.

- MOURA NETO, V.; TRENTIN, A.G.; LIMA, F.R.; GOMES, F.C.; DA SILVA, N.G.; CHAMAS, L.; LINS, C.; GARCIA-ABREU, J.; ROSENTHAL, D.; CHAGAS, C. (1996). Effects of the thyroid hormone (T<sub>3</sub>) on astrocytes. *Rev.Bras.Biol.* **56**:123-134.
- OAKLEY, B.R. (2000): An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.* **10**:537-542.
- PERZEL'OVA, A.; MARES, V. (1993). Appearance of GFAP-positive cells in adult human brain cultures spontaneously decelerated in growth. *Glia.* **7**:237-244.
- PESHEVA, P.; PROBSTMEIER, R. (2000). The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog.Neurobiol.* **61**:465-493.
- PORTERFIELD, S.P.; HENDRICH, C.E. (1993). The role of thyroid hormone in prenatal and neonatal neurological development-current perspectives. *Endocr.Rev.* **14**:94-106.
- PUYMIRAT, J. (1992). Thyroid receptors in the rat brain. *Prog.Neurobiol.* **39**:281-294.
- RAHAMAN, S.O.; GHOSH, S.; MOHANAKUMAR, K.P.; DAS, S.; SARKAR, P.K. (2001). Hypothyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments. *Neurosci.Res.* **40**:273-279.
- REICHARDT, L.F.; TOMASELLI, K.J. (1991). Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu.Rev.Neurosci.* **14**:531-570.
- ROGHANI, M.; MANSUKHANI, A.; DELL'ERA, P.; BELLOSTA, P.; BASILICO, C.; RIFKIN, D.B.; MOSCATELLI, D. (1994). Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding. *J.Biol.Chem.* **269**:3976-3984.
- SAKSELA, O.; RIFKIN, D.B. (1990). Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol.* **110**:3 767-75.

- SECHLER, J.L.; SCHWARZBAUER, J.E. (1998). Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture. *J.Biol.Chem.* **273(40)**:25533-25536.
- SCHLESSINGER, J.; LAX, I.; LEMMON, M. (1995). Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell.* **83**:357-360.
- SCHWARZBAUER, J.E.; SECHLER, J.L. (1999). Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr.Op.Cell Biol.* **11**:622-627.
- SHI, Y.B.; RITCHIE, J.W.A.; TAYLOR, P.M. (2002). Complex regulation of thyroid hormone action: multiple opportunities for pharmacological intervention. *Pharm.Therap.* **94**:235-251.
- STREULI, C. (1999). Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Current Curr.Op.Cell Biol.* **11**:634-640.
- TOWBIN, H.; STAEBELI, T.; GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **455**:68-78.
- TRENTIN, A.G. (1997). Diferenciação e proliferação astrocitária: o hormônio da tireóide induz a síntese e secreção de fatores de crescimento. *Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.* 60pp.
- TRENTIN, A.G.; ROSENTHAL, D.; MOURA NETO, V. (1995). Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: factor secretion, cell differentiation and proliferation. *J.Neurosci.Res.* **41**:409-417.
- TRENTIN, A.G.; MOURA NETO, V. (1995). T<sub>3</sub> affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization. *NeuroReport.* **6**:293-296.

- TRENTIN, A.G.; ALVAREZ-SILVA, M.; MOURA NETO, V. (2001). Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors. *Am.J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**:1088-1094.
- TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J.Neurosci.* **16(3)**:877-885.
- UTIGER, R.D. (1987). The thyroid: physiology, hyperthyroidism, hypothyroidism, and the painful thyroid. *Endocrinology and Metabolism*. 2<sup>nd</sup>. 1. New York. pp. 389-507.
- VENSTROM, K.A.; REICHARDT, L.F. (1993). Extracellular matrix 2: role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J.* **7**:996-1003.
- VERNADAKIS, A. (1996). Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog. Neurobiol.* **49**:185-214.
- WALKER, A., GALLAGHER, J.T. (1996). Structural domains of heparan sulfate for specific recognition of the c-terminal heparin-binding domain of human plasma fibronectin (HEPII). *Biochem. J.* **317**:871-877.
- WAXMAN, S.G.; BLACK, J.A. (1984). Freeze-fracture ultrastructure of the perinodal astrocyte and associated glial junctions. *Brain Res.* **308:1** 77-87 .
- WU, Y.; KOENING, R.J. (2000). Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol.Metab.* **11,6**:207-211.
- YONEDA, J.; SAIKI, I.; IGARASHI, Y.; KOBAYASHI, H.; FUGII, H.; ISHIZAKI, Y.; KIMIZUKA, F.; KATO, I.; AZUMA, I. (1995). Role of the heparin-binding domain of chimeric peptides derived from fibronectin in cell spreading and motility. *Exp.Cell.Res.* **217**:169-179.

ZAGRIS, N. (2001). Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron*. **32**:427-438.

ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. (1999). *Fundamental Neuroscience*. *Academic Press*. San Diego, California, USA. 1600p.