CARLOS ALEXANDRE DOS SANTOS HAEMMERLE

**CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS
IMUNORREATIVAS A 5-BROMO-2-DEOXIURIDINA (BRDU)
NA ZONA VENTRICULAR E SUB-VENTRICULAR ADULTA E DE SUA
RELAÇÃO COM O PEPTÍDEO REGULADOR CART**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

CARLOS ALEXANDRE DOS SANTOS HAEMMERLE

**CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS
IMUNORREATIVAS A 5-BROMO-2-DEOXIURIDINA (BRDU)
NA ZONA VENTRICULAR E SUB-VENTRICULAR ADULTA E DE SUA
RELAÇÃO COM O PEPTÍDEO REGULADOR CART**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Ii-sei Watanabe

Versão Original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Haemmerle, Carlos Alexandre dos Santos.

Caracterização ultra-estrutural das células imunorreativas a 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) na zona ventricular e sub-ventricular adulta e de sua relação com o peptídeo regulador CART / Carlos Alexandre dos Santos Haemmerle. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Ii-Sei Watanabe.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Ultraestrutura das terminações nervosas.

Versão do título para o inglês: Ultrastructural characterization of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) immunoreactive cells in adult ventricular and subventricular zone and its relationship with the regulating peptide CART.

1. Cérebro 2. Microscopia eletrônica 3. Neurônios 4. Peptídeos 5. Neuroquímica 6. Axônios I. Watanabe, Prof. Dr. Ii-Sei II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB03/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carlos Alexandre dos Santos Haemmerle.

Título da Tese: Caracterização ultra-estrutural das células imunorreativas a 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) na zona ventricular e sub-ventricular adulta e de sua relação com o peptídeo regulador CART.

Orientador(a): Prof. Dr. Ii-Sei Watanabe.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **128** nas fls. **93** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Li-
Sei-Watanabe, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Caracterização da zona subependimária e das células imunorreativas à 5-bromo-2`deoxiuridina (BrdU) do epêndima do ventrículo lateral, m ratos Long-Evans** do qual participam o(s) alunos **Carlos Alexandre dos Santos Haemmerle**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **04.11.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 11 de novembro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP

A Deus, presente em todos os sinais.
Ainda que em minha pequenez eu não
seja capaz de Vos reconhecer
conforme a plenitude de Vosso Amor
prediz, conceda-me a Graça de ver em
Maria, Virgem Santíssima, a porta que
me fará mais devotado e comprometido
com a vida renovada por Nosso Senhor
Jesus Cristo, de modo a cooperar
convosco no exercício do serviço.

Aos meus pais Roberto e Ermínia. Com
seus exemplos de pleno amor, entrega,
conselho, confiança e proteção,
reforçam e me inspiram na
necessidade constante de caminhar em
busca de uma promissora formação
humana e profissional, voltada ao
exercício da dignidade daqueles que
estiverem à minha volta.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Ii-sei Watanabe, pelo constante estímulo a meu crescimento humano e profissional. Ao observar sua dedicação e esforço para a realização de trabalhos primorosos, ao mesmo tempo que recebi sua confiança e paciência para minhas notáveis e inúmeras limitações, pude ter a honra de conviver com um raro exemplo de ser-humano com a mais alta predileção para as grandes virtudes humanas. Estas sempre serão lembradas e farão parte das inspirações para uma plena entrega à profissão e àqueles a quem eu for incumbido de ensinar. A responsabilidade de ter a tutela do Prof. Dr. Ii-sei Watanabe é grande, e ao mesmo tempo me permitirá continuar a viver com amor a investigação sobre a Morfologia Humana;

À Profa. Dra. Maria Inês Nogueira, que com o exercício de sua postura e palavras naturalmente acolhedoras, encorajadoras e de reflexão para uma auto-avaliação, me incitou ao trabalho constante, responsável e colaborador, pontos essenciais para o delineamento de uma promissora carreira científica;

Ao Prof. Dr. Arturo Alvarez-Buylla, um verdadeiro e inigualável cientista que me mostrou grandes virtudes humanas desde os primeiros contatos estabelecidos. Me proporcionou a honra e prazer de conviver em seu laboratório e vivenciar a constante investigação para a compreensão de um campo da neurociência, onde seu pioneirismo confirma que o amor e devoção árdua caminham juntos como formas recíprocas de alimentar a busca pela dignidade da compreensão da vida, por meio de trazer à tona a verdade.

Aos professores do departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, em especial ao Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt, Prof. Dr. Newton Sabino Canteras, Profa. Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves, Profa. Dra. Claudimara Ferrini Pacicco Lotfi e Profa. Dra. Marucia Chacur, sempre dispostos a colaborar, esclarecer e emitir opiniões de maneira muito solícita, e que foram muito importantes para a execução de etapas cruciais deste trabalho.

À Profa. Dra. Silvia Honda Takada e Prof. Dr. Luiz Fernando Takase, que com sua atenção constante, foram muito especiais para a elaboração inicial deste plano de trabalho. Mostraram-me o quanto é valioso e ainda presente a doação de tempo de forma incondicional, cuja recompensa se dá unicamente na satisfação com a obtenção de avanços do conhecimento.

A todos os funcionários do departamento de Anatomia, e de modo especial à Sonia Maria Yokomizo de Almeida, Marta Maria da Silva Righetti e Sebastião Aparecido Boleta, que com o convívio constante e co-operador, contribuíram não só com as necessidades de minha formação como aluno, mas também

com a construção de uma instituição que evolui em graus de referência no ensino e pesquisa do Brasil;

Aos meus colegas contemporâneos de laboratório Diego Pulzatto Cury e Fernando José Dias, que compuseram a seu tempo um grupo de pesquisa de exemplar altruísmo e esclarecimento argumentativo. Apresentam um grande caráter construtivista para uma próxima, e próspera, geração de professores e pesquisadores;

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas, que sempre agem com total prestatividade e atenção durante todas as ocasiões em que se necessita de sua colaboração ou serviço e tornaram muito prazerosos e produtivos os períodos devotados dentro deste espaço de estudo e aprendizagem.

Aos funcionários das secretarias de pós-graduação, do departamento de Anatomia e acadêmica do Instituto de Ciências Biomédicas, que sempre demonstraram grande atenção, solicitude, apoio e paciência durante minha formação nessa instituição de ensino e pesquisa.

À FAPESP, cujo fomento permitiu-me dedicar a esta investigação de maneira integral e imensamente satisfatória, sendo crucial nessa etapa de minha formação humana e acadêmica. À CAPES, pelos suportes financeiros e incentivos científicos contínuos que contribuem para a progressão do programa de pós-graduação deste instituto.

“Aplica teu coração ao ensino
e teu ouvido às palavras que trazem conhecimento (...)

Escuta teu pai, que te gerou
e não desprezes tua mãe envelhecida.

Adquire a verdade mas não a vendas;
adquire a sabedoria, a instrução e o entendimento.”

Pr 23, 12. 22-23

“Há um tema que tudo atravessa: a precariedade das ocupações
humanas.

Tudo é *vaidade*, ou seja, conforme o sentido hebraico
original da palavra: neblina, fumaça, ilusão”

Ecl, conteúdo geral.

RESUMO

HAEMMERLE, C. A. S. **Caracterização ultraestrutural das células imunorreativas a 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) na zona ventricular e sub-ventricular adulta e de sua relação com o peptídeo regulador CART.** 2015. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O maior nicho para a formação de novos neurônios no encéfalo adulto está ao redor dos ventrículos laterais. Neste local há um grupo de células com sua morfologia peculiar e derivadas de etapas específicas do processo de proliferação e diferenciação celular, que irão determinar a formação do neurônio. Porém, a descrição das células que iniciam a neurogênese nessa região ainda é controversa. Neste sentido, corroborar a caracterização ultraestrutural das células, principalmente as que tenham entrado em ciclo de divisão, pode contribuir nesse debate. Ademais, a compartimentalização da região periventricular reflete um padrão de distribuição de fibras axonais, como as carreadoras do peptídeo neuroativo CART, cuja descrição de seu padrão de inervação e de suas relações com as células do nicho neurogênico, pode abrir perspectivas para o entendimento de um provável papel deste fator modulador biológico no nicho periventricular. Assim, propomos: 1) estudar a citoarquitetura em nível ultraestrutural das células imunorreativas (ir) ao BrdU localizadas na região periventricular; 2) colaborar para a compreensão da organização tridimensional *in situ* dessa região e 3) descrever a inervação por fibras axonais imunorreativas ao CART e supostas aposições estabelecidas com células próprias da região periventricular. Utilizamos ratos Long-Evans e camundongos C57Bl6 e GFAP:GFP, adultos. Os animais foram perfundidos com diferentes soluções fixadoras para posterior análise ultraestrutural da morfologia celular e neuroquímica na região periventricular do encéfalo, em microscópios eletrônicos de transmissão e varredura de alta-resolução, de luz e laser confocal. O estudo da proliferação na zona periventricular ocorreu a partir da administração de 2% arabinofuranosida (Ara-C) e do marcador de ciclo mitótico BrdU (50 mg/kg, i.p.). A investigação imunoistoquímica utilizou anticorpos primários anti-BrdU, anti-CART, anti-DCX, anti-GFAP e anti-GFP. As células da região periventricular foram ir-BrdU, em sua totalidade, embora com variação na densidade de marcação. Observamos que estas ocorridas no revestimento ventricular correspondem a células endimárias, tanicitos e astrócitos. Essas células são heterogêneas quanto a densidade de distribuição ciliar, apresentando-se uni, bi ou multi-ciliadas, além de serem inervadas em sua superfície apical por axônios varicosos. Encontramos que a maior densidade de inervação por axônios ir-CART ocorre ao longo do trajeto migratório dos neurônios em formação e que esses axônios estabelecem aposições entre progenitores primários, neuroblastos e células que entraram em mitose. Portanto, 1) todas as células do nicho periventricular são ir-BrdU; 2) a organização tridimensional *in situ* do ventrículo lateral evidencia a heterogeneidade na densidade de implantação ciliar e uma densa inervação varicosa aposta aos diferentes cílios; 3) evidências anatômicas sugerem um papel do peptídeo regulador CART na neurogênese periventricular.

Palavras-chave: Neurogênese. Ventrículo lateral. Epêndima. Axônio.

ABSTRACT

HAEMMERLE C. A. S. **Ultrastructural characterization of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) immunoreactive cells in adult ventricular and subventricular zone and its relationship with regulating peptide CART.** 2015. 100 p. Ph. D. Thesis (Morphofunctional Sciences) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The major niche for generation of new neurons in adult brain surrounds the lateral ventricles. In this local there is a group of cells with unique morphology and derived from specific steps of proliferation process and cell differentiation, that will generate the neuron. However, the description of cell that initiates the proliferation in this region is still controversial. In this way, to corroborate the ultrastructural characterization of the cells, mainly that entered in cycle of division, can contribute to solve the debate. Furthermore, the compartmentalization of periventricular region leads to a pattern of distribution for axonal fibers, as that transmit the neuroactive peptide CART, which description of its innervation and its relationship with cells of this neurogenic niche may highlight perspectives for understand the putative role of this modulator factor in the periventricular neurogenic niche. So, we aim: 1) to study the cytoarchitecture in ultrastructural level of BrdU immunoreactive (ir) cells located in periventricular region; 2) to collaborate for comprehension of tridimensional *in situ* organization of this region and 3) to describe the innervation of CART-ir axonal fibers and putative apositions established with canonical cells of periventricular region. We used Long-Evans rats and C57Bl6 and GFAP:GFP mice, adults. The animals were perfused with different fixative solutions for further ultrastructural analysis of cell morphology and neurochemistry in the periventricular region of brain, by transmission and high-resolution scanning electron microscopes, light and laser confocal. The study of proliferation at periventricular region occurred after delivery of 2% arabinofuranoside (Ara-C) and the mitotic cell cycle marker BrdU (50 mg/kg, i.p.). The immunohistochemistry investigation used the primary antibodies anti-BrdU, anti-CART, anti-DCX, anti-GFAP and anti-GFP. The entire cells in periventricular region were BrdU-ir, but with variation in density of staining. We observed these occurring in ventricle lining corresponded to ependymal cells, tanycytes and astrocytes. These cells are heterogeneous in density of cilia distribution, presenting single, bi or multi-ciliated, besides be innervated in its apical surface by varicosal axons. We found the major density of CART-ir innervation in migratory path of neurons in formation and that these axons established apositions among neural primary progenitors, neuroblasts and cell that entered the S-phase of mitotic cycle. Therefore, 1) all cells of periventricular niche are BrdU-ir; 2) the tridimensional *in situ* organization of lateral ventricle highlights the heterogeneity in density of ciliary implantation and a dense varicosal innervation apposed to the different cilia; 3) anatomical evidences suggest a role for the regulator peptide CART in periventricular neurogenesis.

Key-words: Neurogenesis. Lateral ventricle. Ependyma. Axon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	A árvore genealógica das células tronco neurais	21
Figura 2.	Visão esquemática do ciclo de transformação celular que ocorre no nicho neurogênico do ventrículo lateral	25
Figura 3.	A região periventricular do ventrículo lateral do rato	46
Figura 4.	As células de revestimento do ventrículo lateral	50
Figura 5.	Adesão intracelular e organelas não-membranosas na camada ependimária	51
Figura 6.	A característica multiciliada das células ependimárias	52
Figura 7.	O nicho neurogênico do ventrículo lateral	54
Figura 8.	A via humoral na zona subventricular	55
Figura 9.	A imunorreatividade ao BrdU na região periventricular, pelo método da peroxidase	57
Figura 10.	Padrão de imunorreatividade ao BrdU na zona subventricular, pelo método das partículas elétron-densas	59
Figura 11.	Neuroblastos imunorreativos ao BrdU presentes na extremidade ventral do ventrículo lateral	60
Figura 12.	Células imunorreativas ao BrdU também são apostas a vasos sanguíneos	61
Figura 13.	Células ciliadas que revestem o ventrículo lateral também são imunorreativas ao BrdU	62
Figura 14.	Tanicitos na superfície ependimária exibem imunorreatividade ao BrdU	64
Figura 15.	Aspectos tridimensionais <i>in situ</i> da superfície ciliada do ventrículo lateral	66
Figura 16.	A superfície ciliada observada pela microscopia eletrônica de varredura de alta-resolução	67
Figura 17.	Axônios estão presentes na superfície ependimária do ventrículo lateral	68

Figura 18.	A inervação das células ciliadas da superfície ependimária do ventrículo lateral	69
Figura 19.	A organização e varicosidades dos axônios na superfície ependimária do ventrículo lateral	70
Figura 20.	Ramificações dos axônios e suas aposições com células uni-ciliadas na superfície ependimária do ventrículo lateral	71
Figura 21.	Aspectos tridimensionais <i>in situ</i> da zona subventricular do ventrículo lateral	73
Figura 22.	A inervação imunorreativa ao CART na região periventricular	75
Figura 23.	A relação entre axônios e/ou varicosidades ir-CART com as projeções de astrócitos ir-GFAP na SVZ	77
Figura 24.	As relações entre varicosidades axonais ir-CART e astrócitos B1, durante a entrada em fase-S do ciclo mitótico	78
Figura 25.	A relação entre axônios ir-CART e a cadeia migratória de neuroblastos na SVZ	79
Figura 26.	Aposições entre axônios ir-CART e células em fase-S do ciclo de proliferação	80
Figura 27.	A ultraestrutura das aposições dos axônios ir-CART na SVZ	82
Figura 28.	Acoplamento de vesículas sinápticas e os tipos de sinapses estabelecidas pelos axônios ir-CART na SVZ	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos primários utilizados nos experimentos.....	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3V: terceiro ventrículo

6-OHDA: 6 hidroxidopamina

Acb: núcleo *accumbens*

AP: ântero-posterior

BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

CART: transcrito regulado pela cocaína e anfetamina

ChAT: colina acetiltransferase

CNS: parte central do sistema nervoso

CRF: fator liberador de corticotrofina

DAB: diaminobenzidina

DCX: doublecortin

DNA: ácido desoxirribonucléico

DV: dorso-ventral

E9: nono dia de vida embrionária

GABA: ácido γ -amino butírico

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*

ir: imunorreativas

LV: ventrículo lateral

MET: microscopia eletrônica de transmissão

ML: médio-lateral

RNA_m: ácido ribonucléico mensageiro

SOM: somatostatina

SVZ: zona subventricular

TRH: hormônio liberador de tireotrofina

VTA: área tegmental ventral

VZ: zona ventricular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	O nicho germinativo periventricular: observação desde o desenvolvimento embrionário até a idade adulta	20
2.2	Morfologias especiais das células da região periventricular adulta	26
2.3	Bases ultraestruturais para a identidade proliferativa e reguladora da SVZ	27
2.4	Neurogênese e sua regulação na SVZ	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Animais	30
3.2	Indução da proliferação de células quiescentes e administração de BrdU	31
3.3	Preparações e processamento dos tecidos	32
3.3.1	<i>Análise ultraestrutural das células das regiões ventricular e subventricular, pela microscopia eletrônica de transmissão</i>	32
3.3.2	<i>Análise ultraestrutural das células ir-BrdU do epêndima e da SVZ, pela microscopia eletrônica de transmissão</i>	33
3.3.3	<i>Estudo da organização tridimensional in situ das células do epêndima e da SVZ, pela microscopia eletrônica de varredura de alta resolução</i>	37
3.3.4	<i>Descrição do padrão de inervação da SVZ por axônios ir-CART e de suas relações com os progenitores neurais primários, neuroblastos e células ir-BrdU</i>	39
3.3.4.1	Imunoistoquímica para o CART: o método da peroxidase combinado com o método de intensificação pela Ag/Au	40
3.3.4.2	Imunoistoquímica para o CART: o método da fluorescência em microdissecações integrais do ventrículo lateral	41
3.3.4.3	Imunoistoquímicas combinadas e conjugadas a fluoróforos	42
3.3.4.4	Imunoistoquímicas simples e conjugadas ao ouro coloidal	42

3.4	Aquisição, processamento e análise das imagens	43
4	RESULTADOS	45
4.1	Experimento 1: estudo ultraestrutural das células que compõem o epêndima e a SVZ do ventrículo lateral, pela microscopia eletrônica de transmissão	45
4.1.1	<i>Observações ao microscópio de luz:</i>	45
4.1.2	<i>Observações ao microscópio eletrônico de transmissão:</i>	48
4.2	Experimento 2: análise das células ir-BrdU do epêndima e da SVZ do ventrículo lateral, pela microscopia eletrônica de transmissão	56
4.2.1	<i>Observações ao microscópio de luz:</i>	57
4.2.2	<i>Observações ao microscópio eletrônico de transmissão:</i>	59
4.3	Experimento 3: estudo da organização tridimensional <i>in situ</i> das células do epêndima e da SVZ do ventrículo lateral, pela microscopia eletrônica de varredura de alta resolução	67
4.4	Experimento 4: descrição do padrão da inervação da região periventricular por fibras axonais ir-CART e de suas relações com progenitores primários, neuroblastos e células ir-BrdU	76
5	DISCUSSÃO	84
6	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

Atualmente há uma discussão sobre a identidade das células proliferativas localizadas ao redor dos ventrículos laterais, no cérebro adulto. Os argumentos incidem na dificuldade de descrição da delimitação anatômica entre a camada endimária/ventricular e a camada subjacente de células - zona subventricular -, como também na identificação neuroquímica de células que possuem uma alta taxa de expressão de diferentes genes ao longo do tempo, assim como de sua renovação e derivação de células. Além disso, pode-se observar astrócitos ocasionalmente ocupando a camada endimária (CARLÉN et al., 2009; CHOJNACKI; MAK; WEISS, 2009; COSKUN et al., 2008; DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; HAN et al., 2008; SPASSKY et al., 2005).

Embora diferentes padrões de expressão genética e neuroquímica ocorram durante o processo dinâmico da neurogênese, as células endimárias e as células da zona subventricular apresentam detalhes próprios quanto à sua citoarquitetura em nível ultraestrutural (MITRO; PALKOVITS, 1981). Complementar os estudos de identidade neuroquímica, por meio da metodologia de microscopia eletrônica de transmissão, pode ser útil para delinear os limites estruturais e a organização citoarquitetônica dos elementos neurais em questão. Além disso, a microscopia eletrônica de varredura de alta resolução pode corroborar e descrever de maneira singular a organização tridimensional *in situ* das regiões e dos elementos neurais em destaque.

O dinamismo do processo de transformação/derivação que caracteriza a neurogênese também é modulado por sinalizações neuromediadoras químicas, todos encontrados com uma assinatura peculiar do nicho neurogênico do ventrículo lateral (CHOJNACKI; MAK; WEISS, 2009; MIRZADEH et al., 2008; IHRIE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011).

Dentre as sinalizações químicas que influenciam a neurogênese, recentes sugestões tem sido atribuídas à dopamina e serotonina, por exemplo (IHRIE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011; KELLEY et al., 2005; KIM et al., 2010; LENNINGTON et al., 2011; SCHINDLER et al., 2012; TONG, et al., 2014a). Nosso grupo de pesquisa também encontrou axônios imunorreativos ao peptídeo CART (ir-CART, transcrito

regulado pela cocaína e anfetamina), cujo mRNA é altamente expresso diante a exposição do organismo a fatores como estímulos aditivos e de recompensa, psicoestimulantes, comportamento alimentar, ou mesmo durante o desenvolvimento pós-natal inicial de ratos (DOUGLASS; MCKINZIE; COUCEYRO, 1995; RODRIGUES; CAVALCANTE; ELIAS, 2011; YANG; SHIEH; LI, 2005).

Um estudo aponta que a administração do peptídeo CART via intranasal promove uma aceleração da migração de precursores neuronais e regeneração cortical, em um modelo de acidente vascular cerebral em camundongos (LUO et al., 2013). No entanto, ainda não há descrições de relações e de uma possível ação direta do peptídeo CART sobre as células características do nicho neurogênico periventricular.

Neste campo, metodologias de análise ultraestrutural – como a microscopia eletrônica de transmissão - podem ser úteis por determinar a ocorrência de sinapses envolvendo terminais com a assinatura neuroquímica para o peptídeo CART e as células proliferativas da região periventricular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A parte central do sistema nervoso (CNS) apresenta cavidades – denominadas apropriadamente ventrículos -. Existem em mamíferos quatro ventrículos e um longo canal, intracomunicantes e representativos para cada porção do neuroeixo, organizados em: dois ventrículos laterais, sendo cada um localizado em um dos hemisférios telencefálicos, o terceiro ventrículo, localizado no diencéfalo, e o quarto ventrículo, no rombencéfalo; os ventrículos laterais e o terceiro ventrículo se comunicam pelo forame interventricular, enquanto esse e o quarto ventrículo se unem por meio do aqueduto mesencefálico. O canal central se constitui na continuidade dessa cavidade na medula espinal. Assim, os ventrículos formam um sistema cavitário para a produção e fluxo do líquido cérebro-espinhal, ou liquor (MITRO; PALKOVITS, 1981).

Os ventrículos são especialmente revestidos por uma classe de células de suporte do CNS: o epêndima (DEL BIGIO, 2010; FERRAZ DE CARVALHO; WATANABE; DE SOUZA, 1986; MITRO; PALKOVITS, 1981). Este, como epitélio característico, está organizado em uma camada celular simples e contínua; no entanto, estudos recentes relatam especificidades regionais a esta camada, principalmente quando são comparados os diferentes ventrículos cerebrais (DEL BIGIO, 2010; MIRZADEH et al., 2008; MITRO; PALKOVITS, 1981; MULLIER et al., 2010).

Em pontos específicos da superfície ventricular, tem sido descrito que seu revestimento é ocasionalmente suplementado por elementos neurais variados: células endimárias do tipo 2, tanicitos e astrócitos tipo B-1 (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; DOETSCH, 2010a; MIRZADEH et al., 2008; MIRZADEH; MULLIER et al., 2010). Células endimárias do tipo 2 apresentam apenas dois cílios móveis, diferentemente das conhecidas células endimárias multiciliadas; tanicitos tem sido relacionados a um papel de intermediador na comunicação líquórica-humoral, por possuírem um único processo apical comunicante com o líquido e um único e longo processo basal apostado a vasos sanguíneos; astrócitos tipo B-1, descritos como precursores primários de neuroblastos, caracteristicamente apresentam um cílio único que alcança o líquido.

Estes astrócitos ocupam posições variadas, com seu corpo celular localizado na superfície de revestimento do ventrículo lateral, entre as células da camada endimária, ou na região subventricular (SVZ), de onde emite seu cílio único que se interpõe às superfícies laterais das células endimárias. Além disso, nessa região também está presente um plexo de densidade alta a moderada de fibras axonais (DINOPOULOS; DORI, 1995; DOETSCH et al., 1999a; MIKKELSEN; HAY-SCHMIDT; LARSEN, 1997; MIRZADEH et al., 2008; MULLIER et al., 2010).

Dentre o sistema ventricular, os ventrículos laterais têm recebido destaque por compor o nicho de formação de novos neurônios no CNS de organismos adultos (ALTMAN, 1963; CARLÉN et al., 2009; CHIASSON et al., 1999; COSKUN et al., 2008; IHRIE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011; TAKAHASHI; NOWAKOWSKI; CAVINESS, 1992; TRAMONTIN et al., 2003). Neste nicho também estão presentes as células progenitoras - que pertencem à mesma linhagem das células que iniciam a neurogênese na fase de desenvolvimento embrionário e são remanescentes das divisões assimétricas daquele período do desenvolvimento - (DOETSCH et al., 1999; KRIEGSTEIN; ALVAREZ-BUYLLA, 2009; MORSHEAD et al., 1994).

2.1 O nicho germinativo periventricular: observação desde o desenvolvimento embrionário até a idade adulta

O início da formação dos elementos neurais no CNS de mamíferos ocorre em territórios específicos e intimamente associados entre si: as “zonas germinativas neuroepiteliais” (BRAZEL et al., 2003; CHOJNACKI MAK; WEISS, 2009; TAKAHASHI; NOWAKOWSKI; CAVINESS, 1995; TRAMONTIN et al., 2003). Devido à sua disposição ao longo e ao redor dos ventrículos cerebrais, as zonas germinativas recebem a denominação de zona ventricular (VZ) e zona subventricular (SVZ) (CHOJNACKI; MAK; WEISS, 2009; TRAMONTIN et al., 2003).

Figura 1. Adaptado de Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009. A árvore genealógica das células-tronco neurais

A zona ventricular é composta por uma camada de células epiteliais, descendentes da placa neural. No início da neurogênese cortical, que em camundongos ocorre entre E9-10, as células neuroepiteliais passam por um processo de divisão simétrica que multiplica o número de células neuroepiteliais – ao mesmo tempo em que supostamente daí derivam os primeiros neurônios -. À medida que esse evento progride, o epitélio se torna mais espesso devido ao alongamento das células neuroepiteliais, que passam a assumir características morfológicas próprias de células gliais e desenvolvem-se como células da glia radial.

Então, essas células da glia radial continuam seu processo de divisão, agora de forma assimétrica, o que mantém o nicho original de células ao mesmo tempo em que são formados, direta e indiretamente – por meio de percursos neurais intermediários -, os neuroblastos. Apresentando um longo processo que alcança toda a extensão do ventrículo lateral e o território alvo, as células da glia radial direcionam a migração dos neuroblastos em diferenciação, formados na VZ, até seu respectivo alvo nas camadas corticais e do bulbo olfatório (CORBIN; NERY; FISHELL, 2001). Durante esse evento, um fato interessante é que, sejam as células neuroepiteliais ou as células da glia radial, todas mantêm um processo apical comunicante com o ventrículo, ainda que seu corpo celular esteja subjacente à

superfície de revestimento ventricular (KAZANIS, 2009; KRIEGSTEIN; ALVAREZ-BUYLLA, 2009; MERKLE et al., 2004).

As proliferações e migrações celulares que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário estabelecem fases de expansão e regressão à VZ: antes do 14^o. dia do período embrionário (E14) a VZ ocupa a maior parte do parênquima cerebral. No entanto, nesse mesmo dia ocorre o pico de diferenciação a partir das células-tronco derivadas da placa neural (precursoras do astrócito tipo B1) e o início de uma migração celular que irá compor distintos estratos; surge assim uma região contínua e subjacente à VZ: a zona subventricular (CAVINESS, 1995; CHOJNACKI; MAK; WEISS, 2009; TAKAHASHI; NOWAKOWSKI; KAZANIS, 2009).

A partir de E15, ao mesmo tempo em que ocorre um aumento progressivo na densidade celular da SVZ, observa-se a sua diminuição na VZ. Em E18, as células então compõem um discreto número na VZ e se estabelecem na margem da cavidade ventricular, formando o seu revestimento: o epêndima (CAVINESS, 1995; DEL BIGIO, 2010; TAKAHASHI; NOWAKOWSKI; MIRZADEH et al., 2010b).

Ambas as regiões ventricular e subventricular são observadas no CNS após o período pós-natal, sendo mantida a característica de proliferação em migração de suas células, mesmo na idade adulta. Diariamente, cerca de 700 progenitores neurais primários entram em divisão para formar, no final de 4 a 5 ciclos de divisão seguidos [intermediados por células progenitoras intermediárias] cerca de 10.000 neuroblastos que adentram a corrente migratória rostral para derivarem interneurônios no bulbo olfatório - (CHOJNACKI; MAK; WEISS, 2009; DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1999b; KAZANIS, 2009; PONTI et al., 2013). Mesmo que evidências de mitose no CNS tenham sido observadas há cerca de um século (ALLEN 1912), a formação de novos neurônios só foi aceita nas últimas décadas, derrubando um importante dogma da neurociência.

Assim, as células-tronco multipotentes do CNS adulto são remanescentes da neurogênese iniciada no desenvolvimento embrionário e localizam-se ao redor do ventrículo lateral [periventricular], considerando em comum as regiões ventricular e subventricular (CHOJNACKI; MAK; WEISS, 2009; FUENTEALBA; OBERNIER; ALVAREZ-BUYLLA, 2012). Contudo, a determinação pontual de sua região de origem tem gerado controvérsias: trabalhos clássicos atribuem-na à zona

subventricular, enquanto estudos recentes apontam sua origem em células que revestem o ventrículo e formam a zona ventricular. Entretanto, neste debate os grupos concordam que astrócitos B1 iniciam a formação de novos neurônios a partir da SVZ, que está relacionada ao desenvolvimento ontogenético do organismo. Porém, alguns grupos clamam por reconhecimento de dados que evidenciam que as células endimárias, e não apenas células da SVZ, também podem iniciar a formação de novos neurônios, principalmente em modelos relacionados a lesões no CNS (CARLÉN et al., 2009; CHIASSON et al., 1999; COSKUN et al., 2008; DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1999b; GLEASON et al., 2008).

O potencial de neurogênese pode ser inicialmente especulado pela identificação de populações celulares marcadas pela 5-bromo-2'-deoxiuridina [BrdU], 5-cloro-2'-deoxiuridina [CldU], 5-etinil-2'-deoxiuridina [EdU] e a [³H] timidina (MORSHEAD; VAN DER KOOY, 1992; PONTI et al., 2013). Estas são moléculas análogas à timina, que são incorporadas pela fita de DNA durante a fase S do ciclo de mitose. Assim, ambas são utilizadas também para investigar a cinética do ciclo celular de populações definidas, principalmente na região periventricular (LANDGREN; CURTIS, 2010; MORSHEAD; VAN DER KOOY, 1992).

A SVZ possui basicamente três diferentes tipos celulares, definidos ultraestruturalmente: células do tipo A, ou neuroblastos ir-doublecortin [DCX]; células do tipo B [B1 e B2], ou astrócitos ir-*glial fibrillary acidic protein* [GFAP] e células do tipo C, precursores de divisão rápida ir-Mesh1 - (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997). Estes tipos celulares obedecem a um padrão peculiar de organização, que se acredita estar relacionado ao ciclo proliferativo da SVZ (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; 1999; FUENTEALBA; OBERNIER; ALVAREZ-BUYLLA, 2012). O ciclo de divisão mitótica de tais células é curto, em média 12 h, com um período de 4 h em fase S (CHIASSON et al., 1999; MORSHEAD; VAN DER KOOY, 1992).

Estudos de Doetsch, Garcia-Verdugo e Alvarez-Buylla (1997), com microscopia eletrônica de transmissão (MET), demonstraram que somente as células da SVZ podem se dividir, sendo que as células do tipo C e B foram as únicas a incorporar a [³H] timidina, 1h após sua administração via intraperitoneal. Outra

característica dessas células da SVZ, que reforça sua atuação como sítio neurogênico, é que estas migram para sua região alvo: o bulbo olfatório (ALVAREZ-BUYLLA, 1999B; DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; KAZANIS, 2009).

Ainda, abordagens *in vitro* reiteram a SVZ como nicho exclusivo de células-tronco. Essas células, quando isoladas, são as únicas capazes de formar neuroesferas multipotentes – condição que define uma célula-tronco *in vitro* (CHIASSEON et al., 1999; DOETSCH et al., 1999b). De modo especial, somente células GFAP positivas - astrócitos - foram identificadas como geradoras de neuroesferas (DOETSCH et al., 1999a).

Diferentemente dos estudos com marcadores de divisão celular, descritos até então e que indicaram que a localização dos precursores neurais estava na SVZ, o emprego de marcadores neuroquímicos específicos para células-tronco - por exemplo, Nestin e CD133 (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; GLEASON et al., 2008; PFENNINGER et al., 2007) -, revelou paradoxalmente que sua imunorreatividade, assim como a expressão do RNAm do CD133, está presente apenas em células endimárias (COSKUN et al., 2008; DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; PFENNINGER et al., 2007).

As células endimárias são caracterizadas pela presença de cílios e microvilosidades na superfície apical; corpo celular com formas cubóides ou aplanadas; citoplasma com gotículas lipídicas, ribossomos associados à membrana e geralmente poucos retículos endoplasmáticos rugosos; aparelho de Golgi de variados tamanhos; mitocôndrias, predominantes na parte apical; núcleo que varia a forma de acordo com tipo de corpo celular, podendo ser ovalado ou alongado, e cromatina agrupada em porções da membrana interna; presença de zônulas aderentes e de oclusão entre as superfícies laterais das células adjacentes (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; MITRO; PALKOVITS, 1981).

Atualmente, os relatos evidenciam que as células endimárias são quiescentes (CARLÉN et al., 2009; COSKUN et al., 2008; GLEASON et al., 2008) , com um ciclo de divisão mitótica longo, de 14 a 28 dias (CHIASSEON et al., 1999; MORSHEAD et al., 1994), ou que necessita ser deflagrado por estímulos extrínsecos, como lesões da substância negra por injeções estereotáticas de 6-

2.2 Morfologias especiais das células da região periventricular adulta

Como a neurogênese implica em uma cinética peculiar, torna-se indispensável que os elementos neurais envolvidos apresentem especializações estruturais. Estas são descritas com exclusividade para a camada endimária e SVZ (CARLÉN et al., 2009; CHOJNACKI; MAK; WEISS, 2009; COSKUN et al., 2008; DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; DOETSCH et al., 1999; IHRIE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011; MIRZADEH et al., 2008; TAVAZOIE et al., 2008).

Essas especializações incluem, por exemplo, que os astrócitos B1 projetem seu longo processo basal e contactem um denso plexo vascular presente na SVZ, ao mesmo tempo em que emitam um curto processo apical, denominado cílio primário, à luz do ventrículo lateral (MIRZADEH et al., 2008; TAVAZOIE et al., 2008). Células precursoras de neuroblastos – células tipo C, derivadas da divisão assimétrica dos astrócitos B1 - também contactam esse denso plexo vascular, de maneira a não se sobrepor às projeções basais já existentes e aos pericitos que usualmente acompanham os vasos (SHEN et al., 2008; TAVAZOIE et al., 2008).

Em nível ultraestrutural, observam-se peculiaridades nas conexões intracelulares em regiões específicas da camada endimária, e também na conexões intercelulares destas com astrócitos subjacentes; do mesmo modo, a organização dos grupos de microtúbulos de um cílio primário difere da organização de cílios móveis observados em células endimárias clássicas (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; DOETSCH et al., 1999b; GOETZ; ANDERSON, 2010; MIRZADEH et al., 2008). No entanto, essas especializações celulares são apenas um dos pontos que compõem uma maior complexidade que caracteriza a manutenção, ou remanescência, do processo de neurogênese na SVZ.

Outro ponto de grande importância é a participação de sinalizações químicas ou peptidérgicas (IHRIE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011). Estas podem se difundir no nicho proliferativo via vasos sanguíneos, líquido cérebro-espinhal ou liberadas por botões ou terminações sinápticas (IHRIE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011; MIRZADEH et al., 2008; TAVAZOIE et al., 2008). Contudo, em dissecações *ex vivo* – onde as

células da SVZ são isoladas dos corpos neuronais que lhe fazem aferências, assim como do conteúdo circulante do interior dos vasos sanguíneos e líquido cérebro-espinhal - é possível observar e descrever padrões, em função do tempo, para a formação de novas células oriundas de astrócitos B1 (PONTI et al., 2013).

2.3 Bases ultraestruturais para a identidade proliferativa e reguladora da SVZ

A grande discussão sobre a origem das células proliferativas periventriculares da CSN ocorre porque os diferentes argumentos incidem na dificuldade da descrição dos limites anatômicos que separam a camada endimária e SVZ, quando se utiliza apenas a microscopia a laser confocal. Poucos grupos que se utilizam também de metodologias para descrição ultraestrutural, descrevem astrócitos da SVZ em contato com o lúmen ventricular, assim como células endimárias com cílios não-característicos (CHOJNACKI; MAK; WEISS, 2009; DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; SPASSKY et al., 2005).

Como as células endimárias e as células da SVZ apresentam citoarquitecturas próprias e muitas das dúvidas surgem por dificuldades de interpretação/visualização de definições citoarquitectônicas dos elementos neurais proliferativos, propomos neste estudo identificar as células imunorreativas ao BrdU no epêndima e SVZ, a partir de um estudo em nível ultraestrutural - como a microscopia eletrônica de transmissão – que se constitui como um recurso adequado e necessário para a elucidação dessa questão.

Por sua vez, a microscopia eletrônica de varredura de alta resolução, que descreve sintopias celulares sob aspectos tridimensionais *in situ*, visamos contribuir para a melhor compreensão da organização estrutural das células envolvidas.

2.4 Neurogênese e sua regulação na SVZ

O CNS utiliza duas principais classes de substâncias químicas para exercer suas sinalizações: uma delas são as pequenas moléculas transmissoras, por exemplo, a acetilcolina, a dopamina e serotonina; outra classe é a de peptídeos

neuroativos, caracterizados estruturalmente por serem uma curta cadeia de aminoácidos (SCHWARTZ, 2000).

Ambas as classes podem coexistir em um mesmo neurônio, estarem contidos no interior de vesículas, e participarem em uma co-transmissão; no entanto, essas duas classes de substâncias químicas apresentam grandes diferenças entre si: peptídeos neuroativos são observados dentro de vesículas grandes e de núcleo denso, sendo liberados por um mecanismo semelhante ao observado em glândulas secretoras, enquanto pequenos neurotransmissores são contidos em vesículas pequenas, translúcidas, e liberados por um mecanismo ativado por canais de Ca^{++} . Diferenças também recaem em seus metabolismos e também na possibilidade de recaptação da fenda sináptica (SCHWARTZ, 2000; SHEPARD, 2004).

Se a propriedade proliferativa é inerente à célula em questão, ou necessita de uma regulação neuroquímica para o desenvolvimento de um padrão adequado de constituição/reposição neuronal, a atual escassez de dados não permite muitas suposições. Contudo, já são sugeridos que neurotransmissores como a dopamina, serotonina e acetilcolina influenciem a neurogênese (CAMPBELL et al., 2011; IHRIE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011; KIM et al., 2010; KLEMPIN et al., 2013; LENNINGTON et al., 2011; TONG et al. 2014a).

Especificamente em relação à dopamina, a alça “área tegmental ventral-núcleo accumbens” é classicamente reconhecida como um território-chave no estabelecimento do valor recompensatório de determinados estados motivados ou de adição (GROENEWEGEN et al., 1999; VOORN et al., 2004). E agindo nesta via há um peptídeo neuroativo classicamente responsável pela modulação da liberação de dopamina, seja em sua origem, com sinapses axo-dendríticas, ou em seus alvos, por meio de sinapses axo-axônicas: o CART (*cocaine and amphetamine regulated transcript*) (DALLVECHIA-ADAMS; KUCHAR; SMITH, 2002; HUBERT et al., 2008; ROGGE et al., 2008).

Este peptídeo neuroativo apresenta um aumento na expressão de seu mRNA em função da exposição do organismo a fatores como estímulos aditivos e de recompensa, psicoestimulantes, comportamento alimentar, ou mesmo durante o desenvolvimento pós-natal (DOUGLASS; MCKINZIE; COUCEYRO, 1995; RODRIGUES; CAVALCANTE; ELIAS, 2011; YANG; SHIEH; LI, 2005).

O CART é um peptídeo neuroativo com papel muito bem estabelecido como regulador do comportamento alimentar, constituindo um grupo de neurônios que são alvo direto da ação da leptina no núcleo arqueado, e que se projetam para neurônios de segunda ordem envolvidos na inibição da ingestão do alimento (ELIAS et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2000).

Seu envolvimento com o estresse também tem sido proposto, como na caracterizada via do núcleo paraventricular do hipotálamo, a partir de demonstrações das relações entre a administração do peptídeo CART com aumentos na liberação dos hormônios liberadores de corticotrofina e tireotrofina, assim como do hormônio adrenocorticotrófico (STANLEY et al., 2001). Outro papel para o CART se fundamenta na administração do peptídeo no núcleo *accumbens* – um núcleo classicamente relacionado à recompensa e adição – e a observação de uma clara diminuição na auto-administração de cocaína, assim como na inibição de padrões locomotores para procura da droga, em ratos (JAWORSKI et al., 2008).

Contextos de adição e recompensa, e de psicoestimulação, influenciam a neurogênese na SVZ (LENNINGTON et al., 2011; NOONAN et al., 2008; PATEL; BOOZE; MACTUTUS, 2012). E de maneira interessante, observamos previamente na SVZ a presença de uma inervação por fibras axonais ir-CART.

Como ainda não há descrições sobre um provável mecanismo exercido pelo CART diretamente no nicho periventricular, também propomos aqui iniciar um esclarecimento - a partir de uma abordagem anatômica ultraestrutural - sobre a ocorrência de prováveis sinapses entre os axônios ir-CART e as células classicamente identificadas como proliferativas no nicho neurogênico periventricular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo e The Jackson Laboratory (USA). O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (número 128, página 93, livro 02) e pelo *Institutional Animal Care and Use Comittee da University of California at San Francisco* (AN092174-01A), de acordo com as recomendações do CONCEA e guia do *National Institute for Health*.

Para as etapas que previam a descrição ultraestrutural do nicho neurogênico do ventrículo lateral foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos da linhagem Long-Evans, com massa corporal entre 250 a 300 g. Por outro lado, para as etapas que visavam identificar o padrão de inervação e as relações de posição estabelecidas por axônios ir-CART dentro do nicho neurogênico, utilizamos camundongos (*Mus musculus*) selvagens C57Bl/6 e transgênicos que superexpressam *green fluorescent protein* (GFP) sob o controle do promotor humano para *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), específico para astrócitos.

Todos os animais foram mantidos em caixas plásticas, em grupos com no máximo cinco animais, tratados com água e ração comercial *ad libitum*. A temperatura da sala foi controlada e mantida em 21 ± 1 °C, sob um ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas às 07:00). Os camundongos, além das condições de alojamento supra-citadas, foram mantidos em caixas plásticas com enriquecimento ambiental.

De acordo com o objetivo e a metodologia empregada para estudo ultraestrutural, programamos quatro experimentos para a execução deste projeto de pesquisa:

- *Experimento 1*: estudo ultraestrutural das células que compõem o epêndima e a SVZ do ventrículo lateral, pela microscopia eletrônica de transmissão;
- *Experimento 2*: análise das células ir-BrdU do epêndima e da SVZ do ventrículo lateral, pela microscopia eletrônica de transmissão;

- *Experimento 3*: estudo da organização tridimensional *in situ* das células do epêndima e da SVZ do ventrículo lateral, pela microscopia eletrônica de varredura de alta resolução;
- *Experimento 4*: descrição do padrão da inervação da SVZ por fibras axonais ir-CART e de suas relações com progenitores primários, neuroblastos e células ir-BrdU.

3.2 Indução da proliferação de células quiescentes e administração de BrdU

Os animais que compõem o *experimento 2* receberam uma solução anestésica contendo *avertin* (200 mg/kg) e *buprenorphine* (0.05 mg/kg), via intraperitoneal. Verificado o efeito anestésico, o anestésico lidocaína (7 mg/kg) foi administrado na região do escalpo, via subcutânea.

Seguiu-se de tricotomia na região dorsal da cabeça, e fixação do animal em aparelho estereotático. O escalpo foi rebatido, e a calota craniana tratada com *povidone-iodine*. Então foi localizado o bregma, a partir do qual foram definidas as coordenadas ântero-posterior (AP): 0,0; médio-lateral (ML): 1,1 e dorso-ventral (DV): 0,0, para implante subpial de cânula-infusora. Esta foi fixada no crânio por meio de cola cirúrgica, e conectada a uma bomba micro-osmótica, modelo 1007D (Alzet – USA) por meio de cateter de PVC proveniente do kit de infusão cerebral número 1, 3-5 mm, (Alzet – USA). As coordenadas foram adaptadas do atlas estereotático do encéfalo de camundongo (FRANKLIN; PAXINOS, 2008).

A referida bomba micro-osmótica ficou alojada na região subcutânea dorsal do animal, para que houvesse a administração contínua - em volume de 0.5 µl/h, durante um período total de 6 dias - do agente anti-mitótico específico para neuroblastos e progenitores intermediários “citosina-β-D-arabinofuranosida” (Ara-C, Sigma, USA), diluído a 2% em salina estéril. Com isso, visamos interromper a proliferação inerente às células do nicho neurogênico a ponto de que nenhuma célula seja encontrada na SVZ. A proliferação celular é reiniciada partir de 30 min de remoção da mini-bomba osmótica, por ação exclusiva do progenitor neural primário

(DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1999b). O controle para o procedimento foi delineado pela administração apenas do veículo, a salina estéril a 0,9%.

Após a secagem da cola cirúrgica para fixação da cânula-infusora no crânio, a incisão foi suturada por meio de fios *silk* 6-0, e o animal posicionado em superfície aquecida até recuperação total de ambulação.

No sexto dia após a cirurgia de implantação da cânula, os animais foram anestesiados com isoflorano. Verificado o efeito anestésico, iniciou-se o procedimento de re-abertura da incisão inicial para remoção da cânula-guia e bomba micro-osmótica. Finalizado o procedimento, a incisão foi fechada definitivamente com cola cirúrgica.

Então os animais receberam uma dose única de 50 mg/kg, via intraperitoneal, do marcador de proliferação celular 5-bromo-2'-deoxiuridina [(BrdU) Sigma – USA], diluído em salina estéril.

3.3 Preparações e processamentos dos tecidos

3.3.1 Análise ultraestrutural das células das regiões ventricular e subventricular, pela microscopia eletrônica de transmissão.

Nesta etapa de investigação utilizamos ratos da linhagem Long-Evans. Os animais foram anestesiados mediante aplicação intraperitoneal de solução de hidrato de cloral a 35%, na dose de 1mL/animal. Sendo observado seu efeito, iniciou-se o procedimento para posicionamento de cânula, via transcardíaca/aorta ascendente, para uma lavagem inicial do leito vascular com solução salina 0,9%, e em seguida, perfundi-lo com cerca de 100 mL de solução fixadora Karnovsky modificada (WATANABE; YAMADA, 1983), composta por formaldeído a 2% (preparado previamente a partir de solução de paraformaldeído em água destilada, aquecida a 60-65 °C) e glutaraldeído a 2,5%, em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M e pH 7,4.

Em seguida, os encéfalos foram removidos e seccionados em segmentos menores que continham a região endimária e SVZ adjacente, em territórios dorsais, ventrais e intermédios da parede lateral do ventrículo lateral. As amostras

foram imersas na mesma solução fixadora, por 3 h, em temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram lavados em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,4 e pós-fixados em solução de OsO_4 a 1%, tamponada em cacodilato de sódio, por 2 h, a 4 °C. Então os tecidos foram lavados em solução salina a 0,9%, e imersos em solução aquosa de acetato de uranila a 0,5%, por 8 h, à temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras foram desidratadas em bateria de concentrações crescentes de etanol [70%, 80%, 90%, 95% (15 min) e 4x 100% (15 min)] e óxido de propileno (2X, 15 min cada).

Após, iniciou-se a embebeção em resina, preparada sob a proporção de 1:1 entre óxido de propileno e resina Spurr (Electron Microscopy Sciences, USA), a qual permaneceu em misturador rotatório por um período de 4 h. A mistura foi substituída por resina pura e disposta no misturador por um período de 16 h. Em seguida, foi novamente substituída por resina pura, permanecendo em estufa a 37 °C, por 1 h. Ao término desse processo foi feita a inclusão em molde de borracha, permanecendo por 5 dias em estufa a 60 °C, para polimerização da resina.

Passado esse período, o bloco de resina foi trimado para a obtenção da região de interesse do tecido incluso, e realizados cortes semi-finos, em espessura de 300 nm, com faca de vidro, em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, Leica Microscopes - Áustria). Os cortes foram montados em lâminas histológicas de vidro e corados com solução de azul de toluidina a 1%, para visualização em microscópio de luz.

Confirmado o local de interesse, foi realizada uma nova trimagem, com maior restrição à área de interesse, para realização de cortes ultrafinos, em espessura de 60 nm, realizados com faca de diamante. Os cortes foram coletados em telas de cobre, com 200 “mesh”, contrastados com as soluções de acetato de uranila saturada e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963; WATANABE; YAMADA, 1983; WATSON, 1958).

3.3.2 Análise ultraestrutural das células ir-BrdU do epêndima e da SVZ, pela microscopia eletrônica de transmissão

Os animais deste experimento foram submetidos ao tratamento com 2% Ara-C durante seis dias, conforme descrição em seção 4.2, e perfundidos seguindo-se os passos descritos na seção 3.3.1, exceto pela utilização de uma solução fixadora composta por formaldeído a 2% e glutaraldeído a 0,1%. Em seguida, os encéfalos foram removidos e imersos na mesma solução fixadora, por um período de 16 h, a 4 °C.

Após esse período, os segmentos foram seccionados em vibrátomo, no plano frontal e em espessura de 50 µm, coletados em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, e armazenados a 4 °C, para processamento da reação imuno-histoquímica anti-BrdU pré-inclusão.

A partir desse ponto, seguimos inicialmente duas diferentes metodologias para visualização da imunorreatividade ao BrdU: 1) pela peroxidase, para confirmação inicial da efetividade do método de marcação imunoistoquímica em tecido processado para microscopia eletrônica, e 2) pelo uso de partículas elétrondensas caracterizadas por anticorpos secundários conjugado ao ouro coloidal.

Para o método da peroxidase, inicialmente incubamos as secções em solução de boroidreto de sódio 0,1% em PBS 0,1 M pH 7,4, por 30 min. Em seguida, após lavagens em PBS, incubamos as secções em solução de peróxido de hidrogênio 0,3% em PBS 0,1 M pH 7,4, por 15 min. Após novas lavagens em PBS, incubamos o material em solução crioprotetora composta por sacarose a 25%, glicerol a 10%, em PBS 0,1 M pH 7,4, por 20 min, a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras contidas na solução crioprotetora foram transferidas para freezer -80 °C, por 20 min. Esse é um ponto importante, pois é necessária a criação de um local de difusão dos anticorpos para o meio intracelular e que mantenha o máximo de preservação ultraestrutural da membrana citoplasmática (o que é um ponto de desvantagem quando se utiliza soluções como o Triton-X). Então, as amostras foram novamente lavadas e tratadas com solução 2 N HCl, em temperatura ambiente, por 1 h. Sequencialmente, foram incubadas em solução contendo soro normal de cavalo a 3%, anticorpo primário anti-BrdU (Sigma – USA), em PBS 0,1M pH 7,4, por 48 h, a 4 °C, sob constante agitação. As informações sobre a concentração deste anticorpo primário e dos demais utilizados neste estudo estão contidas na tabela 1.

Passado o período, o material foi novamente lavado, e então incubado em solução contendo o anticorpo secundário biotilado anti-Ig de camundongo obtido em cavalo, [1:200] (Vector Labs, Burlingame, USA), em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4, por 1 h, sob constante agitação.

Em seguimento, os cortes foram incubados em solução contendo o complexo avidina-biotina, [1:333] (Kit Elite, Vector Laboratories, Burlingame – EUA), em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4, por 1 h, sob constante agitação. O anticorpo secundário foi revelado pelo método da peroxidase, com 0,02% de peróxido de hidrogênio, 0,017% de diaminobenzidina (DAB), em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4. Os cortes foram montados em lâminas histológicas de vidro, desidratados em série crescente de alcoóis, deslipidificados, osmicados e verificados em microscópio de luz.

O segundo método de visualização, por partículas elétron-densas, constituiu-se do tratamento prévio das secções com boroidreto de sódio 0,1% em PB 0,1 M pH 7,4. Em seguida, as secções foram incubadas em solução crioprotetora (sacarose a 25%, glicerol a 10%, em PB 0,1 M pH 7,4) por 20 min a temperatura ambiente, e em seguida transferida para freezer -80 °C. Após isso, os cortes foram tratados com solução de 2 N HCl, em temperatura ambiente, por 1 h. Sequencialmente, incubamos as secções em solução contendo PB 0,1 M pH 7,4, 0,8% albumina de soro bovino (BSA), 0,1% gelatina de pele de porco, 0,015 M azida de sódio e anticorpos anti-BrdU (Vector – USA) por 72 h, sob constante agitação a 4 °C.

Passado o período, os cortes foram lavados em PB 0,1 M pH 7,4, e em seguida incubados em solução contendo PB 0,1 M, pH 7,4, 0,8% (BSA), 0,1% gelatina de pele de porco, 0,015M azida de sódio e anticorpo secundário anti-rato [1:100], feito em cabra, conjugado ao ouro coloidal com 0,8 nm de diâmetro (Electron Microscopy Sciences - USA), por 16 h, a 4 °C.

Então os cortes foram novamente lavados em PB e em seguida pós-fixados em glutaraldeído 2,5%, em PB 0,1 M pH 7,4, por 2 h. Após novas lavagens em PB 0,1 M pH 7,4, os cortes foram submetidos à intensificação pela prata (incubados em placa de cultura de 24 poços, em relação de 5 cortes para cada poço, com cerca de

Tabela 1. Anticorpos primários utilizados nos experimentos.

Anticorpo	Fabricante	Código	Referência	PubMed ID	Registro do anticorpo na NIF	Link para o Registro na NIF	Diluição
Monoclonal rat anti-BrdU	Abcam Biotechnology Comp.	ab6326	Tong C. et. al. Cell Stem Cell, v. 14, n. 4, p. 500-11, 2014.	25114218	AB_305426	http://antibodyregistry.org/AB_305426	1:400 (fluorescência)
Monoclonal mouse anti-BrdU	Vector Laboratories	VP-B209	Leuner B. et al. J. Comp. Neurol., v. 517, n.2, p. 123-33, 2009.	2749999	-	-	1:100 (peroxidase e ouro coloidal)
Policlonal rabbit anti-CART (55-102)	Phoenix Pharmaceuticals	H-003-62	Dun N. et al. Biol Reprod., v. 63, n. 5, p. 1518-24, 2000.	11058560	AB_2313614	http://antibodyregistry.org/AB_2313614	1:10.000 (peroxidase) 1:3.000 (fluorescência) 1:1.000 (ouro coloidal)
Policlonal goat anti-DCX (C-18)	SantaCruz Biotechnology Inc.	sc-8066	Sawamoto K. et al. J. Comp. Neurol., v. 519, n. 4, p. 690-713, 2011.	21246550	AB_2088494	http://antibodyregistry.org/AB_2088494	1:1.000 (fluorescência)
Monoclonal mouse anti-GFAP	Chemicon (MerckMillipore)	MAB3402	Mirzadeh Z. et al. Cell Stem Cell, v. 3, n. 3, 2008.	18786414	AB_94844	http://antibodyregistry.org/AB_94844	1:1.000 (fluorescência)
Policlonal chicken anti-GFP	Aves Laboratories.	GFP-1020	Ponti G et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 110, n. 11, p. 1045-54, 2013	23431204	AB_10000240	http://antibodyregistry.org/AB_10000240	1:1.000 (fluorescence)

300 µl de R-Gent SE-EM (Aurion, Electron Microscopy Sciences – USA), durante 2 h. Após, foram novamente lavados em PB 0,1 M pH 7,4, e pós-fixados em solução de tetróxido de Ósmio 0,5%, diluído em PB, por 15 min, a 4 °C.

Em seguida, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol [30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 95% (3 min em cada), 100% (4x de 3 min)] e óxido de propileno (2x de 3 min).

Após, iniciou-se a embebeção das amostras em resina, preparada sob a proporção de 1:1 entre óxido de propileno e resina Spurr (Electron Microscopy Sciences, USA), em misturador rotatório por um período de 4 h. Após, a mistura foi substituída por resina pura e mantida no misturador por um período de 16 h. Ao final desse período, as amostras foram incluídas em nova resina Spurr pura entre duas folhas de acetato, permanecendo em estufa a 60 °C por 72 h, para polimerização da resina.

Verificada a polimerização, as folhas de acetato foram removidas e as amostras contendo evidências de imunorreatividade foram coladas na parte superior de blocos de resina, para trimagem e realização de ultramicrotomia, conforme descrição na seção 4.3.1.

3.3.3 Estudo da organização tridimensional in situ das células do epêndima e da SVZ, pela microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

Os animais foram anestesiados à mesma maneira descrita na seção 4.3.1. Sendo observado seu efeito, o animal foi decapitado, seu encéfalo removido, separado em seus dois hemisférios e bloqueado entre os níveis do bulbo olfatório e da parte caudal do hipocampo. Neste nível, o hipocampo forma a parede medial do ventrículo lateral, enquanto o parênquima suprajacente forma a parede dorso-lateral do ventrículo lateral.

Com o auxílio de lupa e iluminação, foi realizada uma incisão com bisturi no espaço ventricular entre a parte dorsal do hipocampo e o córtex. Isso permitiu a remoção de grande parte do hipocampo, o que revelou a parte caudal e o corpo do ventrículo lateral.

Na região ventral do ventrículo lateral há um ponto onde a parte ventral do córtex cerebral flete medialmente para envolver o ventrículo lateral e se aproximar do hipocampo. Outra incisão foi feita neste ponto para liberar completamente o hipocampo e a parede medial do ventrículo lateral, da parede lateral do ventrículo lateral.

A parte intermédia do ventrículo lateral apresenta um ponto de convergência entre sua parede medial e o diencéfalo/septo medial. Aqui, a separação das estruturas foi realizada a partir de uma incisão ventral. Assim, seguiu-se o descolamento das estruturas para continuidade da abertura da parte rostral do ventrículo lateral.

Na parte rostral do ventrículo lateral, a parede medial flete e se une à parede lateral. O ponto de reflexão pode ser observado, e sobre ele foi feita uma incisão para separar estas duas paredes. Com isso, a parede lateral do ventrículo lateral foi totalmente exposta e processada para o estudo (MIRZADEH et al., 2010a).

Finalizada a dissecação, as amostras foram imediatamente imersas em solução fixadora composta por OsO_4 a 2%, tamponada com fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,4, por 2 h, a 4 °C. Em seguida, as amostras foram imersas em solução tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,4 por cerca de 8 h, a 4 °C.

A partir dessa etapa, houve a composição de dois subgrupos, de acordo com a área a ser analisada no microscópio eletrônico de varredura e o tratamento recebido pelo tecido. Os subgrupos compreenderam: 1) análise da superfície endimária e 2) análise da zona subependimária.

Para a análise da superfície endimária, após permanecerem 8 h em solução tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,4, os tecidos foram lavados em água destilada e desidratados em série crescente de etanol [70%, 80%, 90%, 95% (20 min) e 4x 100% (1 h cada)]. Em seguida, foi feita a secagem do material em aparelho de ponto crítico [Balzers CPD-030, Balzers, Liechtenstein]. Finalizando, as amostras foram montadas em bases de metal, de diâmetro de 12 mm, para posterior cobertura com íons de ouro, em aparelho "Ion Sputter" [Balzers SCD-040, Balzers, Liechtenstein] (TANAKA, 1981; TÁNAKA, 1989; WATANABE; KORIYAMA; YAMADA, 1992).

Para a análise da zona subependimária, após as amostras permanecerem por cerca de 8 h em solução tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,4. foram imersas em soluções de dimetilsulfóxido [DMSO] em água destilada, primeiramente na concentração de 12,5%, seguida de 25%, e finalmente na concentração de 50%, ambos por um período de 1 e ½ h, cada, de acordo com (TANAKA, 1981; TANAKA, 1989; WATANABE; KORIYAMA; YAMADA, 1992).

Em seguida, as amostras foram criofraturadas em DMSO 50%, em aparato congelado por N₂ líquido, buscando estabelecer uma divisão em porções que envolvam diferentes níveis dorso-ventrais e rostro-caudais, para análise comparativa do parênquima subependimário. Após as criofraturas, as amostras foram descongeladas em solução de DMSO 50% e lavadas em água destilada, por 15 minutos.

Sequencialmente, foram pós-fixadas em solução de OsO₄ 2%, durante 2 horas, a 4 °C, e então maceradas em solução de OsO₄ a 0,1%, em água destilada, permanecendo por um período de 72 h, sob constante agitação, em temperatura ambiente (cerca de 22 °C). As soluções foram constantemente avaliadas pela necessidade de troca diante tornarem-se turvas.

Após lavagens em água destilada, seguiu-se nova imersão em solução de OsO₄ a 2%, em água destilada, por 2 h, a 4 °C. Então as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol [70%, 80%, 90%, 95% (20 min) e 4x 100% (1 h cada)], para em seguida, serem secas em aparelho de ponto crítico (Balzers CPD-030, Balzers, Liechtenstein). Finalizando, as amostras foram montadas em bases de metal, de diâmetro de 12 mm, para posterior cobertura com íons de ouro, em aparelho “Ion Sputter” (Balzers – SCD-040, Balzers, Liechtenstein) (TANAKA, 1981; TANAKA, 1989; WATANABE; KORIYAMA; YAMADA, 1992).

3.3.4 Descrição do padrão da inervação da SVZ por axônios ir-CART e de suas relações com progenitores neurais primários, neuroblastos e células ir-BrdU

Para uma descrição acurada sobre a inervação da SVZ, houve dois diferentes métodos para a preparação dos tecidos: 1) a partir de seccionamentos em

micrótomo de congelamento, em planos frontal e sagital e 2) a partir de dissecações integrais do ventrículo lateral.

Para o processamento em microtomia, os animais foram perfundidos conforme as descrições apresentadas na seção 3.3.1, exceto a utilização de uma solução fixadora composta por 4% formaldeído, em PB 0,1 M pH 7,4. Os encéfalos foram removidos do crânio e imersos na mesma solução fixadora, por um período de 16 h, a 4 °C, e sequencialmente em solução crioprotetora composta de sacarose a 20% em PBS 0,1 M pH 7,4. Passado esse período, os encéfalos foram seccionados em micrótomo de congelamento, em espessura de 50 µm, coletados em solução de PBS 0,1 M, pH 7,4 e 0,1% azida de sódio, e armazenados a 4 °C, para processamento das reações imuno-histoquímicas.

Por outro lado, para o processamento em dissecações integrais do ventrículo lateral, verificado o efeito anestésico, os animais foram perfundidos com 15 ml de solução salina a 0,9%. Procedeu-se a dissecação conforme a descrição apresentada na seção 4.3.3, sendo então a amostra imersa em solução fixadora composta por 4% formaldeído, tamponado em PB 0,1 M pH 7,4, por 16 h, a 4 °C.

3.3.4.1 Imunoistoquímica para o CART: o método da peroxidase combinado com o método de intensificação pela Ag/Au

O procedimento consistiu inicialmente em lavagens das secções em PBS 0,1 M, pH 7,4 e tratamento com solução de 0,3% de peróxido de hidrogênio em PBS. Após novas lavagens em PBS, as secções foram incubadas em solução contendo 0,1% de Triton X-100, 5% de soro normal de burro (Vector Laboratories – USA), anticorpo primário anti-CART em PBS 0,1 M, pH 7,4, por 48 h a 4 °C.

Passado esse período, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M, pH 7,4, e posteriormente incubados em anticorpo secundário para a Ig-G de coelho, biotilado, gerado em burro (Vector Laboratories - USA), [1:800], por 2 h, sob constante agitação, em temperatura ambiente. Em seguida, e após novas lavagens em PBS, as secções foram incubadas no complexo avidina-biotina, [1:333] (Kit Elite, Vector Laboratories – USA), por 2 h, sob constante agitação, em temperatura ambiente. Após, os cortes foram novamente lavados em PBS, e em seguida,

lavados com tampão Triz-HCl 0,1 M, pH 7,4, para então iniciar-se a reação de peroxidase, fornecida por 6 mg do cromógeno tetracloreto de diaminobenzidina (DAB, Sigma), 20 ml de Triz-HCl 0,1 M, pH 7,4 e 3 µl de peróxido de hidrogênio, durante cerca de 4 min. A reação foi finalizada com lavagens em Triz-HCl 0,1 M, pH 7,4 e em seguida por lavagens em PBS 0,1 M, pH 7,4. As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas em série crescente de alcoóis e imersas em xilol durante 7 dias, para posterior realização do procedimento de intensificação da reação de peroxidase pelo método da Ag/Au.

O método de intensificação pela Ag/Au consistiu na reidratação em concentrações crescentes de alcoóis. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de nitrato de prata a 1% (em água destilada e hidróxido de amônio), a 56 °C, por 60 minutos. Após isso, as lâminas foram lavadas em água corrente, e em sequência, imersas em solução de ouro a 0,1%, sob constante agitação, por 10 min, em temperatura ambiente e protegidas da luz. Novamente foram lavadas em água corrente, imersas em água destilada e então, em solução de tiosulfato de sódio a 5%, por 5 min, em temperatura ambiente. A finalização do procedimento consistiu em nova lavagem do material em água corrente, desidratação, deslipidificação e cobertura com lamínulas, utilizando como meio dióptrico o DPX (Aldrich – USA).

3.3.4.2 Imunoistoquímica para o CART: o método da fluorescência em microdissecações integrais do ventrículo lateral

O estudo do padrão de inervação também foi suplementado pela análise do tecido preparado a partir de microdissecações integrais do ventrículo lateral, descrita na seção 3.3.3, que permitiram a descrição do trajeto axonal e de suas principais ramificações, ao longo da V-SVZ.

As amostras foram inicialmente lavadas em PBS 0,1 M pH 7,4, tratadas com solução de bloqueio para marcações inespecíficas, composta por soro normal de cabra a 10%, Triton-X a 0,5% em PBS 0,1 M pH 7,4, por 1 h, em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram incubadas em nova solução de bloqueio, contendo o anticorpo primário anti-CART, por 48 h, a 4 °C.

Sequencialmente, as amostras foram lavadas em PBS 0,1 M pH 7,4 e incubadas em solução contendo Triton-X a 0,5% em PBS 0,1 M pH 7,4 e anticorpo secundário para a Ig-G de coelho, gerado em cabra, conjugado ao fluoróforo AlexaFluor 488 (Life Sciences - USA), [1:500], por 4 h, sob constante agitação, em temperatura ambiente. Passado esse período, as amostras foram reduzidas a somente a região ventricular e SVZ, sob lupa estereoscópica, montadas em lâminas histológicas eletrostáticas e cobertas com lamínula, utilizando como meio de montagem o Aqua Poli/Mount (Polysciences - USA).

3.3.4.3 Imunoistoquímicas combinadas e conjugadas a fluoróforos

Para a análise das relações da inervação ir-CART com progenitores primários, neuroblastos e/ou células ir-BrdU, o procedimento consistiu basicamente nas descrições apresentadas na sessão anterior, 3.3.4.2, excetuando-se que as soluções contendo os anticorpos primários ou secundários foram compostas por uma combinação de diferentes anti-corpos, oriundos de diferentes espécies: anti-CART; anti-GFAP; anti-GFP; anti-BrdU; anti-DCX. Quando utilizado este último, atentamos para a substituição do soro normal de cabra por soro normal de burro. Os anticorpos secundários utilizados foram conjugados ao AlexaFluor 488, 594, 647 [1:500]. A análise dos marcadores fluorescentes foi realizada em microscópio confocal Leica SP5, equipado com LAS software (Leica – Alemanha)

3.3.4.4 Imunoistoquímicas simples e conjugadas ao ouro coloidal

Nesta fase experimental, as secções foram submetidas a reações imunoistoquímicas simples com anticorpo anti-CART, revelados com anticorpos secundários conjugados ao ouro coloidal de diâmetro ultrapequeno de 0,8 nm e submetidos à intensificação pela Ag/Au. As aposições foram identificadas mediante a morfologia característica de cada uma das células do nicho neurogênico.

Com etapas semelhantes às descritas na seção 3.3.2, os tecidos foram tratados com solução de boroidreto de sódio 1% por 30 min, lavados em PB e imersos em solução crioprotetora composta etilenoglicol a 10% e sacarose a 25%,

por 20 min, em temperatura ambiente. Em seguida, as seções imersas na solução crioprotetora foram dispostas em freezer -80 °C, por 20 min.

Após isso, os cortes foram incubados em solução contendo PB 0,1 M, pH 7,4, 0,8% albumina de soro bovino (BSA), 0,1% gelatina de pele de porco, 0,015 M azida de sódio e anticorpo anti-CART, por 72-96 h, sob constante agitação a 4 °C.

Passado o período, os cortes foram lavados em PB 0,1 M, pH 7,4 e encaminhados para incubação em anticorpo secundário, em solução contendo PB 0,1 M pH 7,4, 0,8% (BSA), 0,1% gelatina de pele de porco, 0,015 M azida de sódio e anticorpo secundário anti-coelho [1:100], feito em cabra, conjugado ao ouro coloidal com 0,8 nm de diâmetro (Electron Microscopy Sciences - USA), por 16 h, a 4 °C.

Em seguida, os cortes foram novamente lavados em PB 0,1 M pH 7,4, em seguida lavados em acetato de sódio 2%, e então incubados em solução de intensificação do ouro coloidal composta por 20 gotas do *enhancer* e 1 gota do *developer* (Aurion R-Gent SE-EM - USA), por 2 h, em temperatura ambiente e protegidos da luz. Seguiu-se de novas lavagem em PB e incubação em solução de cloreto de ouro a 0,5%, em água destilada, durante 10 min, a 4 °C.

Após lavagens em PB, as seções foram pós-fixadas em OsO₄ 0,5%, por 15 min, a 4 °C. Os passos sequenciais de desidratação e embebeção em resina são idênticos aos descritos na sessão 3.3.2.

3.4 Aquisição, processamento e análise das imagens

As imagens ultraestruturais foram obtidas a partir do microscópio eletrônico de transmissão “JEOL 1010”, em 80 kV, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e do microscópio eletrônico de varredura de alta-resolução por emissão de campo modelo “JEOL JSM7401F”, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

As imagens de luz, em campo claro, foram obtidas do microscópio Leica DMI4000B, equipado com camera Leica DFC 295 (Leica – Alemanha). As imagens em fluorescência foram obtidas do microscópio Leica TCS SP5 Spectral Confocal Microscope (Leica- Alemanha) e processadas pelo software LAS AF 2.4.1 (Leica

Microsystems – Alemanha), todos do *Institute for Regeneration Medicine* da *University of California at San Francisco, USA*.

Os ajustes nas imagens foram referentes apenas a brilho e contraste, realizados em software Adobe Photoshop CS5 versão 12.04.x32 (Adobe – USA).

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1: estudo ultraestrutural das células que compõem o epêndima e a SVZ do ventrículo lateral, pela microscopia eletrônica de transmissão

As seguintes descrições são baseadas em preparações das amostras para microscopia eletrônica, as quais também se utilizam de seccionamentos semi-finos, observados em microscópio de luz, para exame geral prévio da região a ser processada em seccionamentos ultrafinos.

4.1.1 Observações ao microscópio de luz:

O revestimento dos ventrículos laterais

Corroboramos que o revestimento do ventrículo lateral é proporcionado por uma camada simples de células ciliadas; no entanto, os tipos celulares e a densidade ciliar que compõem tal revestimento são fatores que diferenciam as paredes lateral e medial do ventrículo lateral (Figs. 3B - 3D).

Em ambas as paredes o revestimento é predominantemente realizado por células ependimárias, multiciliadas, com núcleo ovalado e plasmalema cuboide. Contudo, em sua parte dorsolateral, apresenta pontos de descontinuidade de adesão das superfícies laterais das células ependimárias, onde se observam a inclusão de células com plasmalema irregular – provavelmente astrócitos (discutidos com maior probidade metodológica na sessão de investigação ultraestrutural) - e núcleos polarizados, inclusive a ponto de não serem evidenciados em cortes semifinos (Fig. 3B).

Figura 3. A região periventricular do ventrículo lateral do rato. Em A, apresentamos um esquema ilustrativo de secção frontal correspondente ao nível rostro-caudal de 1mm posterior ao ponto craniométrico bregma, obtido para estudo da zona periventricular e também a representação dos locais referentes às imagens apresentadas em B, C e D, obtidos em cortes semi-finos de 300 μ m e corados pelo método de azul de toluidina. Em B, setas apontam o provável corredor migratório na parte dorsolateral da região periventricular. Em C, setas apontam uma ilha característica, contendo células do parênquima subependimário apostas a um capilar, na parte ventrolateral. Em D, a característica típica de menor densidade/ausência de células no parênquima da região medial da zona subependimária. Legenda: LV- ventrículo lateral; CP – caudado putâme; cc - corpo caloso; AC – comissura anterior. Aumentos - B-D: 300 X.

Por outro lado, a parte ventrolateral apresenta células continuamente adjuntas, mas com núcleos de dimensões notavelmente mais variadas. Quando menores, implicam à região de sua localização uma semelhança com a constituição de uma camada de revestimento pseudo-estratificada (Fig. 3C). Reafirmamos que a metodologia da coloração com azul de toluidina não tem a finalidade de descrição fina da organização celular, e sim apenas de conferir a melhor referenciação dos elementos celulares a serem investigados ultraestruturalmente. No entanto, é de fundamental utilização para esta etapa de estudo, pois permite iniciar o estabelecimento de parâmetros comparativos com os trabalhos atuais que investigam os elementos da camada endimária.

Nota-se que a parede medial do ventrículo lateral seja revestida integralmente por células endimárias. Assim como a parede lateral, é composta por uma camada simples de células endimárias, de plasmalema cubóide e núcleo ovalado (Fig. 3D). Estas podem possuir variações em sua dimensão, devido estarem posicionados em pontos específicos da camada endimária, e também apresentarem-se polarizados, ainda que em menor quantidade quando comparadas à parte ventral ou dorsolateral da parede lateral ventricular.

A densidade ciliar também é um fator diferencial entre as paredes do ventrículo lateral. Ainda que o objetivo deste projeto esteja focado na identificação estrutural das células ir-BrdU, a descrição das estruturas celulares não-membranosas das células – como os cílios –, característicos de células endimárias e ocasionalmente presentes em astrócitos, pode ser útil na identificação e resolução de um ponto chave para esclarecimento sobre a identidade do precursor primário. Identificamos que, sob um grau discreto, a região dorsolateral do ventrículo lateral apresenta uma menor densidade ciliar quando comparada às partes ventrolateral ou medial (Figs. 3B, 3C e 3D, respectivamente).

A população celular da zona subventricular

A quantidade de células localizadas na zona subventricular é nitidamente maior na parede lateral [dispostas ao longo de uma estratificação com cerca de 4 a 10 camadas] quando comparada à parede medial [com estratificação ocasional de 1

camada de células] do ventrículo lateral (Figs. 3B e 3C, respectivamente); ainda, a parte dorsolateral possui o maior número de células dentre as regiões observadas, sendo distribuídas em estratos que adentram a corrente migratória rostral que se inicia imediatamente ventral à parte anterior do corpo caloso (Fig. 3B).

As células examinadas mostram-se com aspectos e dimensões diferentes das células ependimárias. Observa-se que as células da SVZ apresentam plasmalemas e núcleos irregulares, ambos, corados de maneira heterogênea pelo método de azul de toluidina. A irregularidade quanto à forma dos núcleos parece estar em função de sua disposição ao longo da parede lateral da SVZ, sendo que células com um núcleo ovóide localizam-se próximas à parte dorsolateral da SVZ.

Encontramos também projeções citoplasmáticas, adjuvantes na organização de ilhotas celulares; estas apresentam variações quanto ao número e forma de seus elementos constituintes. As ilhotas com a menor densidade celular são compostas predominantemente de células de plasmalema irregular, que estabelecem aposições com capilares (Fig. 3C).

A microcirculação do neuropilo subependimário

Pode-se notar a diferença entre as paredes medial e lateral do ventrículo lateral referindo-se à presença de capilares. Verificou-se um padrão de vascularização do neuropilo subependimário na parede lateral do ventrículo lateral, contendo numerosos capilares distribuídos pontualmente ao longo da parede. Na parte ventro-lateral, pudemos observar os capilares envolvidos por elementos das ilhotas celulares, enquanto na parte dorso-lateral os capilares apresentavam-se distribuídos livremente, dentre um território de provável ocorrência de divisão e migração celular (Figs. 3B e 3C, respectivamente). A parede medial apresentou capilares ocasionais, presentes em um neuropilo de característica não-compacta e com poucos/ausentes elementos próprios da SVZ (Fig. 3D)

4.1.2 Observações ao microscópio eletrônico de transmissão:

O revestimento dos ventrículos laterais

A ultraestrutura dos elementos neurais que revestem o ventrículo lateral mostra a semelhança com células endoteliais (Fig. 4). Observamos que a maioria das células que compõem o revestimento do ventrículo apresentam plasmalema cubóide ou arredondado, com núcleo ovóide em padrão de organização de eucromatina (Figs. 4A-E).

Nota-se as adesões célula-célula estabelecidas entre suas superfícies laterais, que normalmente são orientadas por um eixo perpendicular à superfície apical da célula endotelial; contudo, projeções citoplasmáticas irregulares características de astrócitos e orientadas por um eixo oblíquo à superfície apical endotelial - foram ocasionalmente observadas na composição do revestimento do ventrículo lateral (Fig. 4F). Independentemente dessas alterações, proteínas de adesão foram identificadas constituindo uniões célula-célula na camada endotelial, como junções de oclusão e desmossomos, respectivamente, nas superfícies apical e lateral das células (Fig. 5).

Observando a caracterização das células endoteliais, identifica-se que as mesmas células de plasmalema cubóide ou arredondado apresentam-se multiciliadas e com uma alta densidade de corpos basais no citoplasma apical (Figs. 6C-D). Revelamos cílios dispostos na região da luz ventricular, seccionados transversalmente em seu eixo longitudinal (Figs. 5A-B e 6B). Com o padrão 9:2 de arranjo dos microtúbulos para a formação do axonema dos cílios móveis.

Também identificamos elementos neurais supra-endoteliais. Observamos axolemas, com mitocôndrias em seu interior e prováveis vesículas secretoras (Figs. 4F e 5B). Em determinados casos notamos evidências de elementos eletrondensos, característica de um estabelecimento de sinapses com a superfície apical da célula de revestimento em questão, conforme observado pelas cabeças de setas abertas na figura 5B, independentemente de se tratarem dos tipos simétrica ou assimétrica. A ocorrência de projeções longas e varicosas é uma característica descrita para a superfície endotelial, e pudemos correlacioná-la entre a microscopia eletrônica de transmissão e a microscopia eletrônica de varredura de alta-resolução.

Figura 4. As células de revestimento do ventrículo lateral. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, onde notam-se as células ependimárias com seu plasmalema com morfologia cubóide (A), aplanada (C) ou arredondada (D) e núcleos ovóides em eucromatina (A-E). Células com plasmalema irregular, característico de astrócitos, também revestem o ventrículo lateral e podem estar apostos a um capilar (F). Em F, setas apontam axônios supraependimários, caracterizados por mitocôndrias e vesículas secretoras em seu axolema. Cabeça de seta aponta uma junção de oclusão entre a projeção luminal e a membrana citoplasmática do astrócito. Legenda: bv – vaso sanguíneo. Aumentos - A-C: 4000 X; E: 6000 X; D e F: 7.500 X.

Figura 5. Adesão intracelular e organelas não-membranosas na camada ependimária. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Setas apontam os cílios móveis das células ependimárias, com seu padrão de organização dos microtúbulos em 9.2, enquanto cabeças de setas fechadas apontam junções de oclusão para a adesão das células ependimárias (A-C). Cabeças de setas brancas em B apontam elementos elétricos densos, característicos da formação de sinapses entre o axônio supraependimário e a célula ependimária subjacente. Aumentos - A-C: 15.000 X

Figura 6. A característica multiciliada das células ependimárias. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de uma célula ependimária com as bases de seus cílios organizadas em sua superfície apical (A). Em B, cabeças de seta apontam um cílio, móvel e em padrão 9:2 de organização de seus microtúbulos. Em C, a superfície apical da célula ependimária com alta densidade de mitocôndrias próximas a corpos basais. Em D, um detalhamento da região destacada em C, seta aponta um cílio e seu respectivo corpo basal, em secção transversal. Aumento - A: 7.500 X; B: 15.000 X; C: 10.000 X; D: 20.000 X.

A população celular na zona subventricular

Observamos que a subventricular da parede lateral do ventrículo lateral possui a mais alta densidade e diversidade celular (Fig. 7). As diferentes células da SVZ formam nichos intraespecíficos, distribuídos de uma maneira peculiar no parênquima subependimário: podem estar distribuídas de maneira esparsa, principalmente quando houver a ocorrência de proximidade a um capilar (Fig. 7C) ou apresentarem-se como uma faixa praticamente contínua e subjacente, mas nitidamente separada da membrana basal das células ependimárias (Fig. 7B).

Seus núcleos também apresentam distintos padrões de contrastação, o que pode ser relacionado a diferentes níveis de atividade celular, correspondentes aos padrões de hetero ou eucromatina (Figs. 7A-C). Nesse sentido, as células ependimárias apresentaram um núcleo claro, com cromatina não-condensada ou ocasionalmente em pequenos pontos na periferia nuclear - eucromatina -. Já as células da SVZ apresentaram núcleos densos, em padrões variados de condensação de cromatina; inclusive foi possível visualizarmos uma célula na SVZ em estágio de prófase (Fig. 7A).

A vascularização do neuropilo subependimário

A presença de capilares é um fator indicativo para o norteamento da distribuição celular na SVZ. Confirmamos se tratarem de capilares devido ao revestimento luminal típico contínuo ao núcleo adjacente da célula endotelial e também pela presença de projeções intraluminais das células endoteliais (Figs. 8A-D).

Astrócitos específicos da SVZ estabeleceram contato com capilares por meio de seu corpo celular, ou suas projeções proximais (Fig. 8A). Nas imagens onde podemos notar os astrócitos em contato com um capilar, o núcleo dos mesmos apresentam-se em diferentes padrões de condensação de cromatina (Fig. 8A).

Figura 7. O nicho neurogênico do ventrículo lateral. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, onde se localiza o limite entre a superfície endimária e a zona subependimária do ventrículo lateral. A heterogeneidade celular se apresenta nas diferentes morfologias dos plasmalemas e nos aspectos de ativação nuclear pela condensação da cromatina, em eucromatina (cabeça de seta branca, em A) e heterocromatina (seta branca, em A). Ainda em A, seta preta aponta uma célula em processo de mitose, em fase de prófase. Em B, ilhotas celulares compartilham uma mesma morfologia (setas). Em C, o astrócito estabelece contato com um capilar, corroborando a hipótese da comunicação humoral na manutenção do nicho neurogênico (seta). Legenda: bv - vaso sanguíneo. Escala: 10 μ m. Aumento: 2.500 X.

Figura 8. A via humoral na zona subventricular. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão que permitem evidenciar os contatos entre astrócitos tipo B e capilares, por meio de seu corpo celular ou projeções proximais (setas). Cabeças de seta em C e D apontam as projeções intraluminais das células endoteliais. Legenda: bv - vaso sanguíneo. Aumentos - A: 2.500 X; B: 7.500 X; C-D: 20.000 X.

4.2 Experimento 2: análise das células ir-BrdU do epêndima e da SVZ do ventrículo lateral, pela microscopia eletrônica de transmissão

4.2.1 Observações ao microscópio de luz:

Distribuição da imunorreatividade ao BrdU na região periventricular

Houve sucesso na obtenção de marcação imunoistoquímica, com evidente contraste pela marcação exclusivamente nuclear, que ocasionalmente assume um aspecto granular (quando observada a partir de reação pelo método da peroxidase ou fluorescência). Houve também mínima marcação de fundo, atestando a alta especificidade do anticorpo utilizado, assim como dos demais itens adquiridos para o estudo envolvendo a marcação do BrdU. Em relação ao exame da região periventricular, observamos que a imunorreatividade ao BrdU é presente na zona subependimária como também na superfície de revestimento do ventrículo lateral (Figs. 9B-F).

Com isso, confirma-se a efetividade do nosso protocolo para visualização da imunorreatividade ao BrdU em secções previamente preparadas para análise em microscópio eletrônico de transmissão. Em seguimento, para a análise ultraestrutural das células que apresentam a imunorreatividade ao BrdU, utilizamos unicamente anticorpos secundários conjugados ao ouro coloidal, conforme descrição a seguir.

Figura 9. A imunorreatividade ao BrdU na região periventricular, pelo método da peroxidase. Fotomicrografias de encéfalo de rato, seccionadas em plano frontal, ilustrando o aspecto de marcação granular nuclear característico do BrdU, em secções preparadas para análise em microscópio eletrônico de transmissão. Detalhe em A é mostrado em B e C, enquanto detalhe em D é mostrado em E e F. Legenda - CP: caudado-putame; LV: ventrículo lateral e cc: corpo caloso. Aumentos - A e D: 30 X; B e E: 300 X; C e F: 1300 X.

4.2.2 Observações ao microscópio eletrônico de transmissão:

Padrão de imunorreatividade ao BrdU pelo método das partículas elétron-densas

Em todos os casos positivos, conforme esperado, a imunorreatividade ao BrdU ocorreu seletivamente no núcleo das células. Os neuroblastos, ou células tipo A, exibiram a maior densidade de incorporação de BrdU, refletida como seu padrão de imunorreatividade. Essas células possuem como característica um núcleo ovalado a alongado, elétron-denso em comparação às demais células da SVZ e em padrão de eucromatina. Seu citoplasma é alongado ou piriforme, elétron-denso, e organizado em pequenas ilhotas ou cadeias de células, devido sua capacidade proliferativa (Figs. 10A-B”). Os neuroblastos foram encontrados tanto na parede lateral, quanto na extremidade ventral do ventrículo lateral (Figs. 11A-D).

Continuando a descrição de elementos proliferativos heterogêneos no nicho periventricular, encontramos uma moderada imunorreatividade ao BrdU em precursores neurais de transição rápida, ou células do tipo C. Estas células possuem núcleo e plasmalema irregulares, de baixa elétron-densidade, e tem como característica estarem predominantemente apostos a vasos sanguíneos (Fig. 12). A célula apresentada na figura 12F possui um núcleo de morfologia semelhante ao de uma célula tipo C além de estar aposta a um vaso sanguíneo, mas apresenta-se na superfície de revestimento ventricular.

A superfície de revestimento endimário contém células ciliadas - sejam multiciliadas, como as células endimárias (Figs. 13A-B), ou com um cílio único, como os astrócitos B1 (Fig. 13C) -, sendo que ambos os tipos apresentam um padrão baixo de ausência à moderada densidade de imunorreatividade ao BrdU. Células endimárias, com seu núcleo arredondado, corpos basais e cílios móveis implantados em sua superfície apical, apresentam-se como exemplos, e poucos recorrentes, de uma baixa densidade de imunorreatividade ao BrdU (Fig. 13A-B).

Ainda na superfície endimária, encontramos células de núcleo irregular - sugestivas de astrócitos B1 - que também apresentaram uma baixa densidade de imunorreatividade ao BrdU. Em alguns exemplos, como nas figuras 13D-F, os núcleos das células de revestimento que são ir-BrdU apresentaram-se lobulados.

Figura 10. Padrão de imunorreatividade ao BrdU na zona subventricular, pelo método das partículas elétron-densas. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão a partir de seções de encéfalo de camundongo submetidas à reação de imunohistoquímica pré-inclusão e visualizadas pelo método das partículas elétron-densas de diâmetro ultra-pequeno, intensificadas pela prata. Em A, observa-se o padrão de marcação estritamente nuclear, exemplificado em neuroblastos/células do tipo A - células de plasmalema semelhante, descritas por sua organização em cadeia, de característica migratória ao longo da corrente migratória rostral -. Em B, cabeça de seta aponta um neuroblasto com padrão semelhante na densidade de incorporação do BrdU, detalhado em B'; a concentração dos anticorpos ocorre no núcleo da célula, como esperado. O detalhe em B é apresentado em B'', onde um neuroblasto e uma célula precursora de divisão rápida, mesmo vizinhos, apresentam densidade diferente de imunorreatividade ao BrdU, conforme esperado para células em estágios diferentes de diferenciação, o que caracteriza esse nicho neurogênico. Aumentos - A e B: 7.500X; B': 20.000; B'': 15.000X.

Figura 11. Neuroblastos imunorreativos ao BrdU presentes na extremidade ventral do ventrículo lateral. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão, a partir de seções de encéfalo de camundongo submetidas à reação de imunohistoquímica pré-inclusão e visualizadas pelo método das partículas elétron-densas de diâmetro ultra-pequeno, intensificadas pela prata. O padrão de imunorreatividade é corroborado em neuroblastos, que diferentemente, não migram pela corrente migratória rostral e sim, nestes casos, para a extremidade ventral do ventrículo lateral (como evidenciado pelo parênquima striatal caracterizado por axônios distribuídos em padrão de "ilhas" de matriz e estriossoma). Em C e D, respectivamente, há neuroblastos com característica de recente divisão celular. Aumentos - A-D: 10.000 X.

Figura 12. Células imunorreativas ao BrdU também são apostas a vasos sanguíneos. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão, a partir de seções de encéfalo de camundongo submetidas à reação de imunohistoquímica pré-inclusão e visualizadas pelo método das partículas elétron-densas de diâmetro ultra-pequeno, intensificadas pela prata. Em A-D, setas apontam para imunorreatividade ao BrdU em precursores de divisão rápida/célula tipo C, cuja maior densidade é corroborada estar em aposição a vasos sanguíneos (bv). No entanto, não é exclusividade dessas células estabelecerem esse tipo de aposição em E, a imunorreatividade ao BrdU ocorre em um neuroblasto, enquanto em F, um astrócito tipo B1 - com sua característica de possuir a superfície apical em contato com o lúmen ventricular -, também estabelece contato com o vaso sanguíneo, ainda que apresente uma pequena densidade de incorporação ao BrdU. Aumentos - A: 10.000 X; B-F: 7.500X.

Figura 13. Células ciliadas que revestem o ventrículo lateral também são imuno-reativas ao BrdU. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão, a partir de secções de encéfalo de camundongo submetidas à reação de imunohistoquímica pré-inclusão e visualizadas pelo método das partículas elétron-densas de diâmetro ultra-pequeno, intensificadas pela prata. Em A, B e D, o padrão clássico de ausência ou baixa densidade de imuno-reatividade ao BrdU (ir-BrdU) em células ependimárias multiciliadas, refletido pelo padrão quiescente de entrada no ciclo celular. Em C, um astrócito tipo B1, uniciliado (cabeça de seta) e com núcleo irregular apresenta um baixo padrão de ir-BrdU. Em D e E, células sugeridas como células ependimárias, apresentam baixa a moderada densidade de ir-BrdU. Em F, um sugestivo astrócito B1, com núcleo irregular, também com baixa a moderada densidade de ir-BrdU. Aumentos - A-D: 7.500 X; E-F: 10.000 X.

Além dos dois tipos celulares supracitados compondo a superfície de revestimento ventricular, também encontramos tanicitos. De maneira interessante, os tanicitos exibiram uma moderada a alta densidade de imunorreatividade característica do BrdU (Fig. 14). Estas células apresentam um núcleo irregular, citoplasma piriforme e projeções laterais, todos de alta elétron-densidade. Sua projeção basal é sempre aposta a um vaso sanguíneo (Fig. 14B').

Figura 14. Tanócitos na superfície endimária exibem imunorreatividade ao BrdU. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão, a partir de seções de encéfalo de camundongo submetidas à reação de imunohistoquímica pré-inclusão e visualizadas pelo método das partículas elétron-densas de diâmetro ultrapequeno, intensificadas pela prata. Tanócitos, descritos por sua intermediação entre o lumen ventricular (LV) e dos vasos sanguíneos (bv) também ocorrem no nicho neurogênico periventricular e apresentam moderada a alta densidade de imunorreatividade ao BrdU (ir-BrdU). O detalhe em A é apresentado em A', evidenciando um cílio íntegro e dois corpos basais para implantação ciliar, e a ocorrência de ir-BrdU exclusivamente nuclear (setas). Em B, ao se examinar a mesma célula em seções adjacentes, observa-se a continuidade de corpos basais para ancoragem de múltiplos cílios na superfície apical da célula (cabeça de seta); o detalhe em B é apresentado em B', com a distribuição de ir-BrdU ocorrendo também nas porções basais do núcleo e também a evidenciação do contato entre a superfície basal da célula com um vaso sanguíneo (bv). Aumentos - A: 7.500 X; A'-B: 15.000 X; B': 30.000 X.

4.3 Experimento 3: estudo da organização tridimensional *in situ* das células do epêndima e da SVZ do ventrículo lateral, pela microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

O revestimento dos ventrículos laterais

A distribuição dos cílios e microvilosidades ocorre de maneira heterogênea ao longo da superfície ventricular, apresentando-se em zonas de alta ou baixa densidade ciliar (Fig. 15 e Figs. 16A-B). Quando ocorre uma baixa densidade de implantação de cílios, é possível evidenciar que a superfície ependimária apresenta uma heterogeneidade de elementos, como as células ependimárias multiciliadas e biciliadas (Fig. 16C), plexos axonais (Fig. 17B, Fig. 18, Fig. 19 e Fig. 20) e astrócitos com seus cílios primários (Figs. 19A'-A'' e Fig 20).

Observamos que diferenças entre a densidade de células ciliadas tem relação com diferenças na dimensão dos cílios apresentados pelas mesmas. As regiões de alta densidade de células ciliadas apresentam os cílios de maior comprimento, enquanto regiões de baixa densidade apresentam os cílios de menor comprimento (Figs. 16A-B).

Também pudemos descrever fibras axonais que inervam a superfície de revestimento do ventrículo lateral (Fig. 17, Fig. 18, Fig. 19 e Fig. 19). Observamos nitidamente fibras longas e com varicosidades ao longo de sua extensão (Fig. 17B e Fig. 19B). Essas estruturas são correlacionadas entre esta metodologia e a metodologia da microscopia eletrônica de transmissão, onde nota-se que as estruturas varicosas presentes na superfície apresentam mitocôndrias e vesículas secretoras em seu interior (Fig. 5B), propícias para o estabelecimento de aposições e sinapses do tipo *en passant* com a célula subjacente.

Figura 15. Aspectos tridimensionais *in situ* da superfície ciliada do ventrículo lateral. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de alta-resolução, que permitem observar a disposição geral dos cílios na superfície do ventricular. Diferenças na orientação dos cílios, observadas em D, podem provavelmente influenciar o direcionamento do fluxo líquórico ao longo do sistema ventricular. Aumentos - A: 270 X; B: 700 X; C: 1.100 X; D: 1.900 X.

Figura 16. A superfície ciliada observada pela microscopia eletrônica de varredura de alta resolução. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura de alta-resolução da superfície ependimária da parede lateral do ventrículo lateral, onde observam-se territórios ou com alta densidade de cílios, de grande comprimento (A), ou com baixa densidade de cílios, de pequeno comprimento, inclusive com zonas nuas (B). Nestas, sob maior aumento, pode-se observar a presença de elementos supra-ependimários em distintas formas e distribuição (C e D). O detalhe em B é apresentado em C, onde os elementos neurais supra-ependimários são caracterizados como feixes axonais (setas), microvilosidades (asteriscos) e células ependimárias bi-ciliadas (cabeça de seta). Em D, observa-se o resquício de implantação do plexo coróide, removido durante a dissecação da parede ventricular (seta). Aumentos - A: 1.200 X; B: 1.000 X; C: 7.500 X; D: 5.000 X.

Figura 17. Axônios estão presentes na superfície ependimária do ventrículo lateral. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de alta-resolução. A superfície ependimária com baixa densidade de cílios (A) permite destacar o axônio e suas varicosidades (setas em B), que correlacionadas com microscopia eletrônica de transmissão, contém mitocôndrias e vesículas secretoras. Aumentos - A: 800 X; B: 2.300 X.

Figura 18. A inervação das células ciliadas da superfície ependimária do ventrículo lateral. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura de alta-resolução. Em A, setas apontam a disposição de ramificações axonais que circundam os tufo ciliares das células ependimárias. O detalhe em A' é exibido em A', onde as cabeças de seta apontam as varicosidades axonais - regiões de acúmulo de vesículas sinápticas, indicativas de uma provável ocorrência de sinapse com a superfície apical da célula ependimária -. Aumentos - A: 4.000 X; A': 15.000 X.

Figura 19. A organização e varicosidades dos axônios na superfície ependimária do ventrículo lateral. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura de alta-resolução da superfície de revestimento do ventrículo lateral de ratos. Em A, setas brancas apontam fibras axonais que tipicamente circundam os tufo ciliares; cabeça de seta aponta um ponto de cruzamento/ramificação de diferentes axônios. O detalhe em A é analisado nas imagens subsequentes em progressiva magnificação, onde em A' são observadas as varicosidades de dois diferentes axônios que compõem um pequeno feixe (cabeças de seta brancas) e um cílio primário, isolado (cabeça de seta preta). A identificação deste é corroborada por seu curto comprimento comparado ao cílio de uma célula ependimária multiciliada. Nesta, é observado um exemplo de aposição com uma varicosidade axonal (cabeça de seta branca em A'' e A'''). Aumentos - A: 3.000 X; A': 10.000 X; A'': 15.000 X; A''': 30.000 X.

Figura 20. Ramificações dos axônios e suas aposições com cílios na superfície endimária do ventrículo lateral. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura de alta-resolução, da superfície de revestimento do ventrículo lateral de ratos. Em A, fotomontagem que permite uma abordagem panorâmica, visualizando as ramificações e interconexões dos feixes axonais, além da presença de um vaso sanguíneo (cabeça de seta). Os detalhes em A são respectivamente apresentados em A1 e A2, com as cabeças de seta apontando cílios primários e a seta apontando um feixe axonal; em A1, observam-se diferenças nos padrões de implantação ciliar, como a não ocorrência de uma invaginação ou bolsa ciliar para o cílio primário (cabeça de seta preta). Aumentos - A: 5.000 X; A1 e A2: 15.000 X.

O padrão de inervação ocorre com a ramificação do feixe axonal sobre a superfície ventricular, de modo a circundar os tufo das células endimárias multiciliadas (Fig. 18 e Fig.19). Também observamos uma conexão entre diferentes feixes axonais e a inervação também se estabelecer ao redor de cílios primários, próprios de astrócitos-B1 (Fig. 20A”).

O parênquima da SVZ

Com a utilização da técnica de maceração houve a remoção de estruturas extra-celulares, o que permitiu um estudo da organização tridimensional da células e de suas relações de vizinhança (sintopia) dentro do nicho neurogênico do ventrículo lateral (Fig. 21).

A complexidade do nicho neurogênico localizado na SVZ pode ser compreendida - por sua base anatômica - a partir da observação inicial das numerosas vesículas presentes, seja no neuropilo, nas projeções dos elementos neurais, ou ainda aderidas a capilares (Figs. 21A-B).

A morfologia diversificada entre os corpos celulares dos elementos presentes também pode indicar a complexidade da região. Embora sejam estabelecidos os três tipos celulares que compõem a SVZ, podemos reconhecer os aspectos tridimensionais que caracterizam a complexidade da sintopia dentro do nicho neurogênico periventricular (Fig. 21). Notamos que células piriformes, sugestivas de astrócitos/células do tipo B1, com diâmetro aproximado de 5 μm , fazem contato com a superfície endimária (Fig. 21A), enquanto que capilares da região subjacente são envolvidos ou possuem em sua superfície externa um íntimo contato com projeções axonais (Fig. 21D).

Figura 21. A zona subependimária do ventrículo lateral. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de alta-resolução, após técnica de criofatura em maceração em 0.1% tetróxido de Ósmio, que permitem observar a heterogeneidade de elementos celulares na SVZ. Nota-se a presença de vesículas aderidas às projeções celulares (cabeças de setas em A). Em D, a ocorrência de numerosos axônios varicosos e a aposição de fibras delgadas sobre a superfície de capilares (cabeças de seta). Aumentos - A: 3.000 X; B: 4.500 X; C: 4.500 X; D: 4.000 X.

4.4 Experimento 4: descrição do padrão da inervação da região periventricular por fibras axonais ir-CART e de suas relações com progenitores primários, neuroblastos e células ir-BrdU

A inervação por fibras axonais ir-CART na região periventricular

As fibras axonais ir-CART apresentam varicosidades ao longo de sua trajetória, e inclusive em suas ramificações. Distribuem-se de uma maneira esparsa e heterogênea na região periventricular, com inervação predominante na zona subventricular. Fazem-se presentes nos domínios dorsolateral, da parede lateral e na extremidade ventral. Contudo, dentre estes domínios, a maior densidade de inervação ocorre na região dorsolateral da zona subventricular (Fig. 22).

Em relação à superfície de revestimento – o epêndima - também ocorrem fibras axonais ir-CART, ainda que em uma densidade mais baixa quando comparada à SVZ. Também ocorrem diferenças na densidade de sua distribuição dentre as paredes lateral, medial e dorsal do ventrículo lateral. E neste ponto, a densidade mais alta é observada na parede medial do ventrículo lateral, seguida de uma densidade moderada na parede dorsal e uma baixa densidade na parede lateral.

Por outro lado, em relação a SVZ em seu eixo rostro-caudal, constatamos uma predominância na distribuição das fibras axonais ir-CART na região dorsolateral da SVZ, ao redor do nível 1,6 anterior ao ponto craniométrico bregma.

A relação entre as fibras axonais ir-CART e progenitores primários, neuroblastos e células ir-BrdU na região periventricular

Constatada a ocorrência da inervação ir-CART dentro do nicho neurogênico periventricular, seguimos com a investigação de prováveis ocorrências de aposições ou sinapses com células características dessa região.

Dentre estas células, os progenitores neurais primários – ou células B1 -, são identificados por sua imunorreatividade ao GFAP. Ao exame em microscopia de luz – seja em campo claro ou laser confocal -, esta proteína é observada apenas ao longo das projeções das células B1 e demais astrócitos.

Figura 22. A inervação imunorreativa ao CART na região periventricular. Fotomicrografias de secções frontais de camundongos, submetidas à reação de imunoperoxidase anti-CART e intensificadas pelo método da Ag/Au. Nota-se a maior densidade de inervação por fibras axonais ir-CART na região dorso-lateral da região periventricular, em nível rostral (A), intermédio (B) e caudal (C) da zona subventricular. Legenda - cc: corpo caloso; CP: caudado putame. Aumento - A-C: 300 X.

Em nossa análise conduzida em microscopia a laser confocal, observamos a ocorrência de aposições entre as fibras axonais/varicosidades ir-CART e projeções basais ir-GFAP, dentro do nicho neurogênico do ventrículo lateral (Fig. 23). Para suplementar os dados referentes à descrição de aposições que ocorram nas projeções ir-GFAP, utilizamos animais portadores do gene para proteína verde fluorescente inserido no gene que expressa o GFAP; deste modo, obtivemos uma alternativa que permitiu a visualização do corpo celular dos astrócitos em microscopia a laser confocal. E com esta abordagem, também pudemos observar a ocorrência de aposições entre fibras/varicosidades ir-CART e células GFAP:GFP (Fig. 24).

Outra classe celular de interesse são os neuroblastos, identificados neuroquimicamente por sua imunorreatividade a double-cortin (DCX). Os neuroblastos também se caracterizam pela ocorrência de sua migração em cadeia até o bulbo olfatório, representada por sua reunião em pequenos nichos. Ao contrário das células B1, os neuroblastos não possuem longas projeções, e todo seu corpo celular é evidenciado pela imunorreatividade ao DCX, por microscopia de luz. Deste modo, realizando duplas marcações imunoistoquímicas, pudemos constatar aposições entre as varicosidades ir-CART e os neuroblastos e que as fibras axonais ocasionalmente acompanham a cadeia de migração dos neuroblastos, em microdissecações integrais do ventrículo lateral (Fig. 25).

Dentre neuroblastos e progenitores primários, nosso interesse também abrangeu a verificação de prováveis aposições entre as fibras axonais ir-CART e as células da SVZ no momento em que entraram em fase S de seu ciclo mitótico. Pudemos observar a ocorrência de aposições também em células proliferativas, que entraram na fase S de seu ciclo mitótico (Fig. 26). Observamos que algumas células identificadas em sua fase S do ciclo celular também apresentaram o gene para GFP superexpresso e sob o controle do promotor GFAP, sendo assim definidas como as células progenitoras primárias ou astrócitos B1 (Fig. 24).

Figura 23. A relação entre axônios e/ou varicosidades ir-CART com as projeções de astrócitos ir-GFAP na SVZ. Fotomicrografias de secção frontal de camundongos, obtidas em microscópio de varredura a laser confocal, após dupla marcação imunohistoquímica com anticorpos anti-CART e anti-GFAP. Setas apontam as aposições existentes entre os processos dos referidos elementos neurais. Detalhe em C é exibido em D. Barras de escala - A e D: 10 μm; B: 15 μm; C: 20 μm.

Figura 24. As relações entre varicosidades axonais ir-CART e astrócitos B1, durante a entrada no ciclo de divisão mitótica. Fotomicrografia de encéfalo de camundongo, seccionada em plano frontal e visualizada em microscópio de varredura a laser confocal. Tripla marcação imunohistoquímica revela uma aposição entre axônios ir-CART em astrócito B1 durante fase S de seu ciclo mitótico. Barra de escala: 10 μ m.

Figura 25. A relação entre axônios ir-CART e a cadeia migratória de neuroblastos na SVZ. Fotomicrografias de dissecações integrais do ventrículo lateral, submetidas a duplas reações imunohistoquímicas e examinadas em microscópio de varredura a laser confocal. Nota-se os longos ramos axonais ir-CART em aposição e orientados paralela ou tangencialmente à cadeia migratória de neuroblastos na SVZ. Barras de escala - A: 50 µm; B: 25 µm; C: 15 µm; D: 10 µm.

Figura 26. Aposições entre axônios ir-CART e células em fase-S do ciclo de proliferação na V-SVZ. Fotomicrografias de encéfalo de camundongo, ilustrando duplas marcações imunohistoquímicas com anticorpos anti-BrdU e anti-CART, em dissecações integrais do ventrículo lateral (A, D-F) ou em tecido seccionado no plano frontal (B-C). Legenda - CP: caudado putame; LV: ventrículo lateral. Barra de escala - A: 30 μ m; B-F: 20 μ m.

Demos prosseguimento à investigação das aposições entre os axônios ir-CART e as células presentes no nicho neurogênico periventricular, mas também enfatizando seus aspectos ultraestruturais. Observamos que os terminais ir-CART podem contactar diretamente um neuroblasto (Figs. 27A-A'), mas também contactam elementos neurais que se estabelecem ao redor dos espaços que caracterizam a região de migração da corrente rostral que se direciona ao bulbo olfatório (Figs. 27B-B'). Também, confirmamos a existência de feixes amielínicos em aposição a neuroblastos, nos quais é possível identificar axônios ir-CART, mas que não contactam diretamente o neuroblasto em questão (Figs. 27C-C').

Observamos que as sinalizações envolvidas em axônios ir-CART ocorrem como sinapses do tipo *en passant*, com ancoragem e fusão de vesículas sinápticas (Figs 28A-B) e também pelo estabelecimentos de sinapses simétricas (Fig. 28C) e assimétricas (Fig. 28D), onde inclusive as mitocôndrias no interior dos terminais sinápticos apresentam imunorreatividade ao CART.

Figura 27. A ultraestrutura das aposições dos axônios ir-CART na SVZ. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão, a partir de seções de encéfalo de camundongos submetidos à reação imunohistoquímica anti-CART pré-inclusão e revelada pelo método das partículas de ouro coloidal de diâmetro ultrapequeno. Nota-se que há o estabelecimento de um contato direto com um neuroblasto (seta em A'), ou contatos com elementos neurais que se estabelecem ao redor do corredor de migração dos neuroblastos (setas em B'). Os feixes amielínicos que estão apostos a neuroblastos exibem imunorreatividades ao CART, embora não seja visualizado o estabelecimento de um contato sináptico com a célula em questão (setas em C'). Aumentos - A: 12.000 X; A': 50.000 X; B: 15.000 X; B': 50.000 X; C: 20.000 X; C': 50.000 X.

Figura 28. Acoplamento de vesículas sinápticas e os tipos de sinapses estabelecidas pelos axônios ir-CART, na zona subventricular. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão, a partir de encéfalos de camundongos submetidos à reação imunohistoquímica anti-CART pré-inclusão e visualizada pelo método das partículas de ouro coloidal de diâmetro ultrapequeno. Setas apontam ancoragem e fusão das vesículas sinápticas na membrana citoplasmática, sugerindo o estabelecimento de sinapses do tipo *en passant* (setas em A e B). Por outro lado, elementos elétron-densos que caracterizam sinapses simétricas (cabeças de seta em C) e assimétricas (cabeças de seta em D) também são presentes nos terminais axonais imunorreativos ao CART. Aumentos - A e C: 75.000 X; B: 120.000 X, D: 100.000 X.

5 DISCUSSÃO

Nossa descrição inicial da morfologia das células endoteliais e da região subventricular teve a finalidade de verificar nossa conformidade com a descrição apresentada por outros autores; nesse sentido de caracterização celular, de modo geral, pudemos reconhecer as células e identificá-las conforme proposição vigente da literatura. (CARLÉN et al., 2009; DEL BIGIO, 2010; DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; FERRAZ DE CARVALHO; WATANABE; DE SOUZA, 1986; GARCÍA-VERDUGO et al., 1998; TONG et al., 2014a).

Devido à parede lateral ventrículo lateral fazer parte do nicho neurogênico aduto, observamos entre as células endoteliais a presença de projeções apicais de progenitores neurais primários que alcançam a luz do ventrículo lateral; isso justifica a ocorrência de diferentes elementos na constituição do revestimento endotelial observado nas paredes lateral e medial do ventrículo lateral (CHOJNACKI; MAK; WEISS, 2009; IHRIE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011).

O único achado que se baseia em descrição ultraestrutural, atesta que o progenitor neural primário se trata de um astrócito específico B-1 (DOETSCH et al., 1999a). Corroboramos esse dado ao observar a presença desta célula e de sua projeção apical única – cílio primário -, na camada endotelial. O cílio primário é uma estrutura descrita por sua função sinalizadora, que capta sinais difundidos pelo líquido deflagradores de cascatas de eventos intracelulares (GOETZ; ANDERSON, 2010; MOLLA-HERMAN et al., 2010; TONG et al., 2014b), sendo relacionados a uma ação parácrina de controle sobre a proliferação celular na região ventricular.

Os cílios primários apresentam um padrão 9:0 de organização dos microtúbulos, não ocorrem em células endoteliais, e sim em astrócitos (BREUNIG; ARELLANO; RAKIC, 2010). Além do padrão de organização dos microtúbulos, a implantação do cílio primário na superfície apical da célula ocorre de maneira peculiar, as bolsas ciliares (MIRZADEH et al., 2008; MOLLA-HERMAN et al., 2010).

Também confirmamos que os cílios dispostos na região da luz ventricular, apresentam o padrão 9:2 de arranjo dos microtúbulos para a formação do axonema

dos cílios móveis (MOLLA-HERMAN et al., 2010), propícios para realizarem batimentos coordenados que direcionem o fluxo do líquido cérebro-espinhal.

Considerando as duas diferentes descrições para os cílios (cílio primário e cílio móvel) e assumindo suas funções distintas, sugerimos também relacioná-las à sua densidade de sua implantação: a alta densidade de células multiciliadas pode exercer a função de dirigir o fluxo do fluido cérebro-espinhal ao longo do sistema ventricular por meio do batimento coordenado e direcionado do conjunto ciliar (MIRZADEH et al., 2010b), enquanto células que contêm o cílio primário podem ter em seu cílio um receptor de sinais que circulem dentro do líquido cérebro-espinhal, relacionados também à função de controle ou iniciação proliferativa do nicho neurogênico.

Por outro lado, diferenças na densidade de implantação ciliar precisam ser analisadas também por metodologias de verificação *in situ*, como a microscopia eletrônica de varredura de alta-resolução, verificado em nossos resultados. Uma justificativa é que a disposição angular dos cílios ocorre de maneira diferente ao longo do ventrículo lateral – uma cavidade que, no rato, é côncava superiormente e convexa inferiormente, e apresenta como principal comunicação os forames interventriculares, bilaterais, dirigidos ao terceiro ventrículo, localizado no plano sagital mediano – (MIRZADEH et al., 2010b). Diante dessa complexidade morfológica relacionada às sinuosidades existentes no trajeto do líquido cérebro-espinhal, as células multiciliadas organizam seus cílios de forma que o batimento realizado gere um fluxo que conduza corretamente o líquido ao longo das cavidades. Assim, um único plano de corte pode apresentar cílios sob diferentes orientações, o que pode erroneamente incutir um conceito de diferença na densidade de implantação ciliar, simplesmente entre as partes dorsal e ventral de uma mesma parede ventricular.

Além disso, as descrições da organização *in situ* obtidas pela metodologia de microscopia eletrônica de varredura de alta-resolução confirmam que a distribuição dessas estruturas ocorre de maneira heterogênea ao longo da superfície ventricular, apresentando-se como zonas de alta ou baixa densidade ciliar. Nestas, torna-se mais fácil a evidência dos dois tipos de células ependimárias recentemente sugeridos: as do tipo multiciliadas e do tipo biciliadas; sugerem-se que as células

multiciliadas sejam responsáveis pela geração do fluxo liquórico ao longo de todo o sistema ventricular, enquanto as células biciliadas, por apresentarem um corpo basal mais desenvolvido em relação às células multiciliadas, possam agir na transmissão de informações entre o axonema e demais compartimentos intracelulares. Como as células endimárias biciliadas ocorrem ao longo de todo o sistema ventricular, existem também ao redor do canal central, onde contribuem para seu crescimento no desenvolvimento pós-natal (ALFARO-CERVELLO et al., 2012; MIRZADEH et al., 2008).

Uma descrição inicial atesta que os tanicitos não possuem cílios (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997); no entanto, são descritos cílios nos tanicitos presentes no soalho do terceiro ventrículo (MULLIER et al., 2010). Mesmo diante de um debate sobre a ocorrência ou não deste elemento, pois é documentado que os tanicitos compõem cerca de 0,5% a 1% dos elementos totais na região periventricular do ventrículo lateral (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997), estas células podem ser importantes para a recepção de sinais que transitam no líquido (GOETZ; ANDERSON, 2010; MIRZADEH et al., 2010b; PLOTNIKOVA; PUGACHEVA; GOLEMIS, 2009). Salientamos a ocorrência de um potencial proliferativo, devido à moderada densidade de imunorreatividade ao BrdU, em um tipo celular que apresenta características morfológicas ultraestruturais descritas apenas para tanicitos.

Também, uma recente linha de estudo tem se focado na neurogênese hipotalâmica (KOKOEVA; YIN; FLIER, 2005; ROJCZYK-GOŁĘBIEWSKA; PAŁASZ; WIADERKIEWICZ, 2014). E neste campo, sugere-se que os tanicitos exerçam um papel fundamental na iniciação da formação de novos neurônios que integram redes reguladoras do apetite (HAAN et al., 2013; XU et al., 2005). Esses indícios, ainda que referentes ao terceiro ventrículo, corroboram as nossas descrições apresentadas sobre a incorporação do BrdU em tanicitos e seu provável potencial proliferativo também no nicho do ventrículo lateral. Ainda que células B1 sejam amplamente aceitas como os precursores primários desse nicho (MIRZADEH et al., 2008), isso não é um consenso e alguns grupos de pesquisa sugerem que as células endimárias exerçam esse papel, sendo responsáveis por derivar as células B1 (CARLÉN et al., 2009; COSKUN et al., 2008).

Uma grande discussão sobre a identificação dos precursores neurais primários nesse nicho tem sido conduzida basicamente por estudo de colocalização neuroquímica. Atualmente, somente as células do tipo A, B e C são apontadas como constituintes do nicho neurogênico do ventrículo lateral. A maioria dos estudos se ampara em colocalizações neuroquímicas para a identificação celular. Em relação à identificação de um tanicito, emprega-se o anticorpo vimentina; porém, este não é específico para esse tipo celular, ligando-se também a outro subtipo glial, as células endimárias (ALVAREZ-BUYLLA, 1997; DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; GARCÍA-VERDUGO et al., 1998). Com isso, nossa metodologia apresenta uma contribuição altamente confiável, por identificar o tanicito a partir de sua ultraestrutura própria, combinada ao apontamento do seu potencial proliferativo, decorrente da imunorreatividade ao BrdU.

Sobre a investigação do potencial proliferativo das células do nicho periventricular, somente um estudo envolvendo a timidina tritiada ($[^3\text{H}]$) conseguiu fazer interpretações ultraestruturais das células que apresentavam a marcação a este elemento que prediz a proliferação celular (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997). No entanto a metodologia utilizada na época desse estudo se utilizou de autoradiografias, com visualização da $[^3\text{H}]$ sendo possível apenas em nível de microscopia de luz. A partir da identificação nesse nível microscópico, o tecido foi posteriormente processado para que a mesma célula identificada fosse encontrada e analisada em nível de microscopia eletrônica de transmissão. Deste modo, essa metodologia fez importantes correlações, indiretas, sobre a ultraestrutura da célula que, em microscopia de luz, apresentou a marcação por autoradiografia. No entanto, a nossa metodologia de imunohistoquímica pelo método do ouro coloidal identifica diretamente a presença da anticorpo no interior do núcleo de um tanicito, o que foi possível apenas por seguir com um estudo de investigação estritamente ultraestrutural.

Neste ponto, nossos achados ponderam os argumentos dessa discussão e apontam que os dois tipos celulares podem fazer parte do revestimento ventricular e apresentar imunorreatividade ao BrdU. Deste modo, ainda que existam duas linhas de pensamento divergentes sobre quem é a célula que inicia a proliferação, o potencial proliferativo que se supõe existir pela imunorreatividade ao BrdU deve ser

assumido para ambas as classes celulares, e não apenas para astrócitos B1 ou células endoteliais, inclusive sendo sugerida uma etapa de alteração morfológica que envolva células endoteliais e sua derivação/transformação celular descrita para essa região (COSKUN et al., 2008).

Observamos que diferenças entre a densidade da população de células ciliadas estão em função de diferenças no comprimento dos cílios. Diferenças como esta já são descritas para o terceiro ventrículo, onde a maior densidade de células endoteliais ocupa a região dorsal do referido ventrículo, enquanto tanócitos – com cílios mais curtos - ocupam predominantemente a região ventral (MULLIER et al., 2010). Esta característica pode ser propícia em pontos-chave da superfície de todo o sistema ventricular, para que haja o direcionamento do fluxo líquido dentro das sinuosidades da parede do ventrículo lateral, ou mesmo se tratar de uma diferença devida a uma região que permita uma comunicação entre os sistemas líquido e humorais (DEL BIGIO, 2010; IHRIG; ALVAREZ-BUYLLA, 2011; TAVAZOIE et al., 2008).

Além dos cílios que recobrem o ventrículo lateral, também confirmamos a ocorrência de fibras axonais inervando a superfície endotelial. Novamente, regiões de baixa densidade ciliar facilitam a observação dessas fibras, longas e com varicosidades ao longo de sua extensão. Essas estruturas são descritas como ir-serotonina (IHRIG; ALVAREZ-BUYLLA, 2011; MIKKELSEN; HAY-SCHMIDT; LARSEN, 1997; RICHARDS et al., 1981). Um estudo descreve, por microscopia eletrônica de transmissão, mitocôndrias e vesículas secretoras em seu interior, além de elementos de membrana elétron-densos, característicos de sinapses entre a fibra supra-endotelial e a célula subjacente (TONG et al., 2014a). Deste modo, corroboramos com aspectos anatômicos tridimensionais e *in situ* a prévia sugestão da regulação axonal da superfície de revestimento do ventrículo lateral.

Sobre as SVZ, nossos resultados corroboram a descrição de sua população celular. A densidade de células é nitidamente maior na parede lateral quando comparada à parede medial do ventrículo lateral, o que atesta a descrição vigente da composição representada pelos neuroblastos (células do tipo A), astrócitos (células do tipo B) e células de rápida transição (células do tipo C) (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; IHRIG; ALVAREZ-BUYLLA, 2011;

MIRZADEH et al., 2008), distribuídas de maneira distinta, e inclusive formando pequenos nichos, ao longo da extensão dorso-ventral lateral da SVZ (CHOJNACKI; MAK; WEISS, 2009; IHRIE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011); também observamos células que compartilham uma morfologia nuclear similar distribuídas ao longo de formações semelhantes a faixas, que se dirigem à região ventral do corpo caloso, correlacionada ao início da corrente migratória rostral (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; GARCÍA-VERDUGO et al., 1998). Sugere-se que essa migração seja auxiliada pela existência de projeções citoplasmáticas que delimitam pequenos agrupamentos ou ilhotas, conforme proposição de (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997). Outro fator que auxilia a migração é a presença de capilares; a alta densidade de vascularização da SVZ é sugerida como necessária para ancoragem e via sinalizadora na migração e diferenciação das células da SVZ, estando os progenitores neurais intermediários em mais íntima aposição aos vasos sanguíneos dessa região (TAVAZOIE et al., 2008).

Pelo exame *in situ* da SVZ também notamos a existência de células piriformes com diâmetro aproximado de 5 μm - sugestivas de astrócitos B1 - em contato apical com a superfície endimária. Também notamos capilares na região subjacente que possuem em sua superfície externa contatos a partir de projeções. Possivelmente essa descrição seja relacionada à característica de comunicação líquórica-humoral para as células do tipo B1 (IHRIE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011).

Sobre as células proliferativas na região periventricular, observamos células ir-BrdU presentes tanto na superfície de revestimento do ventrículo lateral (no centro do *pinwheel*) como também na zona subependimária, seja subjacente à parede lateral do ventrículo ou também na região dorsolateral do ventrículo; esses dados estão em conformidade com (MIRZADEH et al., 2008).

Quanto à imunorreatividade presente no epêndima, surge um ponto que deve ser interpretado de maneira cuidadosa. Além da descrição clássica de sua constituição por células endimárias, deve-se atentar que por se tratar do ventrículo lateral, essa mesma superfície é ocupada também por astrócitos - com sua delgada projeção citoplasmática que alcança a luz do ventrículo – de 24 μm^2 , em média, em vista dos 265 μm^2 , em media, para as células endimárias (DOETSCH et al., 1999a; MIRZADEH et al., 2008).

Quanto à regulação da proliferação desse nicho, nossa investigação sobre a distribuição anatômica das fibras axonais ir-CART revelou algumas evidências iniciais. O CART possui um papel bem definido no comportamento alimentar (ROGGE et al., 2008; SCHWARTZ et al., 2000), sendo sua expressão bem caracterizada em neurônios hipotalâmicos, especialmente no núcleo arqueado e área hipotalâmica lateral (ELIAS et al., 2001). Contudo, são crescentes as proposições para a participação do CART também em outras funções, inclusive relacionadas ao desenvolvimento pós-natal do encéfalo (RODRIGUES; CAVALCANTE; ELIAS, 2011; ROGGE et al., 2008).

Por outro lado, recentemente tem sido atribuído que a dopamina, sintetizada por neurônios que se projetam da substância negra e área tegmental ventral, também exerce efeitos na neurogênese da SVZ (HÖGLINGER et al., 2014; LENNINGTON et al., 2011). Há a descrição de uma extensa distribuição na ir-tirosina hidroxilase no estriado dorsal e domínios da SVZ, assim como da presença de receptores dopaminérgicos em células da SVZ (KIM et al., 2010; LAO; LU; CHEN, 2013).

Assim, nossas observações sobre a inervação ir-CART, que exerce sua modulação via receptores dopaminérgicos e inerva territórios como a área tegmental ventral (DALLVECHIA-ADAMS; KUHAR; SMITH, 2002) e núcleo accumbens (CHUNG et al., 2009), sugerem-se como bases estruturais para uma provável ação modulatória também nesse nicho neurogênico. Nossa descrição da inervação especificamente em progenitores neurais e neuroblatos, células classicamente descritas para a SVZ (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997) corrobora prováveis perspectivas funcionais, por um lado, principalmente pela conhecida ação do CART sobre receptores dopaminérgicos D1 e D3, e por outro, da presença desses receptores dopaminérgicos em progenitores neurais primários (LAO; LU; CHEN, 2013), os quais apontamos estar em aposição com fibras axonais ir-CART.

Alguns trabalhos já sugeriram uma influência do CART no desenvolvimento, enquanto outros descreveram alterações na expressão do RNAm do CART em diferentes e específicos núcleos do encéfalo durante o desenvolvimento pós-natal;

este, contudo, sem nenhuma abordagem direta à neurogênese propriamente dita, seja na camada subgranular do giro denteado ou à região subventricular.

O nível de análise em microscopia confocal permite-nos apenas supor a ocorrência de aposições entre os referidos elementos neurais, não sendo suficiente para supormos a ocorrência de sinapses. Ainda que tenhamos empregado anticorpos marcadores de elementos pós-sinápticos, como a sinapsina, as tentativas realizadas até o momento não foram satisfatórias para uma análise acurada da ocorrência ou não dessas interações em nível de microscopia confocal.

Nesse sentido, a análise ultraestrutural, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, das relações entre as fibras axonais ir-CART e as células características da SVZ foi fundamental para o início de um embasamento anatômico com credibilidade para uma provável influência do CART sobre a neurogênese da SVZ. Observamos a ancoragem de vesículas sinápticas em regiões da membrana citoplasmática que exibem zonas ativas, de maneira semelhante a apontada por (IMIG et al., 2014), guardadas as diferenças de se tratar de preparações de hipocampo e diferentes métodos de fixação das amostras. As vesículas sinápticas encontradas nos terminais ir-CART provavelmente se tratam de estruturas secretoras, cujas funções na participação na manutenção do nicho neurogênico da SVZ não são claramente descritas na literatura. Com isso, trazemos apontamentos originais, com bases anatômicas, para o início da investigação do peptídeo regulador CART na neurogênese do nicho periventricular.

Em suma, consideramos que esta investigação contempla a proposta inicial, uma vez que a metodologia desenvolvida possibilitou identificar a natureza celular dos elementos que entram em fase S do ciclo mitótico (ir-BrdU), que potencialmente se proliferam na SVZ adulta.

Evidenciou-se que a região periventricular é formada por distintos fenótipos celulares, conforme indicaram as avaliações em MET e MEVAR: isto é, células do tipo A, tipo B (astrócitos B1) e tipo C, células endoteliais e tanócitos. Estas apresentaram imunoreatividade ao BrdU variada, conforme o fenótipo considerado. Ainda, o nicho neurogênico da região periventricular é innervado por um plexo axonal ir-CART, o qual estabelece aposições e sinapses com os subtipos celulares descritos para esta região, inclusive no momento de entrada em fase S.

Portanto, este estudo contribui para esclarecer a importante controvérsia sobre a identidade e a origem das células que originam os novos neurônios, ao demonstrar que células ependimárias da parede lateral do ventrículo lateral podem apresentar potencial proliferativo, haja vista a discreta imunorreatividade ao BrdU apresentada. Sugerimos que os tanicitos, entreameados às células ependimárias como os astrócitos B1, apresentam um potencial proliferativo inclusive maior, quando comparado ao encontrado nas células ependimárias. Também, este estudo propõe as bases anatômicas de uma provável regulação do peptídeo CART sobre o nicho neurogênico periventricular adulto.

6 CONCLUSÃO

- Neuroblastos, precursores de divisão rápida, astrócitos B1, células ependimárias e tanicitos possuem uma morfologia ultraestrutural peculiar e, sob diferentes densidades, apresentam imunorreatividade ao BrdU;
- Bases imunohistoquímicas e ultraestruturais apontam tanicitos como sugestivos precursores neurais, além dos astrócitos B1;
- A organização tridimensional *in situ* da superfície de revestimento do ventrículo lateral apresenta diferentes densidades de implantação ciliar e uma densa inervação axonal varicosa, aposta aos diferentes cílios de células ependimárias ou astrócitos B1;
- A organização tridimensional *in situ* da região subventricular apresenta complexos elementos celulares organizados em nichos de características semelhantes, apostos a um denso plexo vasculo-nervoso;
- Axônios ir-CART sugerem-se, a partir de um embasamento anatômico, em posição para exercer um papel regulador do nicho neurogênico periventricular adulto.

REFERÊNCIAS*

ALFARO-CERVELLO, C. et al. Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth. **J. Comp. Neurol.**, v. 520, n. 15, p. 3528-3552, 2012.

ALLEN, E. Cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 22, p. 547-568, 1912.

ALTMAN, J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. **Anat. Rec.**, v. 145, p. 573-591, 1963.

BRAZEL, C. et al. Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. **Prog. Neurobiol.**, v. 69, n. 1, p. 49-69, 2003.

BREUNIG, J. J.; ARELLANO, J. I.; RAKIC, P. Cilia in the brain: going with the flow. **Nat. Neurosci.**, v. 13, n. 6, p. 654-655, 2010.

CAMPBELL, N. R. et al. Nicotinic control of adult-born neuron fate. **Biochem. Pharmacol.**, v. 82, n. 8, p. 820-827, 2011.

CARLÉN, M. et al. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. **Nat. Neurosci.**, v. 12, n. 3, p. 259-267, 2009.

CHIASSEON, B. et al. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 11, p. 4462-4471, 1999.

CHOJNACKI, A.; MAK, G.; WEISS, S. Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 10, n. 2, p. 153-163, 2009.

CHUNG, S. et al. The melanin-concentrating hormone system modulates cocaine reward. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 106, n. 16, p. 6772-6777, 2009.

CORBIN, J.; NERY, S.; FISHELL, G. Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. **Nat. Neurosci.**, v. 4 Suppl, p. 1177-1182, 2001.

COSKUN, V. et al. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 105, n. 3, p. 1026-1031, 2008.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DALLVECHIA-ADAMS, S.; KUCHAR, M. J.; SMITH, Y. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide projections in the ventral midbrain: colocalization with gamma-aminobutyric acid, melanin-concentrating hormone, dynorphin, and synaptic interactions with dopamine neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 448, n. 4, p. 360-372, 2002.

DEL BIGIO, M. Ependymal cells: biology and pathology. **Acta Neuropathol.**, v. 119, n. 1, p. 55-73, 2010.

DINOPOULOS, A.; DORI, I. The development of the serotonergic fiber network of the lateral ventricles of the rat brain: a light and electron microscopic immunocytochemical analysis. **Exp. Neurol.**, v. 133, n. 1, p. 73-84, 1995.

DOETSCH, F. et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. **Cell**, v. 97, n. 6, p. 703-716, 1999.

DOETSCH, F.; GARCÍA-VERDUGO, J.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. **J. Neurosci.**, v. 17, n. 13, p. 5046-5061, 1997.

DOETSCH, F.; GARCÍA-VERDUGO, J.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 96, n. 20, p. 11619-11624, 1999.

DOUGLASS, J.; MCKINZIE, A. A.; COUCEYRO, P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 3 Pt 2, p. 2471-2481, 1995.

ELIAS, C. F. et al. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. **J. Comp. Neurol.**, v. 432, n. 1, p. 1-19, 2001.

FERRAZ DE CARVALHO, C.; WATANABE, I.; DE SOUZA, R. Correlative scanning and transmission electron microscopic study on the ependymal surface of Cebus apella. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 44, n. 4, p. 334-340, 1986.

FRANKLIN, K. B. J.; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 3rd edition. New York: Academic Press Elsevier, 2008. [1 v.]

FUENTEALBA, L. C.; OBERNIER, K.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Adult neural stem cells bridge their niche. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 6, p. 698-708, 2012.

GARCÍA-VERDUGO, J. et al. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. **J. Neurobiol.**, v. 36, n. 2, p. 234-248, 1998.

GLEASON, D. et al. Ependymal stem cells divide asymmetrically and transfer progeny into the subventricular zone when activated by injury. **Neuroscience**, v. 156, n. 1, p. 81-88, 2008.

GOETZ, S. C.; ANDERSON, K. V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. **Nat. Rev. Genet.**, v. 11, n. 5, p. 331-344, 2010.

GROENEWEGER, H. J. et al. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 877, p. 49-63, 1999.

HAAN, N. et al. Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 14, p. 6170-6180, 2013.

HAN, Y. et al. Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. **Nat. Neurosci.**, v. 11, n. 3, p. 277-284, 2008.

HUBERT, G. W. et al. CART peptides as modulators of dopamine and psychostimulants and interactions with the mesolimbic dopaminergic system. **Biochem. Pharmacol.**, v. 75, n. 1, p. 57-62, 2008.

HÖGLINGER, G. U. et al. Origin of the dopaminergic innervation of adult neurogenic areas. **J. Comp. Neurol.**, v. 522, n. 10, p. 2336-2348, 2014.

IHRIG, R. A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 674-686, 2011.

IMIG, C. et al. The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones. **Neuron**, v. 84, n. 2, p. 416-431, 2014.

JAWORSKI, J. N. et al. Injection of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide into the nucleus accumbens reduces cocaine self-administration in rats. **Behav. Brain Res.**, v. 191, n. 2, p. 266-271, 2008.

KAZANIS, I. The subependymal zone neurogenic niche: a beating heart in the centre of the brain: how plastic is adult neurogenesis? Opportunities for therapy and questions to be addressed. **Brain**, v. 132, n. Pt 11, p. 2909-2921, 2009.

KELLEY, A. E. et al. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. **Physiol. Behav.**, v. 86, n. 5, p. 773-795, 2005.

KIM, Y. et al. Dopamine stimulation of postnatal murine subventricular zone neurogenesis via the D3 receptor. **J. Neurochem.**, v. 114, n. 3, p. 750-760, 2010.

KLEMPIN, F. et al. Serotonin is required for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 19, p. 8270-8275, 2013.

KOKOEVA, M. V.; YIN, H.; FLIER, J. S. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 679-683, 2005.

KRIEGSTEIN, A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 32, p. 149-184, 2009.

LANDGREN, H.; CURTIS, M. Locating and labeling neural stem cells in the brain. **J. Cell Physiol.**, v. 226, n. 1, p. 1-7, 2010.

LAO, C. L.; LU, C. S.; CHEN, J. C. Dopamine D(3) receptor activation promotes neural stem/progenitor cell proliferation through AKT and ERK1/2 pathways and expands type-B and -C cells in adult subventricular zone. **Glia**, v. 61, n. 4, p. 475-489, 2013.

LENNINGTON, J. B. et al. Midbrain dopamine neurons associated with reward processing innervate the neurogenic subventricular zone. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 37, p. 13078-13087, 2011.

LUO, Y. et al. CART peptide induces neuroregeneration in stroke rats. **J. Cereb. Blood. Flow Metab.**, v. 33, n. 2, p. 300-310, 2013.

MERKLE, F. et al. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 101, n. 50, p. 17528-17532, 2004.

MIKKELSEN, J. D.; HAY-SCHMIDT, A.; LARSEN, P. J. Central innervation of the rat ependyma and subcommissural organ with special reference to ascending serotonergic projections from the raphe nuclei. **J. Comp. Neurol.**, v. 384, n. 4, p. 556-568, 1997.

MIRZADEH, Z. et al. The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. **J. Vis. Exp.**, n. 39, 2010.

MIRZADEH, Z. et al. Cilia organize ependymal planar polarity. **J. Neurosci.**, v. 30, n. 7, p. 2600-2610, 2010.

MIRZADEH, Z. et al. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 265-278, 2008.

MITRO, A.; PALKOVITS, M. Morphology of the rat brain ventricles, ependyma, and periventricular structures. **Bibl. Anat.**, n. 21, p. 1-110, 1981.

MOLLA-HERMAN, A. et al. The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. **J. Cell Sci.**, v. 123, n. 10, p. 1785-1795, 2010.

MORSHEAD, C. et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. **Neuron**, v. 13, n. 5, p. 1071-1082, 1994.

MORSHEAD, C.; VAN DER KOOY, D. Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. **J. Neurosci.**, v. 12, n. 1, p. 249-256, 1992.

MULLIER, A. et al. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 518, n. 7, p. 943-962, 2010.

NOONAN, M. A. et al. Withdrawal from cocaine self-administration normalizes deficits in proliferation and enhances maturity of adult-generated hippocampal neurons. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 10, p. 2516-2526, 2008.

PATEL, D. A.; BOOZE, R. M.; MACTUTUS, C. F. Prenatal cocaine exposure alters progenitor cell markers in the subventricular zone of the adult rat brain. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2012.

PFENNINGER, C. et al. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. **Cancer Res.**, v. 67, n. 12, p. 5727-5736, 2007.

PLOTNIKOVA, O. V.; PUGACHEVA, E. N.; GOLEMIS, E. A. Primary cilia and the cell cycle. **Methods Cell Biol.**, v. 94, p. 137-160, 2009.

PONTI, G. et al. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 110, n. 11, p. E1045-E1054, 2013.

REYNOLDS, E. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 17, p. 208-212, 1963.

RICHARDS, J. G. et al. Demonstration of supra-ependymal 5-HT nerve fibres in human brain and their immunohistochemical identification in rat brain. **J. Physiol. (Paris)**, v. 77, n. 2-3, p. 219-224, 1981.

RODRIGUES, B. C.; CAVALCANTE, J. C.; ELIAS, C. F. Expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat forebrain during postnatal development. **Neuroscience**, v. 195, p. 201-214, Nov 2011.

ROGGE, G. et al. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 9, n. 10, p. 747-758, 2008.

ROJCZYK-GOŁĘBIEWSKA, E.; PAŁASZ, A.; WIADERKIEWICZ, R. Hypothalamic subependymal niche: a novel site of the adult neurogenesis. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 34, n. 5, p. 631-642, 2014.

SCHINDLER, A. G. et al. Stress produces aversion and potentiates cocaine reward by releasing endogenous dynorphins in the ventral striatum to locally stimulate serotonin reuptake. **J. Neurosci.**, v. 32, n. 49, p. 17582-17596, 2012.

SCHWARTZ, J. H. Neurotransmitters. In: KANDEL, E. T.; SCHWARTZ, J. H., *et al* (Ed.). **Principles of Neural Science**. New York: McGraw-Hill, v.1, 2000. cap. 15, p. 280-297.

SCHWARTZ, M. W. *et al*. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-671, 2000.

SHEN, Q. *et al*. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 289-300, 2008.

SHEPARD, G. **The synaptic organization of the brain**. 4th. New York: Oxford University Press, 2004. 709 p.

SPASSKY, N. *et al*. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 1, p. 10-18, 2005.

STANLEY, S. A. *et al*. Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. **Brain Res.**, v. 893, n. 1-2, p. 186-194, 2001.

TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R.; CAVINESS, V. J. BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. **J. Neurocytol.**, v. 21, n. 3, p. 185-197, 1992.

TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R.; CAVINESS, V. J. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 9, p. 6046-6057, 1995.

TANAKA, K. Demonstration of intracellular structures by high resolution scanning electron microscopy. **Scan. Electron Microsc.**, n. 2, p. 1-8, 1981.

TAVAZOIE, M. *et al*. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 279-288, 2008.

TONG, C. K. *et al*. Axonal Control of the Adult Neural Stem Cell Niche. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 4, p. 500-511, 2014.

TONG, C.K. *et al*. Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 111, n. 34, p. 12438-12443, 2014.

TRAMONTIN, A. *et al*. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. **Cereb. Cortex**, v. 13, n. 6, p. 580-587, 2003.

TANAKA, K. High resolution scanning electron microscopy of the cell. **Biol. Cell.**, v. 65, n. 2, p. 89-98, 1989.

VOORN, P. et al. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. **Trends Neurosci.**, v. 27, n. 8, p. 468-474, 2004.

WATANABE, I.; KORIYAMA, Y.; YAMADA, E. High-resolution scanning electron microscopic study of the mouse submandibular salivary gland. **Acta. Anat. (Basel)**, v. 143, n. 1, p. 59-66, 1992.

WATANABE, I.; YAMADA, E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingiva. **Arch. Histol. Jpn.**, v. 46, n. 2, p. 173-182, 1983.

WATSON, M. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 4, n. 4, p. 475-478, 1958.

WODARZ, A.; HUTTNER, W. Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. **Mech. Dev.**, v. 120, n. 11, p. 1297-1309, 2003.

XU, Y. et al. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. **Exp. Neurol.**, v. 192, n. 2, p. 251-264, Apr 2005.

YANG, S. C.; SHIEH, K. R.; LI, H. Y. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the nucleus accumbens participates in the regulation of feeding behavior in rats. **Neuroscience**, v. 133, n. 3, p. 841-851, 2005.