

TATIANE YUMI NAKAMURA KANNO

Papel da Miosina Va na neuritogênese de neurônios
TrkA-positivos do gânglio da raiz dorsal

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientação: Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan

Versão original.

São Paulo
2011

RESUMO

Kanno TYN. Papel da Miosina Va na neuritogênese de neurônios TrkA-positivos do gânglio da raiz dorsal [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

O estabelecimento de conexões apropriadas através da neuritogênese é essencial para a percepção e transmissão de dor e temperatura pelos neurônios nociceptivos (TrkA-positivos) dos gânglios da raiz dorsal (GRD). Miosina Va, uma proteína motora evolutivamente conservada, apresenta ampla distribuição ao longo do sistema nervoso em desenvolvimento. É expressa em neuritos, no corpo celular e no cone de crescimento. Na região carboxi-terminal da proteína, observa-se o domínio globular que é responsável pelo transporte vesicular. Trabalhos anteriores demonstraram que a inativação de Miosina Va, em cones de crescimento de neurônios do GRD de embriões de galinha *in vitro* diminui a taxa de extensão de filopódios. Adicionalmente, camundongos mutantes para Miosina Va apresentam severos defeitos neurológicos similares às características observadas na síndrome de Griscelli em humanos. Esses fenótipos evidenciam a participação da proteína no desenvolvimento neuronal. Neste trabalho, caracterizamos o padrão de expressão de Miosina Va, *in vivo* e *in vitro*, na neuritogênese de células TrkA-positivas em diferentes estádios de desenvolvimento do GRD de galinha. A partir de HH30, a maioria dos neurônios TrkA-positivos apresentam neuritos e em HH34, os neurônios TrkA-positivos ficam mais restritos a região dorsomedial do GRD. Miosina Va é observada no GRD em células com e sem neuritos em HH25. Esta presença perdura durante toda a neuritogênese. Além disso, Miosina Va é recrutada *in vitro* para o processo de regeneração e re-emissão de neuritos de neurônios TrkA positivos na presença de NGF, sendo expressa em neuritos em diferentes estádios de neuro-neuritogênese. Observamos também o efeito da superexpressão do domínio globular da proteína na dinâmica de neuritogênese destes neurônios. Nestes ensaios funcionais, observamos que a superexpressão do domínio globular de Miosina Va em culturas de GRD mantidas em 10 ou 100 ng/ml de NGF reduz a população de células com neuritos longos (maiores que quatro vezes o diâmetro celular) e aumenta a população de células com neuritos curtos ou sem neuritos. Em conjunto, estes dados sugerem que a Miosina Va é importante para o estabelecimento de neuritos nociceptores.

Palavras-chave: Embrião de galinha. Gânglio da Raiz Dorsal. Miosina Va. Neuritogênese. TrkA.

ABSTRACT

Kanno TYN. The role of Myosin Va in the neuritogenesis of Dorsal Root Ganglia TrkA-positive neurons [Master's thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The establishment of appropriate connections through neuritogenesis is essential for the perception and transmission of pain and temperature by nociceptive neurons (TrkA-positive), present in the dorsal root ganglia (DRG). Myosin Va, an evolutionarily conserved motor protein, is widely distributed throughout the developing nervous system. It is expressed in neurites, the cell body and growth cone. The globular tail domain is present in the carboxy-terminal region of the protein and it is responsible for vesicular transport. Inactivation of Myosin Va in DRG neurons growth cones of chick embryos, *in vitro*, decreases the rate of filopodial extension. In addition, Myosin Va mutant mice have severe neurological defects that are similar to the disorders observed in Griscelli's syndrome in humans. These phenotypes demonstrate the protein involvement in the neuronal development. Here, we have characterized the expression pattern of Myosin Va *in vivo* and *in vitro* during TrkA-positive cells neuritogenesis at different stages of chick DRG development. Starting from stage HH30, the majority of TrkA neurons are undergoing neuritogenesis, and at stage HH34, their cell bodies are concentrated in the dorsomedial region of the GRD. We detected Myosin Va in the HH25 GRD. At this stage, it was present both in cells with and without neurites. After the start of neuritogenesis, Myosin Va expression persists throughout the process. Moreover, Myosin Va is recruited *in vitro* for the regeneration process and TrkA-positive neurons neurites re-emission in the presence of NGF, being expressed in neurites at different stages of neo-neuritogenesis. We also observed the protein globular tail overexpression effect in the neuritogenesis dynamics of these neurons. In these functional assays, we observed that Myosin Va globular tail overexpression in GRD cultures maintained with 10 or 100 ng/ml NGF reduced the number of neurons with long neurites (above four times cell body length) and increased the number of neurons with short neurites or no neurites. However, no effect was seen if the transfection occurred after the onset of neuritogenesis. Taken together, these results suggest that Myosin Va is important for the establishment of nociceptor neurites.

Key Words: Chicken embryo. Dorsal Root Ganglia. Myosin Va. Neuritogenesis. TrkA.

1 INTRODUÇÃO

A percepção adequada de estímulos somatosensoriais (tato, temperatura, da posição das partes do corpo ou da dor) pelo sistema nervoso depende de conexões sinápticas apropriadas entre os neurônios sensoriais, presentes no gânglio da raiz dorsal, e seus respectivos alvos (pele e músculos). Essas conexões são consequência de uma neuritogênese bem sucedida.

1.1 Neurônios do gânglio da raiz dorsal

Os gânglios da raiz dorsal (GRD) são componentes do sistema nervoso periférico, anatomicamente identificáveis como estruturas encapsuladas posicionadas bilateralmente e periodicamente ao longo da medula espinal (Fig. 1).

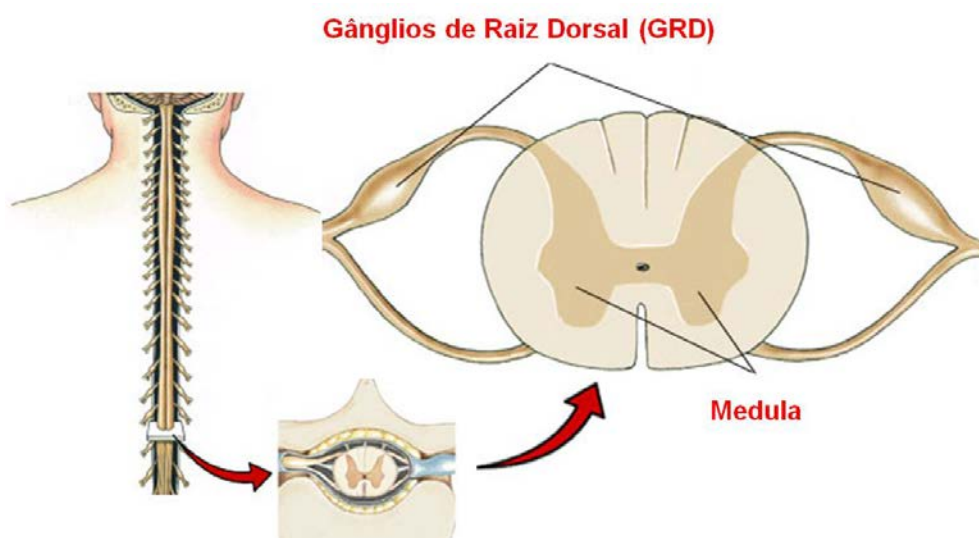


Figura 1 – Os gânglios da raiz dorsal são estruturas encapsuladas do sistema nervoso periférico. Estas estruturas estão distribuídas bilateralmente a medula espinal ao longo da coluna vertebral.

Seu interior contém os corpos celulares de vários subtipos de neurônios sensoriais, bem como células da glia. O GRD diferenciado contém dois subtipos gliais (células satélites e de Schwann) e vários subtipos de neurônios aferentes que apresentam modalidades sensoriais distintas e expressão diferenciada de receptores para fatores neurotróficos. Todos os subtipos neuronais e gliais do GRD derivam das células da crista neural (Carr, 1984; Frank e Sanes, 1991).

Os neurônios presentes no GRD transmitem três tipos de informações sensoriais somáticas: nocicepção, mecanocepção e propriocepção (Fig. 2). A neurogênese sensorial no GRD ocorre principalmente em três ondas temporalmente distintas. A primeira onda gera cerca de um terço das células do GRD e formarão primariamente neurônios de grande diâmetro - os mecanoceptivos e proprioceptivos da região ventrolateral do gânglio (Lawson e Biscoe, 1979; Ma et

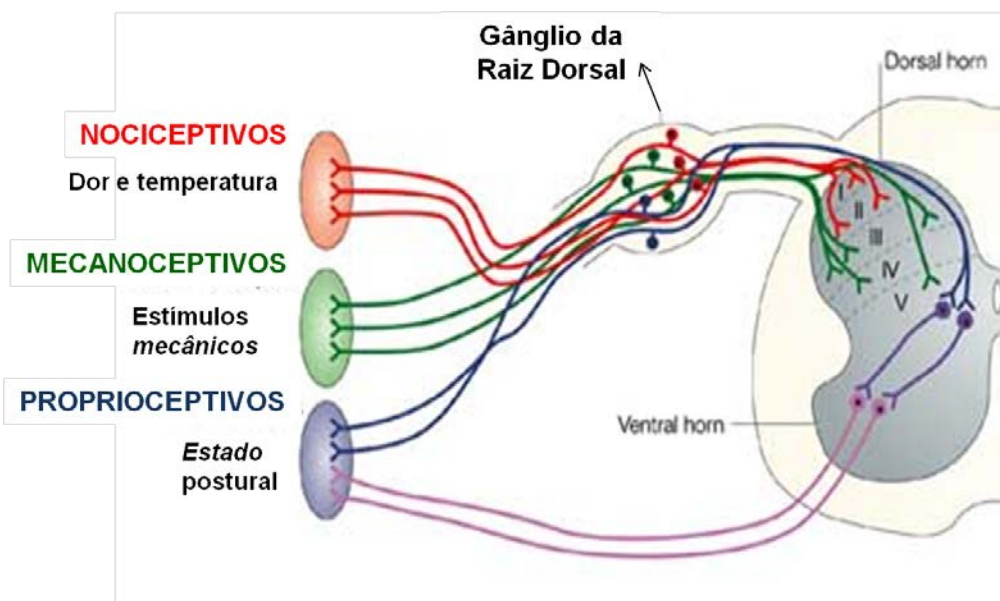


Figura 2 – Tipos de neurônios do gânglio da raiz dorsal. Os GRDs apresentam três populações de neurônios sensoriais: nociceptivos (percepção de dor e temperatura), mecanoceptivos (percepção de estímulos mecânicos) e proprioceptivos (percepção do estado postural do corpo). Cada população neuronal emite neuritos para regiões específicas na medula e periferia do corpo.

Fonte: Adaptado de Caspary e Anderson 2003.

al., 1999). Esta subpopulação neuronal é positiva para o receptor de neurotrofina TrkC e/ou TrkB. O restante das células provém da segunda onda neurogênica, e formam os neurônios nociceptivos que se congregam na região dorsomedial do GRD. Estes expressam o receptor TrkA (Ma et al., 2000). Finalmente, a terceira onda neurogênica contribui para as células-tronco multipotentes da membrana limitante do gânglio, uma estrutura celular no ponto de entrada e saída do GRD (Maro et al., 2004).

A partir dos corpos celulares presentes nos GRDs saem prolongamentos (neuritos) que contactam diferentes regiões de destino tanto na medula como na periferia do corpo (Fig. 2 e Fig. 3). A população neuronal ventrolateral do GRD, composta de neurônios de grande diâmetro primariamente mecanoceptivos e proprioceptivos, emite axônios que ingressam na medula pela

região medial do corno dorsal (Eide e Glover, 1997). Estes axônios estabelecem suas sinapses nas camadas mais profundas da substância cinzenta. Em contraste, os neurônios da região dorsomedial do GRD, de origem primariamente nociceptiva, emitem neuritos que invadem a medula pela região lateral do corno dorsal e terminam em lâminas mais superficiais da substância cinzenta (Eide e Glover, 1997; Brown e Fyffe, 1981). Através dessas inervações é possível a transmissão das diferentes modalidades sensoriais para o sistema nervoso central.

No caso particular do desenvolvimento do GRD, os neurônios são

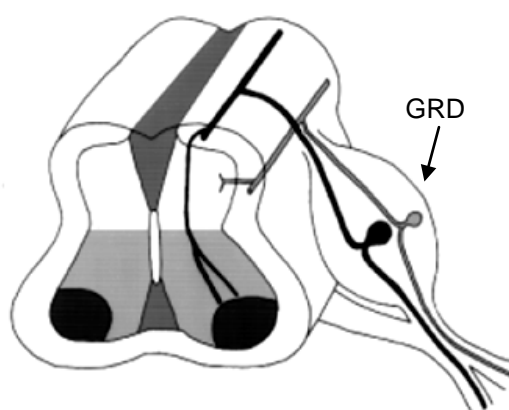


Figura 3 – O gânglio da raiz dorsal localiza-se adjacente ao tubo neural. Os corpos celulares de neurônios sensoriais presentes nestas estruturas emitem neuritos que ingressam na medula pela região dorsal.

Fonte: Adaptado de Sharma e Frank 1998.

sensíveis a fatores neurotróficos distintos, sendo eles: NGF (fator de crescimento de nervo, do inglês *Nerve Growth Factor*), BDNF (fator neurotrófico derivado de cérebro, do inglês *Brain-Derived Neurothrophic Factor*), e as neurotrofinas NT-3 e NT-4/5. Estas neurotrofinas se ligam com alta afinidade aos receptores da família tirosina-quinase (Trk) expressos diferencialmente pelos subtipos neuronais sensoriais (vide acima). NGF sinaliza através de TrkA (receptor tropomiosina quinase A), NT-3 através de TrkC (receptor tropomiosina quinase C), enquanto BDNF e NT-4/5 se ligam a TrkB (receptor tropomiosina quinase B).

Estas neurotrofinas pertencem a uma família de fatores tróficos do sistema nervoso que influenciam na sobrevivência, manutenção e morte de células neuronais e não-neuronais. Atuam regulando a expansão seletiva dos cones de crescimento das diferentes subpopulações neuronais permitindo a neuritogênese. O comportamento dos cones de crescimento na presença destas diferentes neurotrofinas tem correlação direta com a dinâmica do citoesqueleto.

1.1.1 Neurônios *TrkA*-positivos

Dentre os neurônios sensoriais, aqueles especializados em detectar e transduzir estímulos relacionados à dor são conhecidos como nociceptivos (Dubin e Patapoutian, 2010). Estes são neurônios sensoriais polimodais que inervam a pele e detectam estímulos de dor, temperatura, tato e coceira (Chen et al., 1998). A sobrevivência, manutenção e diferenciação desta população é altamente dependente da presença extracelular de NGF e sinalização via receptor *TrkA* (Patel et al., 2000).

O papel do NGF no desenvolvimento nociceptivo é altamente conservado (Guo et al., 2011). Camundongos *NGF^{-/-}* (Crowley et al., 1994) apresentam deficiências no sistema nervoso sensorial e simpático, que os leva a morte logo após o nascimento. O mesmo ocorre com camundongos *TrkA^{-/-}* (Smeyne et al., 1994). Nestes últimos, os neurônios nociceptivos não se desenvolvem, contudo se é feito o resgate destes neurônios através da inativação da via apoptótica, os mesmos só conseguem estabelecer conexões com a medula, demonstrando que a interação entre NGF/*TrkA* tem papel no estabelecimento de conexões com os alvos periféricos (Patel et al., 2000).

Os neurônios *TrkA*-positivos do GRD surgem durante a segunda onda de migração das células da crista neural e possuem menor diâmetro quando comparados aos demais tipos de neurônios sensoriais – mecanocéptivos e proprioceptivos (Ma et al., 1999; Rifkin et al., 2000). No embrião de galinha essa onda de migração ocorre por volta do estágio HH25, e a adição de novos neurônios no GRD perdura cerca de 48 horas. Os neurônios *TrkA*-positivos são encontrados na região dorsomedial do GRD (Fig. 4) e constituem a classe mais abundante de neurônios, representando cerca de 70% dos neurônios presentes na estrutura (Mu et al., 1993). Durante a neuritogênese, estes neurônios emitem prolongamentos latero-ventrais que se projetam até o tecido-alvo periférico; e dorsais que ingressam na região dorsolateral da medula. Os neuritos, que ingressam na medula, concentram seus ramos centrais na lâmina II da mesma, que é conhecida também como substância gelatinosa (Eide e Glover, 1997; Ozaki e Snider, 1997).

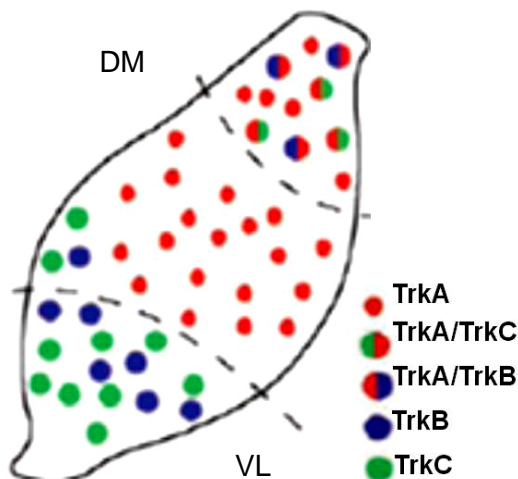


Figura 4 – Neurônios TrkA-positivos apresentam menor diâmetro e se localizam na região dorsomedial (DM) do GRD. VL-ventrolateral

Fonte: Adaptado de Guan *et al.*, 2003.

O processo de neuritogênese é um evento conservado, assim a neuritogênese dos neurônios TrkA-positivos é similar ao processo geral de neuritogênese que ocorre durante o desenvolvimento do sistema nervoso.

1.2 Neuritogênese

A neuritogênese pode ser definida de forma simples como processo de emissão de neuritos a partir do corpo celular do neurônio. O crescimento destes neuritos e sua subsequente diferenciação em dendritos ou axônios é o processo mais importante no desenvolvimento dos neurônios. No embrião de galinha, o início da neuritogênese segue a ordem de desenvolvimento antero-posterior, i.e. neuritos surgem primeiro em segmentos mais anteriores do tubo neural. Dessa forma, durante o desenvolvimento é possível observar neurônios em diferentes fases de neuritogênese dentro do mesmo embrião. Além disso, cada subtipo neuronal apresenta um padrão diferenciado de emissão de neuritos.

Os primeiros neuritos trunciais são motores e são emitidos no estágio HH 16-17 em direção aos somitos (Keynes e Stern, 1984). Posteriormente, no estágio HH 18-19, os neurônios pseudobipolares dos gânglios da raiz dorsal projetam um axônio que se bifurca no ramo periférico e um axônio central. Os ramos periféricos se estendem latero-ventralmente até coalescerem com os motoneurônios na raiz ventral formando o nervo espinhal. Juntos, os componentes motores e sensoriais do nervo se projetam até os tecidos-alvos periféricos.

O processo de neuritogênese é dinâmico, movido pelos elementos do citoesqueleto que compõe os neuritos e é guiado pelo cone de crescimento (Fig. 5). Dentre os elementos que compõe o citoesqueleto do neurito estão os microtúbulos, neurofilamentos e filamentos de actina (Fig. 5e, 5f e 5g). O cone de crescimento situa-se na extremidade do neurito em desenvolvimento e pode ser dividido em dois domínios (Fig. 5b): um domínio mais ativo e periférico rico em F-actina, e um domínio mais central, onde predominam feixes de microtúbulos (Forsher e Smith, 1988). Os microtúbulos são compostos por dímeros de alfa e beta-tubulina. Dentre as beta-tubulinas, as pertencentes à classe III são freqüentemente utilizadas como marcadores de neurônios em desenvolvimento (Lee et al., 1990; Ferreira e Caceres, 1992), devido a sua abundância no tecido nervoso.

A importância das beta-tubulinas de classe III no desenvolvimento de neuritos foi evidenciada no trabalho de Tucker et al. (2008). Estes autores observaram que a redução da tradução destas tubulinas através da eletroporação de RNA-

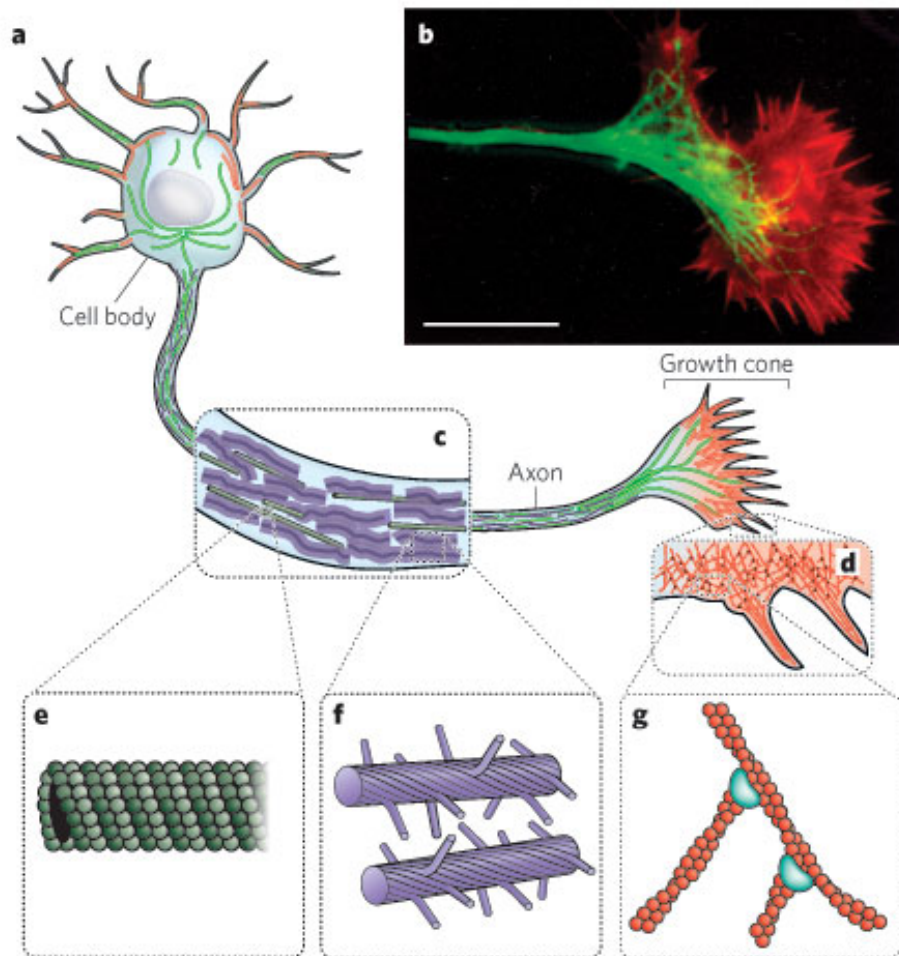


Figura 5 – Elementos do citoesqueleto do neurito. A partir do corpo celular (a) do neurônio saem prolongamentos denominados neuritos. O citoesqueleto do neurito (c) é composto de microtúbulos (e), neurofilamentos (f) e filamentos de actina (g). Na extremidade do neurito encontra-se o cone de crescimento (b), composto por um domínio central rico em microtúbulos (verde) e um domínio periférico rico em filamentos de actina (vermelho). Fonte: Adaptado de Fletcher e Mullins 2010.

antisense *morpholinos* impede ou reduz significativamente a extensão dos neuritos *in vitro*.

Na região periférica do cone de crescimento, os filamentos de actina se reorganizam e polimerizam para formar protrusões (Steketee et al., 2001) denominadas filopódios (Fig. 5d). Os filopódios são estruturas dinâmicas, compostas por F-actina, responsáveis pela captação e transdução de sinais extracelulares. A resposta do cone de crescimento a presença diferencial de neurotrofinas e demais sinais do meio modula a direção e a velocidade em que o neurito se estende, através da alteração na distribuição dos elementos do citoesqueleto (Gordon-Weeks 1991, 2004; Tanaka et al., 1995). Por exemplo, NGF induz a neuritogênese em células PC12 e como consequência observa-se um aumento na polimerização de microtúbulos, que por sua vez são responsáveis em controlar a extensão do neurito (Kelly et al., 2010). Já em outro exemplo, a adição de NGF em culturas de células do GRD de embrião de galinha aumenta o número de filopódios dos neurônios, através do aumento da taxa de formação dos feixes de F-actina (Ketschek e Gallo, 2010).

Neste contexto, o papel do transporte intracelular de elementos do citoesqueleto é fundamental para o crescimento e manutenção do neurito.

1.3 Miosina Va e sua participação no processo de neuritogênese

Miosina Va é uma molécula motora, que se movimenta através de seu domínio motor sobre os filamentos de actina, e apresenta um domínio globular associado a transporte vesicular na região carboxi-terminal (Trybus, 2000). É expressa em uma variedade de tecidos, contudo está enriquecida no tecido nervoso em desenvolvimento (Azevedo et al., 2004). Esta proteína está envolvida no transporte de neurofilamentos (Rao et al., 2002) e o seu domínio globular é de suma importância para o transporte de organelas e componentes relevantes para o estabelecimento de sinapses.

Miosina Va foi detectada em cones de crescimento de células do GRD em cultura, logo abaixo da região rica em actina do domínio periférico destas estruturas (El-Husseini e Vincent, 1999; Suter et al., 2000). A função desta proteína nos cones de crescimento foi verificada em experimentos de inativação por microinjeção de anticorpos (Wang et al., 1996). Neste experimento, foi utilizado um

anticorpo policlonal anti-MiosinaV que reconhece epítomos da região carboxi-terminal. Este anticorpo foi conjugado ao corante verde malaquita. Quando o conjugado é irradiado, com pulsos de laser, liberam radicais livres que resultam na inativação da proteína. Nestas condições, a inativação de Miosina V diminui a taxa de extensão e a motilidade dos filopódios (Wang et al., 1996). Em conjunto, estes dados claramente evidenciam a importância da proteína para a formação de prolongamentos neuronais.

1.4 Miosina Va e seu padrão de expressão durante a embriogênese

Consistente com um possível papel para Miosina Va na neuritogênese durante o desenvolvimento embrionário, Miosina Va é expressa no tubo neural de embriões de galinha durante a neurulação, no telencéfalo, no mesencéfalo, em fibras de nervos cranianos e nas raízes ventrais e dorsais do tubo neural posterior (Fig. 6), (Azevedo et al., 2004). Nas células do GRD de embrião de galinha *in vitro*, esta proteína está presente no corpo celular, nos neuritos e no cone de crescimento. Neste último verificou-se que a imunomarcação para Miosina Va foi mais forte na região central do cone de crescimento, onde os filamentos de microtúbulo abundam (El-Husseini e Vincent, 1999; Suter et al., 2000). Em contrapartida, o padrão de expressão de Miosina Va nos GRDs durante o desenvolvimento embrionário *in vivo* foi relatado apenas para um estágio do desenvolvimento (Fig. 6), não tendo sido

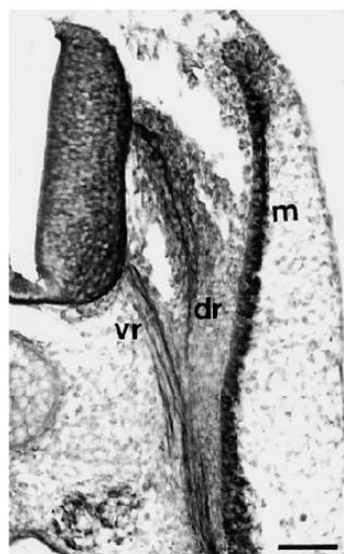


Figura 6 – Expressão de Miosina Va na região trunca do embrião de galinha. Miosina Va é expressa no tubo neural, nas raízes ventrais e dorsais e no miótomo da região trunca do embrião de galinha.
Fonte: Azevedo *et al.*, 2004.

ainda detalhado.

Miosina Va também está presente em cones de crescimento de neurônios hipocâmpais e de células de feocromocitoma PC12 após a neuritogênese induzida por NGF (El-Husseini e Vincent, 1999; Espreafico et al., 1992).

A deficiência de Miosina Va está associada à Síndrome de Griscelli em humanos (Mancini et al., 1998; Pastural et al., 1997). Esta síndrome resulta em várias anomalias neurológicas, como convulsões, hipotonia, desenvolvimento motor tardio, ataxia e retardo mental progressivamente debilitantes levando ao óbito (Anikster et al., 2002; Mancini et al., 1998; Pastural et al., 1997). Estas características também estão presentes em camundongos mutantes para Miosina Va (Wei et al., 1997; Wu et al., 1997), nos quais também se observa postura e equilíbrios anormais, convulsões associadas a rigidez e arqueamento acentuado das costas que, em conjunto os levam a morte poucos dias após o nascimento (Searle, 1952). Os camundongos também apresentam deficiência no processo de mielinização das fibras do sistema nervoso central, nervo óptico, medula espinhal e corpo caloso, possivelmente causado por alterações na morfogênese dos oligodendrócitos (Jacob e Vartanian, 2007). Consistente com um papel para Miosina Va no desenvolvimento glial, a superexpressão da sua forma truncada, em culturas primárias de hemisférios cerebrais de ratos, reduz significativamente o tamanho das lamelas dos oligodendrócitos (Jacob e Vartanian, 2007). Em conjunto, estes dados demonstram que Miosina Va é importante para o desenvolvimento de células neuronais e gliais.

1.5 Estrutura molecular da Miosina Va e suas funções celulares

Miosina Va é composta de duas cadeias pesadas dimerizadas. A região amino-terminal desta cadeia pesada contém o domínio motor que se liga à actina e hidrolisa ATP. Este é seguido de 6 motivos IQ que se ligam a calmodulina, e de domínios helicoidais responsáveis pela dimerização. Por fim, a região carboxi-terminal exibe o domínio globular, que atua em conjunto com alguns dos domínios helicoidais no transporte vesicular (Fig. 7) (Espreafico et al., 1992; Reck-Peterson et al., 2000; Trybus, 2008).

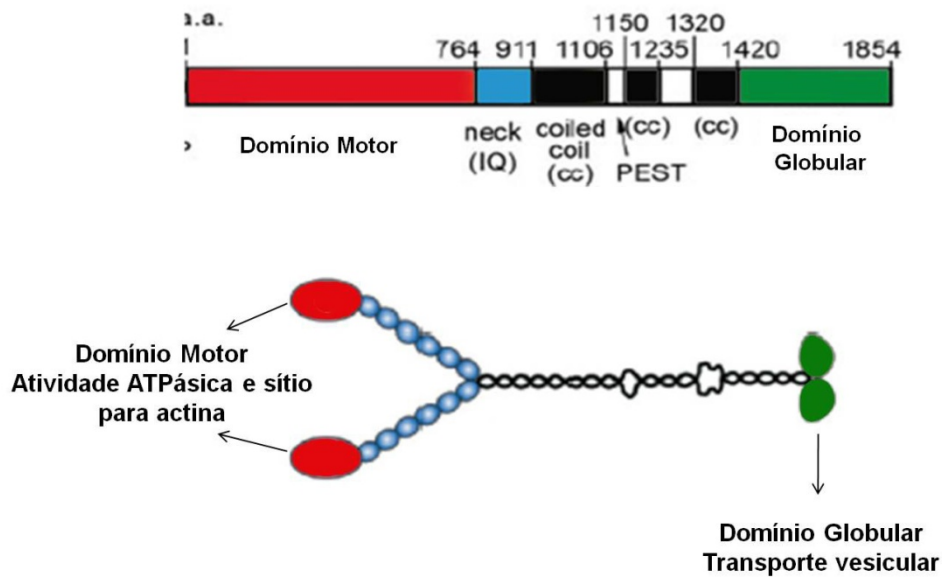


Figura 7 – Domínios da proteína Miosina Va. Domínio motor: sítio de ligação a actina, motivos IQ: ligação a calmodulina, domínios helicoidais: responsáveis pela dimerização, sequência PEST-like: sinais potenciais de degradação protéica rápida, domínio globular: transporte vesicular.

Fonte: Adaptado de Eppinga *et al.*, 2008 e Trybus, 2008, respectivamente.

O domínio globular também atua na estabilização da conformação de Miosina Va (Fig. 8) e provê a sensibilidade aos níveis de cálcio intracelular (Krementsov *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Thirumurugan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004). Portanto, o modelo atual para regulação da atividade de Miosina Va propõe que o domínio globular tem função dupla: na ausência de níveis apropriados de cálcio, Miosina Va assume uma conformação inativa, em que o domínio globular se dobra sobre a região amino-terminal assumindo uma conformação triangular (Fig. 8). A conformação inativa de Miosina Va impede que a mesma se ligue à actina e também inibe a atividade ATPásica da proteína. Na presença de níveis ótimos de cálcio, o domínio globular se expõe e é capaz de interagir com a maquinaria intracelular de transporte vesicular (Li *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004).

A participação do domínio globular na neuritogênese foi evidenciada nos experimentos de Eppinga *et al.* (2008). Neste trabalho foi realizada a superexpressão da forma truncada da proteína (com deleção do domínio globular) nos neurônios de *Drosophila melanogaster in vitro*. Como resultado, observou-se que a superexpressão diminuiu consideravelmente a extensão de neuritos e a presença de F-actina nos neurônios.

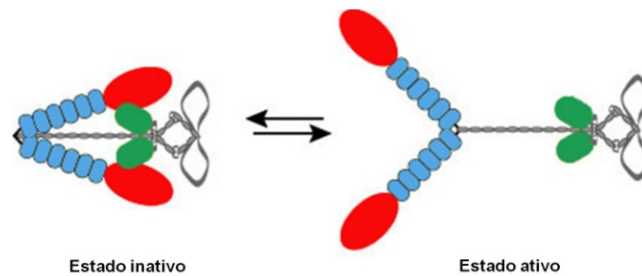


Figura 8 – Conformação da proteína Miosina Va nos estados inativo e ativo. No estado inativo, o domínio globular se liga ao domínio motor assumindo uma forma compacta da proteína. No estado ativo o domínio globular se expõe e é capaz de realizar transporte vesicular. Fonte: Adaptado de Li *et al.*, 2006.

Como visto na seção anterior, Miosina Va é amplamente expressa no sistema nervoso. Além deste tecido, esta proteína também é abundante nos melanócitos. Nestas estruturas, o domínio globular da proteína desempenha um papel importante no transporte de melanossomos. Na deficiência de Miosina Va observa-se a hipopigmentação da pele e dos cabelos, outra característica associada à Síndrome de Griscelli (Mancini *et al.*, 1998; Pastural *et al.*, 1997). Além disso, o domínio globular é capaz de interagir com a cinesina ou com sua molécula transportada colaborando com o transporte vesicular em redes mistas de microtúbulos e actina filamentosa (Ali *et al.*, 2008).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem as seguintes conclusões:

1 - Miosina Va é expressa antes do início da neuritogênese de neurônios TrkA-positivos do GRD;

2 - As células em neuritogênese são Miosina Va positivas;

3 - Miosina Va é expressa nos neuritos durante a neo-neuritogênese *in vitro*;

4 – A superexpressão do domínio globular de Miosina Va (pMES-Myc-MioVaGT) interfere no estabelecimento dos neuritos aumentando a proporção de células com neuritos curtos e diminuindo a proporção de células com neuritos longos.

REFERÊNCIAS*

Alami NH, Jung P, Brown A. Myosin Va increases the efficiency of neurofilament transport by decreasing the duration of long-term pauses. *J Neurosci*. 2009;29:6625-34.

Ali MY, Kremmentsova EB, Kennedy GG, Mahaffy R, Pollard TD, Trybus KM, Warshaw DM. Myosin Va maneuvers through actin intersections and diffuses along microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;104:4332–36.

Ali MY, Lu H, Bookwalter CS, Warshaw DM, Trybus KM. Myosin V and Kinesin act as tethers to enhance each others' processivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;25:4691-96.

Anikster Y, Huizing M, Anderson P, Fitzpatrick D, Klar A, Gross-Kieselstein E, Berkun Y, Shazberg G, Gahl W, Hurvitz H. Evidence that Griscelli syndrome with neurological involvement is caused by mutations in RAB27A, not MYO5A. *Am J Hum Genet*. 2002;71:407– 14.

Azevedo A, Lunardi LO, Larson RE. Immunolocalization of myosin Va in the developing nervous system of embryonic chicks. *Anat Embryol (Berl)*. 2004;208: 395-402.

Bronner-Fraser M, Wilson L, Matsudaira PT. *Methods in avian embryology*. V.51. Academic Press, 1996. 369 p.

Brown AG e Fyffe RE. Direct observations on the contacts made between Ia afferent fibres and alpha-motoneurons in the cat's lumbosacral spinal cord. *J Physiol*. 1981;313:121-40.

Calliari A, Sotelo-Silveira J, Costa MC, Nogueira J, Cameron LC, Kun A, Benech J, Sotelo JR. Myosin Va is locally synthesized following nerve injury. *Cell Motil Cytoeskeleton*. 2002;51,169-76.

Cao TT, Chang,W. Masters SE, Mooseker MS. Myosin-Va binds to and mechanochemically couples microtubules to actin filaments. *Mol Biol Cell*. 2004;15, 151–61.

* International Comitee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Carr VM. Dorsal root ganglia development in chicks following partial ablation of the neural crest. *J Neurosci*. 1984;4:2434-44.

Caspary T e Anderson KV. Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(4):289-97.

Chen PW, Chang YC, Hsieh ST. Trophic interactions between sensory nerves and their targets. *J Biomed Sci*. 1998; 6: 79-85.

Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, McMahon SB, Shelton DL, Levinson AD, Phillips HS. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell*. 1994;76(6):1001-11.

Darling TL, Shooter EM. In *Cell Culture Methods for Molecular and Cell Biology*. 1984;4:79-93.

DePina AS, Langford GM. Vesicle transport: the role of actin filaments and myosin motors. *Microsc Res Tech*. 1999;47:93-106.

Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 2010;120:3760-72.

Eide AL, Glover JC. Developmental dynamics of functionally specific primary sensory afferent projections in the chicken embryo. *Anat Embryol. (Berl)* 1997;195:237-50.

El-Husseini AE, Vicent SR. Cloning and characterization of a novel RING finger protein that interacts with class V myosins. *J Biol Chem*. 1999;274:19771-7.

Eppinga RD, Peng IF, Lin JL, Wu CF, Lin JJ. Opposite effects of overexpressed myosin Va or heavy meromyosin Va on vesicle distribution cytoskeleton organization and cell motility in nonmuscle cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2008;65:197-215.

Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AA, De Camilli PV, Larson RE, Mooseker MS. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190) an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol*. 1992;119: 1541-57.

Evans LL, Hammer J, Bridgman PC. Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from *dilute-lethal* neurons. *J Cell Sci.* 1997;110:439–449.

Fang X, Djouhri L, McMullan S, Berry C, Okuse K, Waxman SG, Lawson SN. *trkA* is expressed in nociceptive neurons and influences electrophysiological properties via Nav18 expression in rapidly conducting nociceptors. *J Neurosci.* 2005;25:4868-4878.

Ferreira A, Caceres A. Expression of the class III beta-tubulin isotype in developing neurons in culture. *J Neurosci Res.* 1992;32:516-29.

Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* 2010;463(7280):485-492.

Forscher P, Smith SJ. Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J Cell Biol.* 1988;107:1505-16.

Frank E, Sanes JR. Lineage of neurons and glia in chick dorsal root ganglia: analysis *in vivo* with a recombinant retrovirus. *Development.* 1991;111:895-908.

Gordon-Weeks PR. Growth cones: the mechanism of neurite advance. *Bio Essays.* 1991;13:235–39.

Gordon-Weeks PR Microtubules and growth cone function. *J Neurobiol.* 2004;58:70-83.

Guan W, Puthenveedu MA, Condic ML. Sensory neuron subtypes have unique substratum preference and receptor expression before target innervations. *J Neurosci.* 2003;23:1781-91.

Gumy LF, Tan CL, Fawcett JW. The role of local protein synthesis in axon regeneration. *Exp Neurol.* 2010; 223: 28-37.

Guo T, Mandai K, Condie BG, Wickramasinghe SR, Capecchi MR, Ginty D. An *envelopig* NGF-Hoxd1 signaling pathway mediates development of divergent neural circuits in vertebrates. *Nat Neurosci.* 2011;14:31-36.

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn.* 1992;195:231-272.

Huang J-D, Brady ST, Richards BW, Stenolen D, Resau JH, Copeland NG, Jenkins NA. Direct interaction of microtubule- and actinbased transport motors. *Nature*. 1999;397:267–70.

Jacob AS, Vartanian TK. Myosin Va controls oligodendrocyte morphogenesis and myelination. *J Neurosci*. 2007;27:11366-375.

Jenkins NA, Copeland NG, Taylor BA, Lee BK. Dilute (d) coat colour mutation of DBA/2J mice is associated with the site of integration of an ecotropic MuLV genome. *Nature*. 1981;293:370-74.

Kelly TA, Katagiri Y, Vartanian KB, Kumar P, Chen II, Rosoff WJ, Urbach JS, Geller HM. Localized alteration of microtubule polymerization in response to guidance cues. *J Neurosci Res*. 2010;88(14):3024-33.

Ketschek A, Gallo G. Nerve growth factor induces axonal filopodia through localizes microdomains of phosphoinositide 3-kinase activity that drive the formation of cytoskeleton precursors to filopodia. *J. Neurosci*. 2010;30(36):12185-97.

Keynes RJ, Stern CD. Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature*. 1984;310:786-9.

Kobova F, Svitkina T. Arp2/3 Complex Is Important for Filopodia Formation Growth Cone Motility and Neuritegenesis in Neuronal Cells. *Mol Biol Cell*. 2008;19:1561-74.

Krementsov DN, Krementsova EB, Trybus KM. Myosin V: regulation by calcium calmodulin and the tail domain. *J Cell Biol*. 2004;164:877-86.

Lawson SN, Biscoe TJ. Development of mouse dorsal root ganglia: an autoradiographic and quantitative study. *J Neurocytol*. 1979;8:265-74.

Lee MK, Tuttle JB, Rebhun LI, Cleveland DW, Frankfurter A. The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1990;17:118-132.

Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Nerve growth factor. *Physiol Rev*. 1968;48:534-569.

Li XD, Jung HS, Mabuchi K, Craig R, Ikebe M. The globular tail domain of myosin Va functions as an inhibitor of the myosin Va motor. *J Biol Chem*. 2006;281:21789-98.

Ma L, Merenmies J, Parada LF. Molecular characterization of the TrkA/NGF receptor minimal enhancer reveals regulation by multiple cis elements to drive embryonic neuron expression. *Development*. 2000;127:3777-88.

Ma Q, Fode C, Guillemont F e Anderson DJ. Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev*. 1999;13:1717-28.

Mancini AJ, Chan L S, Paller AS. Partial albinism with immunodeficiency: Griscelli syndrome: report of a case and review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 1998;38:295-300.

Maro GS, Vermeren M, Voiculescu O, Melton L, Cohen J, Charnay P, Topilko P. Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. *Nat Neurosci*. 2004;7:930-8.

Mu X, Silos-Santiago I, Carroll SL, Snider WD. Neurotrophin receptor genes are expressed in distinct patterns in developing dorsal root ganglia. *J Neurosci*. 1993;13:4029-41.

Ozaki S, Snider WD. Initial trajectories of sensory axons toward laminar targets in the developing mouse spinal cord. *J Comp Neurol*. 1997;380(2):215-29.

Pastural E, Barrat FJ, Dufourcq Lagelouse R, Certain S, Sanal O, Jabado N, Seger R, Griscelli C Fischer A de Saint Basile G. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat Genet*. 1997;16:289-92.

Patel DT, Jackman A, Rice FL, Kucera J, Snider WD. Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling *in vivo*. *Neuron*. 2000;25:345-357.

Rao MV, Engle LJ, Mohan PS, Yuan A, Qiu D, Cataldo A, Hassinger L, Jacobsen S, Lee VM, Andreadis A, Julien JP, Bridgman PC, Nixon RA. Myosin Va binding to neurofilaments is essential for correct myosin Va distribution and transport and neurofilament density. *J Cell Biol*. 2002;159:279-290.

Reck-Peterson SL, Novick PJ, Mooseker MS. The tail of a yeast class V myosin myo2p functions as a localization domain. *Mol Biol Cell*. 1999;10:1001-17.

Rifkin JT, Todd VJ, Anderson LW, Lefcort F. Dynamic expression of neurotrophin receptors during sensory neuron genesis and differentiation. *Dev Biol.* 2000;227:465–80.

Searle AG. A lethal allele of dilute in the house mouse. *Heredity.* 1952; 6: 395-401.
Sharma K e Frank E. Sensory axons are guided by local cues in the developing dorsal spinal cord. *Development.* 1998;125:635-43.

Smeyne RJ, Klein R, Schnappt A, Long LK, Bryant S, Lewin A, Lira SA, Barbacid M. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature.* 1994;368(6468):246-9.

Steketee M, Balazovich K, Tosney KW. Filopodial Initiation and a Novel Filament-organizing Center, the Focal Ring. *Mol Biol Cell.* 2001;12(8):2378-95.

Suter DM, Espindola FS, Lin CH, Forscher P, Mooseker MS. Localization of unconventional myosins V and VI in neuronal growth cones. *J Neurobiol.* 1999;42: 370-82.

Tabb JS, Molyneaux BJ, Cohen DL, Kuznetsov SA, Langford GM. Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *J Cell Sci.* 1998;111:3221–34.

Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brugger B, Ringler P, Muler SA. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell.* 2006;127:831–46.

Tanaka E, Sabry J. Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell.* 1995;83:171–76

Thirumurugan K, Sakamoto T, Hammer JA 3rd, Knight PJ. The cargo-binding domain regulates structure and activity of myosin 5. *Nature.* 2006;442:212-5.

Trybus KM. Myosin V from head to tail. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:1378-89.

Tucker RP, Tran H, Gong Q. Neurogenesis and neurite outgrowth in the spinal cord of chicken embryos and in primary cultures of spinal neurons following knockdown of Class III beta tubulin with antisense morpholinos. *Protoplasma.* 2008;234:97-101.

Verma P, Chierzi S, Codd AM, Campbell DS, Meyer RL, Holt CE, Fawcett JW. Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *J Neurosci*. 2005;25:331–342.

Zheng JQ, Kelly TK, Chang B, Ryazantsev S, Rajasekaran AK, Martin KC, Twiss JL. A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. *J Neurosci*. 2001;21:9291-303.

Wang FS, Wolenski JS, Cheney RE, Mooseker MS, Jay DG. Function of myosin-V in filopodial extension of neuronal growth cones. *Science*. 1996;273:660-63.

Wang F, Thiumurugan K, Stafford WF, Hammer JA 3rd, Knight PJ, Sellers JR. Regulated conformation of myosin V. *J Biol Chem*. 2004;279(4):2333-6.

Wei Q, Wu X, Hammer III JA. The predominant defect in dilute melanocytes is in melanosome distribution and not cell shape supporting a role for myosin V in melanosome transport. *J Muscle Res Cell Motil*. 1997;18:517–27.

Willis DE, Twiss JL. The evolving roles of axonally synthesized proteins in regeneration *Curr Opin Neurobiol* 2006;16:111-8.

Wu X, Bowers B, Wei Q, Kocher B, Hammer III JA. Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. *J Cell Sci*. 1997;110:847–59.

Wu X, Bowers B, Rao K, Wei Q, Hammer JA 3rd. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function *in vivo*. *J Cell Biol*. 1998;143(7):1899-918.