

SÍLVIA APARECIDA TEIXEIRA

**EXPRESSÃO DE LIGANTES DA LECTINA KM⁺
DURANTE A ONTOGÊNESE CEREBELAR DO RATO**

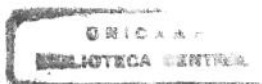
Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Bióloga Sílvia Aparecida Teixeira.

Campinas, 30 de julho de 2001.



Prof. Dr. Antonio Roberto Martins
- Orientador -

CAMPINAS
2001



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

SÍLVIA APARECIDA TEIXEIRA

**EXPRESSÃO DE LIGANTES DA LECTINA KM⁺
DURANTE A ONTOGÊNESE CEREBELAR DO RATO**

*Dissertação de mestrado apresentada
à Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
do título de mestre em Farmacologia.*

**Prof. Dr. Antonio Roberto Martins
Orientador**

**CAMPINAS
2001**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

T235e

Teixeira, Silvia Aparecida

Expressão de ligantes da lectina KM⁺ durante a ontogênese cerebelar do rato / Silvia Aparecida Teixeira. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Antonio Roberto Martins

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Glicoproteínas. 2. Lectinas. 3. Cerebelo. I. Antonio Roberto Martins .II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Roberto Martins

Membros:

1. Prof. Dr. Antonio Roberto Martins

2. Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

3. Profa. Dra. Heloísa Helena de Araújo Ferreira

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30 /07/2001

200519261

*A meus pais, José e Alvarina,
e a Ronildo, por tudo*

AGRADECIMENTOS

É com alegria que expresso aqui meu reconhecimento a todos aqueles que me encorajaram, aconselharam e guiaram no curso de minhas pesquisas.

Minha gratidão vai particularmente para:

Antonio Roberto Martins, Professor Doutor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, que me acolheu em seu laboratório e me formou nas exigências da pesquisa em farmacologia. Sempre encontrei nele a mais afetuosa solicitude.

Wirla Maria S. C. Tamashiro, Professora Doutora do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia/UNICAMP, Heloísa Helena de Araújo Ferreira, Professora Doutora do Centro de Ciências Biológicas da Saúde e Curso de Medicina da Universidade São Francisco, Edson Antunes, Livre Docente do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, José Camillo Novello, Professor Doutor do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia/UNICAMP, e Fernando Morgan A. Corrêa, Professor Doutor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, que generosamente fizeram observações e sugestões, das quais tirei o maior proveito.

Maria Cristina Roque-Barreira, Professora Doutora do Departamento de Imunologia e Microbiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, e João Pereira Leite, Professor Doutor do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela gentileza e cordialidade que sempre me testemunharam.

Mariano S. Viapiano, pós-doutorando em farmacologia na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, que de boa vontade me fez beneficiar da sua alta competência em matéria de bioquímica.

Márcio Oliveira, Alina Ozório, Cesar Zanella, Fabíola Zucchi, Ludmyla Kandatravicius, Ana Maria Anselmi e Hildeberto Costa, com os quais tive o privilégio de trabalhar, pelo companheirismo e dificuldades compartilhadas.

Maria da Penha e funcionários do laboratório de Documentação Científica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pela atenção dispensada no processamento de todo o material fotográfico utilizado.

Expresso igualmente meu reconhecimento a Wanderlei da Cunha Claro e José Waldik Ramon, respectivamente funcionários dos departamentos de farmacologia da FCM/UNICAMP e da FMRP/USP, dos quais tive oportunidade de, não poucas vezes, abusar da competência e paciência na lida com os procedimentos burocráticos inerentes a um trabalho como este.

A FAPESP me concedeu uma bolsa de estudos, sem a qual eu não teria condições de dispor do tempo necessário às minhas pesquisas. O CNPq e a Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da FMRP, forneceram verbas que possibilitaram a compra de material específico e o pagamento de serviços técnicos. A estes também gostaria de deixar registrada minha gratidão.

S.A.T.

*“Aquele que toma minhas plantas
meramente para sentir-lhes o odor não as conhece
nem aquele que as colhe para estudar-lhes o teor”*

Hölderlin

ÍNDICE

RESUMO

INTRODUÇÃO 27

REVISÃO DA LITERATURA

- O Córtex cerebelar 29
- Desenvolvimento do Córtex Cerebelar 29
- Matriz Extracelular 30
- Reconhecimento Celular 34
- Lectinas 34
- Jacalina e KM^+ 35

OBJETIVOS 41

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Lectina KM^+ purificada por cromatografia de afinidade 45
 - 1.1. Análise da homogeneidade da preparação de KM^+ em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE) 46
 - 1.2. Biotinilação da lectina KM^+ 46
 - 1.3. Análise eletroforética da KM^+ biotinilada 47
2. Animais 48
 - 2.1. Obtenção de espécimens cerebelares 48
 - 2.2. Análise morfológica de secções coradas pelo método de Hematoxilina-eosina 49
3. Recuperação de ligantes 49
 - 3.1. Histoquímica para ligantes de KM^+ 50
 - 3.2. Análise da especificidade de ligação de KM^+ ao tecido cerebelar 51
 - 3.3. Análise semi-quantitativa da detecção de ligantes de KM^+ : determinação dos valores de cinza 51
4. Preparação de amostras de homogeneizados de tecido nervoso 52
 - 4.1. Dosagem de proteínas 53
 - 4.2. Preparação de amostras de tecido nervoso, sob condições desnaturantes e Redutoras (SDS-PAGE) 53
 - 4.3. Eletrotransferência 54
 - 4.4. Detecção de ligantes de KM^+ em membranas de nitrocelulose –

“Western blot”	54
5. Análise da especificidade da reação de biotínil- KM^+ em membrana de nitrocelulose	55
6. Detecção de laminina em imunoblot utilizando anticorpo anti-laminina	55
6.1. Detecção de laminina e ligantes de KM^+ em imunoblot utilizando biotínil- KM^+	56
6.2. Quantificação de bandas detectadas por reação de Western blot e analisadas por densitometria	56

RESULTADOS

1. Purificação e biotinilação da lectina KM^+	59
2. Padronização do nível de seccionamento do cerebelo de rato durante a ontogênese cerebelar usando coloração por hematoxilina-eosina	60
3. Padronização do ensaio histoquímico para detecção de ligantes de KM^+ em secções cerebelares de rato	61
3.1. Efeito do desmascaramento de sítios de ligação de KM^+	61
3.2. Padronização do tempo de reação da fosfatase alcalina para detecção de ligantes de KM^+	62
3.3. Efeito da concentração de biotínil- KM^+ sobre a intensidade de marcação de ligantes de KM^+ em secções cerebelares	63
4. Localização histoquímica de ligantes de KM^+ no cerebelo de rato adulto	64
5. Efeito de açúcares sobre a interação de KM^+ com estruturas córtico-cerebelares de rato adulto	64
6. Localização histoquímica de ligantes de KM^+ durante o período pré-natal	65
6.1. Ligantes de KM^+ expressos em células de Purkinje	66
7. Localização histoquímica de ligantes da lectina durante o período pós-natal da corticogênese cerebelar	67
7.1. Camada germinativa externa	67
7.2. Camada molecular	67
7.3. Camada de células de Purkinje	67
7.4. Camada granular	68
7.5. Substância branca	68
7.6. Expressão de ligantes da lectina KM^+ em vasos	69
7.7. Ligantes da lectina KM^+ foram detectados no plexo coróide	69
8. Análise quantitativa da expressão de ligantes de KM^+ durante a ontogênese por valores de cinza	70
8.1. Efeito de açúcares na interação de KM^+ com seus ligantes durante o desenvolvimento cerebelar	70
9. Análise da expressão de ligantes de KM^+ durante a ontogênese cerebelar por Western blot	72
11. Expressão de laminina durante a ontogênese cerebelar do rato	73
12. DISCUSSÃO	77

13. CONCLUSÕES	89
14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
15. SUMMARY	173

LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BSA: albumina bovina
CAM: molécula de adesão celular
Con A: concanavalina A
CP: plexo coróide
CRD: domínio de reconhecimento de carboidrato
DOI: densidade óptica integrada
DOR: densidade óptica relativa
ECM: matriz extracelular
EDTA: etilenodiaminatetracetato de sódio
EGL: camada germinativa externa
EHS: Engelbreth-Holm-Swarm
Gal: galactose
GL: camada granular
Gli: glicose
GT: trigono germinativo
GV: valores de cinza
HE: hematoxilina-eosina
HRP: peroxidase de rábano
if: camada fibrosa
Man: manose
MOL: camada molecular
MPA: aglutinina *Maclura pomifera*
MZ: zona migratória
NBT: nitro-blue-tetrazolium
NE: neuroepitélio
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
PCL: camada de células de Purkinje
PG: paraformaldeído-glutaraldeído
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila
PZ: zona pré-migratória
SDS: dodecil sulfato de sódio
SNC: sistema nervoso central
SP: superfície pial
SV: zona subventricular
Tris: Tris(hidroximetil)aminodiamina
VZ: zona ventricular
WM: substância branca

LISTA DE FIGURAS

Tabela 1: Valores de cinza tomados das diferentes camadas cerebelares.....	93
Figura 1: Purificação da lectina KM^+ por cromatografia de afinidade	95
Figura 2: Análise eletroforética da lectina KM^+ purificada	97
Figura 3: Eletroforese da lectina KM^+ biotinilada.....	99
Figura 4: Padronização do nível de seccionamento do cerebelo de rato - pré-natal..	101
Figura 5: Padronização do nível de seccionamento do cerebelo de rato - pós-natal .	103
Figura 6: Efeito do tratamento das secções cerebelares em microondas	105
Figura 7: Intensidade de marcação de secções cerebelares por biotinil- KM^+ em função do tempo de reação da enzima fosfatase alcalina.....	107
Figura 8: Interação entre tipo e intensidade aparente de marcação	109
Figura 9: Relação entre o tempo de reação e valores de cinza para as diferentes camadas e tipos celulares	111
Figura 10: Relação entre concentração de biotinil- KM^+ e valores de cinza para as diferentes camadas e tipos celulares	113
Figura 11: Efeito de açúcares sobre a ligação de KM^+ às secções cerebelares	115
Figura 12: Efeito da concentração de manose e metil- α -Dmanopiranosídeo sobre a ligação de KM^+ às secções cerebelares.....	117
Figura 13: Localização histoquímica de ligantes de KM^+ no cerebelo embrionário. .	119
Figura 14: Localização histoquímica de ligantes de KM^+ no cerebelo de E15	121
Figura 15: Expressão de ligantes de KM^+ no córtex cerebral de E18	123
Figura 16: Expressão de ligantes de KM^+ no cerebelo de rato no estágio pós-natal. .	125
Figura 17: Expressão de ligantes de KM^+ na EGL.....	127
Figura 18: Expressão de ligantes de KM^+ na PCL	129
Figura 19: Expressão de ligantes de KM^+ na GL	131
Figura 20: Localização histoquímica de ligantes de KM^+ na plexo coróide.....	133
Figura 21: Análise semi-quantitativa da expressão de ligantes de KM^+ na ontogênese cerebelar.....	135
Figura 22: Efeito de açúcares na interação da lectina KM^+ às secções cerebelares de ratos do estágio embrionário	137
Figura 23: Antagonismo da ligação de KM^+	139
Figura 24: Análise semi-quantitativa do efeito inibitório de açúcares na ligação de KM^+ às diferentes camadas cerebelares	141
Figura 25: Detecção de ligantes de KM^+ usando Western blot	143
Figura 26: Expressão diferencial de ligantes de KM^+ , análise densitométrica	145
Figura 27: Análise eletroforética das frações particulada e solúvel de cerebelo.....	147
Figura 28: Expressão diferencial de glicoproteínas ligantes de KM^+ presentes na fração particulada, análise densitométrica.....	149
Figura 29: Expressão diferencial de glicoproteínas ligantes de KM^+ presentes na fração solúvel, análise densitométrica.....	151
Figura 30: Caracterização de glicoproteína ligante de KM^+	153
Figura 31: Expressão de laminina em encéfalo e cerebelo de rato.....	155
Figura 32: Reconhecimento de componentes glicosilados de alto peso molecular pela lectina KM^+	157

RESUMO

RESUMO

Lectinas são proteínas ligantes de carboidratos de origem não imune, que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. Sua abundância na natureza e a facilidade de serem obtidas fez com que passassem a ser utilizadas como ferramentas valiosas para detecção, isolamento e caracterização de glicoproteínas solúveis ou de membrana. Seu uso tem permitido detectar glicoproteínas envolvidas nas diferentes etapas do desenvolvimento. Na neurogênese cerebelar, por exemplo, lectinas têm sido usadas para detectar e diferenciar componentes moleculares envolvidos nos processos de proliferação, diferenciação, migração celular e formação sináptica. Poderíamos citar, como exemplo típico dessas ferramentas, a lectina KM^+ , extraída da semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*), recentemente purificada que apresenta especificidade para D(+)-mannose e propriedade de induzir a migração de neutrófilo por mecanismos haptotático. Seus ligantes têm sido identificados na superfície e no citoplasma de células endoteliais, na superfície de células epiteliais alveolares, na membrana basal e no tecido conjuntivo intersticial de pulmão de rato.

No presente trabalho, a KM^+ foi usada como uma ferramenta nova para identificar glicoconjugados no tecido nervoso. No cerebelo de rato, ligantes dessa lectina foram estudados usando histoquímica e Western blotting, para determinar sua expressão espaço-temporal durante a ontogenia cerebelar, assim como a sua identidade.

Os resultados obtidos indicam que no estágio do desenvolvimento pré-natal a marcação obtida usando biotínil- KM^+ foi fraca e restrita à matriz extracelular. Durante a corticogênese cerebelar no pós-natal, ligantes de KM^+ foram detectados em todas as camadas corticais e exibiram expressão desenvolvimento-dependente, que no citoplasma das células de Purkinje apresentou pico em P15. As camadas granular e molecular apresentaram expressão moderada de ligantes de KM^+ durante o desenvolvimento pós-natal. As células estelares e em cêsto mostraram um aumento de expressão de ligantes de KM^+ a partir de P18. Na camada germinativa externa a marcação foi detectada na matriz extracelular. A marcação obtida usando biotínil- KM^+ foi essencialmente reduzida ou abolida por D(+)-manose, ou açúcares que a contém, mas não por D(+)-galactose.

Estudos de frações cerebelares usando Western blot mostraram que KM^+ reconhece três bandas com Mr 140, 83 e 49 kDa, de natureza não foi identificada, que foram marcadas no homogeneizado cerebelar. A banda de 49 kDa foi observada unicamente na fração particulada, e as bandas de 140 and 83 kDa foram detectadas nas frações particulada e solúvel. KM^+ marcou também duas outras bandas de proteínas com Mr > 205 kDa que co-migram com a laminina EHS e que foram reconhecidas por anticorpo anti-laminina. A expressão desta laminina-like ligante de KM^+ foi desenvolvimento dependente.

Resultados histoquímicos indicaram que a expressão de ligantes de KM^+ , em todas as camadas cerebelares, foi desenvolvimento dependente e específica para D(+)-manose. Análise de Western blot mostrou que o perfil das bandas de proteínas marcadas durante a ontogenia cerebelar também foi desenvolvimento dependente. A detecção de duas bandas com Mr >205 kDa, que co-migram com a laminina EHS, sugere que a laminina é um dos ligantes cerebelares da lectina KM^+ .

INTRODUÇÃO

A ontogênese cerebelar é um importante tópico da biologia do desenvolvimento não somente por enfocar aspectos da proliferação, diferenciação e migração celular mas também por englobar os mecanismos moleculares envolvidos nesses processos. O cerebelo apresenta um sistema apropriado para o estudo do desenvolvimento neural devido ao pequeno número de tipos neuroniais, arranjo estereotipado e ao grande número de células granulares. Seu desenvolvimento se estende por dois períodos relativamente longos, um pré- e outro pós-natal (ALTMAN, 1978, ALTMAN, 1972a, b, c), com tempo de origem de populações neuroniais conhecido. Nesses períodos, o modelo mais utilizado para se estudar, por exemplo, os aspectos envolvidos na migração celular está nas células granulares; isto porque são encontradas em grande quantidade no cerebelo, o que permite que, através de sistemas experimentais *in vivo* e *in vitro*, se identifiquem moléculas importantes para o fenômeno de reconhecimento/adesão (HATTEN & LIEM, 1981; GAO & HATTEN, 1993).

Os processos que ocorrem durante as etapas do desenvolvimento neural, como, por exemplo, a migração radial das células granulares para o interior do cerebelo ao longo da fibra glial, envolvem eventos interação célula-célula ou célula-matriz (SIDMAN & RAKIC, 1973; KUCHLER et al., 1989; SHARON et al., 1993; CAMERON et al., 1997). Esses eventos podem ser mediados por glicoconjugados presentes na matriz extracelular (ECM), os quais desempenham um papel importante em eventos fisiológicos do desenvolvimento, como na migração celular, no crescimento de axônios e dendritos, na sinaptogênese etc (DODD et al., 1990; TOMASELLI et al., 1991). Para caracterizá-los, lectinas vegetais têm sido utilizadas (HATTEN & SIDMAN, 1977; HATTEN & FRANCOIS, 1977; HUCK & HATTEN, 1981). Esta caracterização tem auxiliado o entendimento do desenvolvimento neural.

Recentemente, um tipo de lectina extraída da semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*), denominada KM^+ , foi purificada e apresentou propriedade de induzir a migração de neutrófilos através de mecanismo haptotático (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1993). Os ligantes da KM^+ foram localizados na superfície luminal e no citoplasma de células endoteliais, na superfície de células epiteliais alveolares, na membrana basal

e no tecido conjuntivo intersticial (GANIKO et al., 1998). Os domínios de reconhecimento de carboidratos da molécula de KM⁺ estão diretamente envolvidos na interação com glicoconjugados tanto da superfície do neutrófilo como da matriz extracelular, já que D-manose inibe essa ligação. Além disso, verificou-se que a laminina é um glicoligante de KM⁺ em tecido pulmonar (GANIKO et al., 2001, submetido a publicação).

Tendo em vista o interesse de nosso laboratório nos estudos do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), particularmente do cerebelo, e o potencial da lectina KM⁺ como ferramenta para auxiliar o entendimento desse processo, no presente trabalho nos propusemos estudar a expressão de ligante(s) da lectina KM⁺.

REVISÃO DA LITERATURA

O Córtex cerebelar

A organização estereotipada do córtex cerebelar e o pequeno número de tipos celulares têm auxiliado no entendimento dos sucessivos estágios da ontogênese cerebelar e dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento neural. A grande quantidade de neurônios granulares do cerebelo torna possível analisar os diferentes estágios de seu desenvolvimento, os quais envolvem a migração, a maturação, a diferenciação e a extensão dos processos dendrítico e neuro-axonais durante a ontogênese (HATTEN & HEINTZ, 1995). Um outro fator importante, que facilita o estudo do cerebelo, é a sua estrutura laminar relativamente simples, que compreende, no adulto, apenas 3 camadas: a camada molecular (MOL), a camada granular interna (GL) e a camada de células de Purkinje (PCL), contendo 5 tipos principais de neurônios: células de Purkinje, células granulares, células de Golgi, células estreladas e células em cesto.

Desenvolvimento do córtex cerebelar

O primórdio cerebelar se origina da eminência lateral no metencéfalo, a placa cerebelar, e apresenta duas matrizes germinativas: o neuroepitélio e a camada germinativa externa (ALTMAN, 1982). A maioria dos neurônios que compõem o cerebelo são gerados no romboencéfalo e se localizam, após migração ordenada, a distâncias consideráveis de seu sítio de nascimento (SIDMAN & RAKIC, 1973; RAKIC, 1990). As primeiras células geradas durante o desenvolvimento são as células da glia radial, com processo que se estende por toda a espessura do tubo neural, fazendo contato com a superfície pial e servindo como substrato para a migração neuronal (RAKIC, 1972; LAMING et al., 2000). O alinhamento de neurônios pós-mitóticos com um sistema de fibras da glia radial direcionam a migração (HATTEN, 1999).

O desenvolvimento embrionário do cerebelo pode ser dividido em duas etapas. A primeira etapa compreende a formação de células dos núcleos profundos e células de Purkinje, no neuroepitélio (ALTMAN, 1982; ALTMAN & BAYER 1985c; HATTEN,

1999). Estas últimas são geradas entre os dias embrionários (E) 13 e 16, se diferenciam e migram ao longo de fibras da glia radial em direção à superfície pial (ALTMAN, 1982). O final da produção de células de Purkinje encerra a primeira etapa do desenvolvimento cerebelar em E16. A segunda etapa do desenvolvimento inicia em E17 e termina antes do nascimento (E21) e é marcada por dois eventos: a formação da camada germinativa externa e a migração das células de Purkinje em direção a superfície pial, dando início a corticogênese (ALTMAN, 1982).

As células precursoras das granulares surgem inicialmente no lábio rômboico, uma região proliferativa localizada na região caudo-lateral da placa cerebelar (ALDER et al., 1996; ALTMAN & BAYER, 1997; HATTEN, 1999; WINGATE HATTEN, 1999, e WINGATE, 2001). Essas células movem primeiramente rostralmente e proliferam na superfície cerebelar sendo denominada camada germinativa externa (EGL) (RYDER et al., 1994; HATTEN, 1999). Em E17 as células da EGL se espalham rapidamente no sentido caudo-rostral sob a superfície pial do cerebelo alcançando a região anterior entre os dias E20-E21 (ALTMAN, 1982). No período pós-natal, células da EGL proliferam rapidamente e começam a migrar para o interior do cerebelo (migração radial). Nesse período a EGL está subdividida em zona proliferativa e pré-migratória. Na zona pré-migratória, as células apresentam formato alongado e estão orientadas paralelamente ao eixo longitudinal do “*folium*” cerebelar com dois processos originados nos pólos opostos da soma, as fibras paralelas (RAKIC, 1971; ALTMAN, 1972a). As células posicionadas na proximidade da MOL adquirem formato arredondado e emitem um terceiro processo que penetra na MOL - processo líder (RAKIC, 1971). Essas células migram radialmente, de forma ordenada e sequencial, ao longo da fibra radial ou fibra de Bergman, atravessando a camada molecular para formar a (GL) onde residem no cerebelo adulto (RAKIC, 1971). Recentemente foi demonstrado (KOMURO & RAKIC, 1998; KOMURO et al., 2001) que as células granulares, ao se desprenderem da fibra radial, mudam seu formato, sua velocidade e seu modo de movimento em resposta a instruções ambientais, sugerindo que há moléculas que auxiliam esse processo de migração. A migração e adesão celulares podem ser influenciadas por moléculas

presentes na matriz extracelular e na superfície de células neuroniais e de fibras nervosas.

Matriz Extracelular

A matriz extracelular além de conferir sustentação e firmeza aos tecidos e órgãos apresenta componentes moleculares que desempenham um papel importante na morfogênese do sistema nervoso, mediando a interação, diferenciação, proliferação e migração de neurônios periféricos e centrais (ISAHARA & YAMAMOTO, 1995). Moléculas da superfície das células neuroniais têm sido identificadas como reguladoras da migração e estão envolvidas na interação neurônio-neurônio ou célula-neurônio, funcionando como fator de reconhecimento, adesão, sinalização e ou motilidade celular (ANTON et al., 1996).

A interação entre células ou célula-matriz, na indução da migração ou morte celular programada durante o desenvolvimento, é influenciada por várias proteínas extracelulares que se ligam a proteoglicanos (PGs) e/ou glicosaminoglicanos (GAGs), tais como laminina, fibronectina, CAMs, β -amilóide e fatores de crescimento de fibroblastos (BOVOLENTA & FERNAUD-ESPINOSA, 2000).

Glicosaminoglicanos são cadeias polissacarídicas não ramificadas compostas de unidades de dissacarídeos. São chamados GAGs porque um dos seus resíduos de açúcares na unidade dissacarídica é sempre um aminoaçúcar (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina) (ALBERTS et al., 1994). Se ligam covalentemente a proteínas formando proteoglicanos. Assim, o proteoglicano é uma glicoproteína com características especiais e pode ser distinguido de outras glicoproteínas pela natureza, quantidade e arranjo de suas cadeias de açúcar (ALBERTS et al., 1994).

Dentre as proteínas de matriz extracelular, a laminina tem papel importante no desenvolvimento. Formada por 3 cadeias polipeptídicas diferentes (α , β e γ) unidas por pontes dissulfeto e arrançadas em forma de cruz, a laminina é uma molécula altamente glicosilada que ocorre predominante nas membranas basais. Há pelo menos 5 tipos de cadeia α , que diferem no tamanho e na estrutura. A combinação dessa cadeia com as diferentes cadeias β e γ resulta em diferentes isoformas de laminina (TIMPL, 1996;

FERLETTA & EKBLOM, 1999). Poderíamos citar como exemplo, a isoforma da laminina de camundongo com cadeia $\cong$ 900 kDa, que é constituída por uma cadeia α (400-440 kDa) associada a cadeias β e γ (cada uma com 200-220 kDa) e que foi isolada de tumor de Elgelbreth-Holm-Swarm (EHS) (TIMPL, 1989; BECK et al., 1990). A cadeia α da laminina apresenta um domínio globular na extremidade carboxi-terminal capaz de se ligar à heparina, ao heparan sulfato e ao colágeno tipo IV.

A laminina participa de várias atividades biológicas, incluindo adesão, crescimento e diferenciação. No desenvolvimento ela se liga a glicosaminoglicanas e medeia a adesão celular. A laminina tem sido localizada no tecido nervoso e durante o processo de migração neuronal, ela é expressa na glia radial e interage com receptor do tipo β -integrina, que participa no processo de migração neuronal (LAMING et al., 2000). Essa glicoproteína é encontrada ao longo do caminho migratório, desde o início da migração neuronal sendo depositada na fibra da glia radial de forma puntata, facilitando o movimento neuronal (LAMING et al., 2000).

Alguns autores sugerem (LIESI, 1990; GOLDFINGER et al., 1999) que para adesão ao substrato, a laminina deve se associar ao fator tissular de ativação do plasminogênio (tPA), que medeia a clivagem das cadeias de laminina. Em mamíferos, a laminina está localizada na superfície das células e se liga à proteína priônica, formando um complexo macromolecular com integrinas e interagindo com o receptor da proteína priônica PrP^c (RIEGER et al., 1997; GRANER, 2000). A interação de laminina com células endoteliais e astrócitos é mantida por membros da família das integrinas e de receptores da matriz extracelular (WAGNER & GARDNER, 2000). Essa interação entre PrP^c medeia a adesão celular e a neuritogênese.

Durante o desenvolvimento, interações complexas e dinâmicas ocorrem entre neurônio e ambiente. Essas interações em geral controlam alguns eventos da morfogênese neural (GOODMAN, 1994). Glicoproteínas de adesão participam de tais eventos, antes de formar o contato celular, elas também medeiam a geração e transdução de sinais através da membrana celular. A superfície celular tem papel importante no reconhecimento e adesão celular e em uma variedade de processos celulares. No desenvolvimento, ocorre uma mudança na composição e distribuição de glicoproteínas

na superfície. Essas alterações podem ser detectadas usando lectinas que se ligam a glicoproteínas presentes na matriz extracelular (GOODMAN, 1994). Devido a essa propriedade, lectinas como Con A e Jacalina, têm sido usadas como sondas para detectar variações na expressão de ligantes de lectina (LI et al., 1992).

Reconhecimento celular

Evento central de uma variedade de fenômenos biológicos, o reconhecimento celular é ainda a primeira etapa de numerosos processos baseados nas interações célula-célula, tais como embriogênese e migração celular. O reconhecimento celular inadequado pode causar doenças, promover o crescimento e à motilidade celular descontrolados, característico de transformação neoplásica (SHARON & LIS, 1989).

A alta seletividade requerida para o reconhecimento é proporcionada por interações estereoquímicas específicas entre moléculas complementares, onde umas trazem informações biológicas e outras as decodificam.

A hipótese de que carboidratos de superfície pudessem desempenhar um papel importante no reconhecimento celular fez com que as lectinas, conhecidas há mais de 100 anos por sua propriedade de ligação específica com carboidrato, fossem consideradas candidatas a decodificadoras da informação biológica contida nos açúcares, motivando o desenvolvimento de pesquisas no campo da lectinologia.

Lectinas

A primeira descrição na literatura científica de uma lectina foi realizada por Stillmark (1888), que ao estudar a toxicidade de semente de mamona (*Ricinus communis*) obteve um extrato que provocava aglutinação em hemácias animais de diferentes espécies animais (LIS & SHARON, 1986). O princípio ativo, com propriedade de aglutinar hemácias em vasos sanguíneos, foi isolado e posteriormente denominado ricina. A partir de então, um número cada vez maior de substâncias semelhantes à ricina, com atividade aglutinante, foi descoberto em outras plantas, sendo denominadas aglutininas.

Alguns autores (RENKONEN, 1948; BOYDE & REGUERA, 1949) mostraram haver aglutininas vegetais com seletividade específica para os diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO. No entanto, a denominação lectina (do latim *legere*, que significa escolher, eleger, selecionar) para designar aglutininas vegetais foi proposta somente em 1954 por Boyde & Shapheigh, baseados nas descrições de seletividade dessas substâncias para os diferentes grupos sanguíneos.

Considera-se que as lectinas correspondam a um grupo de proteínas estruturalmente muito diverso, com capacidade de se ligar a oligossacarídeos, com grande especificidade. A importância das lectinas na natureza está claramente demonstrada através da sua homologia conservada durante a evolução (LIS & SHARON, 1986).

A abundância dessas proteínas fez com que passassem a ser conhecidas como ferramentas valiosas para detecção, isolamento e caracterização de glicoproteínas solúveis ou de membrana, além de servirem para caracterização das porções carboidrato dessas glicoproteínas, assim como o acompanhamento de mudanças que ocorrem nos açúcares da superfície das células em processos como desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (LIS & SHARON, 1986; SHARON & LIS, 1989; SHARON, 1993).

A ação de lectinas como mediadores do reconhecimento celular em grande número do sistema biológico, como os de adesão de vírus, bactérias e protozoários às células hospedeiras e de leucócitos às células endoteliais, multiplicou o interesse por esse tipo de proteína. Esse aumento no interesse pelo campo da lectinologia, fez com que diversas lectinas fossem conhecidas e caracterizadas.

Dois aspectos da organização destas lectinas auxiliam na compreensão do papel que exercem. O primeiro se refere ao fato de que a atividade ligante a açúcar é atribuível a uma porção limitada da molécula, correspondendo a um domínio globular de reconhecimento de carboidrato (CRD), com menos de 200 aminoácido. O segundo aspecto se refere ao fato de que os CRDs de muitas lectinas relacionam-se entre si, quanto à sequência de aminoácido, o que faz com que possam ser reunidas em um número relativamente pequeno de grupos (WEIS & DRICKAMER, 1996).

A análise da estrutura tridimensional de lectinas de plantas, enzimas, e proteínas de transporte periplasmático de bactérias permitiu diferenciar os sítios de ligação a carboidrato das lectinas dos sítios de ligação das enzimas e das proteínas.

Os sítios de ligação CRDs correspondem a fendas rasas ou ranhuras na superfície da proteína, diferentes de sítios mais profundo de ligação que envolvem o açúcar, encontrados em algumas enzimas e proteínas periplasmáticas (VYAS, 1991). As lectinas podem apresentar ligação covalente ou não covalente de duas ou mais cadeias polipeptídicas, resultando em formas multiméricas. Em geral, cada cadeia polipeptídica ou subunidade apresenta um CRD (LORIS, 1995).

As lectinas são freqüentemente classificadas de acordo com a especificidade de ligação a monossacarídeos ou dissacarídeos, podendo ser divididas em pequenos grupos (manose, galatose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, L-fucose e ácido N-acetil-neuraminico) de acordo com o monossacarídeo que é o inibidor mais específico da aglutinação de eritrócitos ou precipitação de carboidrato (LIS & SHARON, 1986).

Jacalina e KM^+

A aglutinação de hemácias de diferentes espécies de animais, provocada pelo extrato bruto da semente de *Artocarpus integrifolia*, foi observada por Bunn-Moreno & Campos-Neto (1981), sugerindo, então, a presença de lectina(s) nesse extrato.

Estes dois pesquisadores, ao investigarem o papel mitogênico do extrato bruto da semente de jaca, observaram que o extrato bruto estimulava atividade mitogênica para monócitos, respostas de proliferação de linfócitos T e ativação policlonal de linfócitos B do sangue humano. A lectina presente no extrato bruto foi denominada jacalina.

A jacalina apresentou também interações seletivas com a imunoglobulina A (IgA) do soro humano mas não se ligou a IgG ou IgM, passando a ser identificada como uma ferramenta importante no isolamento dessa classe de imunoglobulina (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985).

Dentre as atividades desencadeadas pelo extrato bruto da semente de jaca (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981; ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-

NETO, 1985), pelo menos uma – a atividade mitogênica – não foi atribuível à jacalina. A jacalina purificada não produzia a resposta proliferativa desencadeada pelo extrato bruto. A existência de uma segunda lectina no extrato de *Artocarpus integrifolia* foi demonstrada por Miranda-Santos e colaboradores (1991) e por Santos-de-Oliveira e colaboradores (1994), que evidenciaram as atividades mitótica e indutora de migração de neutrófilos, respectivamente. Essa segunda lectina foi denominada KM^+ .

Estudos posteriores demonstraram que KM^+ é uma lectina com especificidade por D-manose, que apresenta massa molecular aparente de 52 kDa. Ela é um tetrâmero formada pela associação não covalente de subunidades de 13 kDa, cada uma das quais tem um CRD, que apresenta 57% de identidade com a sequência de aminoácidos da jacalina (ROSA et al., 1999). Portanto, KM^+ e jacalina apresentam 57% de identidade e 14% de similaridade. A base molecular do reconhecimento de carboidratos por KM^+ , e em particular a natureza do mecanismo seletivo que confere à jacalina a flexibilidade de aceitar as formas epiméricas de C4 (D-manose, D-glucose ou D-galactose), enquanto KM^+ não liga a D-galactose, foram baseadas na modelagem molecular de KM^+ por homologia à estrutura tridimensional de jacalina (ROSA et al., 1999). O resíduo Asp 141 do sítio de ligação de KM^+ parece ser fundamental na distinção em D-manose e D-galactose (ROSA et al., 1999).

Ao contrário de jacalina e de uma outra lectina MPA (aglutinina *Maclura pomifera*), as lectinas manose-específicas como KM^+ e calsepa, não sofrem clivagem pós-tradução. Devido a isso, KM^+ apresenta um peptídeo “linker” que impede a ligação a D-galactose.

KM^+ é, ainda, uma molécula que apresenta estrutura rígida, estável, numa ampla gama de condições, que incluem elevação de temperatura, presença de agentes caotrópicos e alto pH (ROSA et al., 1999). Estudos sobre a especificidade da ligação de KM^+ mostraram que entre os monossacarídeos, ela apresenta maior afinidade de ligação a D-manose em relação a D-glucose e N-acetil-glicosamina. Já entre oligossacarídeos, ela liga-se preferencialmente à manotriose: $Man1-3[Man\alpha1-6]Man$. Em termos de especificidade, a KM^+ difere consideravelmente das outras lectinas ligantes de manose, por ligar-se fracamente a $Man\alpha1-2Man$, por não apresentar aumento de afinidade de

ligação a oligossacarídeos fucosilados, e por apresentar ligações com menor afinidade a estruturas manooligossacarídicas que apresentam xilose com ligação β 1-2. Outra lectina com especificidade por D-manose, concanavalina A (Con A), reconhece $Man\alpha$ 1-2 com alta afinidade em relação a $Man\alpha$ 1-6 e $Man\alpha$ 1-3 (MISQUITH et al., 1994; RANI et al. 1999; RANI et al., 2000). A especificidade de ligação de KM^+ a torna uma ferramenta potencial no isolamento e caracterização de glicoconjugados (MISQUITH et al., 1994).

O estudo da atividade biológica da lectina KM^+ purificada mostrou que esta apresenta importante atividade indutora da migração de neutrófilo *in vivo* na cavidade peritoneal de ratos, e *in vitro* (neutrófilo humano) e aglutina hemácias (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994). A indução deve-se à interação entre o sítio de ligação a açúcar da lectina e um glicoconjugado da superfície do neutrófilo, uma vez que a atividade atraente de KM^+ é inibida por de D-manose (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994), portanto, esta atividade é dependente do CRD da lectina (GANIKO et al., 1998).

A disponibilidade de KM^+ homogênea e de anticorpos anti- KM^+ purificados por afinidade tem permitido a detecção de seus ligantes em tecidos animais, como pele e pulmão. Recentemente, Ganiko e colaboradores (2001, submetido a publicação), usando microscopia confocal e eletrônica, demonstraram que KM^+ co-localiza com laminina em vasos e no endotélio alveolar – esta lectina tem localização celular na membrana basal vascular e no endotélio alveolar pulmonar. A KM^+ liga-se a vasos e tecido conjuntivo frouxo de pele de rato e também interage com a superfície de neutrófilos humanos, sendo essa interação inibida por D-manose e potencializada por heparan sulfato (GANIKO et al., 1998), mostrando assim que a lectina KM^+ interage de modo dependente dos CRDs com componentes glicosilados tanto da superfície do neutrófilo como da ECM.

Outras lectinas usadas como sonda em histoquímica têm permitido também estudar o papel de carboidratos durante o desenvolvimento normal (GRIFFITH & SANDERS, 1991; WILSON, 1995; QUONDAMATTEO et al., 2000). Diversos tipos de carboidratos aparecem em diferentes estágios do desenvolvimento. Interações intercelulares são essenciais para o desenvolvimento normal (CHANGEUX & MIKOSHIBA, 1978). Essas interações podem ser mediadas, conforme descrito

anteriormente, por diversas glicoproteínas como N-CAM e citotactina presentes, por exemplo, durante a migração das células granulares cerebelar da EGL para a GL (CHOUNG et al., 1987). Complexos carboidrato e proteína ligante de açúcar, como lectina endógena, nos compartimentos intra e extracelular, podem representar um mecanismo para reconhecimento celular no desenvolvimento cerebelar de mamíferos (JOUBERT et al., 1989; KUCHLER et al., 1990).

Assim, considerando que a ontogênese cerebelar requer a expressão de glicoproteínas de reconhecimento/adesão, estudamos a expressão de ligante(s) endógeno(s) da lectina KM⁺ no cerebelo de rato em desenvolvimento.

OBJETIVOS

A presente investigação objetivou:

- 1) Estudar e caracterizar de ligantes da lectina KM⁺ no cerebelo de rato adulto;
- 2) Determinar o decurso espaço-temporal da expressão de ligantes da lectina KM⁺ durante o desenvolvimento cerebelar, a fim de correlacionarmos com os eventos ontogenéticos;
- 3) Avaliar se a interação da lectina KM⁺ com o tecido cerebelar ocorre via domínio de reconhecimento de carboidrato;
- 4) Identificar os possíveis ligantes da lectina KM⁺ em cerebelo.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Lectina KM⁺ purificada por cromatografia de afinidade

A purificação de KM⁺ foi realizada com base no protocolo descrito por Santos de Oliveira et al., (1994). O pó de semente de *Artocarpus integrifolia*, cedido pela Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque-Barreira, foi suspenso em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM. Esta suspensão foi incubada por 1 hora, sob agitação constante, após o que foi centrifugada a 12,000 g (Sorvall RC-5C) por 10 min, a 4°C (rotor SS34). O primeiro sobrenadante foi separado, o precipitado foi ressuspensionado em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM e incubado por 24 horas a 4°C, sob agitação constante. A solução foi centrifugada novamente a 12000 g (Sorvall RC-5C) por 10 min a 4°C (rotor SS34); o segundo sobrenadante foi coletado (extrato bruto, EB), concentrado e dialisado contra tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM, utilizando membrana YM10 (Amicon® Division, W.R. Grace & Co, Beverly, MA). As frações do EB foram aliqüotadas, estocadas a -20°C e submetidas posteriormente a cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-D-galactose e Sepharose-D-manose.

Para separarmos a lectina KM⁺ da jacalina, ambas presentes no extrato de *Artocarpus integrifolia*, amostras do EB foram aplicadas a uma coluna (6,5 x 0,9 cm) de agarose-D-Galactose (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA), a qual foi conectada em série a uma pré-coluna (0,9 x 11,5 cm) de Sephadex G25 (medium grade, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suécia). O uso da pré-coluna visava reter material particulado que não foi precipitado por centrifugação. A fração não retida pela coluna de agarose-D-Galactose foi eluída com tampão fosfato de sódio 10 mM, contendo NaCl 150 mM, pH 7,4 e denominada Fração K; e a fração ligada à coluna foi eluída com tampão fosfato de sódio 10 mM, contendo NaCl 150 mM, pH 7,4 e D-Galactose 0,5 M, a qual foi denominada fração J.

A fração K foi submetida a cromatografia de afinidade em coluna de agarose-D-Manose (Pierce). A coluna foi eluída com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM e a fração que não se ligou à coluna foi denominada fração KM⁻. A fração ligada ao gel foi eluída com tampão fosfato de sódio 10 mM, contendo

NaCl 150 mM, pH 7,4 e D-Manose 0,1 M. A fração eluída foi denominada fração KM⁺, a qual foi dialisada contra tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM, concentrada e armazenada a -20°C. A absorbância do eluato em 280 nm foi determinada utilizando espectrofotômetro Beckman modelo 25.

1.1. Análise da homogeneidade da preparação de KM⁺ em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE)

A análise eletroforética de amostras de KM⁺ purificada foi realizada em gel de poliacrilamida a 12,5% (LAEMMLI, 1970) na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% (p/v) em tampão Tris 24,8 mM, glicina 192 mM, pH 8,3 utilizando o sistema de eletroforese vertical Mini V-8.10 Vertical eletroforesis System (Gibco BRL, Life Technologies, Inc, Gaithersburg, USA). A eletroforese em SDS-PAGE foi realizada para análise da homogeneidade e para determinação da massa molecular da fração KM⁺ purificada. As amostras foram preparadas para SDS-PAGE por adição de tampão de Laemmli¹ (na proporção de 1 µl de tampão para 4 µl de amostra). Da amostra purificada, duas frações foram analisadas sendo uma previamente fervida por 3 minutos a 100°C e a outra amostra não. A eletroforese foi feita sob voltagem constante e igual a 200 V (150-200 mA) por 45 minutos à temperatura ambiente, usando jacalina e KM⁺ homogêneas como controles. Os géis foram corados pelo método da prata (BLUM et al., 1987). Como controle da migração eletroforética foram utilizados: jacalina, que apresenta, respectivamente, 2 bandas com massa molecular relativa de 11,8 e 14,7 kDa; e marcadores de baixo peso molecular (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), que incluem: fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de Tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

1.2. Biotinilação da Lectina KM⁺

KM⁺ foi biotinilada segundo procedimento de Molecular Probes, ligeiramente modificado. Dez mg do éster succinimidil da biotina-XX [éster succinimidil do ácido 6-((biotinoila)aminohexanoil) aminohexanóico] biotina-XX-SE], Molecular Probes Inc.]

foram diluídos em 1 ml de dimetilsulfóxido (Merck) imediatamente antes do uso. À amostra de 0,5 mg de KM^+ foi adicionado 200 μ l de tampão bicarbonato de sódio 0,2 M, pH 8,3. A seguir, adicionamos, sob agitação, 20 μ l da solução de éster succinimidil da biotina-XX-SE (10 mg/ml dimetilsulfóxido). Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação constante a reação foi interrompida por adição de 200 μ l etanolamina 2 M, pH 7,5 e a mistura de reação foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação. A troca da mistura da reação por tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M foi feita usando centrifugação (Sorvall RC-5C) em tubos de Centricon®-10 (Amicon, Inc., Beverly, MA, USA) a 5,000 g (rotor SS34) por aproximadamente 4 horas, a 4°C. A cada troca (1 troca/hora) foi acrescentado aproximadamente 2,0 ml de tampão fosfato de sódio. Ao término, a lectina foi aliquoteada e estocada a -20°C.

1.3 Análise eletroforética de KM^+ biotinilada

Amostras de 3 μ g da lectina biotinilada foram submetidas a SDS-PAGE nas mesmas condições descritas no item 2. Um gel foi corado pelo método de prata (BLUM et al., 1987). As proteínas separadas eletroforéticamente foram transferidas de um gel não corado para membrana de nitrocelulose em sistema de eletroforese vertical Mini V-8.10 utilizando tampão Tris 24,8 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, contendo metanol 10% (v/v). A eletrotransferência foi feita a 150 V, 85-135 mA por 2 horas. A seguir, a membrana foi pré-incubada com tampão de bloqueio [tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM, Tween-20 0,05% (v/v) e BSA 5% (p/v)] por 16 horas a 4°C. As membranas foram incubadas por 2 horas com Kit ABC-fosfatase alcalina (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) diluída a 1:100 (v/v) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM. A atividade da fosfatase alcalina foi revelada usando como substratos azul de nitro tetrazolio (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) (ambos da Promega). A reação foi interrompida com água MilliQ.

¹ Tampão Laemmli: Tris-HCl 0.313 M, pH 6.8, SDS 10 %, sacarose 10% (p/v), β -mercaptoetanol 0.72 M

Como marcadores de migração eletroforética (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) foram utilizadas as proteínas: fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), inibidor de Tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

2. Animais

Ratos Wistar dos estágios de desenvolvimento pré- e pós-natal foram utilizados nesta pesquisa. Ratos Wistar machos, fêmeas virgens para acasalamentos e fêmeas com filhotes foram obtidos do biotério central da FMRP e mantidos no Departamento de Farmacologia-FMRP-USP, onde receberam água e comida “*ad libitum*”, até o dia do experimento. Os ratos do período pós natal² (8 por estadio) foram coletados logo após o nascimento, de oito ninhadas diferentes e colocados com uma fêmea (oito filhotes por fêmea) que tinha parido no mesmo dia.

2.1. Obtenção de espécimens cerebelares

Os embriões³ foram obtidos por acasalamento de 6 ratas virgens para 1 macho, em cada gaiola. O primeira dia gestacional (dia 0) é aquele da manhã seguinte à noite do acasalamento em que foram detectados espermatozóides na lâmina do esfregaço vaginal. Os animais com idades gestacionais: 18, 19, 20 e 21 dias, P 0 (recém-nascido), 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 21, 28, 45 dias e adulto, foram perfundidos por via transcardíaca com solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 contendo NaCl 0,9 %, paraformaldeído 4% (p/v) (Sigma) e glutaraldeído 0,1% (p/v) (PG) (Electron Microscopy Sciences), à temperatura ambiente. Os animais com idades gestacionais E13, 15 e 17 dias foram retirados do saco embrionário de ratas grávidas e fixados por imersão por 4 horas, à temperatura ambiente. As ratas grávidas e os filhotes no estágio pós-natal foram anestesiados por via intraperitoneal com nembital (40 mg/kg peso corpóreo), previamente à perfusão.

² P, estadio pós-natal de desenvolvimento.

³ E, estadio embrionário de desenvolvimento.

O tecido pós-fixado em PG foi desidratado em álcoois (Merck), diafanizado em benzol (Merck) e incluído em parafina (Shandon). Utilizando um micrótomo (Leica, modelo RM 2065) foram obtidos cortes de 5 μ m de espessura os quais foram coletados em lâminas histológicas pré-tratadas com uma mistura de gelatina (Fisher) e alúmen de cromo e potássio, objetivando uma melhor aderência dos mesmos.

2.2. Análise morfológica de secções cerebelares coradas pelo método de hematoxilina-eosina

As amostras de cerebelo incluídas em parafina foram seccionadas (5 μ m) no plano médio-sagital, para estudo histológico da ontogenia cerebelar. Após este procedimento os cortes histológicos de parafina foram desparafinizados em xilol, 2 x 10 minutos; re-hidratados nas seguintes sequência de álcoois: absoluto, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% por 1 minuto cada; lavados em água Milli-Q por 10 minutos e posteriormente corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE). Os cortes foram novamente desidratados em álcoois, diafanizados em xilol e montados sob lamínula com Permount (Fisher).

Com esta metodologia, e utilizando os critérios descritos por Larsell (1952), identificamos e selecionamos, para esse estudo, o lobo VIII ou piramidal. A análise dos cortes foi realizada utilizando lupa (Olympus modelo SZH10) e microscópio óptico (Olympus modelo BX60).

3. Recuperação de ligantes

O mascaramento dos sítios de ligação provocado pelo fixadores, como paraformaldeído, pode limitar o acesso de lectinas a seus sítios receptores (HEWICKER-TRAUTWEIN et al., 1995). Com o objetivo de facilitar este acesso e recuperar os sítios de ligação de tecidos fixados e incluídos em parafina, diversas técnicas têm sido desenvolvidas, como por exemplo, o pré-tratamento das secções por aquecimento em microondas.

Para testamos o procedimento de recuperação de ligantes de KM^+ utilizamos a técnica proposta por Zanardo e colaboradores (1997) e Martins e colaboradores (1999).

Secções cerebelares de 5 μ m de espessura foram diafanizadas em xilol e re-hidratadas. Posteriormente as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6,0 em jarro plástico de Coplin, e submetidas ou não a forno de microondas (modelo Sharp Corroussel II, modelo RB-4A33). As secções submetidas a forno de microondas foram irradiadas por 20 minutos em potência nominal máxima (MARTINS et al., 1999).

3.1. Histoquímica para ligantes de KM⁺

As secções submetidas ou não ao aquecimento em forno de microondas, foram posteriormente incubadas com solução de glicina 50 mM, tamponada para pH 7,4 com Tris base 0,1 M, durante 30 min, para bloquear os grupos aldeídos livre. Em seguida, as secções foram incubadas com tampão de bloqueio [tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo NaCl 45 mM, Triton X-100 0,3% (v/v) e soro albumina bovina (Sigma) 5% (p/v) por 4 horas. O bloqueio da biotina endógena foi feito com solução de avidina-biotina (Biotin Blocking System, Dako). As secções foram então incubadas com 0,8 μ g/ml de biotinil-KM⁺ diluída em tampão de bloqueio, por uma noite. A detecção de biotinil-KM⁺ foi feita com o kit ABC-fosfatase alcalina (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA), conforme as instruções do fabricante. Como substratos usamos azul de nitro tetrazolio (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) (Promega, Madison, WI, USA) (O'Leary et al., 1983). A reação foi interrompida com água Milli-Q, após tempo padronizado. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente e todas as lavagens em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo NaCl 45 mM e Triton X-100 0,3% (v/v) foram conduzidas por 6 vezes de 5 minutos cada lavagem. Os controles foram feitos incubando secções adjacentes que foram submetidas a todas as etapas do procedimento, acima descrito, porém suprimindo-se a aplicação da lectina KM⁺ biotinilada. As secções foram desidratadas em álcoois, diafanizadas com xilol e montadas sob lamínula com Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ).

As secções foram analisadas utilizando microscópio óptico JENAMED 2 (Carl Zeiss) e lupa modelo SZH10 (Olympus) e fotografadas com microscópio óptico, modelo BX60F3 (Olympus) utilizando óptica Nomarski.

3.2. Análise da especificidade da ligação de KM^+ ao tecido cerebelar

Para análise da especificidade da reação usamos secções adjacentes de cerebelo de rato dos estágios de desenvolvimento correspondentes às idades gestacionais E15, 18, 20 e pós-natal P0, 5, 10, 15, 21 e adulto. As secções foram incubadas com 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de biotinil- KM^+ pré incubada por 1 hora com D-manose 0,4 M (Sigma), D-galactose 0,4 M (Sigma), D-glicose 0,4 M (Sigma), metil α -D-manopiranosídeo 0,1 M (Sigma), manotriose [Man α 1-3(Man α 1-6)Man] 5 mM (Dextra laboratories) e peroxidase tipo VI 5 μM (Sigma).

3.3. Análise semi-quantitativa da detecção de ligantes de KM^+ : determinação de valores de cinza

Os valores de cinza de secções de vermis cerebelar processados para detecção de ligantes de KM^+ foram determinados usando microscópio óptico acoplado a video-câmera, usando analizador de imagens (programa NIH Image). A intensidade luminosa (correspondente a cerca de 6-8 volts na lâmpada) foi ajustada de modo a fornecer valor de cinza (GV) igual a 186 unidades, que corresponde ao segundo padrão de cinza da escala fornecida pelo fabricante (Kodak photographic step tablet no. 2, cat. no. 152 3406, calibrated, 21 steps: DO 0.05-3.05). A área de cada superfície medida foi calibrada com uma régua de 1 mm (Olympus), graduada a cada 10 μm ; a área foi expressa em μm^2 .

Escolhemos como modelo de estudo o lóbulo piramidal ou VIII porque sua ontogênese está bem descrita na literatura (ALTMAN, 1972a, b, c; ALTMAN e BAYER, 1997). As determinações de valor de cinza foram feitas em áreas de superfície semelhantes nas camadas molecular (MOL), granular (GL) e de células de Purkinje (PCL) do lóbulo VIII, tomando como referência a região da fissura secunda abaixo do sulco intra-piramidal 1. As medidas dos valores de cinza foram tomadas inicialmente das secções de cerebelo de rato adulto em que realizou-se a padronização do ensaio e a caracterização dos sítios ligantes de KM^+ . Este procedimento fez-se necessário para determinar qual a melhor concentração de biotinil- KM^+ e o tempo necessário para

revelação da reação nas diferentes camadas, que compõem o cerebelo, de forma a manter a linearidade da marcação.

Os valores de cinza foram quantificados na região do trígono germinativo (GT) e zona subventricular (VZ) para ratos dos estágios E15, 18 e 20. Nos estágios de E18 e 20 os valores de cinza foram quantificados também na região da camada germinativa externa (EGL) prospectiva. No período pós-natal, a quantificação dos valores de cinza em espécimes do estágio P0 foi realizada entre a fissura secunda e a fissura prima; nos estágios entre P5 e P7, na fissura secunda; e, de P10 ao adulto, entre o sulco intrapiramidal 1 e a profundidade do lóbulo VIII. As medidas foram tomadas na MOL, entre a EGL e a PCL; na GL, entre a PCL e a substância branca e na substância branca. A quantificação de ligantes KM⁺ na PCL: foi feita de: P0 a P7, principalmente na mitra das células de Purkinje; P10 ao adulto, no citoplasma das células de Purkinje que apresentavam boa visualização do núcleo, permitindo assim contornar o citoplasma. Em todos os estágios do desenvolvimento acima descritos foram medidas 10 células de Purkinje por secção.

O programa GraphPad Prism, versão 2, foi usado para testar a linearidade dos valores de cinza em função do tempo de incubação com NBT/BCIP.

4. Preparação de amostras de homogeneizado de tecido nervoso

Encéfalos de rato Wistar de diversos estágios de desenvolvimento pré-natal e cerebelos de ratos dos estágios pós-natais foram pesados e homogeneizados em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, contendo 0,32 M de sacarose e inibidores de proteases (EDTA 10 mM, Benzamidina 1 mM, PMSF 0,3 mM e Aprotinina 1 µl/ml), na proporção de 1:10 (p/v). A homogeneização foi realizada em copo Potter-Elvehjem, com pistilo de teflon girando a 1000 rpm, com 10 excursões do pistilo, em banho de gelo. Uma alíquota do homogeneizado foi separada para dosagem de proteínas e outra preparada para SDS-PAGE. As frações solúvel e particulada foram obtidas por centrifugação (Sorvall RC-5C) do homogeneizado a 48,000g por 2 horas a 4°C (rotor SS34), após o que foram separadas e preparadas para SDS-PAGE por adição de tampão de Laemmli (na proporção de 1 µl de tampão para 4 µl de amostra). As amostras foram, então, agitadas

vigorosamente, fervidas por 3 minutos e estocadas a -20°C ou submetidas a SDS-PAGE, gradiente linear de 5 a 20 %.

4.1. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) usando BSA (soro albumina bovina) como padrão e leitura em comprimento de onda de 750 nm, usando espectrofotômetro Beckman, modelo 25. O cálculo da massa relativa foi obtido usando regressão linear pelo método da medida dos mínimos quadrados, com o programa GraphPad Prism versão 2.01.

4.2. Preparação de amostras de tecido nervoso, sob condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada de acordo com o procedimento descrito por LAEMMLI & FAVRE, 1973. As amostras obtidas, descritas no item 6, foram aplicadas em mini-géis (6,0 cm x 8,0 cm x 0,75 cm). Estas amostras de proteínas foram aplicadas em gel de separação com gradiente linear de poliacrilamida de 5% a 20%, preparado com tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, contendo TEMED (N,N,N',N' tetrametilendiamina) 0,125% (v/v), persulfato de amônio 0,065% (p/v) e acrilamida 5% (p/v). O gel de empilhamento, em concentração de 6% de acrilamida/bis-acrilamida, foi feito com tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo TEMED 0,125% (v/v), persulfato de amônio 0,065% (p/v) e acrilamida-bisacrilamida 5% (p/v).

Em cada poço do gel de empilhamento (com 15 raias) foram aplicadas amostras de proteínas de homogeneizado, frações solúvel e particulada de cerebelo (P) ou encéfalo (E) de rato de diferentes estágios de desenvolvimento. Os padrões de peso molecular foram aplicados nas raias laterais dos géis. As proteínas usadas como padrões de massa molecular foram: miosina V (205 kDa), β -galactosidase de *Escherichia coli* (116 kDa), fosforilase b de músculo de coelho (97,4 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa) e calmodulina (17 kDa) (kit 6H, Sigma).

A corrida eletroforética foi iniciada com corrente elétrica de 10 mA por gel, até todas as amostras entrarem no gel de separação. Em seguida a corrente foi aumentada para 20 mA por gel e mantida até o final da corrida. Os géis foram retirados das placas e fixados à temperatura ambiente com uma solução contendo metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Após fixação das proteínas, os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue 0,25% (p/v) diluído no fixador acima descrito. Os géis foram descorados com solução de etanol 30% (v/v) e ácido acético glacial 10% (v/v), trocando inicialmente várias vezes a solução e incubados à temperatura ambiente com solução de ácido acético 7% (v/v).

4.3. Eletrotransferência

A eletrotransferência de proteínas de gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose foi realizada de acordo com o método estabelecido por Towbin et al., (1979). Assim, após a SDS-PAGE, o gel foi lavado com solução tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,3, contendo SDS 0,1% (p/v), glicina 100 mM e etanol 18% (v/v). O “sanduíche” foi montado com camadas sucessivas de: suporte plástico, esponja, folhas de papel de filtro, esponja e suporte plástico. Este “sanduíche” foi colocado em uma cuba para transferência contendo o mesmo tampão acima descrito. As amostras foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose com corrente elétrica de 35 volt/gel por 4 horas.

4.4. Detecção de ligantes de KM^+ em membranas de nitrocelulose – “Western blot”

Para visualização das bandas de proteínas na membrana de nitrocelulose, estas foram coradas com solução de Ponceau 5% (p/v) diluído em ácido tricloroacético 3% (p/v), por 5 minutos e lavadas com água Milli-Q. Após secagem, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com tampão de bloqueio [tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4, contendo NaCl 150 mM, BSA 5% (p/v) e Tween 0,1% (v/v)], por uma noite a 4°C, sob agitação contínua, para bloquear sítios de ligação inespecíficos e posteriormente incubadas com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM, Tween 0,1% (v/v) e 0,08 µg/ml de biotinil- KM^+ , por 6 horas a temperatura

ambiente. Biotinil- KM^+ foi detectado usando estreptavidina-fosfatase alcalina (Gibco) diluído 1:1000 (v/v) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM e Tween 0,1% (v/v), por 1 hora. KM^+ ligada à membrana foi detectada pela reação da fosfatase alcalina, usando NBT/BCIP (Promega) em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, contendo 100 mM de NaCl e 1,25 mM de $MgCl_2$.

5. Análise da especificidade da reação de biotinil- KM^+ em membrana de nitrocelulose

Para testar a especificidade de ligação, KM^+ foi pré-incubada por 1 hora à temperatura ambiente com D-manose 0,4 M ou D-galactose 0,4 M, diluída em tampão de bloqueio, antes de incubá-la sobre as membranas. Após 6 lavagens com tampão tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM e Tween 0,1% (v/v), por 10 minutos cada, seguiu-se a incubação com estreptavidina fosfatase-alcalina. A detecção foi feita conforme descrito no item anterior (6.4).

6. Detecção de laminina em imunoblot utilizando anticorpo anti-laminina

Após a eletrotransferência, as membranas de nitrocelulose que continham as frações foram submetidas ao bloqueio dos sítios de ligações inespecíficos, incubando-as com tampão de bloqueio [(tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4, contendo soro de cabra não-imune a 15% (v/v), leite em pó desnatado (Molico) 5% (p/v), NaCl 0,45 M e Triton X-100 a 0,3% (v/v)] por 6 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com IgG de coelho anti-laminina (Sigma), diluída a 1:1000 em tampão de bloqueio, por uma noite a 4°C. A seguir, a membrana foi lavada em tampão fosfato sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM e Tween 0,1% (v/v) e incubada com anticorpo (secundário) cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Promega) diluído a 1:4000 por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, a membrana foi incubada com complexo avidina-biotina conjugado a peroxidase (Kit Elite ABC, Vector) diluído a 1:100 (v/v) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM e Tween 0,1% (v/v), por 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas com o tampão anteriormente descrito (6 x 10 min) e em seguida com

tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 (2 x 10 min) e tampão carbonato/ bicarbonato 20 mM, pH 9,6 (3 min). Após, as membranas foram colocadas em cassete de revelação, contendo: papel de filme fotográfico Kodak Biomax ML (18 x 24 cm, cat. 8198540), envelope de polietileno com as membranas, sendo a peroxidase revelada com kit para quimioluminiscência, solução de revelação (ECL, Amersham Pharmacia). A revelação foi realizada automaticamente por um período de 5 a 15 minutos, em processador de filme Kodak M35X-OMAT.

6.1. Detecção de laminina e ligantes de KM⁺ em imunoblot utilizando biotínil-KM⁺

Em outra série de experimentos, amostras de extratos de encéfalo ou cerebelo e de laminina purificada de tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de camundongo (Sigma) foram submetidas a SDS-PAGE, gel gradiente 5-20%. Os componentes eletroforéticamente separados foram transferidos para membrana de nitrocelulose. Após a eletrotransferência as membranas de nitrocelulose foram submetidas ao bloqueio de sítios de ligação inespecíficos, incubando-as com tampão de bloqueio [tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo NaCl 45 mM, Triton X-100 0,3% (v/v) e soro albumina bovina (Sigma) 5% (p/v)] por 6 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com 0,08 µg/ml de biotínil-KM⁺ por uma noite a 4°C. O controle foi obtido pela omissão da lectina KM⁺. As etapas seguintes, de lavagem e revelação da reação, procedeu-se conforme descrito no item anterior (7.1).

6.2. Quantificação de bandas detectadas por reação de Western blot e analisadas por densitometria

As membranas que continham as frações de homogeneizado, frações solúvel e particulada, processadas para “Western blot”, foram escaneadas utilizando Scanner de mesa Hewlett Packard e analisadas usando programa ImagePro-Plus v 4.0 (Media Cybernetics). A quantificação das bandas obtidas foi realizada empregando o programa GelPro 3.1, utilizando escala de cinza com 256 níveis. O programa Image-Pro permite quantificar a DOR (densidade óptica relativa) numa escala arbitrária para a área ocupada por cada banda (DOI – densidade óptica integrada).

RESULTADOS

1. Purificação e biotinilação da lectina KM^+

Extrato bruto de semente de *Artocarpus integrifolia* foi submetido a cromatografia em colunas de afinidade agarose-D-galactose e agarose-D-manose. O uso sequencial dessas colunas permitiu separar as lectinas jacalina (Fig. 1A) e KM^+ (Fig. 1B). Ambas, estão presentes no extrato da semente de *Artocarpus integrifolia*, e apresentam afinidade por D-galactose (jacalina) ou D-manose (KM^+). O material não retido na coluna de agarose-D-galactose, foi retido pela coluna de agarose-D-Manose e eluído com 0,1 M de D-manose em pico único (Fig. 1A e 1B).

A fração da lectina KM^+ purificada por afinidade apresentou uma única banda em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Fig. 2). Amostras não-fervidas de KM^+ apresentaram uma banda com aspecto difuso, com massa molecular aparente entre 55 e 80 kDa (Fig. 2A, pistas 1, 2). As amostras fervidas exibiram uma banda única, bem definida, com posição de migração eletroforética de cerca de 13 kDa, correspondente ao monômero de KM^+ (Fig. 2B, pistas 1, 2). As amostras de jacalina purificadas não fervidas apresentaram uma banda na faixa entre 66 e 97 kDa (Fig. 2A, pista 3) e outras duas bandas na faixa de 11.4 e 14.7 kDa (Fig. 2B, pista 3). Em nenhuma das amostras de KM^+ fervida detectamos bandas com 11.4 e 14.7 kDa, que corresponderiam a contaminação por jacalina. Com base nestas análises eletroforéticas, a cromatografia de afinidade da fração KM^+ aqui purificada foi essencialmente homogênea.

A KM^+ purificada foi biotinilada e analisada por SDS-PAGE. Observamos que o padrão de migração eletroforética de amostras de biotinil- KM^+ não fervidas (Fig. 3, pista A) e fervidas (Fig. 3, pista B) foi similar ao descrito para a amostra não biotinilada (Fig. 2A e 2B).

2. Padronização do nível de seccionamento do cerebelo de rato durante a ontogênese cerebelar usando coloração por hematoxilina-eosina

O cerebelo apresenta poucos tipos de células neuroniais, sendo 90% da população total composta por células granulares. Um fator importante para o estudo do cerebelo de rato é que grande parte do seu desenvolvimento cortical ocorre durante o

período pós-natal, tornando possível, em um curto período, estudar os vários passos da ontogênese cerebelar, como, por exemplo, a proliferação e a migração celular.

Padronizamos os níveis de corte de cerebelo de rato nos planos sagitais para analisarmos as estruturas cerebelares e suas alterações ontogenética e selecionar os animais normais dos que apresentassem anomalias cerebelares, tais como heterotopias. Para estas finalidades, usamos secções cerebelares de embriões de rato de estágios pré-natais (E13 a E21) e pós-natais (P0 ao adulto) coradas por HE.

No período embrionário, o primórdio cerebelar é constituído de células indiferenciadas e proliferativas do neuroepitélio do IV ventrículo e glia radial. Nesse período do desenvolvimento, mudanças morfológicas importantes iniciam em E15, com proliferação celular de células de Purkinje e ganglionares entre E13 e E15 (Fig. 4A, 4B e 4C), migração das células de Purkinje entre E15 e E21 (Fig. 4D a 4F) e surgimento das células progenitoras da EGL em E16⁴ (ALTMAN 1972a, b, c). Neste estágio, E16, uma camada fibrosa (if) marca a superfície dorsal do cerebelo sobre a qual as células da EGL migram (Fig. 4C). A camada fibrosa fica posicionada de forma compacta entre a EGL e a PCL prospectivas.

Na região posterior do cerebelo, células de Purkinje iniciam e terminam sua migração antes das células destinadas à região anterior (Fig. 4D a 4F) (ALTMAN e BAYER, 1985c).

A EGL, que deriva do trígono germinativo, começa a surgir em E16 e se expande rapidamente na superfície do cerebelo, sobre a camada fibrosa intermediária, recobrindo-o totalmente em E21 por uma segunda matriz germinativa (Fig. 4D a 4F) (ALTMAN, 1982).

No estágio pós-natal, as células da EGL proliferam rapidamente e migram radialmente da superfície externa para o interior do cerebelo (Fig. 5A a 5F) formando a camada granular interna (GL). As células, que migram de EGL para GL, podem ser observadas na MOL com perfil migratório.

⁴ Para os ratos utilizados em nosso laboratório, contamos a manhã após o acasalamento como dia ZERO. Nas referências relacionadas (Altman) a manhã após o acasalamento é considerada como primeiro dia gestacional.

A MOL é composta por uma fina banda de fibras nos primeiros estágios pós-natais e aumenta gradativamente durante o desenvolvimento com o aumento das fibras paralelas emitidas pelas células granulares, crescimento dos dendritos das células de Purkinje, que se projetam em direção à superfície pial, e posicionamento das células em cêsto e estreladas (Fig. 5A a 5E) (ALTMAN, 1972b).

As células de Purkinje estão dispostas em uma camada com várias células de espessura, em idades entre P0 e P5 (Fig. 5A e 5B); em P7, se posicionam, na maioria dos lobos em camada com espessura de uma célula e mitra proeminente; em P12, apresentam formato piriforme semelhante ao adulto, emitindo arborização dendrítica em direção à superfície pial (ALTMAN, 1972b).

3. Padronização de ensaio histoquímico para detecção de ligantes de KM^+ em secções cerebelares de rato

O córtex cerebelar de rato (ALTMAN & BAYER, 1997), como o humano (RAKIC & SIDMAN, 1970; ZECEVIC & RAKIC, 1976), apresenta diferença de desenvolvimento entre os vários lóbulos. Devido a essa diferença, padronizamos o uso do lobo piramidal (VIII), identificado segundo os reparos anatômicos descritos por LARSELL (1952), para os diversos estágios ontogenéticos. Utilizamos a região do lóbulo VIII, na região compreendida entre o sulco intra-piramidal 1 e a profundidade da fissura secunda a partir de P10, na fissura secunda à profundidade do lóbulo em P5 e na região entre a fissura pré-piramidal e a fissura secunda em P0.

3.1. Efeito do desmascaramento de sítios de ligação de KM^+

O processamento, fixação e embebimento tissular em parafina geralmente mascara os sítios de ligações e receptores tissulares (SHI et al., 1991; HEWICKER-TRUTWEIN, 1995; MARTINS et al., 1999). Como alternativa para evitar o mascaramento de sítios de ligação de KM^+ teríamos fixação branda ou uso de cortes de congelação. Estas opções geralmente limitam a qualidade e a resolução final do material a ser analisado com microscopia óptica convencional. Outra alternativa, atualmente bastante empregada, seria o uso de método genericamente chamado de recuperação de

sítios de ligação em forno de microondas. Esse método permite, através de aquecimento em microondas, expor os sítios de ligação de proteínas ou antígenos de tecidos fixados.

Com o intuito de observarmos se o aquecimento em microondas teria efeito na detecção de ligantes da lectina KM^+ , testamos dois métodos, com e sem tratamento em forno de microondas, usando secções adjacentes de tecido fixado com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, contendo paraformaldeído a 4% (p/v) e glutaraldeído a 0,1% (v/v). A marcação de ligantes cerebelares de KM^+ foi mais intensa nas camadas do córtex cerebelar das secções tratadas em forno de microondas (Fig. 6B) do que naquelas não-tratadas (Fig. 6A). O tratamento intensificou a marcação nas MOL, GL, WM e no citoplasma das células de Purkinje (Fig. 6B). Na ausência do tratamento, a marcação foi discreta principalmente no citoplasma das células de Purkinje, ou ausente na substância branca (Fig. 6A). Essa fraca marcação das células de Purkinje foi melhor visualizada ao microscópio óptico, em aumento de 100x (comparar Fig. 6C com 6D). Os controles não-tratado (Fig. 6E) e tratado (Fig. 6F) não diferiram e não exibiram marcação.

3.2. Padronização do tempo de reação da fosfatase alcalina para detecção de ligantes de KM^+

A expressão de ligantes de KM^+ em secções cerebelares difere, em intensidade, tipo de marcação estrutura marcada, como pode ser observado na Fig. 7. Assim, analisamos a linearidade da reação da fosfatase alcalina em função do tempo de reação para as três camadas (MOL, PCL e GL).

A intensidade da marcação aumenta com o tempo de reação (Fig. 7A a 7H). O aspecto granular da marcação das células ganglionares (Fig. 8A e 8B) e células Purkinje (Fig. 9F e 9G) pode ser melhor evidenciado, ao microscópio óptico, em aumento de 100x. Enquanto a distribuição dos grânulos marcados nas células de Purkinje em tempo de reação igual a 30 minutos (Fig. 9G) é relativamente homogênea, ela não o é nas células ganglionares (Fig. 8B). Já para o epitélio do plexo coróide a marcação é relativamente uniforme e intensa, quando comparados os tempos de reação entre 15 e 30 minutos (Fig. 8D e 8E). Assim, o aumento do tempo de reação de 15 para 30 minutos leva a um aumento aparentemente desproporcionado na intensidade da marcação das

células de Purkinje e ganglionares, possivelmente devido ao padrão de marcação. Com 30 minutos de reação os interneurônios da MOL foram bem marcados (Figs. 7H; 9E e 9G).

Devido ao aumento e diferença de intensidade da marcação obtida na MOL (Figs. 7; 9D e 9E), GL (Figs. 7; 9H e 9I) e PCL (Figs. 7; 9F e 9G), avaliamos a linearidade da reação quantificando os valores de cinza, o que permitiu uma análise semi-quantitativa da intensidade de reação. Na MOL (Fig. 9A) e GL (Fig. 9C), os valores de cinza apresentaram uma relação linear com o tempo de reação entre 0-25 min. Os valores de cinza das células de Purkinje (Fig. 9B) foram linearmente relacionados com o tempo de reação entre 0-20 min.

Com base nestes resultados, padronizamos o tempo de reação da fosfatase alcalina para a revelação das secções incubadas com biotinil- KM^+ (detectado com kit ABC fosfatase alcalina) em 15 min.

3.3. Efeito da concentração de biotinil- KM^+ sobre a intensidade de marcação de ligantes de KM^+ em secções cerebelares

A intensidade da expressão de ligantes de KM^+ aparentemente aumenta com o aumento de concentração de biotinil- KM^+ no meio de incubação. Biotinil- KM^+ em concentração de 0,8 $\mu\text{g/ml}$ permitiu observar a expressão de ligantes da lectina nas diferentes camadas e corpos celulares como: células de Purkinje, MOL e GL. As concentrações de 1,2 e 1,6 $\mu\text{g/ml}$ dificultaram a visualização de limites celulares e da marcação puntata do citoplasma das células de Purkinje, porém não permitiram detectar outras estruturas além das já detectadas com 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de KM^+ . Em concentrações menores que 0,4 $\mu\text{g/ml}$ a marcação foi fraca, dificultando a visualização do material. O aumento e diferença de intensidade da marcação obtida nas diferentes camadas MOL (Fig. 10A), PCL (Fig. 10B), GL (Fig. 10C), e WM (Fig. 10D) permitiu avaliarmos a intensidade da reação quantificando os valores de cinza. Com base nestes resultados, usamos 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de biotinil- KM^+ neste estudo.

4. Localização histoquímica de ligantes de KM^+ no cerebelo de rato adulto

A expressão de ligantes de KM^+ foi detectado em todas as camadas do córtex cerebelar. Na MOL (Figs. 7E e 9D) há marcação puntata e fina, sugestiva de expressão de ligantes de KM^+ em fibras paralelas; não detectamos marcação em dendritos de células de Purkinje. Em secções em que a reação foi mais intensa, observamos a expressão de ligantes de KM^+ no citoplasma e em processos de células estelares e em cesto (Figs. 7G e 7H; 9G).

Nas células de Purkinje, a expressão de ligantes de KM^+ exibiu padrão granular intenso no citoplasma das células (Fig. 9F). Em concentrações maiores de biotínio- KM^+ , ou em tempos de reação mais longos (Fig. 9G), o padrão granular é substituído por marcação essencialmente contínua, ocasionalmente com aspecto difuso. As células granulares, com forma arredondada, núcleo claro e citoplasma “em anel”, foram marcadas com intensidade variável (Fig. 9H e 9I). Observamos algumas células esparsas na GL, com citoplasma proeminente e intensamente marcado, identificadas como células de Golgi (cf. PALAY & CHAN PALAY, 1974). Na substância branca, detectamos fibras e astrócitos intensamente marcados (Fig. 7E a 7H). Marcação discreta foi detectada em vasos da superfície pial, na superfície luminal do endotélio e na lâmina basal (Fig. 8C). Em vasos presentes na MOL e GL não detectamos marcação.

5. Efeito de açúcares sobre a interação de KM^+ com estruturas córtico-cerebelares do rato adulto

A especificidade de ligação de KM^+ às secções do vermis cerebelar foi analisada pré-incubando-a com D-manose 0,1 M (Figs. 11I, 11II.B), D-manose 0,4 M (não mostrado), D-galactose 0,4 M (Figs. 11I, 11II.A), metil α -D-manopiranosídeo 0,1 M (Figs. 11I, 11II.C) e HRP 5 μ M (Figs. 11I, 11II.D). Os resultados indicam que a marcação de secções cerebelares por KM^+ em ausência de açúcares não diferiu quantitativamente (cf. Fig. 11I) e qualitativamente (não documentado aqui) daquela por KM^+ em presença de D-galactose.

A marcação das camadas cerebelares por KM^+ foi muito reduzida por D-manose 0,1 M na MOL, GL e WM e inibiu a ligação às células de Purkinje ou abolida

com D-manose 0,4 M (não documentado) exceto por uma leve marcação em fibras da substância (Figs. 11I, 11II.B). Outros açúcares, como metil- α -D-manopiranosídeo e a glicoproteína HRP, inibiram quase completamente a marcação na MOL, PCL e GL. Com 0,1 M de metil α -D-manopiranosídeo a marcação foi completamente abolida no plexo coróide do IV ventrículo e em todas as camadas cerebelares, exceto na substância branca, onde foi muito reduzida (Figs. 11I, 11II.C).

D-manose e metil- α -D-manopiranosídeo em concentrações de 0,05 M, 0,025 M e 0,01 M promoveram redução importante da marcação (Fig. 12A, 12B). Secções cerebelares incubadas com D-manose e metil- α -D-manopiranosídeo exibiram, portanto, redução da marcação de forma concentração-dependente (Fig. 12A, 12B).

A adição de biotil-KM⁺ pré-incubado com 5 μ M peroxidase de rábano às secções aboliu completamente a marcação no vermis cerebelar (Figs. 11I, 11II.D) e ao plexo coróide. Na substância branca, a inibição da reação foi de 70 a 84% em relação ao controle positivo.

Outras secções foram incubadas primeiramente com biotil-KM⁺ (0,8 μ g/ml). Em seguida, o excesso de KM⁺ foi removido e a secção incubada com 5 μ M de HRP. Esse procedimento não alterou a marcação das secções pela lectina, sugerindo que a lectina KM⁺ ligada ao tecido não foi deslocada por HRP. Por outro lado, ao incubar as secções adicionando simultaneamente KM⁺ e HRP, houve inibição da ligação de KM⁺ às secções, sugerindo que KM⁺ e HRP competem pelos mesmos sítios de ligação (dados não mostrados).

Estes resultados nos permitem sugerir que a ligação da lectina KM⁺ às estruturas cerebelares é antagonizada, de modo concentração dependente, por D-manose e açúcares que a contém, mas não por D-galactose.

6. Localização histoquímica de ligantes de KM⁺ no cerebelo de rato durante o período pré-natal

No período pré-natal, o cerebelo primitivo é composto por duas matrizes germinativas, o neuroepitélio e a camada germinativa externa. Essas matrizes

apresentaram marcação muito discreta de ligantes de KM^+ (Fig. 13A a 13E). Em secções sagitais ou parassagitais de E15 (Figs. 13A e 14), detectamos marcação granular e puntata principalmente na matriz extracelular. Em E16 (Fig. 13B) e E18 (Fig. 13C), as células mais próximas da zona subventricular apresentaram marcação fina e granular.

No período do desenvolvimento que corresponde a E20, a marcação da EGL foi um pouco mais intensa que em E18. Em E21, o cerebelo apresentou marcação com diferenças regionais na direção rosto-caudal (Fig. 13E), sendo mais intensa nos lóbulos anteriores à “*fissura prima*”. Estas diferenças na intensidade de marcação podem ser melhor observadas principalmente na PCL, abaixo da EGL prospectiva (Fig. 13E).

Observamos, ainda, expressão importante de ligantes de KM^+ em estruturas, como o córtex cerebral (Fig. 15) e hipocampo (não mostrado). Células com perfil alongado e disposição colunar, foram intensamente marcadas no córtex cerebral (Fig. 15A a 15C). A marcação foi detectada em células com perfil alongado e em processos na porção posterior do corpo celular (Fig. 15B, 15C). Na porção posterior, o processo foi intensamente marcado na região mais proximal ao soma celular.

6.1. Ligantes de KM^+ expressos na camada de células de Purkinje

As células de Purkinje migram radialmente do neuroepitélio posicionando-se em uma camada estratificada abaixo da EGL prospectiva (ALTMAN & BAYER, 1985 a, c). Utilizando biotinil- KM^+ , podemos observar em secções parassagitais de cerebelo de rato (E16) uma discreta marcação em células que começam a se posicionar abaixo da EGL, sendo, provavelmente, células de Purkinje primitivas que migraram do neuroepitélio (Fig. 13B). Em E18 e E20, a marcação foi moderada no citoplasma de células com núcleo grande e claro, localizadas abaixo da EGL, dispostas em uma camada com várias células de espessura (Figs. 13C e 13D). Em E21 a marcação foi mais intensa e diferenciada entre os lobos no sentido antero-posterior (Fig. 13E).

7. Localização histoquímica de ligantes da lectina KM^+ durante o período pós-natal da corticogênese cerebelar

A expressão de ligantes de KM^+ durante a corticogênese foi analisada nas diferentes camadas do vermis cerebelar de rato.

7.1. Camada germinativa ou granular externa

Durante a corticogênese cerebelar no período pré- e pós-natal, marcação fina e discreta foi observada na matriz extracelular na EGL (Fig. 17 A a 17F). No período pré-natal a marcação da EGL é predominante na ECM (Fig. 17A e 17B). No cerebelo do rato do estágio pós-natal, esta camada germinativa está subdividida em zona proliferativa (PZ) e zona pré-migratória (MZ). Na PZ, a marcação granular é mais intensa e mais evidente tanto na matriz extracelular como no citoplasma de algumas células, apresentado um gradiente diferencial de marcação em relação à MZ (Fig. 17E e 17F).

7.2. Camada Molecular

Na camada molecular, observamos em P0 e P5 uma fina banda com marcação puntata e moderada (Fig. 16A e 16B). Em P10, a marcação foi intensa nos dendritos primários das células de Purkinje (Fig. 16C). Com o desenvolvimento da MOL, observamos um aumento na intensidade da marcação obtida (Fig. 16D a 16F). Em P15 e P21, detectamos, ainda, intensa marcação no citoplasma de interneurônios (células em cesto e/ou estreladas) e seus processos (Figs. 16D e 16E; 18C). Esses interneurônios foram menos marcados no adulto (Fig. 15F). O aumento de tempo de detecção para 30 minutos permitiu detectá-los bem (Figs. 7H e 9G).

7.3. Camada de células de Purkinje

As células de Purkinje em P0 apresentaram marcação moderada (Fig. 16A). Em P5, a marcação foi detectada na mitra destas células para ligantes de KM^+ (Fig. 16B - podendo ser melhor observada na Fig. 18A), com disposição em camada pluriestratificada, núcleo claro e mitra intensamente marcada. Em P7, estas células se

dispõem, abaixo da MOL, em camada com espessura de uma célula, mitra proeminente e marcação intensa (dados não mostrados). Em P10, os dendritos primários das células de Purkinje, exibiram marcação puntata e moderada (Fig. 16C - podendo ser melhor observada na Fig. 18B). Em P12, as células de Purkinje apresentaram marcação puntata, que foi intensificada entre P15-P21 (Figs. 16D e 16E; 18C) e reduzida a um padrão granular menos intenso no adulto (Fig. 16F).

Na PCL, algumas células posicionadas um pouco abaixo ou acima das células de Purkinje, menores que estas, com núcleo grande e claro, exibiram citoplasma intensamente marcado, sendo identificadas como prováveis células da glia radial (Fig. 18C).

7.4. Camada Granular

Na camada granular em P5, observamos fraca marcação de ligantes de KM⁺ (Fig. 16B). Esta marcação se intensificou à medida que a corticogênese progrediu; houve moderada marcação em P10 (Fig. 15C), que foi intensificada entre P15 e P21 (Fig. 16D e 16E). No adulto grupos de células marcadas foram intercalados por grupos de células não marcadas (Fig. 19A e 19B). Observamos, ainda, marcação em interstício das células granulares (cf. seta, Fig. 19B).

As células de Golgi, presentes nessa camada, apresentaram núcleo claro e marcação moderada no citoplasma em P0, que foi intensificada a partir de P5 (Fig. 16B e 16F).

7.5. Substância branca

Na substância branca detectamos marcação fraca de fibras de P5 a P10 (Fig. 16B e 16C), moderada entre P15 e P21 e intensa no adulto (Fig. 19A). Células presentes na substância branca apresentaram de moderada-intensa marcação a partir de P5 até o adulto (Figs. 16B e 16C; 19A).

7.6. Expressão de ligantes da lectina KM^+ em vasos

Em vasos cerebelares observamos a expressão de ligantes de KM^+ do estágio de desenvolvimento (E13) até o período perinatal. A marcação foi intensa em vasos da superfície, no interior da placa cerebelar e em pequenos vasos posicionados na superfície do cerebelo (cf. Figs. 13 e 14A).

No período pós-natal detectamos ligantes de KM^+ em vasos presente na MOL e GL de P0 a P15 (Fig. 15A a 15D). A intensidade da marcação vascular durante a corticogênese decresceu de intensa/moderada até muito fraca/nula em P21 (Fig. 15E). A marcação intensa em vasos da superfície pial (Fig. 16A a 16C) decresceu durante o desenvolvimento, apresentando no adulto uma marcação fraca na superfície luminal do endotélio e na membrana basal (Fig. 16D a 16F). A marcação dos grandes vasos da base permaneceu forte (Fig. 8C). A marcação em vasos do plexo coróide foi intensa durante todo o período do desenvolvimento.

Devido a intensa marcação dos vasos presentes no interior do cerebelo no período pré- (E13 a E21) e pós-natal (P0 a P15), em conjunto com o desaparecimento da marcação nos estágios mais posteriores (P18 ao Adulto), sugerimos que a expressão de ligantes de KM^+ em vasos durante a corticogênese é desenvolvimento dependente.

7.7. Ligantes da lectina KM^+ foram detectados no plexo coróide ao longo da ontogenia cerebelar

O plexo coróide primordial apresentou intensa marcação para ligantes de KM^+ em vasos e discreta marcação no epitélio. Em E15 a expressão de ligantes de KM^+ ocorreu principalmente na superfície vascular luminal (Fig. 20I.A). Nos estágios posteriores (E18-AD) a marcação foi observada no epitélio, com aumento de expressão. A marcação dos vasos do plexo coróide foi de moderada a intensa ao longo da ontogenia cerebelar (Figs. 20I.A a 20I.I). A marcação de KM^+ em todos os estágios de desenvolvimento foi reduzida quando KM^+ foi pré-incubada com D-glicose 0,4 M (Fig. 20II.B e 20II.K), D-manose 0,4 M (Fig. 20II.C e 20II.L), metil α -D-manopiranosídeo 0,1 M (Fig. 20II.E e 20II.M), glicoproteína HRP 5 μ M (Fig. 20II.F e 20II.N) ou do trimanosídeo $\text{Man}\alpha 1-3[\text{Man}\alpha 1-6]\text{Man}$ 5 mM (Fig. 20II.I e 20II.O). A inibição da

marcação de KM⁺, nos estágios E20 (Fig. 20II.A a 20II.I) e P5 (Fig. 20II.J a 20II.O), foi representativa e similar à inibição obtida para os estágios anteriores ou posteriores aos documentados.

Estes resultados sugerem que a expressão de ligantes de KM⁺ no plexo coróide é desenvolvimento dependente e específica para D-manose.

8. Análise quantitativa da expressão de ligantes de KM⁺ durante a ontogenia cerebelar

As secções incubadas com biotinil-KM⁺ foram quantificadas conforme descrito em materiais e métodos, item 5.3, e analisadas usando programa GraphPad Prism. Os valores obtidos foram representativos de no mínimo experimento realizados em quadruplicata. Os valores de cinza obtidos de secções cerebelares embrionárias (E15, E18 e E20), indicam um aumento da expressão de ligantes de KM⁺ no trígono germinativo, zona subventricular e EGL prospectiva (Fig. 21A). Os valores de cinza de secções cerebelares de ratos do estágio pós-natal da MOL, PCL, GL e WM aumentaram ao longo do desenvolvimento (Fig. 21B). Na MOL a marcação aumentou gradativamente até atingir um pico máximo no adulto; na PCL e GL um pico de expressão de ligantes de KM⁺ foi detectado em P15 e reduzida em P21; na WM a expressão foi muito aumentada em P10 ($\cong$ 5 vezes o valor obtido em P5), reduziu pouco em P21 e novamente aumentou no adulto. Estes resultados sugerem que a expressão de ligantes de KM⁺, ao longo da ontogenia cerebelar do rato, é desenvolvimento dependente.

9. Efeito de açúcares na interação de KM⁺ com seus ligantes durante o desenvolvimento cerebelar

Estudamos a especificidade de ligação de KM⁺ a seus ligantes cerebelares durante a corticogênese incubando secções adjacentes de tecidos com KM⁺ pré-adsorvido ou não com vários mono, oligo e polissacarídeos. As secções foram quantificadas para valores de cinza nas diferentes camadas, como mostra a Fig. 22I (A-

EGL, B-zona subventricular e C-trígono germinativo), para os estágios embrionários (E) e Fig. 24 (A-MOL, B-PCL, C-GL e D-WM) para os estágios pós-natal (P).

A marcação de KM^+ em todas as camadas e para os estágios de desenvolvimento pré- (Fig. 22IIA, 22II.G e 22II.M) e pós-natal (Fig. 23A, 23C, 23E, 23G e 23 I) foi parcialmente reduzida quando KM^+ foi pré-incubada com D-manose 0,1 M. KM^+ ao ser pré-incubada com D-manose 0,4 M promoveu uma redução da marcação para todas as camadas cerebelares. No cerebelo de rato no pré-natal a redução foi de 84 a 100% (cf. Fig. 22I; 22II.C, 22II.I e 22II.O) e no pós-natal de 75 a 100% (cf. Figs. 23B, 23D, 23F, 23H e 23J; 24). Quando as secções foram pré-incubadas com metil α -D-manopiranosídeo 0,1 M a marcação foi inibida em 90 a 100% (E) (cf. Fig. 22I; 22II.D, 22II.J, 22II.P) e de 80 a 100% (P) (cf. Figs. 23K e 24). 5 μ M da glicoproteína HRP reduziu a marcação em 90 a 100% (E) (cf. Fig. 22I; 22II.E, 22II.K e 22II.Q) e de 85 a 100% (P) (cf. Figs. 23L e 24). A pré-incubação de KM^+ com 5 mM do trimanosídeo $Man\alpha 1-3[Man\alpha 1-6]Man$ aboliu completamente a marcação (100%) (cf. Figs. 22II.F, 22II.L e 22II.R; 23L). D-glicose 0,4 M reduziu a marcação em 45 a 90% (E) (cf. Fig. 22I; 22IIB, 22II.H e 22II.N) e variou entre as diferentes camadas do período pós-natal sendo para MOL - 20 a 80%; GL - 20 a 60% e PCL - 10 a 60%. Na WM a redução da marcação foi de 25 a 70% para os estágios correspondentes de P5 a P21, no adulto D-glicose não alterou a marcação (cf. Fig. 24). D-galactose não alterou a marcação de ligantes de KM^+ em nenhum dos estágios estudados (cf. Figs. 22I; 24). Os valores de cinza tomados das secções incubadas com KM^+ , não apresentados nos gráficos, representam 100% da marcação e estão indicados na tabela 1.

A marcação reduzida ou abolida quando a lectina foi previamente incubada com os mono, oligo e polissacarídeos acima descritos, durante a ontogenia cerebelar, não foi alterada por pré incubação por D-galactose. Com estes resultados sugerimos que a ligação da lectina KM^+ a estruturas cerebelares ao longo do desenvolvimento cerebelar, foi específica.

10. Análise da expressão de ligantes de KM^+ durante a ontogenia cerebelar, por Western blot

A abordagem histoquímica permitiu detectar a localização tissular de ligantes específicos para a lectina KM^+ em células neuroniais, vasos e matriz extracelular.

Em homogeneizado de encéfalo de rato em desenvolvimento no estágio pré-natal (E14 a E21, Fig. 25A) e em homogeneizado, frações solúvel e particulada de cerebelo durante o estágio pós-natal (P0 ao adulto, Fig. 25C), três bandas principais com massa molecular aparente de aproximadamente 49, 83 e 140 kDa e duas bandas com massa molecular >205 kDa foram observadas.

A intensidade de marcação da banda de 83 kDa em homogeneizado foi variável durante o desenvolvimento, sendo fracamente expressa nos primeiros estágios do período pré-natal (Fig. 26A), com aumento de expressão ($\cong 9$ vezes) observada entre E16 e E20 (Fig. 26A). Em homogeneizado de cerebelo de rato, nos estágios pós-natais (P0-AD), a expressão foi reduzida ($\cong 6$ vezes) no período de P0 a P10 em relação a E20. A p83 apresentou um pico de expressão em P21-adulto (aumentando $\cong 30$ vezes em relação a P10, Fig. 26A).

A p83 foi detectada em maior concentração na fração particulada (Fig. 27A) que na fração solúvel (Fig. 27C), de cerebelo de rato em desenvolvimento. De fato, a expressão de P83 na fração particulada foi cerca de 55 vezes maior do que no cerebelo de P0 na fração solúvel do adulto (Figs. 28A e 29).

Na fração solúvel do cerebelo de rato em desenvolvimento, no período pós-natal (Fig. 27C) a expressão de P83 aumentou cerca de 1 ordens de magnitude entre P0 e adulto (Fig. 29).

A p83 não foi detectada em homogeneizado de encéfalo e cerebelo de rato nos estágios pré- (Fig. 25B) e pós-natal (Fig. 25D), mesmo nas frações particulada (Fig. 27B) e solúvel (Fig. 27D), quando o Western blot foi revelado com biotínio- KM^+ pré-incubado com 0,4 M de D-manose, indicando que a ligação de KM^+ a P83 é D-manose-específica.

A banda de 140 kDa foi detectada no homogeneizado (Figs. 25A, 25C) e nas frações particulada (Fig. 27A) e solúvel (Fig. 27C). No homogeneizado, a banda de 140 kDa apresentou expressão para ligantes de KM^+ , pouco variável no encéfalo de rato

durante a ontogênese pré-natal (Fig. 26B). Em contraste sua expressão, no cerebelo pós natal varia cerca de 7 vezes, com expressão máxima em torno de P10 (Fig. 26B). A expressão da banda de 140 kDa nas frações particulada (Fig. 27A) e solúvel (Fig. 27C) aumentou de acordo com o estágio de desenvolvimento cerebelar. O aumento é de cerca de 10 vezes na fração solúvel, com expressão máxima no adulto (Fig. 29), e na fração particulada, com expressão máxima em P21 e adulto (Fig. 28B).

O ligante de 49 kDa foi detectado nos homogeneizados de tecido nervoso pré e pós-natal (Fig. 25A e 25C) aumentando cerca de 6 vezes entre P0 e o adulto, quando atinge o máximo de expressão (Fig. 26B). p49 foi detectada na fração particulada (Fig. 27A) no estágio pós-natal. A ligação de KM^+ a p49 foi abolida por D(+)-manose 0,4 M (Figs. 25B e 25D; 27C), indicando que o reconhecimento de p49 é dependente de D-manose.

A inibição por D-manose para todas as bandas foi específica, uma vez que D(+)-galactose 0,4 M não interferiu na marcação de KM^+ , indicando que o reconhecimento da banda foi através do domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD).

Estes resultados, em conjunto com os obtidos por histoquímica, sugerem que a expressão de ligantes de KM^+ é desenvolvimento dependente e específica para o monossacarídeo D-manose ou açúcares que o contém.

11. Expressão de laminina durante a ontogênese cerebelar do rato

A detecção de duas bandas com alto peso molecular (>205 kDa) e a co-localização com a laminina purificada de tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de camundongo levou-nos a estudar a possibilidade da lectina KM^+ interagir com a laminina, uma glicoproteína presente na matriz extracelular. Amostras de homogeneizado de encéfalo e cerebelo e das frações solúvel e particulada e de laminina EHS foram submetidas a SDS-PAGE e Western-blot e analisadas quanto ao reconhecimento de bandas de proteína por KM^+ e anticorpo anti-laminina.

Homogeneizados de encéfalo (estágio pré-natal) e cerebelos de ratos (estágios pós-natal) apresentaram duas bandas imuno-reativas detectadas por Western blot

utilizando anticorpo anti-laminina. Essas bandas apresentaram massas moleculares aparentes de 160 kDa e > 205 kDa, respectivamente, e foram detectadas desde E15 até o estágio adulto (Fig. 31A). A banda identificada como laminina com $M_r > 205$ kDa (Fig. 31A) exibiu valores de DOI que não diferiram por mais de 3 vezes (Fig. 31B). Já a laminina de 160 kDa apresentou expressão que variou até 7 vezes durante o desenvolvimento, com expressão máxima em P28 (Fig. 31B).

Em Western blot de homogeneizado, frações solúvel e particulada de cerebelo de rato adulto, detectamos três isoformas de laminina com M_r 160, > 205 kDa e uma com alto peso molecular. As frações cerebelares e laminina EHS quando reveladas usando biotínil- KM^+ apresentaram bandas com $M_r > 205$ kDa e a de alto peso molecular mas não reconheceu a banda com M_r 160 kDa (Fig. 30A e 30C). O anticorpo anti-laminina reconheceu as bandas de 160, 205 kDa e a isoforma de alto peso molecular da laminina (Fig. 30B). Tomados em conjunto, estes dados indicam que KM^+ se liga a ambas isoformas de laminina de peso molecular > 205 kDa.

A análise das frações de tecido nervoso em diferentes estágios de desenvolvimento e a detecção com biotínil- KM^+ mostrou que uma banda com o mesmo R_f que o componente de $M_r > 205$ kDa e outra de alto peso molecular de laminina de sarcoma (EHS) foram detectadas durante todo o desenvolvimento (Fig. 32A) e apresentadora, pico de expressão em P28-Adulto (Fig. 32B). Com a detecção de duas bandas que co-migram com a laminina de EHS, usando biotínil- KM^+ , sugerimos que a laminina endógena seria um dos ligantes de KM^+ no tecido nervoso.

DISCUSSÃO

A lectina KM⁺ de *Artocarpus integrifolia* isolada em nosso laboratório apresentou propriedades idênticas às da isoladas por SANTOS-DE-OLIVEIRA et al. (1994) quanto à especificidade em reconhecer resíduos de D-manose, massa molecular aparente de 52 kDa para a forma nativa e 13 kDa para o monômero. A disponibilidade de KM⁺ permitiu que fosse utilizada como uma ferramenta para estudar a expressão de seus ligantes durante a corticogênese cerebelar. O uso de lectinas como ferramenta tem mostrado que glicoconjugados estão envolvidos em reconhecimento inter-celular, processos de adesão celular e no controle de funções neuronais.

Para localizar e identificar ligantes da lectina KM⁺, optamos por utilizar o cerebelo de rato em desenvolvimento, por ser este um modelo adequado para estudar os mecanismos de reconhecimento celular e sinaptogênese devido à simplicidade da sua citoarquitetura (ALTMAN, 1972 a, b; ALTMAN & BAYER 1997). O cerebelo apresenta um número limitado de tipos neuronais e córtex cerebelar dividido em três camadas (granular, molecular e de células de Purkinje), substância branca e núcleos profundos. Os períodos da sinaptogênese ocorrem essencialmente no pós-natal (ALTMAN, 1972 a, b). Em geral, três períodos de sinaptogênese são descritos durante o desenvolvimento córtico-cerebelar. O primeiro período é de formação sináptica das fibras trepadeiras com as células de Purkinje e ocorre entre o segundo e décimo dia pós-natal. No estágio posterior, do décimo ao vigésimo dia, são formadas sinapses entre as fibras paralelas (axônios das células granulares), células estreladas, células em cêsto e de Purkinje. A partir da terceira semana do desenvolvimento, ocorrem as sinapses glomerulares entre fibras musgosas e dendritos das células granulares.

A hipótese de que KM⁺ pudesse interagir com estruturas celulares e componentes de matriz durante eventos ontogenéticos cerebelares: proliferação, diferenciação, migração e formação sináptica, levou-nos a utilizar biotínil-KM⁺ com o intuito de detectarmos sítio(s) receptores de KM⁺. Inicialmente padronizamos a reação para detecção de ligantes de KM⁺ em secções de cerebelo de rato adulto. Um passo importante para realização do procedimento de histoquímica é a recuperação de sítios ligantes para lectinas, que podem ser mascarados por ligações cruzadas de proteínas causadas por fixação com paraformaldeído e/ou glutaraldeído. Os epitopos e sítios

ligantes podem ser “desmascarados”, por tratamento em microondas (MARTINS et al., 1999).

A ligação de lectinas a glicoconjugados está baseada na sua afinidade específica por determinado açúcar, podendo o tratamento em forno microondas facilitar a ligação da lectina a seus receptores (HEWICKER-TRAUTWEIN et al., 1995).

O tratamento com forno de microondas de secções cerebelares fixadas levou a um aumento significativo da detecção de receptores para KM⁺. Secções de vermis cerebelar incubadas por duas horas com biotinil-KM⁺, após o tratamento, apresentaram expressão importante de ligantes de KM⁺. Verificamos também que a incubação por uma noite, após tratamento em microondas, aumentou a intensidade e a reproducibilidade da detecção de receptores de KM⁺. Entretanto, em secções não aquecidas, a detecção ligantes de KM⁺ no tecido cerebelar foi bem reduzida (MARTINS et al., 1999, TEIXEIRA et al., 1999).

A ligação de KM⁺ no cerebelo de rato adulto foi localizada no citoplasma de células de Purkinje e de células granulares; camada molecular, substância branca, plexo coróide e vasos. A marcação foi específica a julgar pela ausência de marcação nas secções que foram pré-incubadas com D-manose 0,4 M. A marcação dos diversos tipos celulares acarretou a necessidade de padronizar o tempo de reação e a concentração de KM⁺, de forma que permitisse analisar as diferentes estruturas celulares e os resultados obtidos pudessem ser avaliados quantitativamente, permitindo detectar possíveis diferenças de glicosilação durante a ontogênese cerebelar.

No desenvolvimento cerebelar do embrião, uma discreta expressão puntata de ligantes para KM⁺ foi observada em todo o primórdio cerebelar, incluindo o neuroepitélio, o trígono germinativo e o plexo coróide primitivo. Na EGL uma discreta marcação granular foi detectada em E21 na matriz extracelular. Estes resultados sugerem que ligantes da lectina KM⁺ estão presentes desde o primórdio do desenvolvimento cerebelar, inicialmente na matriz extracelular.

O cerebelo de rato no período pós-natal se desenvolve rapidamente (ALTMAN, 1972), e interações intercelulares mediadas por glicoproteínas nesse período são essenciais para o desenvolvimento normal do cerebelo.

Tipos específicos de glicanas aparecem no sistema nervoso central durante o desenvolvimento (KEINO et al., 1998). A migração de células da camada germinativa externa para a camada granular interna é influenciada por sinais moleculares que dirigem a migração (RAKIC et al., 1994). Nesse estágio do desenvolvimento cerebelar detectamos ligantes de KM^+ com diferença na distribuição e modificação no padrão de marcação, sugerindo variação de glicoproteínas e glicosaminoglicanas na matriz extracelular e citoplasma celular durante o desenvolvimento.

As diferentes células que compõem o cerebelo são originadas em diferentes etapas do desenvolvimento com diferentes padrões de expressão de KM^+ . As células de Purkinje, por exemplo, nascem entre E14 e E16, com pico de produção em E15 (ALTMAN & BAYER, 1978). Nessas células de Purkinje prospectivas com perfil alongado, aparentemente migratório e no plexo coróide, marcação moderada foi detectada no período de E15 ao período perinatal. Nesse mesmo período do desenvolvimento a marcação em vasos foi moderada.

Em cerebelo dos estágios anteriores a E13 (E11 e E12) a marcação foi muito discreta (dados não mostrados) em toda placa cerebelar. No período pós-natal (P0-P10), detectamos marcação intensa de vasos na superfície pial e dos vasos que penetram nas camadas granular e molecular; a ligação de KM^+ foi moderada/nula nos estágios P15 ao rato adulto.

A especificidade de ligação de KM^+ a seus ligantes foi avaliada usando o teste de inibição da ligação de KM^+ por D(+)manose; a ligação foi abolida ou muito reduzida nos estágios E15 a P0 e antagonizada parcialmente em todos os outros estágios do desenvolvimento pós-natal. Estes resultados indicam que KM^+ é uma lectina que reconhece ligantes cerebelares via D-manose, durante a ontogênese cerebelar. Esses ligantes apresentam expressão desenvolvimento dependente.

Em trabalhos em que foram realizadas análises do caminho neuronal no desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados foi demonstrado que a maturação de células nervosas resulta de interações específicas na qual glicoconjugados participariam no reconhecimento célula-célula, em processos de adesão celular e controlando outras funções neuronais. As propriedades de complexos carboidrato-proteína ligantes de

açúcar, tal como lectinas endógenas, provêm mecanismo de reconhecimento celular operante durante o desenvolvimento do encéfalo (JOUBERT et al., 1989; KUCHLER et al., 1990). Os mecanismos de contato que guiam a migração e adesão de células granulares envolvem moléculas como, por exemplo, CAMs e/ou lectinas endógenas (LEHMAN et al., 1990).

Entre as diversas classes de lectinas descritas no SNC destacamos duas lectinas cerebelares com afinidade por resíduos de D-manose (CSL, lectina cerebelar solúvel e R1, lectina ligada a membrana). No encéfalo, a CSL desempenha importante papel tanto para a adesão celular como para a geração de sinal, através de formação de “clusters” de ligantes na superfície de uma mesma célula. No tecido nervoso, a CSL desempenha papel de orientação da migração de neurônios ao longo dos processos astrocíticos, para alcançarem a localização própria no adulto (LEHMAN et al., 1990). Essa lectina exerce esta função de orientação da migração através do estabelecimento de pontes entre os ligantes da superfície dos neurônios e da superfície dos astrócitos (ZANETTA, 1997).

Modificação na glicosilação durante a diferenciação celular foi descrita quando utilizou-se lectina de encéfalo de rato (RBL) biotinilada específica para β -galactosidase. Essa RBL reconhece uma lectina endógena expressa no tecido durante os eventos de maturação, estando envolvida na sinaptogênese e tráfico intracelular (LI et al., 1992). Zanetta e colaboradores (1978) mostraram que no cerebelo de rato pós-natal o nível de manose, galactose e N-acetilglicosamina aumenta em uma faixa linear após o nascimento, entretanto o nível de fucose e N-acetilgalactosamina permanece estável.

Na corticogênese, receptores de KM⁺ apresentaram expressão com diferenças regionais no cerebelo, sendo mais intensa nas regiões anteriores que nas posteriores, tanto no período embrionário quanto no pós-natal. Recentemente, Keino e colaboradores (1998) mostraram que a marcação de células de Purkinje por diversas lectinas biotiniladas, durante o desenvolvimento cerebelar do rato, foi modificada, sugerindo que a estrutura terminal do oligossacarídeo possa mudar com o desenvolvimento. A variação de expressão de KM⁺ no cerebelo poderia ser explicada pelo padrão de migração das células de Purkinje, que ocorre segundo um gradiente de ventro-caudal para as regiões dorso-rostral. A migração de células seguindo o gradiente dorso-rostral com diferenças

regionais foi demonstrado no cerebelo primitivo marcado com H^3 -timidina (ALTMAN & BAYER, 1985 a, b, c). As diferenças regionais do padrão migratório e estabelecimento da posição final das células de Purkinje, parece ocorrer devido ao final da divisão mitótica dessas células, localizadas lateralmente no cerebelo primitivo (ALTMAN & BAYER, 1985c).

Na EGL, durante o período de proliferação das células granulares, o cerebelo também apresenta diferenças regionais. No vermis, os lóbulos I e X são os primeiros a desenvolver e os lóbulos VIb, VII e VIII são os últimos. Em geral, a produção das células granulares cessa inicialmente na profundidade das fissuras e termina em todo córtex cerebelar em P21 (ALTMAN, 1982).

A lectina con A, uma lectina com especificidade para D-manose, quando utilizada durante a corticogênese cerebelar marca positivamente as células de Purkinje, células granulares e interneurônios. As células de Purkinje podem ser ricas em oligossacarídeos N-ligados em todos os estágios do desenvolvimento porque o domínio do carboidrato para Con A é o ramo da cadeia oligossacarídeo N-ligada com duas $GlcNAc\beta 1-2Man\alpha$, ligação terminal não reduzida para resíduos de manose do “core” (KORNFELD & FERRIS, 1975; AGRAWAL & GOLDSTEIN, 1983). Con A, utilizada como sonda em histoquímica, detecta receptores glicosilados nas estruturas (soma e dendritos) das células de Purkinje no rato adulto, sugerindo que os grânulos marcados possam ser membranas do Golgi ou membrana do retículo endoplasmático (WOOD et al., 1974).

Outro fator importante durante o desenvolvimento é a vascularização do encéfalo que corresponde uma das etapas iniciais do desenvolvimento do SNC. Os primeiros capilares aparecem no neuroepitélio no 10º dia do desenvolvimento (STURROCK, 1981). Durante a vascularização inicial, capilares da leptomeninge iniciam contato com as células neuroepiteliais e penetram no tubo neural do embrião (BÄR, 1980). Nesse período, de início da vascularização (E10-E12), não detectamos sítios de ligação para KM^+ . Estudos em que diferentes lectinas foram utilizadas revelaram ligações específicas para glicoconjugados que contenham D-galactose, N-acetilgalactosamina e N-acetil-glicosamina, mas não para D-manose (BUDIHARDJO et

al., 1989). Para os estágios posteriores (E13 ao adulto), a marcação de ligantes de KM^+ em vasos mostrou-se intensa no estágio pré-natal (E15 a E21), e continuou até a etapa que coincide com o pico de migração em P15. No estágio pós-natal, entre P18-adulto, a expressão de ligantes de KM^+ em vasos foi muito reduzida. Estes resultados, nos leva a sugerir que ligantes de KM^+ , presentes no endotélio vascular e na matriz subendotelial, apresentam expressão desenvolvimento-dependente no tecido nervoso. Sugerimos ainda que o desenvolvimento e maturação do cerebelo é guiado por modificações de marcação de glicoconjugados, do cerebelo por KM^+ biotinilada, o que indica que a glicosilação e/ou expressão de ligantes mudam durante os processos de migração e estabelecimento sináptico.

A especificidade de ligação de KM^+ foi avaliada em estruturas do tecido cerebelar, como: vasos, matriz extracelular e citoplasma neuronal, nas quais a marcação foi completamente inibida por D-manose (0,4 M) ou metil- α -D-manopiranosídeo (0,1 M), porém não houve alteração da marcação quando utilizamos a mesma concentração de D-galactose. Quando utilizado o heptasacarídeo peroxidase (glicoproteína que apresenta cadeias de $\text{Man}\alpha 1-3[\text{Man}\alpha 1-6]\text{Man}\beta 1-2\text{GlcNAc}$), em concentração 5 μM , ligação da lectina ao tecido cerebelar foi abolida. A lectina já ligada ao tecido não foi deslocada pela posterior adição de peroxidase. Essas observações indicam que a lectina KM^+ reconhece, com alta afinidade, estruturas glicídicas contendo resíduos de manose, provavelmente unidos através de ligações $\alpha 1-3$ e $\alpha 1-6$ (RANI et al., 1999). Misquith e colaboradores (1994) mostraram que a adição de GlcNAc na extremidade redutora do dissacarídeo $[\text{Man}\alpha 1-3]\text{Man}$ ou da manotriose favorece a ligação da lectina.

Estudos termodinâmicos sobre a interação de KM^+ com as diferentes glicanas mostraram que a lectina apresenta a seguinte afinidade de ligação: manotriose ($\text{Man}\alpha 1-3[\text{Man}\alpha 1-6]\text{Man}$) > $\text{Man}\alpha 1-3$ > $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ > $\text{Me}\alpha\text{Man}$ > Man > $\text{Man } \alpha 1-6\text{Man}$ > $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}$ > $\text{Me}\alpha\text{Glu}$ > Glu . Desse modo, a lectina KM^+ liga-se com alta afinidade ao trissacarídeo, $\text{Man}\alpha 1-3[\text{Man}\alpha 1-6]\text{Man}$, presente no “core” de cadeias oligossacarídicas N-ligadas de glicoproteínas (MISQUITH et al., 1994; LIM et al., 1997; RANI et al., 1999; RANI et al., 2000).

Outras lectinas com afinidade por manose têm sido estudadas como, por exemplo, a Con A, que reconhece $Man\alpha 1-6$ e $Man\alpha 1-3$ e apresenta a seguinte afinidade de ligação: $[Man\alpha 1-2]Man \gg [Man\alpha 1-6]Man > [Man\alpha 1-3]Man$.

Em trabalhos recentes de nosso laboratório, mostrou-se que KM^+ é expressa em vasos da pele (GANIKO et al., 1998) e pulmão (GANIKO, et al., submetido a publicação) de rato adulto marcando as células endoteliais, a lâmina vascular basal e células epiteliais pulmonares. A incubação de KM^+ com heparam sulfato solúvel aumentou a ligação da lectina ao tecido vascular; em contraste, a incubação com D(+)-manose aboliu completamente a ligação (GANIKO et al., 1998) mostrando a especificidade desta ligação. No cerebelo, a utilização de biotínil- KM^+ como sonda para detecção de sítos ligantes de KM^+ , permitiu observar uma marcação específica para os estágios pré e pós-natal de forma idade-dependente, havendo, portanto, um aumento na expressão destes ligantes, numa janela espaço temporal. Estes resultados indicam a existência no cerebelo de ligantes endógenos para a lectina KM^+ , D-manose específica.

Com base nos resultados obtidos por histoquímica utilizando lectina KM^+ , durante a ontogênese cerebelar, realizamos a identificação de ligantes a partir de extrato de tecido cerebral (embrião) ou cerebelo (pós-natal).

Através de análise de Western blot de homogeneizado de SNC ao longo da ontogenia e também de frações solúvel e particulada de cerebelo no estadio pós-natal, verificamos a presença de proteínas especificamente reconhecidas por KM^+ com massa molecular de 49, 83, 140, >205 kDa e uma banda de alto peso molecular. A marcação das bandas de 49, 83 e 140 kDa foi semelhante em homogeneizado total e na fração particulada, apresentando um perfil desenvolvimento regulado, sendo moderadamente expressas no período pré-natal e início do pós-natal, e fortemente expressas a partir de P15. Em homogeneizado total, o padrão da banda de 83 kDa nos estágios de P28 e adulto, foi em forma de "alteres", característico de glicoproteínas. Essa forma de alteres da banda de 83 kDa, aparentemente, não afetou a medida de DOI para o adulto mas, uma redução da expressão de KM^+ foi detectada no estágio de P28. A pré-incubação da lectina com 0,4 M de D-manose inibiu o reconhecimento dos componentes acima descritos, enquanto que D-galactose não teve efeito sobre a ligação de KM^+ mostrando

que o reconhecimento destas prováveis glicoproteínas pela lectina KM⁺ ocorreria via D-manose através do CRD.

Estudos de nosso laboratório (VIAPIANO et al., 2000) indicam que o cerebelo de rato em desenvolvimento apresenta um epitopo KM⁺-símile, cuja expressão é desenvolvimento-dependente. Esta expressão foi avaliada usando Western blot e imunohistoquímica. Por Western blot usando KM⁺/anti-KM⁺ uma só banda foi detectada na fração solúvel de cerebelo de rato, que co-migra em 83 kDa e apresentou expressão desenvolvimento dependente. Em cerebelo de rato, ligante (s) de KM⁺, detectado por imunohistoquímica usando KM⁺/anti-KM⁺ e biotinil-KM⁺, apresentaram expressão idade dependente, sugerindo que no sistema nervoso há receptores da lectina KM⁺ e KM⁺-símile envolvidos na migração e/ou maturação neuronal. O par lectina-ligante poderia exercer papéis relacionados ao desenvolvimento e às funções neurais ao longo do desenvolvimento. Com base nestes resultados, sugerimos a ocorrência de lectinas endógenas KM⁺-símile.

Em outros experimentos realizados em nosso laboratório mostrou-se também que KM⁺ co-localiza com laminina em vasos e no endotélio alveolar pulmonar do rato (GANIKO et al., 1998). Em secções de tecido pulmonar, biotinil-KM⁺ se liga a algumas estruturas como o endotélio vascular, lâmina basal e matriz extracelular enquanto que a laminina se liga à lâmina basal pulmonar (GANIKO et al., 2001, submetido a publicação). Mostrou-se também que duas isoformas de laminina de alto peso molecular foram detectadas usando biotinil-KM⁺ em homogeneizado de pulmão (GANIKO et al., 2001, submetido a publicação). A ocorrência no pulmão de bandas de alto peso molecular que foram reconhecidas por biotinil- KM⁺ pelo anticorpo anti-laminina, levou-nos a estudar a possibilidade de KM⁺ estar interagindo com laminina no tecido nervoso. A banda com massa molecular aparente maior que 205 kDa e a de alto peso molecular, que co-migram com a laminina EHS, foi detectada por biotinil-KM⁺ e pelo anticorpo anti-laminina com moderada expressão durante o desenvolvimento. O anticorpo anti-laminina detectou ainda outra isoforma de laminina de 160 kDa. Em homogeneizado de tecido embrionário, o aumento de expressão das bandas, detectadas por biotinil-KM⁺ ou anticorpo anti-laminina em relação ao estágio inicial pós-natal,

poderia ser explicado pela utilização de tecido encefálico enquanto no pós-natal a tecido utilizado foi o cerebelo. Com estes resultados sugerimos que a isoforma de laminina com $Mr > 205$ kDa e a de alto peso molecular, mas não aquela com $Mr 160$ kDa, é um ligante de KM^+ .

A presença da laminina com variação de expressão ao longo do desenvolvimento pode indicar ocorrência de fenômenos de adesão, crescimento e diferenciação de diversos tipos celulares bem como o estabelecimento de interação com outros componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo IV e heparam sulfato (TIMPL, 1989; BECK et al., 1990; BETAGLIA et al., 1992). Os sinais de migração dos neurônios são dados por moléculas de matriz extracelular, como a laminina (FARWELL, 1999). A laminina tem alto peso molecular e análises da composição de glicanas de laminina isolada, a partir de sacorma EHS de camundongo, revelaram um padrão de N-glicosilação bastante heterogêneo, que inclui oligossacarídeos com cadeias laterais contendo unidades repetitivas de $Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-3$, ligadas ao “core” trimanosídeo, e oligossacarídeos do tipo high-mannose (ARUMUGHAM et al., 1986; FUJIWARA et al., 1988; KNIBBS et al., 1989). Laminina está associada a integrinas e está envolvida nos processos de adesão e migração celular. Em trabalhos recentes (GOLDFINGER et al., 1999) demonstrou-se que a laminina se associa a tPA e plasminogênio. Essa associação é um evento necessário para a proteólise das cadeias de laminina. Foi mostrado também (RIEGER, 1997; GRANER et al., 2000) que a laminina se liga à proteína priônica (PrP^c) entre outras (anfoterina etc), sendo importante para o processo de diferenciação e formação de neuritos.

Com base em nestes resultados, sugerimos que a laminina é um dos ligantes de KM^+ expressa durante a ontogenia cerebelar.

CONCLUSÕES

1. Através de histoquímica, demonstramos que o aquecimento em microondas aumentou a intensidade e a reprodutibilidade da detecção de receptores de KM⁺.
2. Desenvolvemos ensaios histoquímicos e quantitativos para detecção de glicoconjugados ligantes de KM⁺ no cerebelo do rato adulto e aplicáveis ao estudo do desenvolvimento cerebelar.
3. A lectina KM⁺ liga-se a estruturas cerebelares como: a camada molecular e a substância branca; ao citoplasma das células granulares e de Purkinje; ao plexo coróide e em vasos.
4. Identificamos como ligantes da lectina KM⁺ cadeias de laminina que co-migram com laminina EHS.
5. A expressão de ligantes de KM⁺ durante a ontogenia cerebelar foi desenvolvimento dependente.
6. A interação de KM⁺ com ligantes teciduais de cerebelo de rato em desenvolvimento e adulto ocorre via CRD; sendo que a inibição ocorre na seguinte ordem de afinidade: peroxidase, manotriose (Man α 1-3[Man α 1-6]Man), metil- α -D-manopiranosídeo e por D-manose.
7. A interação da lectina KM⁺ com as estruturas teciduais não é afetada por 0,4 M de D-galactose.
8. KM⁺ interage com a laminina purificada de tumor de Engelbreth-Holm-Swam (EHS) de camundongo e com laminina de tecido cerebelar com expressão diferencial ao longo do desenvolvimento.

TABELA E FIGURAS

	GT	SV	EGL	MOL	PCL	GL	WM
E15	11	11,3					
E18	34	30	32				
E20	33	43	20				
P0				21,6	66,7		8,6
P5				16,4	74,5	17,1	11,6
P10				30,8	79,2	40,5	76,3
P15				41,1	113,1	74,5	77,6
P21				54,1	93,5	58,3	61,1
AD				79,3	90,7	69,1	96,9

TABELA 1. Valores de cinza obtido usando o programa NIH Image para as diferentes camadas e estruturas cerebelares nos períodos pré- e pós-natal. Secções de cerebelo de rato ($n=4$) foram incubadas com $0,8 \mu\text{g/ml}$ de biotinil- KM^+ . A lectina KM^+ ligada ao tecido foi detectada utilizando sistema ABC-fosfatase alcalina e revelada usando NBT/BCIP como substrato. O valor de cinza foi determinado usando microscopia óptica de transmissão conforme descrito na Fig. 21. O valor de cinza (em unidade), apresentado para cada estágio, foi representativo de experimentos realizados no mínimo por quadruplicata.

FIGURA 1. Purificação de KM^+ a partir de extrato bruto da semente de *Artocarpus integrifolia* por cromatografia de afinidade em coluna de agarose-D-galactose (Painel A) e em coluna de agarose-D-manose (Painel B). Amostras de 10 ml do extrato bruto foram aplicadas em coluna de agarose-D-galactose (6,5 cm x 0,9 cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM, a um fluxo de 10 ml/h; foram coletadas 2 frações/h a 4°C. A coluna foi lavada com a solução tampão, acima descrita, até se obter absorvância próxima de 0,05 UA (Unidades de Absorvância); as frações assim obtidas foram reunidas (Pool K). As frações contendo jacalina foram eluídas com em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM e D-galactose 0,5 M (Pool J). A fração K foi cromatografada em coluna de agarose-D-manose equilibrada com em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM, a um fluxo de 10 ml/h a 4°C, coletando-se 2 frações/h. A coluna foi então lavada com a mesma solução tampão até se obter absorvância próxima de 0,05 UA, (fração KM^+). A seguir, a coluna foi eluída com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM e D-manose 0,5 M, coletando-se 5 frações/h, que foram reunidas no pool KM^+ . A eluição foi monitorada pela medida da absorvância no comprimento de onda de 280 nm.

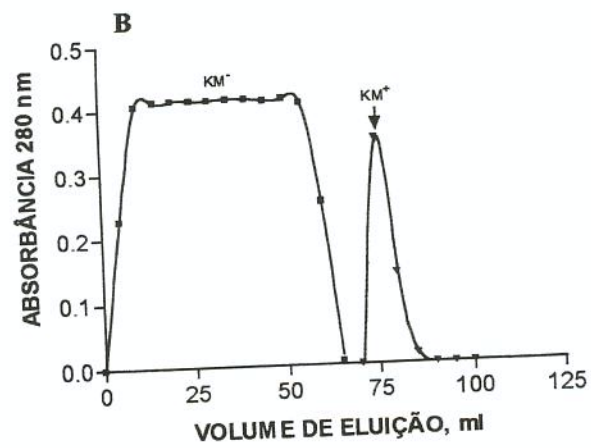
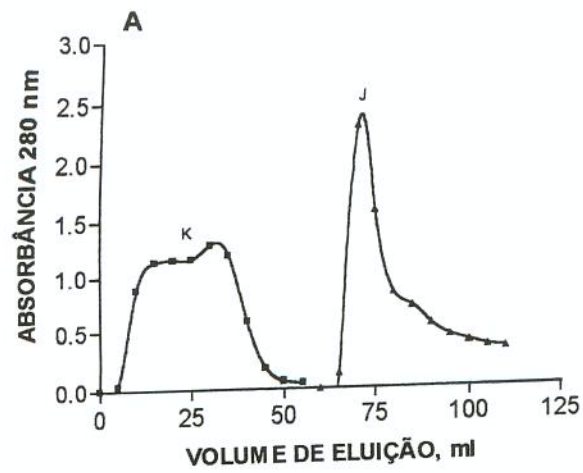


FIGURA 2. Análise eletroforética da fração KM⁺ purificada por cromatografia de afinidade. 2,6 µg de KM⁺ e 3,0 µg da amostra de jacalina homogênea não fervidas (A) ou submetidas a fervura a 100°C por 3 minutos (B) foram analisadas por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 12,5% (p/v)). O gel foi corado pelo método de impregnação por prata. Pistas 1A e 1B, amostras de KM⁺ usadas como padrão; pistas 2A e 2B, amostras de preparações da lectina purificada KM⁺; pistas 3A e 3B, amostras de jacalina.

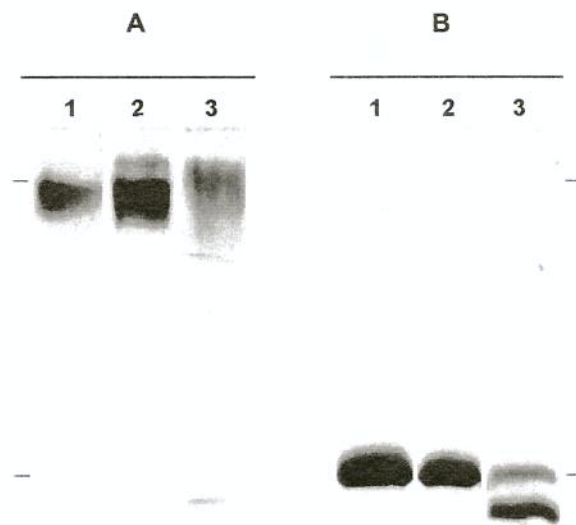


FIGURA 3. Análise eletroforética da lectina KM⁺ biotinilada. Após reação de acoplamento da biotina à lectina purificada, 3,0 µg da amostra foram aplicadas em gel poliacrilamida 12,5% (p/v), sistema SDS-PAGE. O gel foi corado pelo método de prata. Pista A, amostra de KM⁺ biotinilada, não submetida a fervura, apresentou uma banda com massa molecular entre 55 e 97 kDa; pistas B, amostra de KM⁺ biotinilada fervida por 30 minutos, apresentou banda com massa molecular entre aproximadamente 14 e 20 kDa. As posições de migração de proteínas com peso molecular conhecido, expressos em kDa, estão indicadas ao lado esquerdo da figura.

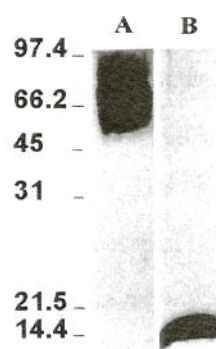


FIGURA 4. Secções de cerebelo de rato do período embrionário coradas com hematoxilina-eosina. Cortes parassagitais de córtex cerebelar de rato em idades gestacionais de E13 (A e B), E15 (C), E17 (D), E18 (E) e E21 (F). O retângulo, em A, representado em maior aumento em B, mostra células em divisão mitótica (indicadas por cabeças de seta), na superfície subventricular. As letras indicam: c, região caudal; r, região rostral; CP, plexo coróide; GT, trígono germinativo; if, camada fibrosa; PCL, camada de células de Purkinje; EGL, camada de células granulares. As setas indicam o posicionamento rostral da EGL. Aumento original: A, C, D e E, 33x e B, 132x.

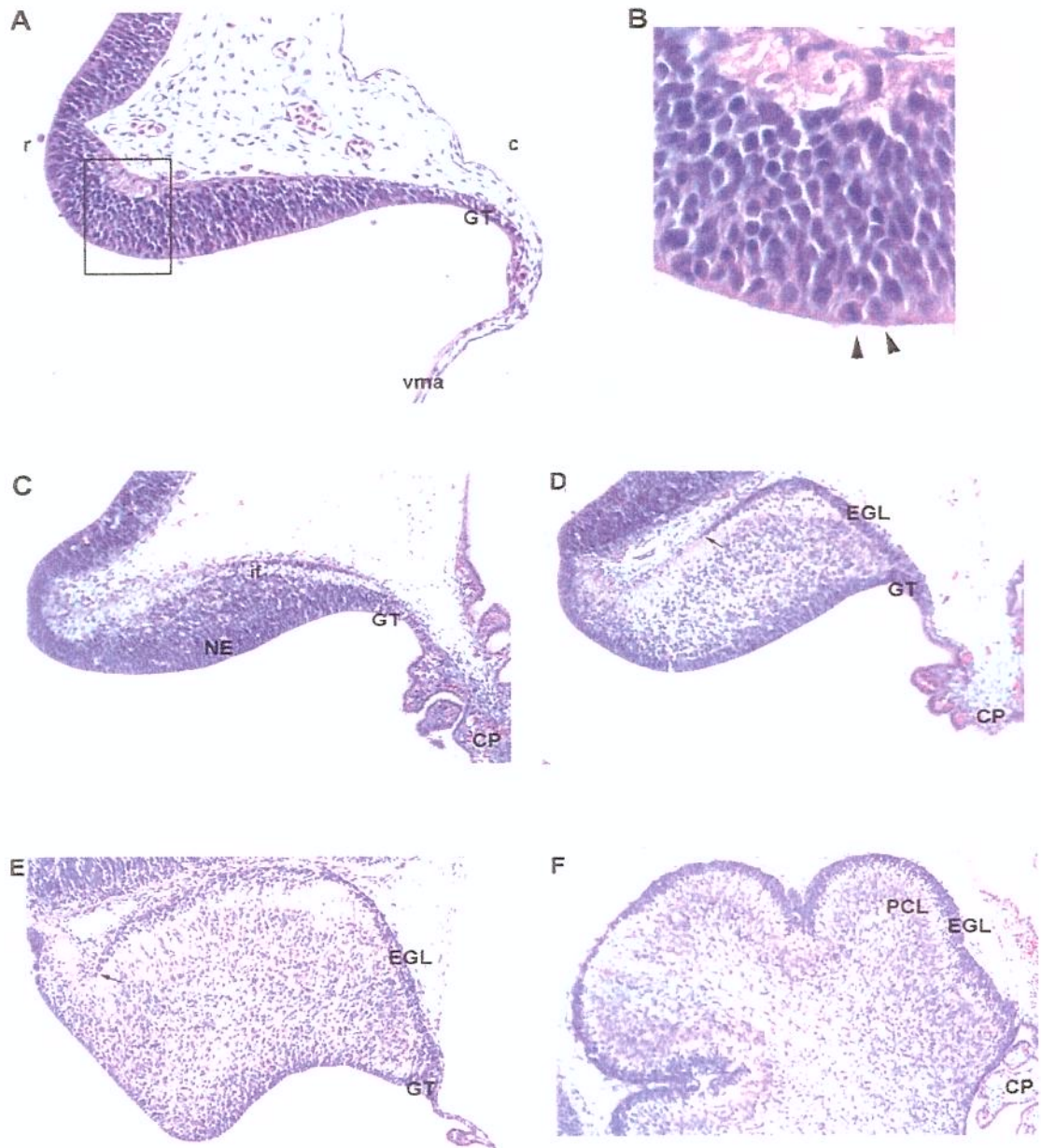


FIGURA 5. Secções de cerebelo de rato do período pós-natal coradas com hematoxilina-eosina. Cortes médio-sagittais ou parassagittais de córtex cerebelar em idades P0 (A), P5 (B), P10 (C), P15 (D), P21 (E) e adulto (F). P0: EGL composta por uma camada com 4 a 5 células de espessura, que aumentou progressivamente entre P5 e P10, diminuiu a partir de P15 e reduziu-se a uma camada com 1 célula de espessura em P21; PCL: camada celular pluriestratificada em P0, abaixo da EGL; em P10 as células estão dispostas em uma única camada; MOL: camada molecular; GL, camada granular; WM, substância branca; Em P21, o padrão de laminação do cerebelo foi semelhante ao do rato adulto. Cabeça de seta indica a fissura prima; seta, fissura secunda. Aumento original 33x.

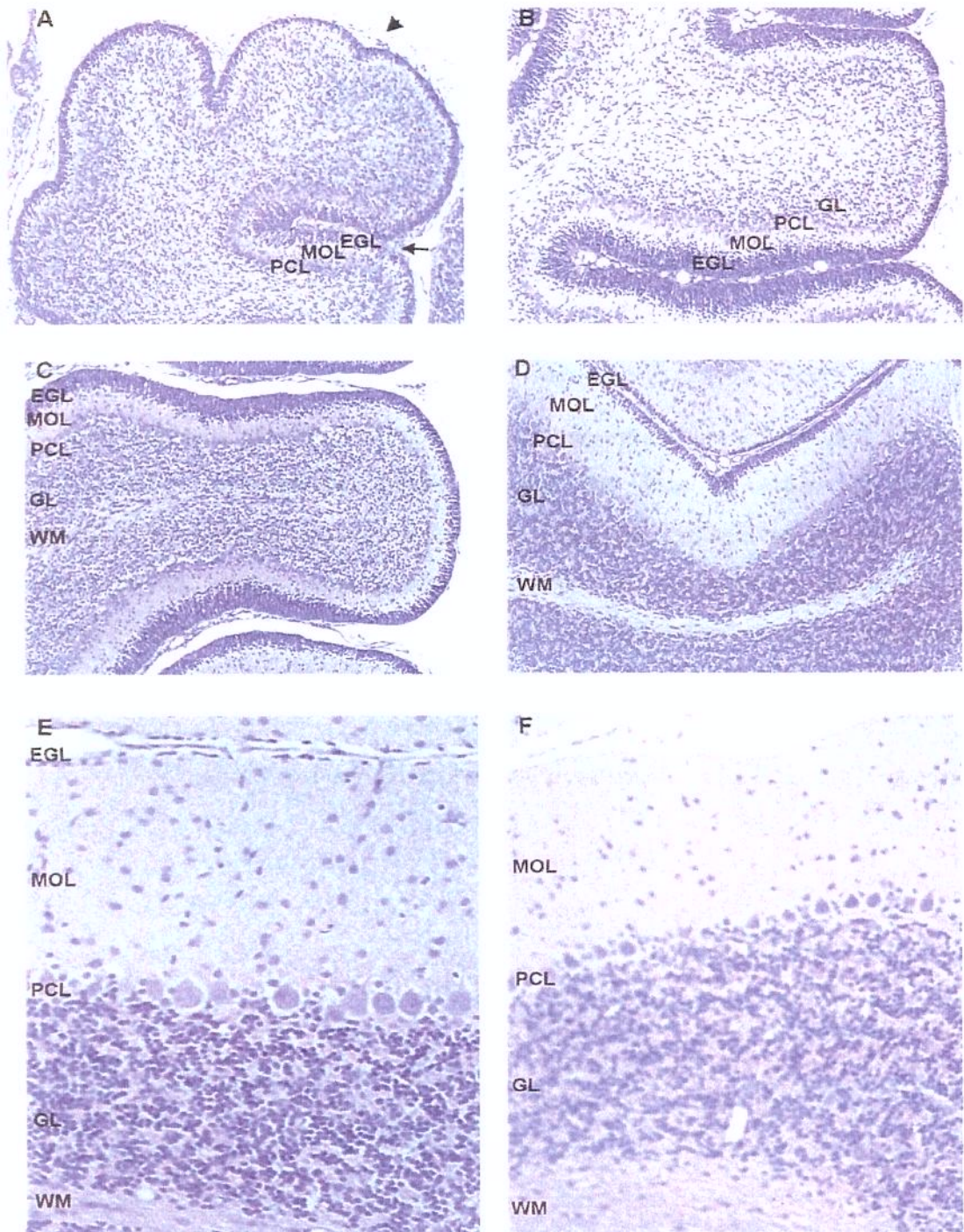


FIGURA 6. Efeito do tratamento de secções seriadas de cerebello com tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6,0, em forno microondas, sobre a detecção histoquímica de ligantes de KM^+ . As secções (5 μ m) tratadas (B e D) exibiram intensificação da expressão de ligantes de KM^+ quando comparadas às secções não tratadas (A e B). As ilustrações B e D, mostram o aumento da intensidade de expressão de ligantes de KM^+ no citoplasma de células de Purkinje e granulares. Em E (secções não tratadas) e F (secções tratadas) representam os controles da reação obtidos por omissão de biotinil- KM^+ . Aumento original A, B, D e E 66x; C e D, 330x .

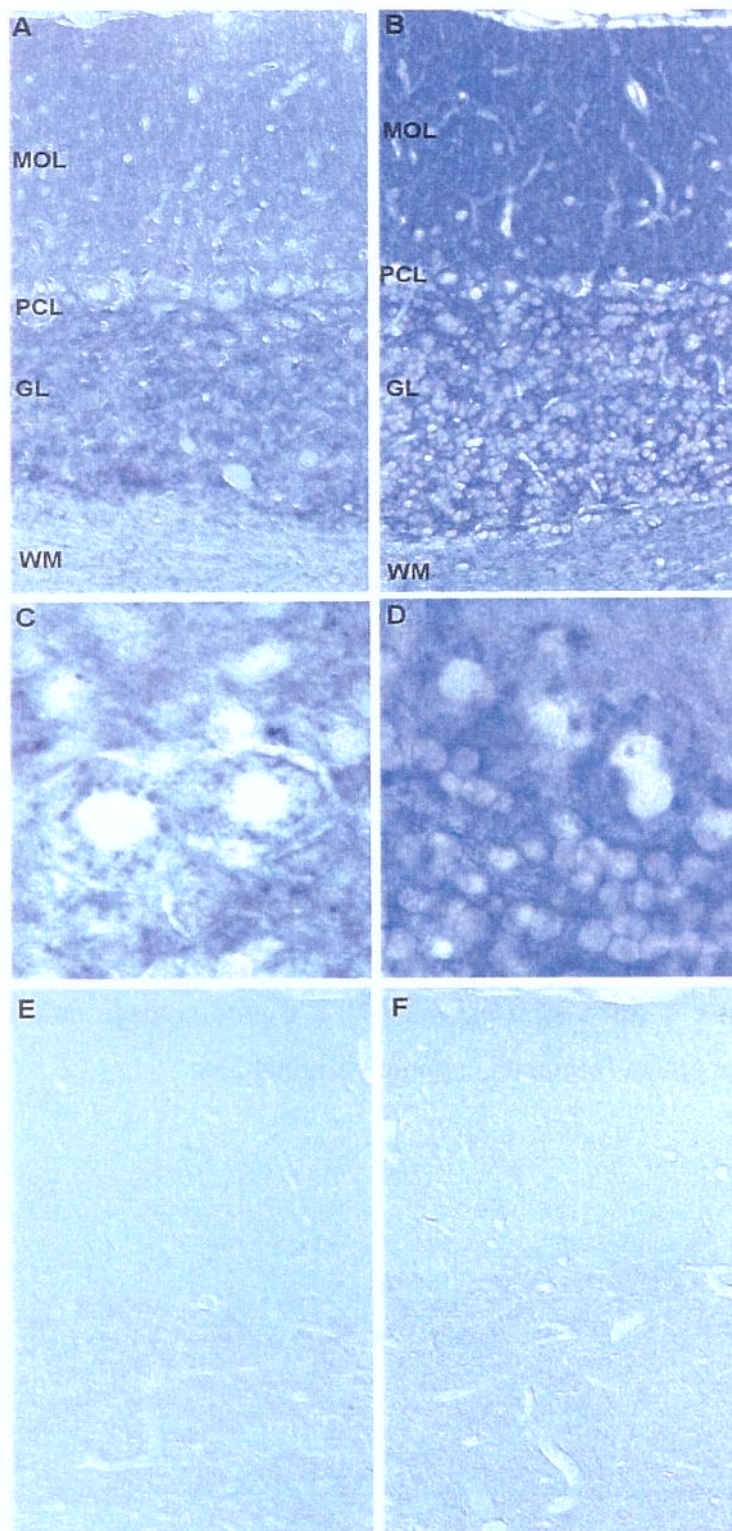


FIGURA 7. Intensidade de marcação de secções cerebelares por biotinil-KM⁺ em função do tempo de reação da enzima fosfatase alcalina. Secções seriadas cerebelares (5 µm) de ratos machos adultos foram incubadas com 0,8 µg/ml de KM⁺, que foi detectada utilizando kit ABC conjugado com fosfatase alcalina e revelada usando NBT/BCIP por 0 (A), 1 (B), 5 (C), 10 (D), 15 (E), 20 (F), 25 (G) e 30 (H) minutos à temperatura ambiente. As linhas traçadas em preto exemplificam as superfícies usadas para determinação dos valores de cinza das camadas molecular (E) e granular (F) usando o programa NIH Image. As cabeças de seta exemplificam o aspecto das células de Purkinje usadas para estimar o valor de cinza no citoplasma. As medidas foram tomadas no lóbulo VIII, entre o sulco intra-piramidal 1 e a profundidade da fissura secunda. Microfotografias em óptica Nomarski, aumento original 33x.

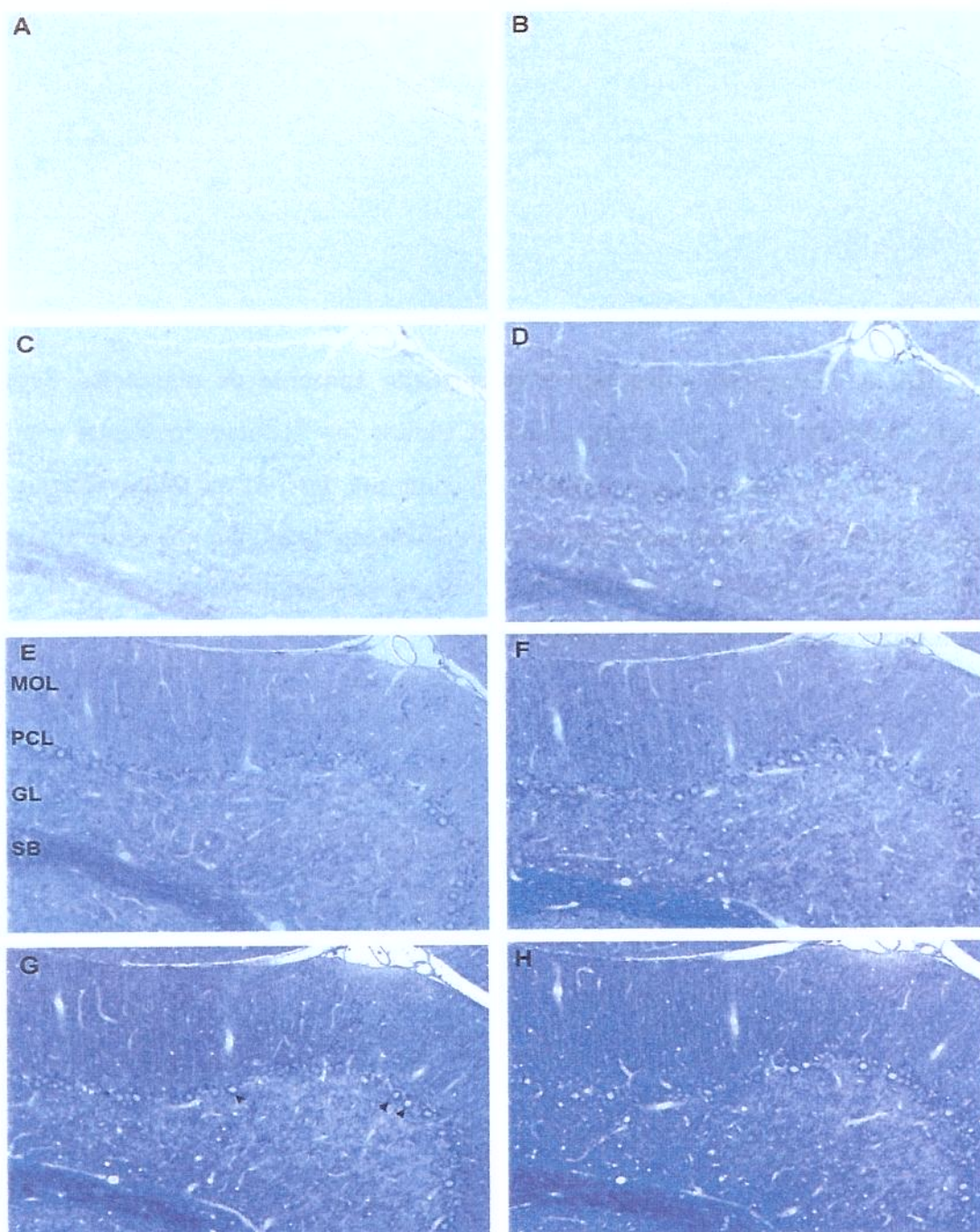


FIGURA 8. Interação entre tipo e intensidade aparente de marcação. Secções seriadas cerebelares (5 μm) de ratos machos adultos ($n= 7$) foram incubadas com 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de KM⁺ e revelada com NBT/BCIP, conforme descrito na figura anterior. As figuras A e D, são representativas do tempo de revelação de 15 minutos, e as figuras B, C e E para tempo igual a 30 minutos. Em A e B, células ganglionares; C, vaso da base; D e E, plexo coróide. Aumento original 132x.

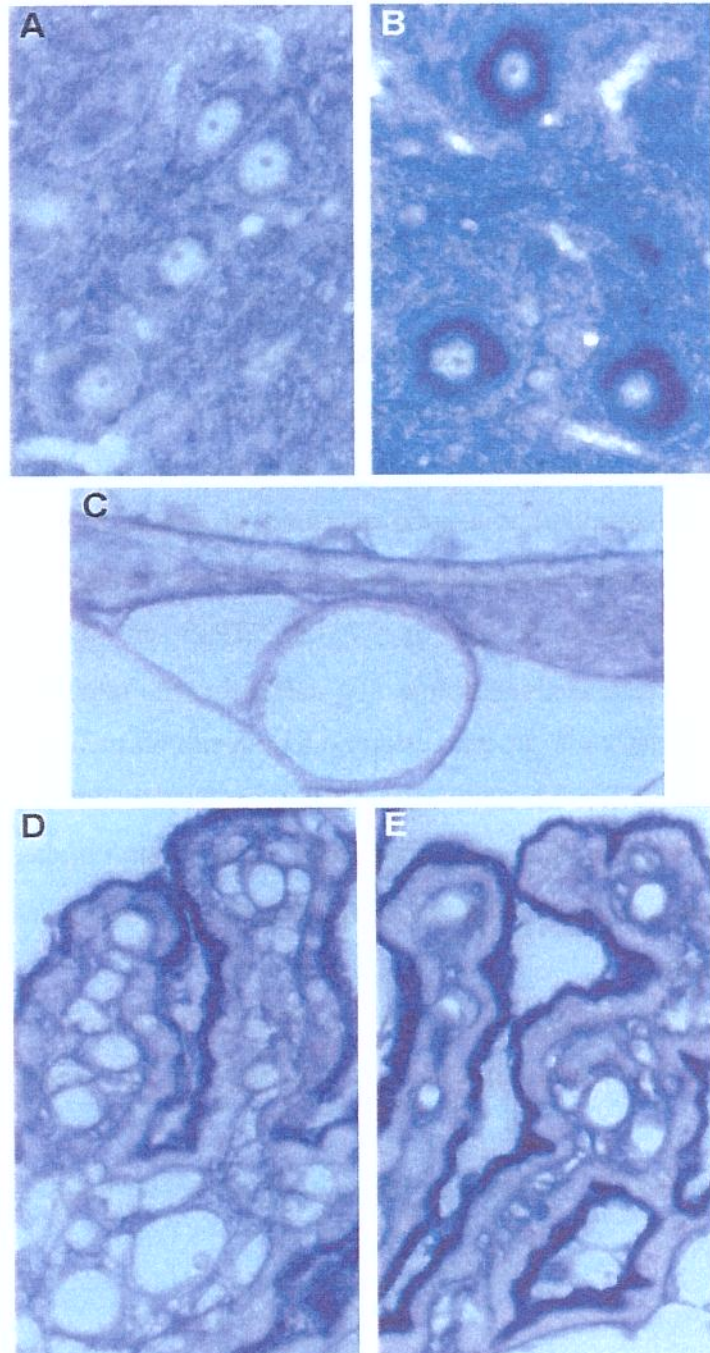


FIGURA 9. Relação entre tempo de reação e valor de cinza para a marcação das camadas molecular (A), células de Purkinje (B) e granular (C). Secções seriadas cerebelares (5 μm) de sete ratos machos adultos foram incubadas com 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de KM^+ , que foi detectado com o kit ABC fosfatase alcalina e incubadas com NBT e BCIP por 0, 1, 5, 10, 15 (D, F, H respectivamente), 20, 25 e 30 (E, G, I respectivamente) minutos à temperatura ambiente. Os valores de cinza das camadas molecular (A) e granular (C) foram determinados usando microscopia óptica de transmissão, aumento 100x, em superfícies como as ilustradas na Fig. 7 (C e D) (área média, faixa de variação: MOL, 69111 μm^2 , 28605-81383 μm^2 , $n = 7$; GL, 57962 μm^2 , 37558-77857 μm^2). Os valores de cinza de células de Purkinje (10 células/secção/rato) foram determinados usando aumentos de 400x em superfícies como a ilustrada no painel F, de tal modo que o núcleo e o citoplasma fossem claramente distinguíveis (área média, faixa de variação: 1108 μm^2 , 926-1319 μm^2). As retas de regressão linear foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados, usando o programa GraphPad Prism, e obedeceram a equação da forma $y=ax+b$, tais que:

$Y = (3,66 \pm 0,1294) X + (77,87 \pm 2,16)$, $r^2 = 0,9378$, tempo 0-25 min, para a MOL;

$Y = (3,039 \pm 1,18 \times 10^{-7}) X + (79,49 \pm 2,04 \times 10^{-6})$, $r^2 = 1,0$, tempo 0-25 min, para a GL;

$Y = (4,041 \pm 3,2 \times 10^{-7}) X + (84,20 \pm 5,6 \times 10^{-6})$, $r^2 = 1,0$, tempo 0-20 min para as células de Purkinje.

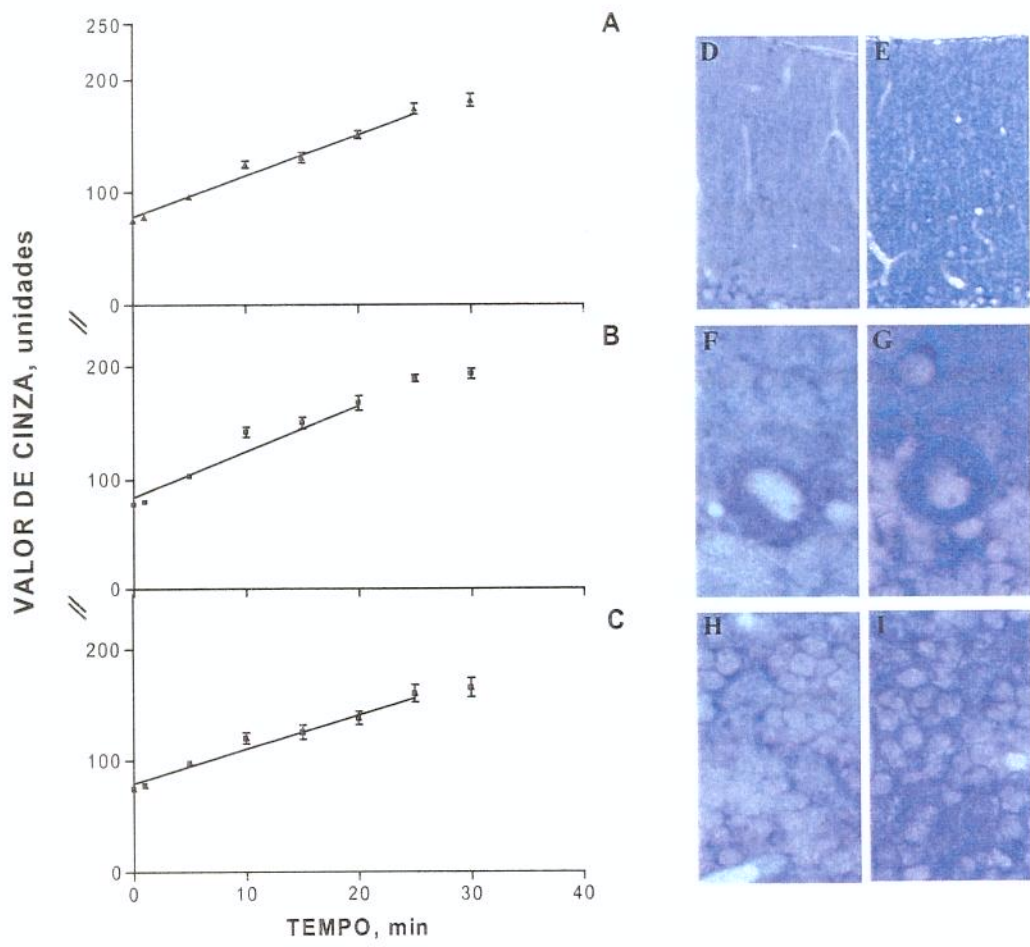


FIGURA 10. Relação entre concentração de biotinil- KM^+ e valor de cinza para a marcação das camadas molecular (A), células de Purkinje (B) e granular (C) e substância branca (D). Secções seriadas cerebelares (5 μm) de ratos machos adultos foram incubadas com 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,2, 1,6 $\mu\text{g/ml}$ de KM^+ , que foi detectado com o kit ABC-fosfatase alcalina e incubadas com NBT e BCIP por 15 minutos à temperatura ambiente. Os valores de cinza das camadas molecular, granular e substância branca foram determinados usando microscopia óptica de transmissão, aumento 100x. Os valores de cinza das células de Purkinje (10 células/secção/rato) foram determinados usando aumentos de 400x. Os gráficos de regressão não linear foram obtidos usando o programa GraphPad Prism.

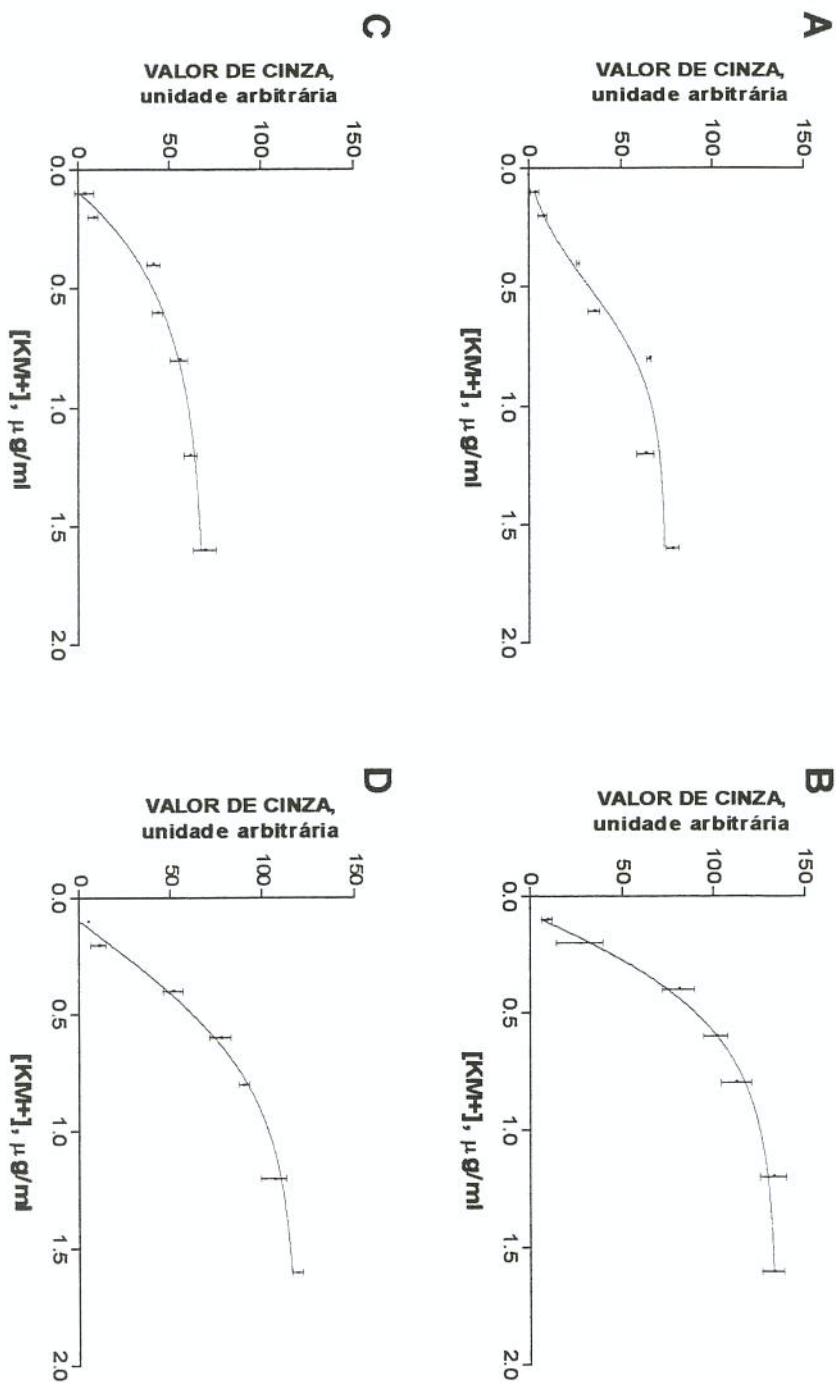


FIGURA 11. Efeito de açúcares e da peroxidase de rábano sobre a ligação de biotinil- KM^+ às secções cerebelares. Secções seriadas de cerebelo de ratos adultos ($n=7$) foram incubadas por 16 horas com biotinil- KM^+ 0,8 $\mu\text{g/ml}$ ou com biotinil- KM^+ pré-incubado à temperatura ambiente com D-galactose 0,4 M, D-manose 0,1 M, metil α -D-manopiranosídeo 0,1 M e HRP 5 μM . A ligação de KM^+ biotinilada às secções foi detectada utilizando o conjugado ABC-fosfatase alcalina e NBT/BCIP. As medidas dos valores de cinza (painel I) foram tomadas de regiões padronizadas na MOL, GL e WM e determinadas usando microscopia de transmissão, aumento 100x. Os valores de cinza para as camadas de células de Purkinje (10 células/secção/rato) foram determinados usando aumento de 400x. Os valores tomados das secções que foram incubadas com biotinil- KM^+ , não apresentados no gráficos correspondem a 100% do valor de cinza e foram em unidades: ± 70 u para a MOL; ± 60 u para a GL; ± 94 u para a PCL e ± 86 u para a substância branca (WM). Os dados foram analisados usando programa GraphPad Prism.

Painel II- Ligação de KM^+ à secções de cerebelo na presença de monossacarídeos e da glicoproteína peroxidase, nas mesmas condições descritas no painel I. A, D-galactose 0,4 M; B, D-manose 0,1 M; C, metil α -D-manopiranosídeo 0,1 M e D, HRPO 5 μM .

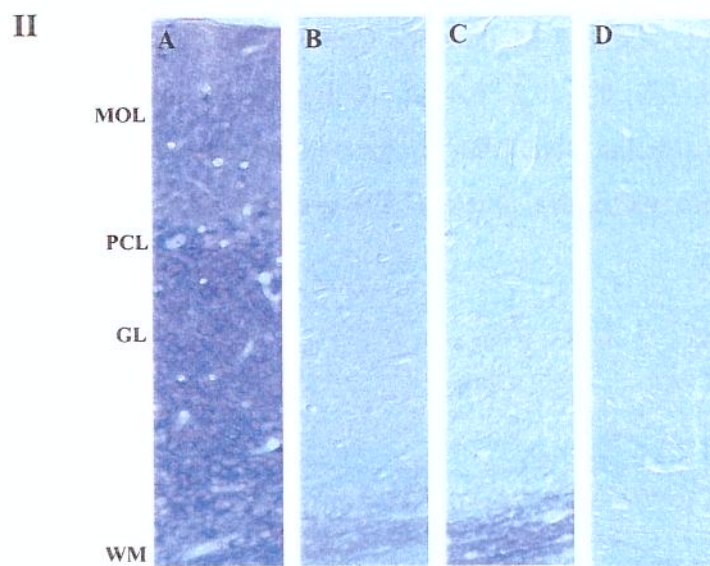
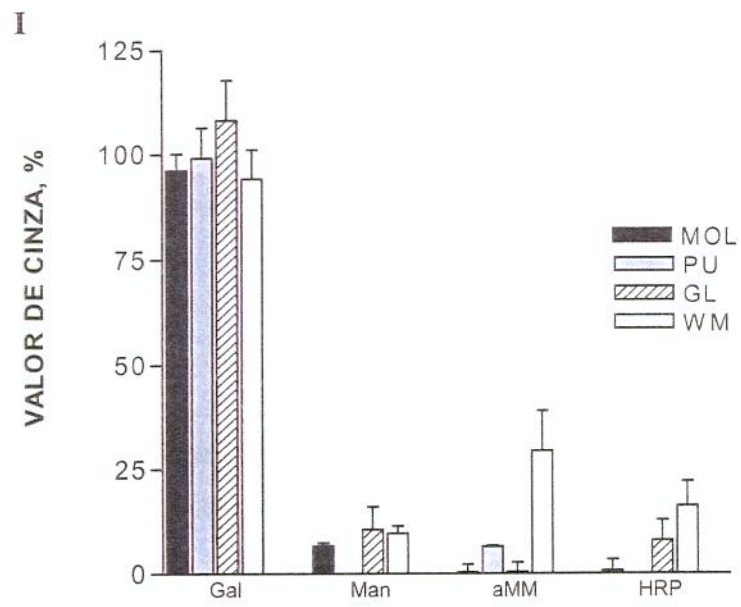


FIGURA 12. Efeito da concentração de manose e metil- α -D-manopiranosídeo sobre a ligação de biotinil- KM^+ às secções cerebelares. Secções seriadas de cerebelo de ratos adultos (n=7) incubadas biotinil- KM^+ 0,8 μ g/ml ou com biotinil- KM^+ pré-incubado à temperatura ambiente com D-manose nas seguintes concentrações: 0,0005, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,25, 0,5, 0,1, 0,2, 0,4 M ou com metil α -D-manopiranosídeo: 0,0005, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,25, 0,5, 0,1, 0,2, 0,4 M. A ligação foi detectada utilizando o conjugado ABC-fosfatase alcalina e NBT/BCIP. As medidas dos valores de cinza foram tomadas conforme descrito na figura anterior. Os gráficos foram obtidos usando o programa GraphPad Prism.

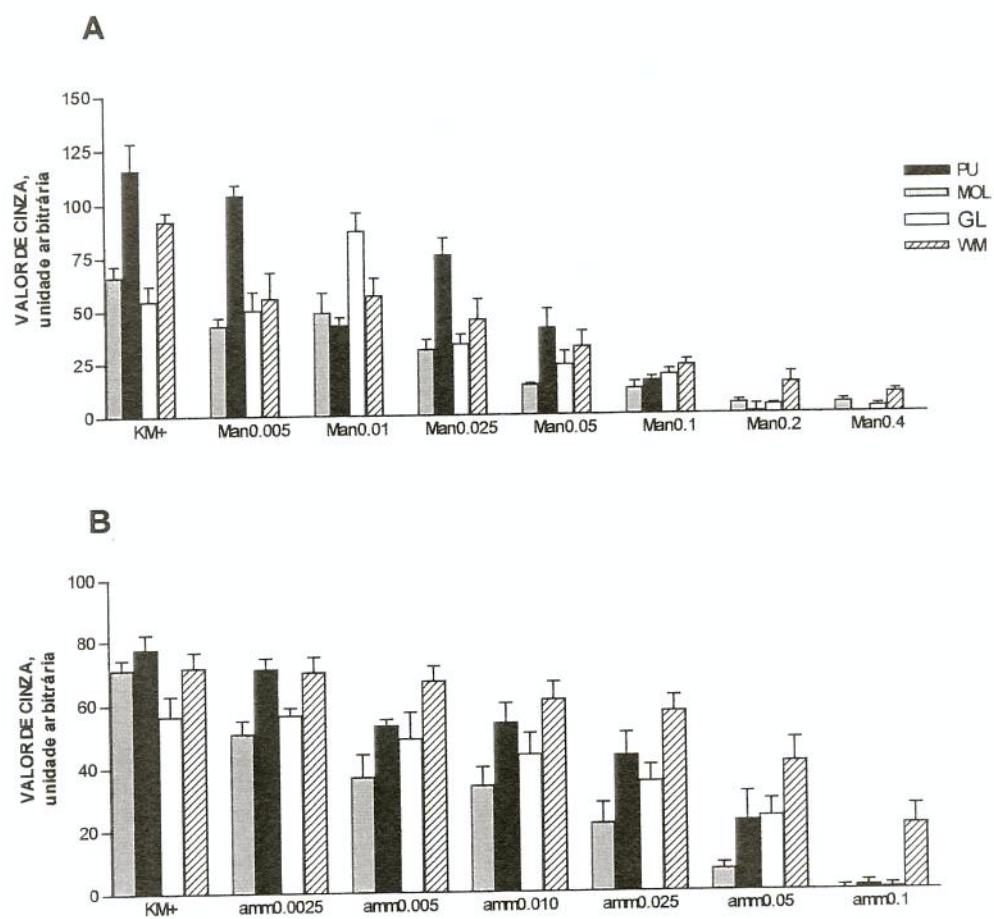


FIGURA 13. Expressão de ligantes da lectina KM⁺ no cerebelo embrionário. Secções cerebelares sagitais (5µm) foram incubadas com 0,8 µg/ml de biotinil-KM⁺ por 16 horas à temperatura ambiente. A ligação da lectina ao tecido foi detectada pelo sistema ABC-fosfatase alcalina, usando NBT/BCIP como substrato. A, 15; B, 16; C, 18; D, 20 e E, 21 dias gestacionais. A seta indica a posição rostral da EGL; GT, trígono germinativo; PCL, camada de células de Purkinje; NE, neuroepitélio; r, rostral; c, caudal. Aumento original A-D 66x; E 33x.

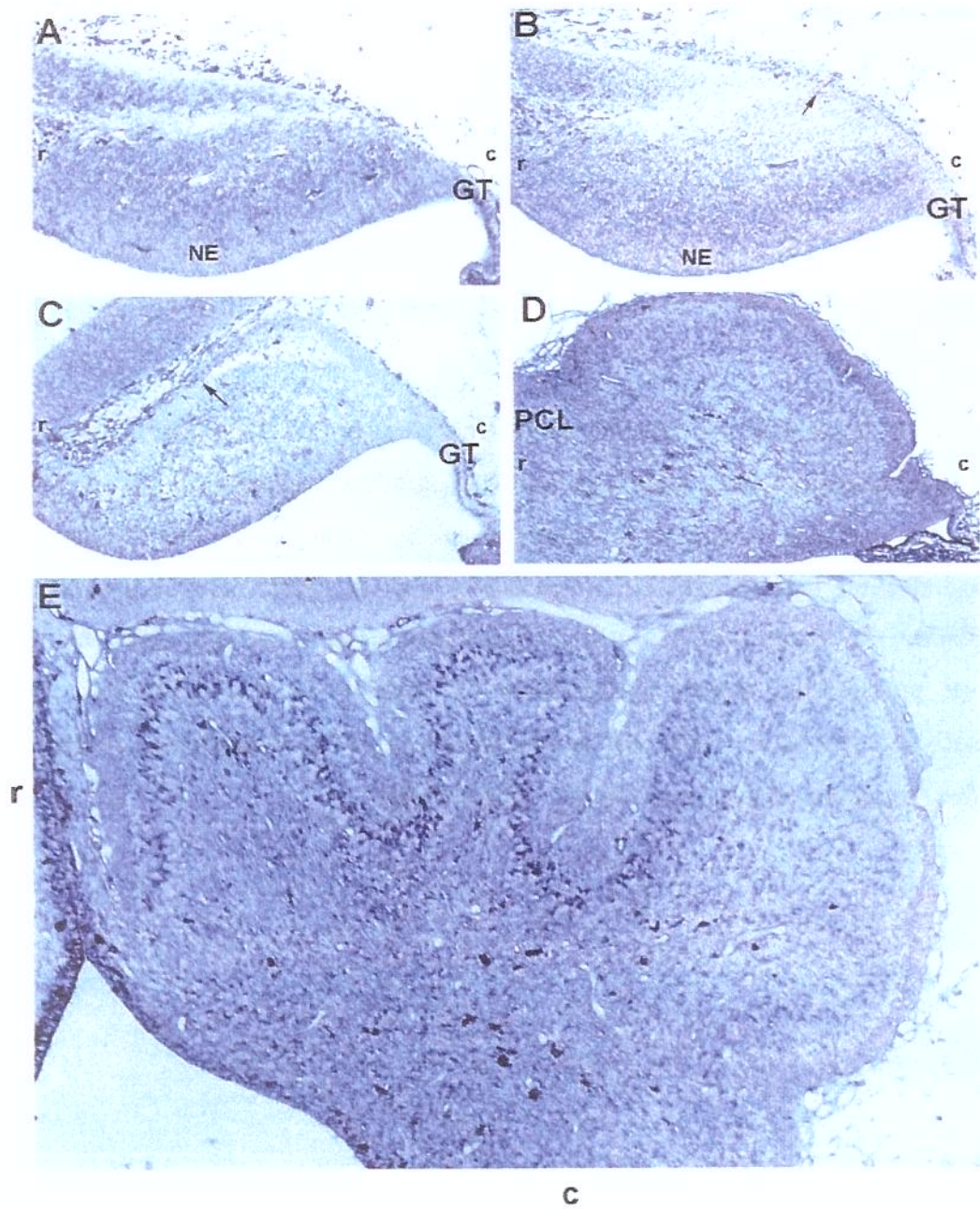


FIGURA 14. Expressão de ligantes da lectina KM⁺ no cerebelo embrionário E15. Secções cerebelares (5 µm) incubadas com 0,8 µg/ml de biotinil-KM⁺ por 16 horas à temperatura ambiente. A ligação da lectina ao tecido foi detectada pelo sistema ABC-fosfatase alcalina, usando NBT/BCIP como substrato. A, região anterior do cerebelo e mesencéfalo; B, região medial; C, região posterior e plexo coróide (CP); D, região posterior próximo ao trígono germinativo; E, detalhe da marcação; GT, trígono germinativo; r, rostral; c, caudal; SP, superfície pial; V, zona ventricular; * indica vasos marcados. Aumento original A-C 66x; D 132x; E 330x.

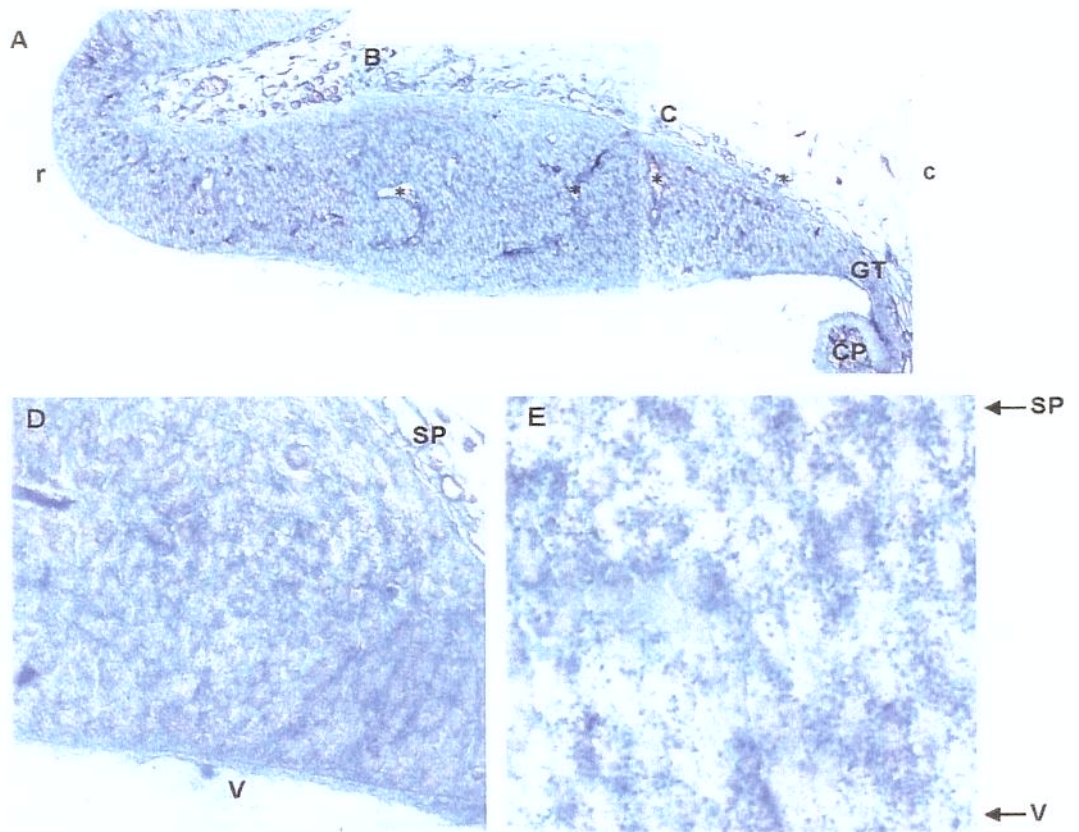


FIGURA 15. Expressão de ligantes da lectina KM⁺ em secções sagitais do córtex cerebral embrionário. Secções de córtex cerebral (5µm) do estágio embrionário E18 foram incubadas com 0,8 µg/ml de biotinil-KM⁺ por 16 horas à temperatura ambiente. A ligação da lectina ao tecido foi detectada pelo sistema ABC-fosfatase alcalina, usando NBT/BCIP como substrato. A, córtex cerebral com células em disposição colunar; B e C, ilustração da marcação de processos e citoplasma celular; setas, indicam processos marcados; SP, superfície pial. Aumento original A 132x; B e C 330x.

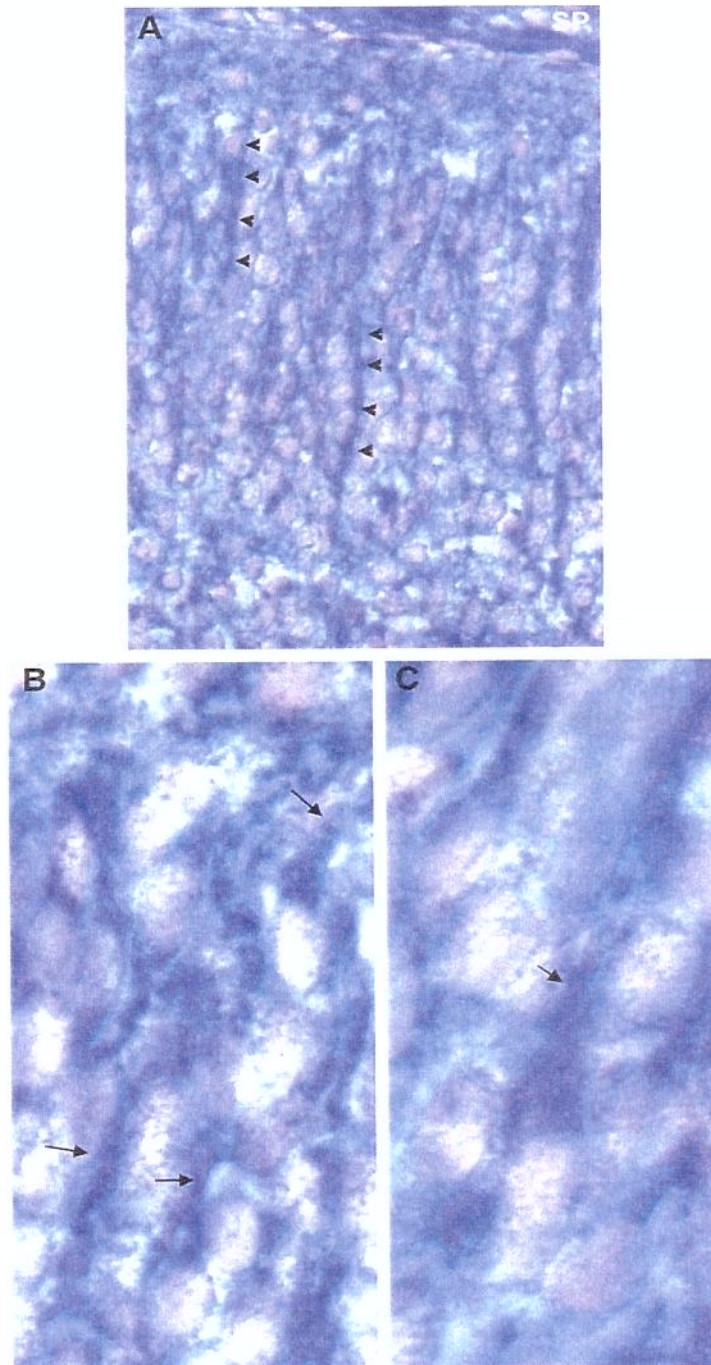


FIGURA 16. Expressão de ligantes da lectina KM⁺ no tecido cerebelar durante o desenvolvimento pós-natal. Secções cerebelares (5 µm) foram incubadas com 0,8 µg/ml de biotinil-KM⁺ a temperatura ambiente. A ligação da lectina ao tecido foi detectada usando sistema ABC-fosfatase alcalina e NBT/BCIP como substrato. A, P0; B, P5; C, P10; D, P15; E, P21 e F, AD (adulto). EGL, camada germinativa externa; PZ, zona proliferativa; MZ, zona pré-migratória; MOL, camada molecular; PCL, camada de células de Purkinje; GL, camada granular; * indica vasos. Aumento original 33x.

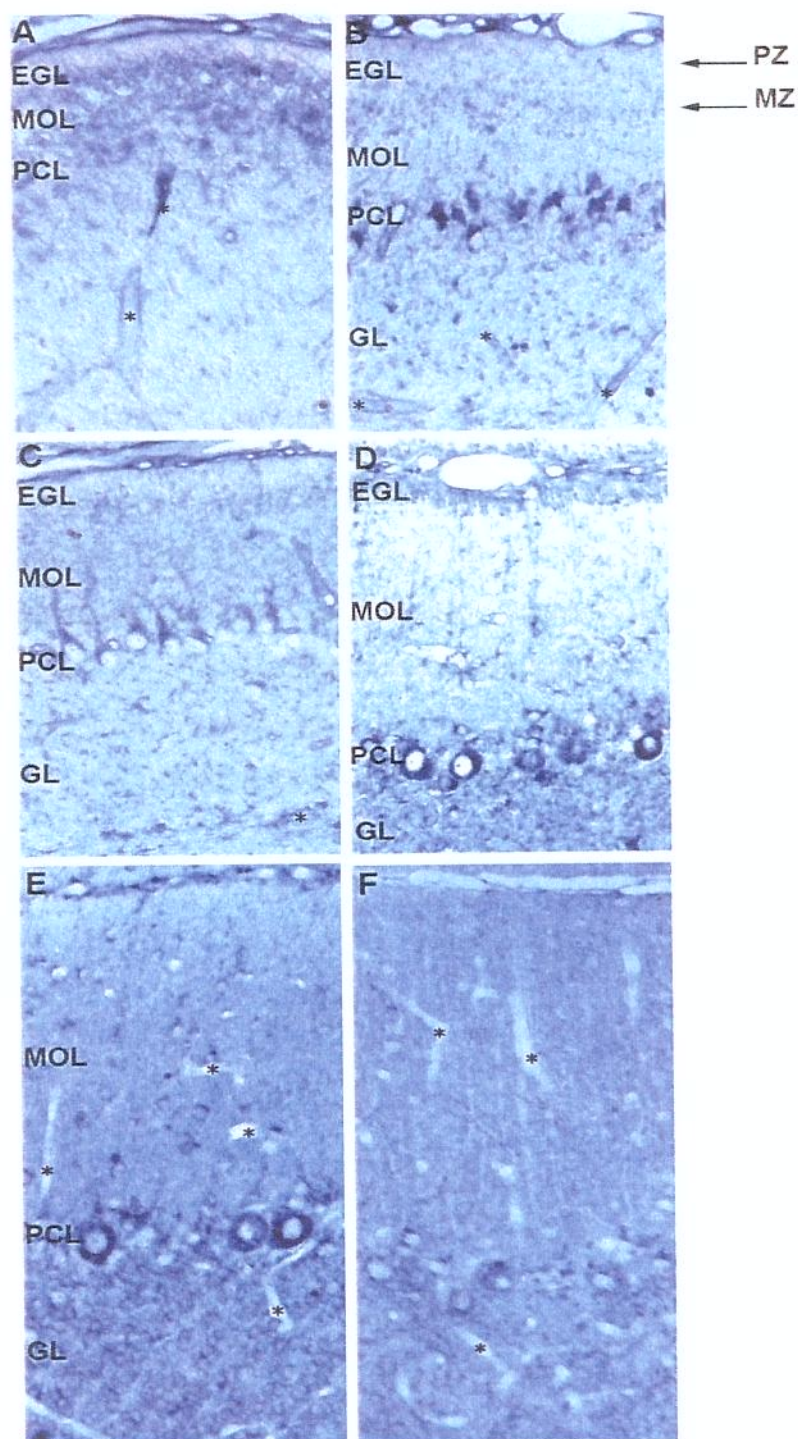


FIGURA 17. Detalhe da EGL mostrando ligantes da lectina KM⁺ durante a ontogenia cerebelar. Secções cerebelares sagitais de A, E18; B, E20; C, P0; D, P5; E, P10 e F, P15 foram incubadas com 0,8 µg/ml de biotinil-KM⁺. A ligação da lectina ao tecido foi detectada pelo sistema ABC-fosfatase alcalina, usando NBT/BCIP como substrato. Biotinil-KM⁺ marcou a matriz extracelular fraca (A-D), moderada (E e F) e de forma puntata. Na zona pré-migratória (MZ) a marcação foi mais intensa que na zona proliferativa (PZ) (E-F). SP, superfície pial. Aumento original 330x.

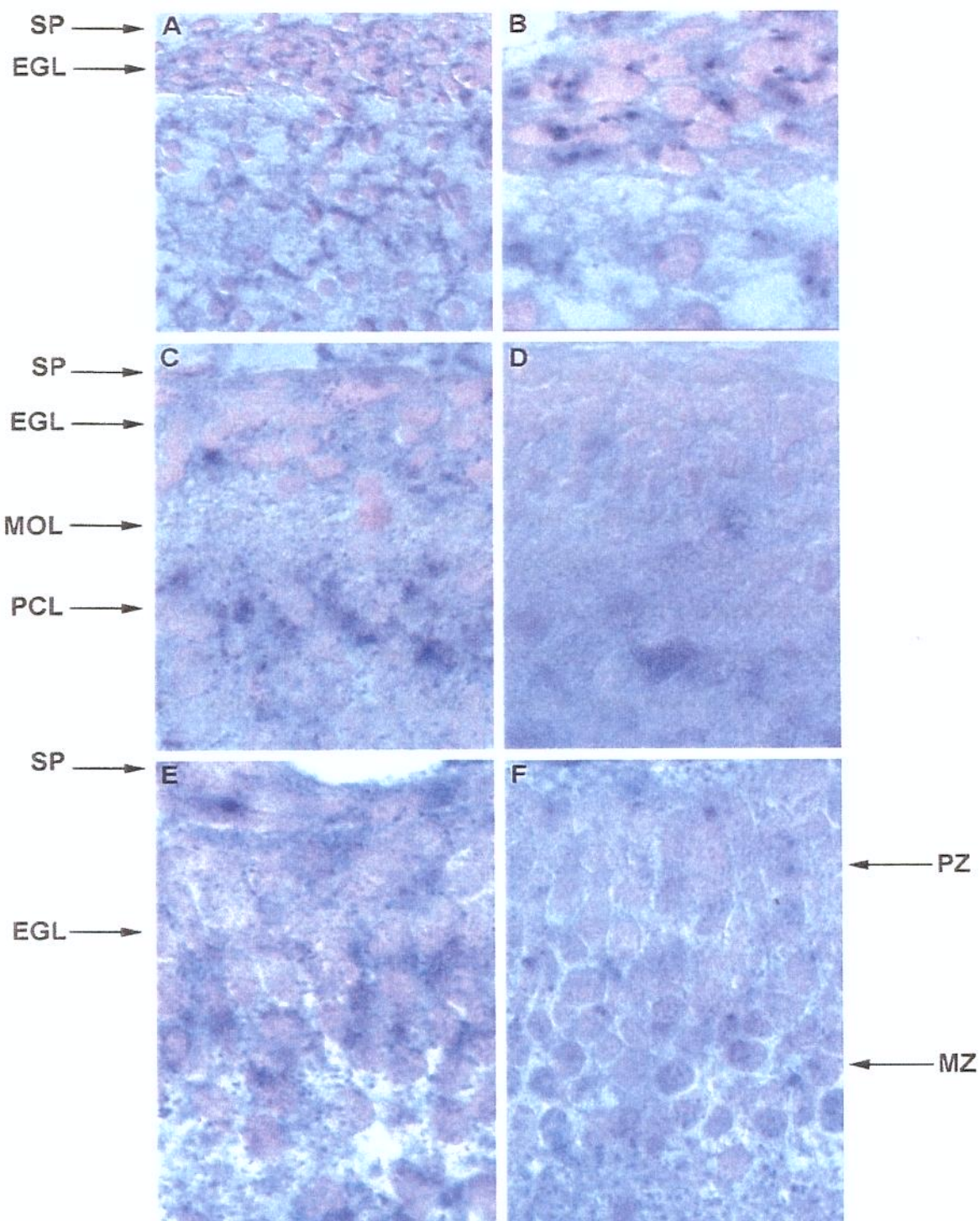


FIGURA 18. Expressão de ligantes KM⁺ na PCL. Secções de cerebelo de rato do estágio pós-natal foram incubadas com 0,8 µg/ml de biotinil-KM⁺, que foi detectada com kit ABC-fosfatase alcalina e revelada com NBT/BCIP. Biotinil-KM⁺ marcou fortemente em P5 (A) mitra apical das células de Purkinje; em P10 (B) e P21 (C) as células de Pukinje exibiram citoplasma fortemente marcados de forma puntata. Os interneurônios próximos a camada de células de Purkinje e as células da glia (cf. seta) foram fortemente marcados (C). Cabeça de seta indica interneurônios (células estreladas e/ou em cêsto) com forte marcação em citoplasmática e em processos. Aumento original A e B 330x, C 132x.

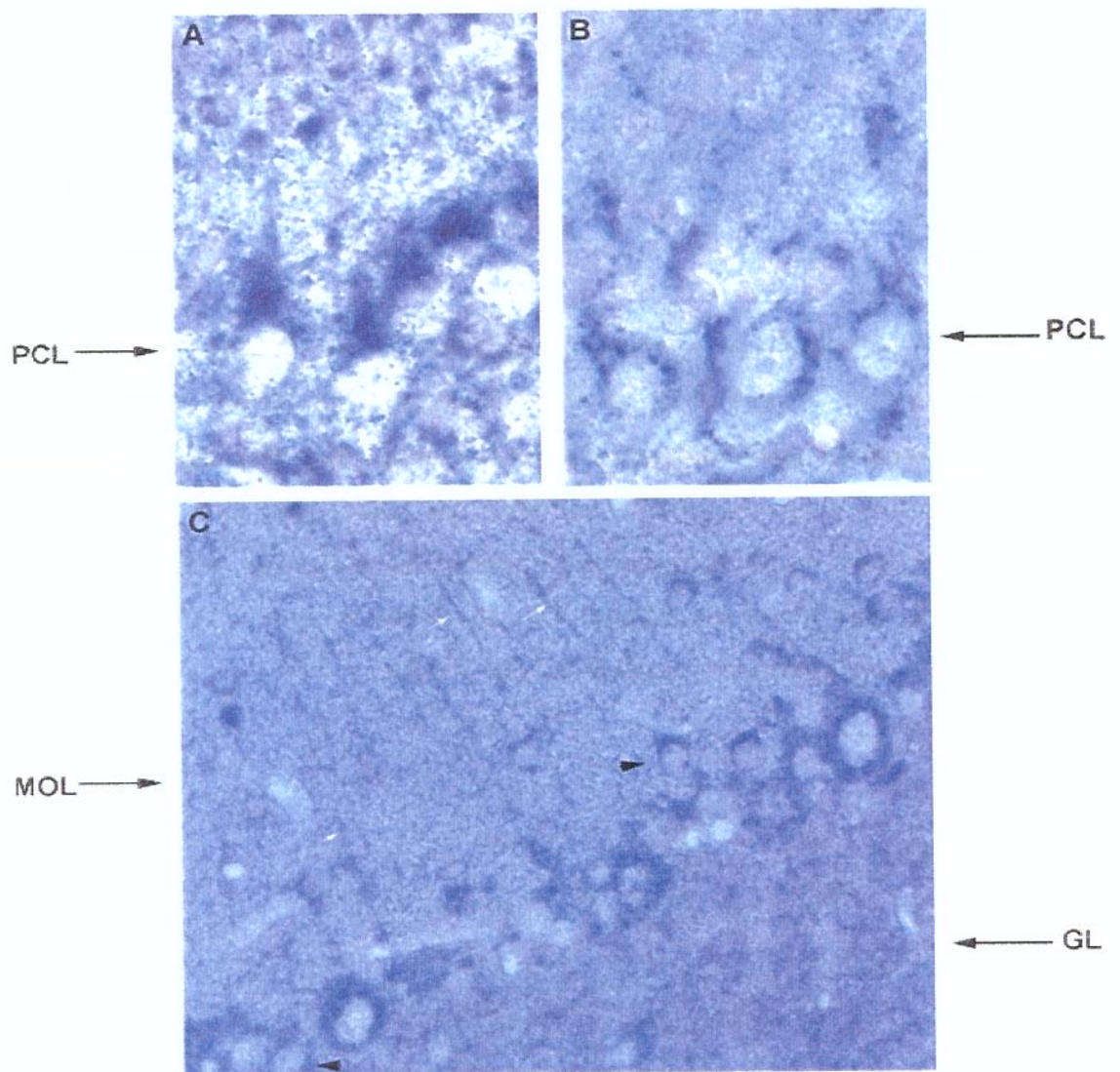


FIGURA 19. Expressão de ligantes da lectina KM⁺ no cerebello de rato adulto. Secções de cerebello de ratos adulto foram incubadas com 0,8 µg/ml de biotínil-KM⁺ que foi detectada com kit ABC-fosfatase alcalina e revelada com NBT/BCIP. Biotínil-KM⁺ marcou fortemente o fino citoplasma em “anel” das células granulares (A e B). Grupos de células marcados foram intercalados por grupos de células não marcados. Figura B, detalhe da GL com marcação delicada em citoplasma e núcleo claro; setas indicam marcação intersticial. Aumento original A 132x, B 330x.

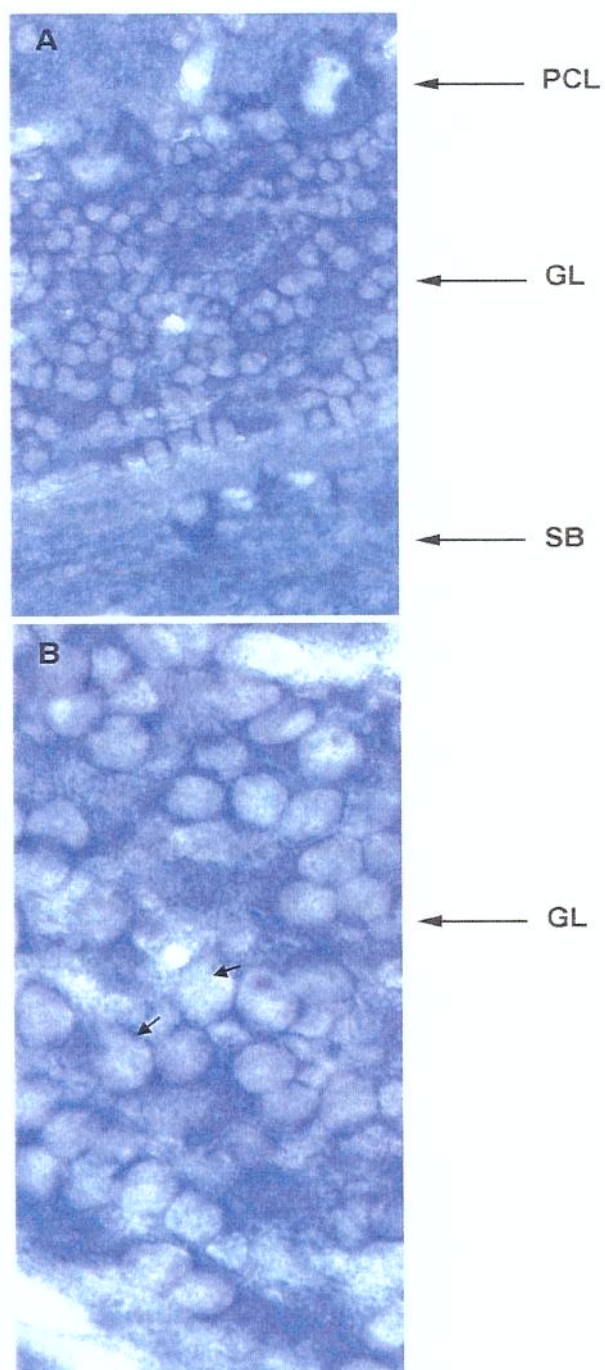
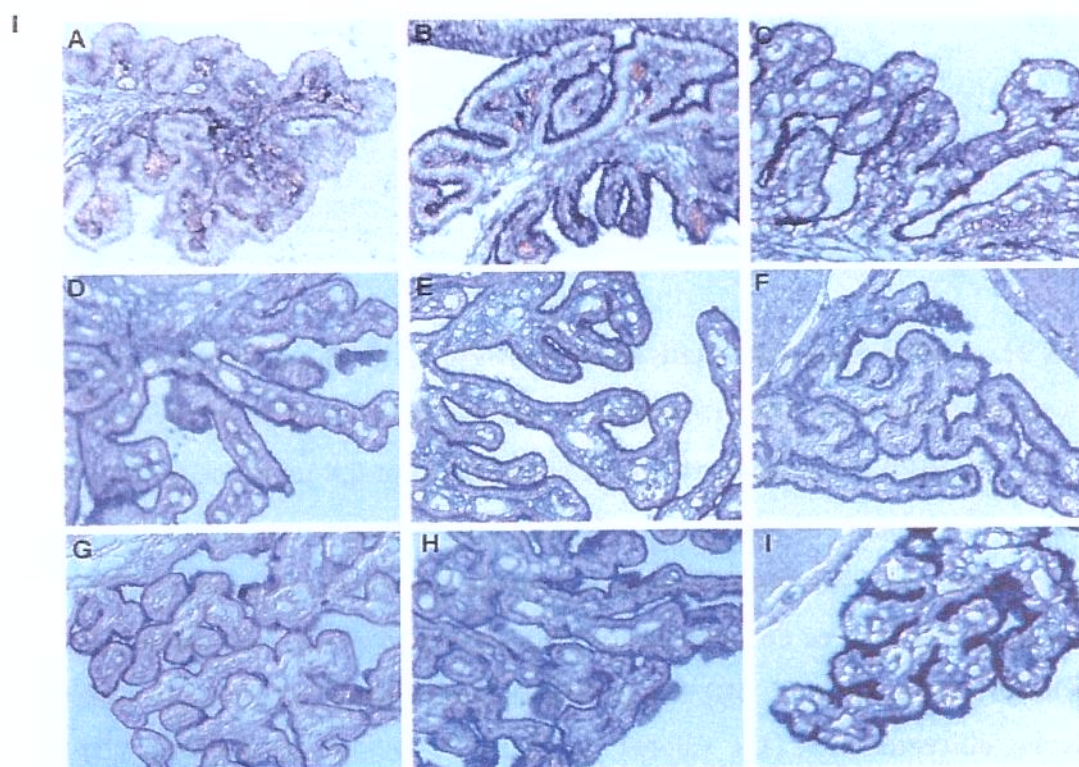


FIGURA 20. Expressão de sítios ligantes KM^+ no plexo coróide durante a ontogênese cerebelar. Secções cerebelares médio ou parassagital de cerebelo de rato E15 (I.A); E18 (I.B); E20 (I.C; II.A-II.I); P0 (II.D); P5 (II.E; II.J-II.O); P10 (I.F); P15 (I.G); P21 (I.H); Ad (I.I) foram incubadas com (I) 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de biotinil- KM^+ ou (II) com biotinil- KM^+ pré-incubada com D-galactose 0,4 M (II.A e II.J), D-glicose 0,4 M (II.B e II.H), D-manose 0,4 M (II.C e II.L), metil α -D-manopiranosídeo 0,1 M (II.E e II.M), 5 μM HRP (II.F e II.N) e trimanisídeo 0,1 M (II.I e II.O). A detecção da ligação da lectina ao tecido foi realizada pelo sistema ABC-fosfatase alcalina e revelada por 15 minutos com NBT/BCIP. A marcação obtida no tecido epitelial foi de fraca (I.A) a muito intensa (II.I); em vasos a marcação foi de moderada a intensa (I.A-I.I). No painel II, a marcação do plexo não foi alterada por D-galactose (II.A e II.G) e foi abolida por D-manose (II.C e II.I) ou açúcares que a contém (II.B, II.H; II.D-II.F; III e III.L). Aumento original 66x.



II

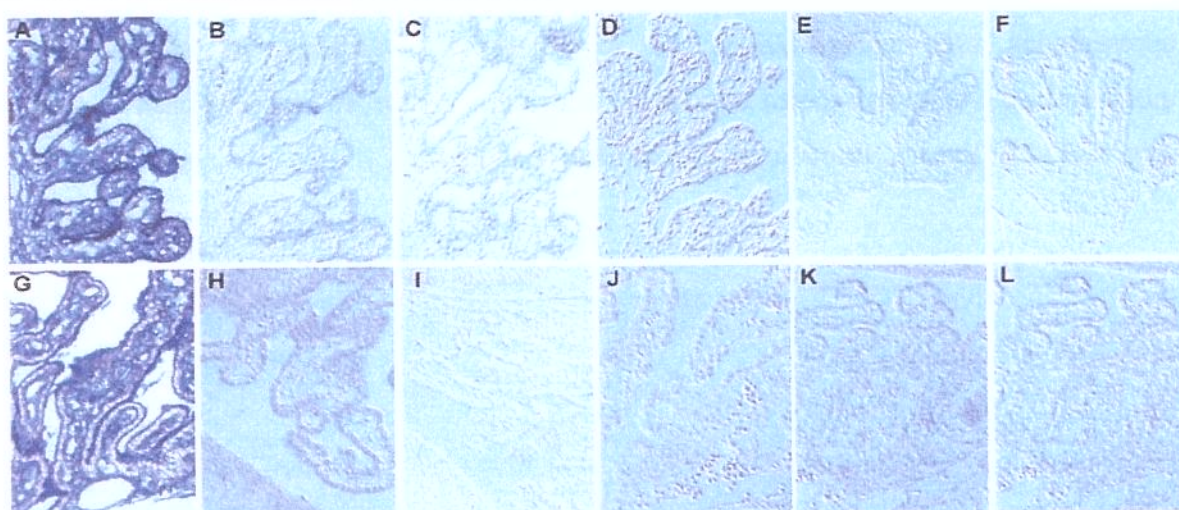


FIGURA 21. Análise semi-quantitativa da expressão da lectina KM⁺ no cerebelo de rato em desenvolvimento. Secções médio ou parassagitais (5 µm) de cerebelo de rato (A-E15, 18, 20; B-P0 ao adulto, n=4) foram incubadas com 0,8 µg/ml de biotilil-KM⁺ por 16 horas a temperatura ambiente. A lectina KM⁺ ligada ao tecido foi detectada utilizando sistema ABC-fosfatase alcalina e revelada por 15 minutos com NBT/BCIP como substrato. Os valores de cinza do trígono germinativo (A), zona subventricular (A), MOL (B), WM (B) e GL (B) foram determinados usando microscopia óptica de transmissão, aumento 100x. Os valores de cinza de células de Purkinje (B) (10 células/secção/rato) foram determinados usando aumentos de 400x. Os dados apresentados são representativos de experimentos realizados no mínimo por quadruplicata. As barras foram obtidas pela média do valor de cinza de cada camada (regressão não linear), usando o programa GraphPad Prism.

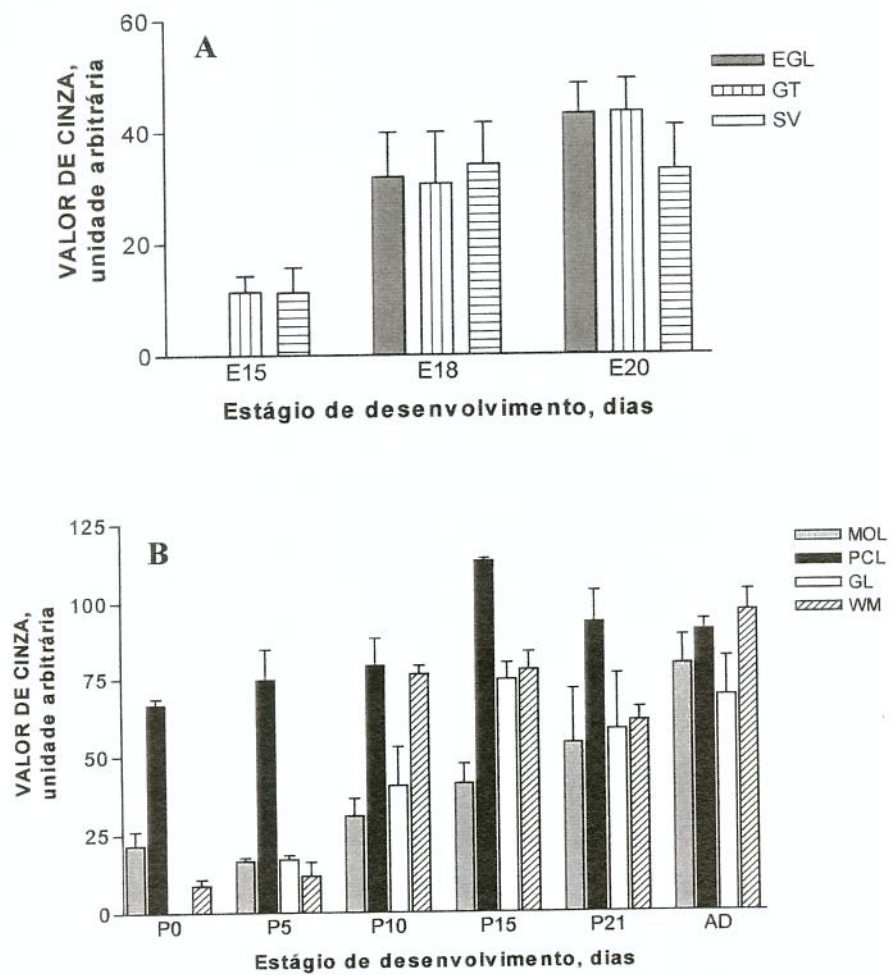
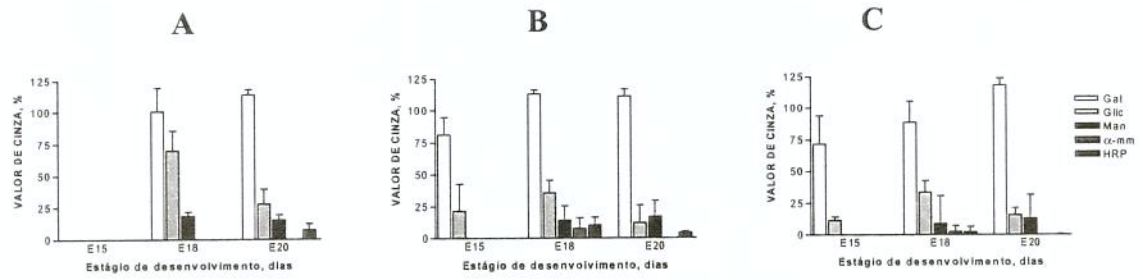


FIGURA 22. Ligação de KM^+ com glicoproteínas de matriz germinativa embrionária. Secções seriadas de cerebelo de rato (4 animais/estágio) foram incubadas com biotinil- KM^+ (painel II. A, G e M) ou biotinil- KM^+ pré adsorvido com D-galactose 0,4 M (painel I. A, B, C) D-glicose 0,4 M (painel I. A,B,C; painel II. B, H e N), D-manose 0,4 M (Painel I. A,B, C; painel II. C, I e O), 0,1 M metil α -D-manopiranosídeo (painel I. A,B,C; painel II. D, J e P); HRP 5 μ M (painel I. A,B,C; painel II. E, K e Q) e trimanosídeo 5 mM (F, L e R). A ligação de KM^+ ao tecido foi detectada utilizando o conjugado ABC-fosfatase alcalina e NBT/BCIP como substrato. Os valores de cinza (painel I. A, B e C) tomados na camada germinativa externa (A), trígono germinativo (B), zona subventricular (C) foram determinados usando microscopia óptica de transmissão, aumento 100X. Os valores tomados das secções que foram incubadas com biotinil- KM^+ , não apresentados no gráficos correspondem a 100% do valor de cinza e estão demonstrados na tabela 1. Os dados apresentados são representativos de experimentos realizados no mínimo por quadruplicata. As barras foram obtidas pela média do valor de cinza, tomada em cada camada (regressão não linear), usando o programa GraphPad Prism.

I



II

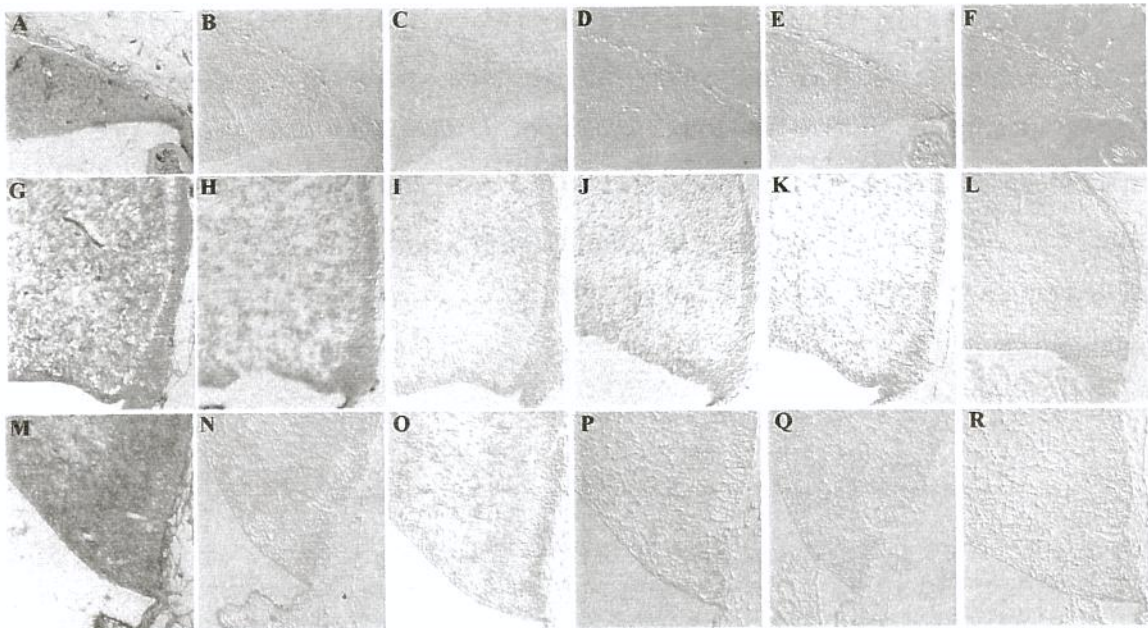


FIGURA 23. Antagonismo da ligação de KM^+ a seus ligantes por açúcares durante a ontogênese cerebelar. Secções cerebelares adjacentes, médio ou parassagital, de cerebelo de rato foram incubadas com biotinil- KM^+ P0 (A); P5 (C); P10 (E); P21 (G); AD (I) ou incubadas com biotinil- KM^+ pré-incubada com D-manose 0.4 M P0 (B); P5 (D); P10 (F); P21 (H); AD (J), metil α -D-manopiranosídeo 0.1 M AD (K), HRP 5 μ M AD (L). A ligação de KM^+ ao tecido foi detectada utilizando o conjugado ABC-fosfatase alcalina e NBT/BCIP como substrato. A marcação das secções por pré-incubação de biotinil- KM^+ com D-galactose (não mostrado) não diferiu da obtida por biotinil- KM^+ . A pré incubação de biotinil- KM^+ com o trimanosídeo inibiu completamente a ligação de KM^+ ao tecido para todos os estágios do desenvolvimento. Aumento original 66x.

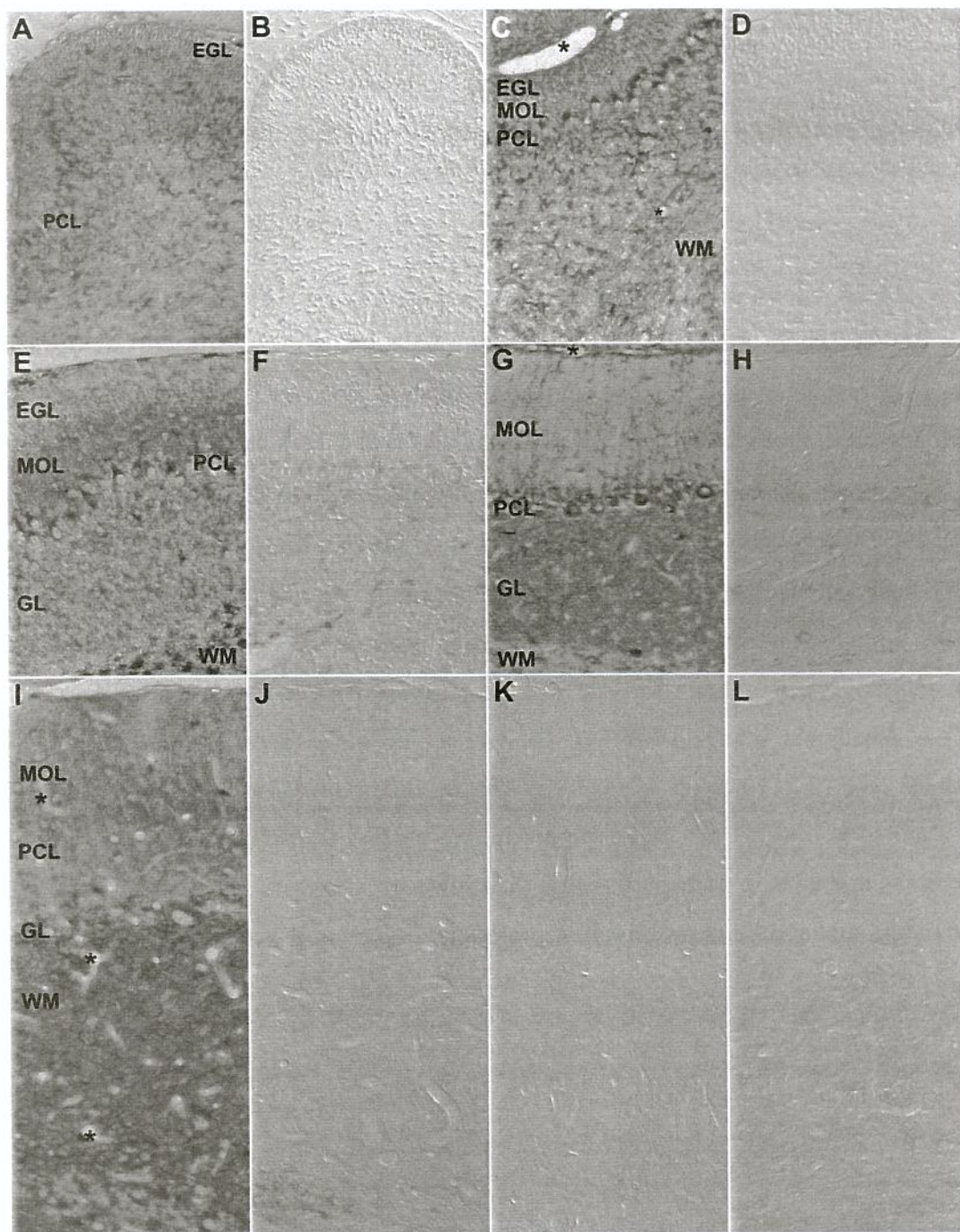


FIGURA 24. Efeito inibitório de açúcares na ligação de KM^+ às camadas molecular (A), de células de Purkinje (B), granular (C) e substância branca (D) durante a corticogênese pós-natal, análise semi-quantitativa. Secções de cerebelo de rato foram incubadas com biotinil- KM^+ que foi pré-incubado com D-galactose 0.4 M; D-glicose 0.4 M; D-manose 0.1 M e 0.4 M; metil α -D-manopiranosídeo 0.1 M; peroxidase 5 μ M (HRPO); trimanosídeo 5 mM (inibiu 100%). A ligação foi detectada utilizando o sistema ABC-fosfatase alcalina e NBT/BCIP como substrato. As medidas dos valores de cinza foram tomadas de regiões padronizadas e determinadas usando microscopia de transmissão, com aumento de 100x para as camadas molecular (A-MOL), granular (C-GL) e substância branca (D-WM). Os valores de cinza para camada de células de Purkinje (B-PCL) (10 células/secção/rato) foram determinadas usando aumento de 400x. Os resultados obtidos são representativos das médias tomadas de 4 ratos obtidos de diferentes ninhadas, e de experimentos realizados em triplicata. As barras foram obtidas pela média do valor de cinza usando o programa GraphPad Prism.

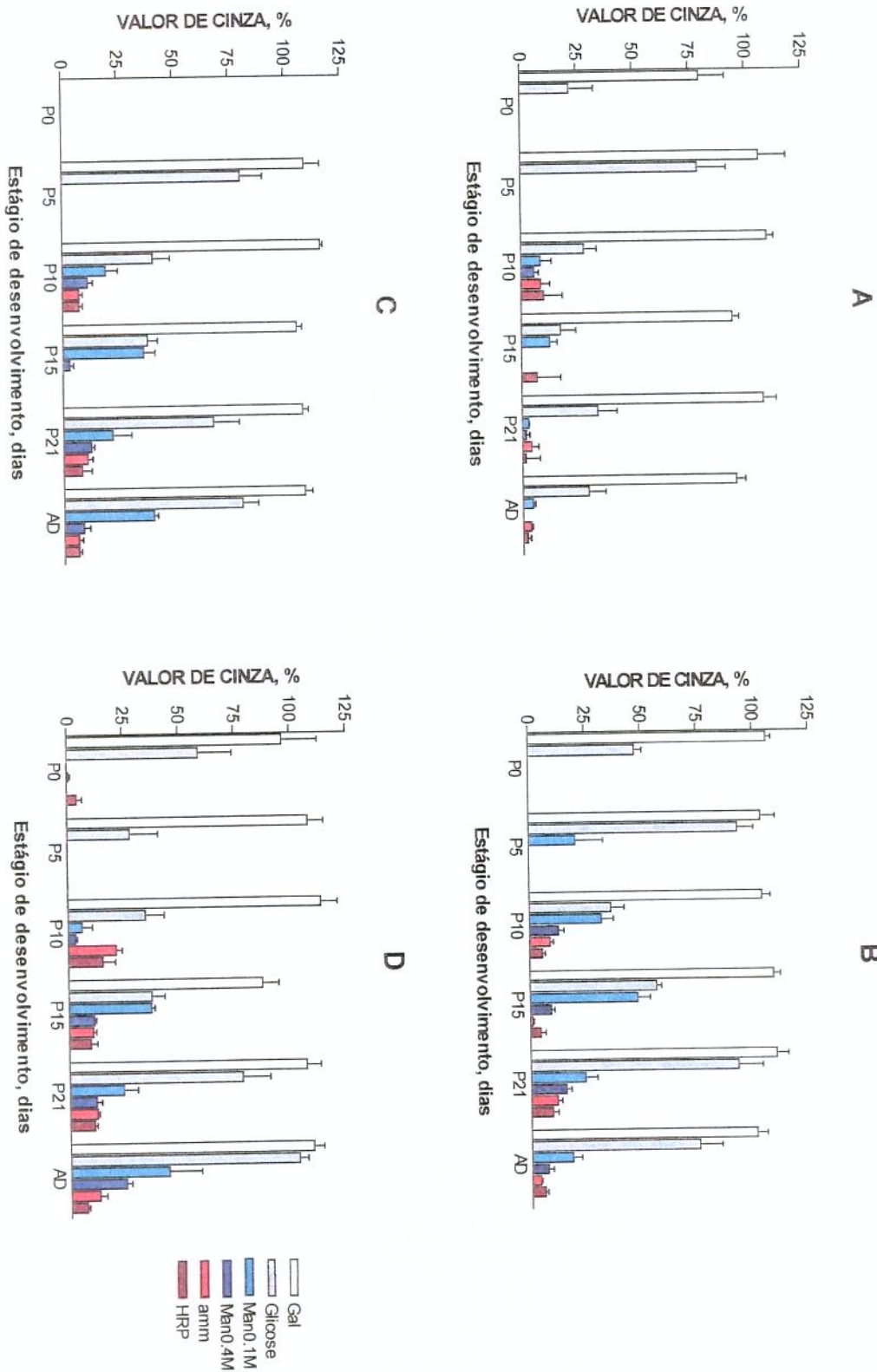


FIGURA 25. Detecção de ligantes de KM^+ em homogeneizado de encéfalo (pré-natal) e cerebelo (pós-natal) de rato durante o desenvolvimento, usando Western blot. Amostras de homogeneizado de encéfalo de embriões dos estágios E14 (26,4 μ g); E15 a E21 e cerebelo dos estágios pós-natal (30 μ g) foram submetidos a SDS-PAGE (gradiente 5 a 20%) em condições desnaturantes e redutoras e os componentes separados foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com 0.08 μ g/ml de biotinil- KM^+ ou com 0.08 μ g/ml de biotinil- KM^+ pré-incubada com D-manose 0.4 M. A lectina KM^+ ligada foi detectada utilizando o conjugado estreptavidina-fosfatase alcalina e NBT/BCIP como substrato. Os painéis A, C e E representam os estágios pré-natais e os painéis B, D e F representam os estágios pós-natais. Os painéis mostram bandas que reagiram com biotinil- KM^+ na ausência (A e B) ou presença de 0.4 M de D-manose (C e D). Os painéis E e F mostram bandas inespecífica resultante da incubação com estreptavidina-fosfatase alcalina na ausência de biotinil- KM^+ .

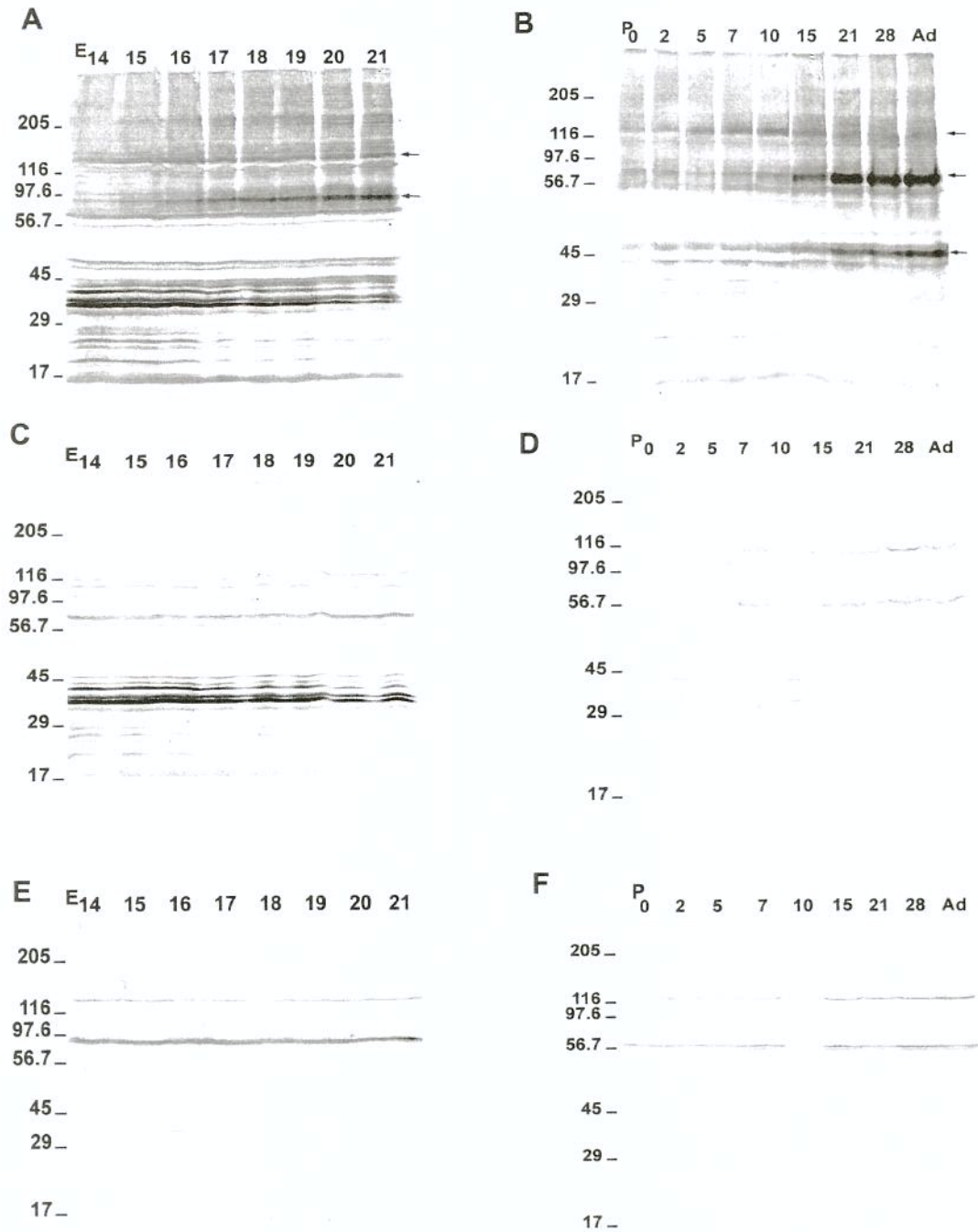


FIGURA 26. Expressão diferencial de ligantes de KM^+ em homogeneizado de encéfalo (pré-natal) e cerebelo (pós-natal) de rato durante o desenvolvimento. Amostras de homogeneizado de encéfalo de embriões dos estágios E14 (26,4 μ g); E15 a E21 e cerebelo dos estágios pós-natais (30 μ g) foram submetidos a SDS-PAGE e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com 0.08 μ g/ml de biotilil- KM^+ . A lectina KM^+ ligada foi detectada utilizando o conjugado estreptavidina-fosfatase alcalina e NBT/BCIP como substrato. As bandas que reagiram com biotilil- KM^+ foram quantificadas utilizando programa GelPro Plus 3.1 e escala de cinza com 256 níveis. A densidade óptica integrada (DOI) foi determinada para as bandas que foram abolidas por D-manose e não foram detectadas no controle (ausência de biotilil- KM^+). Painel A- perfil de expressão da banda de 83 kDa ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal; Painel B- perfil de expressão das bandas de 49 e 140 kDa.

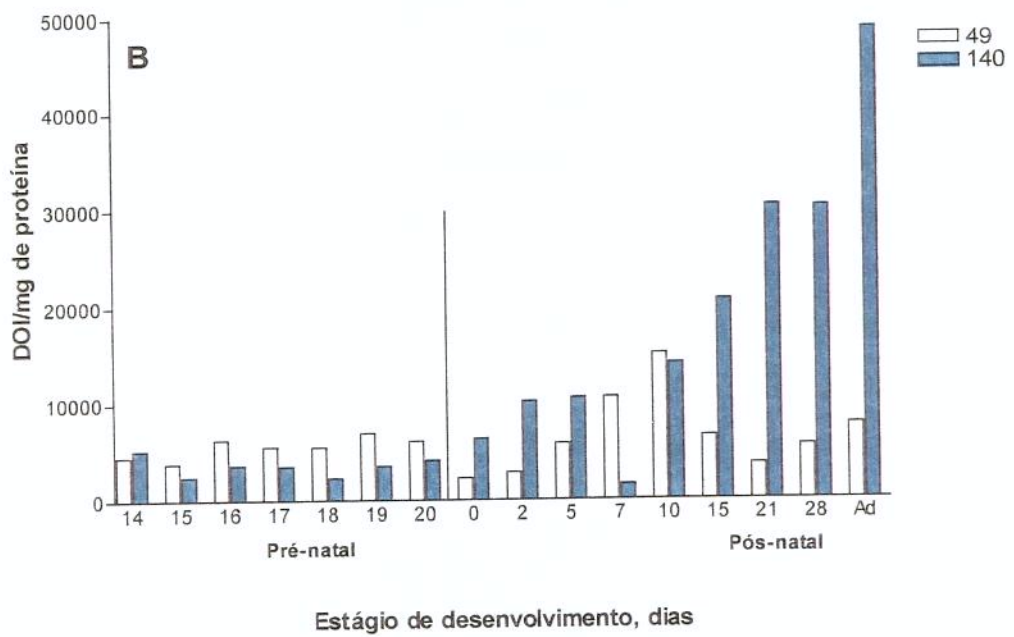
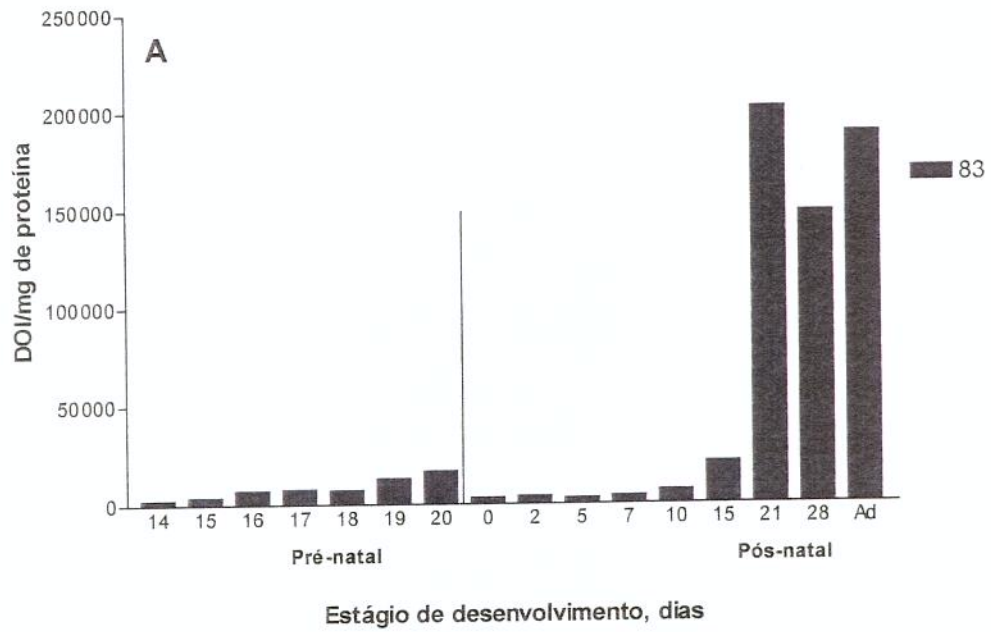


FIGURA 27. Análise eletroforética dos componentes da fração particulada de cerebelo de rato durante o desenvolvimento pós-natal. Cerebelos de rato de diversos estágios de desenvolvimento pós-natal foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7.4 contendo inibidores de proteases. As amostras foram centrifugadas a 48.000 g por 2 horas, a 4°C, separando-se as frações solúvel e particulada de animais P0 ao adulto. As amostras foram ajustadas para concentração de 30 µg/15 µl, as bandas separadas mediante SDS-PAGE (gradiente 5 a 20%) e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. Western blot para frações particuladas e solúvel incubadas com 0.08 µg/ml de biotil-KM⁺ (A e B) ou com 0.08 µg/ml de biotil-KM⁺ pré incubado com D-manose 0.4 M (C e D). A lectina KM⁺ ligada foi detectada utilizando o conjugado estreptavidina-fosfatase alcalina e NBT/BCIP como substrato. Em E e F, mostram bandas inespecífica resultante da incubação com estreptavidina-fosfatase alcalina na ausência de biotil-KM⁺. As setas indicam em A (fração particulada) bandas com peso molecular aparente de > 205 kDa, 140 kDa, 83 kDa e 49 kDa; em B (fração solúvel), bandas > 205 kDa, 140 kDa e 49 kDa; em C e D, a intensidade de marcação das bandas foi muito reduzida ou abolida por D-manose. As posições de migração de proteínas com peso molecular conhecido, expressos em kDa, estão indicadas ao lado esquerdo da figura.

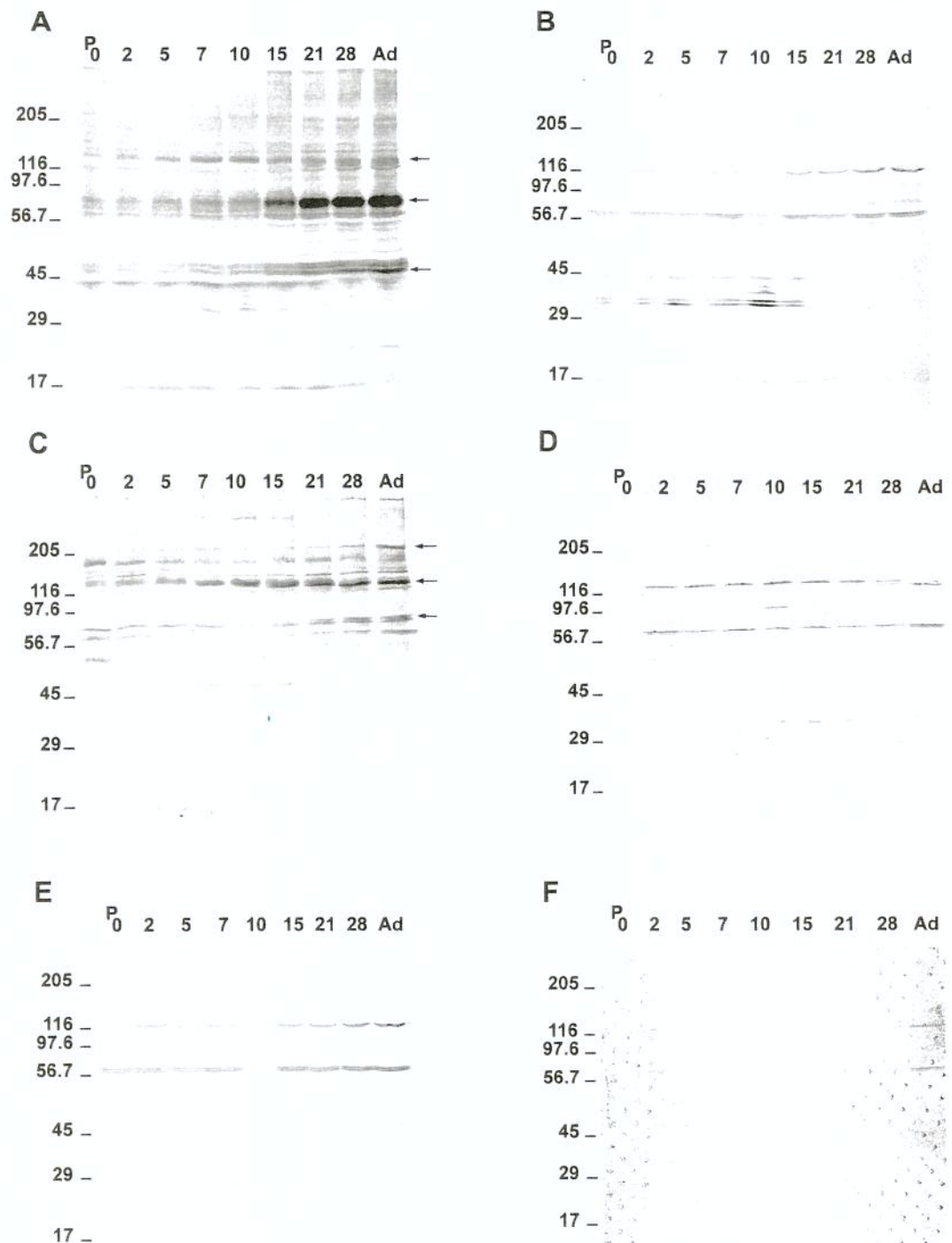


FIGURA 28. Expressão diferencial de glicoproteínas ligantes de KM^+ durante a corticogênese pós-natal. As bandas de proteínas da fração particulada que reagiram com biotínil- KM^+ foram quantificadas utilizando programa GelPro 3.1 e escala de cinza com 256 níveis. A densidade óptica integrada (DOI) foi determinada para as bandas que foram abolidas por D-manose e não foram detectadas no controle (ausência de biotínil- KM^+). Painel A, perfil de expressão da banda de 83 kDa ao longo do desenvolvimento; Painel B, perfil de expressão das bandas de 49 e 140 kDa. Os números 0, 2, 5, 7, 10, 15, 21, 28 correspondem as idades em dias do período pós-natal, Ad- animal adulto.

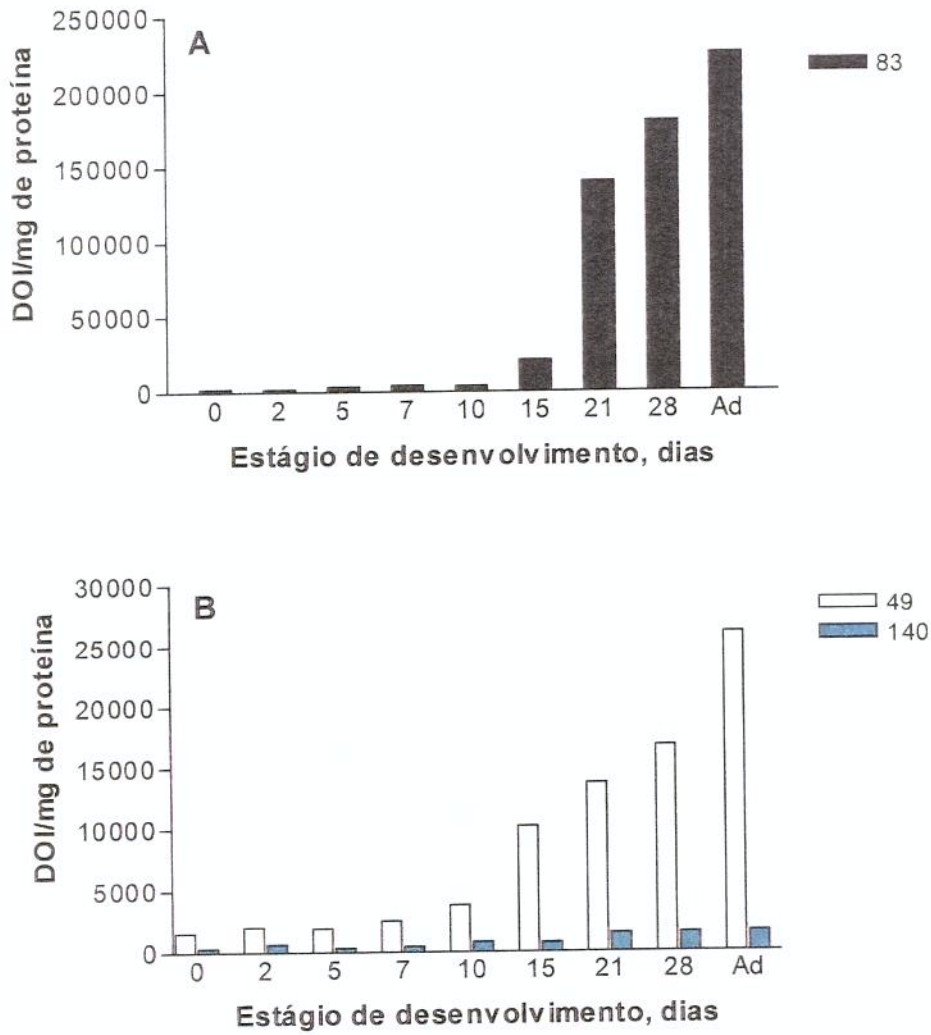


FIGURA 29. Expressão diferencial de glicoproteínas ligantes de KM⁺ durante a corticogênese pós-natal. As bandas de proteínas da fração solúvel que reagiram com biotilil-KM⁺ foram quantificadas utilizando programa GelPro 3.1 e escala de cinza com 256 níveis. A densidade óptica integrada (DOI) foi determinada para as bandas que foram abolidas por D-manose e não foram detectadas no controle (ausência de biotilil-KM⁺). Perfil de expressão da banda de 83, 140 e > 205 kDa ao longo do desenvolvimento. Os números 0, 2, 5, 7, 10, 15, 21, 28 correspondem as idades em dias do período pós-natal, Ad- animal adulto.

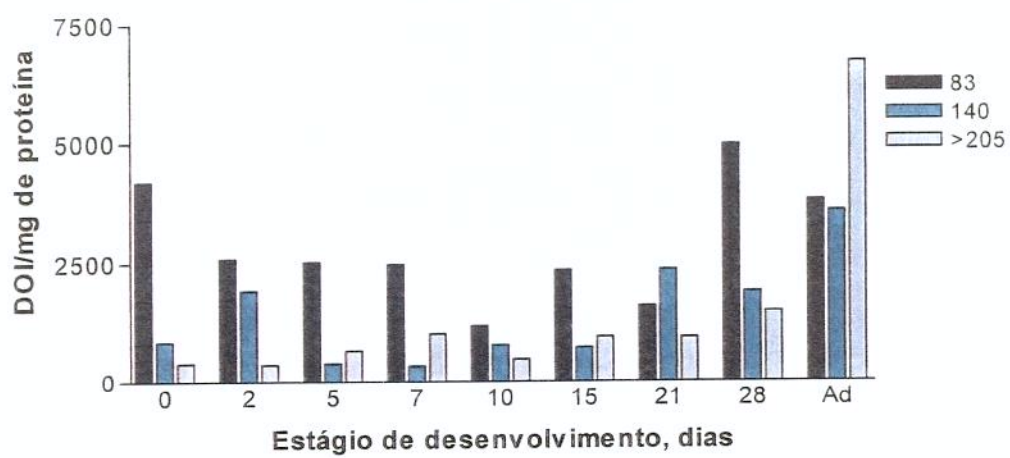


FIGURA 30. Caracterização de glicoproteína ligante de KM^+ em homogeneizado, frações solúvel e particulada de cerebelo de rato adulto.

Amostras de 30 μ g/15 μ l de homogeneizado (pista 1), frações solúvel (pista 2) e particulada (pista 3) e 0,3 μ g de laminina EHS (pista 4) foram aplicadas em cada poço. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas contendo as frações proteicas foram incubadas com biotilil- KM^+ (A e C) ou com anticorpo anti-laminina (B). A detecção foi realizada utilizando kit ABC-fosfatase alcalina e NBT/BCIP como substrato (A), ou kit ABC-peroxidase e reveladas por quimio-luminiscência (ECL) (B, C). As setas indicam em A, bandas detectadas por KM^+ , com peso molecular aparentes de 140, 83 e 49 kDa. As cabeças de seta em A e C indicam bandas de alto peso molecular e > 205 kDa, ligantes de KM^+ (pistas 1, 2 e 3) que co-migraram com laminina EHS (pista 4). Em B, as cabeças de seta indicam bandas de alto peso molecular e > 205 (pistas 1, 2 e 3 - frações cerebelares) e > 205 e 160 kDa (pista 4 - amostra de laminina EHS) que foram reconhecidas pelo anticorpo anti-laminina. As posições de migração de proteínas com peso molecular conhecido, expressos em kDa, estão indicadas ao lado esquerdo (A) e direito (B) da figura.

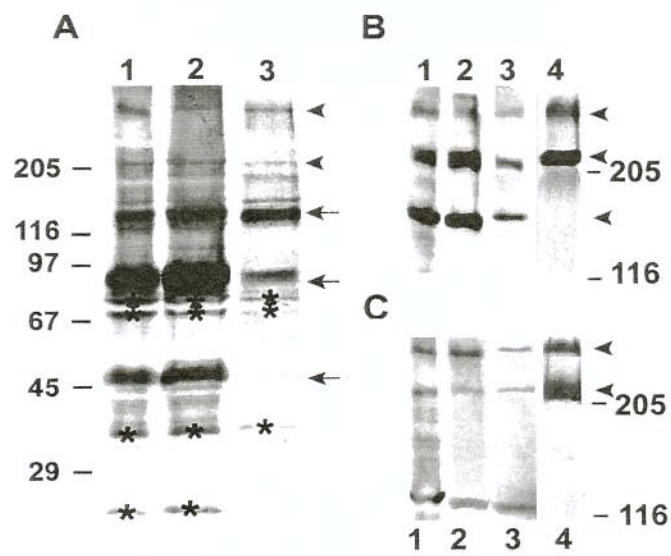
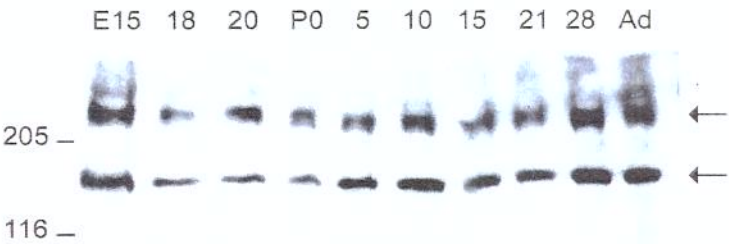


FIGURA 31: Expressão de laminina IR em homogeneizado de encéfalo (embrionário) e de cerebelo (estágio pós-natal). SNC de rato de diferentes estágios do desenvolvimento foram homogeneizados. 30 µg/15 µl de homogeneizado foram aplicados em cada poço e as proteínas separadas por SDS-PAGE. As bandas de proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, que foram incubadas com anticorpo anti-laminina e reveladas por quimio-luminiscência. Duas bandas foram observadas com pesos moleculares aparentes > 205 kDa e 160 kDa, com expressão diferencial durante o desenvolvimento (Figura A). A figura B mostra os valores de DOI das diferentes bandas, ao longo da ontogenia. As posições de migração de proteínas com peso molecular conhecido, expressos em kDa, estão indicadas ao lado esquerdo em A. As setas indicam as bandas reconhecidas pelo anticorpo anti-laminina, e os números na parte superior (A) e inferior (B) indicam as idades.

A



B

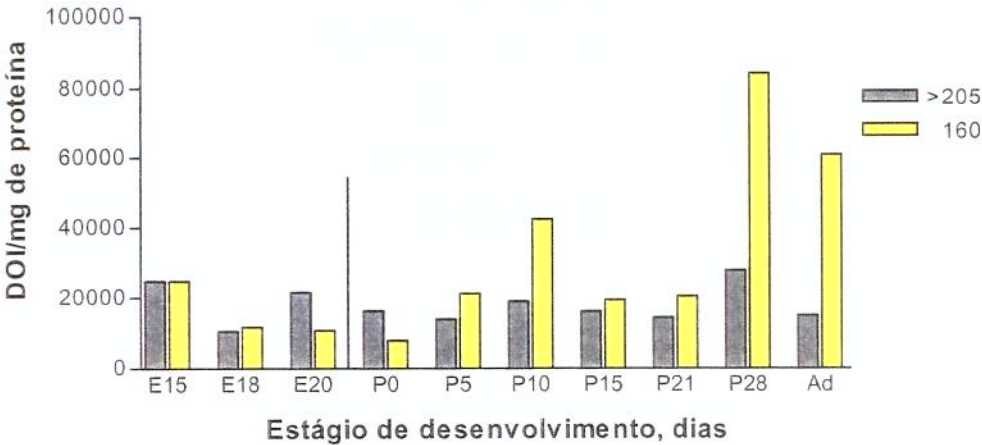
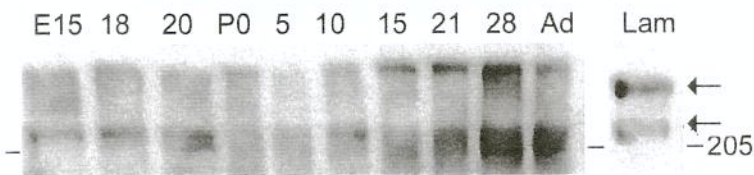
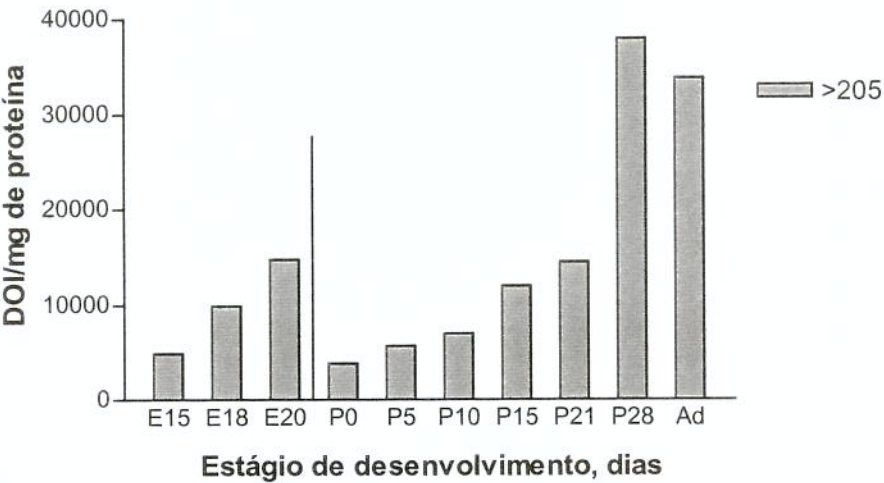


FIGURA 32. Reconhecimento de componentes glicosilados de alto peso molecular pela lectina KM^+ . Amostras de homogeneizado de encéfalo (pré-natal), cerebelo (pós-natal) de rato (30 μ g) e de laminina EHS (0.3 μ g) foram aplicadas em cada poço. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas contendo as frações protéicas foram incubadas com biotilil- KM^+ (0.08 μ g/ml) e reveladas por substrato quimioluminiscente (A). As setas indicam bandas de alto peso molecular e > 205 kDa que co-migraram com laminina EHS (Lam) e foram detectadas em todos os estágios do desenvolvimento. As posições de migração de proteínas com peso molecular conhecido, expressos em kDa, estão indicadas ao lado esquerdo em A. As medidas densitométricas obtidas utilizando programa Gel-proPlus 3.1, mostram no gráfico, figura B, a expressão diferencial desta banda ao longo do desenvolvimento.

A



B



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, B.B.L.; GOLDSTEIN I.J. Purification and properties of carbohydrate-binding proteins. Concanavalin A, the jack bean (*Canavalia ensiformes*) phytohemagglutinin. **Meth. Enzymol.**, v.28b, p.313-317, 1983.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the cell**. 3.ed. New York, Garland Publishing, 1994.
- ALDER, J.; CHO, N.K.; HATTEN, M.E. Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to cerebellar granule neuron identity. **Neuron**, v.17, p.389-399, 1996.
- ALTMAN, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. The external germinal layer and the transitional molecular layer. **J. Comp. Neurol.**, v.145, p.353-398, 1972a.
- ALTMAN, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. **J. Comp. Neurol.**, v.145, p.399-464, 1972b.
- ALTMAN, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. Maturation of the components of the granular layer. **J. Comp. Neurol.**, v.145, p.465-514, 1972c.
- ALTMAN, J.; BAYER, S. Prenatal developing of the cerebellar system in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei an the cortex of the cerebellum. **J. Comp. Neur.**, v.179, p.23-48, 1978.
- ALTMAN, J. Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. In: PALAY, S. L.; CHAN PALAY, V. (ed.) **The cerebellum**. Berlin, Springer, 1982. p.8-49.
- ALTMAN, J.; BAYER, S. A. Embryonic development of the rat cerebellum. a. Delineation of the cerebellar primordium and early cell movements. **J. Comp. Neur.**, v.231, p.1-26, 1985.
- ALTMAN, J.; BAYER, S. A. Embryonic development of the rat cerebellum. b. Translocation and regional distribution of the deep neurons. **J. Comp. Neur.** v231, p27-41, 1985.
- ALTMAN, J.; BAYER, S. A. Embryonic development of the rat cerebellum. c. Regional differences in the time of origin, migration, and settling of Purkinje cells. **J. Comp. Neur.**, v231, p42-65, 1985.
- ALTMAN, J.; BAYER, S. A. **Development of the cerebellar system: in relation to its evolution, structure, and functions**. New York, CRC Press, Inc., 1997.

- ANTON, E. S.; CAMERON, R. S.; RAKIC, P. Role of neuron-glial junctional domain proteins in the maintenance and termination of neuronal migration across the embryonic cerebral wall. **J. Neuroscience**, v.16, n.7, p.2283-2293, 1996.
- ARUMUGHAM, R.G.; HSIEH, T.C.-Y.; TANZER, M.L.; LAINE, R.A. Structures of the asparagine-linked sugar chains laminin. **Biochim. Biophys. Acta**, v.883, p.112-126, 1986.
- BÄR, T. The vascular system of the cerebral cortex. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.**, p.59, v.1-60, 1980.
- BECK, K.; HUNTER, I.; ENGEL, J. Structure and function of laminin: Anatomy of a multidomain glycoprotein. **FASEB J.**, v.4, p.148-160, 1990.
- BOYDE, W.C.; REGUERA, R.M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. **J. Immunol.**, v.62, p.333, 1949.
- BOYDE, W.C.; SHYLEIG, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v.119, p.419, 1954.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.
- BOVOLENTA, P.; FERNAUD-ESPINOSA, I. Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. **Progress in Neurobiology**, v.61, p.113-132, 2000.
- BUNN-MORENO, M.M.; CAMPOS-NETO, A. Lectin(s) extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. **J. Immunol.**, v.127, n.2, p.427-429, 1981.
- CAMERON, R. S.; RUFFIN, J. W.; CHO, N. K.; CAMERON, P. L.; RAKIC, P. Developmental expression, pattern of distribution, and effect on cell aggregation implicate a neuron-glial junction domain protein in neuronal migration. **J. Comp. Neurol.**, v.387, p.467-488, 1997.
- CHANGEUX J.P.; MIKOSHIBA, K. Genetic and epigenetic factors regulating synapse formation in vertebrate cerebellum and neuromuscular junction. **Brain Res.**, v.48, p.43-66, 1978.
- CHOUNG, C.M.; CROSSIN, K.L.; EDELMAN, G.M. Sequential expression and differential function of multiple adhesion molecules during the formation of cerebellar cortical layers. **J. Chem. Biol.**, v.104, p.331-342, 1987.

- DE MIRANDA-SANTOS, I.K.; MENGEL, J.O. JUNIOR; BUNN-MORENO M.M.; CAMPOS-NETO, A. Activation of T and B cells by a crude extract of *Artocarpus integrifolia* is mediated by a lectin distinct from jacalin. **J. Immunol. Methods**, v.140, n.2, p.197-203, 1991.
- FERLLETA, M.; EKBLOM, P. Identification of laminin 10/11 as a strong cell adhesive complex for a normal and a malignant human epithelial cell line. **J. Cell Science**, v.112, p.1-10, 1999.
- FUJIWARA, K.; SHINKAI, H.; DEUTZMANN, R.; PAULSSON, M.; TIMPL, R. Structure and distribution of N-linked oligosaccharide chains on various domains of mouse tumour laminin. **Biochem. J.**, v.252, n.2, p.453-461, 1988.
- GANIKO, L.; MARTINS, A.R.; ESPREÁFICO, E.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM⁺. **Glycoconjugate J.**, v.15, p.527-530, 1998.
- GANIKO, L.; MARTINS, A.R.; FREYMÜLLER, E.; MORTARA R.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Laminin is required for neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM⁺. 2001. Ref. Type: Unpublished Work.
- GAO, W.Q.; HATTEN, M. E. Neuronal differentiation rescued by implantation of weaver granule cell precursors into wild-type cerebellar cortex. **Science**, v.260, p.367-369, 1993.
- GOLDFINGER, L. E.; STACK, M. S.; JONES, J. C. R. Processing of laminin-5 and its functional consequences: role plasmin and tissue-type plasminogen activator. **J. Cell Biology**, v.141, p.255-265, 1999.
- GOODMAN, C. The likeness of being: phylogenetically conserved molecular mechanism of growth cone guidance. **Cell**, v.78, p.353-356, 1994.
- GRANER, E.; MERCANTE, A. F.; ZANATA, S. M.; FORLENZA, O.V.; CABRAL, A. L. B.; VEIGA, S. S.; JULIANO, M. H.; ROESLER, R.; WALZ, R.; MINETTE, A.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V. R.; BRENTANI, R. R. Cellular prion protein binds laminin and meditates neuritogenesis. **Mol. Brain Research**, v.76, p.85-92, 2000.
- GRIFFITH C.M.; SANDERS E.J. Differentiation of the chick embryo floor plate. **Anat. Embryol.**, v.184, n.2, p.159-69, 1991.
- HATTEN, M.E. Central nervous system neuronal migration. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.22, p.511-539, 1999. HATTEN, M.E.; FRANCOIS, A.M. Adhesive specificity of developing cerebellar cells on lectin substrata. **Dev. Biol.**, v.87, p.102-113, 1977.

- HATTEN, M.E.; SIDMAN, R.L. Plant lectin detect age and region specific differences in cell surface carbohydrates and cell reassociation behavior of embryonic mouse cerebelar cells. **J. Supramol. Struct.**, v.7, p.267-275, 1977.
- HATTEN, M.E.; LIEM, R.K.H. Astroglial cells provide a template for the positioning of developing cerebelar neurons in vitro. **J. Cell Biol.**, v.90, p.622-630, 1981.
- HATTEN, M. E.; HEINTZ, N. Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.18, p.385-408, 1995.
- HEWICKER-TRUTWEIN, M.; SCHULTHEIS, G.; TRAUTWEIN, G. Effects of trypsinization and microwave treatment on lectin labelling of microglial cells in paraffin-embedded sections from pre- and postnatal bovine brains. **Acta histochem. (Jena)**, v.97, p.455-461, 1995.
- HUCK, S.; HATTEN, M.E. Developmental stage-specific changes in lectin binding to mouse cerebellar cells in vitro. **J. Neurosci.**, v.1, p.1075-1084, 1981.
- ISAHARA, K.; YAMAMOTO, M. The interaction of vascular endothelial cells and dorsal root ganglion neurites is mediated by vitronectin and heparan sulfate proteoglycans. **Develop. Brain Res.**, v.84, p.164-178, 1995.
- JOUBERT R.; KUCHLER S.; ZANETTA, JP.; BLADIER, D.; AVELLANA-ADALID V.; CARON M.; DOINEL C.; VINCENDON G. Immunohistochemical localization of a β -galactoside binding lectin in rat central nervous system. I. Light and electron microscopical studies in developing cerebral cortex and corpus callosum. **Dev. Neurosci.**, v.11, p.397-413, 1989.
- KEINO, H.; BANNO, T.; OZEKI, J. Compositional changes in glycoconjugate recognized histochemically with lectins in Purkinje cells in sucking and adult rats. **Zoological Sci.**, v.15, p.27-34, 1998.
- KNIBBS, R.N.; PERINI, F.; GOLDSTEIN, I.J. Structure of the major concanavalin A reactive oligosaccharides of the extracellular matrix component laminin. **Biochemistry**, v.28, p.6379-6392, 1989.
- KOMURO, H.; RAKIC, P. Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. **J. Neuroscience**, v.18, n.4, p.1478-1490, 1998.
- KOMURO, H.; YACUBOVA, E.; YACUBOVA, E.; RAKIC, P. Mode and tempo tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. **J. Neuroscience**, v.21, n.2, p.527-540, 2001.

- KORNFELD, R.; FERRIS, C. Interaction of immunoglobulin glycopeptides with Concanavalin A. **J. Biol. Chem.**, v.250, p.2614-2619, 1975.
- KUCHLER, S.; PERRAUD, F.; SENSENBRENNER, M.; VINCENDON, G.; ZANETTA, J. P. A endogenous lectin found in rat astrocytes cultures has a role in cell proliferation. **GLIA**, v.2, p.437-445, 1989.
- KUCHLER, S.; ZANETTA, J.P.; VINCENDON, G.; GABIUS, H.J.I. Detection of binding sites for biotinilated neoglicoprotein and heparin (endogenous lectins) during cerebellar ontogenesis in the rat. **Eur. J. Cell Biol.**, v.52, p.87-97, 1990.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAEMMLI, U.K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. **J. Mol. Biol.**, v.80, p.575-599, 1973.
- LAMING, P. R.; KIMELBERG, S. R.; SALM. A.; HARWRYLAK. N.; MÜLLER, C.; ROOTS, B.; NG. K. Neuronal-glial interactions and behaviour. **Neurosci. and Biobehavioral Reviews**, v.24, p.295-340, 2000.
- LARSELL, O. The morphogenesis and adult pattern of the lobules of the cerebellum of the white rat. **J. Comp. Neur.**, v.97, p.281-356, 1952.
- LEHMANN, S.; KUCHLER, S.; THEVENIAU, M.; VICENDON, G.; ZANETTA, J.P. An endogenous lectin and one of its neuronal glycoprotein ligands are involved in contact guidance of neuron migration. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.87, p.6455-6459, 1990.
- LI, W. X.; KLUCHER, S.; ZAEPFEL, M.; BADACHE, A.; THOMAS, D.; VICENDON, G.; BAUMANN, N.; ZANETTA, J. P. Cerebelar soluble lectin and its glicoprotein ligands in the developing brain o control and dysmyelinating mutant mice. **Neurochem. Int.**, v.22, p.125-133, 1992.
- LIESE, P. Extracellular matrix and neuronal movement. **Experimentia**, v.46, p.900-907, 1990.
- LIM S.B.; CHUA, C.T.; HASHIM,O.H. Isolation of a mannose-binding and IgE and IgM-reactive lectin from the seeds of *Artocarpus integrifolia*. **J. Immunol. Meth.**, v.209, p.177-186, 1997.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Ann. Rev. Biochem.**, v.55, p.35-67, 1986.

- LORIS, R.; MAES, D.; POORTMANS, F.; WYNS, L.; BOUCKAER, J. A structure of the complex between concanavalin A and methyl-3,6-di-O-(α -D-mannopyranosyl)- α -D-mannopyranoside reveals two binding modes. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.48, p.30614-30618, 1996.
- LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.
- MARTINS A. R.; DIAS M. M.; VASCONCELOS, T. M.; CALDO, H.; COSTA, M. C. R.; CHIMELLI, L.; LARSON, R. Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. **J. Neurosci. methods**, v.92, p.25-29, 1999.
- MISQUITH, S.; RANI, P.G.; SUROLIA, A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. **J. Biol. Chem.**, v.269, n.48, p.30393-30401, 1994.
- PALAY, S.L.; CHAN-PALAY, V. (ed.). **Cerebellar Cortex: Cytology and Organization**, Berlin, Springer, 1974. p.1-5.
- QUONDAMATTEO, F.; ZIEGER, J.; GÖTZ, W.; MIOSGE, N.; HERKEN, R. Extensive glycosylation changes revealed by lectin histochemistry in morphologically normal prenatal tissues of the mouse mutant undelated (un/un). **The Anatomical Record**, v.258, p.243-251, 2000.
- RAKIC, P. Mode of cell migration to the superficial layers of the fetal monkey neocortex. **J. Comp. Neurol.**, v.145, p.61-84, 1972.
- RAKIC, P. Principles of neural cell migration. **Experientia**, v.46, p.882-891, 1990.
- RAKIC, P.; SIDMAN L. R. Histogenesis cortical Layers in human cerebellum, particularly the lamina dissecans. **J. Comp. Neur.**, v.139, p.473-500, 1970.
- RAKIC, P. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electron microscopic study in Macacus Rhesus. **J. Comp. Neur.**, v.141, p.283-312, 1971.
- RAKIC, P.; CAMERON, R.S.; KOMURO, H. Recognition, adhesion, transmembrane signaling and cell motility in guided neuronal migration. **Curr. Opinion Neurobiol.**, v.4, p.63-69, 1994.
- RANI, P.G.; BACHHAWAT, K.; MISQUITH, S.; SUROLIA, S. Thermodynamic studies of saccharide binding to artocarpin, a B-cell mitogen, reveals the extended

- nature of its interaction with mannotriose [3,6-Di-O-(α -D-mannopyranosyl)-D-mannose]. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.42, p.29694-29698, 1999.
- RANI, P.G.; BACHHAWAT, K.; REDDY, G.B.; OSCARSON, S.; SUROLIA, A. Isothermal titration calorimetric studies on the binding of deoxytrimannoside derivatives with artocarpin: Implications for a deep-seated combining site in lectins. **Biochemistry**, v.39, p.10755-10760, 2000.
- RENKONNEN, K.O. Studies of hemagglutinins present in seeds of some representatives of Leguminaceae. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, v.26, p.66-72, 1948.
- RIEGER, R.; EDENHOFER, F.; LASMÉZAS C. I.; WEISS, S. The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eucaryotic cells. **Nature Medicine**, v.3, n.12, p.1383-1388, 1997.
- ROQUE-BARRERA, M.C.; CAMPOS-NETO, A. Jacalin: an IgA-binding lectin. **J. Immunol.**, v.134, p.1740-1743, 1985.
- ROSA, J.C.; LOPES DE OLIVEIRA, P.S.; GARRAT, R.; BELTRAMINI, L.; RESING, K.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GREENE, L.J. KM⁺, a manose-binding lectin from *Artocarpus intergrifolia*: Amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition and analysis of the β -prism fold. **Protein Sci.**, v.8, n.1, p.13-24, 1999.
- RYDER, E.F.; CEPKO, C.L. Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. **Neuron**, v.12, p.1011-1029, 1994.
- SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S.M.O.; BELTRAMINI, L.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus intergrifolia*. **J. Immunol.**, v.153, p.1798-1807, 1994.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v.246, n.4927, p.227-234, 1989.
- SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.**, v.268, p.7., 1993.
- SHI, S-R; KEY, M. E.; KALRA, K. L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: na enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **J. Histochem. Cytochem.**, v.39, p.741-748, 1991.
- SIDMAN, R. L.; RAKIC, P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: A Review. **Brain Res.**, v.62, p.1-35, 1973.

- STURROCK, R.R. A quantitative and morphological study of vascularization of the developing mouse spinal cord. **J. Anat.**, v.132, p.203-221, 1981.
- TEIXEIRA, S. A.; BRINN, L. S.; CALDO, H.; GANIKO, L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MARTINS, A.R. KM⁺ binding to the rat cerebellum: assay and expression during development In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, XXVIII^a, Caxambu, 1999. **Anais**. Caxambu, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1999. I-5.
- TIMPL, R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. **Eur. J. Biochem.**, v.180, n.3, p.487-502, 1989.
- TIMPL, R. Macromolecular organization of basement membranes. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v.8, n.5, p.618-624, 1996.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.76, p.4350-4354, 1979.
- VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; MAZARD, A-M.; VERHAERT, P.; HORMAN, A.; DEBRAY, H.; ROUGE, P.; PEUMANS, W. J. Characterization and molecular cloning of the from *Helianthus tuberosus*. **Eur. J. Biochem.**, v.259, p.135-142, 1999.
- VIAPIANO, M.S.; TEIXEIRA, S.A.; JULIANO, M.A.; GANIKO, L.; FAÇA, V.M.; GREENE, L.J.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; MARTINS, A.R. Partial purification and characterization of a 83k Da protein expressed in the developing rat cerebellum. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, XXIX., Caxambu, 2000. **Anais**. Caxambu, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2000.
- VYAS, N. K. Atomic feactures of protein carbohydrate interactions. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v.1, p.732-740, 1991.
- WAGNER, S.; GARDNER, H. Modes of laminin-5 production by rat astrocytes. **Neurosci. Letters**, v.284, p.105-108, 2000.
- WEIS W.I.; DRICKAMER K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu Rev Biochem.**, v.65, p.441-73, 1996.
- WELIM, H.B.; THIES,M.; HERKEN, R. Appearance of lectin-binding sites during vascularization of the primordium of the central nervous system in 10 to 12-day-old mouse embryos. **Cell and tissue research**, v.255, p.627-630, 1989.

- WILSON, D.B.; WYATT, D.P. Patterns of lectin binding during mammalian neurogenesis. **J. Anat.**, v.186, p.209-216, 1995.
- WINGATE, R.J.T.; HATTEN, M.E. The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. **Development**, v.126, p.4395-4404, 1999.
- WINGATE, R.J.T. The rhombic lip and early cerebellar development. **Current Opinion Neurobiology**, v.11, p.82-88, 2001.
- WOOD J.G.; MCLAUGHLIN B.J.; BARBER R.P. The visualization of concanavalin A binding sites in Purkinje cell somata and dendrites of rat cerebellum. **J. Cell Biol.**, v.63, p.541-549, 1974.
- ZANARDO, R.C.O.; COSTA, E.T.; FERREIRA, H.H.A.; ANTUNES, E.; MARTINS, A.R.; MURAD, F.; DE NUCCI, G. Pharmacological and immunohistochemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.94, p.14111-14114, 1997.
- ZANETTA, J.P.; ROUSSEL, G.; GLHARLDOUR, M.S., VINCENDON. G.; GOMBOS, G. Postnatal development of rat cerebellum: massive and transient accumulation of Concanavalin A binding glycoproteins in parallel fiber axolemma. **Brain Res.**, v.142, p.301-319, 1978.
- ZANETTA, J.-P. Lectins and carbohydrates in animal cell adhesion and control of proliferation. In: H.-J and S. Gabius, Chapman & Hall (ed.) **Glycosciences**. Weinheim, p.439-458, 1997.
- ZECEVIC, N.; RAKIC, P. Differentiation of Purkinje cells and their relationship to other components of developing cerebellar cortex in man. **J. Comp. Neurol.**, v.167, p.27-48, 1976.

SUMMARY

Lectins are non-immune, non-enzymatic proteins that bind carbohydrates. They can agglutinate cells and precipitate glyconconjugates. Since they are abundant in plants and can be easily purified, they are commonly used as probes to detect, isolate and characterize soluble or membrane-bound glycoproteins. They have been employed to detect glycoproteins involved in different stages of neural development. In the cerebellar neurogenesis, for example, lectins have been used to detect and differentiate molecular components involved in the processes of cellular proliferation, differentiation and migration, as well as in synapse formation.

The protein KM^+ , extracted from the seeds of the jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) is a recently purified lectin with D(+)-mannose specificity and neutrophil haptotatic-attracting properties. The ligands of this lectin have been identified in the cell surface and cytoplasm of endothelial cells, in the cell surface of alveolar epithelial cells, and in the basement membranes and interstitial connective tissue in the lung.

In the present work, the lectin KM^+ has been used as a novel tool to identify glycoconjugates in the nervous tissue. KM^+ ligands in the rat cerebellum were studied using histochemistry and Western blotting approaches, to determine their spatiotemporal expression during cerebellar ontogeny, as well as their identity.

During pre-natal cerebellar development KM^+ staining was faint and restricted to the extracellular matrix. On the other hand, during post-natal cerebellar corticogenesis, KM^+ binding sites appeared in all cortical layers and exhibited an age-related expression, which peaked in the cytoplasm of Purkinje Cells at P15. Granular and molecular layer staining increased moderately throughout post-natal development. Stellate and basket cells showed an increased expression of KM^+ binding sites from P18 onwards. The external germinative layer was mainly stained in the extracellular matrix. KM^+ labeling was strongly inhibited by D(+)-mannose, but not by D-galactose.

Western blot studies of cerebellar fractions showed that KM^+ recognized three strongly stained bands Mr 140, 83 e 49 kDa in a cerebellar homogenate, whose identity was not identified. The band of 49 kDa was observed only in the particulate fraction,

while the 140 and 83 kDa bands were detected in the particulate and soluble fractions. Moreover KM⁺ also labeled two proteins of Mr > 205 kDa which co-migrated with EHS-laminin and that were recognized by anti-EHS-laminin antibodies. The expression of these laminin-like KM⁺ ligands was development-dependent.

Our histochemical results indicate that KM⁺ stains D(+)-mannose specific ligands in all the cerebellar cortical layers, in a development- and layer-dependent fashion. Western blot analyses showed that the profile of KM⁺ labeled proteins remains the same throughout the cerebellar ontogeny. Western blot analysis suggest that laminin is a putative KM⁺ ligand.