



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Rodrigo Fabrizzio Inacio

Tratamento com taurina e interferon beta influencia a expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I) e a formação de sinapses em células PC12

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Rodrigo Fabrizzio Inacio e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues Oliveira

Campinas, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

In18t

Inacio, Rodrigo Fabrizzio

Tratamento com taurina e interferon beta influencia a expressão do complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC I) e a formação de sinapses em células PC12 / Rodrigo Fabrizzio Inacio. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Alexandre Leite Rodrigues Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glioma. 2. Sinapse. 3. Sistema nervoso. 4. Interferon beta. 5. Taurina. 6. Genes classe I do complexo de histocompatibilidade (MHC). I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Interferon beta and taurine treatment induce major histocompatibility complex class I (MHC I) upregulation and synapse plasticity in PC12 cells.

Palavras-chave em inglês: Gliome; Synapse; Nervous system; Interferon beta; Taurine; MHC class I genes.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Alexandre Leite Rodrigues Oliveira, Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, Marcus Alexandre Finzi Corat.

Data da defesa: 24/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 24 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues Oliveira (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Carla Beatriz Colares Buzato

Assinatura

Prof. Dr. Marcus Alexnadre Finzi Corat



Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes



Assinatura

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar sempre comigo e me abençoar nos momentos felizes e difíceis do dia a dia.

Agradeço ao Professor Alexandre Leite Rodrigues Oliveira, um excelente amigo e orientador. Agradeço por ter me aceitado e estar sempre ao meu lado para tudo, mesmo gastando um pouco de anticorpo a mais rs.

Agradeço minha família, em especial a minha super Mãe e Pai, e a super tia Marice por me apoiarem e ajudarem sempre. A minha avó com seus conselhos e histórias (profunda experiência de vida).

Agradeço a minha irmã Isley e meu cunhado Jamil, por sempre ajudarem e ainda trazer a luz a 2 lindos filhos, meus sobrinhos, Ana Luiza e Pedro Henrique.

Agradeço minha namorada e futura noiva Daiana Bernardi, que sempre esteve comigo e acompanhando os acontecimentos (te amo).

Aos grandes “figuras” do Laboratório (Gustavo, Matheus, Boni, Rafel Senzi, Gabriel). Aos amigos e amigas do laboratório de Regeneração Nervosa (Camila, Sheila, Roberta, Luciana, Suzana, Gleidy, Guilherme, Bianca, Rafaela, Renata, Gabriela).

Aos técnicos do laboratório, Macos Aurélio, Nori, pelos auxílios em todas as necessidades dos laboratórios. Dona Marlene, Paulo Bernardes, Toni, Paulo por estarem sempre à disposição para nos ajudar.

Ao time de futebol da anatomia, campeão da taça confluência dos seios. Nunca mais jogamos, mas se jogar a gente ganha.

A coordenação de Pós-graduação, em especial a Lílian pela atenção prestada e os cuidados com os documentos exigidos ao longo do Curso.

Aos amigos dos outros laboratórios Rafael Burgos, Luiz Henrique, Juliano, Renato.

A Profa Liana Verinaud, que colaborou para realização do trabalho e pela atenção prestada.

A Profa. Maria Júlia, Profa. Valéria, Profa. Elaine, Profa. Evanisi e, em especial, ao Prof. Humberto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp.

"A paciência serve de proteção contra injustiças como as roupas contra o frio. Se você veste mais roupas com o aumento do frio, este não terá nenhum poder para feri-lo. De forma idêntica você deve crescer em paciência quando se encontra em grandes dificuldades e elas serão impotentes para atormentar a sua mente."
(Leonardo da Vinci)

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	viii
Lista de figures	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1. Introdução	1
1.1. Comunicação neurônio-glia	1
1.2. MHC classe I e plasticidade sináptica	6
1.3. Interferon beta: indução da expressão de MHC classe I	9
1.4. Linhagens celulares: PC12 e NG97	11
1.5. Taurina e efeito neuroprotetor	13
1.6.	
2. Justificativa	16
3. Objetivos	17
4. Matérias e métodos	18
4.1. Células PC12	18
4.2. Células NG97	19
4.3. Procedimentos nas culturas isoladas	19
4.4. Avaliação da influência do meio condicionado glial sobre as células PC12	20
4.5. Imunocitoquímica	21
4.6. Western Blotting	21
4.7. Análise estatística	23
5. Resultados	23
5.1. Células NG97 são GFAP positivas	23
5.2. Tratamento com NGF induz a diferenciação de células PC12 e formação de neuritos	26
5.3. Tratamento com IFN beta influência a expressão de MHC classe I em células PC12	34
5.4. Tratamento com taurina diminui a expressão de MHC classe I e influência positivamente na densidade sináptica	41
5.5. A utilização de meio condicionado de células NG97 intensifica a expressão de MHC classe I e influência na distribuição de sinaptofisina	48
6. Discussão	70
7. Conclusões	81
8. Referências Bibliográficas	82

LISTA DE ABREVIATURAS:

- BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor* (Fator neurotrófico derivado do cérebro)
- EGF – *Epidermal growth factor* (Fator de crescimento epidermal)
- FGF – *Fibroblast growth factor* (fator de crescimento de fibroblastos)
- GDNF - *Glial cell-derived neurotrophic factor* (fator neurotrófico derivado de glia)
- GFAP - *Glial fibrillary acidic protein* (proteína ácida fibrilar glial)
- IFN - Interferon
- IGF-BP6 –*Insulin-like growth factor-binding protein 6* (proteína de ligação 6-Fator de crescimento similar à insulina)
- IL – *Interleukin* (Interleucina)
- LTP - *long-term potentiation* (Potencial de longa duração)
- LTD – *long-term depression* (Depressão de longa duração)
- MC – Meio condicionado
- MEC - Matrix extracelular
- MHC I - *Major Histocompatibility Complex of class I*(Complexo de histocompatibility principal de classe I)
- MN – Meio normal
- NGF - *Nerve growth factor* (Fator de crescimento neural)
- NSE – *Neuron-specific enolase* (Enolase específica de Neurônio)
- NT – *Neurotrophin* (Neurotrofina)
- PDGF - *Platelet-derived growth factor* (Fator de crescimento derivado de Plaquetas)
- SNC - Sistema nervoso central
- SNP - Sistema nervoso periférico
- TGF- β - *Transforming growth factor-beta* (Fator de crescimento transformante-beta)
- TNF - *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)
- TrkA - *tyrosine kinase receptor type A* (Receptor tirosino quinase tipo A)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Expressão de GFAP por células NG97.....	24
Figura 2: Expressão de sinaptofisina por células PC12 após tratamento com NGF.....	27
Figura 3: Curva de adesão de células PC12	30
Figura 4: Perfil de crescimento para PC12.....	32
Figura 5: Culturas de células PC12 imunomarcadas com OX-18 e sinaptofisina após tratamento com IFN beta	35
Figura 6: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcação para MHC I após tratamento com IFN beta	37
Figura 7: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcação para sinaptofisina após tratamento com IFN beta	39
Figura 8: Culturas de células PC12 imunomarcadas com OX-18 e sinaptofisina após tratamento com taurina	42
Figura 9: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcação para MHC I após tratamento com taurina	44
Figura 10: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcação para sinaptofisina após tratamento com taurina	46
Figura 11: Culturas de células PC12 imunomarcadas com OX-18 e sinaptofisina após tratamento com meio condicionado + IFN beta	49
Figura 12: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcação para MHC I após tratamento com meio condicionado + IFN beta	51
Figura 13: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcação para MHC I após tratamento com meio condicionado e com meio normal + IFN beta	53
Figura 14: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcação para sinaptofisina após tratamento com meio condicionado + IFN beta	55
Figura 15: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcação para sinaptofisina após tratamento com meio condicionado e com meio normal + IFN beta	57
Figura 16: Culturas de células PC12 imunomarcadas com OX-18 e sinaptofisina após tratamento com meio condicionado + taurina	60
Figura 17: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcação para MHC I após tratamento com meio condicionado + taurina	62
Figura 18: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcação para MHC I após tratamento com meio condicionado e com meio normal + taurina	64
Figura 19: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcação para sinaptofisina após tratamento com meio condicionado + taurina	66
Figura 20: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcação para sinaptofisina após tratamento com meio condicionado e com meio normal + taurina	68

Resumo

Foi demonstrado que a regulação positiva do MHC I por tratamento exógeno com interferon beta (IFN beta) influencia no processo de eliminação das sinapses. Também, o aminoácido taurina mostrou ter influencia positiva na sobrevivência e plasticidade neuronal. No entanto, o estabelecimento de um modelo *in vitro* para estudo do processo de formação/eliminação sináptica e sua relação com a expressão de MHC I ainda não foi proposto. Portanto, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos do tratamento com IFN e taurina, sozinhos ou diluídos em meio glial (derivado do glioma NG97), na expressão de MHC classe I e na formação de sinapses em células PC12. Células PC12 foram tratadas com NGF para indução do fenótipo semelhante a neurônio e as culturas estabelecidas foram submetidas ao tratamento com IFN beta (500 e 1000 IU) e taurina (0.025 and 0.050mg/mL) por 15 dias em meio normal e por 10 dias em meio condicionado. Finalizado o período de cultivo, as células foram fixadas e processadas para imunocitoquímica com anticorpos anti-MHC I (OX18) e anti-sinaptofisina. A imunomarcagem foi mensurada com o software Image J. Nesse contexto, quatro campos representativos foram usados, a partir de cada poço de cultivo. Os resultados mostraram que o IFNbeta (500UI) e a taurina (0.025 mg) modulam a expressão de MHC em células PC12, especialmente após 10 dias de tratamento. IFN e taurina apresentaram efeitos opostos, sendo que o IFN induz o aumento do MHC I, enquanto a taurina causa sua diminuição. Em ambos os casos, o aumento das doses causa degeneração da cultura. Interessantemente, a regulação diferencial do MHC I ocorreu paralelamente a um aumento ou diminuição da plasticidade sináptica, respectivamente. O uso do meio condicionado de NG97, juntamente com IFNbeta ou taurina, leva a uma diminuição da estabilidade sináptica. De uma maneira geral, os presentes dados indicam que as células PC12 podem ser usadas como modelo *in vitro* para estudos de modulação de MHC I e plasticidade sináptica. Também, reforçam o papel do IFNbeta na eliminação sináptica e indicam que a taurina é capaz de aumentar a formação da rede sináptica.

Abstract

It has been demonstrated that MHC I up regulation by exogenous treatment with interferon beta (IFN beta) influences the glial reaction and the synaptic elimination process. Also, the amino acid taurine has been shown to positively influence neuronal survival and plasticity. Nevertheless, the establishment of an *in vitro* model for studying the synaptic formation/elimination process and its relationship with MHC I expression has not yet been proposed. Therefore, the present study aimed to investigate the effects of the IFN beta and taurine treatments, alone or diluted in glial medium (derived from the NG97 gliome), on the expression of MHC I and synaptic formation in PC12 cells. Established cultures were subjected to the IFN beta (500 and 1000 IU) and taurine treatments (0.025 and 0.050mg/ml) for 5 and 10 days. Finally the cells were fixed and processed for immuno-cytochemistry with antisera against MHC I (OX18) and synaptophysin. The results were compared with control cultures only treated with basal or conditioned medium. The results showed that IFNbeta (500 IU) and taurine (0.025 mg) modulated the MHC I expression in PC12 cells, especially after 10 days of treatment. IFN and taurine displayed opposite effects, such that IFN induced MHC I up regulation, while taurine induced down regulation. In both cases, the highest doses caused culture degeneration. Interestingly, the differential regulation of MHC I was paralleled by enhancement or a decrease in synaptic plasticity, respectively. The use of the NG97 conditioned medium together with IFNbeta or taurine led to a decrease in synaptic stability. Altogether, the present data indicate that PC12 cells may be used as an *in vitro* model for studying MHC I modulation and synaptic plasticity. It also reinforced the role of IFNbeta on synaptic elimination and indicated that taurine was able to increase the synaptic network formation.

1. Introdução

1.1. Comunicação neurônio-glia

O Sistema Nervoso, anatomicamente, é dividido em uma porção central (Sistema Nervoso Central – SNC), que se subdivide em duas partes: segmentar, representado pela medula espinal, e supra-segmentar, onde se encontra o encéfalo e uma porção periférica (Sistema Nervoso Periférico – SNP, representado por gânglios e nervos). O Sistema Nervoso desempenha diversas funções que envolvem o processamento de informações sensoriais, o controle motor, a mediação de respostas autonômicas, a elaboração de respostas emocionais, a aprendizagem e a memória. A composição do tecido nervoso é dada por diferentes tipos de células, como os neurônios, a macroglia (astrócitos e oligodendrócitos), a microglia, os macrófagos perivasculares, que são as primeiras células a apresentarem uma resposta imune no SNC, as células endoteliais, as células ependimárias, que forram os ventrículos cerebrais e as células que formam os envoltórios do Sistema Nervoso, as meninges (Machado, 1998; Kandel *et al.*, 2000).

Os neurônios são células especializadas na condução do impulso nervoso e constituem a unidade fundamental do SNC. A célula, como um todo, apresenta contatos com terminais ou botões sinápticos de outros neurônios, formando as sinapses (Kandel *et al.*, 2000).

As células gliais participam ativamente do desenvolvimento e funcionamento do SNC (He & Sun, 2007). Os astrócitos são o tipo mais abundante

de célula glial e caracterizam-se por possuir inúmeros prolongamentos citoplasmáticos, podendo ter um núcleo esférico ou ovóide. Reconhecem-se dois tipos de astrócitos: os fibrosos, que são encontrados na substância branca; e os protoplasmáticos, localizados somente na substância cinzenta. Os prolongamentos dos astrocitários protoplasmáticos relacionam-se intimamente com os corpos dos neurônios e, de maneira especial, envolvem as sinapses (Aldskogius *et al.*, 1999; Kandel *et al.*, 2000). Os astrócitos estão relacionados com o metabolismo do sistema nervoso, contribuindo ativamente para retirar as substâncias potencialmente tóxicas do microambiente neuronal e homeostasia (Tardy, 1991).

As células gliais foram consideradas por um grande período de tempo como agentes passivos do SN. Porém, na atualidade considera-se que neurônios e células gliais têm uma íntima relação de plasticidade morfológica e funcional, que demonstra uma influência mútua entre estes dois tipos celulares (Haydon, 2000). Os prolongamentos dos astrócitos relacionam-se intimamente com os corpos dos neurônios sendo estes particularmente abundantes ao redor das terminações nervosas (Wolff, 1970, Spacek, 1985), onde formam processos peri-sinápticos (Derouiche & Frotsher, 2001). Os processos astrocitários têm a capacidade de alterarem rapidamente seu volume, regulando desta forma, o ambiente ao redor das sinapses (Hanson, 1994; Hanson & Rönnbäck, 1995), bem como limitando a difusão de íons e neurotransmissores (Vandenbranden *et al.*, 1996; Vernadakis, 1996; Rusakov & Kullmann, 1998; Chvatal & Sykova, 2000; Verkhratsky & Steinhäuser, 2000). Conclui-se, portanto, que existem evidências que as projeções

astrocitárias sejam de grande importância na modulação da excitabilidade neuronal e, conseqüentemente, na transmissão sináptica (Kang *et al.*, 1998; Groshe *et al.*, 1999; Araque & Perea, 2004).

Foram descritos vários efeitos relacionados à modulação da fisiologia sináptica por meio da capacidade do astrócito em regular o meio iônico extracelular e metabolizar neurotransmissores. Estas células respondem a neurotransmissores liberados em terminais sinápticos ativos sob o controle dinâmico da atividade neuronal. Em resposta a esta atividade neuronal, os astrócitos podem, por meio de oscilações nos níveis citosólicos de cálcio, enviar retroativamente ao neurônio estímulos para liberação de vários neurotransmissores, como por exemplo, o neurotransmissor excitatório glutamato. O glutamato despolariza o astrócito, o que induz um aumento nos níveis de cálcio intracelular que, por sua vez, induz a liberação de neurotransmissores pelos neurônios (Laming *et al.*, 2000). Além desse efeito neuromodulatório e do provimento de substratos glutamatérgicos para os neurônios, as funções gliais decorrentes da integração com o neurônio incluem a regulação neuronal dos níveis extracelulares de potássio. Esta regulação está associada à atividade sensorial, ao aprendizado e aos estados motivacionais (Sykova *et al.*, 1990). A glia também é responsável por modular diretamente a neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica, via receptores pós-sinápticos gliais (Griffith & Sutin, 1996; Rajkowska, 2000). Nos astrócitos de ratos, a glicogenólise e o metabolismo oxidativo são ativados pela noradrenalina (Aoke & Pickel, 1992),

enquanto que a despolarização astrocítica é induzida pela serotonina (Walz & Schlue, 1982).

Acredita-se que precursores neuronais possam proliferar somente em um microambiente restrito ou em presença de determinados tipos celulares, como os astrócitos. Os astrócitos produzem diversos tipos de sinais celulares permissivos, tanto solúveis como associados à membrana, os quais propiciam um microambiente neurogênico para os precursores neuronais (Lim & Alvarez-Buylla, 1999; Song *et al.*, 2002; Lie *et al.*, 2005).

Os astrócitos podem se comunicar entre si ou com neurônios adjacentes pelo contato célula-célula mediado por moléculas que constituem sua matriz extracelular (MEC) como a laminina, a fibronectina e os proteoglicanos. Lim & Alvarez-Buylla (1999) demonstraram, *in vitro*, que o íntimo contato com astrócitos propicia um suporte à proliferação de precursores neuronais, assim como a sua diferenciação em neuroblastos, inclusive no SN adulto.

Além da comunicação célula-célula, ocorre também uma comunicação via difusão de moléculas no espaço extracelular. Vários fatores neurotróficos expressos e secretados por essas células têm sido identificados (Barkho *et al.*, 2006). Dentre os fatores neurotróficos, os astrócitos são conhecidos por secretar fatores de crescimento, citocinas e mitógenos como o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformante β (TGF- β), fator de crescimento neural (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), as interleucinas (IL) 1 β e 6, proteína 6 de ligação ao fator de crescimento do tipo

insulina (IGF-BP6), decorina, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e neurotrofina 3 (NT-3) (Taylor *et al.*, 2007; Barkho *et al.*, 2006, Gomes *et al.* 2001). Além disso, trabalhos apontam que os astrócitos são importantes reguladores da neurogênese (Ma *et al.*, 2005; Airaksinem & Saarma, 2002) por secretarem FGF, EGF, TNF e IL-3 (Gomes *et al.*, 2001). Pesquisas demonstraram que fatores secretados por astrócitos cerebelares modulam a proliferação e diferenciação de neurônios nessa porção do SNC (Gomes *et al.*, 1999a; Martinez & Gomes, 2002).

Dessa forma, vários estudos têm demonstrado o papel dos fatores solúveis liberados pelos astrócitos na neurogênese, porém pouco se sabe sobre o impacto destes fatores na plasticidade sináptica, uma vez que o destacamento seletivo das sinapses se dá principalmente através do envolvimento do corpo neuronal pelos prolongamentos citoplasmáticos astrocitários. Um estudo sobre plasticidade na dominância ocular sugere que os astrócitos são capazes de liberar moléculas neuroativas e assim ter um potencial de não ser somente “apoio”, mas também ser sinalizadoras no SN (Fellin, 2009). O meio condicionado astroglial influencia o desenvolvimento e a maturação de culturas de células nervosas e podem modular eventos bioquímicos, funcionais e morfológicos ligados à interação neurônio-glia (Sensenbrenner *et al.*, 1980; Aloisi *et al.*, 1987). Estes fatores podem ser interpretados de duas formas, de acordo com o mecanismo de ação: um fator autócrino com auto-produção e estimulação, e um fator parácrino com a estimulação de células adjacentes, através do espaço extracelular. No SNC, estes fatores tróficos produzidos pelas células gliais são responsáveis por regular

o crescimento e diferenciação e também dar o suporte funcional ao sistema nervoso (Ito *et al.*, 1989).

1.2. MHC classe I e Plasticidade Sináptica

Cada sinapse funciona independentemente e apresenta um padrão de atividade dinâmico, onde suas propriedades podem modificar ao longo do tempo, em resposta a estímulos do ambiente e mediante experiência. A essas adaptações damos o nome de plasticidade sináptica. Vários tipos de plasticidade sináptica ocorrem no Sistema Nervoso, dentre eles o potencial de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD), que são fenômenos caracterizados por aumento ou redução na eficácia da comunicação sináptica, respectivamente e são os principais correlatos moleculares dos processos de aprendizagem e memória (Bliss, 1993). A eliminação ou retração sináptica após uma lesão nervosa também podem ser consideradas como uma forma de resposta plástica do SNC. Dessa forma pode-se observar, após axotomia periférica, o destacamento de terminais pré-sinápticos em relação ao corpo neuronal e dendritos dos neurônios comprometidos (Oliveira *et al.*, 2004). Adicionalmente, fazem parte do termo plasticidade nervosa, as modificações ocorridas na glia. Denomina-se astrogliose o conjunto de alterações morfofuncionais apresentado pelos astrócitos e microgliose, o conjunto de alterações apresentado pela micróglia. Ambos incluem hipertrofia e hiperplasia celular e aumento de produção de diversos fatores que contribuem para o processo inflamatório e regenerativo (Aldskogius *et al.* 1999).

O processo de plasticidade neuronal está estreitamente relacionado às alterações morfofuncionais que ocorrem nas células gliais. Os astrócitos constituem a maior parte da glia e, por meio de suas amplas funções e da relativa motilidade de suas projeções citoplasmáticas, representam elementos fundamentais na plasticidade sináptica após uma lesão nervosa (Aldskogius & Svensson, 1999). Essas projeções respondem com rápidas alterações estruturais (Derouiche & Frotsher, 2001), interpondo-se entre a membrana do neurônio motor comprometido por uma lesão e seus terminais sinápticos retraídos (Aldskogius & Svensson, 1999 e Brännström & Kellerth, 1998).

A plasticidade sináptica está presente na homeostase, no desenvolvimento e em resposta à lesão do SN. Contudo, os mecanismos que orientam a intensidade e especificidade deste fenômeno são virtualmente desconhecidos. Acredita-se que a estabilização e a manutenção dos circuitos neuronais do SNC seja um complexo conjunto de processos (Huh *et al.*, 2000; Boulanger *et al.*, 2001). Dentre eles, a manutenção dessas conexões depende da correta atividade neural, que contribui para estabilizar ou eliminar sinapses. Este refinamento foi observado no sistema visual de gatos, no núcleo geniculado lateral, durante o início do desenvolvimento e em fases mais tardias. Diante disso, no SNC, podemos dizer que existe a ocorrência do remodelamento estrutural e de plasticidade sináptica (Huh *et al.*, 2000), regidos por mecanismos ainda pouco conhecidos. Huh *et al.* (2000) mostraram a importância da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC classe I) durante o processo de refinamento sináptico do Sistema Visual. Dessa forma,

animais que não expressam tal molécula, apresentam falhas no processo de refinamento durante o desenvolvimento do sistema visual, resultando na ocorrência de sinapses extra-numerárias.

Oliveira *et al.* (2004) propuseram o papel do MHC I na manutenção seletiva de conexões sinápticas após uma lesão nervosa periférica no adulto. A diferença do nível de expressão de MHC classe I entre distintas linhagens de camundongos parece influenciar a intensidade de astrogliose subsequente à lesão. Nesse contexto, animais que apresentam maior expressão de MHC classe I mostram proporcionalmente uma astrogliose mais intensa (Emirandetti *et al.*, 2006) e maior plasticidade sináptica.

Camundongos C57BL6/J tratados com interferon-1 beta, uma citocina capaz de induzir o aumento da expressão de MHC classe I, mostram, após axotomia, uma maior intensidade da ativação astrocitária juntamente com uma diminuição das conexões sinápticas em relação aos motoneurônios medulares (Zanon & Oliveira, 2006). Esta perda sináptica aumentada logo após a lesão resultou em melhor regeneração periférica e recuperação funcional (Zanon *et al.*, 2010).

No SNC adulto normal, a expressão de MHC I é variável, sendo normalmente bastante baixa (Williams *et al.*, 1980; Lindå *et al.*, 1998). Todavia, genes de MHC I são induzíveis em células gliais e neurônios durante infecções virais, inflamação, tumores (Tran *et al.*, 1998) e exposição a citocinas, como o interferon- β (Zanon *et al.*, 2006). Esses achados foram inesperados, uma vez que se acreditava que neurônios fossem incapazes de expressar significativas

quantidades de MHC I, sendo considerados, assim, “imunoprevilegiados”, pois, em princípio, estariam protegidos contra reações citotóxicas das células T.

1.3. Interferon beta: indução da expressão de MHC classe I

Os interferons (IFNs) são uma família de citocinas pró-inflamatórias geralmente produzidas em resposta a infecções virais e podem ser classificados em tipo I e tipo II. Os IFNs do tipo I incluem os IFNs monoméricos α , β , τ e ω , enquanto o IFN do tipo II, dimérico, corresponde ao IFN γ . O IFN alfa apresenta 12 subtipos que são codificados por 14 genes, enquanto todos os outros IFNs são monogênicos (Davidson & Colledge, 2000). Os IFNs têm papel imunomodulatório, aumentando a expressão de algumas proteínas e moléculas (Jiang *et al.*, 1995). Apresenta-se como uma proteína globular contendo 166 aminoácidos constituindo cinco alfa hélices, produzidas por um único gene localizado no cromossomo 9 humano. Sua resposta celular é mediada por um receptor específico, compartilhado com o IFN alfa. A síntese de IFN beta é induzida por vírus, ácido nucléico viral, bactérias, micoplasma e protozoários (Arnason, 1996).

O interferon beta (IFN beta) é largamente utilizado na prática clínica por aumentar a expressão de moléculas MHC I e estas, por sua vez, apresentam importante papel nos processos de plasticidade e regeneração numa situação pós-lesional.

O aumento da expressão de MHC I pelo IFN beta em células nervosas foi descrito anteriormente (Jiang *et al.*, 1995). Neste sentido, observou-se o aumento da expressão dos genes para MHC I até mesmo em células embrionárias e

neurônios que normalmente expressam baixos níveis dessa molécula (Jiang *et al.*, 1995). Uma seqüência de pares de base comum aos tipos de IFNs (*interferon consensus sequence* – ICS) parece ser responsável pela elevação da transcrição dos genes MHC I (Shirayoshi *et al.*, 1988).

O IFN beta, sob uma forma recombinante não glicosilada, tem sido utilizado desde 1993 para o tratamento da Esclerose Múltipla, uma doença neurodegenerativa autoimune (Bermel & Rudick, 2007), devido ao seu papel imunomodulatório.

Após uma lesão periférica, em camundongos tratados com IFN beta, observa-se um significativo aumento da expressão do MHC I o que correlaciona, em nível ultra-estrutural, com uma intensa retração dos terminais pré-sinápticos em contato com motoneurônios alfa (Zanon *et al.*, 2006). Nesta situação, o MHC I desempenha um papel fundamental na estabilização seletiva das sinapses inibitórias, contribuindo para que o processo de retração sináptica ocorra de forma específica o que sugere a relação entre MHC I e eventos de plasticidade sináptica logo após a lesão. Desta forma, qualquer mudança significativa dos *inputs* de um neurônio, especialmente daqueles presentes no corpo e dendritos proximais, acarreta importantes alterações sobre suas funções e metabolismo. Tais alterações são freqüentemente acompanhadas por reatividade da glia circunjacente, tendo impacto direto sobre a atividade neuronal e na transmissão sináptica (Theodosis *et al.*, 2006). Dessa forma, os neurônios concentram seu metabolismo na regeneração axonal, uma vez que ocorre uma redução significativa de terminais pré-sinápticos.

O aumento do MHC I após uma lesão e o tratamento com IFN interfere no nível de reatividade dos astrócitos alterando o processo de plasticidade sináptica. Sabe-se que não só a interação astrócito-neurônio interfere na plasticidade sináptica, mas também fatores solúveis produzidos pela glia. O meio condicionado astroglial influencia o desenvolvimento e a maturação de culturas de células nervosas e podem modular eventos bioquímicos, funcionais e morfológicos ligados à interação neurônio-glia (Sensenbrenner *et al.*, 1980; Aloisi *et al.*, 1987). Estes fatores podem ser interpretados de duas formas, de acordo com o mecanismo de ação: um fator autócrino com auto-produção e estimulação, e um fator parácrino com a estimulação de células adjacentes, através do espaço extracelular. No SNC, estes fatores tróficos produzidos pelas células gliais são responsáveis por regular o crescimento e diferenciação e também dar o suporte funcional ao sistema nervoso (Ito *et al.*, 1989).

1.4. Linhagens celulares: PC12 e NG97

A obtenção de um melhor entendimento da biologia dos neurônios e células gliais pode ser auxiliada pela realização de experimentos *in vitro*, em condições especialmente controladas e sem a influência de diferentes fatores. Assim, modelos de cultura de células neuronais e gliais foram propostos e estabelecidos.

A linhagem celular de Feocrocitoma de rato (PC12) tem servido de modelo para examinar os mecanismos de ação dos fatores neurais de crescimento (Greene & Tischler, 1982; Halegoua *et al.*, 1991). Quando tratadas com fator de crescimento neural (NGF), estas células desenvolvem um fenótipo neuronal apresentando neuritos, potencial de ação de repouso e expressão de genes

específicos neurais, fazem sinapses e estabelecem complexos circuitos neuronais (Halegoua *et al.*, 1991).

O NGF foi a primeira neurotrofina descoberta (Cohen & Levi-Montalcini, 1956). Atualmente já é sabido que a indução de diferenciação neuronal pelo NGF em células PC12 deve-se a sua capacidade de ligar a receptores tirosino-quinase tipo A (TrkA), os quais iniciam uma série de eventos em cascata, que culminam com crescimento e diferenciação neuronal (Xiao *et al.*, 2006; Gsandtner & Freissmuth, 2006).

As vias de sinalização ativadas pelas neurotrofinas através dos receptores Trk induzem diferentes respostas, tais como diferenciação e sobrevivência celular bem como o crescimento axonal, a plasticidade e a formação de sinapses (Arevalo & Wu, 2006).

A linhagem celular de glioma humano NG97, foi estabelecida por Grippo *et al.* (2001), a partir de tecidos obtidos provenientes de astrocitoma de grau III (Who, 2000). As células NG97 expressam principalmente marcadores neurogliais (GFAP, proteínas S-100, NSE e LEU-7) e não apresentam expressão de outros marcadores imunistoquímico (Schenka *et al.* 2005). Quando transplantadas em camundongos imunossuprimidos, formam uma massa celular, sendo sua morfologia semelhante à astrócitos, mostrando áreas de necrose e de angiogênese (Kleihues *et al.*, 2000; Grippo *et al.*, 2001). Por se tratar de uma linhagem homogênea, possui um padrão morfológico e bioquímico constante que remete ao fenótipo astrogliial (Schenka *et al.* 2005).

A linhagem de células NG97, *in vitro*, apresenta tempo de duplicação médio de 24h e morfotipias distintas quando vistas em microscópio. Cada morfotipia da linhagem apresentava padrões morfológicos diferentes na membrana celular, tais como: bolhas e filopódios nas células de formato arredondado, extensos prolongamentos e vesículas de secreção nas células do tipo dendrítica gigantes e microvilosidades nas células do tipo fusiforme (MACHADO *et al.* 2005).

1.5. Taurina e efeito neuroprotetor

A taurina é um β -aminoácido (ácido 2-aminoetanosulfônico) não utilizado para a síntese protéica, encontrado no interior das células e em altas concentrações no plasma de mamíferos. Esse aminoácido é obtido através da ingestão de carne, peixe e leite, sendo possível também ser biossintetizado a partir de metionina e cisteína. Tem importância nos processos biológicos tais como no desenvolvimento do Sistema Nervoso e da retina, na modulação do Ca^{2+} , na estabilização de membranas, reprodução, imunidade e pode também funcionar como um osmólito para regular o volume celular (Schuller-levis & Park, 2003; Aerts & Van Assche, 2002). Seu papel fisiológico recebeu atenção considerável a partir de estudos realizados em gatos, onde sua deficiência nutricional ocasionou degeneração da retina (Hayes, 1975). Relatos indicam que o mecanismo de ação da taurina possa ocorrer pela combinação do aminoácido com vários tipos de canais iônicos, transportadores e enzimas. Pesquisas demonstraram que a taurina exerce algumas de suas ações inibindo canais KATP (potássio dependentes de ATP) no músculo esquelético (Tricarico *et al.*, 2000) e em fibras cardíacas (Satoh,

1996). Além disso, exerce uma ação agonista nas células miocárdicas para entrada de Ca^{2+} e da corrente retificadora de K^+ em baixas concentrações intracelulares de cálcio, bem como um antagonista inibindo o influxo de Ca^{2+} e a corrente retificadora de K^+ em elevadas concentrações de Ca^{2+} (Satoh, 1998).

No cérebro em desenvolvimento, as concentrações são mais altas de taurina, na época em que a concentração de outros aminoácidos livres tende a ser baixa. Com o desenvolvimento, as concentrações de taurina tendem a diminuir, de forma que seu volume nos neonatos é cerca de dois terços mais altos quando comparado com os níveis no adulto, sendo esse padrão encontrado em várias espécies (Huxtable, 1992). O conteúdo de taurina no cérebro fetal é mais que o dobro que o de um adulto (Sturman & Hayes, 1980), mas é único aminoácido do cérebro cuja concentração diminui com o desenvolvimento pós-natal (Sturman & Gaull, 1975).

A taurina é encontrada tanto nas células da glia como neuronais (Oja & Kontro, 1983), contudo a sua distribuição no SNC não é uniforme. Ao contrário do conteúdo de taurina na maioria dos outros órgãos, os níveis de taurina no SN são preservados em estados de deficiência orgânica (Sturman & Gaull, 1975).

Apesar de seus mecanismos de ação serem desconhecidos, acredita-se que níveis altos de taurina são considerados essenciais para as suas supostas funções. Essas funções incluem osmorregulação (Solis *et al.*, 1988; Nagelhus *et al.* 1993; Pasantés-Morales *et al.*, 2000) estabilização da membrana (Wright *et al.*, 1986) neuroproteção contra excitotoxicidade (Huxtable, 1989; Trenkner, 1990; El Idrissi & Trenkner, 1999), neuromodulação (Muramatsu *et al.*, 1978; Dopico *et al.*

2006) e modulação dos níveis celulares de cálcio (Hendil & Hoffmann, 1974; Izumi *et al.*, 1977; Wade *et al.*, 1988; Huxtable, 1992; Palmi *et al.*, 1999; El Idrissi & Trenkner, 2003).

No SN, suas funções estão relacionadas à regulação da atividade celular, desenvolvimento, modulação da excitabilidade neuronal, manutenção da função cerebelar e modulação da liberação hormonal (Oja & Kontro, 1983). A taurina desempenha também um papel osmorregulador protegendo o SN contra a toxicidade dos íons de cálcio (Lehman *et al.*, 1984).

Além disso, a taurina pode melhorar sintomas epiléticos (Lehmann *et al.*, 1985; Francês *et al.*, 1986; Schurr *et al.* 1987; Wu *et al.*, 1994; Birdsall, 1998; Wu *et al.* 2005, Gupta *et al.* 2005) e suas propriedades anticonvulsivantes recentemente foram descritas em um modelo murino de epilepsia (Junyent *et al.*, 2009). A entrada de cálcio nos neurônios é fortemente associada com convulsões (Meyer, 1989; Speckmann *et al.*, 1989; McNamara, 1992). O influxo de cálcio induz a excitotoxicidade, levando a alterações da mitocôndria e conseqüente morte celular (Cano-Abad *et al.*, 2001). Muitas proteínas unem-se ao cálcio, sendo fundamentais para a homeostase do Ca^{2+} nos neurônios. Dentre elas se destacam a calbindina D28k, calretinina e parvalbumina (Rogers & Resibois, 1992; Hontanilla *et al.*, 1998).

2. Justificativa

O entendimento da interação entre neurônios e células gliais bem como da influência da glia sobre a resposta neuronal vem sendo obtido através de diferentes modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. *In vitro*, é possível testar diferentes moléculas e substâncias, as quais podem interferir no comportamento de cada tipo celular, alterando respostas ao nível molecular e morfológico. Contudo, a manutenção desses sistemas *in vitro* é bastante difícil e a utilização de culturas primárias necessita do sacrifício de embriões e animais neonatos, levantando aspectos éticos, bem como diversas dificuldades técnicas. A possibilidade de se estabelecer um modelo de co-cultivo empregando linhagens celulares poderá potencialmente, em diversas situações, substituir o uso de culturas primárias. Acreditamos, portanto, que os resultados do presente estudo contribuirão para o estabelecimento de um sistema para o estudo da interação neurônio/glial, bem como possibilitará o melhor entendimento do papel da taurina e do IFN na plasticidade sináptica.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Estabelecer um modelo experimental *in vitro*, utilizando a linhagem PC12 em sistema de co-cultura com meio condicionado das células gliais da linhagem NG97 (glioma humano).

3.2. Objetivos específicos

1. Através da análise morfológica e imunocitoquímica, avaliar a diferenciação neuronal e sinaptogênese nas células PC12, com e sem tratamento com taurina e IFN.
2. Avaliar a expressão de MHC I e sinaptofisina após o tratamento com taurina e IFN, buscando um melhor entendimento das vias de interação entre as linhagens celulares estudadas.
3. Avaliar a expressão de MHC I e sinaptofisina após o tratamento com taurina e IFN após a influência de fatores solúveis secretados pelas linhagem NG97.

4. Materiais e Métodos

4.1. Células PC12

As células PC12 foram provenientes da ATCC (*American Type Culture and Collection*), cuja identificação é CRL-1721™ e foram fornecidas pelo Departamento de Química da Universidade de São Paulo (USP- Ribeirão Preto). As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, em garrafas com superfície de 75 cm², com pescoço inclinado e tampa com filtro (TPP™, EUA), contendo 20 mL do meio DMEM com vermelho de fenol, sendo acrescentados 2,5g/mL de glicose (Cultilab®, Brasil), 10% de soro fetal equino inativado (Nutricell®, Brasil), 5% de soro bovino inativado (Nutricell®, Brasil), penicilina 10.000 UI/mL e estreptomicina 10 mg/mL (Nutricell®, Brasil). Para os repiques periódicos, a cada 72 horas aproximadamente, aspirou-se todo o meio da garrafa e adicionou-se 10 mL de novo meio suplementado. Com o auxílio de um *cell scraper* (TPP™, EUA) as células foram destacadas e transferidas para novas garrafas contendo meio DMEM suplementado como descrito acima. Para manutenção da linhagem celular, 7x10⁵ células/mL foram semeadas por repique/garrafa. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar com desinfecção prévia dos materiais e bancada de trabalho por luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos e álcool 70%.

4.2. Células NG97

A linhagem NG97 foi obtida a partir de um astrocitoma neoplásico (grau III - OMS) de lobo temporal extraído de um paciente de 66 anos. As células foram cultivadas com meio DMEM (Nutricell®, Brasil) com vermelho de fenol, suplementado com 2 mM L-glutamina, 100µg/mL de gamicina e 10% de soro fetal bovino inativado. As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, em garrafas com superfície de 75 cm², com pescoço inclinado e tampa com filtro (TPP™, EUA), contendo 20 mL de meio. Para os repiques periódicos, a cada 72 horas aproximadamente, aspirou-se todo o meio da garrafa e adicionou-se 10 mL de novo meio suplementado. Com o auxílio de um *scraper* (TPP™, EUA) as células foram descoladas e transferidas para novas garrafas contendo meio DMEM suplementado como descrito acima. Para manutenção da cultura, 7x10⁵ células/mL foram semeadas por repique/garrafa.

4.3. Procedimentos nas culturas isoladas

Para os experimentos, foram estabelecidas culturas separadas de células das linhagens PC12 (células neurais) e NG97 (glioma). Essas foram mantidas durante 15 dias com trocas de meio de cultivo a cada dois dias. Os tempos de análise para essas culturas foram de 5, 10 e 15 dias.

Primeiramente, as culturas de PC12 foram tratadas com o fator de crescimento NFG e, para essas, foram construídas curvas de crescimento e adesão celular para determinações da taxa de multiplicação celular e sobrevivência em relação ao tempo. A adição de NGF foi realizada para o estudo

da diferenciação celular e crescimento de neuritos com diferentes doses do fator de crescimento (50, 100 e 250 ng/mL) durante 15 dias. Posteriormente, foi realizada imunocitoquímica e imunoblotting para sinaptofisina em culturas controle e com tratamento de NGF.

As culturas de células PC12 foram também tratadas com 500 IU/mL e 1.000 IU/mL de IFN beta e com 0,025 e 0,050 mg/mL de TAU, sendo ambos diluídos em meio de cultura DMEM enriquecido com 5% de soro fetal bovino e 10% de soro fetal equino. O tratamento com IFN beta foi realizado em dias alternados durante quinze dias com adição de 300µl/poço de cultura. Foram realizadas coletas de dados no 5º, 10º e 15º dia. Já o tratamento com taurina foi feito através da diluição em meio de cultura e posteriormente colocado nos poços de cultura com um volume de 300 µl/poço. Foram feitas as coletas no 5º, 10º e 15º dia.

Para as culturas de NG97 foi realizada imunocitoquímica e imunoblotting para GFAP (proteína ácida fibrilar glial).

4.4. Avaliação da influência de meio condicionado glial sobre as células PC12

A obtenção do meio condicionado deu-se a partir de culturas semiconfluentes da linhagem NG97 (aproximadamente 80% em garrafas de 75 cm²). O meio DMEM, mantido por 48 horas em culturas de NG97, foi colhido e armazenado em tubos de centrifuga estéril de 50mL. Acrescentou-se ao meio condicionado pelas células NG97 o fator neurotrófico NGF-7s (250 ng/mL). Essas alíquotas foram mantidas em geladeira até o uso nas culturas de células PC12.

Os tratamentos com IFN beta e taurina também ocorreram através da sua adição ao meio condicionado, previamente à colocação do meio em contato com as células PC12. O tratamento foi realizado com as mesmas doses e frequência já descrito anteriormente, porém, foi mantido por apenas 10 dias, com coleta de resultados no quinto e décimo dias de experimentação.

4.5. Imunocitoquímica

Após os tempos de cultivo pré-determinados, as células foram lavadas por 2 vezes em PBS-FLUSH e posteriormente fixadas com formaldeído 10%, por 10 minutos. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS-FLUSH por 2 vezes de 5 minutos. Os anticorpos primários (coelho anti-sinaptofisina e cabra anti-GFAP) foram diluídos em PBS-FLUSH na concentração de 1:250 e incubados por 3 horas em temperatura ambiente. Passado este tempo, foram feitas 2 lavagens de 5 minutos cada em PBS. Em seqüência, as culturas foram incubadas com anticorpos secundários adequados, conjugados com cianina 3 (CY-3) por 45 minutos (Jackson Lab., USA). Para quantificação foi utilizado o software IMAGE J (versão 1.33U, National Institute of Health, USA). Quinze regiões representativas de cada poço foram documentadas e submetidas à quantificação por densidade integrada de pixels.

4.6. Western blotting

Para a extração protéica as células foram cultivadas em placas de 6 poços. O meio de cultivo foi descartado e as células lavadas em PBS gelado. Após este

passo, realizou-se a extração protéica através do uso de tampão Ripa (50mM Tris pH 8,0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% triton X-100, 0,5% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 1mM de PMSF). A solução foi submetida à lise com sonicador (100, Fischer Scientific) por 3 vezes de 1 minuto. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10.000 $\times g$ durante 10 min a 4°C em centrífuga refrigerada (Bio-Spin-R, BioAgency). Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido para a dosagem da quantidade total de proteína através do método de Bradford (1976).

A proteína total extraída foi mantida em microtubos de 1,5ml estocados a -20°C até a realização da eletroforese. Nesse passo, 30 μ g de proteína para cada grupo foram incubadas em tampão não redutor (120mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 0,01% bromofenol blue e 20% glicerol) e aquecidas a 100°C em banho seco por 5 minutos, corridas em gel de eletroforese a 10% de acrilamida em tampão de corrida pH 8,5 (250mM de Tris base, 190mM de glicina, 1% de SDS). Após a separação das proteínas, essas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência (25mM Tris, 192mM glicina e 20% metanol) a 100 volts por 1 hora.

As membranas com as proteínas foram bloqueadas por 1h com leite em pó desnatado a 5%, e posteriormente a incubação overnight com anticorpos primários para identificação de proteínas específicas: coelho anti-sinaptofisina (1:1000) para células PC12, coelho anti-GFAP (1:1000) para células NG97 e controle camundongo anti- β -actina (1:1000). Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-IgG de coelho e camundongo, ambos conjugados com peroxidase, sendo as membranas reveladas pelo kit *Enhanced Chemiluminescence System* (ECL,

Amershan Biosciences) e com o filme Amershan Hyperfilm (ECL, Amershan Biosciences).

4.7. Análise estatística

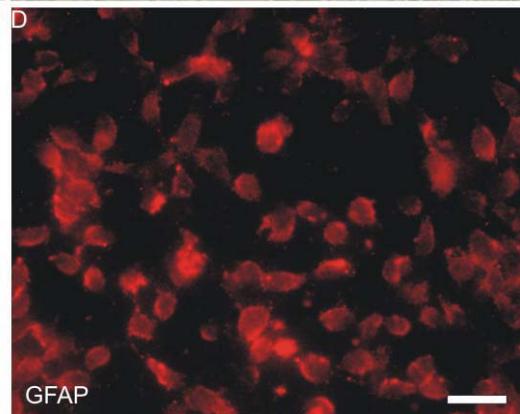
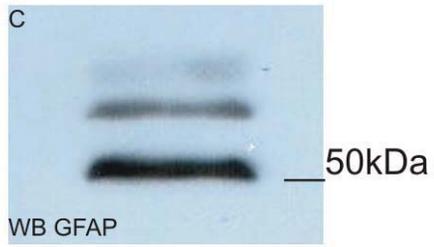
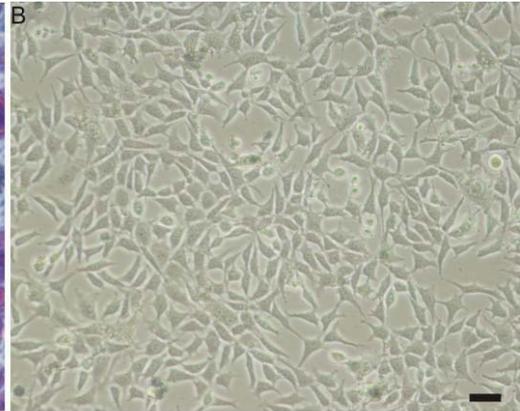
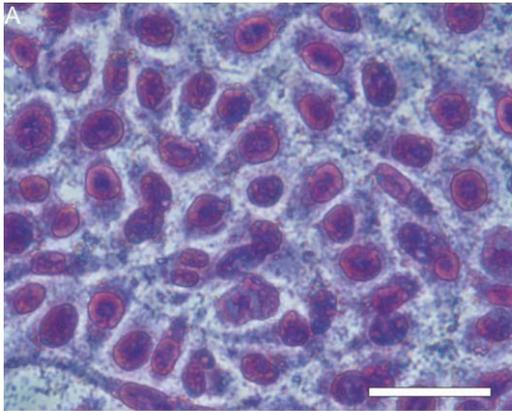
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. A análise de eventuais diferenças intergrupos foi realizada pela Anova, seguido pelo teste t-Student. Assim, assumiu-se $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), utilizando-se as funções estatísticas do programa BioEstat.

5. Resultados

5.1. Células NG97 são GFAP positivas (Figura 1)

Após 1 semana de cultivo em placa de 24 poços contendo inicialmente 10^3 células por poço mantidas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino, foi realizada imunocitoquímica para GFAP, uma proteína do citoesqueleto de astrócitos. Dessa forma, 100% das células de origem tumoral se mostraram GFAP positivas, como observado na Figura 1D. A imunocitoquímica foi validada pela realização de Western Blotting, obtendo-se banda imunorreativa para GFAP, detectada no peso de 50KDa, como mostra a Figura 1C.

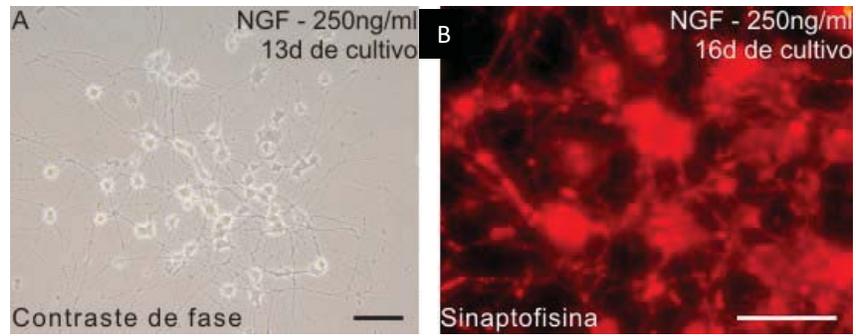
Figura 1: Expressão de GFAP por células NG97. Em (A) as células foram coradas com azul de toluidina, em (B) observa-se a morfologia após 3 dias de cultivo, em (C) determinação da expressão de GFAP através da técnica de Western blotting, em (D) imunocitoquímica, avaliando a expressão de GFAP. Escala= 50µm.



5.2. Tratamento com NGF induz a diferenciação de células PC12 e formação de neuritos

As células PC12 tratadas com diferentes doses de NGF mostraram diferenciação em células semelhantes a neurônios. A apresentação de neuritos bem como a formação de redes dendríticas foi observada principalmente na dose de 250 ng/mL de NGF, sendo, portanto, dose-dependentes. Essa dose foi escolhida para os experimentos seguintes com meio de cultura condicionado. A Figura 2 apresenta imagens de culturas tratadas durante 13 dias com a dose de 250ng de NGF/mL de meio de cultura e também apresenta a expressão de sinaptofisina para as culturas.

Figura 2: Células PC12 após tratamento com NGF (250 ng/mL). Em (A) fotomicrografia mostrando a morfologia e neuritos de culturas de PC12 tratadas com 250ng/mL de NGF, em (B) imunocitoquímica anti-sinaptofisina e em (C) imunoblotting para sinaptofina nas culturas controle e tratadas com doses crescentes de NGF. (A) Escala = 10 μ m ; (B) Escala = 20 μ m.



Os gráficos abaixo mostram respectivamente as curvas de adesão e de crescimento para as células PC12. A curva de adesão representa o tempo necessário para as células aderirem à superfície de cultivo após plaqueamento. O resultado mostrou que as PC12 levam pelo menos 20 minutos para aderirem à placa de cultura (Figura 3).

A curva de crescimento compara a multiplicação celular entre células PC12 indiferenciadas e células tratadas com NGF e mostra que essa segunda cultura, após diferenciação em células semelhantes a neurônios, param ou tem um crescimento muito lento em comparação com as células não tratadas com NGF (Figura 4).

Figura 3: Curva de adesão de células PC12. Note que o número máximo de células fixadas é atingido após 20 minutos de plaqueamento.

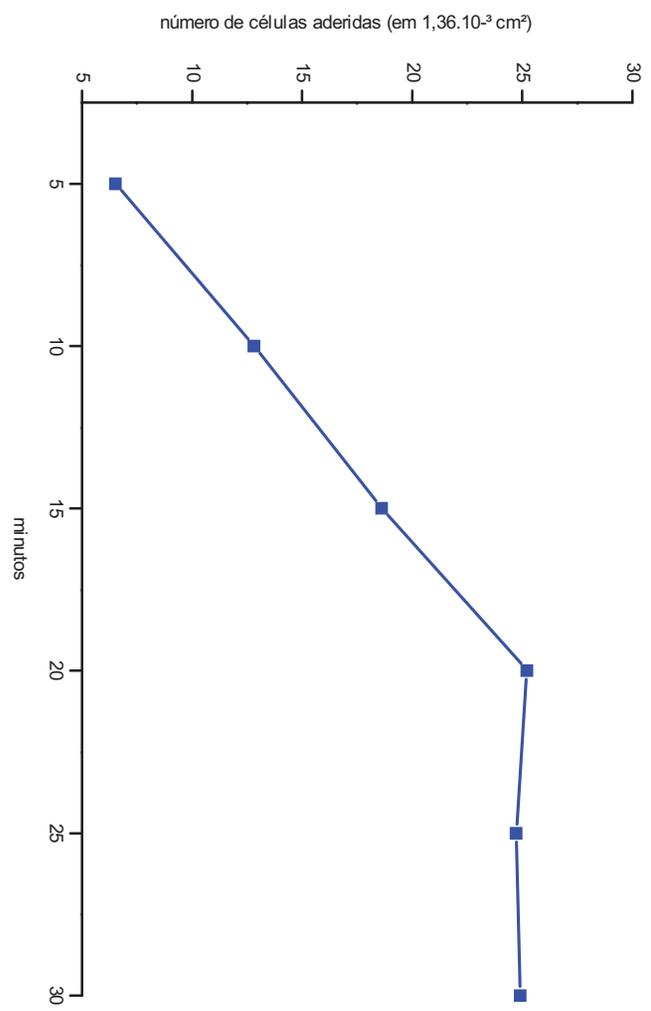
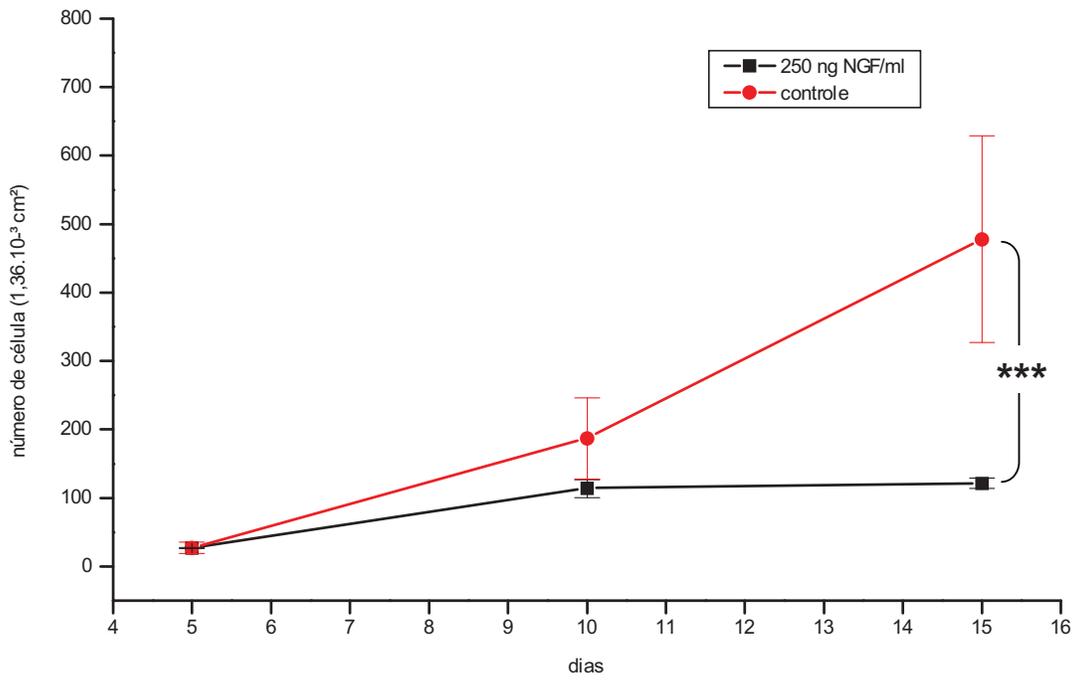


Figura 4: Perfil de crescimento para PC12 até 16 dias de cultivo. Linha preta representa a curva das células tratadas com 250 ng de NGF/mL de meio. Linha vermelha mostra curva para as células indiferenciadas, sem tratamento com NGF. A análise estatística (teste U de Mann Whitney) apontou diferença significativa para o resultado final da taxa de multiplicação celular ($p= 0,0002$).



5.3.Tratamento com IFN beta influência a expressão de MHC classe I em células PC12

O tratamento com IFN β aumentou a expressão de MHC classe I, demonstrado pela imunomarcção anti-OX 18, levando a uma diminuição na formação de sinapses nas células PC12, observando-se a redução da imunomarcção por sinaptofisina, um marcador de uma proteína constituinte da membrana das vesículas sinápticas com neurotransmissores.

As imagens na Figura 5 mostram as culturas controle e tratamentos com 500 e 1000 UI de IFN/mL, num período de 5, 10 e 15 dias. Os resultados do tratamento com interferon beta ficaram mais evidentes após 10 dias de cultivo, sendo que a dose que mais intensificou a expressão de MHC classe I foi a de 500 UI/mL, já que a dose de 1000 UI/mL ocasionou uma desaceleração da multiplicação e degeneração celular em relação ao grupo tratado com a dose de 500 UI de IFN beta (OX-18 10 dias: controle 8315,95 \pm 130,84, 500 UI/mL 13014,64 \pm 97,00, 1000 UI 10450,53 \pm 104,80, $p < 0,001$; sinaptofisina 10 dias: controle 10558,56 \pm 168,86, 500 UI/mL 9212,65 \pm 82,25, 1000 UI/mL 6618,84 \pm 84,89, $p < 0,001$; Figuras 6 e 7).

Figura 5: Culturas de células PC12 imunomarcadas com OX-18 e sinaptofisina após tratamento com IFN beta. **A a F** mostram imagens com 5 dias de tratamento, sendo a primeira linha imunomarcção anti-OX 18 e a segunda linha, anti-sinaptofisina. **F a L** mostram imagens com 10 dias de tratamento e de **M a R**, 15 dias de tratamendo com IFN nas doses 500 e 1000 UI/mL. O tratamento com interferon influencia a elevação de expressão de MHC classe I (OX-18) e a diminuição de sinaptofisina principalmente na dose de 500 UI/mL. Escala = 20µm.

Tratamento com IFN β - meio normal

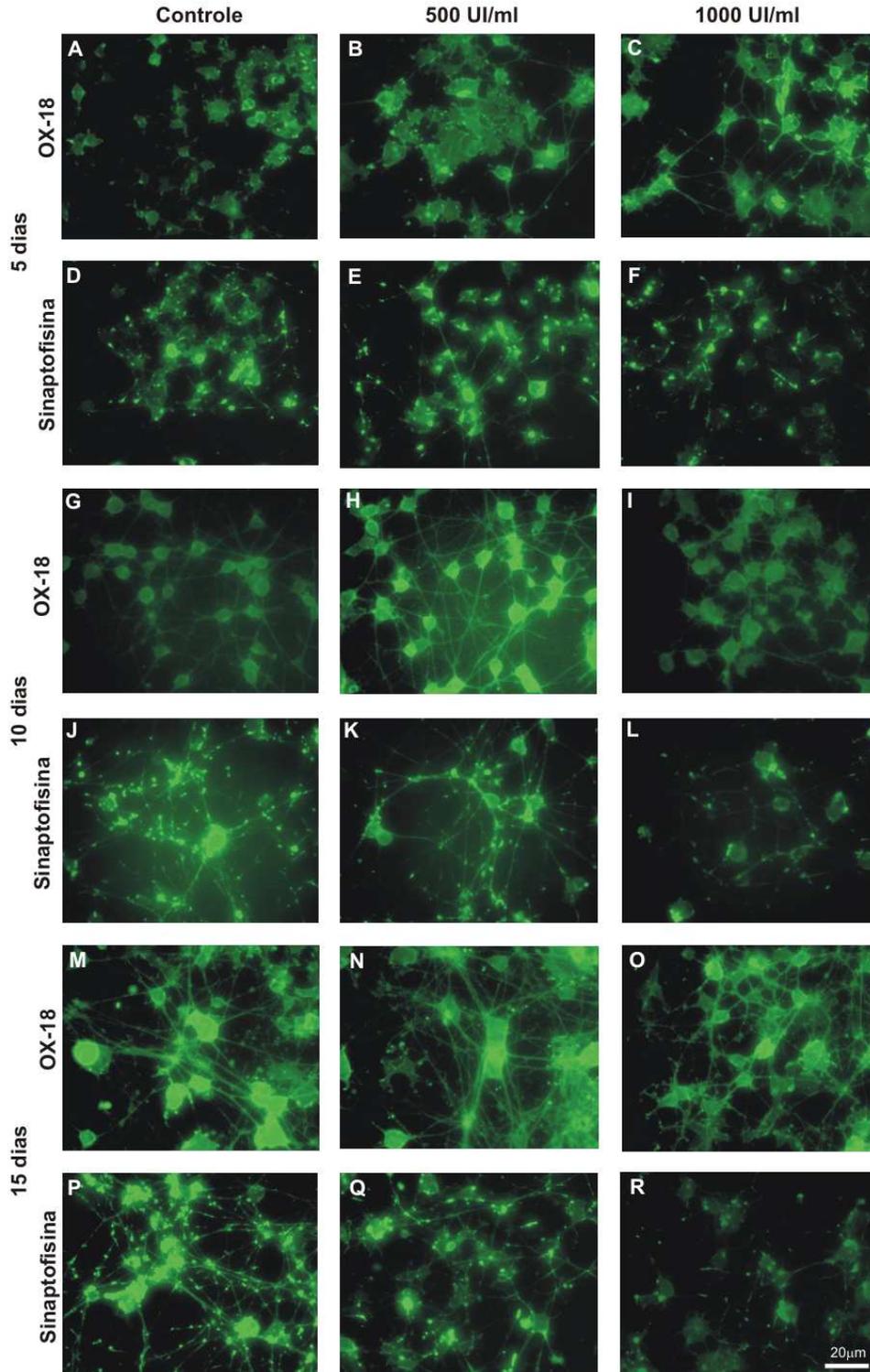


Figura 6: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcagem para MHC I após tratamento com IFN beta ($p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***), teste t –Student).
Densidade integrada de pixel x 10^3 .

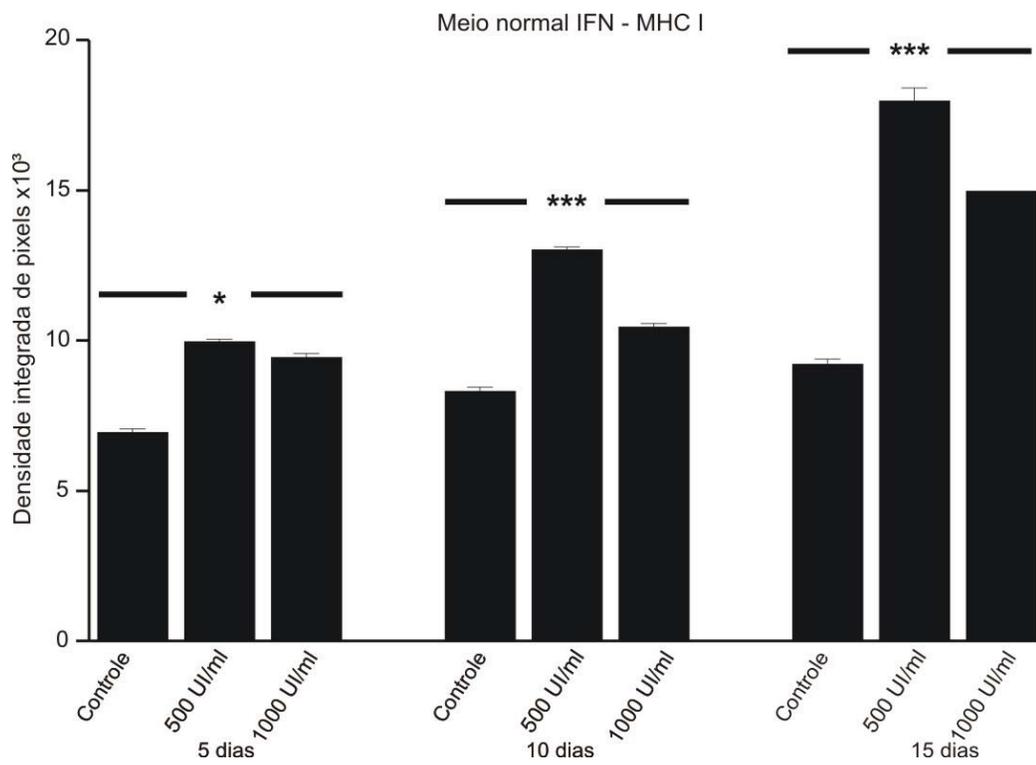
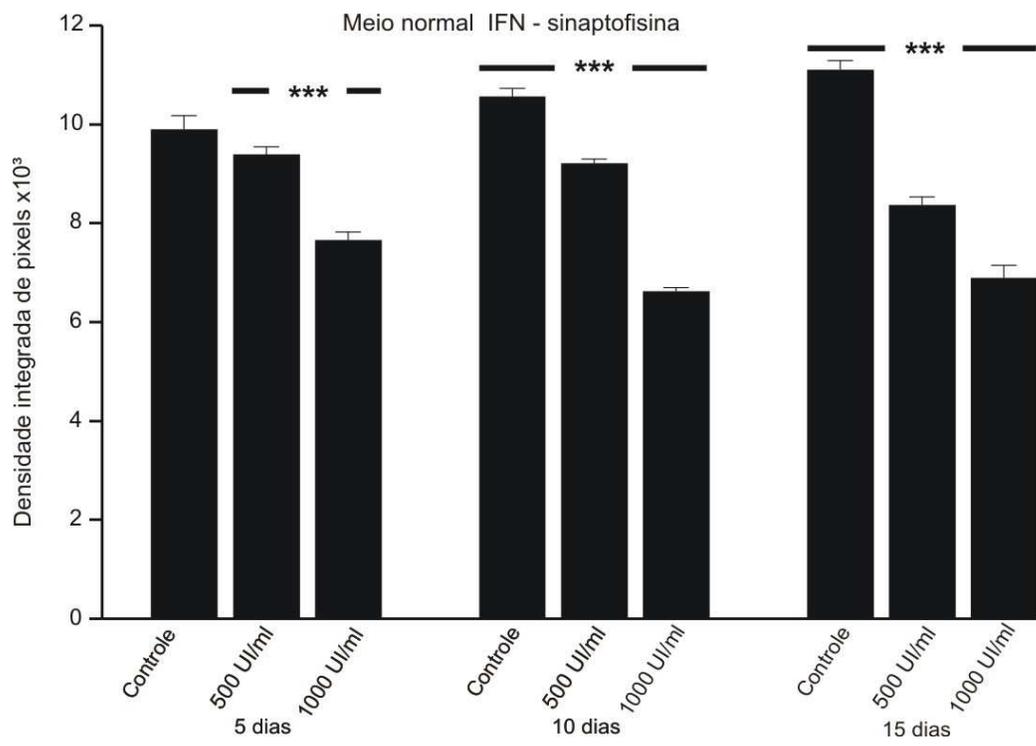


Figura 7: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcacão para sinaptofisina após tratamento com IFN beta ($p < 0,001$ (***) teste t – Student). Densidade integrada de pixel x 10^3 .



5.4. Tratamento com taurina diminui a expressão de MHC classe I e influência positivamente na densidade sináptica

O tratamento com taurina sobre as células PC12 acarretou uma redução da expressão de MHC classe I e conseqüentemente uma elevação da densidade sináptica, mostrada pelo aumento da expressão de sinaptofisina. Os tratamentos das células com taurina decorreram por 5, 10 e 15 dias, sendo os grupos experimentais tratados com as dose de 0,025 e 0,050 mg de taurina/mL de meio (Figura 8).

A análise estatística mostrou que o efeito protetor da taurina, reduzindo a expressão de MHC e, conseqüentemente, preservando sinapses, se deu nos períodos de 10 e 15 dias de tratamento (OX-18 10 dias: controle $9114,03 \pm 248,54$, 0,025ng/mL $7626,05 \pm 179,04$, $p < 0,01$, 0,050 ng/mL $5422,76 \pm 74,79$, $p < 0,001$; sinaptofisina 10 dias: controle $5061,54 \pm 76,93$, 0,025ng/mL $6515,11 \pm 76,56$, $p < 0,001$). A dose de 0,050 mg/mL de taurina foi tóxica para as células uma vez que ocasionou a acidificação do meio de cultura mantido em contato com as células (Figura 9 e 10).

Figura 8: Culturas de células PC12 imunomarcadas com OX-18 e sinaptofisina após tratamento com taurina. **A a F** mostram imagens com 5 dias de tratamento, sendo a primeira linha, imunomarcagem anti-OX 18 e a segunda linha, anti-sinaptofisina. **G a L** mostram imagens com 10 dias de tratamento e de **M a R**, 15 dias de tratamento com taurina nas doses 25 e 50 mg/mL. Note o efeito do tratamento com taurina principalmente na dose de 250 mg sobre a expressão de MHC classe I (OX-18) e a interrelação com a expressão de sinaptofisina. Nesse sentido, quando se tem a redução de OX-18 obtém-se a elevação de sinaptofisina na sua forma distribuída em botões sinápticos (marcação punctata). Escala = 20 μ m.

Tratamento com taurina - meio normal

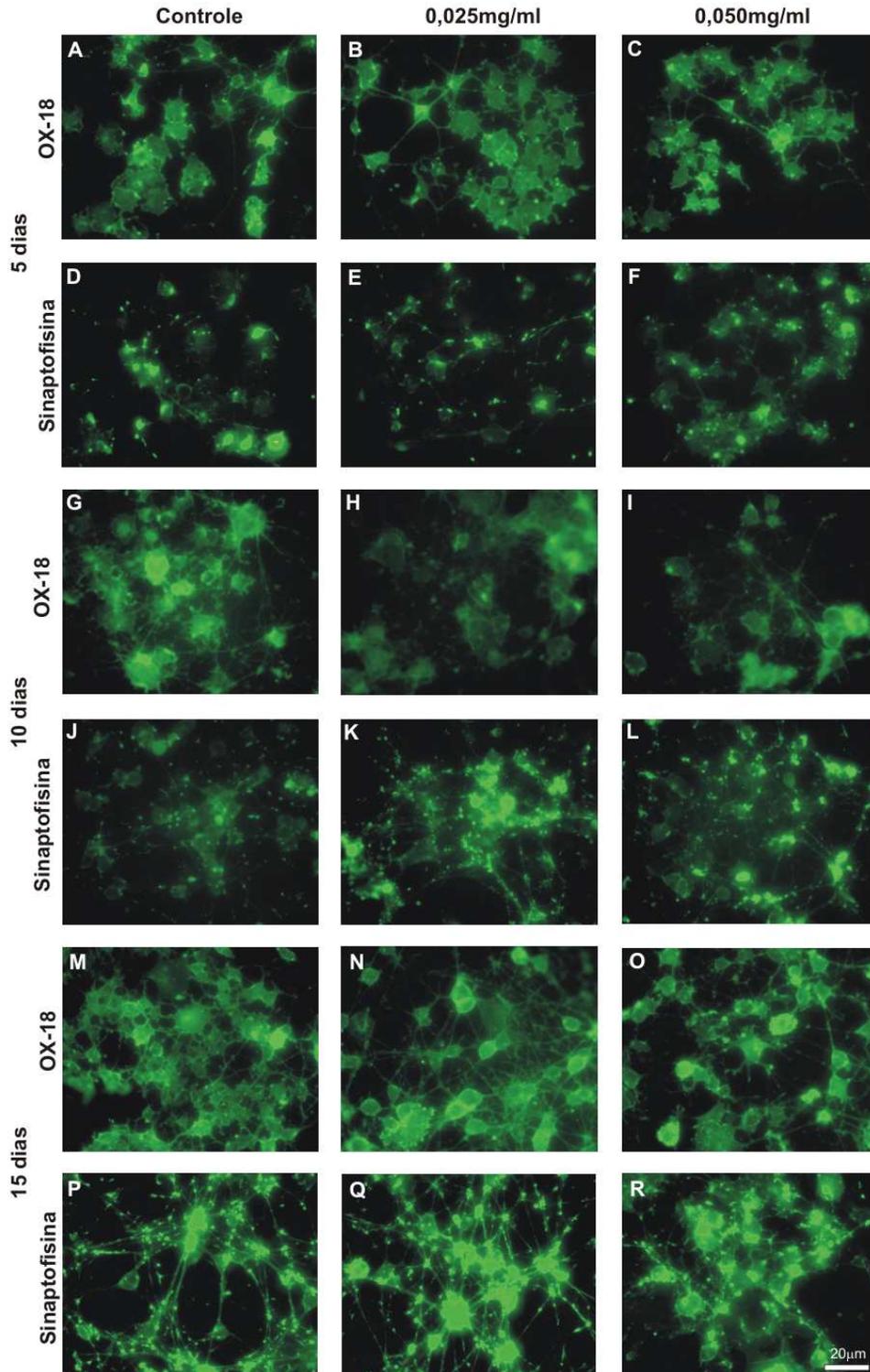


Figura 9: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcagem para MHC I após tratamento com taurina ($p < 0,01$ (**), teste t - Student). Densidade integrada de pixel $\times 10^3$.

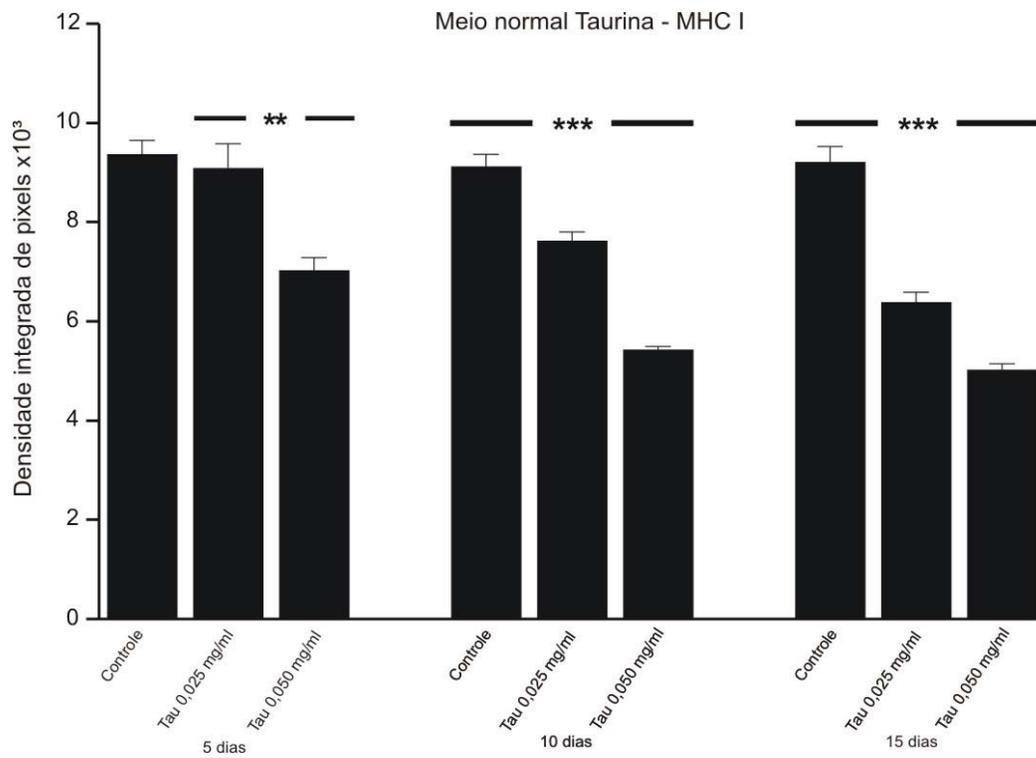
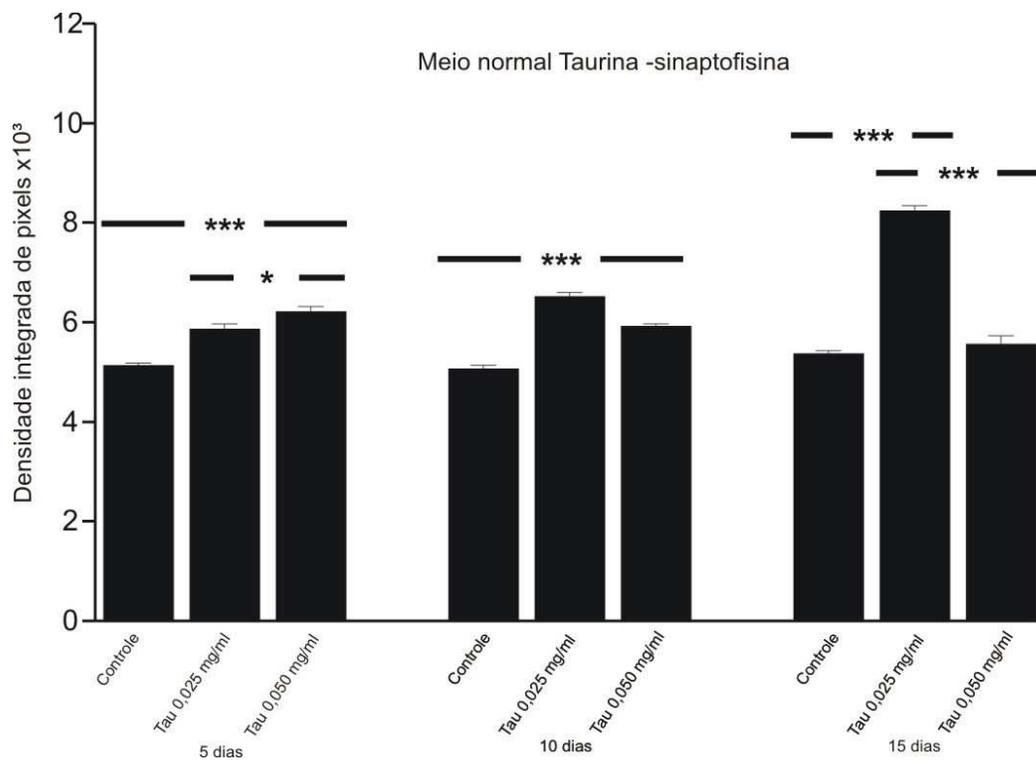


Figura 10: Gráfico mostrando a quantificação da imunomarcção para sinaptofisina após tratamento com taurina ($p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***), teste t – Student). Densidade integrada de pixel x 10^3 .



5.5. A utilização de meio condicionado de células NG97 intensifica a expressão de MHC classe I e influência na distribuição de sinaptofisina

O meio condicionado de glia tumoral humana proveniente da linhagem NG97 mostrou-se capaz de influenciar na expressão do MHC classe I, fazendo com que suas taxas se elevassem e com isso afetasse a formação de sinapses pelas células PC12. As culturas de PC12 foram tratadas com meio condicionado adicionado de 250ng de NGF/mL de meio e ainda adicionado dos tratamentos com IFN beta (Figura 11) e taurina (Figura 13) nas mesmas doses realizadas com os tratamentos com meio de cultura normal durante 10 dias. Após esse tempo, as células foram submetidas à imunocitoquímica para quantificação de sinapses e MHC, com os respectivos anti-corpos sinaptofisina e OX-18.

Durante 5 dias de cultivo, a utilização do meio condicionado adicionado de IFN beta teve uma leve influencia no aumento da expressão de MHC classe I, além do já observado no tratamento com IFN diluído em meio normal. Porém, a redução de sinaptofisina foi significativamente maior nas culturas tratadas com meio condicionado, tanto nas culturas controle como nas tratadas com IFN beta (comparar gráficos das Figuras 7 e 12). O prolongamento do tempo de cultivo com meio condicionado para o tratamento com IFN não influenciou a expressão de MHC classe I em relação ao resultado já obtido com 5 dias de cultivo (Figura 6). No entanto, a expressão de sinaptofisina apresentou aproximadamente 45% de elevação em relação ao quinto dia de tratamento (gráfico 7).

Figura 11: Culturas de células PC12 imunomarcadas com OX-18 e sinaptofisina após tratamento com meio condicionado + IFN beta. A imagem em A mostra culturas controle, B e C mostram imagens de culturas tratadas com 500 e 1000 UI/mL adicionados ao meio condicionado. Escala = 20 μ m.

Tratamento com IFN β - meio condicionado

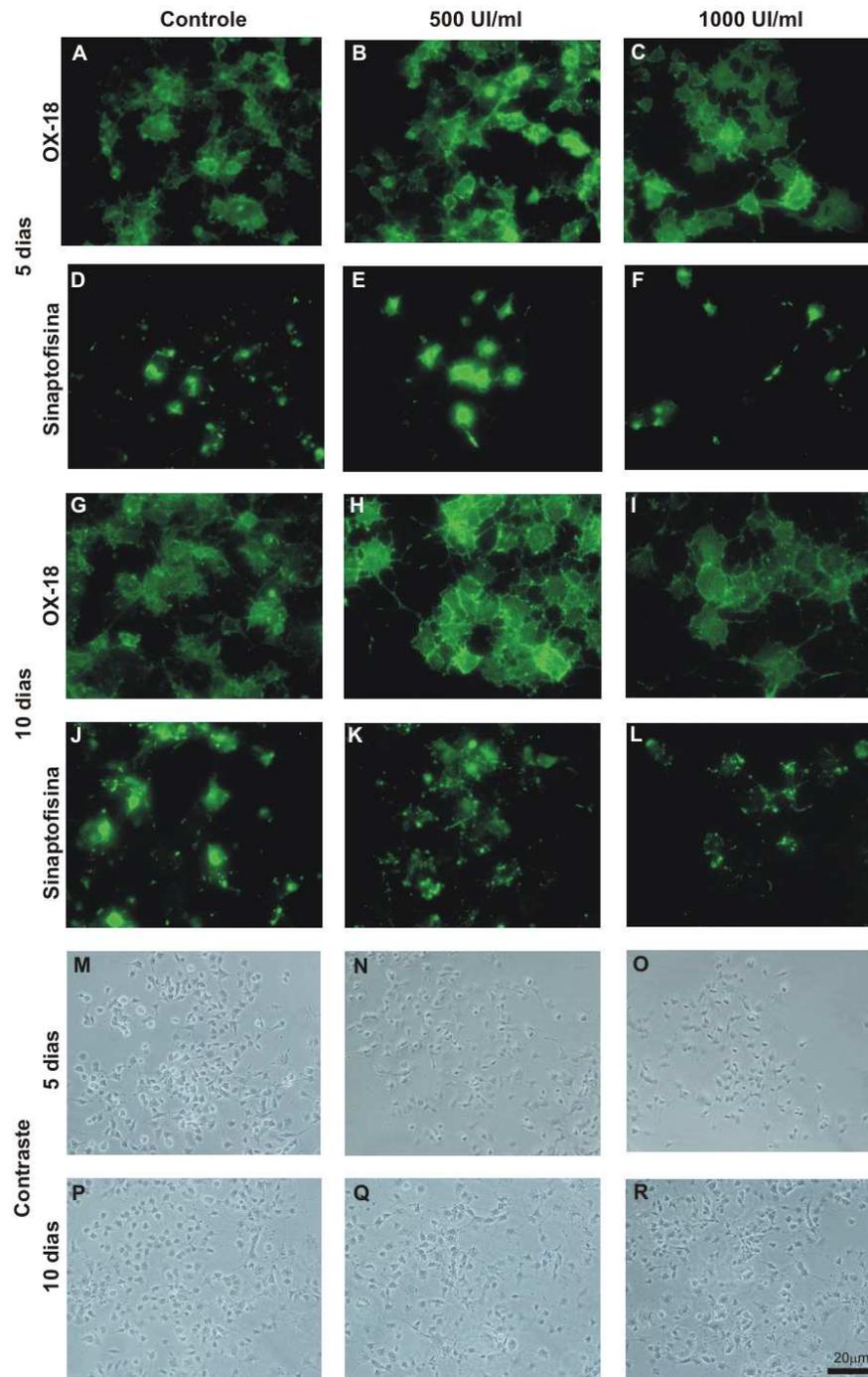


Figura 12: Gráfico relativo à quantificação da imunomarcação para MHC I após tratamento com meio condicionado + IFN beta ($p < 0,001$ (***), teste t – Student). Densidade integrada de pixel x 10^3 .

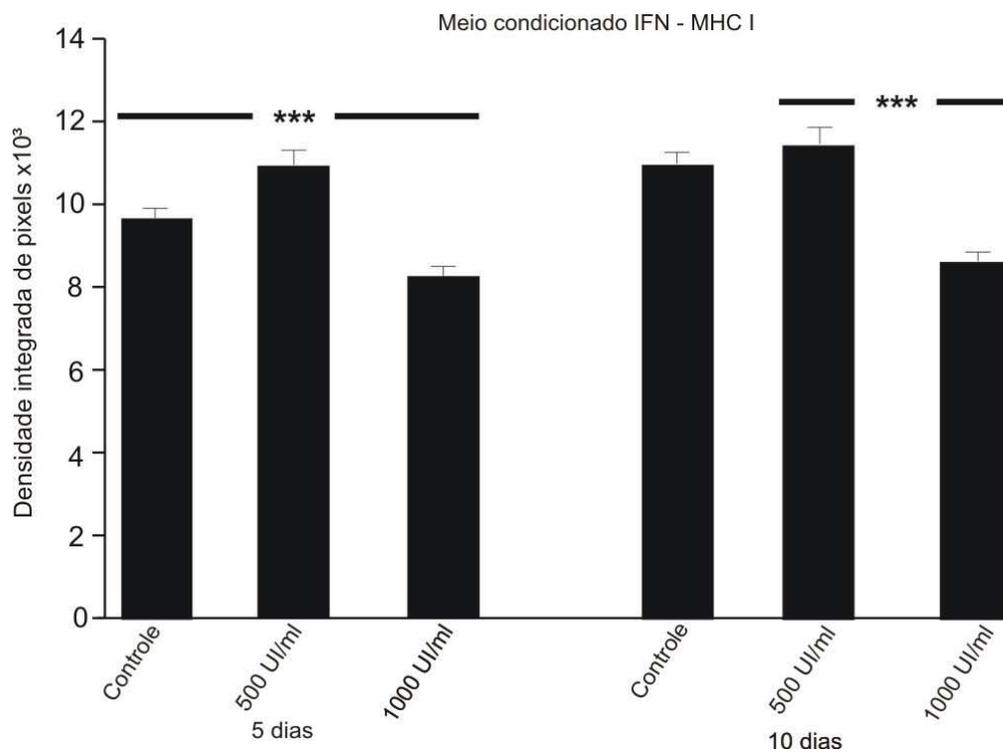


Figura 13: Gráfico relativo à quantificação da imunomarcção para MHC I após tratamento com meio condicionado e com meio normal + IFN beta ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), teste t - Student). MC: meio condicionado; MN: Meio normal. Densidade integrada de pixel x 10^3 .

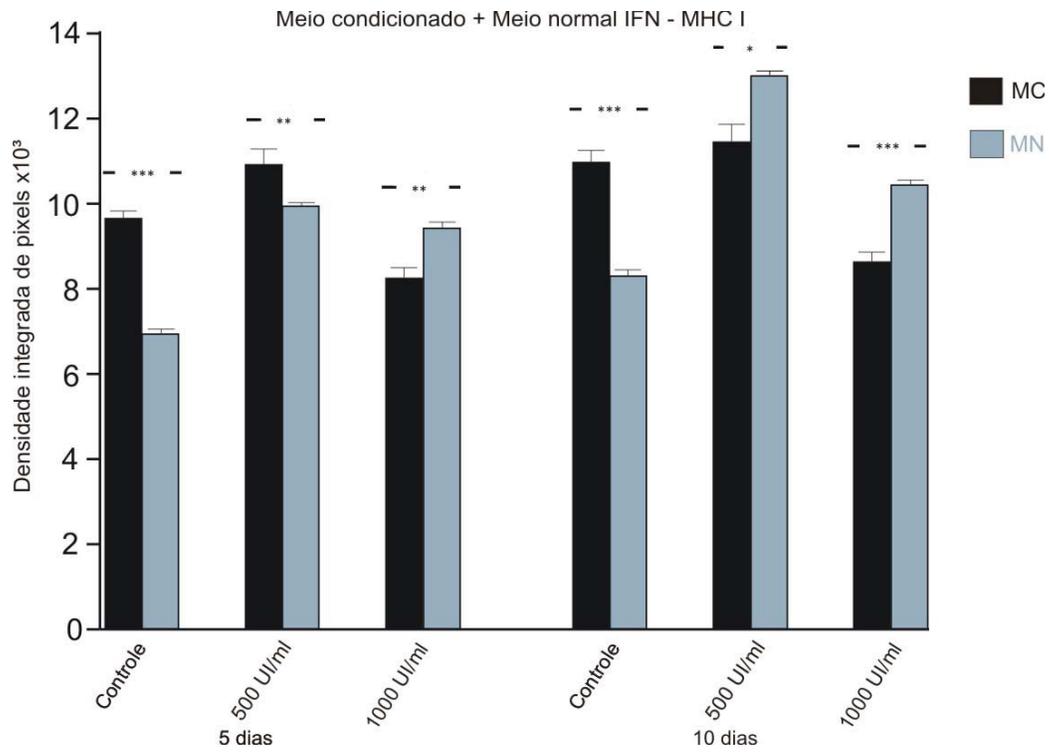


Figura 14: Gráfico relativo à quantificação da imunomarcagem para sinaptofisina após tratamento com meio condicionado + IFN beta ($p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***), t –Student). Densidade integrada de pixel x 10^3 . Densidade integrada de pixel x 10^3 .

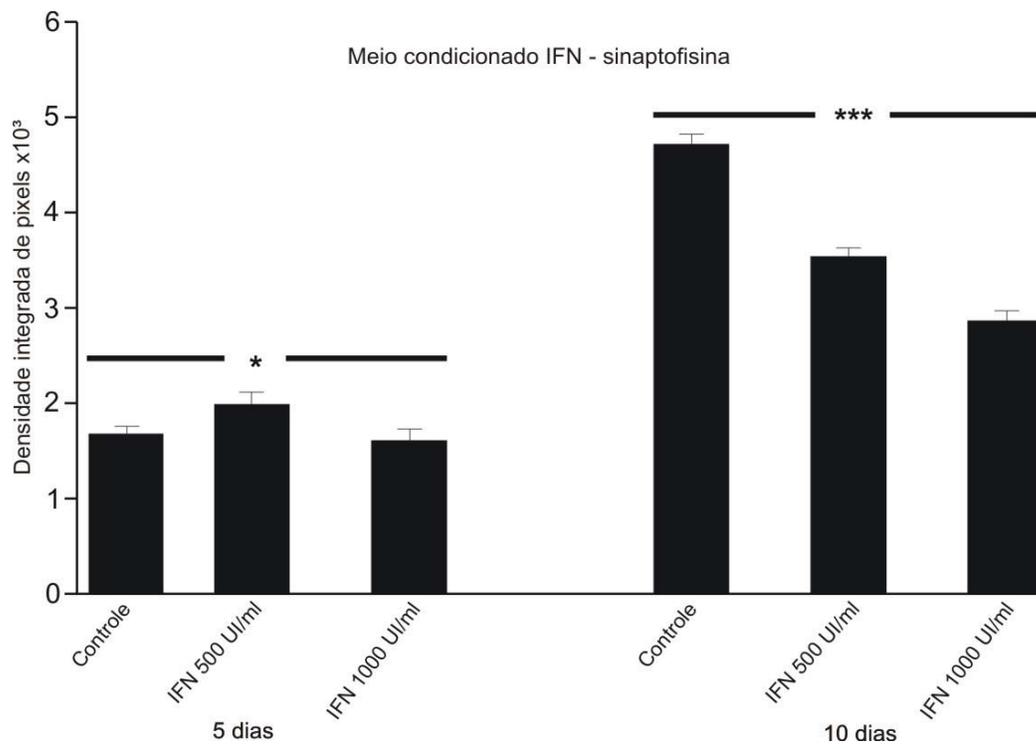
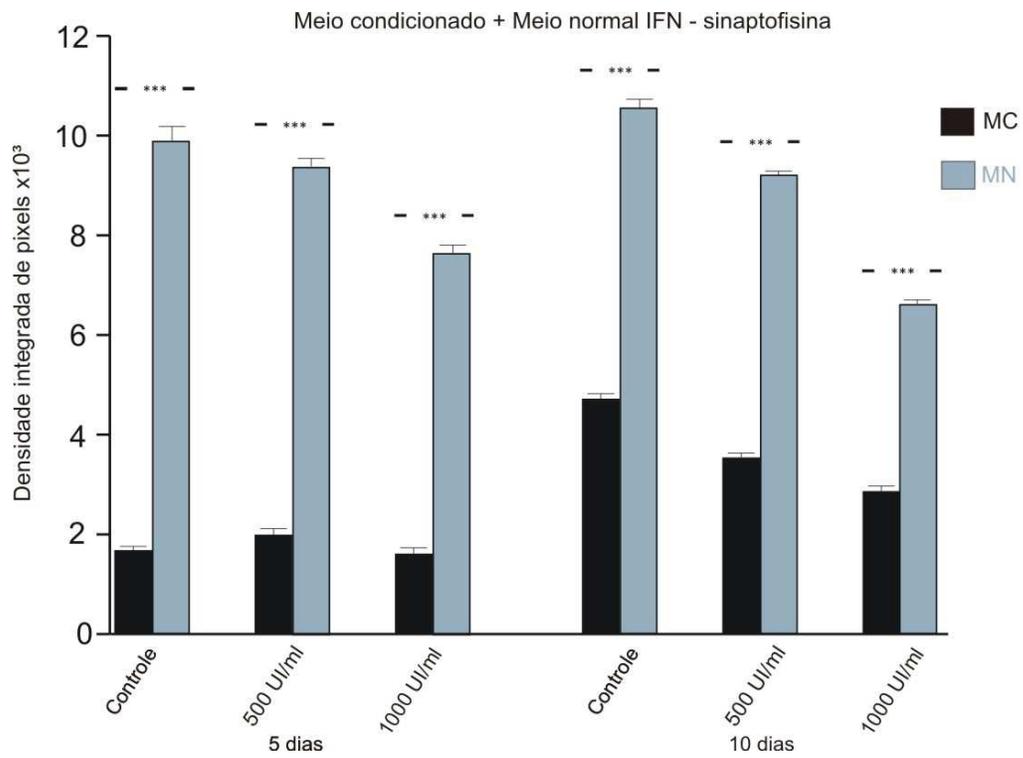


Figura 15: Gráfico relativo à quantificação da imunomarcação para sinaptofisina após tratamento com meio condicionado e com meio normal + IFN beta ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), teste t - Student). MC: meio condicionado; MN: Meio normal. Densidade integrada de pixel x 10^3 .



Em relação ao tratamento com meio condicionado acrescido de taurina, pode-se observar que o aminoácido mantém a neuroproteção previamente notada com o tratamento em meio normal nos primeiros 5 dias de tratamento. No entanto esse efeito, em relação à expressão de OX-18, é gradativamente diminuído até o décimo dia de cultivo (comparar gráficos nas Figuras 9 e 14). A expressão de sinaptofisina nos primeiros 5 dias de tratamento com meio condicionado e taurina (0,025mg/mL) é significativamente maior do que a cultura controle. Ao observar os resultados com 10 dias de tratamento a sinaptofisina tende a cair, aparentemente potencializado pelo efeito do meio condicionado, uma vez que, com meio normal, o tratamento com taurina foi bastante positivo. Observa-se que nas culturas houve uma retração dos neuritos, provavelmente por ação de fatores solúveis contidos no meio condicionado. (comparar gráficos das Figuras 10 e 15).

Figura 16: Culturas de células PC12 imunomarcadas com OX-18 e sinaptofisina após tratamento com meio condicionado + taurina. A imagem em A mostra culturas controle, B e C mostram imagens de culturas tratadas com 0,025 e 0,050 mg/mL de taurina adicionados ao meio condicionado. Escala = 20 μ m. De L a Q, são representadas imagens de contraste de fase, de modo a comprovar a integridade das células, apesar da baixa imuno-reatividade. Escala = 10 μ m.

Tratamento com taurina - meio condicionado

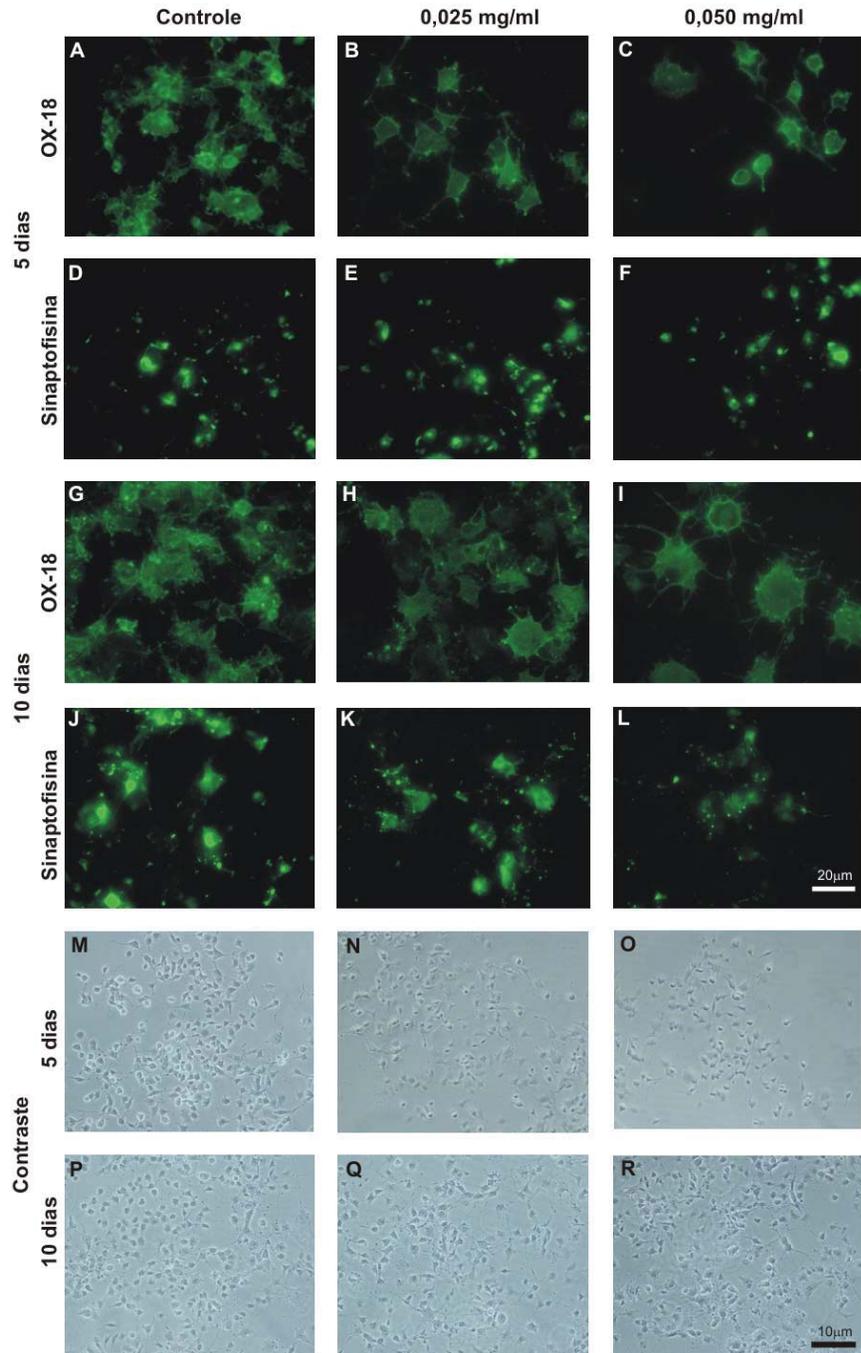


Figura 17: Gráfico relativo à quantificação da imunomarcação para MHC I após tratamento com meio condicionado + taurina ($p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***), teste t – Student). Densidade integrada de pixel x 10^3 .

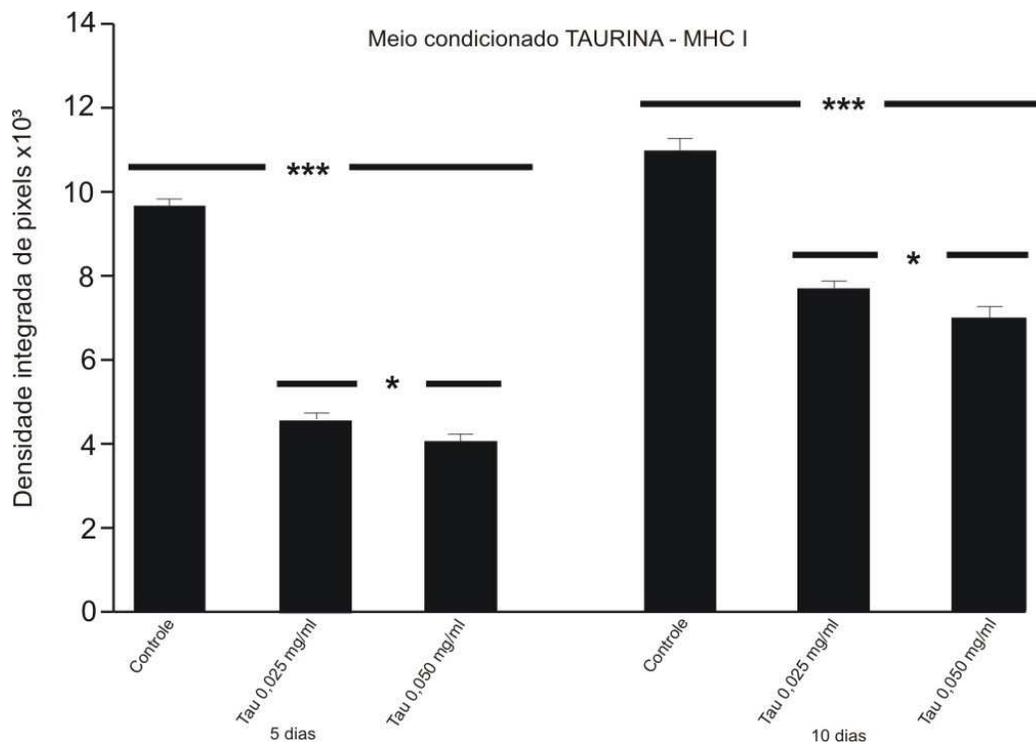


Figura 18: Gráfico relativo à quantificação da imunomarcagem para MHC I após tratamento com meio condicionado e com meio normal + taurina ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), teste t - Student). MC: meio condicionado; MN: Meio normal. Densidade integrada de pixel x 10^3 .

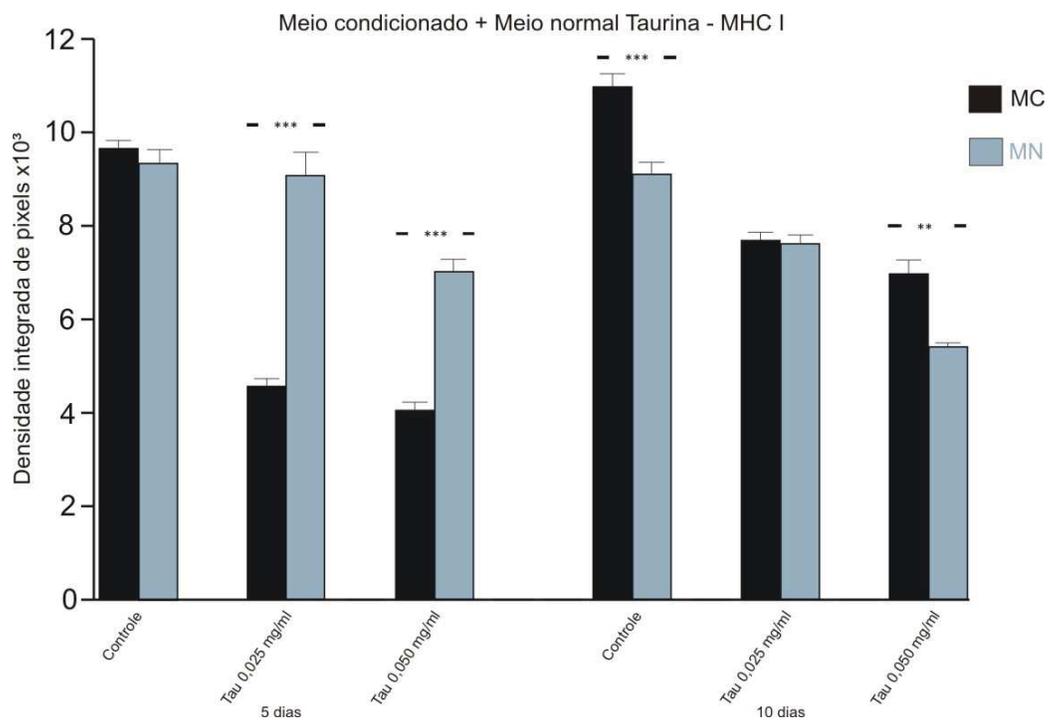


Figura 19: Gráfico relativo à quantificação da imunomarcação para sinaptofisina após tratamento com meio condicionado + taurina ($p < 0,001$ (***), teste t – Student). Densidade integrada de pixel $\times 10^3$.

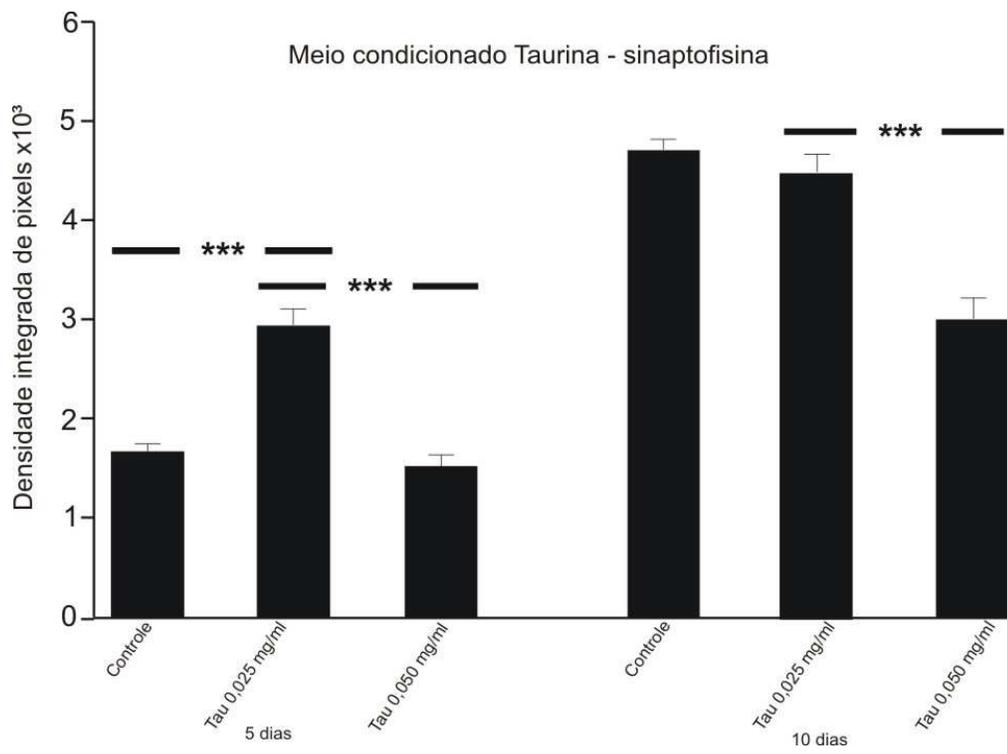
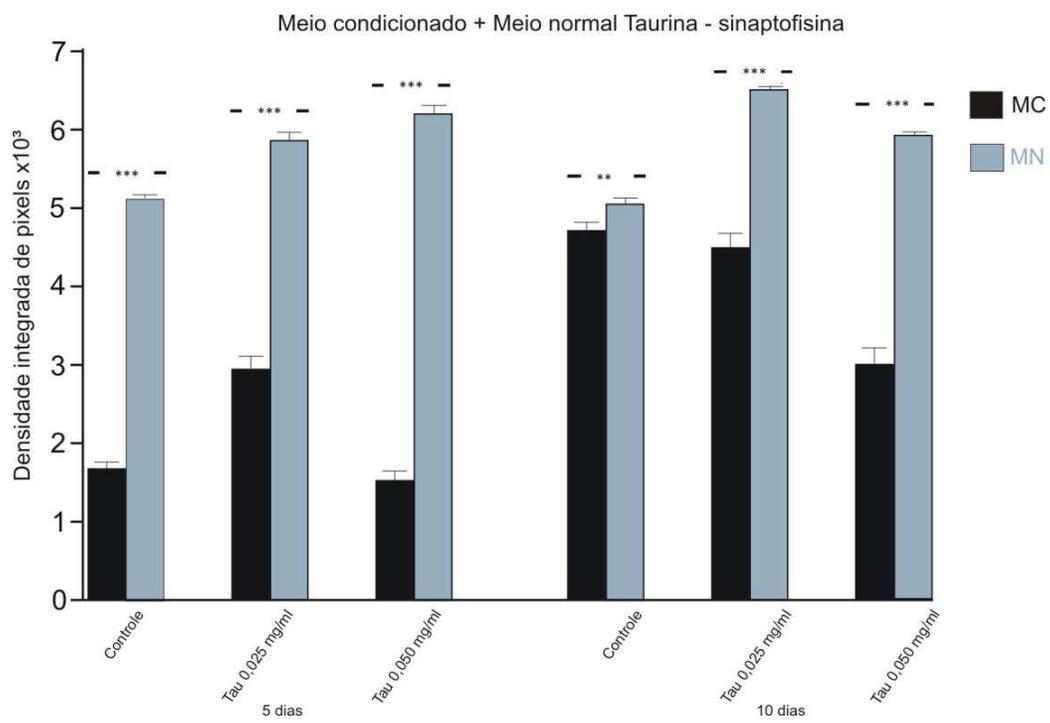


Figura 20: Gráfico relativo à quantificação da imunomarcagem para sinaptofisina após tratamento com meio condicionado e com meio normal + taurina ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), teste t - Student). MC: meio condicionado; MN: Meio normal. Densidade integrada de pixel x 10^3 .



6. Discussão

Um dos argumentos usados para se considerar o Sistema Nervoso Central (SNC) como um sistema imunoprivilegiado é o baixo nível ou a ausência da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC classe I) pelas células nervosas (Lampson & Hickey, 1986; Ljunggren & Kärre, 1990; Joly *et al.*, 1991; Mucke & Oldstone, 1992; Rall *et al.*, 1994). Apesar disso, recentes evidências mostraram que o SNC é capaz de expressar tais moléculas (Corriveau *et al.*, 1998; Linda *et al.*, 1998; Linda *et al.*, 1999) e ainda, que a ausência do MHC classe I acarreta prejuízos no desenvolvimento do tecido nervoso e na sua recuperação após lesão (Corriveau *et al.*, 1998; Huh *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2004).

Procurando um papel funcional para as moléculas de MHC classe I na plasticidade e na regeneração sináptica de neurônios do SNC de animais adultos, Oliveira *et al.* (2004) utilizaram como modelo experimental, a transecção do nervo isquiático, com conseqüente retração dos terminais pré-sinápticos. Nesse trabalho, os autores demonstraram que a expressão do complexo de MHC classe I tem influência direta sobre as respostas após lesão nervosa, sendo crucial para a manutenção seletiva dos terminais inibitórios em aposição aos neurônios axotomizados.

Assim, a ausência da expressão de MHC I em animais knock-out levou a uma perda de seletividade da retração de sináptica, com perda exacerbada de terminais pré-sinápticos nos motoneurônios axotomizados. Apesar dessa perda de

conectividade não resultar em morte neuronal, observou-se um decréscimo na capacidade regenerativa axonal nesses animais mutantes. Tal fato indica que a plasticidade sináptica após lesão, influencia diretamente na regeneração nervosa subsequente (Oliveira *et al.*, 2004).

Tendo-se em vista a importância do MHC I para a resposta pós-lesão, o melhor entendimento do processo de retração de sinapses, bem como dos mecanismos de plasticidade neural, pode resultar em novas estratégias para o tratamento de traumas ao SNC. Contudo, há necessidade do estabelecimento de modelos experimentais adequados para a sua investigação.

Apesar de estudos “*in vivo*” serem fundamentais, a possibilidade de realização de pesquisas mais específicas *in vitro* pode também contribuir significativamente para o avanço do conhecimento nessa área. O emprego de culturas primárias, contudo, traz várias dificuldades, tais como a necessidade de sacrifício de animais neonatos e em estágios embrionários. Há necessidade de sincronização entre culturas gliais e neuronais, bem como o tempo de cultivo de neurônios medulares é restrito.

Tendo-se em vista o acima mencionado, no presente estudo propusemos o desenvolvimento de um modelo *in vitro* empregando células imortalizadas, capazes de se diferenciarem em tipo neuronal, contendo parte significativa do aparato intracelular neuronal, bem como capacidade para formar sinapses funcionais.

As células PC12 são amplamente utilizadas como modelo de diferenciação neuronal. É uma linhagem celular diplóide com 40 cromossomos e homegênea,

que quando tratadas com fator de crescimento neural (*nerve growth factor*, NGF) cessa a divisão celular e se diferencia em células semelhantes a neurônios simpáticos (Weston, 1970, Burnstock & Costa, 1973).

Anteriormente à realização dos experimentos propostos com as células PC12, procedeu-se com algumas padronizações em relação à técnica de manipulação e repique desse tipo celular. Dessa forma, para estabelecer-se o período que teríamos que aguardar desde o plaqueamento até a adesão das células para o início dos experimentos com NGF foi avaliado através da construção de uma curva de adesão o tempo necessário para sedimentação e fixação das células PC12. Foi feita a contagem de células a cada 5 minutos, após o plaqueamento e constatou-se que, passados 20 minutos, as células atingiram o tempo necessário para a adesão, dando assim o número real de células viáveis (Figura 3).

Em nosso trabalho analisamos o tratamento com diferentes concentrações de NGF (50, 100 e 250 ng/mL). A escolha dessas doses foi feita baseando-se na literatura consultada. Nesse sentido, Tamura *et al.* (1994) utilizaram a mesma dosagem para estudar a diferenciação e o crescimento de neuritos. Doses de 50 ng/mL e 100 ng/mL também foram estudadas em pesquisas relacionadas à resposta do NGF em células PC12 com propósito de estabelecer uma linhagem clonal noradrenérgica (Greene & Tischler, 1976). Através das análises feitas referentes ao comportamento das células PC12 às doses de NGF, verificou-se a formação de neuritos e a densidade sináptica através da expressão de sinaptofisina, uma proteína presente na membrana de vesículas que carregam neurotransmissores e

que estão presentes dentro dos terminais pré-sinápticos. Assim, sua expressão pode ser utilizada como forma indireta de medir a quantidade de sinapses em cultura. Percebeu-se que tanto a diferenciação quanto o desenvolvimento de redes de comunicação entre as células foi dose-dependente, sendo que a concentração de 250 ng/mL apresentou efeitos mais positivos e, portanto, foi a dose escolhida para a manutenção e diferenciação das PC12 nos experimentos que foram desenvolvidos nesse trabalho.

A influência do NGF (250ng/mL) sobre a multiplicação das células PC12 foi avaliada através de curva de crescimento que transcorreu por 15 dias, uma vez que Greene & Tischler (1976) mostraram que o crescimento celular cessa por volta do 7º dia de exposição ao NGF. Contudo, em nossas condições experimentais cessou por volta do 10º dia de exposição ao NGF.

Adicionalmente ao cultivo básico dessas células de padrão neuronal, tornou-se fundamental comprovar a expressão de MHC I pelas células PC12. De fato, esse tipo celular expressa quantidades significativas de MHC I, como visualizado por imunocitoquímica.

Após a comprovação da importância da expressão de MHC I por neurônios após lesão, Zanon & Oliviera (2006) investigaram a possibilidade de regular a expressão desse complexo através de tratamento exógeno com interferon beta, uma citocina pró-inflamatória empregada rotineiramente no tratamento de Esclerose Múltipla. Observaram que o IFN beta regula positivamente a expressão de MHC I após lesão nervosa e que tal aumento resulta em elevação da plasticidade sináptica medular. Assim, o tratamento com IFN beta resultou em

melhora do processo regenerativo axonal, acelerando a recuperação motora em camundongos submetidos ao esmagamento do nervo isquiático (Zanon *et al.*, 2010). No presente estudo, empregamos diferentes doses de IFN beta no sentido de induzir a expressão de MHC I em células PC12 diferenciadas, analisando o impacto sobre a plasticidade sináptica. De fato as culturas de células PC12 tratadas com IFN beta mostraram um relevante aumento na expressão de MHC I e uma diminuição na expressão de sinaptofisina, observado por imunocitoquímica. Os dados mostram uma maior expressão de MHC classe I no grupo tratado com 500 UI/mL de IFN beta, uma vez que a dose de 1000 UI/mL de IFN beta mostrou-se aparentemente tóxica às células, afetando sua morfologia e diferenciação.

A interrelação entre as expressões de sinaptofisina e MHC classe I foi reportada em vários trabalhos, sendo assim, após um aumento da expressão de MHC I, espera-se uma redução na densidade de sinapses, mostrado pela diminuição da expressão de sinaptofisina (Oliveira *et al.*, 2004; Zanon & Oliveira, 2006; Emirandetti *et al.*, 2006; Sabha *et al.* 2008). Nesse contexto, acreditamos que o modelo ora proposto apresenta características suficientes para embasar novos experimentos de regulação de MHC I bem como do impacto deste sobre a estabilidade e plasticidade sináptica. Assim, no presente trabalho testamos o impacto da adição de taurina, em diferentes concentrações, sobre a expressão de MHC I e plasticidade sináptica.

A taurina ou aminoácido 2-etanosulfônico é um dos aminoácidos mais abundantes em mamíferos (Jacobsen & Smith, 1968), sintetizada a partir dos aminoácidos metionina e cisteína, através de uma seqüência de reações

enzimáticas de oxidação e transulfuração que necessitam da participação da vitamina B6 como co-fator (Ganong, 1993). As necessidades dos aminoácidos sulfurados em adultos correspondem a 17 mg/g de proteína ingerida. Nos lactentes é de 42 mg/g de proteína e nos pré-escolares corresponde a 25 mg/g de proteína ingerida (Huxtable, 1992; Lajolo & Tirapegui, 1998; Newsholme & Leech, 1983).

O papel fisiológico da taurina recebeu considerável atenção desde relatos de dieta alimentar pobre em taurina acarretando degeneração central da retina (Hayes *et al.*, 1975). A taurina pode funcionar como um neuromodulador ou neurotransmissor no SNC que permite a manutenção da integridade estrutural da membrana e regula o transporte e carreamento de cálcio (Lombardini, 1992) e protege os neurônios contra neurotoxicidade induzida por glutamato (El Idrissi & Trenkner, 1999).

Destacamos aqui a função da taurina como neuroprotetor e, neste contexto, podemos encontrar várias pesquisas: a taurina promove melhora da recuperação das funções neuronais após hipóxia (Schurr *et al.*, 1987); tem propriedades neuroinibitórias e neuroprotetoras em casos de isquemia cerebral (Shuaib, 2003); inibe a liberação de glutamato, evitando o influxo de cálcio (Chen *et al.*, 2001). Tendo-se em vista o acima mencionado, buscamos avaliar em células PC12 tratadas com NGF no que diz respeito à regulação de MHC I e densidade sináptica.

O tratamento com taurina nas culturas de células PC12 mostrou um efeito neuroprotetor, visto que a exposição das células ao meio contendo 0,025 mg/mL

de taurina, resultou num aumento da expressão de sinaptofisina, conjugado com diminuição na expressão de MHC classe I. Os resultados obtidos com a dose de 0,025 mg/mL de taurina mostraram-se superiores ao grupo tratado com 0,050 mg/mL, uma vez que, sua adição em relativamente altas quantidades tornou o meio de cultura muito ácido. Como as células PC12 são sensíveis às variações do meio de cultura, o meio tornou-se impróprio para a manutenção celular, promovendo assim degeneração progressiva das culturas (Morton, 1970). Essa sensibilidade das células PC12 já foi relatada por outros pesquisadores. Assim, Greene e Tischeler (1976) mostraram que as células PC12 são sensíveis a meios de culturas pobres ou isentos de soro fetal equino e soro fetal bovino. Substituindo-se o meio DMEM por outros meios de cultura, como HAM-F12 (Morton, 1970), F-14 (Vogel *et al.* 1972), as PC12 também perdem a capacidade de divisão e degeneraram.

Em condições normais, a barreira hematoencefálica previne a entrada de células imunocompetentes, citocinas e anticorpos no SNC. Lesões ao SNC adulto como resultado de traumas, desordens genéticas ou alterações bioquímicas induzem uma série de mudanças fisiológicas incluindo-se isquemia local, edema, formação de radicais livres, reação inflamatória e a ativação de células gliais (Eng *et al.*, 2000). Tanto astrócitos quanto microglias tornam-se reativas, constituindo a chamada gliose reativa, caracterizada pela hipertrofia do corpo e processos celulares dos astrócitos e pela hiperplasia de ambos os tipos celulares (Privat *et al.*, 1981; Norton *et al.*, 1992; Eng *et al.*, 2000).

A astrogliose reativa tem sido indicada como o principal obstáculo para regeneração axonal no SNC (Stensaas *et al.*, 1987; Reier *et al.*, 1989). Em contraste, astrócitos reativos produzem substâncias neurotróficas que parecem estimular o crescimento axonal (Baba, 1998; Davies *et al.*, 1999).

A identificação histológica de astrócitos normais ou em situação patológica tem sido feita através de método imunohistoquímico que detecta antígenos da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), componente dos filamentos de tamanho intermediário do citoesqueleto celular, presente nos astrócitos e em algumas outras células (Eng & Ghirnikar, 1994, Cullen, 1997).

Em situações experimentais e também no homem, em alguns processos patológicos, o estudo da distribuição e da morfologia de astrócitos imunorreativos à GFAP têm se mostrado útil ao diagnóstico e tem contribuído para o conhecimento da importância da astrogliose (Eng & Ghirnikar 1994).

As células NG97 cultivadas no presente trabalho formaram monocamadas na superfície dos poços de cultura, onde se distinguiram duas populações celulares, sendo uma apresentando morfologia arredondada e outra com morfologia fusiforme, com aspecto radiado. Os dois tipos celulares ocorreram de modo relativamente uniforme mesmo após vários repiques (Grippio *et al.*, 2001), o que pode ser observado através de contraste de fase e coloração com azul de toluidina.

A proteína fibrilar glial ácida é um polipeptídeo de 48-52 KDa que constitui o principal componente do filamento intermediário de subclasse III presente em astrócitos (normais e reativos) e também em astrocitomas e glioblastomas (Eng *et*

al., 1971, Bonnin & Rubinstein, 1984.; Morrison e Prayson, 2000). Através da técnica de Western Blotting foi confirmada a expressão de GFAP nas células NG97, apresentando uma banda de 50 KDa. O padrão de positividade de GFAP nessas células é usualmente citoplasmático, sendo a proteína detectada tanto no corpo celular quanto nos processos celulares (Morrison & Prayson, 2000). Esse padrão está de acordo com nossas observações na imunocitoquímica anti-GFAP nas células NG97.

A célula glial é o substrato preferencial para o desenvolvimento neuronal, onde desempenha diversas funções como sintetizar elementos da matriz extracelular, como a laminina, que é especialmente fundamental para a o crescimento de neurônios (Garcia-Abreu *et al.*, 1995, Garcia-Abreu *et al.*, 2000); fatores de crescimento, como TGF β , EGF, TNF, FGF, (Gomes *et al.*, 1999, Trentin *et al.*, 2001; Rentin de Sampaio & Spohr, 2002), elementos chaves na diferenciação de células pluripotentes em vias neuronal ou glial e ainda na proliferação tanto da glia como dos neurônios. Produz ainda citocinas e prostaglandinas, como PGE2 que, indiretamente, controlam o papel da microglia na eliminação de neurônios, conseqüentemente implicando na estabilização do número de sinapses (Rozenfeld *et al.*, 2003). Mais recentemente, foi demonstrado que a glia tumoral é capaz de interagir com neurônios sadios (Faria *et al.*, 2006) e, além disto, parece ser receptiva a fatores neuronais que modulam a expressão de elementos de sua matriz extracelular (Garcia-Abreu *et al.*, 2000).

Diante das informações presentes na literatura, conjuntamente aos nossos resultados com meio normal, torna-se relevante a análise da interação neurônio-

glia, já que as células gliais, mais precisamente no presente contexto, os gliomas, podem ter papel importante na modulação da expressão do MHC classe I e na plasticidade sináptica. Como visto acima, a glia pode secretar elementos que interferem no desenvolvimento do SN ou após uma injúria, afetando assim a reorganização do SNC.

A fim de se avaliar a influência de fatores solúveis presentes no meio de cultura das células da linhagem NG97, este foi coletado e posteriormente utilizado para tratar células PC12. Tais experimentos também envolveram o emprego de NGF e tratamentos com IFN beta e taurina.

O tratamento com meio condicionado resultou num aumento na expressão MHC I, quando comparado com o meio normal no grupo controle. Já o tratamento com IFN, realçou ainda mais expressão de MHC I, sendo mais significativa no grupo tratado com 500 UI/mL. Em contraste, o meio condicionado reduziu significativamente a formação de sinapses, fato observado por imunocitoquímica e contraste de fase, que comprovaram a retração dos neuritos e pouca arborização dendrítica. O tempo decorrente entre o 5º e o 10º dias de cultivo nas células tratadas com IFN, mostrou-se crucial para as alterações morfológicas observadas, reforçando a hipótese que a importância da modulação do MHC I se dá na fase aguda pós estímulo/lesão.

O tratamento com meio condicionado conjugado a taurina, mesmo com suas funções neuroprotetoras já conhecidas, mostrou um aumento na expressão de MHC I, seguida da inibição na formação de sinapses. De forma semelhante, pesquisas feitas em co-culturas entre neurônios de cultura primária (E18) e

glioblastoma humano (GBm03, GBm02 e GBm95) mostraram um pequeno desenvolvimento na formação dos neuritos, o que foi comparado com co-culturas entre astrócitos normais e neurônios, os quais mostraram maior comprimento dos neuritos (Faria *et al.*, 1996). Conclui-se, portanto, que as propriedades da taurina foram sobrepujadas por fatores solúveis presentes no meio condicionado, que influenciaram a regulação do MHC classe I, conseqüentemente afetando a sinaptogênese nas células PC12.

7. Conclusões

- A célula PC12 apresenta características suficientes para embasar novos experimentos de regulação de MHC I bem como do impacto deste sobre a estabilidade e plasticidade sináptica.
- As culturas de células PC12 tratadas com IFN beta mostraram um significativo aumento na expressão de MHC I e uma diminuição na expressão de sinaptofisina, quando tratadas com meio normal.
- O tratamento com taurina conjugada ao meio normal resultou num aumento da expressão de sinaptofisina, seguida de uma diminuição na expressão de MHC classe I, mostrando assim seu papel neuromodulatório e neuroprotetor.
- O meio condicionado reduziu a formação de sinapses, o que provavelmente está ligado a fatores solúveis liberados pelas células NG97 (glioma humano).

8. Referências Bibliográficas

AERTS, L.; VAN ASSCHE, F.A. Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period. **Perinat Med.**, v.30, p.281-286, 2002.

AIRAKSINEN, M.S.; SAARMA, M. The GDNF family: signaling, biological functions and therapeutic value. **Nat Rev. Neurosci.**, v.3, p.383-394, 2002.

ALDSKOGIUS, H.; LIU, L; SVENSSON, M. Glial responses to synaptic damage and plasticity. **J. Neurosci. Res.**, v.58, p.33-41, 1999.

ALOISI, F.; AGREST, C.; LEVI, G. Glial conditioned media inhibit the proliferation of cultured rat cerebellar astrocytes. **Neurochem Res.**, v.12, p.189–195, 1987.

AOKE, C.; PICKEL, V.M. Ultrastructural Relations Between Beta-adrenergic Receptors and Catecholaminergic Neurons. **Brain Res Bull.**, v.29, p.257-263, 1992.

ARAQUE, P., PEREA, G. Glial Modulation of Synaptic Transmission in Culture. **Glia.**, v.47, p.241-248, 2004.

AREVALO, J.C.; WU, S.H. Neurotrophin signaling many exciting surprises! **Cell Mol Life Sci.**, v.63, p.1523-1537, 2006.

ARNASON, B.G.H. Interferon beta in multiple sclerosis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.81, p.1- 11, 1996.

BABA, A. Role of endothelin B receptor signals in reactive astrocytes. **Life Sci.**, v.62, p.1711-1715, 1998.

BAIMBRIDGE, K.G.; CELIO, M.R.; ROGERS, J.H. Calcium-binding proteins in the nervous system. **Trends Neurosci.**, v.15, p.303-308, 1992.

BARKHO, B.Z.; SONG, H.; AIMONE, J.B.; SMRT, R.D.; KUWABARA, T.; NAKASHIMA, K.; GAGE, F.H.; ZHAO, X. Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/ progenitor cell differentiation. **Stem cells Dev.**, v.15, p.407-421, 2006.

BERMEL, R.A.; RUDICK, R.A. Interferon-beta treatment for multiple sclerosis. **Neurotherap.**, v.4, p.633-646, 2007.

BIRDSALL, T.C.. Therapeutic applications of taurine. **Altern Med Ver.**, v.3, p.128–136, 1998.

BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature.**, v.361, p.31-39, 1993.

BONNIN, J.M.; RUBINSTEIN, L.J. Immunohistochemistry of central nervous system tumors. Its contributions to neurosurgical diagnosis. **J Neurosurg.**, v.60, p.1121–1133, 1984.

BOULANGER, L.M.; HUH, G.S.; SHATZ, C.J. Neuronal plasticity and cellular immunity: shared molecular mechanisms. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.11, p.568-578, 2001.

BRÄNNSTRÖM, T.; KELLERTH, J. Changes in synaptology of adult cat spinal α -motoneurons after axotomy. **Exp. Brain Res.**, v. 118, p.1-13, 1998.

BURNSTOCK, G.; COSTA, M. Inhibitory innervations of the gut. **Gastroenterology.**, v.64, p.141-144, 1973.

CANO-ABAD, M.F.; VILLARROYA, M.; GARCIA, A.G.; GABILAN, N.H.; LÓPEZ, M.G. Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. **J Biol Chem.**, v.276, p.39695–39704, 2001.

CHEN, W.Q.; JIN, H.; NGUYEN, M.; CARR, J.; LEE, Y.J.; HSU, C.C.; FAIMAN, M.D.; SCHLOSS, J.V.; WU, J.Y. Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. **Journal of Neurosc. Research.**, v.15, p.612-619, 2001.

CHVATAL, A.; SYKOVA, E. Glial influence on neuronal signaling. **Prog. Brain Res.**, v.125, p.199-216, 2000.

COHEN, S.; LEVI-MONTALCINI, R. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. **Proc Natl Acad Sci.**, v.42, p. 571-574, 1956.

CORRIVEAU, R.; HUH, G.S.; SHATZ, C. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. **Neuron**, v.21, p.505-520, 1998.

CULLEN, K.M. Antigen retrieval method for glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry: implications on neuropathological studies. **Brain Pathol.**, v.7, p.1179, 1997.

DAVIDSON COLLEGE. Interferon beta. **Davidson webpage**, 2000 Disponível em: <www.bio.davidson.edu/courses/immunology/students/spring2000/white/ifnbeta.html#overview>. Acessado em: 2010.

DAVIES, S.J.; GOUCHER, D. R.; DOLLOR, C.; SILVER, J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of adult spinal cord. **J Neurosci.**, v.209, p.426-445, 1999.

DE SAMPAIO E SPOHR, T.C.; MARTINEZ, R.; DA SILVA, E.F.; MOURA NETO, V.; GOMES, C. Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor- α . **Eur J Neurosci.**, v.16, p.2059- 2069, 2002.

DEROUICHE, A.; FROTHER, M. Preripheral astrocyte processes: Monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. **Glia**, v.36, p.330-341, 2001.

DOPICO, J.G.; GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; PEREZ, I.M.; GARCIA, I.G.; ABRIL, A.M.; INCHAUSTI, J.O.; RODRIGUEZ DIAS, M. Glycine release in the substantia nigra: interaction with glutamate and GABA. **Neuropharm.**, v.50, p.548–557, 2006.

ENG, L.; GHIRNIKAR, R.S.. GFAP and astrogliosis. **Brain Pathol.**, v.4, p.229-237, 1994.

ENG, L.F.; GHIRNIKAR, R.S.; LEE, Y.L. Glial Fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem. Res.**, v.25, p.1439-1451, 2000.

ENG, L.F.; VANDERHAEGHEN, J.J.; BIGNAMI, A.; GERSTL, B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. **Brain Res.**, v.28, p.351-354, 1971.

EL IDRISSE, A.; TRENKENER, E. Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. **J Neurosci** v.19, p. 9459 -9468, 1999.

EL IDRISSE, A.; TRENKNER, E. Taurine regulates mitochondrial calcium homeostasis. **Adv Exp Med Biol.**, v.36, p.526-527, 2003.

EMIRANDETTI, A.; GRACIELE ZANON, R.; SABHA, M.JR; DE OLIVEIRA, A.L. Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals opposed to spinal motoneurons after axotomy. **Brain Res.**, v.1095, p.35-42, 2006.

FARIA, J.; ROMÃO, L.; MARTINS, S.; ALVES, T.; MENDES, F.A.; de FARIA, G.P.; HOLLANDA, R.; TAKIYA, C.; CHIMELLI, L.; MORANDI, V.; de SOUZA, J.M.; ABREU, J.G.; MOURA NETO, V. Interactive properties of human glioblastoma cells with brain neurons in culture and neuronal modulation of glial laminin organization. **Differentiation.**, v.74, p.562-572, 2006.

FELLIN, T. Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. **J. Neurochem.**, v.108, p.533 - 544, 2009.

GANONG, W.F. **Fisiologia Médica**. 17.ed. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1993.

GARCIA-ABREU, J.; CAVALCANTE, L.A.; MOURA NETO, V. Differential patterns of laminin expression in lateral and medial midbrain glia. **Neuroreport.**, v.27, p.761-764, 1995.

GARCIA-ABREU, J.; MENDES, F.A.; ONOFRE, G.R.; DE FREITAS, M.S.; SILVA, L.C.; NETO, V.M.; CAVALCANTE, L.A. Contribution of heparin sulfate to the non-permissive role of the midline glia to the growth of midbrain neurites. **Glia.**, v.1, p.260-72, 2000.

GOMES, F.C.A.; PAULIN, D.; MOURA NETO, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Braz J Med and Biol Res.**, v.32, p.615-631, 1999.

GREENE, L.A.; TISCHLER, A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.73, p.2424-2428, 1976.

GOMES, F.C.; SPOHR, T.C.; MARTINEZ, R.; NETO, V.M. Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. **Braz J Med Biol Res.**, v.5, p.611-620, 2001.

GOMES, F.C.A.; PAULIN, D.; NETO, V.M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Braz J Med and Biol Res.**, v.32, p. 615-631, 1999a.

GREENE, L.; TISCHLER, A. PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. **Adv. Cell. Neurobiol.**, v.3, p.373-414, 1982.

GRIFFITH, R.; SUTIN, J. Reactive Astrocyte Formation in vivo is Regulated by Noradrenergic Axons. **J Comp Neurol.**, v.37, p.362-375, 1996.

GRIPPO, M.C.; PENTEADO, P.F.; CARELLI, E.F.; CRUZ-HOFLING, M.A.; VERINAUD, L. Establishment and partial characterization of a continuous human malignant glioma cell line: NG97. **Cell Mol Neurobiol.**, v.21, p.421-428, 2001.

GROSCHKE, J.; MATYASCH, V.; MÖLLER, T.; VERKHRATSKY, A.; REICHENBACH, A.; KATTENMANN, H. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergman glial cells. **Nat. Neurosci.**, v.2, p.139-143, 1999.

GSANDTNER, I.; FREISSMUTH, M. A tail of two signals: the C terminus of the A2A Adenosine receptor recruits alternative signaling pathways. **Mol. Pharmacol.**, v.70, p.447- 449, 2006.

GUPTA, R.C.; WIN, T.; BITTNER, S. Taurine analogues; a new class of therapeutics: retrospect and prospects. **Curr Med Chem.**, v.12, p.2021–2039, 2005.

HALEGOUA, S.; ARMSTRONG, R.C.; KREMER, N.E. Dissecting the mode of action of a neuronal growth factor. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.165, p.119-170, 1991.

HANSON, E. Metabotropic glutamate receptor activation induces astroglial swelling. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.21955-21961, 1994.

HANSON, E.; RÖNNBÄCK, L. Astrocytes in glutamate neurotransmission. **FASEB J.**, v.9, p.343-350, 1995.

HAYDON PG. Neuroglial networks: neurons and glia talk to each other. **Curr Biol.** v.19, p. 12-14, 2000.

HAYES, K.C.; CAREY, R.E.; SCHMIDT, S.Y. Retinal degeneration 537 associated with taurine deficiency in the cat. **Science.**, v.188, p.949–951, 1975.

HE, F.; SUN, Y.E. Cells in focus: Glial cells more than support cells?. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p. 661–665, 2007.

HENDIL, K.B.; HOFFMANN, E.K.. Cell volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells. **J Cell Physiol.**, v.84, p.115–125, 1974.

HONTANILLA, B.; PARENT, A.; DE LAS HERAS, S.; GIMENEZ-AMAYA, J.M.. Distribution of calbindin D-28k and parvalbumin neurons and fibers in the rat basal ganglia. **Brain Res Bull.**, v.47, p.107–116, 1998.

HUH, G.S.; BOULANGER, L.M.; DU, H.; RIQUELME, P.A.; BROTZ, T.M.; SHATZ, C.J. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. **Science.**, v.290, p.2155-2159, 2000.

HUXTABLE, R.J. The Physiological actions of taurine. **Physiol. Rev.**, v.72, p. 101-163, 1992.

HUXTABLE, R.J. Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. **Progress Neurobiol.**, v.32, p.471-533, 1989.

ITO, J.; TANAKA, R.; KATO, T. Interaction between neuron and glia in the culture system. **Hum Cell.**, v.2, p.143-149, 1989.

IZUMI, K.; BUTTERWORTH, R.F.; BARBEAU, A. Effect of taurine on calcium binding to microsomes isolated from rat cerebral cortex. **Life Sci.**, v.20, p.943-950, 1977.

JACOBSEN, J.G.; SMITH, J.R.L.H. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. **Physiol Rev.**, v.48, p.424-511, 1968.

JIANG, H.; MILO, R.; SWOVELAND, P.; JOHNSON, K.P.; PANITCH, H.; DHIB-JALBUT, S. Interferon β -1b reduces interferon γ -induced antigen-presenting capacity of human glial and B cells. **J. Neuroimmunol.**, v.61, p.17-25, 1995.

JUNYENT, F.; UTRERA, J.; ROMERO, R.; PALLA'S, M.; CAMINS, A.; DUQUE, D, AULADELL, C. Prevention of epilepsy by taurine treatments in mice experimental model. **J Neurosci Res.**, v.87, p.1500-1508, 2009.

JOLY, E.; MUCKE, L.; OLDSTONE, M.B.A. Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. **Science**, v.253, p.1283-1285, 1991.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of neural science**. 4.ed. McGraw-Hill, 2000.

KANG, J.; JIANG, L.; GOLDMAN, S.A.; NEDERGAARD, M. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. **Nat. Neurosci.**, v.1, p.683-692, 1998.

LAJOLO, F.M.; TIRAPEGUI, J. **Proteína e Aminoácidos**. In: Ciências Nutricionais. São Paulo: Sarvier, p.41-69, 1998.

LAMING, P.R.; KIMELBERG, H.; ROBINSON, S.; SALM, A.; HAWRYLAK, N.; MULLER, C.; ROOTS, B. Neuronal–glial Interactions and Behaviour. **Neurosc Biobehav Rev.**, v.24, p.295-340, 2000.

LAMPSON, L.A.; HICKEY, W.F. Monoclonal antibody analysis of MHC expression in human brain biopsies; tissue ranging from histologically normal to that showing different levels of glia tumor involvement. **J. Immunol.**, v.136, p.4054-4062, 1986.

LEHMANN, A.; HAGBERG, H.; JACOBSON, I.; HAMBERGER, A. Effects of status epilepticus on extracellular amino acids in the hippocampus. **Brain Res.**, v.359, p.147–151, 1985.

LEHMANN, A.; HAGBERG, H.; HAMBERGER, A. A role of taurine in the maintenance of homeostasis in the central nervous system during hyperexcitation? **Neurosci Lett.**, v.52, p.341-346, 1984.

LIE, D.C.; COLAMARINO, S.A.; SONG, H.J. Wnt signaling regulates adult hippocampal neurogenesis. **Nature.**, v.437, p.1370–1375, 2005.

LIM, D. A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v.96, p.7526–7531, 1999.

LINDA, H.; HAMMARBERG, H.; CULLHEIM, S.; LEVINOVITZ, A.; KHADEMI, M.; OLSSON, T. Expression of MHC class I and beta2-microglobulin in rat spinal motoneurons: regulatory influences by IFN γ and axotomy. **Exp. Neurol.**, v.150, p.282-295, 1998.

LINDA, H.; HAMMARBERG, H.; PIEHL, F.; KHADEMI, M.; OLSSON, T. Expression of MHC class I heavy chain and beta2-microglobulin in rat brainstem motoneurons and nigral dopaminergic neurons. **J. Neuroimmunol.**, v.101, p.76-86, 1999.

LJUNGGREN, H.G.; KÄRRE, K. In search for the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. **Immunol. Today**, v.652, p.174-176, 1990.

LOMBARDINI, J. Effect of taurine on the phosphorylation of specific protein in subcellular fractions of the rat retina. **Neurochemical research**. v. 17, p. 821-824, 1992.

MA, D.K.; MING, G.L.; SONG, H. Glial influences on neural stem cell development cellular niches for adult neurogenesis. **Curr opin Neurobiol.**, v.15, p.514-520, 2005.

MACHADO, A.B.M. **Neuroanatomia funcional**. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.

MACHADO, C.M.; SCHENKA, A.; VASSALLO, J.; TAMASHIRO, W.M.; GONÇALVES, E.M.; GENARI, S.C.; VERINAUD, L. Morphological characterization of a human glioma cell line. **Cancer Cell Int.**; v.5, p.13, 2005.

MARTINEZ, R.; GOMES, F.C. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. **J Biol Chem.**, v.51, p.311-318, 2002.

McNAMARA, J.O.. The neurobiological basis of epilepsy. **Trends Neurosci.**, v.15, p.357-359, 1992.

MEYER, F.B.. Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. **Brain Res Rev.**, v.14, p.227-243, 1989.

MORRISON, C.D.; PRAYSON, R.A. Immunohistochemistry in the diagnosis of neoplasms of the central nervous system. **Semin. Diagn. Pathol.**, v.17, p.204-215, 2000.

MORTON, H. J. A survey of commercially available tissue culture media. **In vitro.**, v.6, p.89-108, 1970.

MOURA NETO, V.; NETO, V.M.; MOURA-NETO V.; KRYSZKE, M.H.; LI, Z.; VICART, P.; LILIENBAUM, A.; PAULIN, D. A 28-bp Negative Element With Multiple Factor-Bindingg Activitv Controls Expression of the Vimentin-encoding Gene. **Gene.**, v.168, p.261-268, 1996.

MUCKE, L.; OLDSTONE, M.B.A. The expression of major histocompatibility complex (MHC) class I antigens in the brain differs markedly in acute and persistent infections with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). **J. Neuroimmunol.**, v.36, p.193-198, 1992.

MURAMATSU, K.; KAKITA, K.; NAKAGAWA, K.; KURIYAMA, K. A modulating role of taurine on release of acetylcholine and norepinephrine from neuronal tissues. **J Pharmacol.**, v.28, p.259–268, 1978.

NAGELHUS, E.A.; AMIRY-MOGHADDAM, M.; LEHMANN, A.; OTTERSEN, O.P. Taurine as an organic osmolyte in the intact brain: immunocytochemical and biochemical studies. **Advan Experim Medic and Biol.**, v.359, p.325–334, 1994.

NEWSHOLME, E.A.; LEECH, A.R. **Biochemistry for the medical sciences.** Chichester: John Wiley & Sons, 952p, 1983.

NORTON, W.T.; AQUINO, D.A.; HOZUMI, I.; CHIU, F.C.; BROSNAN, C.F. Quantative aspects of reactive gliosis. A review. **Neurochem. Res.**, v.17, p.877-885, 1992.

OJA, S.S.; KONTRO, P. **Taurine.** In: Handbook of Neurochemistry, New York: Plenum Press., v.3, p.501-533, 1983.

OLIVEIRA, A.L.R.; THAMS, S.; LIDMAN, O.; PIEHL, F.; HÖKFELT, T.; KÄRRE, K.; LINDA, H.; CULHEIM, S. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, p.17843-17848, 2004.

PALMI, M.; YOUMBI, G.T.; FUSI, F.; SGARAGLI, G.P.; DIXON, H.B.; FROSINI, M.; TIPTON, K.F.. Potentiation of mitochondrial Ca²⁺ sequestration by taurine. **Biochem Pharmacol.**, v.58, p.1123–1131, 1999.

PASANTES-MORALES, H.; MORAN, J.; SCHOUSBOE, A. Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanism. **Glia.**, v.3, p.427–432, 1990.

PRIVAT, A.; VALAT, J.; FULCRAND, J. Proliferation of neuroglial cell lines in the degenerating optic nerve of young rats. A radioautographic study. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v.40, p.46-60, 1981.

RAJKOWSKA, G. Postmortem Studies in Mood Disorders Indicate Altered Numbers of Neurons and Glial Cells. **Biol. Psychiatry.**, v.48, p.766-777, 2000.

RALL, G.F.; MUCKE, L.; NERENBERG, M.; OLDSTONE, M.B.A. A transgenic mouse model to assess the interaction of cytotoxic T lymphocytes with virally infected, class I MHC-expressing astrocytes. **J. Neuroimmunol.**, v.52, p.61-68, 1994.

REIER, P.J.; ENG, L.F.; JAKEMAN, L.. Reactive astrocyte and axonal outgrowth in the injured CNS: is gliosis really an impediment to regeneration? **Neur. Reg. Transpl. Front. Clin. Neurosci.**, v.6, p.193-209, 1989.

ROGERS, J.H.; RESIBOIS, A. Calretinin and calbindin-D28k in rat brain: patterns of partial co-localization. **Neurosc.**, v.51, p.843–865, 1992.

ROZENFELD, C.; MARTINEZ, R.; FIGUEIREDO, R.T.; BOZZA, M.T.; LIMA, F.R.; PIRES, A.L.; SILVA, P.M.; BONOMO, A.; LANNES-VIEIRA, J.; DE SOUZA, W.; MOURA NETO, V. Soluble factors released by *Toxoplasma gondii*-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration. **Infect Immun.**, v.71, p.047-057, 2003.

RUSAKOV, D.A.; KULLMANN, D.M. Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. **J. Neurosci.**, v.18, p.3158- 3170, 1998.

SABHA, M. JR; EMIRANDETTI, A.; CULLHEIM, S.; DE OLIVEIRA, A.L. MHC I expression and synaptic plasticity in different mice strains after axotomy. *Synapse*, v.62, p.137-148, 2008.

SATOH, H. Cardiac actions of taurine as a modulator of the ion channels. **Adv Exp Med Biol.**, v.442, p.121-128, 1998.

SATOH, H. Direct inhibition by taurine of the ATP-sensitive k⁺ channel in guinea pig ventricular cardiomyocytes. **Gen Pharmacol.**, v.27, p.625-627, 1996.

SCHENKA, A.A.; MACHADO, C.M.; GRIPPO, M.C.; QUEIROZ, L.S.; SCHENKA, N.G.; CHAGAS, C.A.; VERINAUD, L.; BROUSSET, P.; VASSALLO, J. Immunophenotypic and ultra structural characterization of a recently established human malignant glioma cell line: NG-97. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v.5, p.929-941, 2005.

SCHULLER-LEVIS, G.B.; PARK, E. Taurine new implications for an old amino acid. **FEMS Microbiology Letters.**, v.226, p.195-202, 2003.

SCHURR, A.; TSENG, M.T.; WEST, C.A.; RIGOR, B.M.. Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia: an in vitro study. **Life Sci** v.40, p.059–2066, 1987.

SENSENBRENNER, M.; JAROS, G.G.; MOONEN, G.; MEYER, B.J. Effect of conditioned media on nerve cell differentiation. **Experientia.**, v.36, p.660–662, 1980.

SHIRAYOSHI, Y.; BURKE, P.A.; APPELA, E.; OZATO, K. Interferon-induced transcription of a major histocompatibility class I gene accompanies binding of inducible nuclear factors to the interferon consensus sequence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.85, p.5884-5888, 1988.

SHUAIB, A. The role of taurine in cerebral ischemia: studies in transient forebrain ischemia and embolic focal ischemia in rodents. **Adv Exp Med Biol.**, v.526, p.421–431, 2003.

SOLIS, J. M.; Herranz, A.S.; Herraras, O.; Lerma, J.; Martin de1 Rio, R. Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain? **Neurosci. Lett.**, v.91, p.53-58, 1988.

SONG, H.; Stevens, C.F.; Gage, F.H. Astroglia induces neurogenesis from adult neural stem cells. **Nature.**, v.417, p.39–42, 2002.

SPACEK, J. Three-dimensional analysis of dendritic spines. III. **Glial Sheets Anat. Embryol.**; v.171, p.245- 252, 1985.

SPECKMANN, E.J.; WALDEN, J.; BINGMANN, D. Functional implication of calcium ions in epileptic seizures. Antiepileptic effects of organic calcium antagonists. **Arzneimittelforschung.**, v.39, p.149–156, 1989.

STENSAAS, L.J.; PARTLOW, L.M.; BURGESS, P.R.; HORCH, K.W. Inhibition of regeneration: the ultrastructure of reactive astrocytes and abortive axon terminals in the transition zone of the dorsalroot. **Prog Brain Res.**, v.71, p.457–468, 1987.

STURMAN, J.A.; GAULL, G.E. Taurine in the brain and liver of developing human and monkey. **J Neurochem.**, v.25, p.831-835, 1975.

STURMAN, J.A.; HAHES, K.C. The biology of taurine in nutrition and development. **Adv Nutr Res.**, v. 3, p.231-299, 1980.

SYKOVA, E.; JANDELOVA, P.; SVOBODA, J.; SEDMAN, G.; NG, K. T. Activity-Related Rise in Extracellular Potassium Concentration in the Brain of 1–3-day-old Chicks. **Brain Res. Bull.**, v.24, p.569–575, 1990.

TAMURA, H.O.; NOTO, M.; KINOSHITA, K.; OHKUMA, S.; IKEZAWA, H. Inhibition of NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells by Bacillus cereus sphingomyelinase, a bacterial hemolysin. **Toxicon.**, v.32, p.629–633, 1994.

TARDY, M. Astrocyte et Homeostasie. **Médecine Science**, v.8, n.7, p.799-804, 1991.

TAYLOR, A.R.; ROBINSON, M.B.; MILLIGAN, C.E. In vitro methods to prepare astrocyte and motoneuron cultures for the investigation of potential in vitro interactions. **Nat Prot.**, v.2, p.1499-1507, 2007.

THEODOSIS, D.T.; TRAILIN, A.; POULAIN, D.A. Remodeling of astrocytes, a prerequisite for synapse turnover in the adult brain? Insights from the oxytocin system of the hypothalamus. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.290, n.5, p.1175-1182, 2006.

TRAN, C.T.; WOLZ, P.; EGENSEPERGER, R.; KOSEL, S.; IMAI, Y.; BISE, K.; KOHSAKA, S.; MEHRAEIN, P.; GRAEBER, M.B. Differential expression of MHC class II molecules by microglia and neoplastic astroglia: relevance for the escape of astrocytoma cells from immune surveillance. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v.24, p.293-301, 1998.

TRENKNER, E. Possible role of glutamate with taurine in neuron-glia interaction during cerebellar development. In: PASANTES-MORALES-MORALES, H.; MARTIN, D.L.; SHAIN, W.; MARTIN DEL RIO, R. editors. Taurine: functional neurochemistry, physiology, and cardiology. New York: Wiley-Liss., p.133–140, 1990.

TRENTIN, A.; ALVAREZ-SILVA, M.; MOURA NETO, V.; NETO, V.M.; MOURA-NETO V. Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors.. **American Journal of Physiol: Endocrinology and Metabolism.**, v.281, p.1088-1094, 2001.

TRICARICO, D.; BARBIERI, M.; CONTE CAMERINO, D. Acetazolamide opens the muscular KCa^{2+} channel: a novel mechanism of action that may explain the therapeutic effect of the drug in hypokalemic periodic paralysis. **Ann Neurol.**, v.48, p.304–312, 2000.

VANDENBRANDEN, C.A.V.; VERWEIJ, J.; KAMERMANS, M.; MÜLLER, L.J.J.M.; RUIJTER, J.M.; VRENSSEN, G.F.J.M.; SPEKREIJSE, H. Clearance of neurotransmitter from the cone synaptic cleft in goldfish retina. **Visual Res.**, v.36, p.3859-3874, 1996.

VERKHRATSKY, A.; STEINHAUSER, C. Ion channels in glial cells. **Brain Res. Rev.**, v.32, p.380-412, 2000.

VERNADAKIS, A. Glia-Neuron intercommunications and synaptic plasticity. **Prog. Neurobiol.**, v.49, p.185-214, 1996.

VOGEL, Z.; SYTKOWSKI, A.J.; NIRENBERG, M.W. Acetylcholine receptors of muscle grown in z&o. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.69, p.3180-3184, 1972.

XIAO, J.; PRADHAN, A.; LIU, Y. Functional role of JNK in neuritogenesis of PC12-N1 cells. **Neuroscience letters.**, v.392, p.231-234, 2006.

WADE, J.V.; OLSON, J.P.; SAMSON, F.E.; NELSON, S.R.; PAZDERNIK, T.L.; A possible role for taurine in osmoregulation within the brain. **J Neurochem.**, v.51, p.740–745, 1988.

WALZ, W.; SCHLUE, W.R. Ionic Mechanism of a Hyperpolarizing 5 hydroxytryptamine Effect on Leech Neuropile Glial Cells. **Brain Res.**, v.250, p.111–121, 1982.

WESTON, J. The migration and differentiation of neural crest cells. **Adv. Morph.**, v.8, p.41-114, 1970.

WILLIAMS, K.A., HART, D.N.J., FABRE, J.W., MORRIS, P.J. Distribution and quantitation of HLA-ABC and DR (Ia) antigens on human kidney and other tissues. **Transplantation.**, v.29, p.274-279, 1980.

WOLFF, J.R. Quantitative aspects of astroglia. In: **Proceedings of the sixth international congress of neuropathology**, Paris: Masson; p. 327-352, 1970.

WRIGHT, C.E.; TALLAN, H.H.; LIN, Y.Y.; GAULL, G.E. Taurine: biological update. **Annu Rev Biochem.**, v.55, p. 427–453, 1986.

WU, H.; JIN, Y.; WEI, J.; JIN, H.; SHA, D.; WU, J.Y. Mode of action of taurine as a neuroprotector. **Brain Res.**, v.1038, p.123–131, 2005.

WU, J.Y.; LIN, C.T.; JOHANSEN, F.F.; LIU, J.W. Taurine neurons in rat hippocampal formation are relatively inert to cerebral ischemia. **Adv Exp Med Biol.**, v.359, p.289–298, 1994.

ZANON, R.G.; CARTAROZZI, L.P.; VICTÓRIO, S.C.S.; MORAES, J.C.; MORARI, J.; VELLOSO, L.A.; OLIVEIRA, A.L.R. Interferon (IFN) beta treatment induces major histocompatibility complex (MHC) class I expression in the spinal cord and enhances axonal growth and motor function recovery following sciatic nerve crush in mice. **Neuropathology and Applied Neurobiology.**, v.36, p.515–534, 2010.

ZANON, R.G.; OLIVEIRA, A.L. MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transection. **Exp Neurol.**, v.200, p.521-531, 2006.