

Fabíola Cristina Ribeiro Zucchi

**EXPRESSÃO DO INIBIDOR PROTÉICO DA SINTASE
NEURONAL DO ÓXIDO NÍTRICO (PIN) E MOLÉCULAS
RELACIONADAS, DA ONTOGÊNESE AO
ENVELHECIMENTO DO CEREBELO HUMANO**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Bióloga Fabíola Cristina Ribeiro Zucchi.

Campinas, 25 de janeiro de 2002.


Prof. Dr. Antonio Roberto Martins
- Orientador -

Campinas
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Fabíola Cristina Ribeiro Zucchi

**EXPRESSÃO DO INIBIDOR PROTÉICO DA SINTASE
NEURONAL DO ÓXIDO NÍTRICO (PIN) E MOLÉCULAS
RELACIONADAS, DA ONTOGÊNESE AO
ENVELHECIMENTO DO CEREBELO HUMANO**

*Dissertação de Mestrado apresentada
à pós-graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção
do título de Mestre em Farmacologia.*

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

**Campinas
2002**

UNIDADE	BC
Nº CHAM.	T/UNICAMP
	Z82e
V	
TOMBO BC.	48171
PROC.	16-83710a
	<input type="checkbox"/> C <input checked="" type="checkbox"/> A
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00165809-1

BIB ID 235865

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

Z82e

Zucchi, Fabíola Cristina Ribeiro

Expressão do inibidor protéico da sintase neuronal do óxido nítrico (PIN) e moléculas relacionadas, da ontogênese ao envelhecimento do cerebelo humano / Fabíola Cristina Ribeiro Zucchi. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Antonio Roberto Martins
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Óxido Nítrico. 2. Sistema Nervoso - Central. 3. Cerebelo. I. Antonio Roberto Martins. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Roberto Martins

Membros:

Prof. Dr. Antonio Roberto Martins

Armal

Prof. Dr. José Luiz Donato

José Luiz Donato

Prof. Dr. João Pereira Leite

João Pereira Leite

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

Data: 25/01/02

008712008

*Aos meus pais, Maria Eliza e José,
que semearam o conhecimento em nossa
família desde a minha infância,
e ao meu irmão Marcelo.*

PHOTO CENTER
UNIVERSITY OF MICHIGAN
ANN ARBOR, MICHIGAN

AGRADECIMENTOS

Agradeço às pessoas e instituições que me ajudaram a realizar este trabalho:

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Roberto Martins por todo o conhecimento transmitido durante estes anos e pela amizade dedicada.

À Fapesp pelo suporte financeiro, através da bolsa de Mestrado e reserva técnica utilizada para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Ao curso de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo pela utilização de suas dependências.

Aos Prof. Drs. Luciano Neder Serafini e Leila Chimelli, e ao Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pelo fornecimento e análise histopatológica dos materiais de biópsia e necrópsia.

Ao Prof. Dr. Foued S. Espindola e seus alunos, especialmente a Camila, o Pablo, a Fátima e a Luciana, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Uberlândia, pela gentileza dedicada e auxílio na realização dos experimentos de *Western blot*.

Aos membros da banca Profs. Drs.: João Pereira Leite, José Luiz Donato, Francesco Langone e Gilberto De Nucci, pela correção da dissertação e valiosas sugestões.

Ao meu amigo e companheiro de laboratório César Zanella por todo o apoio e amizade nestes últimos anos. E a todos os meus amigos e colegas do laboratório: Alina Oliveira, Silvia Teixeira, Ludmyla Kandratavicius, Hildeberto Caldo, Ana Anselmi, Diva, Roberta Maia, Elizabete Rosa, e aos ex-colegas Lisa Brinn, Mariano Viapiano e Marcio Oliveira, por todo o apoio e pelos momentos felizes.

À Ana Anselmi e à Vani M. Corrêa pela realização dos cortes histológicos, pela simpatia e amizade.

Aos secretários José Valdik Ramon e Wanderley da Cunha Claro pela disposição em atender às nossas dificuldades.

À Maria, à Meire, ao Cosme e ao Gilberto do Departamento de Documentação Científica do Hospital das Clínicas FMRP-USP, pela dedicação e profissionalismo.

À Geralda Machado que me acolheu em sua casa com muito carinho, no início do Mestrado.

Às companheiras de república Katiane e Lucimara, pela convivência e amizade durante estes anos.

À todos os meus amigos: Ana, Andréia, Alina, Andreinha, Carol, Cristiane, Caio, Daniela Bertolini, Daniela Sartorelli, Daniel, Deyse, Karininha, Lalá, Nani, Pacato, Tatiana, Veruska, Viviane Steigleder, Viviane Thomé, que estiveram comigo em muitos momentos felizes, durante muitos anos.

Aos meus tios e padrinhos Zélia e Valentim (*in memoriam*) Ciani, pelo amor e atenção que sempre dedicaram a mim, e muito contribuíram para a minha formação humana.

A minha prima Amelinha pela hospedagem em Campinas e por toda a atenção dedicada a mim sempre.

Ao meu irmão Marcelo que eu tanto amo.

Aos meus pais Maria Eliza e José por todo o amor e ensinamentos, pois são eles os grandes responsáveis pelo que sou.

A Deus pela proteção.

*“Não menos do que o saber,
agrada-me o duvidar.”*

Dante Alighieri

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	23
REVISÃO DA LITERATURA.	
• Desenvolvimento do cerebelo humano.....	29
• Migração neuronal e motores moleculares.....	31
• PIN/DLC.....	36
• Sintases do óxido nítrico - nNOS.....	37
OBJETIVOS	41
MATERIAIS E MÉTODOS.	
1. Casuística utilizada neste estudo.....	47
2. Processamento do tecido humano.....	47
3. Coloração com Hematoxilina-Eosina das secções cerebelares humanas.....	48
4. Desenvolvimento de condição de recuperação da imuno-reatividade de secções cerebelares humanas.....	48
4.1. Recuperação da imuno-reatividade de PIN em secções de cerebelo humano parafinizadas.....	48
4.2. Recuperação da imuno-reatividade de nNOS em secções de cerebelo humano parafinizadas e congeladas.....	48
5. Padronização do ensaio imuno-histoquímico para a detecção de PIN, DLC, DIC e nNOS em secções parafinizadas de cerebelo humano.....	49
5.1. Imunohistoquímica.....	49
5.2. Anticorpos.....	50
6. Ensaio imunohistoquímico para a localização de PIN e nNOS em secções cerebelares congeladas.....	51
7. Imunodeteção de PIN, DLC, DIC e nNOS utilizando imunoblot.....	51
7.1. Preparação do homogeneizado de tecido cerebelar humano.....	51
7.2. Dosagem de proteínas.....	51

7.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida - sistema desnaturante (SDS-PAGE).....	52
7.4. Eletrotransferência.....	52
7.5. Fixação da membrana de nitrocelulose.....	53
7.6. Revelação enzimática para detecção de PIN, DLC, DIC e nNOS - <i>Western blot</i>	53
7.6.1. PIN e DLC.....	53
7.6.2. DIC.....	54
7.6.3. nNOS.....	54

RESULTADOS.

1. Histogênese cerebelar como vista usando secções coradas com H&E.....	57
2. Desenvolvimento de metodologia imunohistoquímica, baseada em recuperação antigênica.....	58
2.1. Recuperação da antigenicidade utilizando microondas em secções parafinizadas para a detecção de PIN-imuno-reativo símile (IR).....	58
2.2. Imunorreatividade para PIN em secções cerebelares congeladas.....	59
2.3. Imunolocalização de nNOS em secções cerebelares humanas utilizando recuperação antigênica com Tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9.5 contendo 5% de uréia (p/v) em forno de microondas.....	59
2.4. Recuperação da antigenicidade da nNOS utilizando vapor em secções congeladas, fixadas e congeladas e secções parafinizadas.....	60
3. Expressão imunohistoquímica de PIN e moléculas relacionadas no cerebelo humano.....	60
3.1. Imunolocalização de PIN durante a corticogênese cerebelar do período pré e pós-natal até o início da idade adulta.....	60
3.1.1. Estadio de duas camadas: até 10 GW.....	60
3.1.2. Estadio de três camadas: 10-20 GW.....	61
3.1.3. Estadio de cinco camadas: 20-32 GW.....	61
3.1.4. Estadio de quatro camadas: 32GW até 1 ano pós-natal.....	61
3.1.5. Estadio de três camadas: Segundo ano de vida ao início da idade adulta.....	63
3.2. Expressão de PIN durante a idade adulta e envelhecimento do cerebelo humano.....	63

3.3. Expressão de DLC em secções cerebelares humanas durante a corticogênese pré e pós-natal até o início da idade adulta.....	64
3.3.1. Estadio de três camadas: 10-20 GW.....	64
3.3.2. Estadio de cinco camadas: 20-32 GW.....	64
3.3.3. Estadio de três camadas: 32 GW até 1 ano pós-natal.....	65
3.3.4. Estadio de três camadas: segundo ano pós-natal até o início da idade adulta.....	65
3.4. Expressão de DLC durante a idade adulta até o envelhecimento.....	66
3.5. Expressão de DIC-IR símile em secções de cerebelo humano.....	66
3.5.1. Estadio de cinco camadas: 20-32 GW.....	66
3.5.2. Estadio de quatro camadas: 32 GW até 1 ano pós-natal.....	67
3.5.3. Estadio de três camadas: do segundo ano pós-natal até o envelhecimento.....	67
4. Expressão imunohistoquímica de nNOS no cerebelo humano.....	67
4.1. Imunolocalização de nNOS durante a corticogênese cerebelar do período pré e pós-natal até o início da vida adulta.....	67
4.1.1. Estadio de duas camadas: até 10 GW.....	68
4.1.2. Estadio de três camadas: 10-20 GW.....	68
4.1.3. Estadio de cinco camadas: 20-32 GW.....	68
4.1.4. Estadio de quatro camadas: 32GW até 1 ano pós-natal.....	68
4.2. Estadio de três camadas: segundo ano de vida até o início da idade adulta.....	69
4.3. Expressão de nNOS durante a idade adulta e o envelhecimento do cerebelo humano.....	70
5. Imunodeteccção de PIN, DLC, DIC e nNOS em vérmis e hemisfério cerebelares humanos, utilizando imunoblot.....	70
5.1. PIN e DLC.....	70
5.2. DIC.....	70
5.3. nNOS.....	71
DISCUSSÃO.....	73
CONCLUSÕES.....	85

TABELAS E FIGURAS	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
SUMMARY	135

LISTA DE ABREVIATURAS

Bcl-2: família de proteínas pró-apoptóticas.
Bim: proteína membro da família das Bcl-2.
cAMP: monofosfato de adenosina cíclico.
Cdk5: serina treonina quinase.
cGMP: monofosfato de guanosina cíclico.
DAB: 3,3'-diaminobenzidina.
DIC: cadeia intermediária da dineína de 74 kDa.
DLC: cadeia leve da dineína de 8 kDa.
EDRF: fator relaxante derivado do endotélio.
EGL: camada germinativa externa.
eNOS: sintase endotelial do óxido nítrico.
FAD: flavina adenina dinucleotídeo.
FMN: flavina mononucleotídeo.
GCs: guanilato ciclase solúvel.
GL: camada granular.
GW: semana gestacional.
HE: hematoxilina-eosina.
iNOS: sintase induzível do óxido nítrico.
IR: imuno-reativo.
IZ: zona intermediária.
I κ B α : inibidor do fator nuclear κ B.
LD: *lamina dissecans*.
LIS1: proteína associada a lisencefalia no homem.
LPS: lipopolissacarídeo.
LTD: depressão de longo prazo.
LTP: potenciação de longo prazo.
MOL: camada molecular.
MZ: zona marginal.

NANC: nervos não adrenérgicos não colinérgicos.

NFκB: fator nuclear κB.

NMDA: N-metil-D-ácido aspártico.

nNOS: sintase neuronal do óxido nítrico.

NO: óxido nítrico.

NUDE: proteína que interage com NUDF em *Aspergillus nidulans*.

NUDEL: proteína humana homóloga a NUDE de *Aspergillus nidulans*.

NUDF: proteína de *Aspergillus nidulans*, homóloga a LIS1 humana.

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida.

PC: células de Purkinje.

PCL: camada de células de Purkinje.

PIN: proteína inibidora da sintase neuronal do óxido nítrico.

PKA: proteína quinase A.

PKC: proteína quinase C.

PLM: proteína ligante de maltose.

Pmo: mês pós-natal.

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila.

SDS: dodecil sulfato de sódio.

SNC: sistema nervoso central.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametilenodiamina.

Tris: Tris(hidroximetil)aminodiamina.

VZ: zona ventricular.

WM: substância branca.

LISTA DE FIGURAS

Tabela 1: Caracterização dos casos utilizados em imunohistoquímica.....	91
Tabela 2: Casos utilizados em <i>Western blot</i> e imunohistoquímica de secções congeladas pareadas com secções parafinizadas.....	95
Figura 1: Alterações na laminação do córtex cerebelar humano durante seu desenvolvimento, como detectadas pela coloração de secções sagitais com Hematoxilina-eosina.....	97
Figura 2: Recuperação da imunorreatividade de PIN e DLC usando forno de microondas em secções (5 µm) adjacentes de vérmis e hemisfério cerebelares de um espécime de 1 ano e 6 meses de idade.....	99
Figura 3: Expressão de PIN imunorreativo-símile em secções (5 µm) de cerebelo humano durante o desenvolvimento pré e pós-natal.....	101
Figura 4: Expressão de PIN imunorreativo-símile no córtex cerebelar humano em desenvolvimento pós-natal (secções tissulares de um recém nascido de 2 dias - mesmo caso documentado na Fig. 3 I).....	103
Figura 5: Expressão de PIN-IR em secções cerebelares de espécimes de crianças, adolescentes e adultos.....	105
Figura 6: Expressão de PIN no núcleo denteado.....	107
Figura 7: Expressão de PIN no núcleo denteado.....	109
Figura 8: Expressão de nNOS imunorreativo-símile em secções (5 µm) de cerebelo humano durante o desenvolvimento pré e pós-natal e em adulto jovem.....	111
Figura 9: Expressão de nNOS no cerebelo humano do segundo ano de vida até a idade adulta.....	113
Figura 10: Expressão de nNOS no cerebelo humano adulto até o envelhecimento.....	115
Figura 11: Expressão de nNOS no cerebelo humano.....	117
Figura 12: Imunodeteccção de anti-PIN por imunoblot.....	119
Figura 13: Imunodeteccção de anti-DLC por imunoblot.....	119
Figura 14: Imunodeteccção de bandas DIC-IR por imunoblot.....	119
Figura 15: Imunodeteccção de anti-nNOS utilizando imunoblot.....	121

O PIN é a proteína inibidora da sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS). O mecanismo de regulação ocorre pela interação do PIN com a nNOS, inibindo sua dimerização, dissociando os dímeros já formados e assim inibindo a formação da enzima ativa. O PIN é uma proteína de 10 kDa e 89 resíduos de aminoácidos altamente conservada na natureza. O PIN humano apresenta 100% de homologia com a cadeia leve da dineína (DLC) humana. A DLC está envolvida na modulação da atividade transcricional do NFκB. A dineína está envolvida em uma variedade de processos de motilidade intracelular, incluindo divisão celular, tráfego de vesículas membranosas e outras partículas intracelulares. A interação de PIN com múltiplas proteínas e sua alta conservação evolutiva sugerem que o PIN possa ser um importante regulador de vários processos fisiológicos. O óxido nítrico (NO) atua como um mensageiro não convencional nos sistemas vascular, imune e nervoso. O modelo corticogênese cerebelar humana é relativamente bem conhecido e permite correlacionar eventos morfogênicos e bioquímicos/moleculares.

Observamos que a expressão imunohistoquímica de PIN/DLC e nNOS no cerebelo humano é desenvolvimento-dependente. Durante a ontogênese estas moléculas ocorrem em regiões proliferativas, como a EGL e a zona ventricular, no núcleo e citoplasma das células. Células com aspecto migratório foram imunomarcadas para PIN, DLC e nNOS no núcleo e no citoplasma. Este resultado é inédito, e não encontramos relatos semelhantes na literatura. Os interneurônios e as células de Purkinje expressaram PIN e DLC, principalmente no núcleo celular, desde o surgimento até 98 anos. E a imunodeteção de nNOS nos interneurônios e células de Purkinje foi observada principalmente no citoplasma e ramificações dendríticas em todas as idades observadas. A camada granular interna expressou PIN, DLC e nNOS em todo o período estudado. Detectamos imunorreatividade para PIN e DLC nas células ganglionares do núcleo denteado, principalmente no núcleo celular, e para a nNOS principalmente no citoplasma, desde a ontogênese até o envelhecimento do cerebelo humano. Nossos resultados imunohistoquímicos foram validados pela detecção de PIN, DLC, DIC e nNOS em amostras cerebelares obtidas de pacientes de 6, 16, 23, 47, 68 e 82 anos de idade usando *Western blotting*.

INTRODUÇÃO

O PIN foi identificado no tecido nervoso de rato por Jaffrey e Snyder (1996) como o inibidor protéico da isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico (nNOS), utilizando o método do duplo híbrido. O PIN interage fisicamente com a nNOS e inibe a formação do dímero cataliticamente ativo, além de facilitar o transporte de nNOS ao longo dos microtúbulos nos axônios. O PIN é uma proteína de 89 aminoácidos altamente conservada em diversas espécies e interage com um número muito grande de proteínas relacionadas a diversos mecanismos celulares (JAFFREY & SNYDER, 1996), como com o inibidor do fator nuclear κB , $I\kappa B\alpha$ (CRÉPIEUX *et al.*, 1997) e a proteína pró-apoptótica Bim (PUTHALAKATH *et al.*, 1999). O PIN de SNC humano apresenta 100% de homologia com PIN de rato e de camundongo, 100% de homologia com a DLC humana e 92% de homologia com a cadeia leve da dineína (DLC 8) de 8 kDa de *Chlamydomonas reinhardtii* (JAFFREY & SNYDER, 1996; TOCHIO *et al.*, 1998). A DLC foi descrita por King e Patel-King (1995) como a cadeia leve (DLC de 8 kDa) da dineína flagelar de *Chlamydomonas reinhardtii*. O PIN foi identificado como uma das cadeias leves da miosina-Va de cérebro de pintainho, associada com o domínio cauda da proteína e pode estar envolvida com o transporte de vesículas (ESPÍNDOLA *et al.*, 2000). Assim, motores moleculares baseados tanto em microtúbulos, como dineínas, quanto em actinas, como miosinas, compartilham de uma sub-unidade comum (VALEE & GEE, 1998). Em processos de desenvolvimento do sistema nervoso central, principalmente migração celular, a dineína pode estar envolvida na nucleocinese (MORRIS, 2000).

No sistema nervoso central PIN foi detectado utilizando *Northern* e *Western blot* em cerebelo, córtex, mesencéfalo, medula ablongata, hipocampo e medula espinal de ratos adultos (GREENWOOD *et al.*, 1997). Após isquemia, observou-se um aumento na expressão de PIN no córtex cerebral e hipocampo de ratos adultos (GILLARDON *et al.*, 1998). Utilizando os métodos de *Northern blot* e hibridização *in situ* o PIN foi detectado em cérebros pós-isquemia com acentuado aumento na sua expressão. Este aumento pode estar relacionado com a produção de óxido nítrico, transporte intracelular ou com a estrutura do citoesqueleto (GILLARDON *et al.*, 1998).

Neurotransmissores clássicos são liberados na fenda sináptica por exocitose de vesículas. O gás hidrofóbico NO não se acumula em vesículas, sua produção é regulada pela atividade da NOS. O controle rápido da atividade da nNOS se dá por regulação alostérica, por modificação pós-tradução e pela localização subcelular da enzima. Neste contexto, há extensa auto-inibição da nNOS (e das outras isoformas) pelo NO, via formação de complexo nitrosil-ferroso com o grupo heme da NOS (ABU-SOUD *et al.*, 1995). Ainda, várias quinases (CAM quinase II, PKA, PKC) fosforilam a nNOS levando à redução de sua atividade catalítica; em contraste a calcineurina defosforila a nNOS e aumenta sua atividade (DAWSON & DAWSON, 1996). Em adição, a atividade da nNOS pode ser estabilizada/ativada por fosfolípidos, de modo Ca^{++} -dependente (HORI *et al.*, 1997).

Em nosso laboratório temos interesse em processos de desenvolvimento do sistema nervoso, particularmente o desenvolvimento cerebelar. Desta forma procuramos relacionar a expressão da proteína PIN/DLC em tecido cerebelar humano de 11 semanas gestacionais até 98 anos descrita neste trabalho, com tais eventos. O PIN pode estar envolvido em processos celulares como o inibidor da nNOS e/ou como um motor molecular presente em dineínas e miosinas. Assim, utilizando imunohistoquímica, observamos que a expressão de PIN, DLC e nNOS é desenvolvimento-dependente. A expressão de PIN, DLC e nNOS em regiões proliferativas, como a camada germinativa externa (EGL) do córtex cerebelar e o neuroepitélio ventricular, sugerem que estas moléculas poderiam estar envolvidas em processos de proliferação neural. A presença de PIN/DLC e nNOS em células granulares com aspecto migratório sugere o envolvimento destas moléculas em processos de migração neuronal. A presença de PIN/DLC e nNOS no núcleo celular de diferentes tipos celulares sugere papel na regulação da expressão gênica. A diferença na localização subcelular, núcleo e citoplasma, de PIN/DLC e nNOS durante e após o desenvolvimento sugere diferentes papéis destas moléculas dependendo da localização e estágio ontogenético.

REVISÃO DA LITERATURA

Desenvolvimento cerebelar.

A corticogênese cerebelar é relativamente bem conhecida em seus aspectos morfológicos e celulares. Em contraste, os aspectos bioquímicos e moleculares destes fenômenos são bem menos conhecidos.

No Sistema Nervoso (SN) as células imaturas migram até alcançar a posição final que ocupam no SN adulto. A maioria dos neurônios do SN de vertebrados em desenvolvimento é gerada em zonas proliferativas diferentes daquelas nas quais residem no cérebro adulto. No SNC, após a divisão celular, a migração pode ocorrer de forma radial, na qual os neurônios usam processos radiais; e tangencial, na qual o movimento é paralelo à superfície pial. Na migração radial gliofilica, que ocorre em particular nos córtices cerebral e cerebelar, neurônios usam as fibras radiais como suporte e migram de modo aproximadamente perpendicular à superfície cortical (RAKIC, 1971).

A migração de células granulares cerebelares da camada granular externa (EGL) em direção à sua posição final na camada granular interna (GL) depende do influxo de cálcio na célula via canais de cálcio tipo N (KOMURO & RAKIC, 1992). O glutamato, agindo via receptor NMDA, também parece regular a migração neuronal cálcio-dependente (KOMURO & RAKIC, 1993). A frequência e a amplitude de flutuações transitórias no nível de cálcio intracelular foram correlacionadas positivamente com a velocidade de movimento da célula granular em cultura de explantes (KOMURO & RAKIC, 1995). Tem-se sugerido que moléculas presentes no meio celular local afetem a motilidade celular ativando canais iônicos específicos e segundos mensageiros que influenciam a polimerização de proteínas do citoesqueleto (RAKIC & KOMURO, 1995). Estas interações precoces entre neurônios pós-mitóticos e células vizinhas controlaria a velocidade de seus movimentos, esculpiria suas formas, estabeleceria sua posição e, portanto, determinaria indiretamente suas identidades antes da formação de conexões sinápticas (RAKIC, 1990).

Durante as 10 primeiras semanas gestacionais o córtex cerebelar humano, assim como o dos primatas, é formado primeiramente por duas camadas celulares, as zonas marginal e intermediária. Entre 10 e 20 semanas gestacionais, o córtex é composto por três camadas celulares: surge a camada germinativa externa (EGL), localizada acima da zona marginal (RAKIC & SIDMAN, 1970). A camada germinativa externa é formada pela migração

tangencial de células através da superfície cerebelar de 11 a 13 semanas gestacionais. As células granulares surgem pela proliferação de células no trígono germinativo, de onde partem para formar a EGL. Neste período é possível visualizar células bipolares orientadas paralelamente à superfície. Depois de estabelecida a camada germinativa externa, podemos observar duas regiões distintas: a zona proliferativa, próxima à pia, onde ocorre a proliferação das células granulares e a zona pré-migratória, localizada entre a zona proliferativa da EGL e a camada molecular, onde as células granulares, após a sua última divisão mitótica, assumem uma forma característica (RAKIC & SIDMAN, 1970). Após as 13 semanas gestacionais, há significativa proliferação das células do neuroepitélio ventricular, de onde surgem as células de Purkinje, astrócitos, células gliais e células ganglionares do núcleo denteado. Nesta região ocorre migração radial de células da superfície ventricular para a periferia (ZECEVIC & RAKIC, 1976).

No período seguinte de 20 a 30 semanas gestacionais o córtex apresenta-se dividido em cinco camadas: a EGL, a camada molecular (MOL), a camada de células de Purkinje (PCL), a *lamina dissecans* (LD) presente no homem e outros primatas, e a camada granular (GL). A *lamina dissecans* é uma camada acelular e não é visualizada em todo o *folium*, mas principalmente na profundidade da *fissura prima*. Neste período já houve uma migração massiva de células da EGL em direção ao interior do cerebelo, iniciando assim a formação da camada granular. O período seguinte vai de 30-32 semanas gestacionais até o primeiro ano pós-natal e o córtex está dividido em quatro camadas celulares: a EGL, que fica cada vez mais estreita à medida que as células granulares migram para a camada granular; a camada molecular, que aumenta em espessura durante a corticogênese; a camada de células de Purkinje disposta em monocamada e a camada granular. A *lamina dissecans* desapareceu neste período. No segundo ano pós-natal o córtex cerebelar já tem a citoarquitetura do cerebelo adulto, composto por três camadas celulares: camada molecular, camada de células de Purkinje e camada granular (RAKIC & SIDMAN, 1970).

Migração neuronal e motores moleculares.

Dineínas.

A dineína citoplasmática é um dos principais motores moleculares no transporte intracelular ao longo dos microtúbulos (PHILLIS *et al.*, 1996). A dineína tem função de organização do fuso mitótico, posicionamento do complexo de Golgi e transporte de organelas membranosas (DICK *et al.*, 1996). A dineína citoplasmática é uma proteína composta por subunidades: 2 cadeias pesadas de 530 kDa, 2 cadeias intermediárias de 74 kDa, 4 cadeias leves intermediárias de 53 a 59 kDa e várias cadeias leves de aproximadamente 8 a 20 kDa. O complexo tem em torno de 1,2 MDa. Esta molécula é capaz de gerar a energia necessária ao movimento pela hidrólise de ATP. As cadeias leves da dineína participam da complexa montagem e acoplamento da dineína às várias cargas celulares (KING, 2000).

A migração de células granulares cerebelares da camada germinativa externa atravessando as camadas molecular e de células de Purkinje até a camada granular foi observada primeiramente por Ramón y Cajal (1911) utilizando microscopia de luz. A migração neuronal sobre fibras gliais é fundamental para o desenvolvimento do cérebro de mamíferos (RAKIC, 1971; 1972; 1985). No cerebelo as fibras radiais da glia de Bergmann guiarão a migração neuronal. As células epiteliais de Golgi localizam-se próximo às células de Purkinje e enviam seus processos em forma de candelabro, as fibras de Bergmann, até a superfície pial, onde são fixados seus pés terminais. As células granulares, após a sua última divisão mitótica, assumem bipolaridade horizontal, estendendo processos laterais que irão originar as fibras paralelas. A seguir, as células granulares apostas sobre fibras da glia de Bergmann estendem um processo líder perpendicular às fibras paralelas. A migração da célula granular ocorre por movimentos de extensão do processo líder e translocação do núcleo por este processo líder em associação com a glia de Bergmann. A célula migratória ao deslocar-se deixa para trás seu axônio com as fibras paralelas na sua extremidade. Ao atingir a região da camada de células de Purkinje a célula granular desloca-se da glia radial e continua seu trajeto até atingir sua posição na camada granular (RAKIC, 1971; 1990).

As células granulares cerebelares são um bom modelo experimental de migração no Sistema Nervoso Central por causa de seu movimento especializado ao longo de fibras gliais. Mecanismos celulares e moleculares de interação neurônio-glia e migração foram estudados

utilizando sistemas de microculturas (TRENKNER & SIDMAN, 1977; HATTEN & LIEM, 1981; HATTEN & MASON, 1986; GREGORY *et al.*, 1988; RIVAS & HATTEN, 1995). Há evidências de que o citoesqueleto esteja envolvido no processo migratório pela detecção, por video- e elétron-microscopia, de microtúbulos orientados longitudinalmente da base do núcleo até o processo líder na célula granular migratória (GREGORY *et al.*, 1988). O sistema de microtúbulos estimula um fluxo orientado de elementos membranosos e vesículas do soma ao processo líder (HATTEN, 1993). Durante a migração neuronal são vistos elementos do citoesqueleto em dois tipos de aposição neurônio-glia, uma junção intersticial na interface do corpo celular e a glia de Bergmann e as *puncta adherentia* ao longo do processo líder (GREGORY *et al.*, 1988).

Sugeriu-se que o mecanismo responsável pela migração neuronal no cérebro humano tenha um componente similar ao da migração nuclear vista em fungos filamentosos (MORRIS *et al.*, 1998a). Uma dosagem insuficiente de LIS1, homólogo humano de NUDF de *Aspergillus nidulans*, causa a lisencefalia, uma desordem na migração neuronal humana (DOBYNS & TRUWIT, 1995). Assim, apenas uma subpopulação de neurônios chega ao córtex, gerando a aparência lisa do córtex cerebral. Este defeito durante o desenvolvimento cerebral causa severo retardo mental, epilepsia, e usualmente a morte em idade muito precoce. LIS1 é uma proteína que associa-se a microtúbulos e reduz a frequência de catástrofes nos microtúbulos *in vitro* (SAPIR *et al.*, 1997). Notáveis similaridades entre NUDF de *Aspergillus nidulans* e LIS1 levaram à proposta de que migração neuronal e migração nuclear estão relacionadas (MORRIS *et al.*, 1998a).

A migração de células WART de adenocarcinoma de pulmão em cultura apresenta um modelo que relaciona migração neuronal LIS1-mediada com migração nuclear NUDF-mediada. Células WART movem-se pela extensão de um longo processo anterior, pelo qual o corpo celular transloca-se (KLOMINEK *et al.*, 1991). Na migração de células granulares o mecanismo de extensão do processo líder e translocação do núcleo é semelhante (RAKIC, 1971). Este tipo de migração celular é denominado nucleocinese. Neurônios em cultura e blastômeros de células P, uma linhagem em *Caenorhabditis elegans*, também se movem desta forma (BOOK & MOREST, 1990; GONCZY *et al.*, 1999).

A hipótese de que a migração neuronal defeituosa vista na lisencefalia possa ser uma falha na nucleocinese (MORRIS *et al.*, 1998) têm sido testada pelo exame do ambiente migratório de explantes de células granulares cerebelares de camundongos nocauteados para LIS1. LIS1 nocauteada em camundongos é letal ao embrião, mas heterozigotos exibem defeitos na migração neuronal (HIROTSUNE *et al.*, 1998). Em explantes de camundongos normais os corpos celulares migram através dos processos citoplasmáticos. Nos explantes de camundongos nocauteados para LIS1 são estendidos processos citoplasmáticos como nos animais normais, mas a migração do corpo celular é defeituosa. Este experimento suporta a hipótese de que o defeito na migração neuronal mostrado na lisencefalia pode ser gerado por um defeito na migração nuclear.

Muitas características na translocação do núcleo são comuns na migração nuclear dos eucariotos. O núcleo é puxado pelos centrossomos, onde microtúbulos, dineína citoplasmática e dinactina estão envolvidos. Os efeitos de proteínas motoras na estabilidade dos microtúbulos e movimento nuclear em fungos são de grande interesse, pois evocam a questão da migração neuronal ser mediada pela atividade motora e/ou por efeitos na dinâmica dos microtúbulos (MORRIS, 2000).

Morris (2000) levanta as questões: NUDF e LIS1 têm um mecanismo conservado de interação entre si? Que mecanismo pode ser? Se este mecanismo afeta, e como afeta a dineína citoplasmática, dinactina e/ou microtúbulos?

Niethammer *et al.* (2000) mostram caminhos prováveis para responder a estas questões. Estes autores isolaram um novo gene, que exhibe sequência similar à NUDE de *Aspergillus nidulans*. Recentemente, mostrou-se que NUDF interage com NUDE (EFIMOV & MORRIS, 2000). NUDEL associa-se fisicamente com ambas, dineína citoplasmática e LIS1. Intrigantemente, NUDEL é um substrato *in vivo* de Cdk5, e a fosforilação de NUDEL por Cdk5 afeta sua distribuição em neurônios. Então, NUDEL é uma molécula que cruza o caminho que ocorre entre Cdk5 e LIS1 (NIETHAMMER *et al.*, 2000). O desenvolvimento do córtex cerebral, propriamente migração neuronal, depende da atividade de Cdk5, uma serina/treonina quinase (KWON & TSAI, 2000). Camundongos com deficiência de Cdk5, ou um par regulatório p35, exibem defeitos de laminação cortical (CHAE *et al.*, 1997). Tem-se

mostrado que Cdk5 regula a dinâmica de actina do citoesqueleto e adesão neuronal (KWON *et al.*, 2000).

Este trabalho sobre esta nova molécula, NUDEL, apresentou evidências de que LIS1 e Cdk5 estão envolvidos na regulação da dineína citoplasmática. LIS1 interage com a dineína citoplasmática (SMITH *et al.*, 2000), que atua na organização do fuso mitótico, no transporte retrógrado axonal em neurônios, bem como no transporte de microtúbulos durante o crescimento de axônios (PHILLIS *et al.*, 1996). Niethammer *et al.* (2000) propuseram que LIS1 em abundância em neurônios facilita a função específica da dineína, que tem um papel na migração neuronal e crescimento de axônios. O transporte axonal é crítico para o estabelecimento de polaridade axodendrítica. Cérebros humanos lisencefálicos e córtices de camundongos p35^{-/-} contêm neurônios com polaridade axodendrítica reversa ou aberrante (NIETHAMMER *et al.*, 2000).

Foi demonstrado que NUDEL e LIS1 são bioquimicamente e geneticamente ligados. No cérebro de camundongos adultos NUDEL imunorreativo aparece fortemente na neurópila e tratos axonais, sugerindo que sua função primária possa estar relacionada a eventos que estejam ocorrendo em localizações sinápticas, carregando e descarregando cargas. Suportando estes dados, NUDEL foi também encontrado na membrana sináptica e densidade pós-sináptica em cérebros de camundongos adultos. NUDEL e LIS1 podem regular aspectos ambientais da dineína na nucleocinese. A superexpressão de NUDEL causa a redistribuição da cadeia intermediária da dineína na periferia celular (NIETHAMMER *et al.*, 2000).

Os três sítios de fosforilação de NUDEL por Cdk5 estão na região de ligação com a dineína, sugerindo que a fosforilação poderá regular a ligação ao complexo dineína/dinactina e assim regular a função da dineína, podendo inibir o transporte baseado em dineína. NUDEL e LIS1 teriam papéis antagônicos em relação à atividade da dineína (NIETHAMMER *et al.*, 2000).

A especificidade da função motora da dineína está no fato de ser regulada por proteínas que interagem com o centro do complexo motor. Mostrou-se recentemente que a superexpressão de LIS1 estimulou a mudança no tamanho e localização de complexos de dineína (SMITH *et al.*, 2000). NUDEL muda a localização da dineína, como foi dito anteriormente. A via Cdk5 têm sido implicada na modulação do citoesqueleto de actina.

Embora a dineína seja um motor molecular ligado a microtúbulos, o complexo regulatório dineína-dinactina contém várias moléculas actina-símile que regulam a associação de vesículas e organelas membranosas ao citoesqueleto cortical. Além disso, há evidências que a própria dineína possa ancorar-se ao citoesqueleto cortical. Finalmente, a cadeia leve da dineína (DLC) associa-se à miosina-V (ESPINDOLA *et al.*, 2000), uma proteína motora ligada a actina, e a proteínas de densidade pós-sináptica. Então, Cdk5-dineína cruzam o caminho potencial de regulação de transporte entre redes de microtúbulos e actina. Isto, juntamente com a similaridade da inversão das camadas corticais entre os fenótipos *reeler/scrambler* e camundongos deficientes em Cdk5, sugerem uma íntima relação entre estes caminhos. Niethammer *et al.* (2000) sugerem o cruzamento entre três conhecidos caminhos regulatórios da migração neuronal.

Miosinas.

Miosinas são proteínas motoras relacionadas ao transporte celular anterógrado ligadas a filamentos de actina e geram a energia necessária para o seu movimento pela hidrólise de ATP. A superfamília das miosinas consiste de 17 classes de diferentes miosinas (MERMALL *et al.*, 1998). A molécula da miosina-V está dividida em: domínio motor, que interage com os filamentos de actina e hidroliza ATP; domínio pescoço, que se liga às cadeias leves ou a calmodulina; domínio cauda, que posiciona e ancora o domínio motor e interage com a carga (revisão SELLERS *et al.*, 2000). A miosina-V tem sua sequência de aminoácidos determinada para alguns organismos: levedura (HAARER *et al.*, 1994), camundongo (MERCER *et al.*, 1991), miosina-Va de cérebro de pintainho (LARSON, 1996), miosina-Va humana (ENGLE & KUENNETT, 1994), miosina-Vb de rato (ZHAO *et al.*, 1996) e miosina-V de *Drosophila* (BONAFE & SELLERS, 1998). Calmodulinas e cadeias leves estão associadas à miosina-V (STEVENS & DAVIS, 1998). Dentre as cadeias leves foram identificadas duas cadeias de 23 e 17 kDa, presentes na miosina II, além de uma cadeia leve de 10 kDa, identificada como a cadeia leve da dineína (DLC8) ou PIN (ESPINDOLA *et al.*, 2000). Em nosso laboratório foi estudada a expressão imunohistoquímica da miosina-V no cerebelo e hipocampo de rato (BRINN, 1999) e na retina humana (JORGE, 1999).

PIN/DLC

O PIN foi identificado no tecido nervoso de rato por Jaffrey e Snyder (1996) como o inibidor protéico da forma neuronal da sintase do óxido nítrico (nNOS), utilizando o método do duplo híbrido. O PIN interage fisicamente com a nNOS e inibe a formação do dímero cataliticamente ativo, além de facilitar o transporte de nNOS ao longo dos microtúbulos nos axônios. O PIN é uma proteína de 10 kDa com 89 resíduos de aminoácidos altamente conservados em diversas espécies e interage com um número muito grande de proteínas relacionadas a diversos mecanismos celulares (JAFFREY & SNYDER, 1996). O PIN humano apresenta 100% de homologia com o PIN de rato e de camundongo, 100% de homologia com a DLC humana e 92% de homologia na sequência de aminoácidos com a cadeia leve da dineína (DLC 8) de 8 kDa de *Chlamydomonas reinhardtii* (JAFFREY & SNYDER, 1996; TOCHIO *et al.*, 1998). A DLC foi descrita por King e Patel-King (1995) como a cadeia leve (DLC de 8 kDa) da dineína flagelar de *Chlamydomonas reinhardtii*. PIN/DLC foi identificada como uma das cadeias leves da miosina-Va de cérebro de pintainho, associada com o domínio cauda da proteína e pode estar envolvida com o transporte de vesículas (ESPÍNDOLA *et al.*, 2000). Assim, motores moleculares baseados tanto em microtúbulos, como dineínas, quanto em actinas, como miosinas, compartilham de uma sub-unidade comum (VALEE & GEE, 1998). Em processos de desenvolvimento do sistema nervoso central, principalmente migração celular, a dineína pode estar envolvida na nucleocinese (MORRIS, 2000). PIN/DLC está envolvida no controle transcricional mediado pelo fator nuclear κ B, pela interação com seu inibidor I κ B α (CRÉPIEUX *et al.*, 1997). Também está relacionada com o controle da apoptose pela interação específica entre PIN/DLC e Bim, uma nova proteína pró-apoptótica da família da Bcl-2 (PUTHALAKATH *et al.*, 1999). A presença de duas cópias da DLC8 dentro do complexo da dineína citoplasmática sugere que a dimerização desta subunidade pode ser importante para a montagem e função do complexo motor, e o entendimento da relação entre as estruturas terciárias e quaternárias será útil para entender a função da proteína (BENASHSKI *et al.*, 1997).

Greenwood *et al.* (1997), utilizando *Northern* e *Western blot*, detectaram PIN em: cerebelo, córtex, mesencéfalo, medula ablongata, hipocampo e medula espinal de ratos adultos. A isquemia cerebral está associada ao aumento da produção de NO (IADECOLA *et*

al., 1995). Inibidores seletivos da nNOS reduzem a área de infarto após a oclusão da artéria cerebral média (IADECOLA, 1997). Camundongos nocauteados para a nNOS exibem área de infarto menor e aumento da resistência de neurônios na área de Sommers (CA1) à isquemia global transitória (HUANG *et al.*, 1994). Estes dados sugerem que a atividade da nNOS é prejudicial ao cérebro isquêmico. Após isquemia, observou-se um aumento na expressão de PIN no córtex cerebral e hipocampo de ratos adultos (GILLARDON *et al.*, 1998). Utilizando *Northern blot* e hibridização *in situ* o PIN foi detectado em cérebros pós-isquemia com acentuado aumento na expressão de PIN. Este aumento de expressão pode estar relacionado com a regulação da produção de óxido nítrico, ou com o aumento de DLC contrabalançando os efeitos da isquemia sobre o transporte intracelular ou a estrutura do citoesqueleto (GILLARDON *et al.*, 1998).

Utilizando imunohistoquímica, o PIN foi localizado no sarcolema e núcleo de células de músculos ventilatórios, e nos axônios das fibras nervosas, em ratos. A localização do PIN em regiões musculares onde há abundância de nNOS sugere que possa estar desempenhando papel de regulação da atividade da nNOS nas fibras de músculo esquelético (GUO *et al.*, 1999).

Sintases do óxido nítrico – nNOS.

A descoberta do radical livre óxido nítrico (NO; FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; IGNARRO *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1987; GARTHWAITE *et al.*, 1988) que atua como um mensageiro não-convencional nos sistemas vascular, imune e nervoso, desencadeou um surto de pesquisas sobre esta molécula difusível e altamente reativa. O NO foi detectado em abundância no sistema nervoso central e periférico (BREDT & SNYDER, 1994). A síntese do óxido nítrico é catalisada pelas sintases do óxido nítrico (NOS; L-arginina, NADPH: oxigênio oxidoredutases formadoras de óxido nítrico; E.C. 1.14.13.39) que convertem L-arginina em citrulina, numa reação que requer NADPH e O₂ (MARLETTA, 1994).

Três isoformas de NOS foram identificadas. A NOS1 (NOS neuronal; nNOS) é a isoforma constitutiva da NOS expressa em subpopulações neuronais. A NOS3 (NOS endotelial; eNOS) é a isoforma constitutiva da NOS expressa em células endoteliais. Ambas

as NOS, neuronal e endotelial, são ativadas rapidamente pelo aumento dos níveis de cálcio intracelulares, via calmodulina (BREDT & SNYDER, 1994). A NOS2 (NOS induzida; iNOS) é induzida por citocinas inflamatórias, lipopolissacarídeo (LPS) e agentes infecciosos. Esta ativação é independente dos níveis de cálcio/calmodulina (XIE *et al.*, 1982; FÖRSTERMANN *et al.*, 1998). As NOS podem ser caracterizadas como hemeoproteínas citocromo P-450-símile. De modo geral, apresentam um domínio redutase C-terminal e um oxidativo ou heme-ligante N-terminal. As estruturas primárias das isoformas de NOS compartilham seqüências consenso de sítios de ligação para calmodulina, NADPH, flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), bem como sítios para fosforilação. Cada isoforma catalisa a síntese de NO como uma proteína dimérica.

O NO é produzido rapidamente sob demanda, não sendo armazenado nem inativado enzimaticamente como os neurotransmissores clássicos (SCHMIDT & WALTER, 1994). Assim, o controle da síntese de NO ocorre pela regulação da atividade da NOS. Um dos mecanismos de sua regulação é a interação da proteína inibidora da nNOS (PIN) com a nNOS. PIN age tanto pela inibição da dimerização, quanto pela dissociação dos dímeros de nNOS formados, levando à perda de sua atividade catalítica (JAFFREY & SNYDER, 1996). A regulação da atividade da NOS por proteínas-quinase é um mecanismo Ca^{2+} -dependente de inibição da NOS. A nNOS é fosforilada por proteína quinase A cAMP-dependente, e proteína quinase II cálcio/calmodulina-dependente, que agem em diferentes sítios; a fosforilação pela PKC reduz dramaticamente a atividade enzimática da NOS. A fosforilação pela proteína quinase C regula a atividade da NOS em neurônios e células endoteliais (BREDT *et al.*, 1991).

No sistema vascular, o NO foi identificado como o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), liberado de células endoteliais em resposta a acetilcolina, bradicinina e histamina, por exemplo (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). O NO difunde-se até o músculo liso onde ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), que catalisa a formação de cGMP (MURAD, 1994). O cGMP promove o relaxamento do músculo liso. No Sistema Nervoso Central, o neurotransmissor excitatório glutamato, atuando em receptores pós-sinápticos do tipo NMDA, provoca influxo de Ca^{++} . O aumento da concentração de Ca^{++} ativa a nNOS via Ca^{++} /calmodulina, com produção de NO (GARTHWAITE *et al.*, 1988). O NO formado

difunde-se para o terminal pré-sináptico onde ativa a GCs, com produção de cGMP (CHRISTOPHERSON & BREDT, 1997). Nos nervos não-adrenérgicos não-colinérgicos do intestino (NANC), a nNOS está seletivamente concentrada em varicosidades axonais do plexo mioentérico. Durante o peristaltismo intestinal, os potenciais de ação disparados pelos neurônios mioentéricos promovem o influxo de Ca^{++} nas varicosidades, ativando a calmodulina que ativa a nNOS. O NO assim produzido se difunde para as células musculares lisas, ativando a GCs nelas presente. O cGMP formado medeia o relaxamento do músculo liso (CHRISTOPHERSON & BREDT, 1997).

No encéfalo a atividade neural está associada a um aumento no fluxo sanguíneo (IADECOLA *et al.*, 1993). A atividade anormal da inervação dos grandes vasos cerebrais parece estar associada à enxaqueca, de vez que alguns bloqueadores de canal de cálcio promovem vasoconstrição nestes territórios, controlando a enxaqueca (BREDT *et al.*, 1990) e antagonizam a cefaléia induzida pela nitroglicerina (WELCH, 1993). No SNC, o NO participa na plasticidade sináptica, sendo aparentemente essencial para a potenciação de longo prazo (LTP) no hipocampo (MCBAIN *et al.*, 1999) e para a depressão de longo prazo (LTD) no cerebelo (DANIEL *et al.*, 1998). Assim, o NO também tem papel funcional na sinaptogênese, em processos sensoriais, na plasticidade sináptica e aprendizado. Outra função dual do NO parece ser proteger/lesar neurônios na vigência de processos excitotóxicos. A inibição seletiva da NOS previne a neurotoxicidade glutamatérgica mediada por receptores NMDA em culturas primárias de cérebro, indicando que o NO liberado por neurônios pode matar neurônios adjacentes (BREDT *et al.*, 1991). Em sistemas biológicos, a produção de intermediários reativos de oxigênio associada à deficiência de sistemas antioxidantes pode promover efeitos deletérios do NO. O radical livre NO reage com o superóxido (O_2^-), metais de transição e oxigênio (O_2). Cada produto dessas reações: peroxinitrito ($OONO^-$), adutos de metal-NO, e NO_2 , respectivamente, pode reagir com sítios nucleofílicos. Reações de nitrosilação podem ocorrer em outros sítios nucleofílicos sob condições mais restritas, como por exemplo a N-nitrosilação de ácidos desoxirribonucleicos e modificações covalentes de resíduos de tirosina, ambos mecanismos potenciais de toxicidade (STAMLER, 1994).

Utilizando imunohistoquímica, a nNOS foi detectada ou não no SN humano por alguns autores. A distribuição de neurônios NOS-IR no cérebro humano foi observada em 4 pacientes

com uma média de 60 anos (EGBERONGBE *et al.*, 1994). No cerebelo observaram a marcação da NOS em células granulares, células de Purkinje e seus processos, moderada marcação de células estreladas e em cesto e uma densa rede de fibras na camada molecular. Esta distribuição é similar à distribuição da atividade da nNOS mostrada em cerebelo de rato (BREDT *et al.*, 1990; FÖRSTERMANN *et al.*, 1990; SCHIMIDT *et al.*, 1992), com poucas diferenças notáveis no cerebelo. Downen *et al.* (1999) não detectaram imunorreatividade para nNOS no cerebelo humano de 18 a 29 semanas gestacionais, a termo e no adulto. Ohyu e Takashima (1998) não observaram marcação para a nNOS de nenhuma camada do córtex cerebelar humano de 13 a 18 semanas gestacionais. Mas detectaram imunorreatividade a partir de 22 GW até o final da gestação e após os 3 anos, quando o córtex cerebelar é similar ao córtex adulto.

OBJETIVOS

1. Padronizar um método para recuperação da imunorreatividade de PIN, DLC, DIC e nNOS em tecido cerebelar humano fixado em formalina e embocado em parafina.
2. Analisar a expressão imunohistoquímica do PIN, DLC, DIC e nNOS no cerebelo humano da ontogênese ao envelhecimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Casuística utilizada neste estudo.

Utilizamos tecido cerebelar humano obtido de autópsias realizadas no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Os tecidos provieram de pacientes sem história de doença neurológica ou psiquiátrica, e sem evidência de patologia neurológica detectável pelo exame macroscópico e microscópico do SN. O exame neuropatológico foi realizado pelos Profs. Leila M. C. Chimelli e Luciano N. Serafini. O uso do material foi aprovado pela Comissão de Ética do HC FMRP-USP.

Processamos cerca de 110 casos de necrópsia e biópsia de várias regiões cerebrais e cerebelares (ZUCCHI & ZANELLA), das quais usamos o vérmis e o hemisfério cerebelares. Entre estes, utilizamos 80 casos entre 11 semanas gestacionais e 98 anos. A idade, a *causa mortis*, o intervalo entre o óbito e a fixação do tecido e o tempo de fixação estão descritos na Tabela 1. As idades gestacionais foram determinadas pela história materna, peso corporal e um conjunto de medidas do feto, combinados com as características histológicas do cerebelo.

2. Processamento do tecido humano.

Os tecidos cerebelares humanos foram fixados em formalina 10% (v/v). O tecido fixado foi desidratado em etanol, diafanizado em xileno e embocado em parafina. Os blocos de tecidos foram cortados em micrótomo modelo RM 2065 (Leica) com 5µm de espessura. As secções foram dispostas em lâminas tratadas com gelatina/chromalumn. Utilizamos 6 casos de necrópsia com idades variando entre 6 e 82 anos, com intervalo entre o óbito e a obtenção do tecido inferior a 7:25 horas, para *Western blot* e imunohistoquímica de secções congeladas pareadas com secções parafinizadas (Tab. 2). Após a dissecação, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram estocadas em freezer a -80°C.

Os blocos de tecido congelado utilizados em imunohistoquímica foram divididos em 2 grupos: blocos congelados em n-hexano a -70°C, ou blocos fixados em formalina 10% (v/v), crioprotetidos em sacarose 15 e 30% sucessivamente e então congelados em n-hexano a -70°C. Os blocos foram cortados em criostato com espessura de 10 µm. As secções

parafinizadas pareadas com os blocos congelados foram cortadas em micrótomo modelo RM 2065 (Leica) com 10 μm de espessura.

3. Coloração com Hematoxilina-Eosina das secções cerebelares humanas.

Secções de cerebelo humano foram coradas com Hematoxilina de Harris e eosina (H&E) para análise histopatológica e seleção dos blocos tissulares que apresentassem melhor conservação histológica.

4. Desenvolvimento de condição de recuperação da imuno-reatividade de secções cerebelares humanas.

4.1. Recuperação da imuno-reatividade de PIN em secções de cerebelo humano parafinizadas.

A recuperação da antigenicidade foi realizada pela modificação do procedimento experimental descrito por Martins *et al.* (1999). Um forno de microondas Sharp modelo RB-4A33, foi utilizado em potência nominal máxima. Para a imunolocalização de PIN as lâminas com secções parafinizadas de vérnis e hemisfério cerebelar foram colocadas em jarros Coplin contendo: tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6 ou tampão Tris-HCl 50mM, pH 9.5. São utilizados três jarros, dispostos simetricamente no forno de microondas, com a mesma quantidade de solução por jarro. Estes cuidados determinam uma irradiação reprodutível em cada jarro nos diferentes experimentos. Os jarros são cobertos com filme PVC (Vitafilm, GoodYear) preso por uma tira de borracha. Após fervura por 20 minutos, os jarros Coplin são removidos e deixados esfriar à temperatura ambiente por 30 minutos. Secções controle permaneceram em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6 ou tampão Tris-HCl 50mM, pH 9.5 à temperatura ambiente, pelo mesmo tempo que as secções teste foram tratadas.

4.2. Recuperação da imuno-reatividade de nNOS em secções de cerebelo humano parafinizadas e congeladas.

Para secções parafinizadas utilizadas na imunodeteção de nNOS utilizamos o mesmo procedimento descrito acima, com os tampões Tris-HCl 50mM, pH 9.5 e Tris-HCl 50mM, pH 9.5 contendo 5% de uréia Pierce. Utilizamos também um método alternativo, baseado em

aquecimento por vapor de água, de recuperação da imunorreatividade da nNOS em secções cerebelares parafinizadas. Em uma panela a vapor colocamos dois jarros Coplin com os diferentes tampões durante 45 minutos. Em panela a vapor o tampão não entra em ebulição, permanece a cerca de 95°C, proporcionando maior integridade das secções. Os controles permaneceram em tampão Tris-HCl 50mM, pH 9.5 com 5% de uréia (p/v), ou em tampão Tris-HCl 50mM, pH 9.5.

Para verificar se o aumento de imunorreatividade é também observável em secções congeladas, utilizamos panela a vapor por 45 minutos com os seguintes tampões em jarros Coplin: tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6 ou tampão Tris-HCl 50mM, pH 9.5. Os controles, onde foi omitido o tratamento pelo vapor, permaneceram em tampão citrato de sódio 10mM, pH 6.0 ou tampão Tris-HCl 50mM, pH 9.5.

5. Padronização do ensaio imuno-histoquímico para a detecção de PIN, DLC, DIC e nNOS em secções parafinizadas de cerebelo humano.

Durante a corticogênese cerebelar existem diferenças regionais acentuadas de desenvolvimento (RAKIC & SIDMAN, 1970; ZECEVIC & RAKIC, 1976). Assim, é necessário escolher uma região cerebelar para analisar o desenvolvimento em função da idade. A expressão destas moléculas em secções tissulares de vérmis e hemisfério cerebelares humanos foi observada, quando possível, no *cúlmen* na profundidade da *fissura prima*.

5.1. Imunohistoquímica.

Após a recuperação da antigenicidade usando tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,5 por 20 minutos em forno de microondas, as secções foram incubadas com glicina 50 mM tamponada com Tris-base 0.1M, pH 7.4, por 30 minutos à temperatura ambiente, para bloquear grupos aldeído. As secções foram então incubadas em tampão de bloqueio [tampão fosfato de sódio 0.02 M, pH 7.4, contendo 0.45 M de cloreto de sódio e 0.3% de Triton X-100 (New England Nuclear - Tampão B), e 5% (p/v) de leite em pó Molico e soro de jumento inativado diluído a 1:6 (v/v)] por 4 horas. As secções foram incubadas “overnight” à temperatura ambiente com o anticorpo primário em tampão de bloqueio. Os controles foram incubados com tampão de bloqueio apenas. As secções foram submetidas a sucessivas lavagens com tampão B. A seguir,

as secções foram incubadas por 15 minutos em solução avidina (Dako), lavadas com tampão B e incubadas por mais 15 minutos em solução biotina (Dako), e novamente lavadas com tampão B. O anticorpo primário foi detectado pelo anticorpo secundário biotinilado diluído em tampão de bloqueio, por 60 minutos à temperatura ambiente. As secções foram novamente lavadas com tampão B, e em seguida em PBS. O anticorpo secundário foi detectado usando o kit Elite ABC-peroxidase (Vector), por 60 minutos à temperatura ambiente. As secções foram novamente lavadas com tampão B, e em seguida com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7.6. A marcação foi feita usando H₂O₂ como substrato em presença de 0.4 mg/ml de 3, 3'-diaminobenzidina (DAB). A reação foi interrompida com água Milli-Q após 12 minutos. Os cortes foram desidratados com álcoois e diafanizados em xilol. As secções foram montadas entre lâmina e lamínula com Permount.

As lâminas foram analisadas utilizando microscópio modelo JENAMED 2 (Carl Zeiss) e lupa modelo SZH10 (Olympus). As fotos foram feitas com microscópio óptico modelo BX60F3 (Olympus).

5.2. Anticorpos.

Todos os anticorpos utilizados foram purificados por afinidade.

Anticorpos primários utilizados em imunohistoquímica e *Western blot*: policlonal cabra anti-PIN [PIN (N-19), Santa Cruz Biotechnology] diluído a 1:10; policlonal coelho anti-DLC R4058 (cedido pelo Prof. Dr. Stephen M. King), para detecção da cadeia leve da dineína de 8 kDa, diluído a 1:20; monoclonal camundongo anti-DIC (MAB1618 Chemicon), para a detecção da cadeia intermediária da dineína de 74 kDa, diluído a 1:100; policlonal coelho anti-nNOS (Transduction Laboratories) diluído a 1:25.

Anticorpos secundários utilizados em imunohistoquímica: biotinilado coelho anti-cabra E0466 (DAKO) para detecção de anti-PIN, diluído a 1:100; biotinilado porco anti-coelho E0353 (DAKO) para a detecção de anti-DLC e anti-nNOS, diluído a 1:100; biotinilado coelho anti-camundongo E0354 (DAKO), diluído a 1:100 para a detecção de anti-DIC.

Anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram utilizados em *Western blot*: anti-coelho para a detecção de anti-DLC, diluído a 1:1000 (Amershan Pharmacia Biotech);

anti-camundongo para a detecção de anti-DIC, diluído a 1:2000 (Amershan Pharmacia Biotech); anti-coelho para a detecção de anti-nNOS, diluído a 1:5000 (Promega).

6. Ensaio imunohistoquímico para a localização de PIN e nNOS em secções cerebelares congeladas.

Utilizamos secções cerebelares congeladas e secções fixadas e congeladas para verificar se a imunorreatividade para o PIN e nNOS é a mesma mostrada em secções parafinizadas. Os casos foram cuidadosamente selecionados, de modo que foram utilizados apenas tecidos cerebelares de casos com intervalos *post mortem* curtos (entre 2:30 e 5 horas). O congelamento dos tecidos foi feito em n-hexano a -70°C logo após as autópsias. Estes cuidados foram necessários para minimizar a autólise. Parte do mesmo material foi fixado em formalina e crioprotectado em sacarose 15 e 30% sucessivamente e congelado em n-hexano a -70°C .

7. Imunodetecção de PIN, DLC, DIC e nNOS utilizando imunoblot.

7.1. Preparação do homogeneizado de tecido cerebelar humano.

O homogeneizado de vérmis e hemisfério cerebelar humano foi preparado com tampão de homogeneização a 10% (p/v). Ao tampão de homogeneização (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5) foram adicionados inibidores de proteases (PMSF 0,3 mM, aprotinina 0,3 mM, benzamidina 1mM). A homogeneização foi feita em homogeneizador Potter-Elvehjem com pistilo de teflon a 1000 rpm. Foram feitas 10 excursões do pistilo, mantido em banho de gelo. Aliquotas foram separadas para dosagem de proteínas. Ao restante do homogeneizado foi adicionado tampão Laemli [Tris-HCl 2M, pH 6,8, contendo SDS 10% (p/v), sacarose 10% (p/v), azul de bromofenol e β -mercaptoetanol 3,6 M] em uma proporção de 4 (homogeneizado): 1 (tampão) (v/v). As amostras foram fervidas por 3 minutos, e estocadas em freezer a -40°C .

7.2. Dosagem de proteínas.

A dosagem de proteínas foi feita segundo o método de Lowry (1951), utilizando soroalbumina bovina como padrão. Todas as determinações foram feitas em duplicata. A concentração de proteínas nas amostras foi determinada por interpolação, utilizando curva-

padrão obtida por regressão linear pelo Programa GraphPad Prism versão 2.01. A determinação da absorbância das soluções foi feita usando espectrofotômetro Beckman, modelo 25.

7.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida - sistema desnaturante (SDS-PAGE).

O procedimento utilizado foi o mesmo descrito por Laemmli e Favre (1973). Foram utilizados géis de poliacrilamida de 5 a 22 %. Os géis de separação são compostos por: tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, acrilamida-bisacrilamida, N,N,N',N' tetrametilenodiamina (TEMED) 0,125 % (v/v), persulfato de amônia 0,065 % (p/v), azul de bromofenol, SDS 0.1% (v/v). Géis de empilhamento a 5% de concentração de acrilamida/bis-acrilamida: tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, acrilamida-bisacrilamida 5% (p/v), SDS-PAGE 10% (v/v), TEMED 0,125 % (v/v), persulfato de amônia 0,065% (p/v), azul de bromofenol. Foram aplicadas 20 µg de proteína/poço das amostras de vérnis e hemisfério cerebelares humanos fervidas por 3 minutos. Nos poços laterais do gel foi aplicado o padrão de peso molecular SDS-7B (180 kDa; 116 kDa; 84 kDa; 58 kDa; 48,5 kDa; 39,5 kDa; 26,6 kDa - Sigma). Ao padrão SDS-7B foi adicionada a metalotioneína (Sigma), uma proteína de 6 kDa utilizada como padrão de baixo peso molecular. Como controle positivo para anti-PIN e anti-DLC utilizamos uma amostra de DLC de *Chlamydomonas reihardtii* purificada com a PLM (proteína ligante de maltose) semiclivada pelo fator Xa que rompe especificamente a ligação entre as duas proteínas (cedido pelo Prof. Dr. Foued S. Espíndola); e para a anti-nNOS utilizamos lisado de pituitária de rato (Transduction Labs.). Para a corrida eletroforética foi utilizada uma corrente elétrica de 30 mA/gel.

7.4. Eletrotransferência.

A eletrotransferência de proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose 0.2 µm foi realizada de acordo com o método estabelecido por Towbin *et al.* (1979). O sanduíche de blot foi preparado na seguinte ordem: suporte plástico, esponja, papel de filtro, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulose, papel de filtro, esponja, suporte plástico; no sentido ânion-cátion. A solução utilizada para a eletrotransferência foi a solução tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,3, contendo SDS 0,1% (p/v), 100 mM glicina e metanol 20%

(v/v). Para a transferência de PIN/DLC utilizamos 35 V, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para a transferência de DIC e nNOS utilizamos uma corrente elétrica de 80 mA/gel durante 12 horas a 4 °C. As membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau.

7.5. Fixação da membrana de nitrocelulose.

A fixação das membranas de nitrocelulose em glutaraldeído 0.02% diluído em PBS [tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4, contendo 0,45 M de cloreto de sódio] durante 10 minutos foi feita imediatamente após a transferência. Foram fixadas as membranas utilizadas para *Western blot* para PIN e DLC, para a fixação de proteínas de baixo peso molecular na membrana de nitrocelulose. Após a fixação a membrana de nitrocelulose foi lavada durante 30 minutos em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,3, contendo glicina 100 mM, e em seguida três lavagens de 5 minutos em tampão de lavagem [PBS contendo TWEEN 20 a 0,05% (v/v)]. Após as lavagens a membrana foi corada com Ponceau para a confirmação da transferência, e descoradas com água Milli-Q.

7.6. Revelação enzimática para detecção de PIN, DLC, DIC e nNOS - *Western blot*.

7.6.1. PIN e DLC.

As membranas de nitrocelulose foram umedecidas em tampão de lavagem sob lenta agitação durante 10 minutos. Após, foram bloqueadas em tampão PBS contendo TWEEN 20 a 0.05 % (v/v) e leite em pó Molico desnatado a 5% (p/v) a temperatura ambiente por 90 minutos, para bloquear os sítios inespecíficos de ligação. Após o bloqueio, a membrana de nitrocelulose foi incubada com os anticorpos primários anti-PIN (1:250) ou anti-DLC (1:200) diluídos em PBS durante 60 minutos. Em seguida, a solução contendo o anticorpo foi removida, e a membrana foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem durante 15 minutos. A membrana de nitrocelulose foi então incubada por 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com a peroxidase, diluído em PBS. Após a incubação lavamos a membrana 3 vezes com tampão de lavagem, durante 15 minutos. A revelação foi feita por quimioluminescência utilizando o Kit ECL pela reação da peroxidase.

7.6.2. DIC.

A metodologia foi semelhante à utilizada para a detecção de bandas de PIN e DLC, com algumas diferenças quanto aos tempos de incubação. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada durante 12 horas. A incubação com o anticorpo primário monoclonal anti-DIC diluído a 1:1000 em PBS foi feita durante 8 horas. Os demais procedimentos e soluções foram os mesmos.

7.6.3. nNOS.

As membranas foram umedecidas em tampão B (tampão fosfato de sódio 0.02 M, pH 7.4, contendo 0.45 M de cloreto de sódio e 0.3% de Triton X-100 -New England Nuclear) sob agitação à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Foram então incubadas com tampão de bloqueio [leite em pó Mólico desnatado a 5% (p/v), e soro de jumento inativado diluído a 1:6 em tampão B] por 4 horas à temperatura ambiente sob agitação constante. Após o bloqueio, a membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo anti-nNOS diluído a 1:400 em tampão de bloqueio, “overnight” à temperatura ambiente. Em seguida, a solução contendo o anticorpo foi removida, e a membrana foi lavada 7 vezes com tampão B durante 50 minutos. A membrana de nitrocelulose foi incubada por 1 hora com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com a peroxidase diluído a 1:5000 em tampão de bloqueio. A solução contendo o anticorpo foi então removida, e a membrana foi lavada 6 vezes com tampão B durante 30 minutos, e em seguida 3 lavagens de 5 minutos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.6. A revelação foi feita por quimioluminescência em câmara escura, onde a membrana foi incubada em tampão carbonato-bicarbonato 20 mM pH 9.6 durante 5 minutos, e após incubada em kit ECL (Amershan Pharmacia Biotech).

RESULTADOS

1. Histogênese cerebelar como vista usando secções coradas com HE.

Durante a corticogênese cerebelar há diferenças regionais acentuadas de desenvolvimento. Por isso é necessário escolher uma região cerebelar para analisar o desenvolvimento em função da idade (Rakic e Sidman, 1970). A região escolhida foi o *culmen*, na profundidade da *fissura prima*. Podemos observar o desenvolvimento cerebelar nos 5 diferentes estadios.

Estadio de duas camadas (até 10 GW): zonas marginal (MZ) e intermediária (IZ) além da ventricular (VZ). Este período não foi documentado, pois não obtivemos cerebelo de embriões entre 3 e 8 GW em boas condições de preservação.

Estadio de três camadas (10-20 GW): entre 10 e 11 GW aparece uma camada celular na superfície externa do córtex cerebelar, na região mais externa da zona marginal, a camada germinativa externa (EGL – Fig. 1 A). A EGL consiste de células com citoplasma escasso e núcleo fortemente corado. No início deste período sua espessura é de 3-4 células. Na 19^a-20^a GW, a EGL tem espessura de 5-6 células (30-35 µm). A camada molecular aparece em torno da 19^a-20^a GW. Nesta idade a camada de células de Purkinje prospectiva começa a se tornar mais conspícua, como uma condensação da IZ. Durante a 12^a-13^a GW o primórdio do núcleo denteado e dos núcleos do teto aparecem na IZ.

Estadio de cinco camadas (20-32 GW): a EGL com 20-21 GW apresentou espessura de 6-9 células e a espessura da MOL não mudou apreciavelmente. O notável neste período foi o aparecimento de uma banda relativamente acelular, com 15-20 µm de espessura, visível na profundidade da *fissura prima*, mas não em todos os lóbulos cerebelares. Esta banda, denominada *lamina dissecans* (LD) fica entre as camadas de células de Purkinje e granular. Assim, ao término do 5^o mês lunar gestacional o córtex cerebelar é constituído por 5 camadas que são da superfície pial para dentro: EGL, MOL, PCL, LD e GL (Fig. 1 B, C). A *lamina dissecans* foi se reduzindo até desaparecer ao redor da 32^a GW.

Estadio de quatro camadas (32 GW-1 ano): no período entre 32 GW e o nascimento a espessura da EGL permanece constante, concomitantemente com o grande aumento da área da superfície cerebelar. A espessura da MOL continuou aumentando, atingindo 90-110 µm ao término. Os corpos das células de Purkinje se tornaram mais espaçados e mais claramente estratificados em camada com uma única célula de espessura durante este período. Durante os

primeiros seis meses pós-natais (Pmo) a espessura da EGL se reduziu para 25-30 μm , enquanto que a espessura da MOL praticamente dobrou atingindo aproximadamente 200 μm (Fig. 1 D). No 7° Pmo vimos apenas um vestígio da EGL, uma fileira única e descontínua de células. A EGL não foi detectável após o 12° Pmo.

Estadio de 3 camadas (1 ano em diante). A partir do segundo ano pós-natal o cerebelo adquiriu o padrão adulto de laminação cortical, com três camadas: MOL, PCL e GCL (Fig. 1 E).

2. Desenvolvimento de metodologia imunohistoquímica, baseada em recuperação antigênica.

2.1. Recuperação da antigenicidade utilizando microondas em secções parafinizadas para a detecção de PIN-imuno-reativo símile (IR).

Utilizando tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,5 na recuperação antigênica das secções cerebelares anti-PIN marcou fortemente interneurônios na MOL –células em cesto e estreladas- no núcleo. PIN-IR foi detectado em aglomerados de células granulares, marcadas no núcleo e no citoplasma. Citoplasma e dendritos de células de Purkinje não foram marcados; entretanto, detectamos marcação de alguns núcleos destas células (Fig. 2 A). No núcleo denteado os grandes neurônios ganglionares exibiram marcação nuclear moderada e citoplasmática fraca. Núcleos de neurônios pequenos no núcleo denteado também foram marcados (Fig. 2 F).

Utilizando tratamento em forno de microondas por 20 minutos observamos que a imunorreatividade foi bem recuperada em tecido cerebelar humano. A imunorreatividade de PIN foi obtida mais eficientemente com a utilização de tampão Tris-HCL 50 mM, pH 9,5 durante o tratamento com microondas (Figs. 2 A, F). A utilização de tampão citrato de sódio 10mM, pH 6,0 na recuperação antigênica das secções cerebelares foi menos eficiente que com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,5 (Fig. 2 B). PIN foi detectado fracamente em secções que permaneceram nos tampões Tris-HCl ou citrato de sódio, porém não foram submetidas ao tratamento com forno de microondas (Fig. 2 C, G).

A recuperação da antigenicidade também foi observada para anti-DLC com o mesmo tratamento com tampão Tris-HCl 50 mM pH 9.5 e forno de microondas, em secções tratadas

do mesmo modo e processadas em paralelo (Fig. 2 D). Controles obtidos por omissão dos anticorpos primários anti-PIN (Figs. 2 E- córtex, H- núcleo denteado) e anti-DLC, tratados ou não em forno de microondas, com tampões Tris-HCl ou citrato de sódio, não exibiram imunomarcação.

Observamos a marcação para anti-PIN das mesmas estruturas, com e sem tratamento com forno de microondas, e com os diferentes tampões (Figs. 2 A-C). Anti-DLC imunomarcou as mesmas estruturas que anti-PIN (Fig. 2 D). Tomados em conjunto, nossos estudos sobre a recuperação da imunorreatividade de PIN-IR no cerebelo, fixado com formalina 10% e emblocado em parafina, mostraram que é possível aumentar a intensidade da imunomarcação para PIN e para DLC tratando as secções tissulares com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,5, em forno de microondas por 20 minutos.

2.2. Imunorreatividade para PIN em secções cerebelares congeladas.

As secções fixadas e congeladas exibiram intensa marcação de granulações na região dos plexos ganglionares. Observamos alguns interneurônios intensamente marcados no núcleo e citoplasma celular, outros fracamente marcados. As células de Purkinje aparecem moderadamente marcadas no núcleo. A camada granular apresenta fraca marcação em “patches”, exceto em pontos espalhados intensamente marcados. Algumas células na substância branca aparecem intensamente marcadas.

Estes resultados mostraram que a expressão de PIN em secções congeladas coincide com a marcação de secções parafinizadas, apesar destas exibirem imunorreatividade mais intensa.

2.3. Imunolocalização de nNOS em secções cerebelares humanas utilizando recuperação antigênica com Tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9.5 contendo 5% de uréia (p/v) em forno de microondas.

O aspecto mais notável utilizando a recuperação antigênica em forno de microondas com solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,5 contendo uréia a 5% (p/v) para a imunolocalização de nNOS, em relação ao mesmo procedimento sem a adição de uréia, foi a intensificação da marcação dos processos das células estreladas e em cesto (interneurônios) e a

exuberante marcação de seus corpos celulares. Os tipos celulares imunomarcados foram os mesmos utilizando o mesmo tratamento sem a adição de uréia.

2.4. Recuperação da antigenicidade da nNOS utilizando vapor em secções congeladas, fixadas e congeladas e secções parafinizadas.

Este método foi tão eficiente quanto o método de recuperação antigênica por microondas para a imunolocalização de nNOS em secções parafinizadas. As secções parafinizadas exibiram marcação aumentada dos processos dos interneurônios quando tratadas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9.5 contendo uréia a 5% (p/v), assim como ocorre no tratamento por microondas.

Em secções congeladas observamos intensa imunorreatividade sem qualquer tratamento, por vapor ou microondas. A incubação de tecido congelado em tampão citrato de sódio em panela a vapor intensificou a imunorreatividade da nNOS, mostrando os processos dos interneurônios marcados mais intensamente que em secções não tratadas. Em algumas secções este tratamento danificou o tecido. As secções incubadas em tampão Tris-HCl 50mM, pH 9.5 foram danificadas.

Em secções fixadas e congeladas sem o tratamento a vapor observamos fraca imunorreatividade. Utilizando o tratamento a vapor em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6,0 a imunorreatividade foi intensificada. Observamos intensa marcação dos interneurônios e seus processos. Observamos moderada marcação das células de Purkinje e seus dendritos e de células granulares na GL, “em manchas”.

3. Expressão imunohistoquímica de PIN e moléculas relacionadas no cerebelo humano.

3.1. Imunolocalização de PIN durante a corticogênese cerebelar do período pré e pós-natal até o início da idade adulta.

3.1.1. Estadio de duas camadas: até 10 GW.

Durante este período não obtivemos espécimes em boas condições histológicas e imunohistoquímicas. Assim, não foi possível documentarmos a expressão de PIN-IR no estadio de corticogênese de duas camadas.

3.1.2. Estadio de três camadas: 10-20 GW.

Neste período chama a atenção a marcação da EGL, que foi detectada desde a 11^a GW, a idade mais precoce disponível. A marcação das progenitoras das células granulares é intensa, principalmente no núcleo da célula (Figs. 3 A, C, D–controle, E). A marcação PIN-positiva foi intensa também na zona intersticial (ZI – Fig. 3 E) e a zona ventricular (ZV – Fig. 3 B). A zona intersticial exibe uma condensação próxima à ZM bem marcada. Em idades mais tardias como 17-20 GW a EGL apareceu menos marcada na zona proliferativa que na zona pré-migratória. A camada molecular exibiu células alongadas e arredondadas intensamente marcadas no núcleo e citoplasma celular. A prospectiva camada de células de Purkinje apresentou intensa marcação nuclear. Ainda não foi possível distinguir a GL da ZI (Figs. 3 A-E).

3.1.3. Estadio de cinco camadas: 20-32 GW.

No início deste período a marcação para o PIN foi intensa na EGL e comparável ao estadio de três camadas. A zona pré-migratória apareceu mais fortemente PIN-marcada que a zona proliferativa. Os interneurônios da MOL exibiram intensa marcação nuclear e citoplasmática. As células de Purkinje exibiram núcleos fortemente marcados para PIN. Neste estadio a *lamina dissecans* não foi detectável em todos os lóbulos cerebelares imuno-marcados para PIN, de modo análogo ao que havia sido visto usando HE. A GL exibiu PIN-IR no núcleo e no citoplasma das células granulares (Fig. 3 F). Em 28 GW observamos células com perfil migratório moderadamente marcadas no núcleo e citoplasma.

Em 30 GW a *lamina dissecans* já desapareceu. A EGL e a GL exibiram imunomarcação para o PIN moderada. Os interneurônios e as células de Purkinje apareceram intensamente PIN-imunomarcados no núcleo celular e moderadamente no citoplasma (Fig. 3 G).

3.1.4. Estadio de quatro camadas: 32GW até 1 ano pós-natal.

No início deste período, em 34 GW a marcação PIN-IR da EGL foi moderada na zona proliferativa e intensa na pré-migratória. Os interneurônios foram intensamente PIN-imunomarcados. As células de Purkinje exibiram marcação citoplasmática moderada e nuclear

intensa. A GL exibiu moderada marcação nuclear e intensa citoplasmática (Fig. 3 H). A VZ exibiu intensa marcação. Os grandes neurônios ganglionares do núcleo denteado apareceram intensamente marcados para PIN no núcleo e fracamente no citoplasma (Fig. 6 A). Após o nascimento a marcação na zona proliferativa da EGL foi mais fraca, porém a marcação das células da zona pré-migratória continuou intensa (Figs. 3 I-J). À medida que a corticogênese avança há redução na espessura da EGL (Figs. 3 I-L). Os interneurônios na MOL foram PIN-IR fortemente positivos, com marcação nuclear intensa e citoplasmática moderada (Figs. 3 I-M). A intensidade da marcação dos núcleos das células de Purkinje reduziu-se, e no citoplasma é fraca ou ausente. O padrão de marcação da GL é “em manchas” ou “patches” característico para várias moléculas, com intensa marcação citoplasmática e fraca marcação nuclear (Figs. 3 I-M).

Neste período o que mais chamou-nos a atenção foi a presença de imunorreatividade para o PIN em células com perfil migratório bem características. No estadió de cinco camadas, em 28 GW, e no estadió de quatro camadas, em 34 GW também as detectamos, porém menos características que após o nascimento em 2 dias (Figs. 3 I; 4 A-C), 3 dias, 21 dias e 3 meses pós-natais (Fig. 3 J). Estes dados são inéditos na literatura, o que reforça nosso interesse neste estudo. Nestes espécimes foram observadas células com perfil migratório moderadamente imunomarcadas (Figs. 3 I-J; 4 A-C). No espécime de 2 dias (Fig. 4) observamos a EGL com as células da zona pré-migratória imunomarcadas mais intensamente que as células da zona proliferativa (Figs. 3 I; 4 A-B). O processo líder das células com perfil migratório (Figs. 4 A-B, setas menores; C, cabeça de seta) e o “trailing process” (Fig. 4 C, seta menor) foram moderadamente imunomarcados. As células com perfil migratório estavam intimamente apostas a cabos de glia de Bergmann translúcidos (Fig. 4 A, seta menor). A marcação PIN-IR dos interneurônios na camada molecular oscilou (moderada a intensa) no núcleo celular e foi fraca no citoplasma, e os processos dos interneurônios nunca apareceram imunomarcados (Figs. 4 A-C, setas maiores). As células de Purkinje apresentaram marcação para o PIN, que no núcleo variou de forte a moderada (Figs. 3 I-J) e fraca no citoplasma. A camada granular apresentou forte imunomarcção para o PIN nos primeiros dias pós-natais, e posteriormente oscilou entre moderada a fraca, principalmente no citoplasma, já exibindo o padrão característico “em manchas” (Figs. 3 I-M). No hemisfério cerebelar, os grandes neurônios

ganglionares do núcleo denteado apresentaram núcleo intensamente marcado para o PIN, e marcação fraca e heterogênea de citoplasma (Fig. 6 A).

3.1.5. Estadio de três camadas: Segundo ano de vida ao início da idade adulta.

A EGL desapareceu em torno do fim do primeiro ano de vida. No início deste período a MOL exibiu marcação nuclear de interneurônios entre moderada e forte e em alguns casos fraca marcação citoplasmática, o início de processos de algumas destas células exibe PIN-IR. Após os 7 anos os interneurônios mantiveram a marcação nuclear moderada a forte, e citoplasmática fraca. As células de Purkinje exibiram marcação nuclear moderada. Neste período, a partir da idade de 7 anos, aparece imuno-marcação PIN-IR intensa, puntiforme grosseira, na região dos plexos ganglionares. A marcação da GL é menos intensa que nos períodos anteriores. Na GL a marcação é fraca no núcleo, e oscila de moderada a forte no citoplasma. A marcação da GL foi sempre “em manchas” mostrando células granulares imunomarcadas e outras não marcadas (Figs. 5 A-C). No núcleo denteado foram observados neurônios ganglionares intensamente marcados no núcleo e fracamente no citoplasma (Fig. 6 B).

3.2. Expressão de PIN durante a idade adulta e envelhecimento do cerebelo humano.

O padrão geral de imuno-marcação das várias camadas cerebelares para PIN-IR em adultos e idosos não difere essencialmente daquele descrito para adultos jovens no final da adolescência. Nos adultos observados a partir dos 33 anos, até idosos de 90 anos os interneurônios da camada molecular exibiram um padrão moderado de marcação nuclear (Figs. 5 C-H). Aos 98 anos os interneurônios apareceram fracamente imunomarcados para o PIN, mas este espécime foi o único observado nesta faixa etária.

Neste período também foi detectada marcação puntata e grosseira nos plexos ganglionares, porém mais grosseira e em maior quantidade que em adultos jovens/adolescentes. As células de Purkinje apresentaram marcação nuclear que variou de fraca a moderada, e citoplasmática muito fraca ou ausente, na maioria das células observadas, até os 90 anos (Figs. 5 D-H). No paciente de 98 anos foi observado um número reduzido de células de Purkinje, entre elas raras imuno-marcadas.

A GL exibiu marcação nuclear fraca, em alguns casos moderada e marcação citoplasmática variando de moderada a forte até a 90ª década. O padrão de marcação da GL continuou o mesmo, “em manchas”. No núcleo denteado, até a idade de 98 anos, foram observados grandes neurônios ganglionares intensamente marcados no núcleo e com fraca marcação granular no citoplasma (Figs. 6 C-D; 7 A-D). Em alguns pacientes nesta faixa etária apareceram células menores intensamente imunomarcadas para o PIN (Figs. 6 C-D; 7). Chama a atenção na GL a presença de marcação puntata delicada, de tamanho inferior ao de duas células granulares (diâmetro menor que cerca de 12 μm) em estrutura não identificada à microscopia óptica. Em várias secções de diferentes idades foram detectados vasos PIN-IR no córtex cerebelar, fibras PIN-IR na GL e células PIN-IR na substância branca.

3.3. Expressão de DLC em secções cerebelares humanas durante a corticogênese pré e pós-natal até o início da idade adulta.

A marcação para anti-DLC aparece nas mesmas regiões e tipos celulares, e têm mesma localização subcelular que a marcação para anti-PIN e a intensidade da reação é próxima. As granulações nos plexos ganglionares que começam a aparecer no segundo ano de vida utilizando anti-PIN e apresentam imunorreatividade entre moderada e intensa, como descrito anteriormente, apareceram como uma marcação puntata muito fina utilizando anti-DLC. As idades observadas estão descritas na Tabela 1.

3.3.1. Estadio de três camadas: 10-20 GW.

Em 11 GW as células das diferentes regiões aparecem bem marcadas no núcleo e no citoplasma. No paciente de 18.5 GW a marcação da EGL é mais intensa na zona pré-migratória no núcleo e no citoplasma. Nas camadas mais internas a marcação é fraca no núcleo e citoplasma, e algumas células aparecem mais intensamente marcadas, possivelmente a prospectiva camada de células de Purkinje.

3.3.2. Estadio de cinco camadas: 20-32 GW.

No início deste período, em 22 GW, a EGL aparece moderadamente marcada no citoplasma e fracamente no núcleo. A camada molecular está moderadamente marcada, mas

não foi possível diferenciar os interneurônios. A camada de células de Purkinje aparece com marcação moderada no núcleo celular.

Em 26 GW a EGL aparece intensamente marcada na zona pré-migratória. Nas células de Purkinje, que neste período está em multicamada, a marcação oscila de forte a moderada no núcleo celular. A GL está moderadamente marcada e algumas células intensamente marcadas.

No final do período, em 30 GW, a EGL apresenta-se bem marcada próximo à pia, a região entre a zona proliferativa e a zona pré-migratória da EGL está fracamente marcada e a zona pré-migratória encontra-se novamente bem marcada. Na MOL é possível visualizar células fracamente marcadas e outras intensamente marcadas no núcleo e citoplasma. Foi difícil delimitar PCL e GL. A PCL aparece bem marcada principalmente no núcleo celular. Na GL mais abaixo da PCL algumas células estão intensamente marcadas no núcleo e no citoplasma, e outras pouco marcadas.

3.3.3. Estadio de três camadas: 32 GW até 1 ano pós-natal.

A EGL aparece fracamente marcada no núcleo e no citoplasma em 34 GW. A zona pré-migratória exibe marcação mais intensa. Os interneurônios da camada molecular aparecem intensamente marcados no núcleo e citoplasma. O núcleo das células de Purkinje aparece moderadamente marcado. A GL exibe o padrão de marcação em “patches”, com núcleo marcado fracamente e citoplasma moderadamente marcado.

Observamos células com perfil migratório fracamente marcadas em 2 dias pós-natais. Os interneurônios aparecem moderadamente marcados no núcleo e citoplasma. A EGL aparece mais intensa na zona pré-migratória que na zona proliferativa. A PCL apresentou núcleos com marcação moderada a intensa. Na GL a marcação citoplasmática é moderada e a nuclear é fraca “em manchas”. No núcleo denteado a marcação nuclear é intensa.

Em 3 meses pós-natais a marcação é fraca. Os interneurônios estão moderadamente marcados no núcleo e citoplasma. Células com perfil migratório estão fracamente marcadas.

3.3.4. Estadio de três camadas: segundo ano pós-natal até o início da idade adulta.

Podemos observar interneurônios intensamente marcados no núcleo e citoplasma, núcleos de células de Purkinje moderadamente marcados, e a camada granular marcada “em

manchas” em um caso de 1 ano e 6 meses (Fig. 2 D). Aos 7 anos a marcação é moderada no núcleo dos interneurônios e das células de Purkinje. Aos 19 anos a marcação é intensa no núcleo dos interneurônios e moderada nas células de Purkinje. A GL em “patches” foi fracamente marcada no caso de 7 anos e moderadamente no caso de 19 anos. A marcação dos plexos ganglionares é puntata e muito fina.

3.4. Expressão de DLC durante a idade adulta até o envelhecimento.

Dos 48 aos 90 anos a marcação é intensa no núcleo dos interneurônios e moderada nas células de Purkinje. A GL foi moderadamente marcada no citoplasma e fracamente no núcleo, exibindo o mesmo padrão “em manchas”. As células de Golgi aparecem intensamente marcadas no núcleo celular. Aos 98 anos a marcação foi fraca. Nesta idade as células ganglionares do núcleo denteado aparecem moderadamente marcadas no núcleo celular, e de forma heterogênea no citoplasma, apresentando granulações bem marcadas.

3.5. Expressão de DIC-IR símile em secções de cerebelo humano.

A marcação para anti-DIC foi fraca em todas as idades observadas. DIC imunorreativa foi observada principalmente na EGL, com fraca marcação; nos plexos ganglionares, a partir de 7 anos, intensamente; e em pontos esparsos da GL, a partir de 7 anos. Antes de 30 GW a marcação observada foi muito fraca, aparentemente apenas citoplasmática, em todos os tipos celulares. Em contraste, a marcação para PIN/DLC aparece no citoplasma e núcleo celular. Os casos observados estão descritos na Tabela 1.

3.5.1. Estadio de cinco camadas: 20-32 GW.

Observamos em 30 GW marcação fraca da EGL, porém mais destacada que as demais regiões. A MOL, a PCL e a GL apresentaram fraca marcação. A marcação do núcleo denteado foi moderada, não houve marcação nuclear e aparentemente as células ganglionares foram marcadas ao redor do núcleo, no citoplasma e na matriz extracelular.

3.5.2. Estadio de quatro camadas: 32 GW até 1 ano pós-natal.

Em um espécime de 2 dias pós-natais destaca-se a marcação da EGL, apesar de fraca. Observamos a marcação de células granulares no citoplasma e aparentemente ao redor do núcleo. Fibras gliais também foram marcadas na MOL. As células com perfil migratório apresentam fraca marcação citoplasmática e ao redor do núcleo, sobre cabos de glia fracamente imunorreativos. Os demais tipos celulares exibiram marcação muito fraca. A GL apresenta marcação em “patches”, apesar de muito fraca.

Nas outras idades observadas neste período a marcação de todos os tipos celulares foi muito fraca, sem nenhuma particularidade a comentar.

3.5.3. Estadio de três camadas: após o segundo ano pós-natal até o envelhecimento.

O destaque da marcação neste período, dos 7 aos 98 anos, são as granulações grosseiras e células pequenas intensamente marcadas na região dos plexos ganglionares. Na GL aparecem estruturas intensamente marcadas, com diâmetro aproximado de uma célula granular, semelhantes a sinapses glomerulares. Na substância branca também foram identificadas estruturas semelhantes, além de algumas células intensamente marcadas. Nos adultos observamos marcação de pontos intensos nas células granulares, espalhados por toda a GL. No espécime de 48 anos observamos um axônio de uma célula de Purkinje imunorreativo. Aos 98 anos as células ganglionares do núcleo denteado exibem marcação citoplasmática idêntica à marcação observada com anti-PIN e anti-DLC, marcando o citoplasma de forma heterogênea, oscilando de fraca a moderada. O núcleo celular não aparece marcado. Alguns vasos aparecem bem marcados. As outras camadas celulares apresentaram marcação muito fraca.

4. Expressão imunohistoquímica de nNOS no cerebelo humano.

4.1. Imunolocalização de nNOS durante a corticogênese cerebelar do período pré e pós-natal até o início da vida adulta.

A expressão de nNOS durante a ontogênese cerebelar até o envelhecimento do cerebelo humano, na faixa de idade entre 11 semanas gestacionais e 98 anos, está descrita em ordem cronológica (Tab. 1).

4.1.1. Estadio de duas camadas: até 10 GW.

A expressão de nNOS-IR no estadio de corticogênese de duas camadas, até 10 GW, não foi documentada por falta de espécimes em boas condições histológica durante este período.

4.1.2. Estadio de três camadas: 10-20 GW.

A marcação para nNOS é intensa neste período. A EGL expressou imuno-marcação para nNOS-IR intensa no citoplasma e no núcleo (Fig. 8 A). Fibras nNOS-IR com orientação predominantemente radial foram detectadas na MOL, bem como células alongadas e arredondadas moderadamente marcadas. As células de Purkinje imaturas exibiram marcação moderada/intensa no citoplasma e no núcleo. A zona ventricular (Fig. 8 B) apresentou marcação intensa de suas células no núcleo e no citoplasma.

4.1.3. Estadio de cinco camadas: 20-32 GW.

A EGL manteve a intensidade de imuno-marcação com o desenvolvimento (Figs. 8 C, D). Em 30 GW a EGL aparece mais intensamente marcada na zona proliferativa que na pré-migratória. O citoplasma das progenitoras das células granulares exibiu forte IR para nNOS, em contraste com a marcação mais fraca do núcleo (Fig. 8 E, F-controle). Na MOL os interneurônios estão bem marcados durante o período (Figs. 8 C-E). As células de Purkinje exibiram marcação intensa no citoplasma e no núcleo. A *lamina dissecans* foi observada (Figs. 8 C, D), mas em 30 GW já não era mais detectável (Fig. 8 E). A marcação das células granulares foi forte no citoplasma e fraca no núcleo (Figs. 8 C-E). As olivas apareceram marcadas em 30 GW.

4.1.4. Estadio de quatro camadas: 32 GW-1 ano.

Houve redução da imuno-marcação da EGL em 34 GW, cujas células exibiram marcação mais intensa no citoplasma que no núcleo. Na MOL foram detectados interneurônios marcados, porém com processos negativos. As células de Purkinje exibiram citoplasma e arborização dendrítica bem marcados, com núcleo pálido. As células granulares exibiram citoplasma intensamente marcado com núcleo pálido (Fig. 8 G).

Em recém-nascidos a EGL exibiu fraca marcação nNOS-positiva no núcleo e citoplasma. Observamos em 2 dias pós-natais células com perfil migratório bem características moderadamente imunomarcadas no núcleo e citoplasma celular. Os interneurônios com seus processos e os dendritos das células de Purkinje apareceram moderadamente marcados. O corpo celular das células de Purkinje exibiu fraca marcação citoplasmática e nenhuma marcação nuclear. A GL apareceu fracamente imunomarcada para nNOS no núcleo e citoplasma celular. No núcleo denteado as células ganglionares apresentaram fraca marcação apenas no citoplasma. Em 21 dias a EGL apareceu marcada moderadamente no citoplasma e fracamente no núcleo (Fig. 8 H). Na zona pré-migratória a marcação foi mais intensa. Os interneurônios da camada molecular apresentaram marcação nNOS-positiva intensa do citoplasma e processos e moderada marcação de núcleo. As células de Purkinje exibiram marcação fraca no núcleo, moderada no citoplasma e intensa nos dendritos (Fig. 8 H). A GL exibiu intensa marcação citoplasmática e moderada marcação nuclear, “em manchas”. No núcleo denteado, as células ganglionares apareceram intensamente marcadas no citoplasma com ausência de marcação nuclear (Figs. 11 A-B).

No decorrer deste período a imuno-marcação da EGL se reduziu com o desenvolvimento, até o desaparecimento desta camada. A marcação intensa, quase “Golgi-like” das células em cesto e estreladas na MOL é o destaque na expressão da nNOS. Há intensa marcação dos processos destes interneurônios em quase todos os lóbulos cerebelares (Fig. 8 I). Neste estadio a marcação das células de Purkinje vai se restringindo ao corpo celular e, mais fracamente que no estadio anterior, aos dendritos (Figs. 8-quadro inferior- A, B).

4.2. Estadio de três camadas: segundo ano de vida até o início da idade adulta.

Neste período destaca-se a marcação “Golgi-like” das células em cesto e estreladas, com processos varicosos intensamente marcados, e o aparecimento da marcação granular fina, na região do plexo ganglionar, a partir de 7 anos de idade. A marcação das células de Purkinje foi intensa na infância e moderada e relativamente constante em adultos jovens e os dendritos estão moderadamente marcados. A marcação da GL exibiu padrão característico “em manchas”(“patch”), sendo moderada a forte e semelhante em todos os lóbulos estudados (Figs. 9 A-C).

4.3. Expressão de nNOS durante a idade adulta e o envelhecimento do cerebelo humano.

A marcação “Golgi-like” das células em cesto e estreladas permanece (Figs. 9 D, E; 10 A-E) . A marcação granular nos plexos ganglionares acentuou-se à medida que o cerebelo envelheceu (Figs. 9 D; 10 A-F). A marcação das células de Purkinje foi moderada/fraca e relativamente constante durante a vida adulta e no idoso. As células de Purkinje exibem marcação fraca a moderada na maioria dos lóbulos (Figs. 9 D; 10 A-E); em alguns lóbulos os corpos celulares (Fig. 9 E) e os dendritos (Fig. 10 F) estão intensamente marcados. A marcação da GL exibiu padrão característico “em manchas”(“patch”), sendo moderada a forte e semelhante em todos os lóbulos estudados (Fig. 9, 10).

Aos 98 anos a marcação declinou, mas esta foi a única idade observada no período. O núcleo denteado exibiu marcação fraca (Fig. 10 C). O corpo celular e os dendritos primários das células de Purkinje exibiram marcação para a nNOS que variou entre moderada e intensa. As outras camadas e os outros tipos celulares apresentaram fraca marcação geral (Fig. 10 D).

5. Imunodeteccção de PIN, DLC, DIC e nNOS em vérmis e hemisfério cerebelares humanos, utilizando imunoblot.

5.1. PIN e DLC.

Em homogeneizado de cerebelo humano o anticorpo anti-PIN reconheceu uma banda imunorreativa, com migração eletroforética de aproximadamente 10 kDa, em todas as amostras de vérmis e hemisfério cerebelares dos diferentes casos utilizados. Anti-PIN não reconheceu o padrão da DLC de *Chlamydomonas reinhardtii* clivada com a PLM (proteína ligante de maltose de aproximadamente 42 kDa) que tem peso molecular aparente de aproximadamente 10 kDa (Fig. 12).

Utilizando o anticorpo anti-DLC observamos imunorreatividade do controle positivo da DLC e de uma banda, com mesma migração eletroforética, em todas as amostras de vérmis e hemisfério cerebelares, com aproximadamente 10 kDa (Fig. 13).

5.2. DIC.

Observamos uma banda imunorreativa para DIC em todas as amostras de vérmis e hemisfério cerebelares humanos com migração eletroforética de aproximadamente 74 kDa.

Em algumas amostras observamos autólise do tecido, pela presença de bandas imunorreativas com peso molecular inferior a 74 kDa.

5.3. nNOS.

O anticorpo anti-nNOS reconheceu bandas imunorreativas de vérmis e hemisfério cerebelares (6 a 82 anos) com mesma migração eletroforética que o padrão da nNOS que tem peso molecular aparente de aproximadamente 160 kDa. Observamos autólise do tecido pela presença de ligação do anticorpo a cadeias polipeptídicas provavelmente resultantes de degradação protéica da nNOS, com migração eletroforética diferente da nNOS, observada nas amostras de vérmis e hemisfério cerebelares dos pacientes estudados. Utilizamos a fração solúvel de amostra cirúrgica de lobo temporal, mostrando menor proteólise que em espécimes de necrópsia (Fig. 15).

DISCUSSÃO

A recuperação antigênica é um procedimento cada vez mais usado em imunohistoquímica, pois expõe epitopos, proporcionando maior imunorreatividade. Devido à grande disponibilidade de material de necropsia e biópsia, fixados em formalina e embebidos em parafina, em laboratórios de pesquisa e centros de estudos patológicos em hospitais no mundo todo, métodos de recuperação da antigenicidade têm grande importância na imunodeteção de muitas moléculas. Em imunohistoquímica o fixador e o tempo de fixação do tecido são fatores importantes no estudo de tecido *post-mortem*, pois interferem na qualidade da reação. Utilizamos tecido cerebelar humano fixado em formalina a 10% (v/v), durante um intervalo de 2 semanas a 10 meses (Tab. 1). A fixação pode levar a mudanças químicas nos antígenos de proteínas, pela formação de ligações cruzadas. Para amenizar estes problemas causados pelo fixador, desenvolvemos uma metodologia imunohistoquímica (MARTINS *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 1999), baseada na recuperação da antigenicidade (SHI *et al.*, 1997) para detectar PIN no cerebelo humano (Fig. 2). Esta metodologia consiste no tratamento das secções tissulares em forno de microondas em tampão Tris-HCL 50 mM, pH 9,5. A ruptura de algumas ligações cruzadas pelo tratamento das secções de tecido em soluções aquosas é presumivelmente a base para a recuperação antigênica (revisado por SHI *et al.*, 1997). Outra explicação provável para o aumento da IR são alterações conformacionais dos epitopos em decorrência do tratamento com forno de microondas em solução alcalina ou ácida.

Para a imunolocalização de PIN/DLC grande parte dos trabalhos encontrados na literatura utilizam secções de tecido congelado ou culturas de células e não utilizam método de recuperação da imunorreatividade (ESPÍNDOLA *et al.*, 2000; GUO *et al.*, 1999; DICK *et al.*, 1996).

Em estudos anteriores neste laboratório verificou-se que a recuperação antigênica por microondas é importante para a imunolocalização de nNOS no cerebelo e em células tumorais humanos, e em tecidos de rato (MENDES *et al.*, 2001; ZANARDO *et al.*, 1997; COSTA, 1998; SOARES *et al.*, 1999). Recentemente, a recuperação da antigenicidade para a imunolocalização da nNOS foi feita em nosso laboratório por Zanella e Martins (comunicação pessoal). Este procedimento permite maior resolução que aquele desenvolvido por Costa (1998), também em nosso laboratório. Em outros trabalhos encontrados na literatura a nNOS

foi detectada em secções congeladas, ou fixadas e congeladas, onde não foi feito nenhum tipo de recuperação da antigenicidade (Keilhoff *et al*, 1996; Vizzard *et al*, 1994; Terada *et al*, 1996), com resultados satisfatórios, porém não comparáveis aos nossos resultados devido às diferenças metodológicas.

Baseados nestes resultados e na experiência que nosso laboratório possui em utilizar microondas na recuperação de antígenos de proteínas em imunohistoquímica, resolvemos testar este método de recuperação antigênica para melhor detecção da imunorreatividade de PIN, DLC, DIC e nNOS.

A análise de tecido não fixado é útil para comparação da imunorreatividade observada em secções fixadas e parafinizadas. Fizemos um ensaio, utilizando secções cerebelares de tecido apenas congelado e tecido fixado e congelado, para verificar a imunorreatividade para PIN/DLC e nNOS. Nossos resultados mostraram que a expressão de PIN e nNOS em secções congeladas coincide com a marcação de secções parafinizadas, apesar destas exibirem imunorreatividade mais intensa.

Testamos também um outro método de recuperação da antigenicidade utilizando vapor de água. Utilizamos secções parafinizadas, congeladas e fixadas e congeladas para a detecção da imunorreatividade da nNOS. Verificamos que em secções congeladas o tratamento a vapor em tampão citrato de sódio pH 6,0 proporcionou aumento da imunorreatividade. A imunorreatividade de secções parafinizadas foi muito semelhante utilizando vapor ou microondas, em tampão Tris-HCL 50 mM, pH 9,5 com 5% de uréia. Quando utilizamos tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,5 contendo uréia a 5% na recuperação antigênica por microondas observamos maior intensificação da marcação dos processos dos interneurônios em todas as idades observadas, em relação às secções tratadas em forno de microondas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,5 (Fig. 2).

A expressão de PIN no cerebelo humano não foi descrita na literatura. Como foi amplamente descrita na literatura a abundância de nNOS no cerebelo, consideramos relevante o estudo da expressão de PIN no cerebelo humano em desenvolvimento, adulto e em envelhecimento. Desta forma, documentamos a distribuição imunohistoquímica de PIN no cerebelo humano desde idades fetais precoces até idosos. A expressão de PIN foi detectada de 11 GW a 98 anos em 86 espécimes (Tabs. 1 e 2) e demonstrou ser desenvolvimento-

dependente. O PIN originalmente descrito por Jaffrey e Snyder (1996) como o inibidor protéico da nNOS é homólogo à cadeia leve da dineína (DLC) Mr 8,000 identificada na dineína flagelar de *Chlamidomonas reinhardtii* (KING & PATEL-KING, 1995), apresentando 92% de homologia. Dineínas são motores moleculares de 1-2 MDa ligadas a microtúbulos que são capazes de gerar força. As dineínas citoplasmáticas estão envolvidas em uma variedade de processos de motilidade intracelular incluindo o movimento flagelar de *Chlamidomonas reinhardtii*, manutenção do fuso mitótico e do aparato de Golgi, tráfego de vesículas membranosas e outras partículas intracelulares (KING, 2000).

Anticorpos diferentes que reconhecem uma mesma molécula podem apresentar diferenças de imunorreatividade devido aos diferentes epitopos da molécula que são reconhecidos ou devido a interações molécula- outras moléculas. Utilizamos dois anticorpos anti-PIN e anti-DLC para a imunodeteção destas duas moléculas que têm alto grau de homologia e que provavelmente são a mesma proteína. A imunorreatividade observada utilizando anti-DLC mostra os mesmos tipos celulares imunomarcados para anti-PIN e mesma localização celular durante as diferentes idades observadas.

Observamos a expressão de PIN imunorreativo símile em regiões onde há proliferação celular como na camada germinativa externa (EGL), onde há proliferação de células granulares, e zona ventricular, onde há proliferação de células de Purkinje, interneurônios, células gliais e células ganglionares do núcleo denteado. Nestas regiões observamos PIN intensamente marcado no núcleo e citoplasma celular desde 11 GW (Figs. 3 A-F). No citoplasma o PIN poderia estar envolvido no processo de divisão celular como uma cadeia leve da dineína citoplasmática. A dineína está ligada a microtúbulos do fuso mitótico, e é ancorada ao córtex celular pela dinactina (SHARP *et al.*, 2000). No núcleo o PIN poderia estar relacionado a respostas pleiotrópicas (CRÉPIEUX *et al.*, 1997). Assim o fato de PIN/DLC ser expresso na zona proliferativa da EGL e na zona ventricular é compreensível já que é conhecido o envolvimento desta molécula em processos de divisão celular. Crépieux *et al.*, (1997) mostrou haver relação entre citoesqueleto e regulação gênica. A atividade de alguns fatores de transcrição citoplasmáticos, que migram para o núcleo sob estimulação, como o NFκB, pode ser modulada pela plasticidade do citoesqueleto. O NFκB é um fator de transcrição que pré-existe como um complexo latente no citoplasma de células não

estimuladas. A retenção citosólica do NF κ B é mediada por uma família de proteínas inibitórias I κ B. Estas moléculas inibitórias I κ B possuem motivos responsáveis pela associação ao NF κ B e inibição da ligação ao DNA, e também por estes motivos estão associadas ao citoesqueleto. A degradação da proteína inibitória ocorre por uma cascata de sinais, e consequente ativação do NF κ B. A proteína I κ B α associa-se fisicamente com DLC e esta associação não compromete a habilidade de I κ B α associar-se com NF κ B. DLC exhibe localização subcelular nuclear e citoplasmática; I κ B α colocaliza com DLC no citoplasma e ambas interagem com a rede de microtúbulos. É possível que DLC fortaleça a interação I κ B α -NF κ B de modo a prevenir a apoptose. A diferença na localização subcelular de DLC pode refletir diferenças funcionais. I κ B α contribui para a retenção de NF κ B no citoplasma por uma interação com componentes do citoesqueleto, impedindo assim a ligação de NF κ B ao DNA (CRÉPIEUX *et al.*, 1997). Além da atividade do NF κ B ser modulada pela DLC pela interação ao I κ B α , sua atividade ligada ao controle da transcrição da iNOS, isoforma da NOS transcrita de forma induzida (como descrito na revisão da literatura), é controlada pelo óxido nítrico intra e intercelular produzido pela nNOS. O NO derivado da nNOS na glia inibe intercelularmente a ativação do NF κ B em neurônios. Existem regiões regulatórias próximas ao sítio de início da transcrição da iNOS, entre estas regiões sítios ligantes para NF κ B. Além disso, o NO endógeno inibe a atividade ligante do NF κ B a estes sítios gênicos específicos. Assim, o NO pode regular NF κ B através de sinais intra e intercelulares (TOGASHI *et al.*, 1997). Então, estas duas vias diferentes estão envolvidas no controle da atividade do fator nuclear κ B. Entretanto, nestas duas vias as moléculas estão relacionadas entre si, já que o PIN inibe a produção de NO pela nNOS pela ligação à molécula de nNOS impedindo a formação do dímero ativo. O que nos leva a questionar: qual o mecanismo pelo qual PIN/DLC interage com diferentes moléculas?

Além de observarmos PIN em regiões proliferativas, também o observamos em células granulares pré-migratórias e células granulares com perfil migratório. Aproximadamente no meio da gestação até os primeiros dias pós-natais a zona pré-migratória da EGL apresenta-se mais intensamente marcada que a zona proliferativa (Figs. 3 E-J; 4 A-C). Em recém nascidos de 2 dias e crianças de 3 meses aparecem células com perfil migratório intensamente marcadas

para PIN/DLC no núcleo e moderadamente no citoplasma (Figs. 3 I; 4 A-C – setas menores). Estes resultados são inéditos na literatura, sugerindo participação de PIN/DLC em processos de migração neuronal. A migração radial de células granulares sobre a glia de Bergmann têm sido extensivamente analisada (para revisão ver RAKIC 1981, 1990; HATTEN, 1999; HATTEN & MASON, 1990), mas pouco é conhecido sobre o ambiente de células granulares pós-mitóticas antes de iniciarem sua descida pela camada molecular. A migração neuronal no cérebro humano tem aspectos similares à migração nuclear vista em fungos filamentosos. Este tipo de migração nuclear é denominado nucleocinese (MORRIS *et al.*, 1998). NUDEL, homólogo humano de NUDE de *Aspergillus nidulans*, interage com dineína citoplasmática e LIS1 (NIETHAMMER *et al.*, 2000). A deficiência de LIS1 causa defeitos na migração neuronal cerebral gerando a lisencefalia, patologia que leva a severo retardo mental, epilepsia e morte precoce. Na migração celular de eucariotos o núcleo é puxado pelos centrossomos, onde microtúbulos, dineína citoplasmática e dinactina estão envolvidos (MORRIS, 2000). Utilizando microscopia confocal Komuro *et al.* (2001) detectaram a migração tangencial de progenitoras das células granulares na EGL que ocorre entre a última divisão mitótica e o início da migração radial em camundongos. Anteriormente Ryder e Cepko (1994) usando retrovirus replicação-incompetente sugeriram que células granulares podem migrar tangencialmente nos planos rostrocaudal e mediolateral antes de iniciarem sua migração radial. A migração tangencial das células granulares prospectivas ocorre na região mais profunda da zona pré-migratória, na região média e no limite entre a camada molecular e a EGL. As células assumem uma forma alongada, orientada paralelamente ao plano axial longitudinal ao folium, emitindo dois processos horizontais nos pólos opostos, um deles semelhante ao processo líder. No limite entre a EGL e a MOL as células granulares adquirem uma forma arredondada e um terceiro processo verticalmente orientado penetra na MOL (KOMURO *et al.*, 2001). Durante todos estes eventos migratórios são expressos diferentes genes nas células granulares sucessivamente. Este fato, combinado a sinais gerados em outros elementos celulares, pode estar modulando a morfologia celular e o ambiente migratório (KUHAR *et al.*, 1993; HATTEN *et al.*, 1997). Neste trabalho nós utilizamos secções tissulares sagitais onde pudemos observar células granulares PIN-imunomarcadas de diferentes tamanhos na zona pré-migratória da EGL (Figs. 4 A-C). Segundo o modelo de migração

tangencial proposto por Komuro *et al.* (2001) células estariam migrando tangencialmente nesta região. As células bem menores observadas em nosso trabalho poderiam ser células migratórias seccionadas transversalmente. Para visualizar células migrando tangencialmente nesta região seria necessário utilizar secções coronais.

A camada molecular (MOL) apresenta intensa marcação para PIN no núcleo e citoplasma dos interneurônios (Fig. 3 E-L; 4 A-C) durante o desenvolvimento pré e pós-natal. A marcação nuclear dos interneurônios é moderada dos 9 aos 90 anos (Figs. 5 A-H). Detectamos intensa marcação PIN-IR nuclear da camada de células de Purkinje (PCL) desde 17 GW até 34 GW. Após o nascimento até os 6 meses a marcação varia de intensa a moderada. E de 9 a 90 anos a marcação nuclear oscila entre moderada e fraca, no entanto o número de células imunomarcadas é reduzido. No núcleo denteado, as células ganglionares aparecem intensamente marcadas no núcleo e fracamente no citoplasma de 34 GW a 98 anos (Figs. 6 e 7). Em alguns adultos observamos células menores intensamente marcadas no núcleo denteado (Figs. 6 C e D). Observamos marcação da GL variando entre moderada e intensa durante o desenvolvimento pré e pós-natal. Após o nascimento a GL já exibe o padrão de marcação “em manchas”. De 9 a 90 anos a marcação da GL é fraca no núcleo e oscila de moderada a forte no citoplasma (Figs. 3-5). Por analogia aos resultados de Crepieux *et al.* (1997) discutidos acima, podemos inferir que a marcação PIN-positiva nuclear de células granulares, células de Purkinje, interneurônios e células do núcleo denteado, observadas neste trabalho sugere envolvimento do PIN em processos de regulação gênica.

A cadeia intermediária da dineína (DIC) de 74 kDa foi observada com fraca imunorreatividade em todas as idades utilizadas. Destaca-se a marcação da EGL nos períodos pré e pós-natal, a intensa marcação dos plexos ganglionares e de estruturas esparsas na GL semelhantes a sinapses glomerulares. A imunomarcção de DIC na EGL reforça nossos resultados discutidos até aqui sobre a presença de PIN/DLC nesta região, e o possível envolvimento da dineína na migração neuronal. As estruturas imunorreativas observadas na GL, também foram observadas utilizando anti-PIN e anti-DLC. Se as estruturas observadas na camada granular forem realmente sinapses glomerulares, o que não podemos confirmar usando microscopia óptica, é justificável a presença de dineína atuando como um transportador retrógrado de vesículas pré e pós-sinápticas. Niethammer *et al.* (2000) em seu

trabalho, detectaram a presença de DIC colocalizada com NUDEL no citoplasma celular, ao redor do núcleo, sugerindo o envolvimento da dineína na citocinese durante a migração neuronal. Estes resultados coincidem com nossos achados da DIC na EGL.

A detecção de PIN em subpopulações de células granulares grandes pode ser uma marcação devido ao estado toxi-infeccioso ou isquêmico do paciente, com hipóxia grave. A isquemia cerebral está associada ao aumento da produção de NO, com regulação da nNOS e controle da expressão do gene NOS (IADECOLA *et al.*, 1995). Inibidores seletivos da nNOS reduzem a área de infarto após a oclusão da artéria cerebral média (IADECOLA, 1997). Camundongos nocauteados para a nNOS exibem área de infarto menor e aumento da resistência de neurônios na área de Sommers (CA1) à isquemia global transitória (HUANG *et al.*, 1994). Estes dados sugerem que a atividade da nNOS é prejudicial ao cérebro isquêmico. Demonstrou-se recentemente que a expressão neuronal de PIN-mRNA aumenta após a isquemia cerebral, inclusive na *fascia dentata* após isquemia cerebral global (GUILLARDON *et al.*, 1998). Dado o alto grau de homologia entre PIN e DLC, este resultado pode refletir tanto o aumento de concentração de inibidor de nNOS, o que reduziria o efeito tóxico do NO, quanto aumento da DLC, o que contrabalançaria os efeitos da isquemia sobre o transporte intracelular e/ou a estrutura do citoesqueleto.

A presença do PIN pode estar envolvida: 1) com a regulação de respostas pleiotrópicas, no controle de expressão gênica, associado ao I κ B α , o inibidor do fator nuclear κ B, como discutimos acima (CRÉPIEUX *et al.*, 1997); 2) como componente da dineína citoplasmática atuando como um motor molecular em processos de mitose (DICK *et al.*, 1996) e migração neuronal; 3) inibição da nNOS, pois neste estudo o PIN foi localizado em várias regiões e estádios ontogenéticos do cerebelo humano em que a nNOS ocorre.

Assim nossos resultados sobre a expressão de PIN/DLC e DIC no cerebelo humano reforçam nossa hipótese sobre o envolvimento da dineína na migração neuronal.

Na análise de *Western blot* de vérnis e hemisfério cerebelares dos 6 casos de necrópsia entre 6 e 82 anos observamos uma banda imunorreativa de aproximadamente 10 kDa, utilizando anti-PIN ou anti-DLC. O anticorpo anti-DLC reconheceu uma banda imunorreativa do controle positivo da DLC purificada de *Chlamydomonas reinhardtii* com mesma migração

eletroforética que as bandas das amostras de cerebelo humano. O anticorpo anti-PIN não a reconheceu.

A descrição na literatura sobre a distribuição imunohistoquímica de nNOS no cerebelo humano em desenvolvimento, em adultos e idosos é controversa e incompleta. Neste trabalho completamos os dados de Costa (1998) para mostrarmos a expressão da nNOS desde o início da ontogênese cerebelar (11 GW) até o envelhecimento do cerebelo (98 anos). A expressão da nNOS também exibe um padrão dependente do desenvolvimento. Os dados que obtivemos neste estudo coincidem com alguns dos dados anteriormente obtidos em nosso laboratório (COSTA, 1998). Porém as idades aqui estudadas correspondem a períodos não observados por Costa (1998), complementando assim seus dados. Costa (1998) não observou células com perfil migratório imunorreativas. Nós as observamos, inequivocamente, em um espécime de 2 dias pós-natais moderadamente imunomarcadas. Observamos a EGL nNOS-IR em todo o período em que ela aparece, e com intensidade de marcação muito superior à observada por Costa (1998). Estes resultados sugerem que o NO pode ter papel importante na proliferação celular, que no cerebelo ocorre até o primeiro ano de vida, e não somente nas etapas iniciais do desenvolvimento como sugere Costa (1998). Quanto aos corpos celulares e arborização dendrítica das PC os resultados são coincidentes, mas aqui a expressão mantém-se moderada neste tipo celular até a idade adulta.

A EGL expressou nNOS fortemente no citoplasma e moderadamente no núcleo, mais intensa na zona pré-migratória. As células de Purkinje exibiram marcação moderada/intensa no citoplasma e no núcleo de 10-20 GW; de 20-32 GW a marcação declinou no núcleo, e continua desta forma no adulto, aparecendo em algumas células apenas a marcação nuclear. A marcação de células granulares foi de modo geral forte no citoplasma e fraca no núcleo. O dado mais notável para a marcação de nNOS são os interneurônios intensamente imunorreativos e com os processos marcados em todas as idades observadas desde sua origem.

Em nosso laboratório foram feitos alguns estudos quanto a expressão de nNOS. A retina humana exibiu nNOS-IR no núcleo de células ganglionares e bipolares (JORGE, 1999). Células de neoplasias linfóides malignas humanas apresentaram marcação nuclear nNOS positivas (MENDES, 1999; MENDES *et al.*, 2001). Os dados aqui descritos levantam a questão do possível papel biológico da nNOS no núcleo. A nNOS pode estar sendo

transportada para o núcleo, onde atuaria como um fator ativador ou repressor da expressão gênica.

Egberongbe *et al.* (1994) descrevem em seu trabalho que a distribuição de neurônios NOS-IR no cérebro humano é muito similar à distribuição da atividade da nNOS mostrada em rato (BREDT *et al.*, 1990; FÖRSTERMANN *et al.*, 1990; SCHIMIDT *et al.*, 1992), com poucas diferenças notáveis no cerebelo, formação hipocampal e medula ablongata. Em cerebelos humanos a marcação da NOS em células granulares está bem visualizada. Egberongbe *et al.* (1994) encontraram células de Purkinje positivamente marcadas. Estes resultados são semelhantes aos obtidos neste estudo no cerebelo adulto. Entretanto, o autor utilizou-se de um número de casos muito reduzido (n=4), de 50 a 70 anos com uma média de 60 anos. O intervalo entre a morte e a fixação foi muito superior aos utilizados em nosso estudo. Downen *et al.* (1999) não encontraram imunorreatividade para nNOS no cerebelo humano de 18 a 29 semanas gestacionais, a termo e adulto. Mas as condições de preservação do tecido e o anticorpo utilizado foram diferentes neste trabalho, onde foi possível a detecção de nNOS em tecidos fixados com formalina e emblocados em parafina. Downen *et al.* (1999) utilizaram casos com intervalo *post mortem* muito altos, até 48 horas, enquanto que os nossos intervalos *post mortem* não excederam 11 horas. O intervalo *post mortem* é um fator muito importante para a integridade do tecido. E o anticorpo utilizado por estes autores foi anti-nNOS (Incstar: Stillwater, Minn) diferente da anti-nNOS (Transduction Labs.) utilizada em nosso trabalho. Como já discutimos anteriormente diferentes anticorpos podem marcar diferentemente uma mesma molécula.

A localização de nNOS em diferentes tipos neuronais no cerebelo humano, com distintas localizações subcelulares ao longo dos períodos estudados neste trabalho, sugere que a nNOS pode estar envolvida em diversos processos celulares. Entre eles, a regulação da expressão gênica pelo fator nuclear κ B. O NO gerado intra ou intercelularmente derivado da nNOS inibe a ativação do NF κ B, um fator nuclear responsável pelo controle da transcrição da iNOS (TOGASHI *et al.*, 1997).

Para *Western blot* foram utilizados pacientes com idades entre 6 e 82 anos, com intervalos entre a morte e a congelação do tecido de 2:30 a 7:25 horas. A nNOS têm peso

molecular aparente de 160 kDa. Observamos a marcação do padrão da nNOS, e de bandas com mesma migração eletroforética que o padrão em todas as amostras cerebelares.

Assim, utilizando imunohistoquímica, observamos que a expressão de PIN/DLC e nNOS no cerebelo humano é desenvolvimento-dependente. A expressão de PIN/DLC nas diferentes idades e regiões cerebelares observadas sugere o envolvimento desta molécula no controle da expressão gênica, na proliferação e migração neuronal e na inibição da atividade da nNOS, já que ocorre nas mesmas regiões e idades observadas para nNOS. A expressão de DIC na camada germinativa externa suporta nossa hipótese do envolvimento do PIN na migração neuronal via cadeia leve, componente da dineína citoplasmática. A expressão de nNOS em regiões proliferativas, como a EGL e a zona ventricular, sugere que a nNOS pode estar envolvida na proliferação celular. A imunomarcação para nNOS-IR de células com aspecto migratório sugere o envolvimento destas moléculas em processos de migração neuronal. A expressão de nNOS nos interneurônios, células de Purkinje e células ganglionares do núcleo denteado sugere sua participação na diferenciação neuronal. E a presença de nNOS no núcleo celular de diferentes tipos celulares sugere papel na regulação da expressão gênica. Nossos resultados imunohistoquímicos foram validados pela detecção de PIN, DLC, DIC e nNOS em amostras cerebelares obtidas de pacientes de 6, 16, 23, 47, 68 e 82 anos de idade usando *Western blotting*.

CONCLUSÕES

1. Padronizamos um método de recuperação da imunorreatividade de PIN, DLC, DIC e nNOS em secções cerebelares humanas imersas em solução tampão Tris-HCL 50 mM em forno de microondas por 20 minutos.
2. A expressão imunohistoquímica de PIN, DLC e nNOS no cerebelo humano é desenvolvimento-dependente. Não detectamos variação apreciável na imunorreatividade destas moléculas da infância até o idoso.
3. Células com perfil migratório apresentaram imunorreatividade para PIN/DLC e nNOS no núcleo e citoplasma celulares. A localização citoplasmática de PIN/DLC sugere seu possível envolvimento na motilidade neuronal.
4. A camada germinativa externa e a zona ventricular, regiões proliferativas cerebelares, expressaram PIN, DLC, DIC e nNOS, sugerindo a participação destas proteínas na proliferação celular.
5. A expressão diferencial de PIN/DLC e nNOS em células de Purkinje, em interneurônios e na camada granular em diferentes janelas espaço-temporais, sugere sua participação em processos de diferenciação celular.
6. A localização de PIN/DLC e nNOS nos mesmos tipos celulares e estádios ontogenéticos, sugere que PIN/DLC possa estar desempenhando função de regulação da atividade da nNOS.
7. A localização nuclear de PIN/DLC e nNOS sugere seu envolvimento na modulação da expressão gênica.
8. A detecção de PIN, DLC, DIC e nNOS em amostras cerebelares obtidas de pacientes de 6, 16, 23, 47, 68 e 82 anos de idade utilizando, *Western blot*, reforçou nossos resultados imunohistoquímicos.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Caracterização dos casos utilizados em imunohistoquímica.

CASO	IDADE	REGIÃO	IPM (H)	TF (DIAS)	ANTI CORPO	DIAGNÓSTICO
1	11GW	V/H	ND	ND	PIN/nNOS DLC/DIC	Onfalocele em parede abdominal e ausência de baço. Edema vilositário e hemorragia decidual.
2	13GW	crbl+tr	ND	ND	PIN/nNOS	ND
3	13GW	crbl+tr+te cto cer.	ND	ND	PIN/nNOS	Deciduíte e intervilosite agudas, edema vilositário. Gastrosquise, pneumonia e neutrófilos na luz intestinal. A morte fetal ocorreu após infecção amniótica.
4	15GW	Enc.+crbl	ND	ND	PIN/nNOS	Prematuridade extrema
5	16GW	V	ND	ND	PIN/nNOS	ND
6	17GW	Enc.+crbl	ND	ND	PIN	Anóxia intra-uterina
7	17GW	V/H	ND	ND	PIN	Autólise discreta. Áreas de infarto isquêmico da decídua.
8	18GW	V	ND	ND	PIN	Corioamnionite ascendente com contaminação e infecção fetal.
9	18.5GW	V/H	ND	ND	PIN/DLC/ DIC	Placenta com sinais de retenção. Sinais de morte por anóxia.
10	19GW	Crbl+tr	ND	ND	PIN	ND
11	19- 20GW	V	ND	120	PIN	Deciduíte, corioamnionite, intervilosite, vilosite e funiculites agudas em restos placentários, associada a sinais de retenção.
12	20GW	V	ND	ND	PIN	Corioamnionite aguda difusa
13	22GW	H	ND	ND	PIN	Infecção amniótica
14	22GW	V/H	ND	ND	PIN/DLC/ DIC	Discreto edema e alargamento do estroma vilositário.
15	22GW	V	ND	ND	PIN	Sinais de morte por anóxia. Restos placentários com deciduíte aguda focal. Sinais de retenção e hemorragia.
16	23GW	V	ND	60	PIN/nNOS	ND
17	23GW	V	8:30	43	PIN/nNOS	Doença de membrana hialina
18	24GW	V	5	72	PIN/nNOS	Anóxia intra-útero

19	26GW	V	4:40	ND	PIN	Anóxia perinatal
20	26GW	V/H	5:30	34	PIN/DLC/ DIC	Anóxia neonatal
21	26GW	V	5:20	318	PIN	Doença da membrana hialina
22	28GW	V/H	2:33	ND	PIN/nNOS	Falência de múltiplos órgãos
23	30GW	V	ND	ND	PIN/nNOS DLC/DIC	Placenta com corioamnionite aguda.
24	34GW	V/H	10:5 0	ND	PIN/nNOS DLC/DIC	Hemorragia pulmonar
25	38GW	V	11:3 0	ND	PIN	Pneumotórax hipertensivo
26	2d	H	3	35	PIN/DLC/ DIC	Hipoplasia pulmonar
27	3d	V/H		ND	PIN/nNOS	ND
28	15 dias	H	ND	ND	PIN	Septicemia
29	21d	V/H	2:25	41	PIN/nNOS	Estado pós-operatório
30	25 dias	H+tr	7:30	ND	PIN	Falência cardíaca
31	2m	V/H	6:30	ND	PIN	Broncopneumonia
32	2m	H	6:45	ND	PIN	Insuficiência respiratória
33	3m	H	2:35	ND	PIN	Anasarca
34	3m	H	4	244	PIN/DLC/ DIC	Insuficiência cardíaca
35	4m	V	5:30	73	PIN	Broncopneumonia
36	5m	H	5:45	ND	PIN	Pulmão de choque
37	6m	V/H	3	66	PIN	Estado toxi-infeccioso
38	10m	V/H	6	ND	PIN/nNOS	Insuficiência hepática
39	1a	V ant.	3	108	PIN/nNOS	Hemorragia pulmonar
40	1a	V	3:33	71	PIN/nNOS	Anemia aguda
41	1a 5m	V	6	222	NNOS	Broncopneumonia confluente bilateral
42	1a 6m	V/H	4	143	PIN/nNOS DLC/DIC	Choque (IC)
43	2a	V	4	23	PIN/nNOS	Estado pós-operatório/ Tetralogia de Fallot

44	7a	V	6:45	237	PIN/nNOS DLC/DIC	Broncopneumonia abcedida
45	9a	V	5:30	109	PIN/nNOS	Insuficiência cardíaca congestiva
46	9a	V/H	3:20	105	PIN/nNOS	Choque séptico
47	19a	V/H	4	107	PIN/nNOS DLC/DIC	Choque hemorrágico
48	21a	H	8	51	PIN/nNOS	Insuficiência cardíaca
49	22a	H	7:20	43	PIN/nNOS	Neoplasia epitelial maligna da cavidade torácica.
50	33a	V	3	42	PIN/nNOS	Broncopneumonia abcedida bilateral
51	33a	H	3	29	PIN/nNOS	Pneumonia lobar a esquerda
52	35a	V/H	4:55	99	PIN/nNOS	Septicemia.
53	37a	H	4:40	71	PIN/nNOS	Pneumonia aspirativa bilateral
54	38a	V	3:30	151	PIN/nNOS	Broncopneumonia bilateral
55	39a	V/H	5	35	PIN/nNOS	Choque séptico
56	43a	V/H	4	257	PIN/nNOS	Insuficiência renal crônica
57	44a	V	3	44	PIN/nNOS	Síndrome consuptiva a esclarecer
58	46a	V/H	4:20	46	PIN	Insuficiência renal aguda.
59	48a	V	7:53	117	PIN/nNOS DLC/DIC	Pulmão de choque
60	49a	V	4:30	61	PIN/nNOS	Septicemia
61	50a	V/H	5	214	PIN/nNOS	Anemia e plaquetopenia
62	50a	V	6:10	34	PIN/nNOS	Cardiopatia reumatisal crônica descompensada
63	51a	V	4	243	PIN/nNOS	Doença mista do tecido conjuntivo
64	53a	V/H	ND	115	PIN/nNOS	Edema agudo dos pulmões
65	53a	V	5:20	153	nNOS	Choque cardiogênico
66	56a	V/H	4	117	PIN/nNOS	Anemia aguda
67	56a	V	4	170	PIN/nNOS	Rim de choque
68	63a	V	3:40	57	PIN/nNOS	Pneumonia

69	65a	V	ND	168	PIN/nNOS	Choque cardiogênico intra-operatório
70	66a	V/H	3:30	29	PIN/nNOS DLC/DIC	Hematoma extenso em região pélvica
71	70a	V/H	5:45	106	PIN/nNOS	Broncopneumonia confluyente bilateral
72	71a	V	5:30	120	PIN/nNOS	Distúrbio hidroeletrólítico
73	72a	V	3	42	PIN/nNOS	Insuficiência cardíaco congestiva descompensada
74	72a	V	7:30	113	PIN/nNOS	Insuficiência respiratória
75	78a	V/H	6:55	262	PIN/nNOS	Choque cardiogênico
76	79a	V	4	73	PIN/nNOS	Choque hipovolêmico
77	87a	V/H	2:36	83	PIN/nNOS	Choque cardiogênico
78	90a	V/H	7:20	270	PIN/nNOS DLC/DIC	Hemorragia digestiva baixa
79	90a	V/H	4	52	PIN	Pneumonia bilateral por aspiração.
80	98	H	8:10	319	PIN/nNOS DLC/DIC	Septicemia.

Abreviaturas: GW, semanas gestacionais; d, dias; m, meses; a, anos; IPM, intervalo *post-mortem* (em horas); TF, tempo de fixação (em dias); Enc., encéfalo; crbl, cerebelo; V, vérnis; H, hemisfério; tr, tronco; cer., cerebral; ND, dados não disponíveis.

Tabela 2. Casos utilizados em *Western blot* e imunohistoquímica de secções congeladas pareadas com secções parafinizadas.

	PMI (H)	IDADE (ANOS)	DIAGNÓSTICO
81.	7:25	6	Estado pós-operatório de cardiopatia congênita.
82.	3	16	Broncopneumonia confluyente.
83.	5	23	Leucemia linfóide aguda.
84.	3	47	Choque hipovolêmico.
85.	2:30	68	IAM
86.	5	82	Carcinoma de vesícula biliar com disseminação hepática.

Abreviaturas: PMI, intervalo *post-mortem*; H, horas.

Figura 1. Alterações na laminação do córtex cerebelar humano durante seu desenvolvimento, como detectadas pela coloração de secções sagitais com Hematoxilina-eosina. A, Vérnis cerebelar fetal de 17 GW, estadio de 3 camadas: camada germinativa externa (EGL), zona marginal (MZ) e zona intersticial (IZ). B e C, Hemisfério cerebelar fetal de 25 GW, estadio de 5 camadas: camada germinativa externa (EGL); camada molecular prospectiva (MOL); camada de células de Purkinje (PCL); *lamina dissecans* (LD); camada granular (GL). D, Hemisfério cerebelar de lactente com 2 meses de idade, estadio de 4 camadas: EGL vestigial, camada molecular, camada de células de Purkinje e camada granular. Substância branca (WM). E, Vérnis cerebelar de uma criança de 3 anos de idade, estadio de 3 camadas: camada molecular, camada de células de Purkinje e camada granular. Neste estadio o córtex cerebelar já tem o mesmo número de camadas que no adulto. Aumento original: 33X em A, B, C 66X em D, E.

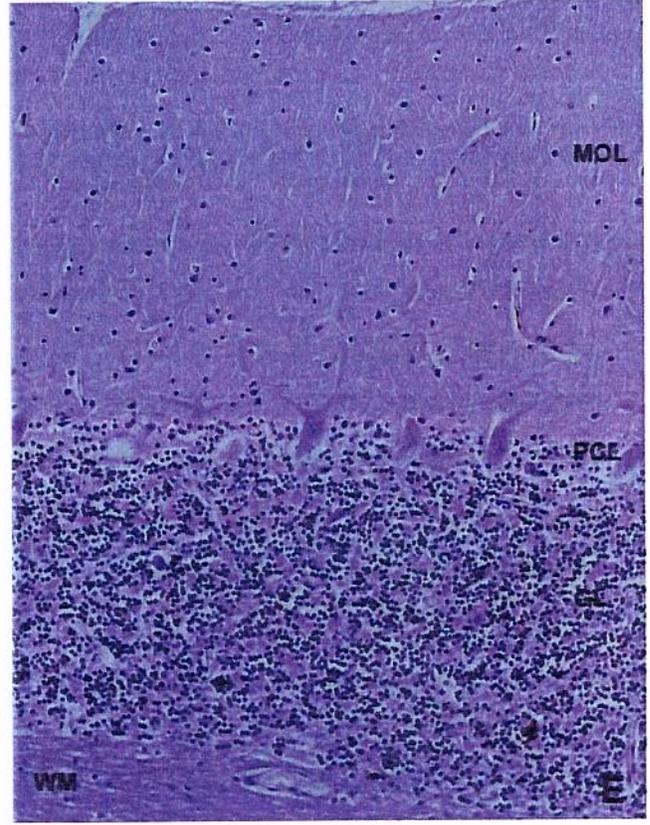
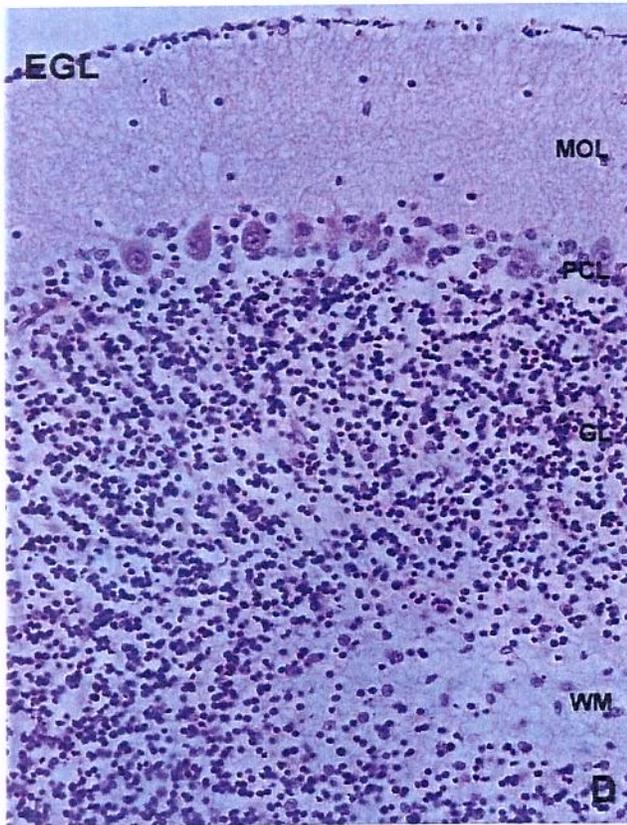
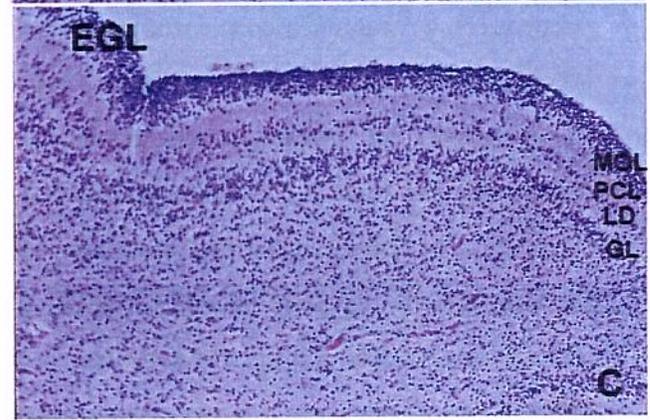
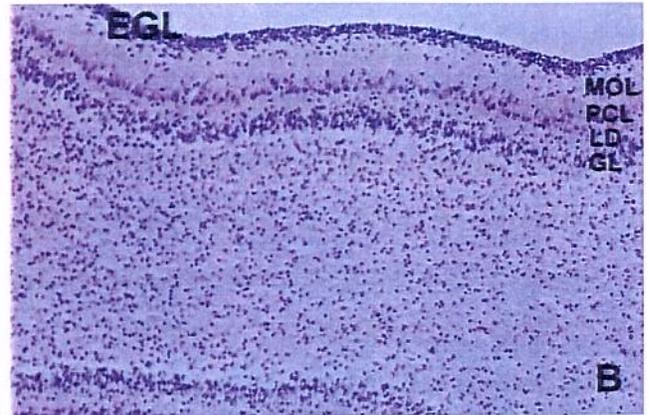
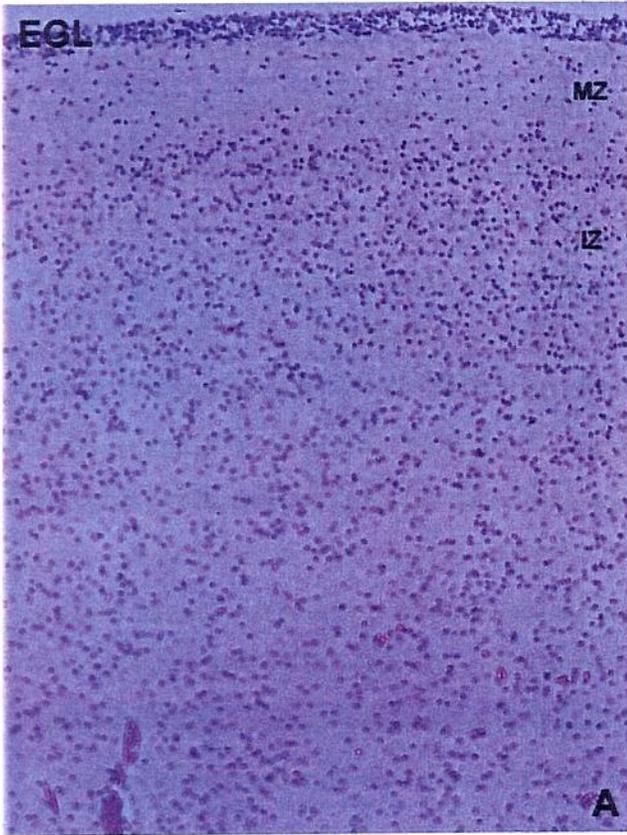


Figura 1

Figura 2. Recuperação da imunorreatividade de PIN e DLC usando forno de microondas em secções (5 μm) adjacentes de vérmis e hemisfério cerebelares de um espécime de 1 ano e 6 meses de idade. A, B e C. Secções de vérmis cerebelar incubadas com anticorpo anti-PIN. A, Observamos maior imunorreatividade que em (B e C). Podemos observar interneurônios intensamente marcados no núcleo e citoplasma, núcleos de células de Purkinje moderadamente marcados, e a camada granular marcada “em manchas”. Foi utilizado o tratamento com tampão Tris-HCl 50mM, pH9.5 em forno de microondas por 20 minutos. B, Tratamento com forno de microondas por 20 minutos em tampão citrato de sódio 10mM, pH6.0. Observamos marcação semelhante à observada em (A), porém menos intensa. C, A secção foi incubada em tampão Tris-HCl 50mM, pH9.5, mas o tratamento com microondas foi omitido. Observamos marcação menos intensa que em (B e C), e com menor resolução. D, Vérmis cerebelar incubado com anticorpo primário anti-DLC. Tratamento com microondas em tampão Tris-HCl 50mM, pH9.5. As mesmas estruturas imunomarcadas em (A) são observadas. E, Vérmis cerebelar. Controle onde foi omitido o anticorpo primário anti-PIN. Tratamento com microondas em tampão Tris-HCl 50mM, pH9.5. Não detectamos imunorreatividade. F, G e H, Hemisfério cerebelar, mostrando o núcleo denteado. F e G, foram incubadas com anticorpo primário anti-PIN. F, Tratamento com microondas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9.5. Observamos células ganglionares moderadamente marcadas no núcleo e fracamente no citoplasma. Neurônios menores são observados intensamente marcados. A imunorreatividade desta secção foi mais intensa que em (G). G, Incubação em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9.5 com omissão do tratamento com microondas. Observamos as mesmas estruturas imunomarcadas em (F), porém com menor intensidade. H, Tratamento com microondas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9.5, com omissão do anticorpo primário anti-PIN. Não detectamos imunorreatividade. Abreviaturas: MOL, camada molecular; PCL, camada de células de Purkinje; GL, camada granular; WM, substância branca. Óptica Nomarski em todos os painéis. Escala: 50 μm .

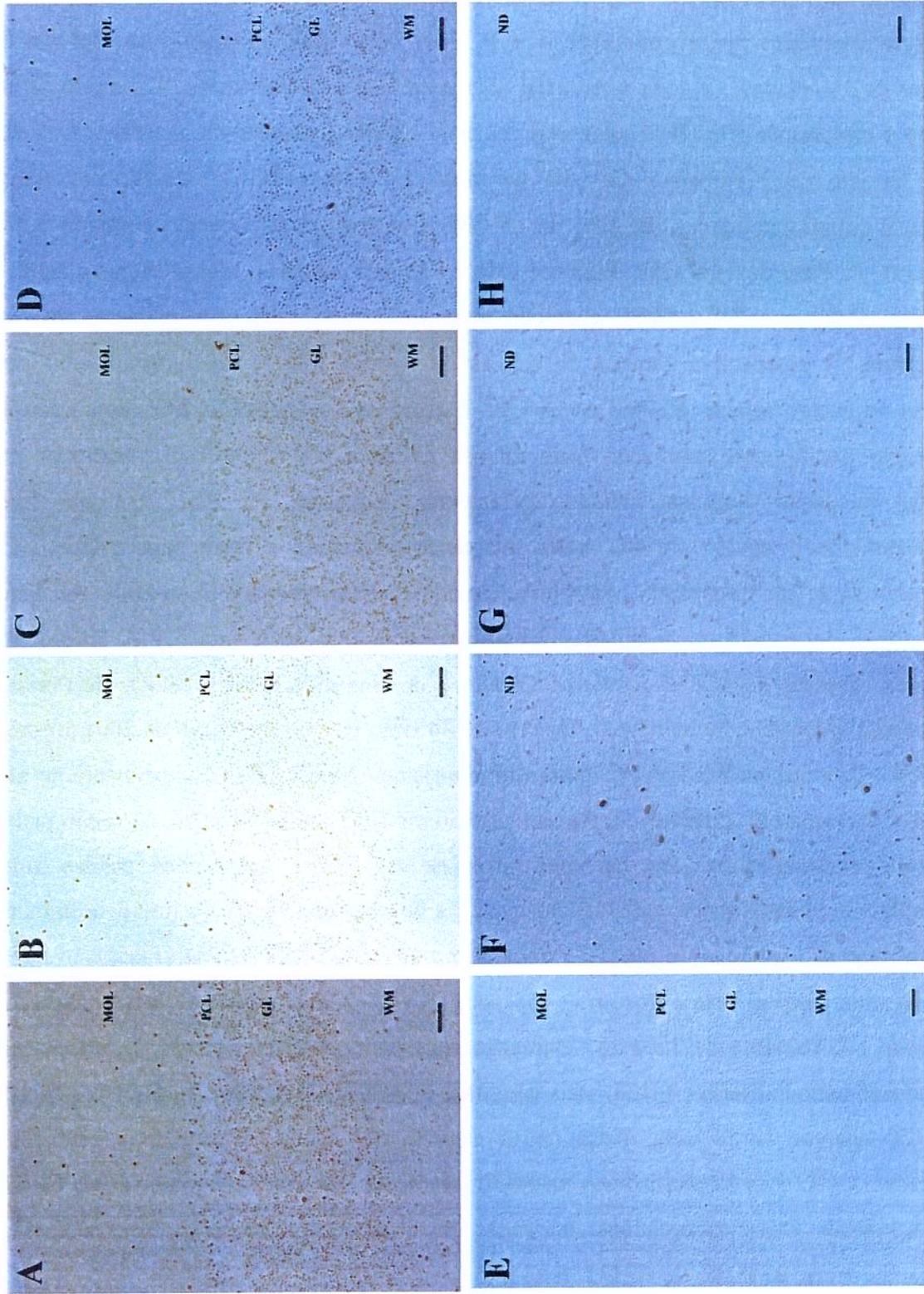


Figura 2

Figura 3. Expressão de PIN imunorreativo-símile em secções de cerebelo humano durante o desenvolvimento pré e pós-natal. **A e B**, Feto de 11 GW. Em (**A**) observamos a EGL no estadio de 3 camadas e a zona intersticial (ZI) apareceram intensamente PIN-imunomarcadas no núcleo e citoplasma. Em (**B**) a zona ventricular (ZV) está intensamente marcada. **C**, Feto de 15 GW. Estadio de 3 camadas. Camada germinativa externa (EGL) intensamente marcada no núcleo e citoplasma celular. **D**, Feto de 15 GW. Controle de (**C**), obtido omitindo o anticorpo primário. **E**, Feto de 18,5 GW. Final do estadio de três camadas. Identificamos a EGL, a zona marginal (MZ) e a ZI. A EGL apareceu intensamente marcada principalmente na zona pré-migratória. A prospectiva camada de células de Purkinje (PCL) foi detectada com marcação intensa no núcleo celular. **F**, Feto de 26 GW. Estadio de 5 camadas. A EGL continuou exibindo o mesmo padrão com marcação mais intensa na zona pré-migratória. A camada molecular (MOL) mostrou algumas células fortemente marcadas. A PCL marcou fortemente principalmente o núcleo. A GL exibiu marcação moderada a forte para o PIN. A *lamina dissecans* pode ser visualizada como uma camada acelular entre a PCL e a GL. **G**, Feto de 30 GW. Início do estadio de 4 camadas. Neste período a marcação para o PIN foi moderada em todas as camadas do córtex cerebelar. O núcleo dos interneurônios e células de Purkinje (PC) apareceram intensamente marcados. **H**, Feto de 34 GW. Intensa marcação da zona pré-migratória da EGL. Os interneurônios as PC aparecem intensamente marcados principalmente no núcleo. A GL está marcada em “patches”. **I**, Recém nascido de 2 dias. A EGL exhibe marcação mais intensa na zona pré-migratória que na zona proliferativa. Foram observadas células com perfil migratório moderadamente marcadas no núcleo e citoplasma celular. Os interneurônios na MOL exibem intensa marcação do núcleo e fraca do citoplasma. As PC exibem marcação nuclear que varia de moderada a forte e fraca no citoplasma. A GL exhibe marcação de moderada a forte “em manchas”. **J**, Lactente de 3 meses. Marcação semelhante a observada em (**I**), no entanto neste período podemos observar a EGL mais estreita e a MOL mais espessa. **L**, Lactente de 10 meses. A EGL aparece como uma fileira muito discreta de células na superfície pial, fracamente marcada. A GL e os interneurônios na MOL aparecem fracamente marcados. **M**, Criança de 1 ano e 6 meses. Observamos intensa marcação dos interneurônios e da GL em “patches”. Óptica Nomarski em **A, B, D, E, G, H, I, J**. Escala: 50µm.

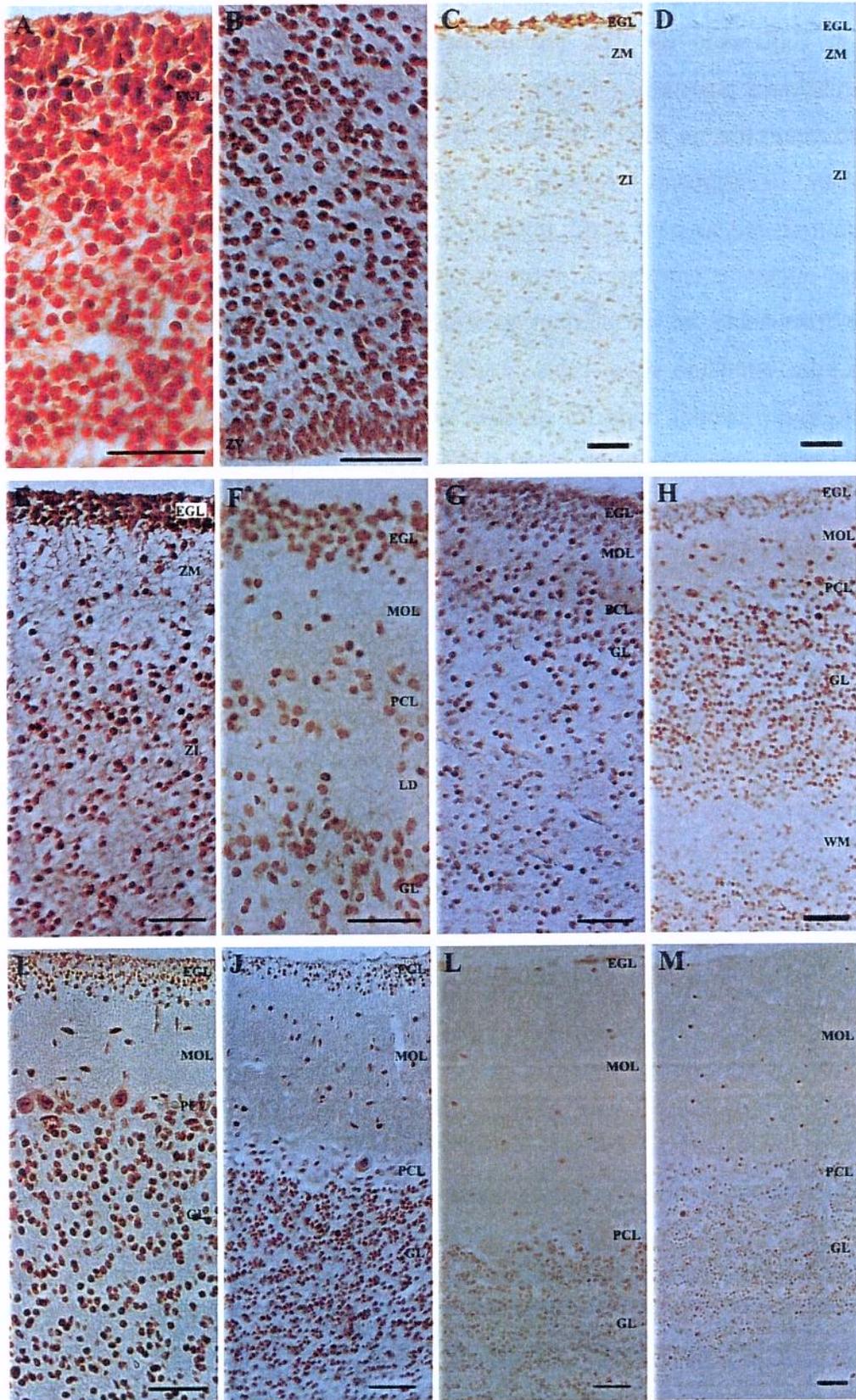


Figura 3

Figura 4. Expressão de PIN imunorreativo-símile no córtex cerebelar humano em desenvolvimento pós-natal (secções tissulares de um recém nascido de 2 dias - mesmo caso documentado na Fig. 3 D). Em **A**, **B** e **C** notou-se na EGL que a zona pré-migratória estava mais intensamente marcada no núcleo e citoplasma que a zona proliferativa. Observaram-se células com perfil migratório (setas menores) moderadamente marcadas para o PIN no núcleo e citoplasma. Interneurônios (setas maiores) intensamente marcados no núcleo e fracamente no citoplasma. **A**, Célula com perfil migratório (seta menor) com o processo líder estendido sobre cabo de glia de Bergmann translúcido. **B**, Célula com perfil migratório (seta menor) onde foi possível observar o processo líder. **C**, Célula com perfil migratório (seta menor) onde foi possível visualizar o “trailing process”. Na outra célula com perfil migratório observamos o processo líder (cabeça de seta). Óptica Nomarski em todos os painéis. Escala: 10 μ m.

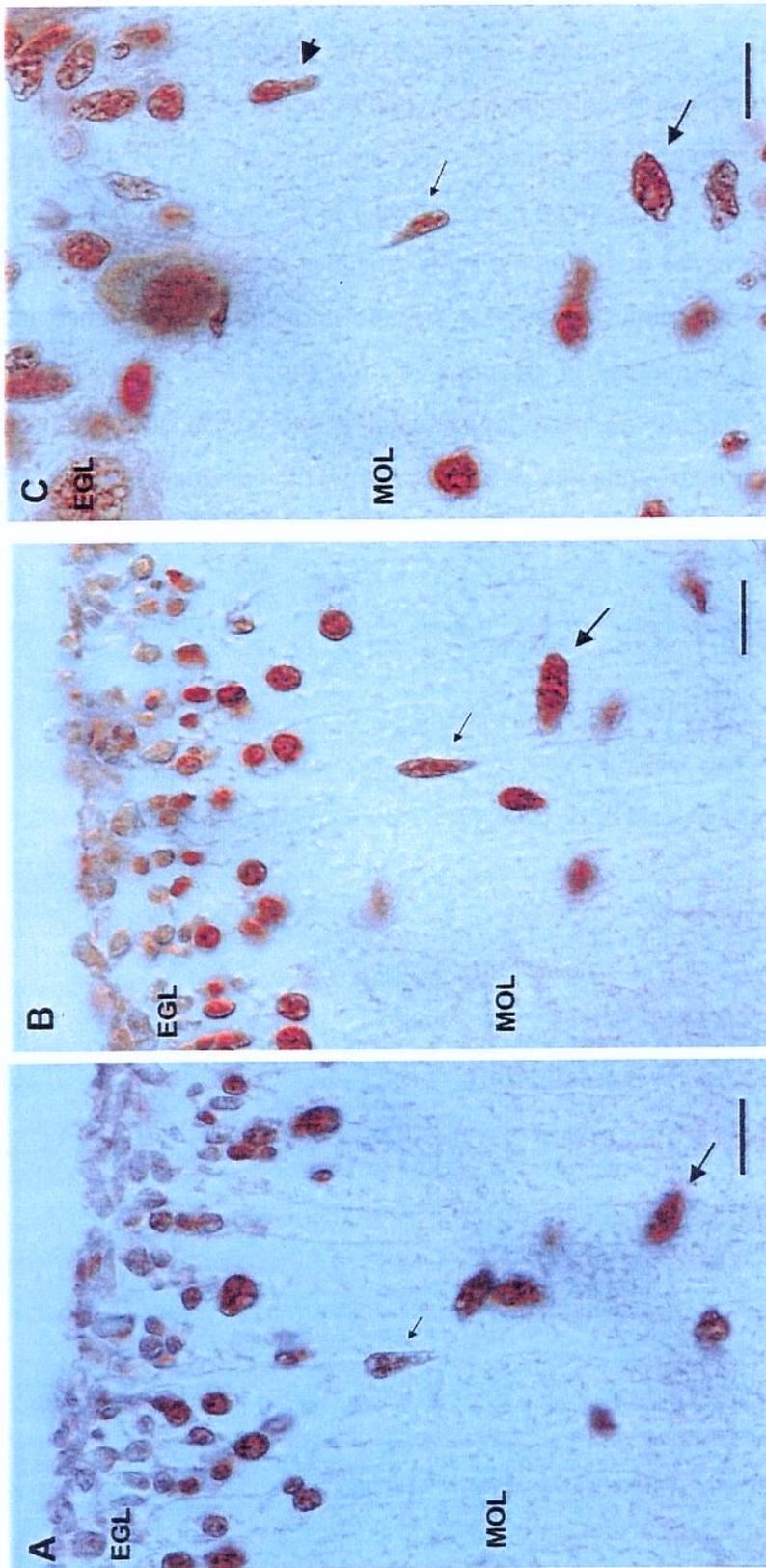


Figura 4

Figura 5. Expressão de PIN-IR em secções cerebelares de espécimes de crianças, adolescentes e adultos. A, 9 anos. Marcação de interneurônios intensa. A marcação moderada no núcleo e intensa no citoplasma da células granulares da GL exibe padrão patch. **B,** 9 anos. Secção controle, onde foi omitido o anticorpo primário. **C,** 21 anos. A marcação dos interneurônios é moderada. A GL exibe o mesmo padrão de marcação com menor intensidade. **D,** 35 anos. Intensa marcação dos interneurônios, dos plexos ganglionares e da GL. Moderada marcação dos núcleos das células de Purkinje. **E,** 46 anos. Marcação semelhante à da idade anterior, e dos painéis seguintes. **F,** 63 anos. **G,** 72 anos. **H,** 90 anos. A intensidade da marcação diminui em relação ao período pré-natal e o primeiro ano pós-natal. Os plexos ganglionares continuam bem evidentes. Abreviaturas: MOL, camada molecular; PCL, camada de células de Purkinje; GL, camada granular. Óptica Nomarski em **A, B, C, D, E.** Escala: 50 μm .

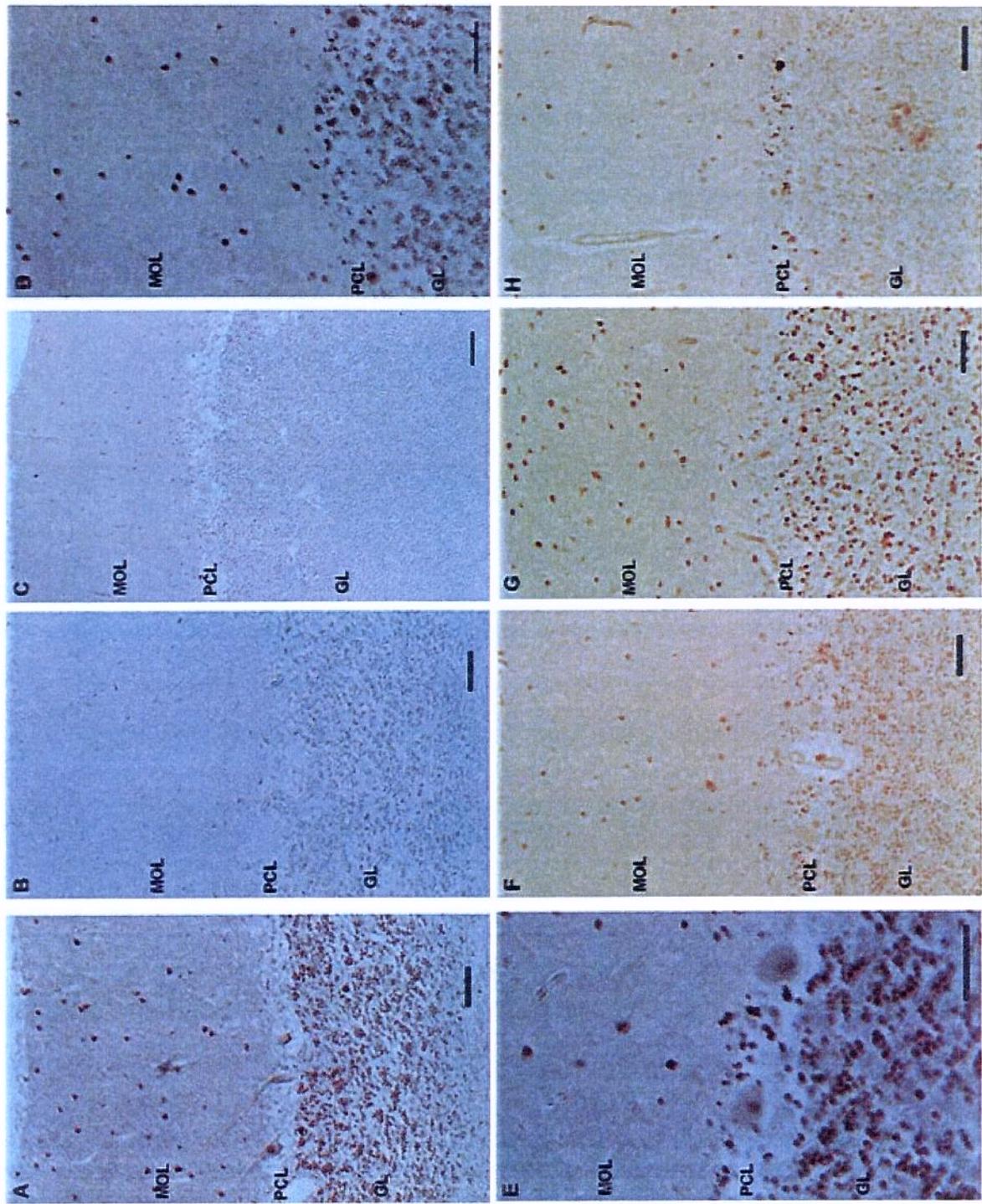


Figura 5

Figura 6. Expressão de PIN no núcleo denteado. Os neurônios ganglionares do núcleo denteado (células maiores) apareceram intensamente marcados para o PIN no núcleo e fracamente no citoplasma. Algumas células menores apareceram marcadas em (A), e muitas apareceram intensamente marcadas em (C) e (D). **A**, Feto de 34 GW. **B**, Espécime de 9 anos. **C** e **D**, Espécime de 37 anos. Óptica Nomarski em todos os painéis. Escala: 50 μ m.

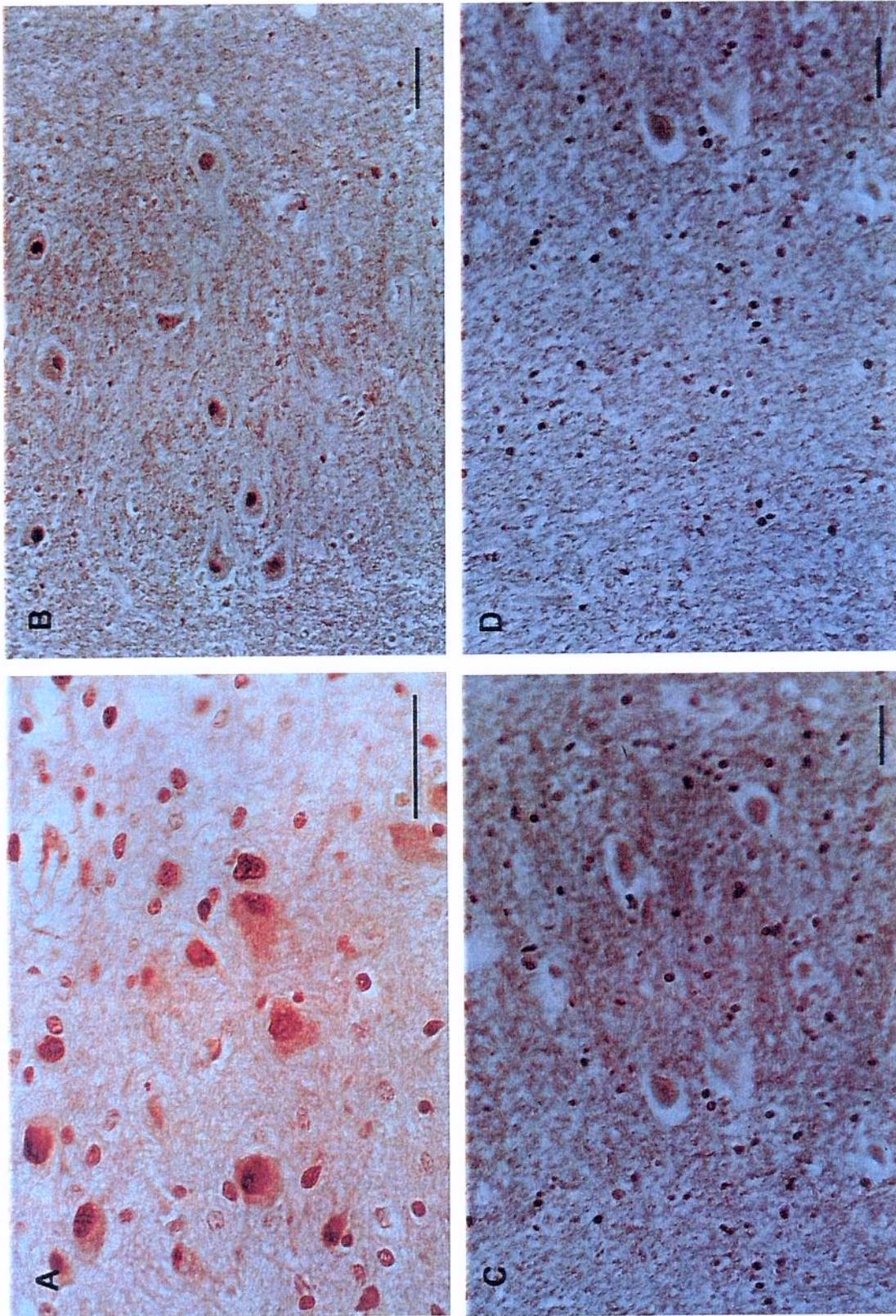


Figura 6

Figura 7. Expressão de PIN no núcleo denteado. **A e B**, Paciente de 46 anos. Observamos células ganglionares do núcleo denteado intensamente imunomarcadas para o PIN no núcleo e fracamente no citoplasma. Poucas células menores apareceram marcadas. **C**, Paciente de 87 anos. O padrão de marcação foi mantido, com intensa marcação nuclear e fraca citoplasmática das células ganglionares. Poucas células menores imunomarcadas para o PIN. **D**, Paciente de 98 anos. A marcação PIN-positiva decaiu, foi moderada no núcleo e fraca no citoplasma. Óptica Nomarski em todos os painéis. Escala: 50 μ m.

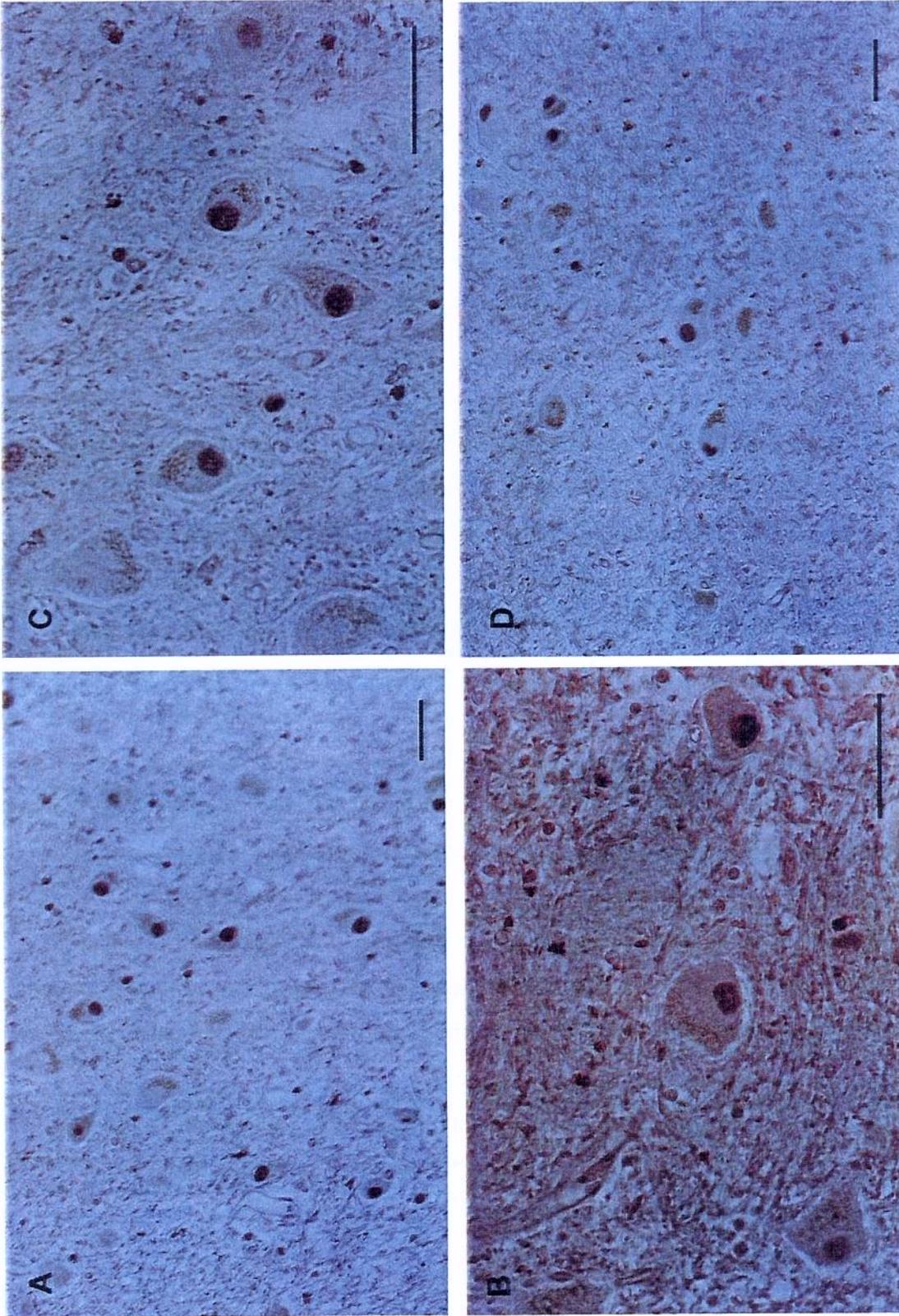


Figura 7

Figura 8. Expressão de nNOS imunorreativo-símile em secções (5 µm) de cerebelo humano durante o desenvolvimento pré e pós-natal e em adulto jovem. **A**, Espécime de 13 GW. Estadio de 3 camadas. A EGL apareceu intensamente imunomarcada para a nNOS no núcleo e citoplasma celular. A MZ e a IZ também exibiram intensa marcação. **B**, Espécime de 13 GW (sequência de **A**). A ZV apareceu intensamente marcada. **C**, Espécime de 23 GW. Observamos intensa marcação da EGL e de células na MOL. As células de Purkinje apareceram bem marcadas no núcleo e citoplasma. A GL em formação aparece bem marcada. **D**, Espécime de 24 GW. A marcação é semelhante ao painel anterior. **E**, Espécime de 30 GW. Na EGL a zona proliferativa apareceu imunomarcada mais intensamente que a zona pré-migratória. Na MOL as células apareceram bem marcadas. A PCL mostrou intensa marcação nuclear nNOS-positiva e moderada citoplasmática. Na GL algumas células estão intensamente marcadas e outras moderadamente. **F**, Controle obtido omitindo-se o anticorpo primário. Mesma região de (**E**). **G**, Espécime de 34 GW. Observamos moderada marcação da EGL e células na MOL, intensa marcação citoplasmática das células de Purkinje e moderada nuclear. Na GL observamos células intensamente marcadas e outras moderadamente. **H**, Espécime de 21 dias pós-natais. A EGL exibiu moderada marcação nNOS-IR. Os interneurônios na MOL exibiram intensa marcação do citoplasma e seus processos. As células de Purkinje apresentaram fraca marcação nuclear, moderada marcação do citoplasma e intensa marcação de dendritos. A GL exibiu marcação intensa no citoplasma e fraca no núcleo, “em manchas”. **I**, Espécime de 10 meses. Os interneurônios na MOL apresentaram marcação de citoplasma e dos processos intensa. As células de Purkinje estão moderadamente marcadas no citoplasma e dendritos. A GL marcou fracamente no núcleo e moderadamente no citoplasma, “em manchas”. Escala: 50 µm. No quadro inferior observamos um espécime de 1 ano. Em **A** uma célula de Purkinje e uma célula em cesto imuno-reativas para nNOS. Em **B** observamos dendritos de células de Purkinje na MOL nNOS-IR. Aumento original: 330X em **A** e **B**.

Abreviaturas: MZ, zona marginal; IZ, zona intersticial; ZV, zona ventricular; EGL, camada germinativa externa; MOL, camada molecular; PCL, camada de células de Purkinje; GL, camada granular. Óptica Nomarski em todos os painéis.

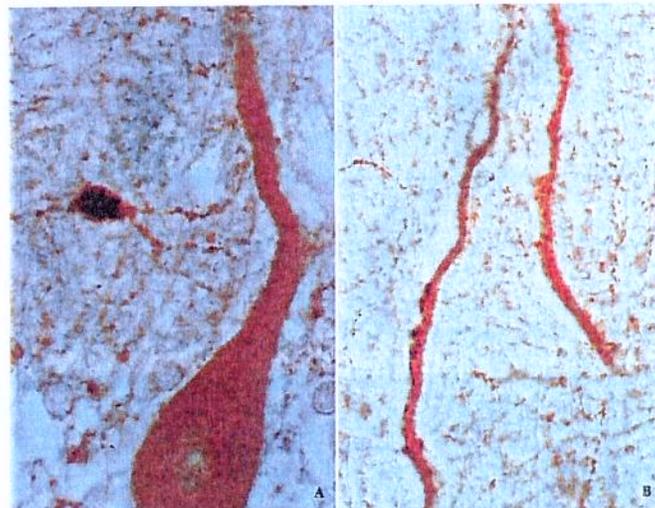
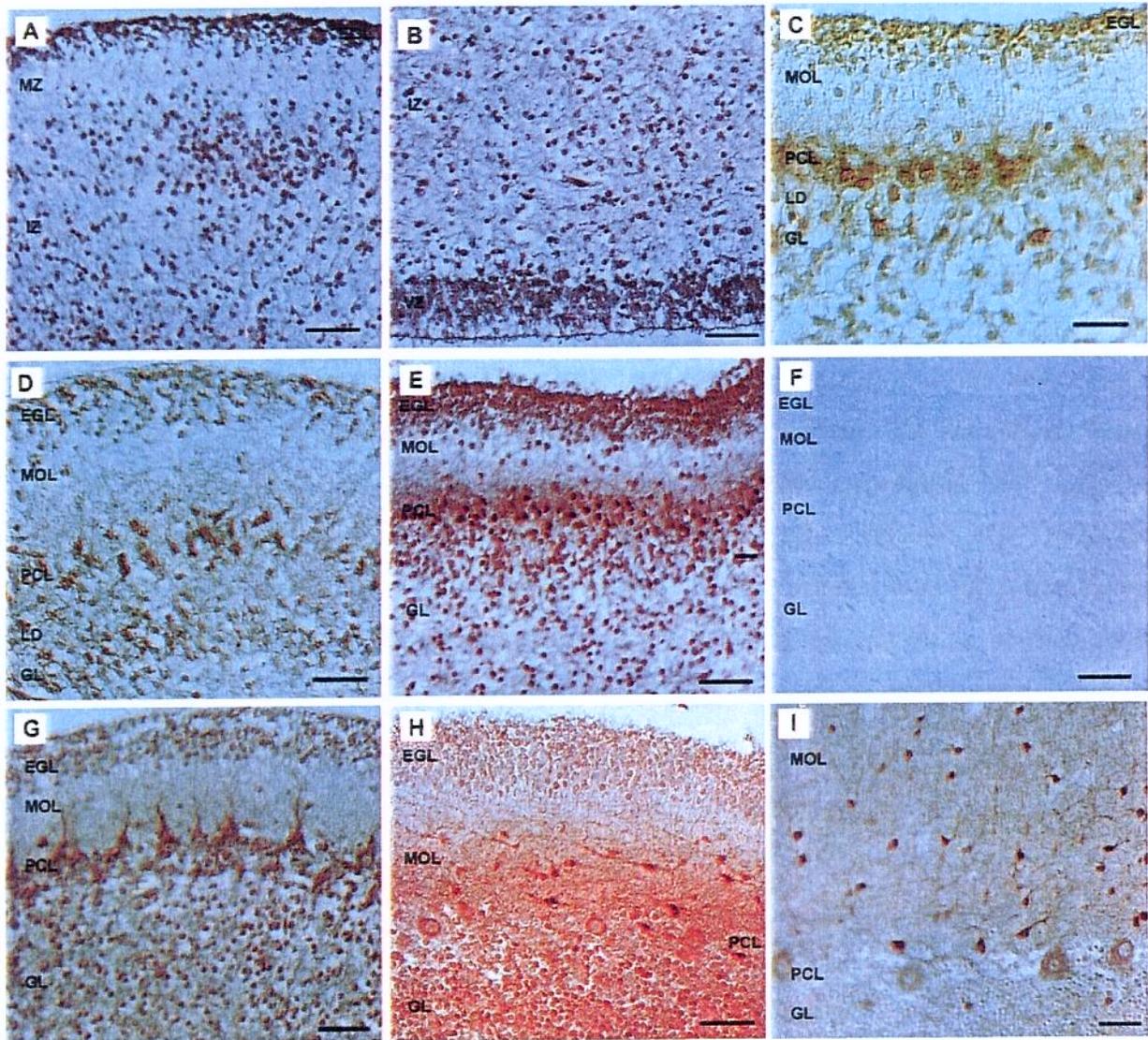


Figura 8.

Figura 9. Expressão de nNOS no cerebelo humano do segundo ano de vida até a idade adulta. **A**, Cerebelo de lactente de 1 ano. Os interneurônios e as células de Purkinje, no corpo celular e arborização dendrítica, estão bem marcados. **B**, Cerebelo de criança de 7 anos. A marcação é semelhante à da figura **A**, exceto pela presença de granulações bem marcadas no plexo ganglionar. **C**, Cerebelo de adolescente de 19 anos. A marcação é semelhante às duas idades anteriores, com maior intensidade de marcação da GL. As granulações nos plexos ganglionares estão presentes, embora seja difícil a visualização nesta figura. **D**, Cerebelo de adulto de 38 anos. Os interneurônios e a arborização dendrítica das PC aparecem bem marcados na MOL. As granulações nos plexos ganglionares estão presentes. A GL exibe moderada marcação “em manchas”. **E**, Cerebelo de adulto de 44 anos. A marcação nesta idade é semelhante a da idade anterior, exceto que as granulações nos plexos ganglionares não foram detectadas, e o núcleo de algumas células de Purkinje aparecem intensamente marcados. Aumento original: 66x em todas as figuras. Óptica Nomarski em B,D e E.

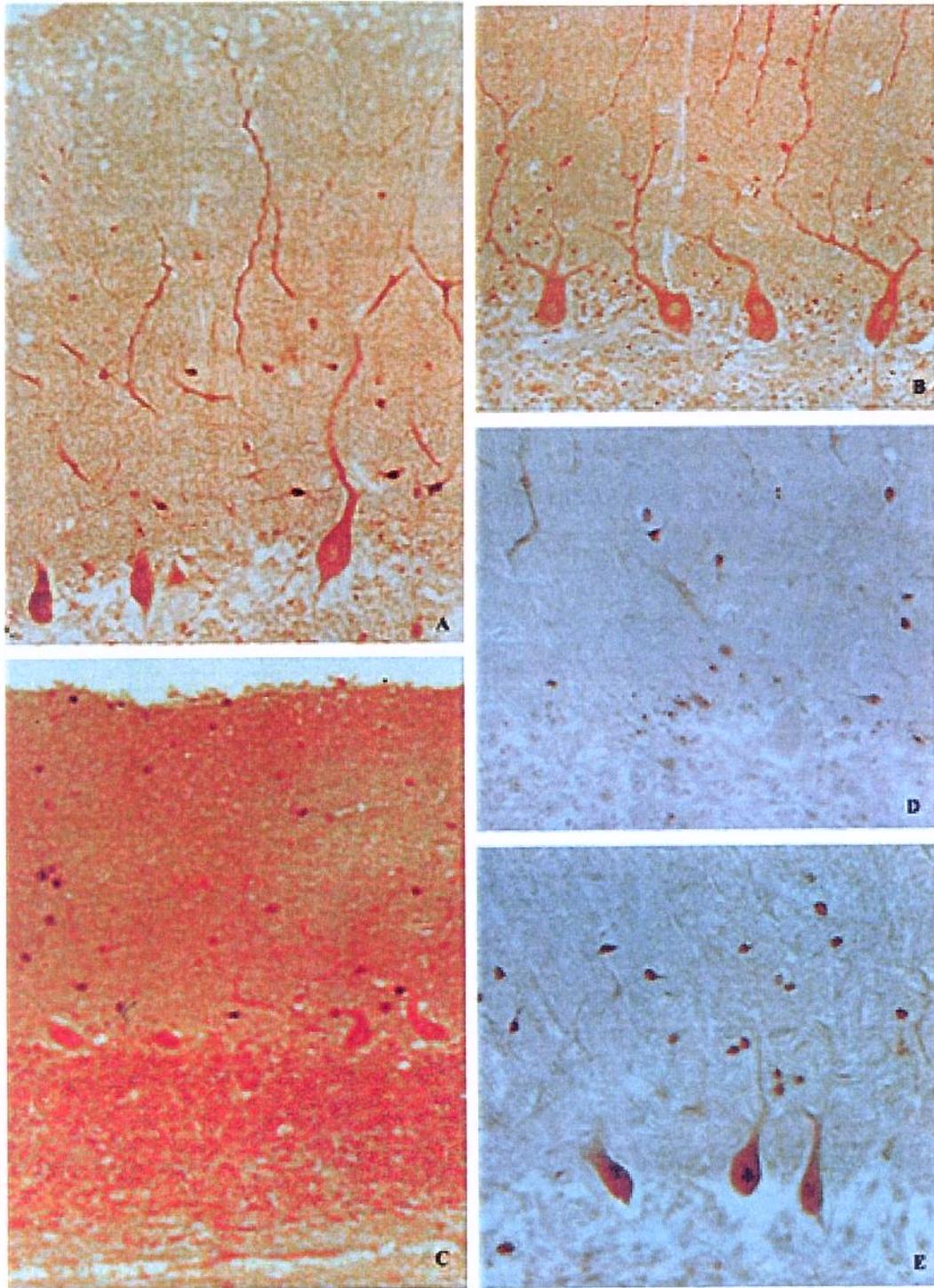


Figura 9

Figura 10. Expressão de nNOS no cerebelo humano adulto até o envelhecimento. A, 53 anos. B, 63 anos. C, 72 anos. D, Controle de (C) obtido por omissão do anticorpo primário. E, 87 anos. F, 90 anos. A MOL apresenta-se bem marcada em **A, B, C, E e F**, principalmente em **B, C e E**. Os interneurônios, que são o destaque da marcação para nNOS, aparecem intensamente marcados em todos os painéis onde foi observada imunorreatividade, exceto em (F) onde a marcação é moderada. Aparece marcação das granulações dos plexos ganglionares em todos os painéis. As células de Purkinje aparecem moderadamente imunomarcadas no citoplasma e em (F) alguns núcleos imunorreativos. A GL exhibe marcação “patch” moderada. A variação observada na na marcação dos diferentes painéis deve-se possivelmente à fixação e processamento do tecido cerebelar e não à diferenças de expressão em função da idade. Abreviaturas: MOL, camada molecular; PCL, camada de células de Purkinje; GL, camada granular. Aumento original: 66x em todas as figuras. Óptica Nomarski em **A, B, D, E e F**.

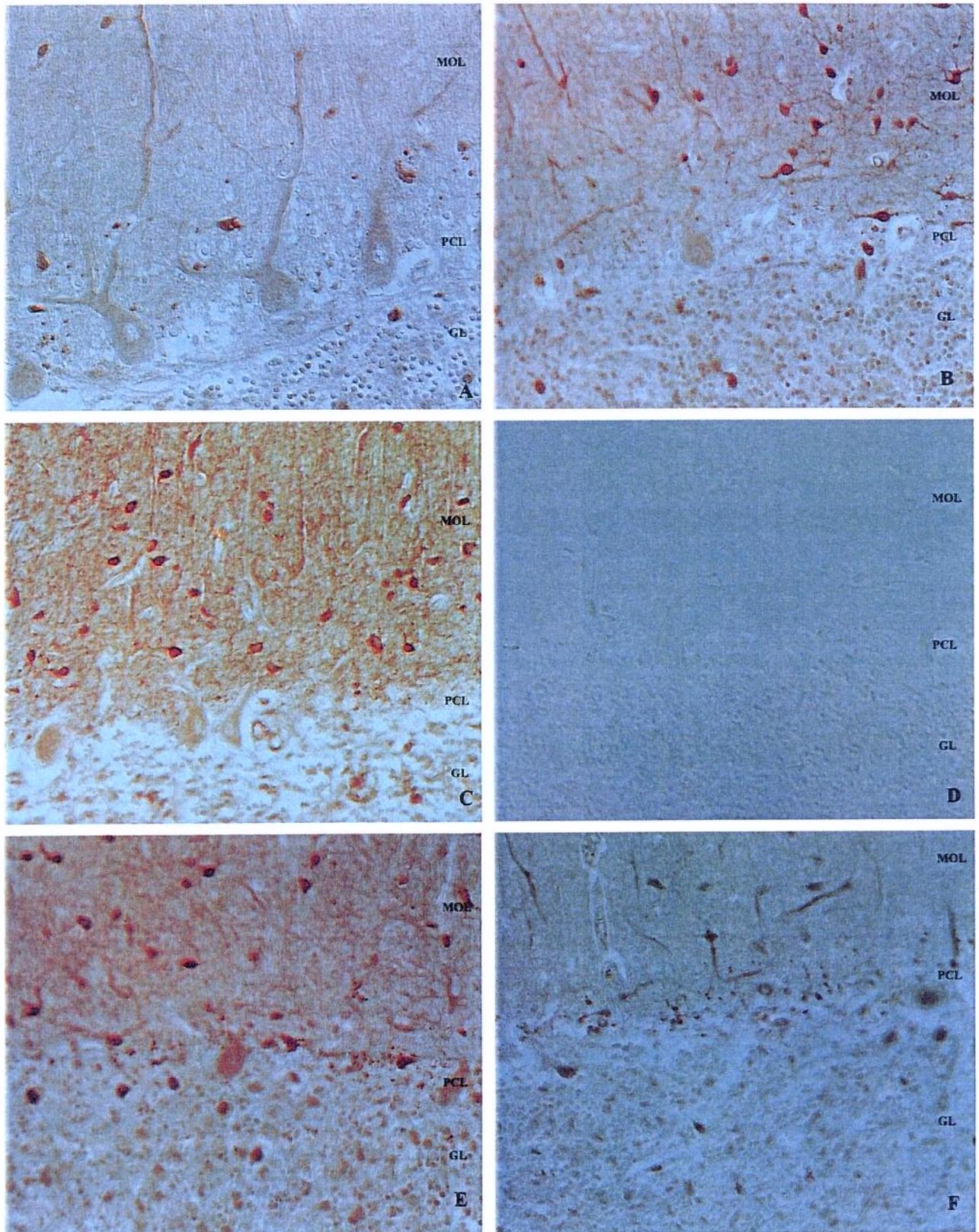


Figura 10.

Figura 11. Expressão de nNOS no cerebelo humano. **A,** Espécime de 21 dias. Núcleo denteado, mostrando intensa imunorreatividade para a nNOS das células ganglionares. **B,** Mesmo paciente e região cerebelar do painel anterior. Aqui foi possível visualizar ausência de marcação nuclear e intensa marcação citoplasmática das células ganglionares. **C,** Espécime de 98 anos. Núcleo denteado com fraca marcação citoplasmática das células ganglionares. **D,** Espécime de 98 anos. O córtex cerebelar exibiu intensa marcação de dendritos primários e citoplasma de células de Purkinje. A MOL e a GL exibiram marcação muito fraca, quase inexistente. Óptica Nomarski em todos os painéis. Escala: 50 μ m.

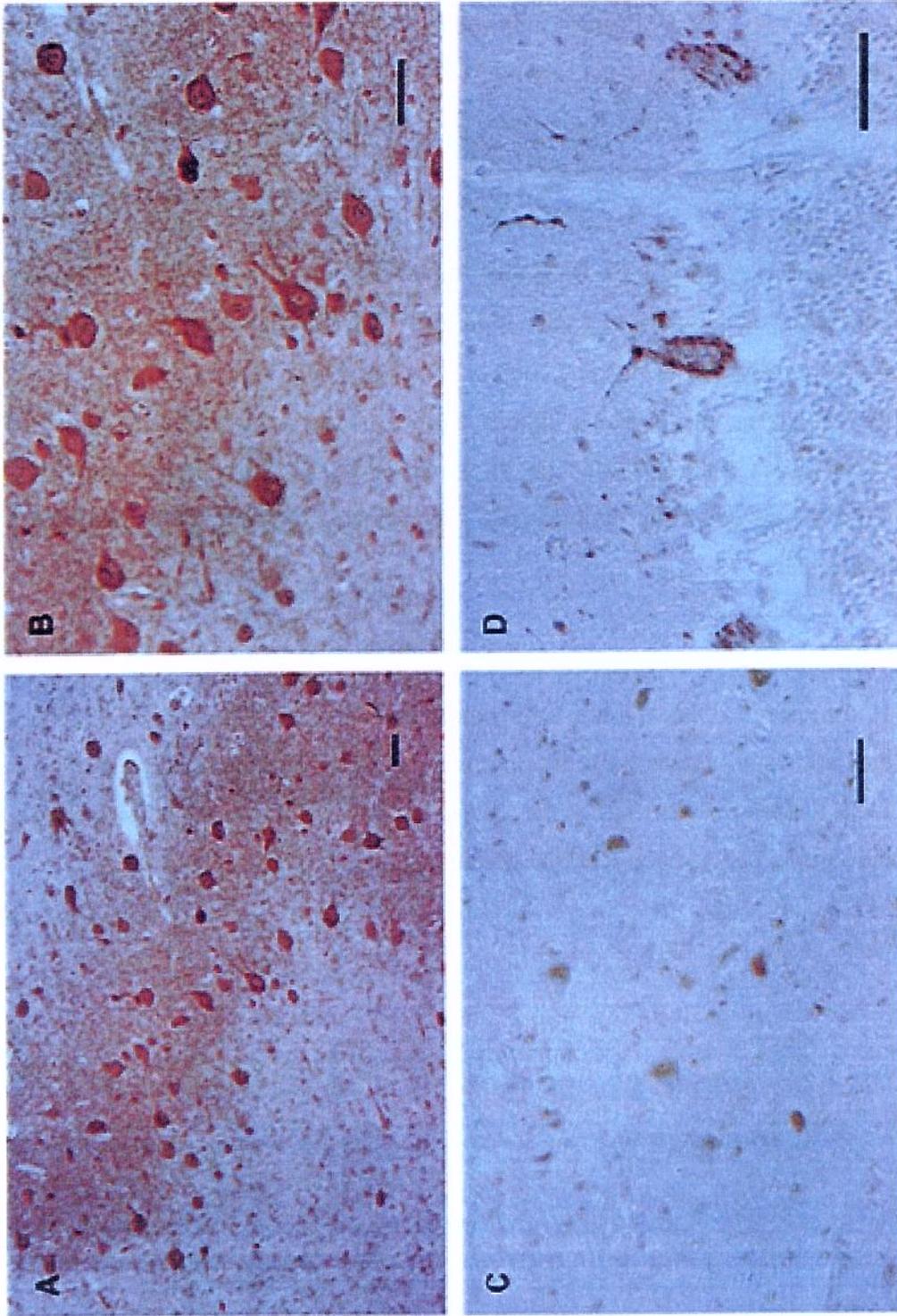


Figure 11

Figura 12. Imunodeteccção de anti-PIN por imunoblot. Nos poços 1 a 6 estão as amostras de hemisfério cerebelar (6, 16, 23, 47, 68, 82 anos) nos poços 7 a 11 estão as amostras de vérmis cerebelar (6 a 68 anos). Identificamos em todas as amostras uma banda imunorreativa com migração eletroforética de aproximadamente 10 kDa (seta). Nos poços laterais utilizamos o padrão de peso molecular SDS-7B contendo metalotioneína como padrão de baixo peso molecular (6 kDa). Revelação por quimioluminescência.

Figura 13. Imunodeteccção de anti-DLC por imunoblot. As amostras são as mesmas utilizadas no experimento anterior. Utilizamos o anticorpo anti-DLC. No poço 12 uma amostra de DLC de *Chlamydomonas reinhardtii* purificada com a PLM (proteína ligante de maltose) clivada pelo fator Xa (que cliva especificamente a ligação entre as duas proteínas) utilizada como controle positivo. Observamos imunorreatividade do controle positivo e de uma banda com mesma migração eletroforética que a amostra de DLC (seta- aproximadamente 10 kDa). Revelação por quimioluminescência.

Figura 14. Imunodeteccção de bandas DIC-IR por imunoblot. As amostras são as mesmas dos experimentos anteriores. Observamos uma banda de aproximadamente 74 kDa em todas as amostras (seta) utilizando anticorpo primário contra a cadeia intermediária da dineína de 74 kDa. As bandas identificadas de peso molecular inferior a 74 kDa ocorrem, possivelmente, devido à ligação do anticorpo a cadeias polipeptídicas resultantes de proteólise da DIC.

Figura 12.



Figura 13.

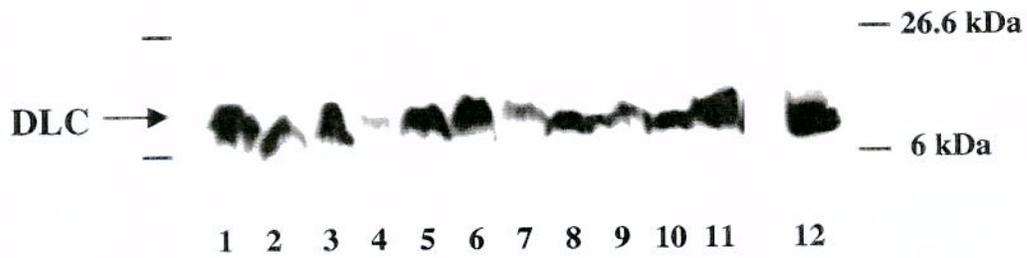


Figura 14.

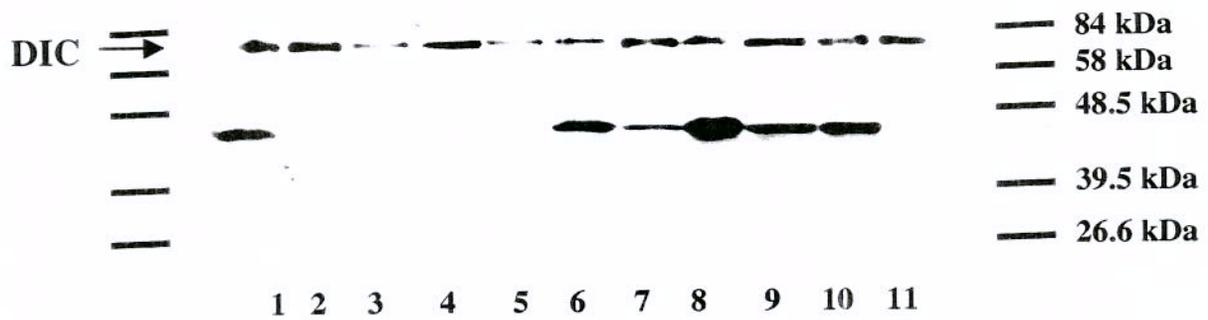


Figura 15. Imunodeteccção de anti-nNOS utilizando imunoblot. Especificidade para o anticorpo anti-nNOS, com marcação do controle positivo para a nNOS (poço 13). Revelação por quimioluminescência. Nos poços 1 a 6 estão as amostras de hemisfério cerebelar (6, 16, 23, 47, 68, 82 anos) nos poços 7 a 11 estão as amostras de vérmis cerebelar (6 a 68 anos). Todas as amostras exibem bandas imunomarcadas para anti-nNOS com mesma migração eletroforética que o padrão da nNOS. A marcação de bandas com peso molecular inferior ocorre, possivelmente devido a autólise do tecido. No poço 14 está a fração solúvel de amostra cirúrgica de lobo temporal, mostrando menor proteólise que os espécimes de necrópsia. No poço 15 está o controle positivo para a nNOS (seta).

*indica ligação inespecífica quando comparado o experimento teste com o controle, onde foi omitido o anticorpo primário.

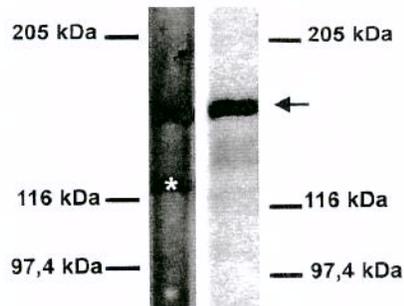


Figura 15.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-SOUD, H.M.; WANG, J.; ROUSSEAU, D.L.; FUKUTO, J.M.; IGNARRO, L.J.; STUHER, D.J. Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.22997-23006, 1995.
- BENASHSKI, S.E.; HARRISON, A.; PATEL-KING, R.; KING, S.M. Dimerization of the highly conserved light chain shared by dynein and myosin V. **J. Biol. Chem.** v.272, n.33, p.20929-20935, 1997.
- BONAFE, N. AND SELLERS, J.R. Molecular characterization of myosin V from *Drosophila melanogaster*. **J. Muscle Res. Cell. Motil.**, v. 19, p.129-141, 1998.
- BOOK, K.J. AND MOREST, D.K. Migration of neuroblasts by perycarial translocation: role of cellular elongation and axonal outgrowth in the acoustic nuclei of the chickembryo medulla. **J. Comp. Neurol.** v.297, p.55-76, 1990.
- BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; SNYDER, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v.347, p.768-770, 1990.
- BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; GLATT, C.E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R.R.; SNYDER, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, v.351, p.714-718, 1991.
- BREDT, D.S. AND SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Ann. Rev. Biochem.** v.63, p.175-195, 1994.
- BRINN, L.S. **Expressão diferencial da miosina-V de cérebro durante a ontogênese neural do rato, em especial na corticogênese cerebelar e hipocampal.** 1999. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Psicobiologia) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- CHAE, T.; KWON, Y.T.; BRONSON, R.; DIKKES, P.; LI, E.; TSAI, L.H. Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. **Neuron**, v.18, p.29-42, 1997.
- CHRISTOPHERSON, K.S. AND BREDT, D.S. Nitric Oxide in Excitable Tissues: Physiological Roles and Disease. **J. Clin. Invest.**, v.100, n.10, p.2424-2429, 1997.
- COSTA, E.T. **O óxido nítrico e a ontogênese do cerebelo humano: estudo imunohistoquímico em tecido post-mortem.** 1998. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Farmacologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo.

- COSTA, E.T.; DE NUCCI, G.; CHIMELLI, L.; MARTINS, A.R. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) immunoreactivity (IR) is differentially expressed during human cerebellar corticogenesis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, XXVIIª, Caxambu, 1998. **Anais**. Caxambu, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1998. I-31.
- CRÉPIEUX, P.; KWON, H.; LECLERC, N.; SPENCER, W.; RICHARD, S.; LIN, R.; HISCOTT, J. I κ B α physically interacts with a cytoskeleton-associated protein through its signal response domain. **Molecular and Cellular Biology**, v.17, n.12, p.7375-7385, 1997.
- DANIEL, H., LEVENES, C. AND CRÉPEL, F. Cellular mechanisms of cerebellar LTD. **Trends Neurosci.**, v.21, p.401-407, 1998.
- DAWSON, V.L. AND DAWSON, T.M. Nitric oxide in neuronal degeneration. **Proc. Soc. Exper. Biol. Med.**, v.211, p.33-40, 1996.
- DICK, T.; RAY, K.; SALZ, H.K.; CHIA, W. Cytoplasmic dynein (ddlc1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Cell. Biol.**, v.16, p.1966-1977, 1996.
- DOBINS, W.B. AND TRUWIT, C.L. Lissencephaly and other malformations of cortical development: 1995 update. **Neuropediatrics**, v.26, p.132-147, 1995.
- DOWNEN, M.; ZHAO, M.L.; LEE, P.; WEIDENHEIM, K.M.; DICKSON, D.W.; LEE, S. C. Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v.58, n.1, p.12-21, 1999.
- EFIMOV, V.P, MORRIS, N.R. The LIS1-related NUDF protein of *Aspergillus nidulans* interacts with the coiled-coil domain of the NUDE/RO11 protein. **J Cell Biol.**, v.150, n.3, p.681-8, 2000.
- EGBERONGBE, Y.I.; GENTLEMAN, S.M.; FALKAI, P.; BOGERTS, B.; POLAK, J.M.; ROBERTS, G.W. The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. **Neuroscience**, v.59, n.3, p.561-578, 1994.
- ENGLE, L.J. AND KUENNETT, R.H. Cloning, analysis and chromosomal localization of myoxin (MYH12), the human homolog to the mouse dilute gene. **Genomics**, v.19, p.407-416, 1994.
- ESPÍNDOLA, F.S.; SUTER, D.M.; PARTATA, L.B. E.; CAO, T.; WOLENSKI, J.S.;

- CHENEY, R.E.; KING, S.M.; MOOSEKER, M.S. The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v.47, p.269-281, 2000.
- FÖRSTERMANN, U.; GORSKY, L.D.; POLLOCK, J.S.; SCHMIDT, H.H.; HELLER, M.; MURAD, F. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.168, n.2, p.727-732, 1990.
- FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J-P.; KLEINERT, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB J.**, v.12, p.773-788, 1998.
- FURCHGOTT, R.F. AND ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, p.373-376, 1980.
- GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v.336, p.385-388, 1988.
- GILLARDON, F.; KREP, H.; BRINKER, G.; LENZ, C.; BOTTIGER, B.; HOSSMANN, K.A. Induction of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase/cytoplasmic dynein light chain following cerebral ischemia. **Neuroscience**, v.84, n.1, p.81-88, 1998.
- GONCZY, P.; PICHLER, S.; KIRKHAM, M.; ILYMAN, A. A. Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *C. elegans* embryo. **J. Cell Biol.**, v.147, p.135-150, 1999.
- GREENWOOD, M.T.; GUO, Y.; KUMAR, U.; BEAUSÉJOURS, S.; HUSSAIN, S.N.A. Distribution of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat brain. **Bioch. and Bioph. Res. Commun.**, v.238, p.617-621, 1997.
- GREGORY, W.A.; EDMONDSON, J.C.; HATTEN, M.E.; MASON, C.A. Cytology and neuron-glia apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro. **J Neurosci.**, v.8, n.5, p.1728-38, 1988.
- GUO, Y.; GREENWOOD, M.T.; PETROF, B.J.; HUSSAIN, S.N.A. Expression and regulation of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in ventilatory muscles. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v.20, p.319-326, 1999.
- HAARER, B.K.; PETZOLD, A.; LILLIE, S.H.; BROWN, S.S. Identification of MYO4, a

- second class V myosin gene in yeast. **J. Cell Sci.**, v.107, p.615-623, 1994.
- HATTEN, M.E. AND LIEM, R.K.H. Astroglial cells provide a template for the positioning of developing cerebellar neurons *in vitro*. **J. Cell Biol.**, v.90, p.622-630, 1981.
- HATTEN, M.E. AND MASON, C.A. Neuron-astroglia interactions *in vitro* and *in vivo*. **TINS**, v.9, p.168-174, 1986.
- HATTEN, M.E. AND MASON, C.A. Mechanisms of glial-guided neuronal migration *in vitro* and *in vivo*. **Experientia**, v.46, p.907-916, 1990.
- HATTEN, M.E. The role of migration in central nervous system neuronal development. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.3, n.1, p.38-44, 1993.
- HATTEN, M.E.; ALDER, J.; ZIMMERMAN, K.; HEINTZ, N. Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. **Curr Opin Neurobiol.**, v.7, n.1, p.40-7, 1997.
- HATTEN, M.E. Central nervous system neuronal migration. **Annu Rev Neurosci.**, v.22, p.511-39, 1999.
- HIROTSUNE, S.; FLECK, M.W.; GAMBELLO, M.J.; BIX, G.J.; CHEN, A.; CLARK, G.D.; LEDBETTER, D.H.; MCBAIN, C.J.; WYNshaw-BORIS, A. Graded reduction of Pafah1b1 (LIS1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. **Nat. Genet.**, v.19, p.333-339, 1998.
- HORI, H.; IWASAKI, T.; KURAHASHI, Y.; NISHINO, T. Calcium-dependent inactivation of neuronal nitric oxide synthase: evidence for the existence of stabilization/activation factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.243, p.476-480, 1997.
- HUANG, Z.; HUANG, P.L.; PANAHIAN, N.; DALKARA, T.; FISHMAN, M.C.; MOSKOWITZ, M.A. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. **Science**, v.265, p.1883-1885, 1994.
- IADECOLA, C.; ZHANG, F.; Xu, X. Role of nitric oxide synthase-containing vascular nerves in cerebrovasodilation elicited from cerebellum. **Am J Physiol.**, v.264, n.4, p.738-746, 1993.
- IADECOLA, C.; XU, X.; ZHANG, F.; EL-FAKAHANY, E.E.; ROSS, M.E. Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. **J. Cerebr. Blood Flow Metab.**, v.15, p.52-59, 1995.

- IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **Trends Neuroscience**, v.20, p.132-139, 1997.
- IGNARRO, L.J.; BYRNS, R.E.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S. **Circulation Res.**, v.61, p.866-879, 1987.
- JAFFREY, S.R. AND SNYDER, S.H. PIN: An Associated Protein Inhibitor of Neuronal Nitric Oxide Synthase. **Science**, v.274, p.774-777, 1996.
- JORGE, R. (1999): **Imunolocalização da isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico (nNOS), do inibidor protéico da nNOS e da miosina-V na retina humana normal.** Tese (Doutorado em Oftalmologia) Departamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- KEILHOFF, G.; SEIDEL, B.; NOACK, H.; TISCHMEYER, W.; STANEK, D.; WOLF, G. Patterns of nitric oxide synthase at the messenger RNA and protein levels during early rat brain development. **Neuroscience**, v.75, n.4, p.1193-1201, 1996.
- KING, S.M. AND PATEL-KING, R.S. The Mr = 8,000 and 11,000 outer arm dynein light chains from *Clamydomonas* flagella have cytoplasmichomologues. **The J. of Biol. Chem.**, v.270, n.19, p.11445-11452, 1995.
- KING, S. The dynein microtubule motor. **Bioch. et Bioph. Acta.**, v.1496, p.60-75, 2000.
- KLOMINEK, J.; SUNDQVIST, K.C.; ROBERT, K.I.I. Nucleokinesis: distinct pattern of cell translocation in response to an autocrine motility factor-like substance or fibronectin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.88, p.3902-3906, 1991.
- KOMURO, H. AND RAKIC, P. Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. **Science**, v.257, p.806-809, 1992.
- KOMURO, H. AND RAKIC, P. Modulation of neural migration by NMDA receptors. **Science**, v.260, p.95-97, 1993.
- KOMURO, H. AND RAKIC, P. Dynamics of granule cell migration: a confocal microscopic study in acute cerebellar slice preparations. **J. Neurosci.**, v.15, p.1110-1120, 1995.
- KOMURO, H. AND RAKIC, P. Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. **J. Neurosci.**, v.18, n.4, p.1478-1490, 1998.
- KOMURO, H.; YACUBOVA, E.; YACUBOVA, E.; RAKIC, P. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. **The Journal of**

- Neuroscience**, v.21, n.2, p.527-540, 2001.
- KUHAR, S.G.; FENG, L.; VIDAN, S.; ROSS, M.E.; HATTEN, M.E.; HEINTZ, N.
Changing patterns of gene expression define four stages of cerebellar granule neuron differentiation. **Development**, v.117, p.97-104, 1993.
- KWON, Y.T. AND TSAI, L.H. The role of the p35/Cdk5 kinase in cortical development. **Results Probl. Cell Differ.**, v.30, p.241-253, 2000.
- KWON, Y.T.; GUPTA, A.; ZHOU, Y.; NICOLIC, M.; TSAI, L.H. Regulation of N-cadherin-mediated adhesion by the p35-cdk5 kinase. **Curr. Biol.**, v.10, p.363-372, 2000.
- LAEMMLI, U.K. AND FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. **J. Mol. Biol.**, v.80, p.575-599, 1973.
- LARSON, R.E. Myosin-V: a novel class of unconventional myosins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p.309-318, 1996.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, v.193, p.265-75, 1951.
- MARLETTA, M.A. Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis. **Cell**, v.78, p.927-930, 1994.
- MARTINS, A.R.; DIAS, M.M.; VASCONCELOS, T.M.; CALDO, H.; COSTA, M.C.R.; CHIMELLI, L.; LARSON R.E Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. **J. Neurosci. Methods.**, v.92, p.25-29, 1999.
- MCBAIN, C.J., FREUND, T.F. AND MODY, I. Glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons: precision timing without lasting plasticity. **Trends Neurosci.**, v.22, p.228-235, 1999.
- MENDES, R.C.V. **Expressão das sintases do óxido nítrico em neoplasias linfóides.** 1999. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- MENDES, R.V.; MARTINS, A.R.; DE NUCCI, G.; MURAD, F.; SOARES, F.A. Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine immunoreactivity by B-cell non-Hodgkin's lymphomas and multiple myeloma. **Histopathology**, v.39, n.2, p.172-178, 2001.
- MERCER, J.A.; SEPERACK, P.K.; STROBEL, M.C.; COPELAND, N.G. JENKINS, N.A.

- Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus [published erratum appears in *Nature* 1991 Aug. 8:352:547]. **Nature**, v.349, p.709-713, 1991.
- MERMALL, V.; POST, P.L.; MOOSEKER, M.S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. **Science**, v.279, p.527-533, 1998.
- MORRIS, N.R.; EFIMOV, V.P.; XIANG, X. Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. **Trends Cell Biol.**, v.8, p.467-470, 1998.
- MORRIS, N.R. Nuclear migration: From fungi to the mammalian brain. **The J. of Cell Biol.**, v.148, p.1097-1101, 2000.
- MURAD, F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cGMP signal transduction system. **Adv. Pharmacol.**, v.26, p.19-33, 1994.
- NIETHAMMER, M.; SMITH, D.S.; AYALA, R.; PENG, J.; KO, J.; LEE, M-S.; MORABITO, M.; TSAI, L-H. NUDEL is a novel associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. **Neuron**, v.28, p.697-711, 2000.
- OHYU, J. AND TAKASHIMA, S. Developmental characteristics of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) immunoreactive neurons in fetal to adolescent human brains. **Developmental Brain Research**, v.110, p.193-202, 1998.
- PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v.327, n.6122, p.524-526, 1987.
- PHILLIS, R.; STATTON, D.; CAUCCIO, P.; MURPHEY, R.K. Mutations in the 8 kDa dynein light chain gene disrupt sensory axon projections in the *Drosophila* imaginal CNS. **Development**, v.122, p.2955-2963, 1996.
- PUTHALAKATH, H.; HUANG, D.C.; O'REILLY, L.A.; KING, S.M.; STRASSER, A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interection with the dynein motor complex. **Mol. Cell.**, v.3, p.287-296, 1999.
- RAKIC, P. AND SIDMAN, R.L. Histogenesis of 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 in the cerebellar cortex. A golgi and electron microscopic study in *Macacus rhesus*. **J. Comp. Neurol.**, v.147, p.523-546, 1971.

- RAKIC, P. Extrinsic cytological determinants of basket and stellate cell dendritic pattern in cerebellar molecular layer. **J. Comp. Neurol.**, v.146, p.335-354, 1972.
- RAKIC, P., NOWAKOWSKI, R.S. The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. **J. Comp. Neurol.**, v.196, n.1, p.99-128, 1981.
- RAKIC, P. Mechanism of neuronal migration in developing cerebellar cortex. In: Molecular basis of neural development (Edelman GE, Cowan, WM, Gall E, eds), p.139-160. New York: Wiley, 1985.
- RAKIC, P. Principles of neural cell migration. **Experientia**, v.46, p.882-891, 1990.
- RAMÓN Y CAJAL. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Paris, Maloine. Reprinted by Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 1955. v.II. p.993, 1911.
- RIVAS, R.J AND HATTEN, M.E. Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. **J. Neurosci.**, v.15, p.981-989, 1995.
- RYDER, E.F. AND 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.
- SAPIR, T.; ELBAUM, M.; REINER, O. Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetyl hydrolase subunit. **EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.**, v. 16, p. 6977-6984, 1997.
- SHARP, D.J.; BROWN, H.M.; KWON, M.; ROGERS, G.C.; HOLLAND, G.; SCHOLEY, J.M. Functional coordination of three mitotic motors in *Drosophila* embryos. **Mol. Biology of the cell.**, v.11, p.241-253, 2000.
- SHI, S.R.; COTE, R.J.; TAYLOR, C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present and future. **J. Histochem. Cytochem.**, v.45, p.327-43, 1997.
- SCHMIDT, H.H.H.W.; GAGNE, G.D.; NAKANE, M.; POLLOCK, J.S.; MILLER, M.; MURAD, F. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. **J. Histochem. Cytochem.**, v.40, p.1439-1456, 1992.
- SCHMIDT, H.H.H.W. AND WALTER, U. NO at Work. **Cell**, v.78, p.919-925, 1994.
- SELLERS, J. R. Myosins a diverse superfamily. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam,

v.1496, n.1, p.3-22, 2000.

- SMITH, D.S.; NIETHAMMER, M.; AYALA, R.; ZHOU, Y.; GAMBELLO, M.J.; WYNshaw-BORIS, A.; TSAI, L.H. Regulation of cytoplasmic dynein behavior and microtubule organization by mammalian LIS1. **Nat. Cell Biol.**, v.2, p.767-775, 2000.
- SOARES, T.J.; COIMBRA, T.M.; MARTINS, A.R.; PEREIRA, A.G.F.; CARNIO, E.C.; BRANCO, L.G.S.; ALBUQUERQUE-ARAUJO, W.I.C.; NUCCI, G. DE; FAVARETTO, A.L.V.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S.M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Atrial Natriuretic Peptide and Oxytocin Induce Natriuresis by Release of Cyclic GMP. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v.96, p.278-283, 1999.
- STAMLER, J.S. Redox Signaling: Nitrosylation and Related Target Interactions of Nitric Oxide. **Cell**, v.78, p.931-936, 1994.
- STEVENS, R.C. AND DAVIS, T.N. Mlc1p is a light chain for the unconventional myosin Myo2p in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Biol.**, v.142, p.711-722, 1998.
- TERADA, H.; NAGAI, T.; KIMURA, H.; KITAHAMA, K.; OKADA, S. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in fetal rat brains at embryonic day 15 and day 19. **J. Chemical Neuroanatomy**, v.10, p.273-278, 1996.
- TOCHIO, H.; OHKI, S.; ZHANG, Q.; LI, M.; ZHANG, M. Solution structure of a protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. **Nat. Struct. Biol.**, v.5, n.11, p.965-969, 1998.
- TOGASHI, H.; SASAKI, M.; FROHMAN, E.; TAIRA, E.; RATAN, R.R.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor κ B activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.94, p.2676-2680, 1997.
- TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**; 76: 4350-54, 1979.
- TRENKNER, E. AND SIDMAN, R.L. Histogenesis of mouse cerebellum in microwell cultures. Cell reaggregation and migration, fiber and synapse formation. **J Cell Biol.**, v.75, n.3, p.915-40, 1977.
- VALLEE, R.B. AND GEE, M.A. Make room for dynein. **Trends Cell Biol.**, v.8, p.490-494, 1998.

- VIZZARD, M.A.; ERDMAN, S.L.; FÖRSTERMANN, U.; DE GROAT, W.C. Ontogeny of nitric oxide synthase in the lumbosacral spinal cord of the neonatal rat. **Developmental Brain Research**, v.81, p.201-217, 1994.
- WELCH, K.M. Drug therapy of migraine. **N. Engl. J. Med.**, v.329, p.1476-1483, 1993.
- XIE, Q.W.; CHO, H.J.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R.A.; SWIDEREK, K.M.; LEE, T.D.; DING, A.; TROSO, T.; NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, v.256, p.225-228, 1982.
- 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. (USA)**, v.94, p.14111-14114, 1997.
- ZECEVIC, N. AND RAKIC, P. Differentiation of Purkinje cells and their relationship to other components of developing cerebellar cortex in man. **J. Comp. Neur.**, v.167, p.27-48, 1976.
- ZHAO, L.P.; KOSLOVSKY, J.S.; REINHARD, J.; BAHLER, M.; WITT, A.E.; PROVANCE JR., D.W.; MERCER, J.A. Cloning and characterization of myr6, an unconventional myosin of the dilute/myosin V family. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p.10826-10831, 1996.

SUMMARY

PIN is the protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (nNOS). PIN interacts physically with nNOS, inhibits it by destabilizing its dimer form, thus being able to regulate nNOS activity. PIN is a 10 kDa protein composed of 89 amino acid residues, which are highly conserved in nature. Human PIN has 100% amino acid sequence identity to the human dynein light chain (DLC). DLC appears to play a role in the modulation of the transcriptional activity of NF- κ B. Dynein is involved in several processes of intracellular motility, including mitosis, traffic of membranous vesicles, and others intracellular particles. The interaction of PIN/DLC with multiple proteins and its high evolutive conservation suggest that PIN can be an important regulator of various physiological processes. Nitric oxide (NO) acts as a nonconventional messenger in the vascular, immune and nervous systems. The model of human cerebellar corticogenesis is relatively well known and permits to correlate morphogenetic events with their molecular counterparts.

We observed that the immunohistochemical expression of PIN/DLC and nNOS in the human cerebellum is development-dependent. During ontogenesis, these molecules were detected in the nuclei and cytoplasm of cells in proliferative regions, such as the EGL and the ventricular zone. We show here for the first time the detection of PIN, DLC and nNOS in the nuclei and cytoplasm of cells with a migratory profile. Interneurons and Purkinje cells expressed PIN and DLC, mainly in the cellular nuclei, from the first time they were identified until age 98 years. Immunodetection of nNOS in the interneurons and Purkinje cells was observed mainly in the cytoplasm and dendritic arborization in all ages observed. Internal granular layer expressed PIN, DLC and nNOS through out the time range studied. PIN and DLC immunoreactivity were detected in ganglion cells of the dentate nucleus, mainly in the cellular nuclei, whereas anti-nNOS stained mainly the cytoplasm of these cells, throughout the time range studied. Our immunohistochemical data were further validated by the detection of PIN, DLC, DIC and nNOS in cerebella obtained from patients aged 6, 16, 23, 47, 68 and 82 years-old using *Western blotting*.

