

Luíza da Silva Miranda

INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA APOLIPOPROTEÍNA-E NO
CRESCIMENTO NEURÍTICO EM CULTURAS PRIMÁRIAS DO GÂNGLIO
CERVICAL SUPERIOR DE CAMUNDONGOS

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral
Belo Horizonte - MG
2013

Luíza da Silva Miranda

INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA APOLIPOPROTEÍNA-E NO
CRESCIMENTO NEURÍTICO EM CULTURAS PRIMÁRIAS DO GÂNGLIO
CERVICAL SUPERIOR DE CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia, área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientador: Rosa Maria Esteves Arantes

Co-orientador: Camila Megale de Almeida Leite

Belo Horizonte
2013

Miranda, Luiza da Silva.
M672i Investigação do papel da apolipoproteína-E no crescimento neurítico em culturas primárias do gânglio cervical superior de camundongos [manuscrito]. / Luiza da Silva Miranda. -- Belo Horizonte: 2013. 70f.: il.
Orientadora: Rosa Maria Esteves Arantes.
Co-Orientadora: Camila Megale de Almeida Leite.
Área de concentração: Patologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Neurónios. 2. Apolipoproteína E/metabolismo. 3. Fatores de Crescimento Neural. 4. Cultura Primária de Células. 5. In Vitro. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Arantes, Rosa Maria Esteves. II. Leite, Camila Megale de Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WL 140

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho é resultado do esforço de muitas pessoas, sou muito grata por tê-las em minha trajetória até aqui. Juntos construímos coisas maravilhosas, e com certeza elas seguirão sempre comigo.

Agradeço minha orientadora Prof^ª. Rosa, que abriu as portas do laboratório criando novos horizontes para mim. Obrigada por acreditar no meu potencial, pela orientação nesses 4 anos e por todos os ensinamentos, não apenas os científicos mas também os da vida. Graças a você termino o mestrado com a certeza de que sou uma cientista comprometida com meu trabalho, com a honestidade e a ética.

A minha co-orientadora Prof^ª.Camila por sempre se mostrar disponível para me ajudar e a me socorrer nos momentos de incerteza. Obrigada também por acreditar no meu trabalho, pela compreensão e paciência. Você me ensinou muito pelo seu exemplo de profissional competente, comprometida e sensata.

Agradeço a vida por ter me presenteado com as mulheres incríveis que conheci: Bel, Bruna, Camila Faraco, Camila França, Chris, Joana, Luciana e Maria, cada uma especial à sua maneira, diferenças que se completam. Com vocês aprendi muito mais do que ciência, aprendi a sinceridade de um olhar, o conforto de uma palavra amiga, a dar e receber carinho desprezioso, a valorizar o companheirismo e a sorrir (muito!) todos os dias. Obrigada por fazerem do nosso laboratório um ambiente de muito amor.

Aos professores e colegas da Pós-graduação em Patologia Geral que contribuíram imensamente para o meu crescimento profissional. Especialmente aos colegas do LPL que sempre mostraram boa vontade em ajudar e em compartilhar conhecimento.

A técnica do biotério, Gi, que cuidou dos meus animais com muito amor e zelo.

Ao colega Marcelo, pela imensa paciência em me ajudar a desvendar os mistérios da genotipagem dos animais apoE -/- e também por partilhar os desafios dessa empreitada.

A “NHACA” por ter me recebido como amiga e pelos vários momentos de descontração e humor non sense que ajudaram a aliviar a pressão.

Aos meus queridos pais e querida irmã, que juntos moldaram a pessoa que sou. Me ensinaram a ter coragem para buscar meus sonhos, a ter fé em momentos difíceis, a zelar pelo meu caráter, a ser honesta com meus sentimentos, a perdoar e a enxergar as pessoas além do que os olhos vêem. Tudo isso foi muito importante para que eu seguisse em frente e alcançasse meus objetivos. Obrigada por me amarem como sou, me apoiarem e sentirem orgulho de mim. Sei que o amor de vocês estará sempre comigo aonde quer que eu esteja. Amo muito vocês!

A Guiomar, Dalmir e Larissa, que me acolheram como parte da família e me trataram com muito amor e carinho. Sou muito grata a vocês por terem me acolhido e também me ensinado muito. Essa caminhada foi mais fácil porque pude contar com vocês. Espero retribuir tudo que vocês fizeram por mim

Aos meus avós, tias, tios, primas e primos, que sempre foram muito amorosos comigo, acreditaram em mim e por sempre demonstrarem muito orgulho. Sou muito agradecida pela família que tenho.

Ao meu amado Dalmir Filho, meu leal companheiro, obrigada por me compreender, me aconselhar e por cuidar tão bem de mim. Devo a conclusão desse trabalho a você, que me ajudou a manter o equilíbrio e que no final acabou se tornando meu co-orientador, agradeço também todos os sacrifícios que você fez por mim, tenho muita sorte de caminhar ao seu lado. Você me faz muito feliz, te amo muito!

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental (NIPE) do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Prof^a. Rosa Maria Esteves Arantes, com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

*“De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos apenas começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar.
Fazemos da interrupção um novo caminho...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro.”*

Fernando Sabino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais	25
3.2 Genotipagem das matrizes apoE -/-	25
3.2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	25
3.2.2 Dosagem de colesterol	26
3.3 Cultura primária de neurônios.....	27
3.3.1 Obtenção e dissecação dos gânglios	27
3.3.2 Dissociação enzimática das células ganglionares	27
3.3.4 Dissociação mecânica das células ganglionares.....	28
3.3.5 Plaqueamento das células.....	28
3.4 Imunofluorescência	29
3.5 Análise quantitativa dos corpos neuronais e extensão neurítica em culturas apoE -/- e WT	31
3.6 Análise Estatística	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Caracterização dos animais apoE-/-	33
4.1.1 Genotipagem e Dosagem do Colesterol total dos animais apoE -/-	33
4.2 Análise qualitativa das culturas primárias.....	35
4.2.1 Culturas de animais WT	35
4.2.2 Culturas de animais ApoE -/-	35
4.3 Análise morfométrica quantitativa	39
4.3.1 Sobrevida neuronal <i>in vitro</i>	39
4.3.2 Diâmetro dos corpos neuronais	40
4.3.3 Número de neuritos primários.....	41

4.3.4 Extensão neurítica	42
4.4 Análise imunohistoquímica.....	43
4.4.1 PGP 9.5 e β -tubulina	43
4.4.2 GAP-43 e LAMP-1	45
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	56
7 ABSTRACT	57
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9 ANEXOS	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados na técnica de PCR.....	26
Tabela 2: Caracterização dos anticorpos primários e secundários.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eventos do transporte de membrana nos processos de reparo e crescimento axonal.....	18
Figura 2: Gel de agarose 1,5% representativo do resultado da genotipagem dos animais ApoE -/- ..	33
Figura 3: Colesterol total de animais WT e apoE -/-.....	34
Figura 4: Aspectos de culturas neuronais do GCS de animais WT e apoE -/- às 3, 6, 12 e 24 horas após plaqueamento.....	38
Figura 5: Número de corpos celulares neuronais por área.....	39
Figura 6: Diâmetro dos corpos celulares neuronais às 3 horas.....	40
Figura 7: Número de neuritos primários por neurônio.....	41
Figura 8: Extensão neurítica às 6, 12 e 24 horas pós plaqueamento.....	42
Figura 9: Expressão de β -tubulina e PGP 9.5.....	44
Figura 10: Expressão de GAP-43 e LAMP-1.....	47

ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
Apo	Apolipoproteína
ApoE	Apolipoproteína E
ApoE -/-	Apolipoproteína E Nocaute
BDNF	Fator Neurotrófico derivado do Cérebro
BSA	Soro Albumina Bovina
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CO₂	Gás Carbônico
DA	Doença de Alzheimer
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EUA	Estados Unidos da América
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
GAP-43	Proteína 43 Associada ao Crescimento Neuronal
GCS	Gânglio Cervical Superior
H/H	Solução de Hanks Tamponada com Solução Hepes
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgG	Imunoglobulina G
LAMP-1	<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein 1</i>
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
mAbs	Anticorpo Monoclonal

NGS	Soro Normal de Cabra
NGF	Fator de crescimento Neuronal
NIPE	Neuro Imuno Patologia Experimental
NMS	Soro Normal de Camundongo
PBS	Solução Tampão Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGP 9.5	Produto Protéico do Gene 9.5
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	Ácido Ribonucléico Mensageiro
SFB	Soro Fetal Bovino
SIF	Células Pequenas Intensamente Fluorescentes
SN	Sistema Nervoso
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNARE	<i>Soluble NSF-Attachment protein Receptor proteins</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TrkA	Receptor tirosina quinase
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VAMP	<i>Vesicle-Associated Membrane Protein</i>
VLDL	Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa
WT	<i>Wild Type</i>

RESUMO

Apolipoproteína E (apoE) é uma proteína plasmática envolvida no transporte de moléculas hidrofóbicas. No sistema nervoso, a apoE está envolvida na distribuição de lipídeos e colesterol e pode atuar na manutenção de membranas neuronais, processo essencial para o reparo e remodelamento neuronal durante o desenvolvimento e regeneração pós-traumática. O principal objetivo deste estudo foi avaliar o envolvimento da apoE na viabilidade, manutenção de membranas neuronais e crescimento neurítico *in vitro*. Culturas neuronais primárias foram obtidas do gânglio cervical superior (GCS) de camundongos neonatos C57BL/6 *wild-type* (WT) e apoE^{-/-}. As culturas primárias WT e apoE^{-/-} foram avaliadas comparativamente quanto aos aspectos morfológicos através da quantificação do número total de neurônios, neuritos primários, diâmetro dos corpos celulares e extensão neurítica. As culturas apoE^{-/-} apresentaram maior número de corpos celulares e maiores extensões neuríticas 12 horas após plaqueamento em relação às culturas WT ($p < 0,05$). As mesmas apresentaram também maior diâmetro de corpos celulares e maior número de neuritos primários 3 horas após plaqueamento ($p < 0,05$). Além disso, ambas as culturas apresentaram imunopositividade para β -tubulina, PGP 9.5, GAP-43 e LAMP-1. No entanto os neurônios apoE^{-/-} apresentaram maior expressão de GAP-43 12 horas após plaqueamento e de LAMP-1 06 horas após plaqueamento ($p < 0,05$). Nossos dados demonstraram que neurônios WT e apoE^{-/-} apresentaram diferenças *in vitro* em relação à morfologia, ao crescimento neurítico e à expressão de moléculas associadas à funcionalidade neuronal, sugerindo, possíveis diferenças nos mecanismos de regeneração pós deafferenciação, o que pode ser relevante para o estudo de doenças neurodegenerativas.

Palavras chave: neurônio, crescimento neurítico, apoE, *in vitro*, cultura primária.

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso (SN) é objeto de investigação do homem desde a antiguidade. Acredita-se que a primeira referência ao cérebro em registros humanos ocorreu no século XVII a.C. Isso nos leva a crer que o estudo do SN desperta o interesse do homem desde tempos remotos (Kandel, Schwartz et al. 2000). Com a invenção do microscópio, foi revelada a estrutura do SN e de suas células. No século XIX, as primeiras descrições detalhadas foram realizadas por Camillo Golgi e Santiago Ramón y Cajal. Essas descrições elucidaram características importantes das células nervosas, tais como: presença de corpos celulares e dois tipos de prolongamentos principais, um deles mais ramificado, os dendritos, e outro semelhante a um feixe, os axônios. Adicionalmente, a organização dessas células em complexas redes neurais foi descoberta e estabeleceu-se que os neurônios são componentes fundamentais para a sinalização do SN (Kandel, Schwartz et al. 2000). Em 1920, Ross Harisson demonstrou que os prolongamentos presentes nas células nervosas são capazes de crescer a partir do corpo celular, mesmo *in vitro*, onde cada neurônio é isolado. Harrison também confirmou a hipótese de Ramón y Cajal que sugere que o axônio é originado de uma expansão chamada cone de crescimento. Esse permite o desenvolvimento do axônio em direção ao seu alvo, que pode ser outras células nervosas ou músculos (Kandel, Schwartz et al. 2000).

Atualmente, nosso conhecimento a respeito do SN baseia-se em estudos nas áreas de anatomia, fisiologia, embriologia, farmacologia e psicologia (Lent 2008). Mesmo assim, até hoje os mecanismos de regulação do crescimento neurítico e sua relação com as principais doenças degenerativas neuronais vem sendo investigados.

O SN é integrativo, pois exerce suas funções a partir da cooperação de seus elementos. Isso atribui maior complexidade funcional a seus componentes, que compreendem neurônios e células da glia. Os neurônios são especializados em receber estímulos e enviá-los para órgãos efetores e se comunicam extensamente formando uma complexa rede. As células da glia, por sua vez, representam a grande maioria da população celular do SN, possuindo funções tróficas, protetivas e isolantes e tem sido estudadas em nosso laboratório (Arantes, Lourenssen et al. 2000; Arantes and Andrews 2006; Almeida-Leite, Galvao et al. 2007; Souza 2007; Maysinger, Holmes et al. 2008).

O primeiro nível de subdivisão anatômica do SN o classifica em duas partes principais: sistema nervoso central (SNC), composto pelo encéfalo e medula espinhal, e sistema nervoso periférico (SNP) que compreende os nervos cranianos e espinhais e os gânglios associados a eles (Lent 2008).

No SNP, os nervos cranianos e espinhais, formados pelo conjunto de feixes de fibras nervosas ou axônios, conduzem informações da periferia para o SNC (via aferente) e do SNC para a periferia (via eferente). Para isso, faz-se necessário que os nervos estejam distribuídos por todo o corpo. A proteção dos nervos é feita através de bainhas fibrosas que os revestem, mas, ainda assim, são frequentemente danificados por trauma (Snell 1997). Além dos nervos, o SNP é composto por gânglios, agrupamentos de neurônios e células da glia, distribuídos entre órgãos ou na parede desses (Lent 2008).

O SNP é composto por uma parte somática, responsável pela execução de movimentos voluntários dos músculos esqueléticos e pelas sensações provenientes de estímulos internos e externos, e por uma parte autonômica, denominada sistema nervoso autônomo (SNA) (Koike and Tanaka 1991). O SNA é responsável pela inervação de estruturas que possuem movimentos involuntários, como glândulas salivares e lacrimais, coração, vasos sanguíneos e músculos lisos. De acordo com as funções que exerce, o SNA é subdividido em simpático e parassimpático, possuindo grande autonomia em relação ao sistema nervoso central (SNC), enquanto o SNP somático está sob controle direto do SNC (Purves, Augustine et al. 2001).

Os neurônios dos gânglios simpáticos, objeto de estudo deste trabalho, são multipolares, com grande variação na morfologia de seus prolongamentos. A maioria deles são noradrenérgicos e apresentam positividade para reação imunocitoquímica à tirosina hidroxilase, uma enzima essencial na síntese das catecolaminas (Lindh, Lundberg et al. 1989; Masliukov and Timmermans 2004). As propriedades neuroquímicas e funcionais dos neurônios dos gânglios simpáticos diferem de acordo com sua localização na cadeia periférica (Lindh, Lundberg et al. 1989; Morris, Gibbins et al. 1989; Gibbins 1992). Os neurônios simpáticos apresentam diversas vias de sinalização que são importantes na regulação da síntese de neurotransmissores, expressão gênica, excitabilidade neuronal e resposta a fatores de crescimento (Roivainen and Koistinaho 1996).

O gânglio cervical superior (GCS), que utilizamos para obtenção das células de nosso interesse, possui organização relativamente simples (Roivainen and Koistinaho 1996), apresentando também, arquitetura tecidual definida. Seus componentes incluem neurônios, interneurônios, também classificados como células pequenas intensamente fluorescentes (SIF) e células da glia satélites que envolvem os neurônios e suas ramificações (Chiba and Williams 1975; Hedger and Webber 1976; Madariaga-Domich and Taxi 1986). A morfologia do GCS é alterada frente a estímulos fisiológicos, ao dano e envelhecimento (Andrews, Thrasivoulou et al. 1996). Além disso, esse gânglio mantém transmissão sináptica e alta taxa metabólica durante incubações *in vitro* (Roivainen and Koistinaho 1996). Sendo assim os neurônios isolados destes gânglios se aplicam a estudos *in vitro* que visam compreender aspectos de sua estrutura e função (Arantes, Lourenssen et al. 2000; Arantes and Andrews 2006).

Estudos *in vitro* representam uma alternativa para estudar aspectos específicos de problemas *in vivo*, que são muito complexos em razão da grande quantidade de variáveis envolvidas. Essa ferramenta científica tem sido utilizada desde o início do século passado e a primeira cultura descrita foi feita a partir de células do tecido nervoso (Tolkovsky, Walker et al. 1990; Hamburger 1993). Desde então, os modelos *in vitro* tem sido utilizados em áreas de pesquisa básica e aplicada, dentre elas a neurobiologia, que utiliza essa ferramenta para estudar a dinâmica do desenvolvimento (Laerum, Steinsvag et al. 1985), a plasticidade de neurotransmissores (Jonakait 1993), a ação de agentes neurotóxicos e drogas (Aschner and Syversen 2004; Lonchamp, Dupont et al. 2006), interações neurônio-específicas (Lonchamp, Dupont et al. 2006) e aspectos do crescimento neurítico (Nathan, Jiang et al. 2002; Arantes and Andrews 2006; Almeida-Leite, Galvao et al. 2007; Kosacka, Gericke et al. 2009).

Os neurônios simpáticos do GCS *in vitro*, na presença de NGF e matrigel, conservam suas principais características morfológicas, preservam sinapses funcionais e outras propriedades eletrofisiológicas (Ko and Burton 1976; Wakshull and Johnson 1979), bem como mostram imunorreatividade para marcadores genéricos de neurônios como o produto protéico do gene 9.5 (PGP9.5) (Arantes, Lourenssen et al. 2000), entre outros, permitindo a visualização dos corpos neuronais e neuritos, facilitando a interpretação de lesões e a sua quantificação.

Esse modelo também permite a investigação da extensão, ramificação e interconexão de neuritos, fenômenos que fazem parte do processo de crescimento neurítico e que são fundamentais para o desenvolvimento do SN (Prochiantz 1995; Arantes and Andrews 2006). Durante o desenvolvimento do SN, cada neurônio emite um único axônio que cresce guiado por um cone de crescimento, estrutura que orienta os axônios para a direção correta até seus alvos, que podem estar próximos ou distantes. Ao atingir seus alvos, os axônios se arborizam e estabelecem sinapses (Lent 2008).

O crescimento neurítico baseia-se em mecanismos de exocitose e, portanto requer transporte de vesículas até as terminações do axônio, seguido pela adição de membrana nas extremidades dos processos de crescimento, assim como o rearranjo do citoesqueleto (Zhou and Snider 2006; Pak, Flynn et al. 2008; Lowery and Van Vactor 2009; Tuck and Cavalli 2010; Winckler and Mellman 2010; Dent, Gupton et al. 2011).

Alguns estudos implicam também a v-SNARE (*Soluble NSF-Attachment protein Receptor proteins present on intracellular vesicles*)/VAMP7 (*Vesicle-Associated Membrane Protein*) nos eventos exocíticos responsáveis pela extensão neurítica (Martinez-Arca, Coco et al. 2001). VAMP7 foi originalmente identificada como uma SNARE relacionada à sinaptobrevina (D'Esposito, Ciccodicola et al. 1996), resistente a clivagem pelas neurotoxinas tetânicas e botulínicas (Galli, Zahraoui et al. 1998). Os compartimentos intracelulares contendo VAMP-7 são reconhecidos como uma fonte de membrana para o crescimento neurítico, uma vez que após o seu silenciamento o crescimento neurítico foi inibido (Alberts, Rudge et al. 2003). Essa proteína e o marcador lisossomal LAMP-1 (*Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*) estão amplamente co-localizados em neurônios do GCS, presentes também nas regiões distais dos cones de crescimento nos processos de desenvolvimento neurítico (Arantes and Andrews 2006).

Estudos de microscopia confocal tem elucidado a sequência de eventos que dão origem ao cone de crescimento após plaqueamento de neurônios *in vitro*, como é o caso dos nossos experimentos. Primeiro, o rompimento do axônio, causado por lesão, leva à uma despolarização instantânea e reestruturação de microtúbulos (Erez, Malkinson et al. 2007). Essa reorganização de microtúbulos continua até que o centro do cone de crescimento seja circundado por uma rede de microtúbulos nas terminações do axônio

lesado. Paralelamente a esse processo, ocorre um acúmulo de vesículas que são transportadas de forma anterógrada a partir do centro do cone de crescimento (Erez, Malkinson et al. 2007). A membrana de tais vesículas tem origem no complexo de Golgi (Erez, Malkinson et al. 2007; Prager-Khoutorsky and Spira 2009). Essas vesículas são exocíticas e se fundem com a membrana plasmática no centro do cone de crescimento, auxiliando na formação e extensão do cone de crescimento (Erez, Malkinson et al. 2007; Prager-Khoutorsky and Spira 2009).

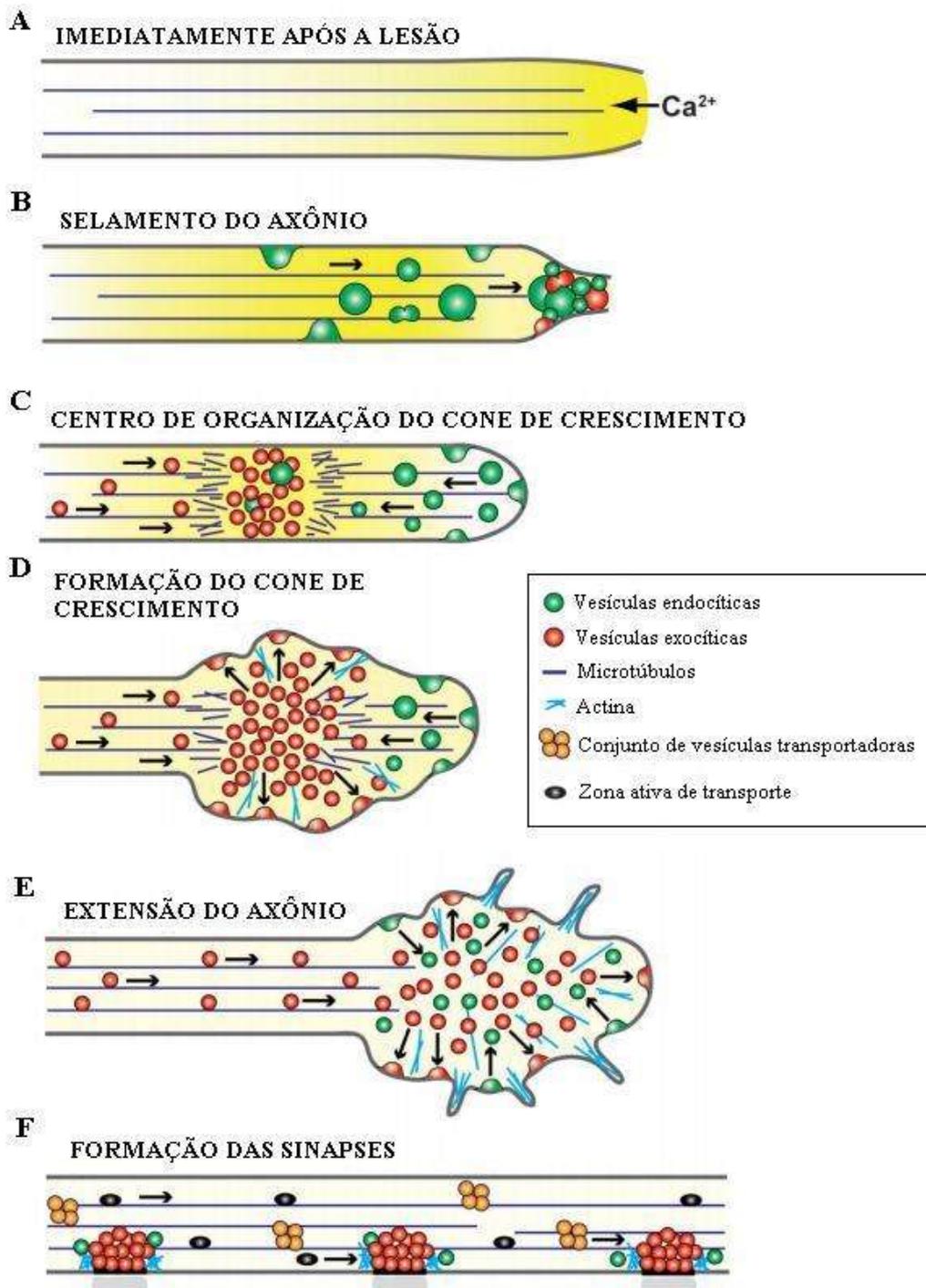


Figura 1: Eventos do transporte de membrana nos processos de reparo e crescimento axonal. **A.** Imediatamente após a lesão, o cálcio entra pela terminação do axônio que foi lesionada e desencadeia diversos processos que resultam no reparo da membrana e formação do cone de crescimento. **B.** Primeiro, o sinal de cálcio inicia o processo de selamento do axônio, que consiste em uma barreira de membrana, esse fenômeno ocorre, em parte, pela atuação de vesículas endocíticas, seguida por eventos de exocitose. **C.** Em seguida, os microtúbulos se reorientam no centro do cone de crescimento e formam uma rede, que permite o acúmulo de vesículas originadas do complexo de Golgi. **D.** Vesículas derivadas do complexo de Golgi se fundem com a membrana plasmática para formar o lamelopódio que se origina no cone de crescimento. Ao mesmo tempo, a endocitose e a reorganização de actina auxiliam no remodelamento da terminação axonal. **E.** A extensão do axônio ocorre através da adição de membrana no cone de crescimento. **F.** Ao mesmo tempo em que o axônio cresce, ele forma conexões sinápticas com alvos pós-sinápticos, esse mecanismo envolve o transporte de conjuntos de vesículas pela zona ativa de transporte.

Assim como a exocitose, a endocitose também é um evento importante para o remodelamento da membrana axonal durante a organização da formação do cone de crescimento. Em função disso, simultaneamente ao processo de exocitose, há uma aceleração da recuperação da membrana originada na superfície celular feita por endocitose (Ashery, Penner et al. 1996). As vesículas são formadas e em seguida são transportadas de forma retrógrada das pontas dos axônios para o centro do cone de crescimento (Erez, Malkinson et al. 2007). Apesar da exocitose e endocitose ocorrerem ao mesmo tempo, a endocitose é dominante, resultando numa perda da área de superfície e retração parcial do axônio, mesmo quando o lamelopódio do cone de crescimento se forma e inicia sua extensão (Ashery, Penner et al. 1996).

Após a organização do cone de crescimento, o axônio passa por um conjunto de eventos complexos que remodelam a membrana levando ao surgimento de um lamelopódio rico em actina e um cone de crescimento nascente. No nível molecular, a formação do cone de crescimento necessita da elevação do íon Ca_2^+ intracelular, subsequente ativação de proteases, quebra de espectrina e fusão de vesículas exocíticas derivadas do complexo de Golgi (Bloom and Morgan 2011). No processo de complexificação neurítica e sua extensão, estudos do nosso grupo implicaram as vesículas lisossomais tardias LAMP-1 positivas como fonte de membrana (Arantes and Andrews 2006). Estes autores mostraram a presença de vesículas LAMP-1 positivas nas pontas dos neuritos, bem como nos locais de ancoragem dos cones de crescimento no substrato, implicando estas vesículas, já descritas como importantes para o fenômeno de reparo celular dependente de cálcio, também no reparo e crescimento neurítico *in vitro* (Andrews and Chakrabarti 2005).

Além dos mecanismos citados acima, o acesso aos constituintes da membrana plasmática são de igual importância para a formação de nova membrana e consequentemente para o crescimento neurítico. Um importante fator na formação de membranas é o aporte de lipídeos, componente essencial de sua estrutura (Yeagle 1989). Sabe-se que o colesterol e outros lipídeos são usados para a síntese de membrana e para atividades anabólicas e catabólicas das células de todo organismo, incluindo as do SNC, que é um local de grande rotatividade de lipídeos (Robinson and Rapoport 1989; Andersson, Aberg et al. 1995).

Assim como as demais células do organismo, os neurônios são completamente revestidos por uma membrana plasmática que separa o meio intracelular do extracelular. A membrana plasmática dos neurônios é semipermeável, composta por uma bicamada lipídica, proteínas, glicídios e canais iônicos. A polaridade da membrana plasmática do neurônio é diferente entre o meio intra e extracelular, essa propriedade é importante para permitir o surgimento de uma diferença no potencial elétrico entre o meio intra e extracelular, gerando assim os sinais elétricos de comunicação entre neurônios (Lent 2008).

A membrana dos neurônios não é idêntica em toda a extensão da célula e nem entre diferentes neurônios. A composição de proteínas inseridas na membrana varia e são fundamentais para as propriedades de circuito e de comunicação de cada neurônio. As proteínas dispersas na bicamada lipídica são constituintes dos canais iônicos, receptores e transportadores moleculares, moléculas de adesão celular e enzimas (Lent 2008).

Embora as células que compõem o tecido nervoso sejam capazes de sintetizar lipídeos, elas podem também internalizar lipoproteínas presentes no ambiente (Pitas, Boyles et al. 1987; Poirier, Baccichet et al. 1993). Devido ao bloqueio feito pela barreira hematoencefálica, pode-se inferir que a passagem de macromoléculas é dificultada, por isso, acredita-se que a síntese de lipídeos é feita no próprio SNC usando componentes presentes no plasma ou originados da síntese e secreção local (Roheim, Carey et al. 1979; Pitas, Boyles et al. 1987; Borghini, Barja et al. 1995).

A maior classe de lipídeos presentes no soro, tais como colesterol e seus ésteres, triglicérides e fosfolipídeos são transportados em quatro grandes classes de lipoproteínas: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Stoffel 1984).

A classificação das partículas de lipoproteínas de acordo sua densidade é útil, no entanto não é capaz de refletir os aspectos funcionais referentes a cada uma das classes, como por exemplo, o transporte de triglicérides em VLDL e quilomícrons para suprir gastos energéticos e de colesterol e seus ésteres em LDL e HDL às células alvo, como componentes da membrana plasmática e precursores de hormônios (Stoffel 1984).

As lipoproteínas, como o nome sugere, possuem uma molécula de proteína associada aos lipídeos, as apolipoproteínas (apos) (Beffert, Danik et al. 1998), que não apenas facilitam a solubilização de lipídeos insolúveis em água, mas também contribuem para o tamanho e forma das partículas de lipoproteínas. Algumas apos agem como reguladoras de reações enzimáticas envolvidas no metabolismo lipídico, outras como ligantes de receptores celulares que atuam na internalização de lipoproteínas e em seu metabolismo intracelular (Stoffel 1984). A descoberta das apolipoproteínas e seus receptores ocorreu, principalmente, por causa do seu papel no metabolismo lipídico e no controle dos níveis de colesterol. No entanto, tem sido descobertas novas funções para essa proteína, especialmente aquelas relacionadas ao SNC (Beffert, Danik et al. 1998).

Pouco se sabe a respeito da presença de apolipoproteínas no cérebro, uma vez que, em extratos totais do cérebro de diversas espécies de mamíferos, não são identificados RNA mensageiros das apolipoproteínas mais comuns: apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoB, apoC-II, apoC-III, apoF e apoH. Entretanto esses resultados não excluem a possibilidade da existência de baixas expressões de mRNA em populações celulares específicas (Boyles, Pitas et al. 1985; Elshourbagy, Walker et al. 1986; Datta, Li et al. 1987; Pitas, Boyles et al. 1987; Smith, Lawn et al. 1990; Simonet, Bucay et al. 1991; Namba, Tsuchiya et al. 1992; Day, Albers et al. 1994).

Por outro lado, diversas apolipoproteínas, incluindo apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD, apoE e apoJ podem ser encontradas no fluido cerebral espinhal de várias espécies. Essas apolipoproteínas podem ser produto da síntese local ou do plasma filtrado (Roheim, Carey et al. 1979; Salen, Berginer et al. 1987; Fujimoto, Fukagawa et al. 1993; Borghini, Barja et al. 1995; Koudinov, Koudinova et al. 1996).

Entre as principais apolipoproteínas presentes em humanos, encontra-se a apoE, presente em 10 a 20% da concentração de moléculas de VLDL e como componente minoritário em todas as outras lipoproteínas. A apolipoproteína E (apoE) (35 kDa) possibilita uma forte ligação entre partículas, pois atua como ligante à receptores específicos. Nas membranas plasmáticas das células hepáticas, a apoE é responsável também pelo catabolismo de lipoproteínas remanescentes presentes no fígado (Stoffel 1984). As células do parênquima hepático produzem a maior parte da apoE presente no plasma sanguíneo de mamíferos, que também é produzida no baço, cérebro, pulmões, rins, tecidos linfático e muscular (Zhang, Zhang et al. 2011).

A apoE atua no metabolismo e transporte de colesterol e lipídeos no plasma sanguíneo, no SNC e SNP (Boyles, Pitas et al. 1985; Stoll, Meuller et al. 1989; Zhang, Zhang et al. 2011). No plasma, a apoE é o principal componente das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de um grupo de lipoproteínas de alta densidade (HDL), desempenhando um papel funcional na distribuição das lipoproteínas plasmáticas (Beffert, Danik et al. 1998) e envolvida na redistribuição de triglicérides e colesterol em diferentes tecidos (Mensenkamp, Jong et al. 1999).

Estudos do efeito da apoE em dano de nervo periférico e em cultura de neurônios do SNC indicam que apoE pode influenciar no crescimento de neuritos e na plasticidade neuronal de um modo isoforma específico *in vivo* (Nathan, Bellosta et al. 1994; Holtzman, Pitas et al. 1995; Buttini, Orth et al. 1999; Teter, Xu et al. 1999). No entanto, nosso trabalho estuda o crescimento neurítico na ausência de apoE e suas isoformas.

Animais nocautes para o gene que expressa a apoE (apoE $-/-$) foram criados, inicialmente, para o uso em pesquisas relacionadas à patologia da aterosclerose devido ao importante papel dessa molécula no transporte de lipídeos (Plump, Smith et al. 1992). Atualmente, esse animal tem sido utilizado também para investigar o papel da apoE na síntese de fatores de crescimento, como BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), e moléculas envolvidas no processo de dor e nocicepção no sistema nervoso *in vivo* (Hashikawa-Hobara, Hashikawa et al. 2011; Wang, Miki et al. 2011; Hinder, Vincent et al. 2012).

Estudos em camundongos apoE $-/-$ sugerem que a apoE protege o cérebro contra danos agudos (Chen, Lomnitski et al. 1997) e ajuda a manter a integridade neuronal durante o envelhecimento (Masliah, Mallory et al. 1995). Outros estudos, entretanto, não observaram anormalidades neurológicas relacionadas à idade em camundongos apoE $-/-$ (Anderson, Barnes et al. 1998; Fagan and Holtzman 2000). Nosso objetivo foi lançar luz sobre essas controvérsias através de desenhos experimentais que incluem modelos *in vitro*, onde mecanismos intrínsecos podem ser investigados.

O mecanismo patogênico mais importante nas doenças neurodegenerativas e neurotraumas é a morte de neurônios. Compreender os mecanismos operantes na lesão degenerativa e necrótica neuronal é um passo fundamental para criar estratégias efetivas de tratamento contra perda neuronal pós-traumática ou relacionada ao processo de envelhecimento. A capacidade de regeneração dendrítica ou axonal também pode variar em diversos tipos de lesões e contribuir para a patogênese de diversas doenças neurodegenerativas (Fagan and Holtzman 2000).

Os efeitos da apoE na neurodegeneração no SNC e SNP são amplamente estudados na manutenção da estabilidade do aparato sinapto-dendrítico no SNC durante o processo de envelhecimento, em sua atuação como fator de crescimento neuronal na ausência e presença do peptídeo β -amilóide *in vitro*, no remodelamento dendrítico hipocampal *in vivo*, na composição e regeneração de nervos periféricos e na patogênese da Doença de Parkinson (Masliah, Mallory et al. 1995; Puttfarcken, Manelli et al. 1997; Champagne, Rochford et al. 2005; Comley, Fuller et al. 2011; Verghese, Castellano et al. 2011; Wilhelmus, Bol et al. 2011).

Como os resultados apresentados ainda são conflitantes (Popko, Goodrum et al. 1993; Masliah, Mallory et al. 1995; Anderson, Barnes et al. 1998), decidimos investigar o fenótipo *in vitro* dos neurônios apoE^{-/-} a fim de definir um papel para a apoE na viabilidade ou vulnerabilidade neuronal e no crescimento neurítico em culturas primárias de neurônios do GCS.

Neste estudo longitudinal com avaliações nos tempos de 3, 6, 12 e 24 horas após plaqueamento, descrevemos um fenótipo dos neurônios simpáticos apoE^{-/-} que sugerem sua maior resistência à lesão ou maior capacidade de regeneração em relação aos neurônios WT, abrindo caminho para posteriores abordagens experimentais que investiguem os mecanismos envolvidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a participação da apoE no fenótipo do crescimento neurítico e sua funcionalidade numa abordagem longitudinal em culturas primárias de neurônios de animais WT e apoE -/-.

2.2 Objetivos Específicos

As culturas primárias de neurônios simpáticos de animais WT e apoE -/- foram utilizadas para estabelecer diferenças entre os fenótipos nos tempos de 3, 6, 12 e 24 horas quanto a:

- Viabilidade neuronal e a cinética do crescimento neurítico; através da quantificação do número de corpos celulares, número de neuritos primários, diâmetro celular e extensão neurítica.
- Diferenças estruturais e funcionais dos neurônios através da avaliação da expressão dos marcadores PGP 9.5, β -tubulina, GAP-43 e LAMP-1.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

As culturas primárias de neurônios foram feitas a partir da dissecação dos gânglios cervicais superiores (GCS) de animais neonatos com até três dias de vida pertencentes à linhagem C57BL/6 do tipo *wild type* (WT) e apoE^{-/-}. Para a obtenção dos neonatos, uma rotina de cruzamentos planejados entre animais adultos (matrizes) dos dois tipos foi mantida no biotério do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB)/UFMG. Inicialmente, as matrizes WT foram obtidas no Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG e as matrizes apoE^{-/-} foram gentilmente cedidas pela Prof^a Jaqueline Alvarez-Leite do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG. Foram utilizados, no mínimo, 5 animais por experimento. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob protocolo número 255/08 (ANEXO 1).

3.2 Genotipagem das matrizes apoE^{-/-}

3.2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para confirmar a ausência do gene que codifica a apoE nos animais apoE^{-/-}. Essa reação envolve iniciadores que permitem indicar a presença do gene ou a substituição dele. O DNA obtido para a reação foi extraído de um pequeno fragmento da cauda dos camundongos apoE^{-/-} (C57BL/6) e selvagens (WT C57BL/6). De acordo com o protocolo de extração do DNA adotado, foram adicionados 300 µL de NaOH 50 mM às amostras, que foram incubadas a 95 °C por aproximadamente 45 minutos. Em seguida, foi realizada a agitação no vórtex até que a maior parte do fragmento estivesse degradado e, após, adicionou-se 25 µL de Tris-HCl 1 M pH 8,0 com posterior centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e transferido para outro microtubo e o produto resultante foi utilizado para a PCR. Nessa reação, foram utilizados três iniciadores, sendo que o direto se anela no DNA do WT e do apoE^{-/-}, um dos reversos apenas no de WT e o outro reverso apenas no do apoE^{-/-}. Assim, o fragmento amplificado a partir do DNA dos nocautes apresenta 245 pb e dos WT, 155 pb. Os resultados foram revelados em gel de agarose 1%.

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados na técnica de PCR. Os primers 180 e 181 amplificam a banda wild type (155 pb); 180 e 182 amplificam a banda do alelo afetado (245 pb).

Sequências dos primers	
oIMR0180:	5'GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG 3' Tm = 70,0°C
oIMR0181:	5'TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C3' Tm = 67,0°C
oIMR0182:	5'GCC GCC CCG ACT GCA TCT 3' Tm = 69,0°C

3.2.2 Dosagem de colesterol

A dosagem de colesterol presente no soro sanguíneo também foi utilizada para diferenciar animais apoE^{-/-} e WT. Os animais apoE^{-/-}, devido à deficiência em apoE, responsável pela distribuição de lipídeos e de colesterol, apresentam níveis elevados de colesterol no soro sanguíneo em relação aos animais WT (Zhang, Reddick et al. 1992). Os níveis de colesterol total dos animais foram determinados por método enzimático colorimétrico (colesterol oxidase) utilizando-se kit comercial (Labtest, Brasil).

Para a dosagem do colesterol total, uma amostra de sangue foi colhida a partir de um pequeno corte na extremidade da cauda dos animais. Em seguida as amostras foram centrifugadas para obtenção do soro sanguíneo. Uma alíquota de 5µL de soro de cada amostra foi diluída em água deionizada na proporção 1:100 e, posteriormente, 100µL do soro diluído e 100µL do reagente de cor (Kit Labtest) foram plaqueados em placa de 96 poços e incubados por 15 min a 37°C. Após, foi realizada a leitura da absorbância a 492nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus). A partir da leitura, obteve-se uma curva padrão, sendo o resultado obtido pela equação da reta multiplicado pelo fator de diluição, com obtenção de valor correspondente à concentração de colesterol total em mg/dL.

3.3 Cultura primária de neurônios

3.3.1 Obtenção e dissecação dos gânglios

Os camundongos neonatos foram mortos por decapitação e cada cabeça foi imediatamente posicionada sob a lupa (ZP101, Prior Scientific Instruments Ltd, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) para localização e retirada dos GCSs bilateralmente. Foi utilizada uma solução de sais balanceada de Hanks (HBSS, H9269, Sigma-Aldrich Company, St.Louis, EUA) tamponada com 10 mM de solução tampão HEPES (H/H) (15630-056, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para lavar o tecido e facilitar a localização anatômica e a retirada dos gânglios. Após a remoção, os gânglios foram colocados em gotas de H/H em uma placa de cultura de 60x15mm (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Após a coleta de todos os gânglios, o tecido conjuntivo e os vasos porventura aderidos foram retirados sob observação à lupa. Todos os procedimentos foram executados em ambiente limpo, utilizando-se pinças e tesouras cirúrgicas delicadas previamente desinfetadas. A solução H/H utilizada permaneceu estéril até o início do sacrifício dos animais, momento em que o tubo e a placa de cultura foram abertos para permitir a lavagem das cabeças e a colocação dos gânglios nas gotas da solução.

3.3.2 Dissociação enzimática das células ganglionares

A partir desta etapa, trabalhou-se em capela de fluxo laminar, em ambiente estéril. Para o estabelecimento de culturas de neurônios, os gânglios mantidos em gotas de H/H foram transferidos com uma pipeta de Pasteur para um tubo contendo 2 ml de tripsina (T5266, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 0.3 % em H/H. Em seguida, o tubo fechado contendo os gânglios foi incubado a 37°C em atmosfera de 5 % de gás carbônico (CO₂) e 95 % de umidade pelo período de 60 minutos. A cada 10 minutos, o tubo foi gentilmente agitado para evitar que os gânglios se aderissem à superfície do tubo, otimizando a ação da enzima sobre os tecidos. Após esse período, o sobrenadante contendo a solução enzimática foi cuidadosamente removido, preservando os gânglios ainda íntegros no fundo do tubo.

3.3.4 Dissociação mecânica das células ganglionares

Após a remoção da solução de tripsina, 1 ml de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e com os antibióticos Penicilina (100 UI/ml, P433, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA) e Estreptomicina (10000 µg/ml, P433, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA) foi adicionado ao tubo e os gânglios foram aspirados repetidas vezes dentro de uma pipeta de Pasteur com o intuito de dissociar mecanicamente as células ganglionares. Após a desintegração dos gânglios, as células foram contadas em câmara de Neubauer e a suspensão de células foi reservada até o seu plaqueamento.

Para estabelecimento da cultura de neurônios, a superfície da lamínula de vidro (Glasscyto, Brasil) no fundo dos poços de cultura recebeu uma camada fina de Matrigel (354234, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) na diluição 1:1 em meio DMEM *serum free* estéril (11995-065, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As superfícies dos poços foram tratadas antes do plaqueamento das células em tempo suficiente para secagem em ambiente estéril.

3.3.5 Plaqueamento das células

As células obtidas em suspensão após os procedimentos de dissociação foram diluídas em meio completo para obtenção de densidade de 2×10^4 células em volumes de 500 µl/poço e foram plaqueadas em placas de 24 poços (LCP024, Lavie, Brasil). A densidade mínima de 5×10^3 células plaqueadas por poço garante um padrão adequado de densidade e distribuição das células em cultura (Arantes, Lourenssen et al., 2000; Almeida-Leite et al., 2007). As células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Glasscyto, Brasil) previamente tratadas com Matrigel para posteriores reações de imunofluorescência e documentações fotográficas. Para obtenção das culturas de neurônios, NGF (N-100, Alomone, Jerusalem, Israel) na concentração de 10 ng/ml foi adicionado à solução de células em meio completo. O NGF é indispensável à viabilidade neuronal *in vitro* e deve ser adicionado à cultura a cada 48 horas.

3.4 Imunofluorescência

As culturas celulares foram submetidas à técnica de imunofluorescência para a avaliação da expressão dos marcadores β -tubulina, marcador de microtúbulos específicos de neurônios (Hoffman 1989), PGP 9.5, marcador genérico de neurônios, GAP-43, proteína associada ao crescimento neurítico (Hoffman 1989) e LAMP-1, glicoproteína lisossomal presente em vesículas exocíticas (Advani, Yang et al. 1999; Rao, Huynh et al. 2004). A **Tabela 02** a seguir especifica os anticorpos primários e secundários utilizados.

Tabela 2: Caracterização dos anticorpos primários e secundários.

Nome do anticorpo	Marca e referência comercial	Origem e Diluição	Sistema de detecção/anticorpo secundário	Diluição do anticorpo secundário
PGP 9.5	UltraClone Ltd Yarmouth, Reino Unido	policlonal de coelho 1:600	Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA)	1:250
β - tubulina	Millipore EUA	Monoclonal de camundongo 1:400	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Invitrogen, USA)	1:400
GAP-43	Millipore EUA	Policlonal de coelho 1:200	Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit (Invitrogen, USA)	1:400
Lamp-1	Hybridoma Bank, USA; Cedido pela Dr. Norma Andrews, University of Maryland	Monoclonal de rato 1:100	Alexa Fluor 568 goat anti-rat IgG (Invitrogen, USA)	1:250

Após fixação em formol a 10%, as lamínulas foram lavadas em três banhos de solução tampão fosfato (PBS) 10% por cinco minutos cada. Em seguida foram incubadas sucessivamente em soro normal de cabra na diluição 1:20 (NGS, Cripion Biotechnology, Brasil), albumina bovina a 2% (BSA, Inlab, Brasil) e soro normal de camundongo (NMS) 1:100 por 15 min cada. Em seguida, as células foram permeabilizadas por saponina a 0,05% durante 20 min à temperatura ambiente. As células foram, então, incubadas com os anticorpos primários por, no mínimo, 50 min e, no máximo, 2 horas e com os anticorpos secundários por 40 min à temperatura ambiente. O controle negativo das reações foi feito pela omissão do anticorpo primário resultando em baixa reatividade. Entre cada etapa, as lamínulas foram lavadas em três banhos de cinco minutos em PBS 10%. Para detecção do núcleo e sua caracterização morfológica, utilizou-se 0,2 µg/mL do marcador Hoechst (H1399, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com incubação por 10 min à temperatura ambiente e posterior lavagem em PBS 10% por três vezes. Após montagem das lamínulas em hydromount (HS-106, National Diagnostics, Atlanta, GA, USA), as mesmas foram analisadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 e as imagens foram obtidas para a documentação através do software Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, MD, USA).

3.5 Análise quantitativa dos corpos neuronais e extensão neurítica em culturas apoE^{-/-} e WT

As imagens das áreas de maior concentração celular das culturas neuronais fixadas foram obtidas no aumento 1600 X no microscópio invertido Olympus IX71 equipado com câmera Hamamatsu Orca II cooled CCD e o software MetaMorph. Foram obtidas 10 imagens de cada lamínula. Os neurônios foram distinguidos das células da glia por suas características morfológicas. A quantificação dos corpos neuronais, neuritos primários, diâmetro do corpo neuronal, extensão neurítica e intensidade de fluorescência foi feita utilizando o software ImageJ 1.44 (disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para a quantificação da extensão neurítica foram escolhidos 15 neuritos em cada imagem. Os neuritos foram medidos por uma linha traçada em sua extensão e os valores dessa medida foram obtidos em micrômetros e representados graficamente. As imagens das marcações por imunofluorescência foram convertidas em escala de cinza e submetidas à análise da intensidade do sinal fluorescente para ambos os genótipos entre

60 e 200 níveis de cinza. A área de marcação foi delimitada e a intensidade de fluorescência dessa área foi determinada automaticamente pelo programa Image J. Os dados obtidos foram normalizados e convertidos em representações gráficas através do programa GraphPad Prism 5.0.

3.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos de, no mínimo, dois experimentos independentes foram avaliados quanto à significância estatísticas pelos testes One-way ANOVA ou teste T de Student para dados paramétricos, Mann–Whitney ou ANOVA-Kruskal-Wallis para dados não paramétricos e Two-way ANOVA. Valores de probabilidade iguais ou menores que 0.05 foram considerados significantes. Os testes estatísticos foram feitos através do programa GraphPad Prism 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos animais apoE^{-/-}

4.1.1 Genotipagem e Dosagem do Colesterol total dos animais apoE^{-/-}

Os animais apoE^{-/-} utilizados nesse trabalho tiveram seu genótipo confirmado por PCR e pela quantificação do colesterol no plasma sanguíneo. A deleção do gene apoE e os níveis elevados de colesterol foram observados em todos os animais apoE^{-/-}.

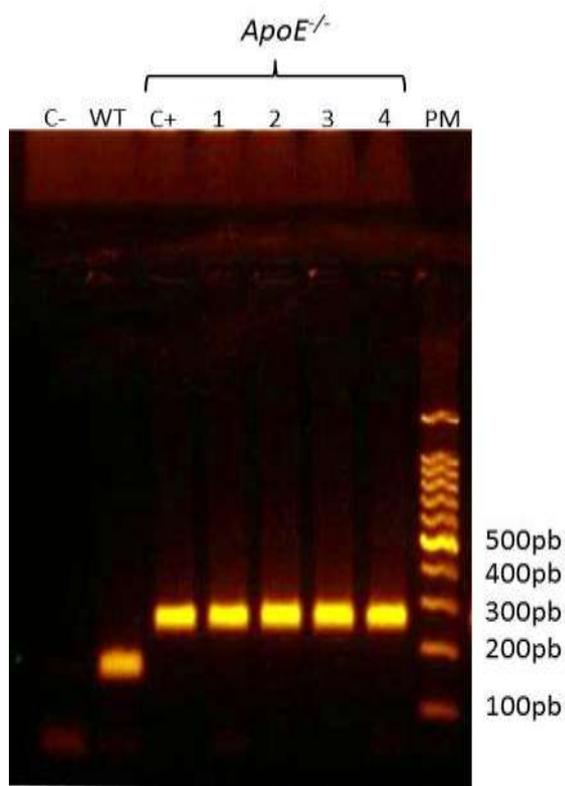


Figura 2: Gel de agarose 1,5% representativo do resultado da genotipagem dos animais ApoE^{-/-}. No controle negativo (C-), foram adicionados todos os reagentes com exceção do DNA. No controle positivo, adicionamos o DNA extraído de um animal apoE^{-/-} cujo genótipo havia sido previamente confirmado. O fragmento obtido a partir da amplificação do DNA do animal WT possui 155pb. Já o amplicon gerado pelo DNA molde dos animais apoE^{-/-} possui 245pb.

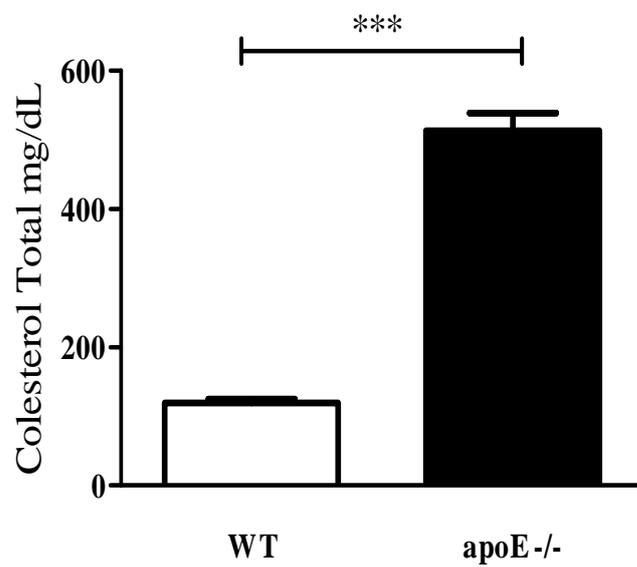


Figura 3: Colesterol total de animais WT e apoE -/-. Gráfico representativo da dosagem de colesterol pelo método enzimático colorimétrico através do Kit comercial LabTest. *** $p < 0,001$.

4.2 Análise qualitativa das culturas primárias

Os aspectos morfológicos ao campo claro das culturas neuronais estão documentados na **Figura 4** e descritos a seguir.

4.2.1 Culturas de animais WT

Após 3 horas de plaqueamento, as culturas primárias WT apresentaram corpos celulares com morfologia homogênea e menor tamanho em relação aos tempos de 6, 12 e 24h. Algumas células apresentaram neuritos primários, mas, devido ao seu tamanho reduzido, a extensão desses neuritos não foi medida neste tempo. A maior parte das células apresentou aspecto viável, com presença de raros debris celulares e alguns corpos celulares de grande volume (**Figura 4A**). A ausência das células da glia parece não alterar a morfologia dos neurônios nem sua capacidade de emitir neuritos primários. Nenhuma alteração morfológica evidente foi observada entre experimentos na presença de células da glia e na ausência das mesmas (**dados não apresentados para nenhum dos tempos**).

Seis horas após o plaqueamento, observou-se a presença de corpos celulares volumosos, maior número de emissões de neuritos primários e maior extensão neurítica (**Figura 4C**).

Doze horas após o plaqueamento, os corpos celulares mantiveram as características observadas nos tempos anteriores, mas apresentaram-se agrupados. Nesse tempo houve um aumento na extensão dos neuritos, formando uma rede neurítica complexa, não observada nos tempos anteriores (**Figura 4E**).

No tempo de 24 horas, as células apresentaram-se mais agrupadas e a extensão e complexidade neurítica também estavam aumentadas (**Figura 4G**).

4.2.2 Culturas de animais ApoE -/-

As culturas primárias apoE -/- após 3 horas de plaqueamento apresentaram, em geral, corpos celulares de tamanhos regulares. No entanto, aparentaram ser, em média, maiores que os corpos celulares de neurônios WT. Nesse tempo observou-se também a presença de vários corpos celulares de tamanho bastante aumentado, o que não ocorreu em culturas primárias WT do mesmo tempo. Em relação à emissão de neuritos primários, as culturas primárias WT e apoE -/- exibiram o mesmo padrão. Assim como

nas culturas WT, a extensão neurítica não pode ser medida devido aos pequenos comprimentos dos neuritos (**Figura 4B**). Semelhante as culturas WT, não observou-se nenhuma diferença entre culturas apoE -/- com presença ou ausência de células da glia, sugerindo que essas células não interferem na morfologia dos neurônios e nem em sua capacidade de emitir neuritos (**dados não apresentados para nenhum dos tempos**).

Seis horas após plaqueamento, houve uma diminuição no número de corpos celulares volumosos e um aumento no número de neuritos primários. A extensão neurítica também apresentou-se aumentada nesse tempo em relação as culturas WT (**Figura 4D**).

Após doze horas, os corpos celulares mantiveram as características observadas nos tempos anteriores. Os corpos celulares apresentaram-se mais aglomerados e os volumosos tornaram-se mais raros. Houve um aumento na extensão dos neuritos, formando uma rede neurítica complexa, não observada nos tempos anteriores. Essa rede foi visivelmente mais densa nos animais apoE-/- quando comparado aos WT (**Figura 4F**).

Para o tempo de 24 horas, as observações foram semelhantes às culturas primárias WT, com corpos celulares bastante agrupados, extensão neurítica aumentada e maior complexidade da rede (**Figura 4H**).

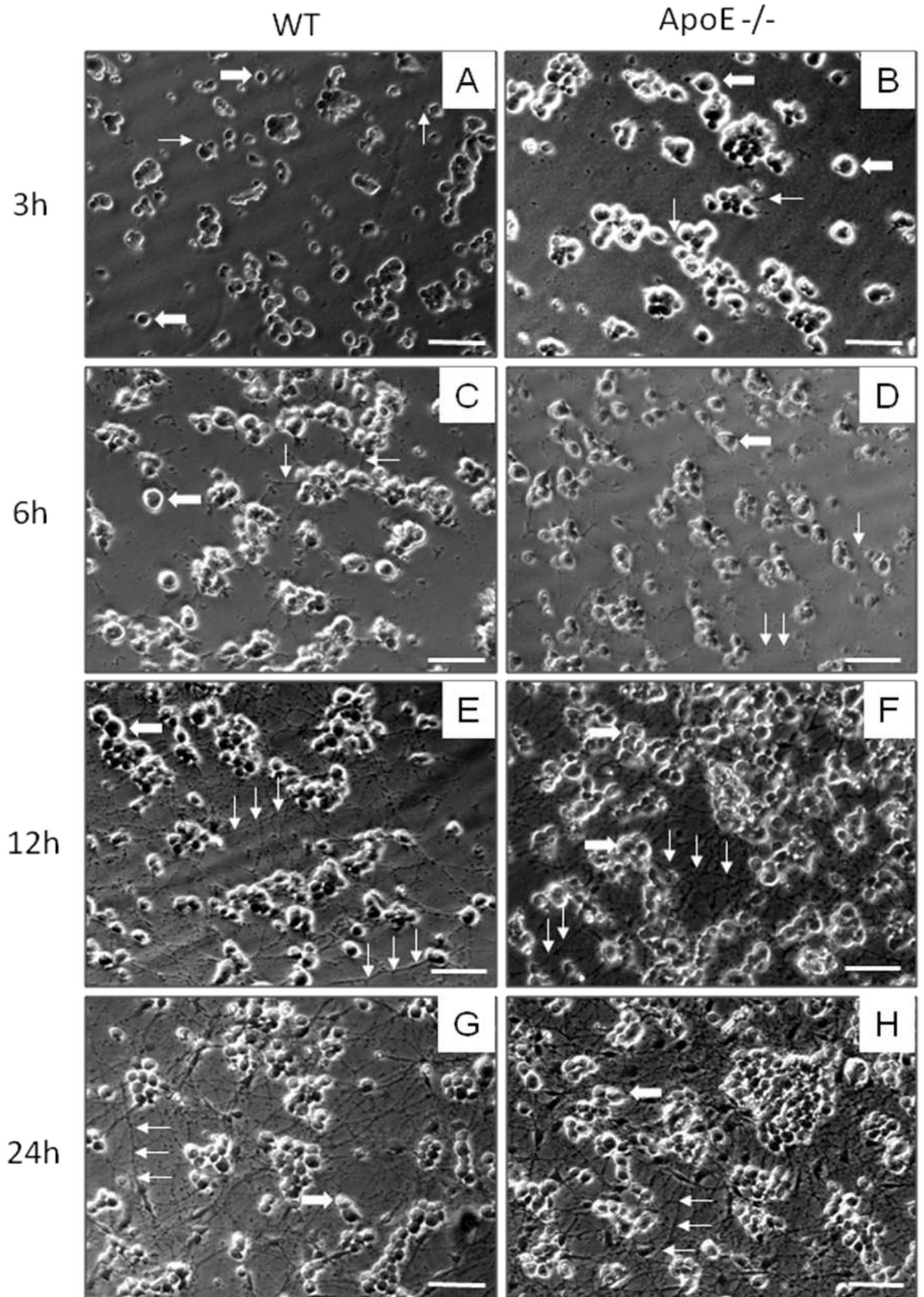


Figura 4: Aspectos de culturas neuronais do GCS de animais WT e apoE -/- às 3, 6, 12 e 24 horas após plaqueamento. Culturas primárias neuronais do GCS foram obtidas de camundongos neonatos WT e apoE -/- e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ por 3, 6, 12 ou 24h. Em seguida, foram fixadas com formaldeído a 10%. Aspectos de culturas neuronais do GCS de animais WT (A, C e E) e apoE -/- (B, D e F). Culturas neuronais às 3 (A, B), 6 (C, D), 12 (E, F) e 24 horas (G,H) após plaqueamento. Setas indicam neuritos e setas espessas indicam corpos neuronais. Barra de escala representa 50 µm.

4.3 Análise morfométrica quantitativa

4.3.1 Sobrevida neuronal *in vitro*

Uma vez que nossa análise qualitativa indicou que os neurônios apoE $-/-$ mostravam-se mais volumosos e com aspecto mais íntegro, estudamos a viabilidade neuronal através da contagem dos números de corpos celulares (**Figura 5**).

Observamos que a viabilidade neuronal é maior nos animais apoE $-/-$ o que é evidenciado no tempo de 12 horas após o plaqueamento. Com relação às culturas WT houve diminuição no número de corpos celulares das culturas de 6, 12 e 24 horas comparadas ao tempo de 3 horas após plaqueamento.

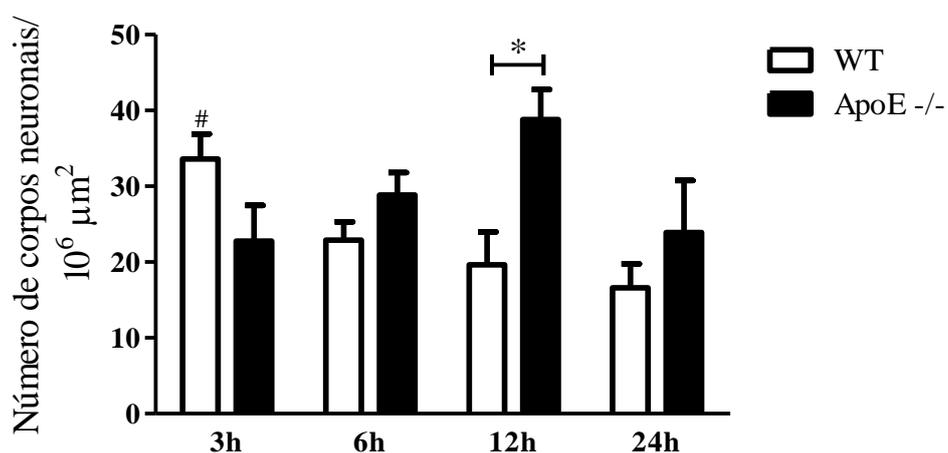


Figura 5: Número de corpos celulares neuronais por área. Culturas primárias neuronais do GCS foram obtidas de camundongos neonatos WT e apoE $-/-$ mantidas a 37°C incubadas 5% CO₂ por 3, 6, 12 ou 24h. Em seguida, foram fixadas com formaldeído a 10%. Culturas apoE $-/-$ apresentaram maior número de corpos celulares/área em relação as culturas WT às 12 horas após o plaqueamento (*p<0,01). Barras representam a média e o erro padrão médio de dois experimentos independentes em, no mínimo, triplicatas, *p<0,05 representam culturas WT em relação a apoE $-/-$ 12 horas após plaqueamento, # p<0,05 representa culturas WT de 6, 12 e 24h em relação às culturas WT de 3 horas após plaqueamento.

4.3.2 Diâmetro dos corpos neuronais

De acordo com nossa análise qualitativa, observamos que, no tempo de 3 horas após plaqueamento, o diâmetro dos corpos neuronais apoE ^{-/-} apresentavam-se aumentados em relação ao controle WT. Esse parâmetro pode ser utilizado também como indicador da viabilidade neuronal e indiretamente da capacidade de reparo de membrana. A partir dessa observação, fizemos a medida do diâmetro do corpo neuronal em culturas neuronais apoE ^{-/-} e WT fixadas após 3 horas de plaqueamento. Esse dado sugere que a ausência da apoE associa-se com aumento da área dos corpos neuronais *in vitro* imediatamente após o plaqueamento confirmando a nossa impressão.

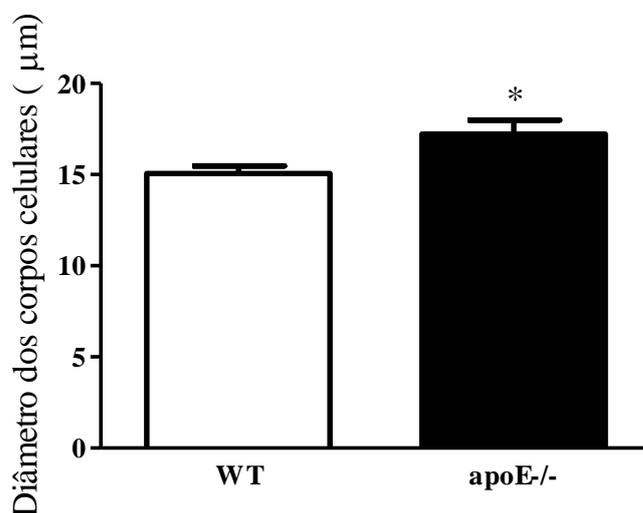


Figura 6: Diâmetro dos corpos celulares neuronais às 3 horas. Culturas primárias apoE ^{-/-} apresentaram maior diâmetro de corpos celulares em relação as culturas WT às 3 horas após o plaqueamento (*p<0,05). Barras representam o erro padrão médio de dois experimentos independentes em, no mínimo triplicatas.

4.3.3 Número de neuritos primários

Baseados em nossas observações qualitativas e considerando a importância da apoE nos fenômenos relacionados com a formação dos cones de crescimento neurítico e das membranas plasmáticas no fenótipo de resistência ou susceptibilidade à lesão nos animais WT e apoE^{-/-}, medimos o número de brotamentos primários presentes nos corpos neuronais. Observamos que 3 horas após o plaqueamento, as culturas apoE^{-/-} apresentaram maior número de neuritos primários/célula em relação às culturas WT.

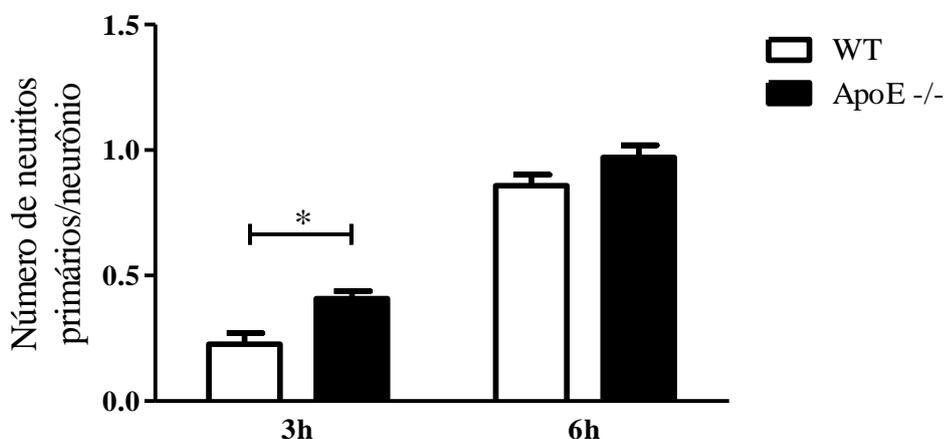


Figura 7: Número de neuritos primários por neurônio. Culturas neuronais apoE^{-/-} apresentam maior número de neuritos primários por neurônios às 3 horas. Barras representam a média e o erro padrão médio de dois experimentos independentes, em no mínimo, triplicatas, *p<0,05.

4.3.4 Extensão neurítica

Com base nas observações descritas na análise qualitativa, submetemos as culturas a uma análise quantitativa para mensurar a extensão neurítica nos tempos de 6, 12 e 24 horas após plaqueamento.

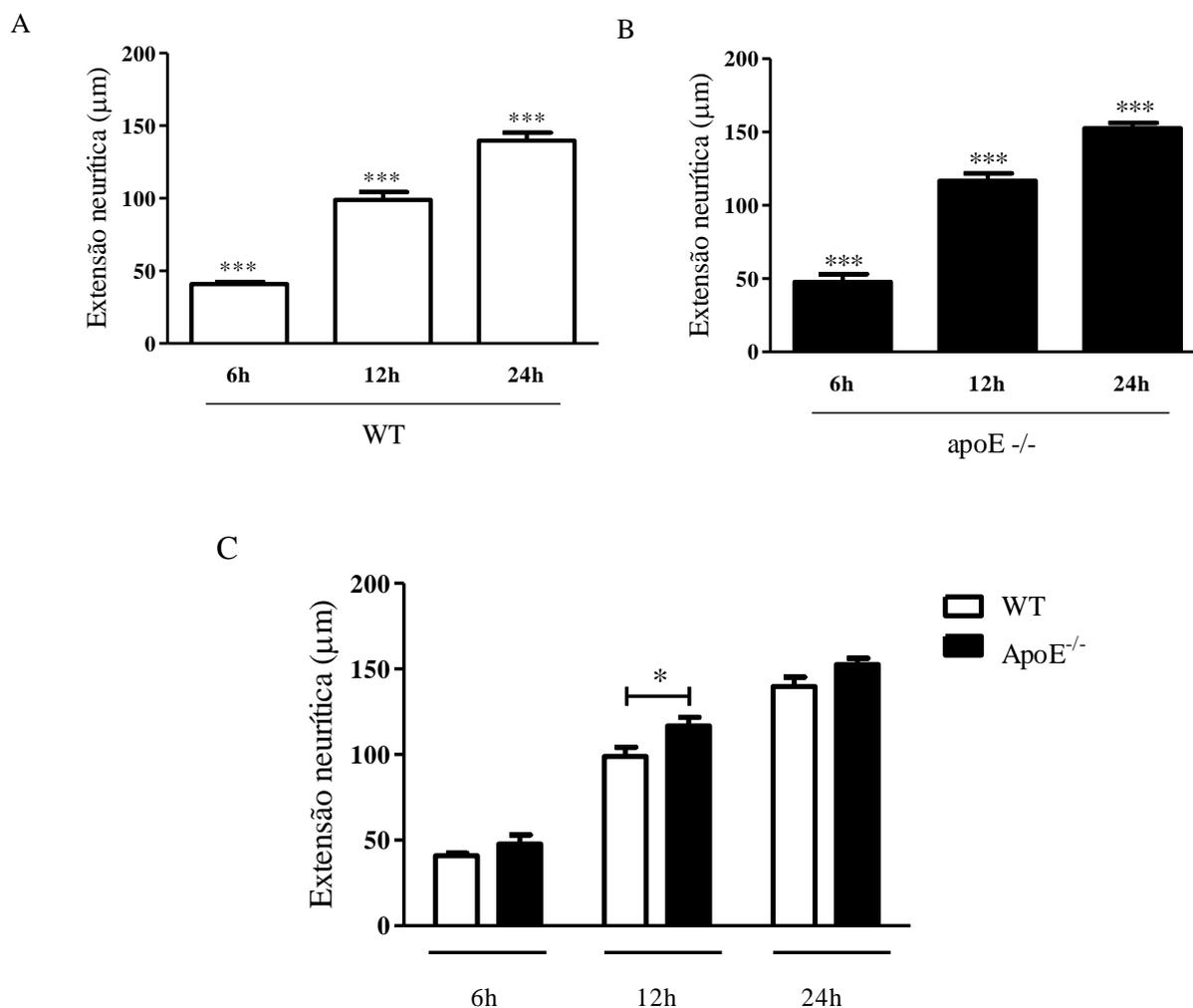


Figura 8: Extensão neurítica às 6, 12 e 24 horas pós plaqueamento. Culturas neuronais WT (A) e apoE^{-/-} (B) mostraram um aumento significativo na extensão neurítica ao longo do tempo. Após 12 horas (C), culturas de neurônios apoE^{-/-} apresentaram maior extensão neurítica em relação a culturas WT. Barras representam a média e o erro padrão médio de dois experimentos independentes, em no mínimo, triplicatas, *p<0,05,***p<0,001.

4.4 Análise imunohistoquímica

4.4.1 PGP 9.5 e β -tubulina

Devido as diferenças observadas na extensão neurítica entre culturas WT e apoE $-/-$ nós decidimos avaliar a expressão de alguns marcadores como β -tubulina, um marcador específico de microtúbulos de neurônios (Hoffman 1989) e PGP 9.5, um marcador genérico de neurônios, com a finalidade de estabelecer diferenças estruturais entre neurônios WT e apoE $-/-$. Não foram observadas diferenças na expressão de β -tubulina e PGP 9.5 na marcação por imunofluorescência, embora a quantificação da intensidade de fluorescência desses dois marcadores não tenha sido feita (**Figura 9**). Esse resultado sugere que essas proteínas estruturais são expressas de maneira semelhante em neurônios WT e apoE $-/-$.

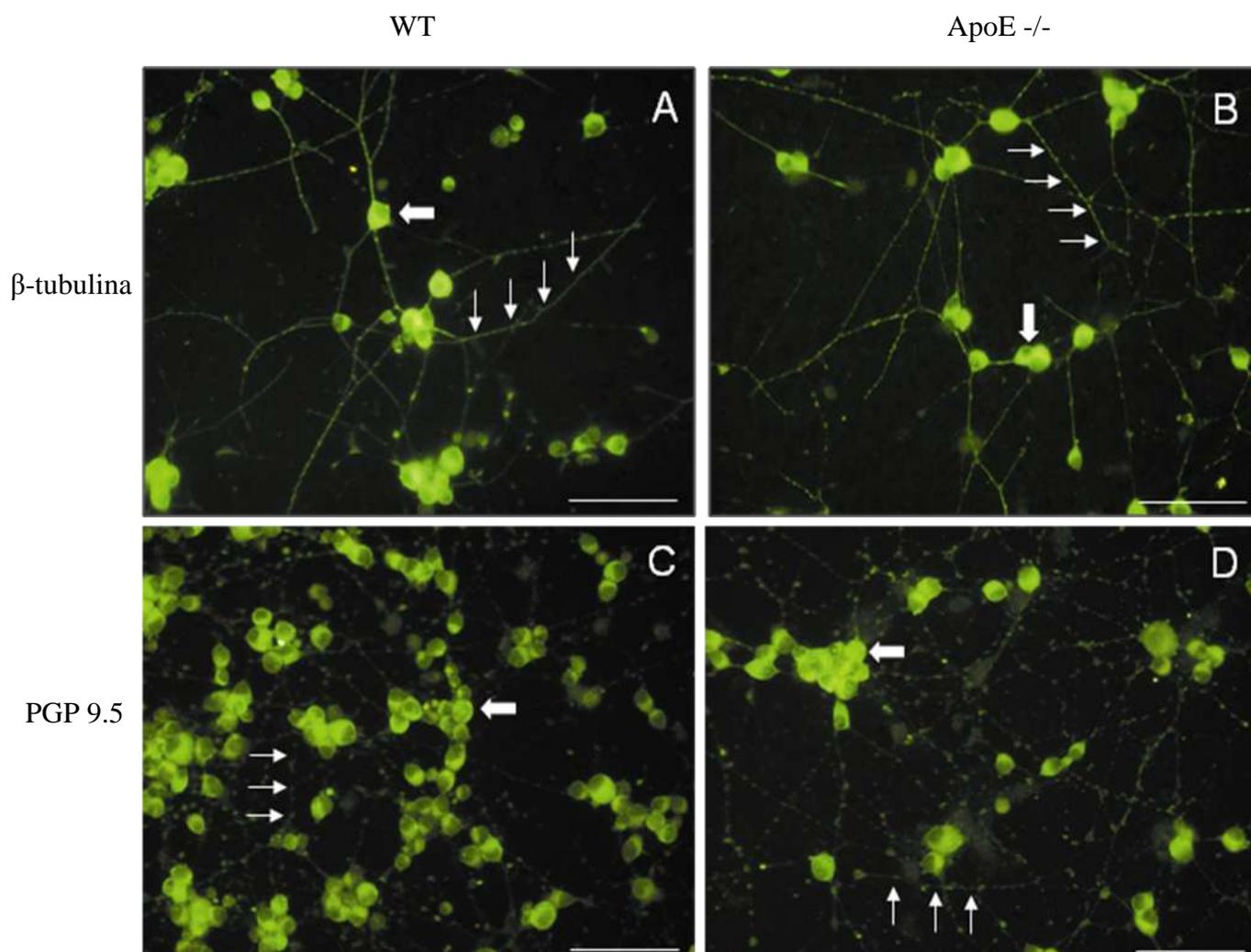


Figura 9: Expressão de β -tubulina e PGP 9.5. Imunofluorescência em neurônios WT (A e C) e apoE -/- (B e D) anti β -tubulina (verde, A e B) e anti PGP 9.5 (verde, C e D). Setas indicam neuritos e setas largas indicam os corpos celulares neuronais. Barra de escala representa 30 μ m.

4.4.2 GAP-43 e LAMP-1

Através da técnica de imunofluorescência, nós verificamos a expressão de GAP-43, uma proteína associada ao crescimento neuronal, e LAMP-1, uma glicoproteína lisossomal presente em vesículas exocíticas. A expressão de GAP-43 em neurônios apoE ^{-/-} foi maior em relação aos neurônios WT 12 horas após plaqueamento (**Figura 10 A,B,G**) (**p< 0,01). A quantificação da intensidade de fluorescência foi feita a partir da delimitação da área fluorescente e o valor obtido foi convertido em Unidades Arbitrárias (U.A.). Em relação à expressão de LAMP-1, os neurônios apoE ^{-/-} apresentaram maior expressão em relação a neurônios WT 6 horas após plaqueamento (**Figura 10 E,F,H**) (*p< 0,05). No entanto, no tempo de 12 horas após plaqueamento, os neurônios WT e apoE^{-/-} apresentaram expressão semelhante de LAMP-1.

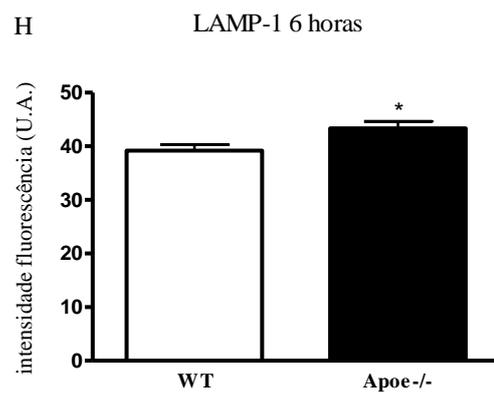
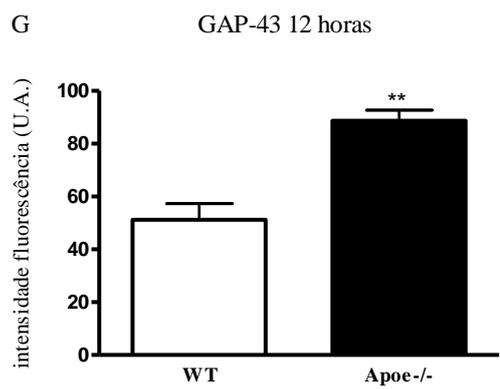
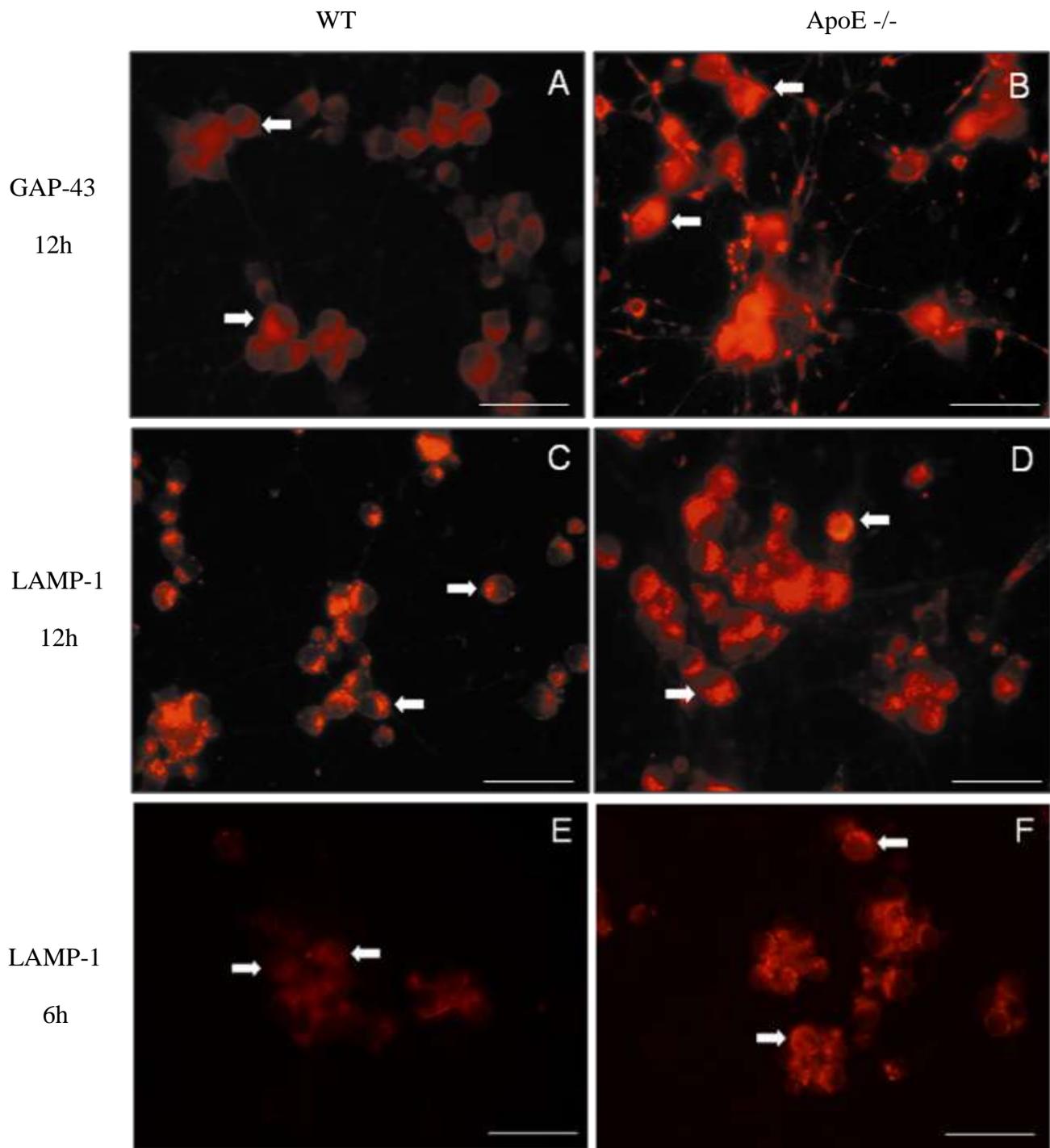


Figura 10: Expressão de GAP-43 e LAMP-1. Imunofluorescência de neurônios do GCS de animais WT (A e C) e apoE $-/-$ (B e D) utilizando anticorpos policlonais anti GAP-43 (vermelho, A e B) e anticorpos monoclonais anti LAMP-1 12 horas após plaqueamento (vermelho, C, D) e 6 horas após plaqueamento (E, F). A intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (U.A.) está representada em G para GAP-43 12 horas pós plaqueamento e H para LAMP-1 6 horas após plaqueamento. Barra de escala representa 30 μ m. Barras representam a média e o erro padrão médio de dois experimentos independentes, em no mínimo, triplicatas, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

A abordagem *in vitro* da neurobiologia apresenta diversas vantagens em relação à abordagem *in vivo*, dentre elas a possível seleção de neurônios e de diferentes tipos de células da glia para o estabelecimento das culturas. Essa abordagem permite também o estudo direto das interações intercelulares (Laerum, Steinsvag et al. 1985), a manipulação do ambiente extracelular e a observação direta (Tiffany-Castiglioni 1993). Muitos estudos utilizam linhagens celulares geneticamente modificadas, como células imortalizadas e células cancerosas, para realizar ensaios *in vitro*. No entanto, as células de cultura primária, obtidas diretamente de tecidos de um organismo, são mais similares às células presentes *in vivo*, pois se apresentam normalmente diferenciadas e mantêm características morfológicas e funcionais observadas no tecido, tais como: a síntese e secreção de produtos específicos, a capacidade de contração e, no caso de neurônios, a emissão de axônios eletricamente excitáveis e capazes de fazer sinapse com outras células nervosas. A manutenção das propriedades típicas das células originais em células de cultura primária permite o estudo de aspectos celulares que seriam muito menos acessíveis no tecido, demonstrando a sua importância como ferramenta metodológica (Tolkovsky, Walker et al. 1990). Embora estudos *in vitro* apresentem vantagens em relação aos modelos *in vivo*, é importante citar os desafios no delineamento experimental e na interpretação dos resultados que os modelos de cultura celular e tecidual oferecem (Tiffany-Castiglioni 1993).

No caso de culturas primárias obtidas de neonatos apoE ^{-/-}, encaramos o desafio adicional de obter ninhadas com número suficiente de animais para permitir a coleta de, no mínimo, 14 a 18 gânglios, que, idealmente, permitiriam o plaqueamento da quantidade necessária de poços para analisar todas as variáveis que pretendíamos nesse estudo nos diversos tempos experimentais. As ninhadas de animais apoE ^{-/-} eram freqüentemente pequenas (menos de 7 animais), exigindo duas ninhadas por experimento, o que produziu atrasos no nosso cronograma de repetições. Além disso, tivemos dificuldade com a padronização inicial dos experimentos devido à inviabilidade do NGF por problemas de acondicionamento. A preservação do NGF e o controle de sua atividade tem sido agora feitos de maneira rotineira em nosso laboratório.

A cultura primária de neurônios simpáticos do GCS, que vem sendo utilizada por nosso grupo para estudar a lesão neuronal estrutural e a cinética do crescimento neurítico após ação de diversos estímulos (Arantes and Andrews 2006; Almeida-Leite, Galvao et al. 2007) apresenta algumas particularidades metodológicas como: dependência de Matrigel e de fator de crescimento nervoso (NGF) para a sobrevivência e emissão de prolongamentos *in vitro*. O Matrigel é um gel comercial que mimetiza a matriz extracelular e sua presença nos poços de cultura é essencial à fixação, viabilidade dos neurônios e ao crescimento de neuritos em cultura (Blennerhassett and Bienenstock 1998; Arantes, Lourenssen et al. 2000). Esse gel tem sido utilizado em estudos *in vitro* de diversos tipos celulares devido a sua capacidade de reconstituir a membrana basal com similaridades em estrutura, composição e propriedades físicas e funcionais encontradas *in vivo* (Kleinman, McGarvey et al. 1982; Kleinman, Graf et al. 1987; McGuire and Seeds 1989; Katz, Barrette et al. 1992). Associado aos componentes da matriz extracelular, o NGF também é essencial à sobrevivência de neurônios simpáticos em cultura e sua ausência por um período superior a 18 horas está relacionada à ocorrência de apoptose neuronal (Martin, Schmidt et al. 1988). Além disso, o NGF é necessário para a emissão de prolongamentos (Reynolds and Perez-Polo 1981), para a diferenciação (Greene and Tischler 1976) e para o desenvolvimento de sinapses *in vitro*, tanto em culturas primárias quanto em células da linhagem PC12 derivadas de feocromocitoma da medula da adrenal de ratos (Zhou, Xu et al. 2006). O NGF, também é essencial para a sobrevivência dos neurônios e exerce seus efeitos biológicos pela ligação a duas classes de receptores de superfície celular, receptores de alta afinidade tirosina quinase (TrkA) e receptores transmembrana de baixa afinidade de neurotrofinas p75 (p75NTR) (Geetha and Wooten 2008; Moises, Wuller et al. 2009). Os receptores TrkA quando ativados podem levar a um aumento na concentração de íons de cálcio. Uma concentração basal de íons de cálcio parece ser importante para a sobrevivência dependente de NGF de neurônios simpáticos *in vitro* (Koike and Tanaka 1991), mas ainda existem dúvidas se a sinalização de cálcio dependente de NGF é necessária para o crescimento neurítico (Tolkovsky, Walker et al. 1990).

Apesar das dificuldades descritas acima, que provocaram uma drástica redução no tempo para a execução de nosso estudo, realizamos a avaliação longitudinal do crescimento neurítico em culturas primárias advindas de animais WT e apoE *-/-*. Ao

seguirmos nossas culturas por 3, 6, 12 e 24 horas após plaqueamento, foi possível acompanhar mudanças na morfologia do corpo neuronal e no crescimento neurítico ao longo do tempo.

Em um primeiro momento, quantificamos os parâmetros que são indicadores de viabilidade neuronal, tais como: o número de corpos neuronais, que é indicativo da sobrevivência neuronal, número de neuritos primários e diâmetro do corpo celular neuronal. Tais parâmetros indicaram maior número de neurônios às 12 horas e neuritos primários e maior volume do corpo neuronal nos animais apoE $-/-$ às 3 horas.

A densidade mínima de 5×10^3 células plaqueadas por poço garante um padrão adequado de densidade e distribuição das células em cultura (Arantes, Lourenssen et al., 2000). Sendo o neurônio uma célula perene, é de fundamental importância verificar o número de células com membranas intactas, nucléolos evidentes e aspecto morfológico característico de neurônios que persistiram nos tempos estudados. Nossos resultados demonstraram maior número de células com aspecto morfológico preservado em culturas apoE $-/-$ em relação a WT no tempo de 12 horas após plaqueamento. No tempo de 3 horas após plaqueamento, os neurônios apoE $-/-$ apresentaram corpos celulares maiores em relação às culturas WT. Esses dados sugerem que a ausência da expressão de apoE possa interferir nos mecanismos de morte celular. Divergente aos nossos dados, Hayashi e colaboradores, 2007 demonstraram que a sinalização através de apoE via LRP1 (*low density lipoprotein receptor 1*) promove a sobrevivência celular (Hayashi, Campenot et al. 2007). Portanto, estudos mais detalhados dos mecanismos de morte celular nos neurônios apoE $-/-$ são necessários.

Os neurônios apoE $-/-$ apresentaram maior número de neuritos primários em relação aos neurônios WT 3 horas após plaqueamento. Nosso resultado contrasta com o observado por Champagne e colaboradores que afirmaram que o brotamento no SNC de animais apoE $-/-$ é mais tardio em relação aos animais controle (Champagne et al., 2005). Esses pesquisadores investigam o papel da apoE no SNC em neurônios hipocámpais e a diferença encontrada em nosso estudo em relação a esse trabalho pode residir no tipo de neurônio utilizado em nossos experimentos que pertencem ao GCS situado no SNP. No entanto, alguns estudos indicam que neurônios do gânglio da raiz dorsal *in vitro* e neurônios simpáticos apoE $-/-$ também apresentam menos brotamentos neuríticos (Handelmann, Boyles et al. 1992; Maysinger, Holmes et al. 2008).

Maysinger e colaboradores indicam que o brotamento de neuritos induzido por NGF intracelular em animais apoE ^{-/-} pode ser bloqueado por algumas moléculas endógenas, entre elas as ceramidas, que são constituintes da membrana celular e atuam como segundo mensageiro de sinalização para lipídeos (de Chaves, Bussiere et al. 2001; Hannun and Obeid 2008; Maysinger, Holmes et al. 2008). Estudos anteriores apontam que a ceramida C, uma ceramida solúvel em água e análoga a ceramidas naturais, inibe o crescimento axonal em neurônios simpáticos *in vitro* (de Chaves, Bussiere et al. 1997). Acredita-se que os efeitos das ceramidas no brotamento de neuritos podem surgir, em parte, através da modulação que essa molécula exerce na concentração local, distribuição e dinâmica de proteínas/receptores da membrana plasmática presentes nas balsas de membrana (Chiantia, Kahya et al. 2006; Chiantia, Ries et al. 2008). Dessa forma, em nosso estudo, a investigação do mecanismo pelo qual a ausência da apoE resulta em maior brotamentos de neuritos primários precisa ser realizada.

Além dos dados relacionados à viabilidade neuronal, as culturas apoE ^{-/-} apresentaram maiores extensões neuríticas em relação às culturas WT, com diferença estatística no tempo de 12 horas após o plaqueamento. Sabemos que os principais efeitos da deaferenciação ocorrem no momento do plaqueamento e imediatamente após sob ação do NGF e dos sinais de cálcio derivados da ligação a este receptor, ocorrendo acelerada exocitose de vesículas de reparo nas membranas, que em seguida são seladas e iniciam a polarização em extensões neuríticas (Pandiella-Alonso, Malgaroli et al. 1986; Rehder, Jensen et al. 1992). No nosso estudo, esses efeitos parecem ter ocorrido de forma diferente entre os neurônios WT e apoE ^{-/-} e sido evidenciados apenas no tempo de 12 horas. No tempo posterior a 12 horas, as culturas se equipararam em termos de morfologia dos corpos neuronais, densidade da trama neurítica e aspecto dos mesmos, indicando provavelmente certo equilíbrio na taxa de manutenção das membranas neuronais ou outros mecanismos compensatórios (Arantes and Andrews 2006).

Estudos do efeito da apoE em dano de nervo periférico e em cultura de neurônios do SNC indicam que apoE pode influenciar no crescimento de neuritos e na plasticidade neuronal *in vivo* (Nathan, Bellosta et al. 1994) (Holtzman, Pitas et al. 1995) (Buttini, Orth et al. 1999) (Teter, Xu et al. 1999), atuando também como receptor na sinalização celular, alterando a fosforilação de diversas proteínas e afetando o

crescimento neurítico (Herz and Beffert 2000). Outros estudos demonstram que a apoE está envolvida em alterações na densidade de espinhas dendríticas em modelos animais e tecido humano (Ji, Gong et al. 2003). Em animais deficientes para apoE tem-se observado que o crescimento neurítico é diminuído durante o envelhecimento e na presença da isoforma 4, que é considerada fator de risco para doenças neurodegenerativas (Masliah, Mallory et al. 1995) (Strittmatter, Saunders et al. 1993). Baseado nessas e outras observações, a apoE tem sido implicada nos processos de reparo e/ou proteção de neurônios frente a lesões, embora os mecanismos envolvidos permaneçam ainda desconhecidos (Hayashi, Campenot et al. 2007). Além disso, estudos *in vitro* tem demonstrado que a apoE associada a lipoproteínas estimula o crescimento neurítico em diversos neurônios do SNC e SNP (Beffert, Danik et al. 1998) (Nathan, Jiang et al. 2002). No entanto, alguns estudos indicam que a regeneração de nervos periféricos ocorrem de forma semelhante entre animais apoE $-/-$ e controles (Popko, Goodrum et al. 1993; Goodrum, Bouldin et al. 1995; Gilbert and Murphy 2004). Masliah e colaboradores encontraram poucas sinapses, dendritos edemaciados e vacuolizados e a recuperação pós lesão foi prejudicada em animais apoE $-/-$ comparados com animais selvagens (Masliah, Mallory et al. 1995). Esses animais também apresentaram déficits cognitivos que puderam ser corrigidos com uma infusão de apoE nos ventrículos laterais do cérebro (Masliah, Samuel et al. 1997). Entretanto, outros estudos não observaram nenhuma neuropatologia evidente nesses animais (Anderson, Barnes et al. 1998). Estudos prévios indicam que embora a produção de apoE esteja aumentada após lesão no SNP em camundongos, a neuroregeneração ocorre mesmo na ausência da apoE. Esse fenômeno poderia ser explicado pela super produção de apoD e apoA-I (Boyles, Notterpek et al. 1990)

Em situação de lesão, após o rompimento de axônios, as terminações danificadas ficam expostas ao meio extracelular, portanto, o primeiro passo do processo de reparo axonal/regeneração é selar ou fechar as membranas danificadas num processo dependente de íons cálcio (Ziv and Spira 1993; Krause, Fishman et al. 1994; Spira, Dormann et al. 1996; Eddleman, Ballinger et al. 1997; Ziv and Spira 1997). Após o selamento do axônio, esse é rapidamente convertido em um cone de crescimento, cuja função é restabelecer conexões com alvos pós-sinápticos (Bloom and Morgan 2011).

Para avaliar a composição estrutural e a funcionalidade dos neuritos de animais WT e apoE *-/-* durante o processo de regeneração pós lesão, utilizamos marcadores bem estabelecidos na literatura: β -tubulina, uma proteína diretamente envolvida no processo de alongamento axonal (Yamada, Spooner et al. 1971; Menezes and Luskin 1994), PGP 9.5 (Almeida-Leite, Galvao et al. 2007), GAP-43 uma proteína associada ao crescimento neuronal, também denominada neuromodulina B-50, P-57, F1 e pp46 (Hoffman 1989), utilizada como marcador relacionado a regeneração em neurônios sensoriais (Song, Li et al. 2008) e LAMP-1 (Arantes and Andrews 2006). Ao investigarmos a expressão desses marcadores para a identificação do potencial regenerativo e alongamento dos neuritos, após a lesão gerada pela deafferenciação, demonstramos que as culturas WT e apoE *-/-* diferiram na expressão de GAP-43 e LAMP-1, mas não na expressão de β -tubulina e PGP 9.5. Esse resultado sugere que neurônios WT e apoE *-/-* conservaram suas características morfológicas e exibiram neuritos viáveis com varicosidades visíveis, evidente através da imunoreatividade para PGP 9.5. A expressão semelhante desses dois marcadores sugerem também que ambos os neurônios possuem uma composição estrutural similar e pode não estar relacionada à maior viabilidade e crescimento neurítico em animais apoE *-/-*.

Durante o processo de formação de cones de crescimento algumas proteínas associadas ao crescimento neurítico, denominadas GAPs, são mais abundantes em neurônios que apresentam cones de crescimento do que em neurônios que já estabeleceram suas conexões sinápticas. A GAP 43 é uma dessas proteínas de crescimento, produzida e transportada em grande quantidade durante o desenvolvimento e regeneração axonal, é também umas das principais proteínas que constituem a membrana derivada do cone de crescimento (Meiri, Willard et al. 1988). O aumento na expressão de GAP-43 é frequentemente usado como um marcador de regeneração neurítica ou do brotamento de axônio após dano traumático *in vivo* e também é indicador de sobrevivência neuronal *in vitro* (Anand, Otto et al. 2008; Nagamoto-Combs, Morecraft et al. 2010). Alguns estudos indicam que a expressão de GAP-43 é aumentada logo após lesão tecidual e que, momentos depois, a expressão retorna a níveis constitutivos. Li e colaboradores, 1998 descrevem que MAP-2 e GAP-43 são marcadores precoces e sensíveis de dano neuronal causado por isquemia (Li et al., 1998) e uma intensa expressão de GAP-43 foi detectada em células granulares do giro

denteado mesmo 3 horas após isquemia (Tagaya, Matsuyama et al. 1995). Os neurônios apoE^{-/-} apresentaram maior expressão de GAP-43 12 horas pós plaqueamento. Devido à ausência de apoE podemos inferir que a membrana desses neurônios seja menos estável e, portanto, mais fluida. Essas propriedades podem tornar a membrana mais suscetível ao dano, que, por sua vez, aumenta a expressão de GAP-43, que está associada à regeneração neurítica.

Alguns dos mecanismos envolvidos no reparo e no crescimento de axônios são semelhantes aos mecanismos que atuam no transporte de vesículas e liberação de neurotransmissores em axônios não lesados. Ambos os mecanismos envolvem cálcio, v-SNARES e t-SNARES, proteínas essenciais para a maquinaria molecular responsável pela fusão de membranas (Rothman 1994). Estudos anteriores demonstraram que compartimentos intracelulares contendo v-SNARES VAMP7 participam do transporte de membrana intracelular para os locais de alongamento neurítico (Martinez-Arca, Alberts et al. 2000; Martinez-Arca, Coco et al. 2001; Alberts, Rudge et al. 2003) (ROTHMAN, 1994). Arantes e Andrews, 2006 mostraram que VAMP7 e o marcador lisossomal LAMP-1 estão amplamente co-localizados em neurônios do GCS. A marcação positiva para LAMP-1 foi amplamente visualizada nos corpos celulares, aglomerados de vesículas e também na região distal dos neuritos (Arantes and Andrews 2006). A marcação para LAMP-1 em nosso estudo também foi abundante em corpos celulares, no entanto, não encontramos marcação nas regiões distais de crescimento neurítico nos tempos de 6 e 12 horas, diferente do observado pelos autores acima citados (Arantes and Andrews 2006) As culturas apoE^{-/-} apresentaram maior intensidade de fluorescência para LAMP-1 6 horas após plaqueamento, demonstrando que as vesículas LAMP-1 positivas podem participar de forma expressiva do processo de crescimento neurítico na ausência de apoE^{-/-}.

Nossos achados de maior número de neuritos primários e diâmetro do corpo neuronal 3 horas e maior número de células e extensão neurítica 12 horas após plaqueamento nos neurônios derivados de animais apoE^{-/-} indicam que, na ausência desta apolipoproteína, há maior adição de membranas derivadas de vesículas ou do sistema de endomembranas celular para reparar e selar a célula neuronal danificada pela diferenciação e traumas mecânicos e enzimáticos resultantes do seu isolamento. Nosso grupo já trabalhou com esta hipótese em um modelo similar ao nosso, no qual

demonstrou que, pelo menos em parte, uma fonte importante de membranas nestes fenômenos precoces eram as vesículas endossomais/lisossomais tardias, LAMP-1 positivas.

Investigamos a expressão de LAMP-1 em nossas preparações nos tempos de 6 e 12 horas e obtivemos maior intensidade de fluorescência, evidenciando maior expressão nos neurônios e cones de crescimento derivados de apoE^{-/-} quando comparados aos derivados de WT 6 horas após plaqueamento.

Nossos dados ainda são preliminares uma vez que não só as vesículas LAMP-1 positivas, mas todas as vesículas doadoras de membrana descritas em neurônios devem ser examinadas e comparadas entre os grupos. Não sabemos qual a porcentagem de outras apolipoproteínas presentes nos diversos compartimentos celulares neuronais nem se há diferenças na sua distribuição nos diferentes compartimentos e membranas derivadas. No entanto, seria importante detectar se esse fenômeno afeta indiscriminadamente membranas internas e externas no neurônio, o que poderia ter implicações na resistência a lesão e/ou na capacidade de reparo.

6 CONCLUSÃO

Nosso estudo evidenciou que na ausência da apoE os neurônios mostraram-se mais viáveis (maior número de neurônios e diâmetro do corpo neuronal) 3 horas após plaqueamento e com maior capacidade de crescimento neurítico 12 horas *in vitro*. Em relação a expressão de moléculas estruturais (β -tubulina e PGP 9.5) e funcionais (GAP-43 e LAMP-1) observamos que a apoE não interfere na expressão das moléculas estruturais; no entanto a expressão de GAP-43 e LAMP-1 são influenciadas por apoE, que tiveram sua expressão aumentada na ausência da mesma.

Em conjunto, nossos resultados demonstraram divergências quanto a outros trabalhos em relação ao crescimento neurítico e a sobrevivência de neurônios de animais apoE *-/-* e WT *in vitro*. Embora trabalhos em modelos animais e *in vitro* não possam ser transferidos diretamente para seres humanos, nossos resultados são relevantes para a compreensão dos mecanismos patogênicos das doenças neurodegenerativas e também abrem perspectivas para o desenvolvimento de formas de terapia.

7 ABSTRACT

Apolipoprotein E (apoE) is a plasma protein involved in the transport of hydrophobic molecules. In the nervous system, apoE is involved in the release of lipids and cholesterol, and can operate in the maintenance of neuronal membranes, which is essential for neuronal repair and / or remodeling during development and posttraumatic regeneration. The main objective of this study was to evaluate the involvement of apoE in neuronal viability maintenance and neurite outgrowth *in vitro*. Primary neuronal cultures were obtained from superior cervical ganglia (SCG) of C57BL/6 wild-type (WT) or apoE^{-/-} neonatal mice. Morphological aspects and quantification of total number of neurons and neurite length of WT and apoE^{-/-} cultures were comparatively evaluated. ApoE^{-/-} cultures showed greater number of neuronal bodies in comparison to WT cultures ($p < 0.05$) and greater neurite length at 12 hours after plating. Furthermore, both cultures showed immunopositivity to tubulin, PGP 9.5, GAP-43 and LAMP-1, these markers were used to establish structural and functional differences between WT and apoE^{-/-} neurons. Our data demonstrate that the survival rate and morphology of WT and apoE^{-/-} neurons are distinct *in vitro*, suggesting possible differences in post deafferentiation mechanism of regeneration, which is relevant for the study of neurodegenerative diseases.

Key words: neuron, neurite outgrowth, apoE, *in vitro*, primary culture

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Advani, R. J., B. Yang, et al. (1999). "VAMP-7 mediates vesicular transport from endosomes to lysosomes." J Cell Biol **146**(4): 765-776.
- Alberts, P., R. Rudge, et al. (2003). "Cross talk between tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion." Mol Biol Cell **14**(10): 4207-4220.
- Almeida-Leite, C. M., L. M. Galvao, et al. (2007). "Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by Trypanosoma cruzi-infected macrophages." Neurobiol Dis **25**(1): 170-178.
- Anand, U., W. R. Otto, et al. (2008). "Cytosine arabinoside affects the heat and capsaicin receptor TRPV1 localization and sensitivity in human sensory neurons." Journal of neurooncology **89**: 1-7.
- Anderson, R., J. C. Barnes, et al. (1998). "Behavioural, physiological and morphological analysis of a line of apolipoprotein E knockout mouse." Neuroscience **85**(1): 93-110.
- Andersson, M., F. Aberg, et al. (1995). "Age-dependent modifications in the metabolism of mevalonate pathway lipids in rat brain." Mech Ageing Dev **85**(1): 1-14.
- Andrews, N. W. and S. Chakrabarti (2005). "There's more to life than neurotransmission: the regulation of exocytosis by synaptotagmin VII." Trends Cell Biol **15**(11): 626-631.
- Andrews, T. J., C. Thrasivoulou, et al. (1996). "Target-specific differences in the dendritic morphology and neuropeptide content of neurons in the rat SCG during development and aging." The Journal of comparative neurology **368**(1): 33-44.
- Arantes, R. M. and N. W. Andrews (2006). "A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons." J Neurosci **26**(17): 4630-4637.
- Arantes, R. M., S. Lourenssen, et al. (2000). "Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages: a model of neuronal injury in vitro." Neuroreport **11**(1): 177-181.
- Aschner, M. and T. Syversen (2004). "Neurotoxicology: principles and considerations of in vitro assessment." Altern Lab Anim **32**(4): 323-327.
- Ashery, U., R. Penner, et al. (1996). "Acceleration of membrane recycling by axotomy of cultured aplasia neurons." Neuron **16**(3): 641-651.
- Beffert, U., M. Danik, et al. (1998). "The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease." Brain Res Brain Res Rev **27**(2): 119-142.
- Blennerhassett, M. G. and J. Bienenstock (1998). "Sympathetic nerve contact causes maturation of mast cells in vitro." J Neurobiol **35**(2): 173-182.
- Bloom, O. E. and J. R. Morgan (2011). "Membrane trafficking events underlying axon repair, growth, and regeneration." Mol Cell Neurosci **48**(4): 339-348.

- Borghini, I., F. Barja, et al. (1995). "Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid." Biochim Biophys Acta **1255**(2): 192-200.
- Boyles, J. K., L. M. Notterpek, et al. (1990). "Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I." J Biol Chem **265**(29): 17805-17815.
- Boyles, J. K., R. E. Pitas, et al. (1985). "Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system." J Clin Invest **76**(4): 1501-1513.
- Buttini, M., M. Orth, et al. (1999). "Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration." J Neurosci **19**(12): 4867-4880.
- Champagne, D., J. Rochford, et al. (2005). "Effect of apolipoprotein E deficiency on reactive sprouting in the dentate gyrus of the hippocampus following entorhinal cortex lesion: role of the astroglial response." Exp Neurol **194**(1): 31-42.
- Chen, Y., L. Lomnitski, et al. (1997). "Motor and cognitive deficits in apolipoprotein E-deficient mice after closed head injury." Neuroscience **80**(4): 1255-1262.
- Chiantia, S., N. Kahya, et al. (2006). "Effects of ceramide on liquid-ordered domains investigated by simultaneous AFM and FCS." Biophys J **90**(12): 4500-4508.
- Chiantia, S., J. Ries, et al. (2008). "Role of ceramide in membrane protein organization investigated by combined AFM and FCS." Biochim Biophys Acta **1778**(5): 1356-1364.
- Chiba, T. and T. H. Williams (1975). "Histofluorescence characteristics and quantification of small intensely fluorescent (SIF) cells in sympathetic ganglia of several species." Cell Tissue Res **162**(3): 331-341.
- Comley, L. H., H. R. Fuller, et al. (2011). "ApoE isoform-specific regulation of regeneration in the peripheral nervous system." Hum Mol Genet **20**(12): 2406-2421.
- D'Esposito, M., A. Ciccodicola, et al. (1996). "A synaptobrevin-like gene in the Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation." Nat Genet **13**(2): 227-229.
- Datta, S., W. H. Li, et al. (1987). "Structure and expression of dog apolipoprotein C-II and C-III mRNAs. Implications for the evolution and functional constraints of apolipoprotein structure." J Biol Chem **262**(22): 10588-10593.
- Day, J. R., J. J. Albers, et al. (1994). "Purification and molecular cloning of human apolipoprotein F." Biochem Biophys Res Commun **203**(2): 1146-1151.
- de Chaves, E. I., M. Bussiere, et al. (1997). "Elevation of ceramide within distal neurites inhibits neurite growth in cultured rat sympathetic neurons." J Biol Chem **272**(5): 3028-3035.
- de Chaves, E. P., M. Bussiere, et al. (2001). "Ceramide inhibits axonal growth and nerve growth factor uptake without compromising the viability of sympathetic neurons." J Biol Chem **276**(39): 36207-36214.
- Dent, E. W., S. L. Gupton, et al. (2011). "The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(3).
- Eddleman, C. S., M. L. Ballinger, et al. (1997). "Repair of plasmalemmal lesions by vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4745-4750.

- Elshourbagy, N. A., D. W. Walker, et al. (1986). "The nucleotide and derived amino acid sequence of human apolipoprotein A-IV mRNA and the close linkage of its gene to the genes of apolipoproteins A-I and C-III." J Biol Chem **261**(5): 1998-2002.
- Erez, H., G. Malkinson, et al. (2007). "Formation of microtubule-based traps controls the sorting and concentration of vesicles to restricted sites of regenerating neurons after axotomy." J Cell Biol **176**(4): 497-507.
- Fagan, A. M. and D. M. Holtzman (2000). "Astrocyte lipoproteins, effects of apoE on neuronal function, and role of apoE in amyloid-beta deposition in vivo." Microsc Res Tech **50**(4): 297-304.
- Fujimoto, K., K. Fukagawa, et al. (1993). "Suppression of food intake by apolipoprotein A-IV is mediated through the central nervous system in rats." J Clin Invest **91**(4): 1830-1833.
- Galli, T., A. Zahraoui, et al. (1998). "A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells." Mol Biol Cell **9**(6): 1437-1448.
- Gibbins, I. L. (1992). "Vasoconstrictor, vasodilator and pilomotor pathways in sympathetic ganglia of guinea-pigs." Neuroscience **47**(3): 657-672.
- Gilbert, P. E. and C. Murphy (2004). "The effect of the ApoE epsilon4 allele on recognition memory for olfactory and visual stimuli in patients with pathologically confirmed Alzheimer's disease, probable Alzheimer's disease, and healthy elderly controls." J Clin Exp Neuropsychol **26**(6): 779-794.
- Goodrum, J. F., T. W. Bouldin, et al. (1995). "Nerve regeneration and cholesterol reutilization occur in the absence of apolipoproteins E and A-I in mice." J Neurochem **64**(1): 408-416.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(7): 2424-2428.
- Hamburger, V. (1993). "The history of the discovery of the nerve growth factor." J Neurobiol **24**(7): 893-897.
- Handelmann, G. E., J. K. Boyles, et al. (1992). "Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro." J Lipid Res **33**(11): 1677-1688.
- Hannun, Y. A. and L. M. Obeid (2008). "Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 139-150.
- Hashikawa-Hobara, N., N. Hashikawa, et al. (2011). "The Akt-nitric oxide-cGMP pathway contributes to nerve growth factor-mediated neurite outgrowth in apolipoprotein E knockout mice." J Pharmacol Exp Ther **338**(2): 694-700.
- Hayashi, H., R. B. Campenot, et al. (2007). "Apolipoprotein E-containing lipoproteins protect neurons from apoptosis via a signaling pathway involving low-density lipoprotein receptor-related protein-1." J Neurosci **27**(8): 1933-1941.
- Hedger, J. H. and R. H. Webber (1976). "Anatomical study of the cervical sympathetic trunk and ganglia in the albino rat (*Mus norvegicus albinus*)." Acta Anat (Basel) **96**(2): 206-217.
- Herz, J. and U. Beffert (2000). "Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **1**(1): 51-58.

- Hinder, L. M., A. M. Vincent, et al. (2012). "Apolipoprotein E knockout as the basis for mouse models of dyslipidemia-induced neuropathy." Exp Neurol **239C**: 102-110.
- Hoffman, P. N. (1989). "Expression of GAP-43, a rapidly transported growth-associated protein, and class II beta tubulin, a slowly transported cytoskeletal protein, are coordinated in regenerating neurons." J Neurosci **9**(3): 893-897.
- Holtzman, D. M., R. E. Pitas, et al. (1995). "Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9480-9484.
- Ji, Y., Y. Gong, et al. (2003). "Apolipoprotein E isoform-specific regulation of dendritic spine morphology in apolipoprotein E transgenic mice and Alzheimer's disease patients." Neuroscience **122**(2): 305-315.
- Jonakait, G. M. (1993). "Neural-immune interactions in sympathetic ganglia." Trends Neurosci **16**(10): 419-423.
- Kandel, E., J. Schwartz, et al. (2000). Principles of neuroscience, McGraw-Hill Companies, Incorporated.
- Katz, M. A., T. Barrette, et al. (1992). "Hydraulic conductivity of basement membrane with computed values for fiber radius and void volume ratio." Am J Physiol **263**(5 Pt 2): H1417-1421.
- Kleinman, H. K., J. Graf, et al. (1987). "Role of basement membranes in cell differentiation." Ann N Y Acad Sci **513**: 134-145.
- Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, et al. (1982). "Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma." Biochemistry **21**(24): 6188-6193.
- Ko, C. P. and H. Burton (1976). "Synaptic transmission between rat superior cervical ganglion neurons in dissociated cell cultures." Brain Research **117**(3): 461-485.
- Koike, T. and S. Tanaka (1991). "Evidence that nerve growth factor dependence of sympathetic neurons for survival in vitro may be determined by levels of cytoplasmic free Ca²⁺." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3892-3896.
- Kosacka, J., M. Gericke, et al. (2009). "Apolipoproteins D and E3 exert neurotrophic and synaptogenic effects in dorsal root ganglion cell cultures." Neuroscience **162**(2): 282-291.
- Koudinov, A. R., N. V. Koudinova, et al. (1996). "Biochemical characterization of Alzheimer's soluble amyloid beta protein in human cerebrospinal fluid: association with high density lipoproteins." Biochem Biophys Res Commun **223**(3): 592-597.
- Krause, T. L., H. M. Fishman, et al. (1994). "Extent and mechanism of sealing in transected giant axons of squid and earthworms." J Neurosci **14**(11 Pt 1): 6638-6651.
- Laerum, O. D., S. Steinsvag, et al. (1985). "Cell and tissue culture of the central nervous system: recent developments and current applications." Acta Neurol Scand **72**(6): 529-549.
- Lent, R. (2008). Neurociência da Mente e do Comportamento. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

- Lindh, B., J. M. Lundberg, et al. (1989). "NPY-, galanin-, VIP/PHI-, CGRP- and substance P-immunoreactive neuronal subpopulations in cat autonomic and sensory ganglia and their projections." Cell Tissue Res **256**(2): 259-273.
- Lonchamp, E., J. L. Dupont, et al. (2006). "The mouse cerebellar cortex in organotypic slice cultures: an in vitro model to analyze the consequences of mutations and pathologies on neuronal survival, development, and function." Crit Rev Neurobiol **18**(1-2): 179-186.
- Lowery, L. A. and D. Van Vactor (2009). "The trip of the tip: understanding the growth cone machinery." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(5): 332-343.
- Madariaga-Domich, A. and J. Taxi (1986). "A comparative and quantitative study of small intensely fluorescent (SIF) cells in the sympathetic ganglia of some small mammals." Arch Anat Microsc Morphol Exp **75**(1): 1-17.
- Martin, D. P., R. E. Schmidt, et al. (1988). "Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation." J Cell Biol **106**(3): 829-844.
- Martinez-Arca, S., P. Alberts, et al. (2000). "Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth." J Cell Biol **149**(4): 889-900.
- Martinez-Arca, S., S. Coco, et al. (2001). "A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth." J Neurosci **21**(11): 3830-3838.
- Masliah, E., M. Mallory, et al. (1995). "Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice." Exp Neurol **136**(2): 107-122.
- Masliah, E., W. Samuel, et al. (1997). "Neurodegeneration and cognitive impairment in apoE-deficient mice is ameliorated by infusion of recombinant apoE." Brain Res **751**(2): 307-314.
- Masliukov, P. M. and J. P. Timmermans (2004). "Immunocytochemical properties of stellate ganglion neurons during early postnatal development." Histochem Cell Biol **122**(3): 201-209.
- Maysinger, D., M. Holmes, et al. (2008). "Ceramide is responsible for the failure of compensatory nerve sprouting in apolipoprotein E knock-out mice." J Neurosci **28**(31): 7891-7899.
- McGuire, P. G. and N. W. Seeds (1989). "The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells." J Cell Biochem **40**(2): 215-227.
- Meiri, K. F., M. Willard, et al. (1988). "Distribution and phosphorylation of the Growth-Associated Protein GAP-43 in regenerating sympathetic neurons in culture." The journal of neuroscience **8**(7): 2571-2581.
- Menezes, J. R. and M. B. Luskin (1994). "Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon." J Neurosci **14**(9): 5399-5416.
- Mensenkamp, A. R., M. C. Jong, et al. (1999). "Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver." J Biol Chem **274**(50): 35711-35718.
- Morris, J. L., I. L. Gibbins, et al. (1989). "Galanin-like immunoreactivity in sympathetic and parasympathetic neurons of the toad *Bufo marinus*." Neurosci Lett **102**(2-3): 142-148.

- Nagamoto-Combs, K., R. J. Morecraft, et al. (2010). "Long-term gliosis and molecular changes in the cervical spinal cord of the rhesus monkey after traumatic brain injury." Journal of neurotrauma **27**: 565-585.
- Namba, Y., H. Tsuchiya, et al. (1992). "Apolipoprotein B immunoreactivity in senile plaque and vascular amyloids and neurofibrillary tangles in the brains of patients with Alzheimer's disease." Neurosci Lett **134**(2): 264-266.
- Nathan, B. P., S. Bellosta, et al. (1994). "Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro." Science **264**(5160): 850-852.
- Nathan, B. P., Y. Jiang, et al. (2002). "Apolipoprotein E4 inhibits, and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult mouse cortical neurons through the low-density lipoprotein receptor-related protein." Brain Res **928**(1-2): 96-105.
- Pak, C. W., K. C. Flynn, et al. (2008). "Actin-binding proteins take the reins in growth cones." Nat Rev Neurosci **9**(2): 136-147.
- Pandiella-Alonso, A., A. Malgaroli, et al. (1986). "Early rise of cytosolic Ca²⁺ induced by NGF in PC12 and chromaffin cells." FEBS Lett **208**(1): 48-51.
- Pitas, R. E., J. K. Boyles, et al. (1987). "Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins." Biochim Biophys Acta **917**(1): 148-161.
- Pitas, R. E., J. K. Boyles, et al. (1987). "Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain." J Biol Chem **262**(29): 14352-14360.
- Plump, A. S., J. D. Smith, et al. (1992). "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells." Cell **71**(2): 343-353.
- Poirier, J., A. Baccichet, et al. (1993). "Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats." Neuroscience **55**(1): 81-90.
- Popko, B., J. F. Goodrum, et al. (1993). "Nerve regeneration occurs in the absence of apolipoprotein E in mice." J Neurochem **60**(3): 1155-1158.
- Prager-Khoutorsky, M. and M. E. Spira (2009). "Neurite retraction and regrowth regulated by membrane retrieval, membrane supply, and actin dynamics." Brain Res **1251**: 65-79.
- Prochiantz, A. (1995). "Neuronal polarity: giving neurons heads and tails." Neuron **15**(4): 743-746.
- Purves, D., G. J. Augustine, et al. (2001). Neuroscience, Sinauer Associated.
- Puttfarcken, P. S., A. M. Manelli, et al. (1997). "Effect of apolipoprotein E on neurite outgrowth and beta-amyloid-induced toxicity in developing rat primary hippocampal cultures." J Neurochem **68**(2): 760-769.
- Rao, S. K., C. Huynh, et al. (2004). "Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis." J Biol Chem **279**(19): 20471-20479.
- Rehder, V., J. R. Jensen, et al. (1992). "The initial stages of neural regeneration are dependent upon intracellular calcium levels." Neuroscience **51**(3): 565-574.

- Reynolds, C. P. and J. R. Perez-Polo (1981). "Induction of neurite outgrowth in the IMR-32 human neuroblastoma cell line by nerve growth factor." J Neurosci Res **6**(3): 319-325.
- Robinson, P. J. and S. I. Rapoport (1989). "A method for examining turnover and synthesis of palmitate-containing brain lipids in vivo." Clin Exp Pharmacol Physiol **16**(9): 701-714.
- Roheim, P. S., M. Carey, et al. (1979). "Apolipoproteins in human cerebrospinal fluid." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4646-4649.
- Roivainen, R. and J. Koistinaho (1996). "Histochemical detection of age- and injury-related changes in signal transduction in the superior cervical ganglion." Microsc Res Tech **35**(1): 20-31.
- Rothman, J. E. (1994). "Mechanisms of intracellular protein transport." Nature **372**(6501): 55-63.
- Salen, G., V. Berginer, et al. (1987). "Increased concentrations of cholestanol and apolipoprotein B in the cerebrospinal fluid of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. Effect of chenodeoxycholic acid." N Engl J Med **316**(20): 1233-1238.
- Simonet, W. S., N. Bucay, et al. (1991). "Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice." J Biol Chem **266**(14): 8651-8654.
- Smith, K. M., R. M. Lawn, et al. (1990). "Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization." J Lipid Res **31**(6): 995-1004.
- Snell, R. S. (1997). Clinical neuroanatomy for medical students. EUA, Lippincott-Raven.
- Song, X. Y., F. Li, et al. (2008). "Peripherally-derived BDNF promotes regeneration of ascending sensory neurons after spinal cord injury." PLoS One **3**(3): e1707.
- Souza, C. C. (2007). Aspectos da interação parasito-hospedeiro na infecção *in vitro* de microgliócitos por *Leishmania major*. Mestrado Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Spira, M. E., A. Dormann, et al. (1996). "Use of Aplysia neurons for the study of cellular alterations and the resealing of transected axons in vitro." J Neurosci Methods **69**(1): 91-102.
- Stoffel, W. (1984). "Synthesis, transport, and processing of apolipoproteins of high density lipoproteins." J Lipid Res **25**(13): 1586-1592.
- Stoll, G., H. W. Mueller, et al. (1989). "Oligodendrocytes but not astrocytes express apolipoprotein E after injury of rat optic nerve." Glia **2**(3): 170-176.
- Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, et al. (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 1977-1981.
- Tagaya, M., T. Matsuyama, et al. (1995). "Increased F1/GAP-43 mRNA accumulation in gerbil hippocampus after brain ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **15**(6): 1132-1136.
- Teter, B., P. T. Xu, et al. (1999). "Human apolipoprotein E isoform-specific differences in neuronal sprouting in organotypic hippocampal culture." J Neurochem **73**(6): 2613-2616.

- Tiffany-Castiglioni, E. (1993). "Cell culture models for lead toxicity in neuronal and glial cells." Neurotoxicology **14**(4): 513-536.
- Tolkovsky, A. M., A. E. Walker, et al. (1990). "Ca²⁺ transients are not required as signals for long-term neurite outgrowth from cultured sympathetic neurons." J Cell Biol **110**(4): 1295-1306.
- Tuck, E. and V. Cavalli (2010). "Roles of membrane trafficking in nerve repair and regeneration." Commun Integr Biol **3**(3): 209-214.
- Verghese, P. B., J. M. Castellano, et al. (2011). "Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders." Lancet Neurol **10**(3): 241-252.
- Wakshull, E. and M. I. Johnson (1979). "Postnatal rat sympathetic neurons in culture II Synaptic transmission by postnatal neurons." Journal of Neurophysiology **42**(5): 1426-1436.
- Wang, Z. Y., T. Miki, et al. (2011). "A high cholesterol diet given to apolipoprotein E-knockout mice has a differential effect on the various neurotrophin systems in the hippocampus." Metab Brain Dis **26**(3): 185-194.
- Wilhelmus, M. M., J. G. Bol, et al. (2011). "Apolipoprotein E and LRP1 Increase Early in Parkinson's Disease Pathogenesis." Am J Pathol **179**(5): 2152-2156.
- Winckler, B. and I. Mellman (2010). "Trafficking guidance receptors." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(7): a001826.
- Yamada, K. M., B. S. Spooner, et al. (1971). "Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells." J Cell Biol **49**(3): 614-635.
- Yeagle, P. L. (1989). "Lipid regulation of cell membrane structure and function." FASEB J **3**(7): 1833-1842.
- Zhang, K. J., H. L. Zhang, et al. (2011). "Apolipoprotein E isoform-specific effects on cytokine and nitric oxide production from mouse Schwann cells after inflammatory stimulation." Neurosci Lett **499**(3): 175-180.
- Zhang, S. H., R. L. Reddick, et al. (1992). "Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E." Science **258**(5081): 468-471.
- Zhou, F. Q. and W. D. Snider (2006). "Intracellular control of developmental and regenerative axon growth." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1473): 1575-1592.
- Zhou, T., B. Xu, et al. (2006). "Neurons derived from PC12 cells have the potential to develop synapses with primary neurons from rat cortex." Acta Neurobiol Exp (Wars) **66**(2): 105-112.
- Ziv, N. E. and M. E. Spira (1993). "Spatiotemporal distribution of Ca²⁺ following axotomy and throughout the recovery process of cultured Aplysia neurons." Eur J Neurosci **5**(6): 657-668.
- Ziv, N. E. and M. E. Spira (1997). "Localized and transient elevations of intracellular Ca²⁺ induce the dedifferentiation of axonal segments into growth cones." J Neurosci **17**(10): 3568-3579.

9 ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 255/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Investigando a participação da apolipoproteína E nos processos de lesão e reparo neuronal in vitro**", que tem como responsável(is) **Rosa Maria Esteves Arantes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/ 12/2008**.

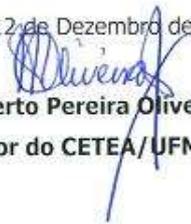
Este certificado expira-se em **10/ 12/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 255/2008**, related to the project entitled "**Participation of apolipoprotein E in the processes of injury and neuronal repair in vitro**", under the supervisors of **Rosa Maria Esteves Arantes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 10, 2008**.

This certificate expires in **December 10, 2013**.

Belo Horizonte, 12 de Dezembro de 2008.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpq@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LUÍZA DA SILVA MIRANDA, nº de registro 2011857452. Às quatorze horas do dia 27 de fevereiro de dois mil e treze, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA APOLIPOPROTEÍNA-E NO CRESCIMENTO NEURÍTICO EM CULTURAS PRIMÁRIAS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR DE ANIMAIS WT E ApoE -/-.", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Investigativa. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Rosa Maria Esteves Arantes, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes/Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>quarda</u>
Profa. Camila Megale de Almeida Leite/Coorientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Cristina Guatimosim Fonseca	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Milene Alvarenga Rachid	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada aprovada.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2013.

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes Rosa Maria Esteves Arantes

Profa. Camila Megale de Almeida Leite Camila Leite

Profa. Cristina Guatimosim Fonseca Cristina Guatimosim Fonseca

Profa. Milene Alvarenga Rachid Milene Rachid

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes (Coordenadora) Rosa Maria Esteves Arantes

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina / UFMG



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpq@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelas professoras doutoras: Rosa Maria Esteves Arantes, Camila Megale de Almeida Leite, Cristina Guatimosim Fonseca e Milene Alvarenga Rachid, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA APOLIPOPROTEÍNA-E NO CRESCIMENTO NEURÍTICO EM CULTURAS PRIMÁRIAS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR DE ANIMAIS WT E ApoE -/-”**, apresentada pela mestrand **LUÍZA DA SILVA MIRANDA**, para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Investigativa, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 27 de fevereiro de 2013.

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes
Orientadora

Profa. Camila Megale de Almeida Leite
Coorientadora

Profa. Cristina Guatimosim Fonseca

Profa. Milene Alvarenga Rachid

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina / UFMG