



Universidade Federal do Rio de Janeiro



Campus Macaé

Caracterização dos glicosaminoglicanos do sistema nervoso
central e seu envolvimento no processo de neuroregeneração
na ascídia *Phallusia nigra*

Evelyn Mendonça Reis

MACAÉ
DEZEMBRO 2013

Evelyn Mendonça Reis

Caracterização dos glicosaminoglicanos do sistema nervoso central e seu envolvimento no processo de neuroregeneração na ascídia *Phallusia nigra*

Monografia Apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico

Orientadora: Cintia Monteiro de Barros

MACAÉ
DEZEMBRO 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Reis, Evelyn Mendonça

Caracterização dos glicosaminoglicanos do sistema nervoso central e seu envolvimento no processo de neuroregeneração na ascídia *Phallusia nigra*

Monografia do Curso de Farmácia

- 1- Regeneração
- 2- Degeneração
- 3- Glicosaminoglicanos
- 4- Ascídias
- 5- Sistema Nervoso Central

I- Universidade Federal do Rio de Janeiro, *Campus Macaé*.

II- Caracterização dos Glicosaminoglicanos do Sistema Nervoso Central e seu envolvimento no processo de neuroregeneração na ascídia *Phallusia nigra*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiro a Deus, que me guia, ilumina e abençoa todos os dias durante minha caminhada.

Agradeço aos meus pais, Sandro e Vanda, por serem tudo que eu preciso, por me apoiarem, e por saber que, por todos os dias que eu vivi e que vou viver, eu fui e serei sempre amada. Amo vocês!

As minhas irmãs Érika e Karina, por não serem perfeitas, mas por serem minhas, e por saber que quando eu precisar sempre terei vocês! Amo vocês!

Agradeço a toda minha família por todo apoio, amor e momentos felizes, e principalmente a minha prima Thaylisa, porque mesmo estando longe de mim, cuida de mim, me apóia e escuta todas as minhas reclamações sempre!

Aos meus amigos, a todos aqueles que contribuem para os meus dias serem mais felizes, aos que me apóiam, aos que estão longe, aos que me dizem não só o que eu quero ouvir e sim o que preciso, muito obrigada!

Obrigada as amigas que a faculdade de farmácia me deu, e que agora, mesmo ao fim dessa etapa, vou levar para o resto da minha vida, Paula, Millena, Rayssa e Thamiris.

Aos meus colegas de laboratório, por fazerem a rotina ser mais divertida, os almoços os mais esperados, e por saber que posso contar com vocês! Obrigada Bianca, Andressa, Paula, Jéssica, Danilo, Mariana, Brenda, Taynan, Juliana, Thiago e Israelle.

Muito obrigada a minha orientadora Cintia, pela amizade, pelo apoio, pela paciência, pelos puxões de orelha merecidos, e principalmente por acreditar em mim. Obrigada também por ser um exemplo de professora, de honestidade e de dedicação!

Aos professores Dr. Leonardo Paes Cinelli e Dra. Luciana Ferreira Romão por aceitarem participar da avaliação desse trabalho.

A FAPERJ, FUNEMAC e ao CNPQ pela verba cedida para a realização desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Cladograma do filo dos Chordata.

FIGURA 2 - Visão filogenética da capacidade de regeneração do SNC.

FIGURA 3 – Ascídia *Phallusia nigra* em duas fases de sua vida.

FIGURA 4 - Distribuição da ascídia *Phallusia nigra*

FIGURA 5 - Esquema do interior de uma ascídia solitária.

FIGURA 6 - Unidades estruturais dos glicosaminoglicanos.

FIGURA 7 - Esquema hipotético da composição das redes perineuronais.

FIGURA 5 8 -Figura 8: A) Fórmula estrutural da 3-acetilpiridina; B) Fórmula Estrutural da nicotinamida.

FIGURA 9 - Foto do Porto do forno, Arraial do Cabo.

FIGURA 10 - Foto de Armação de Búzios

FIGURA 11 - Ação da condroitinase ABC.

FIGURA 12-Gânglio da áscidia *Phallusia nigra* controle corado com corante de rotina HE e DMB.

FIGURA 13 - Imunofluorescência do gânglio controle com Anti-heparam sulfato e anti-dermatam sulfato

FIGURA 14 - Eletroforese em gel de agarose

FIGURA 15 - Comparação entre os gânglios controle e 24h após indução da degeneração com hematoxilina e eosina

FIGURA 16 - Comparação através de imunofluorescência com o anticorpo anti- β III-tubulina

FIGURA 17 - Gráfico de fluorescência por área (%Área) para beta-III-tubulina, comparando gânglio 24 horas após a degeneração com gânglio controle (Teste T, $p < 0,05$).

FIGURA 18 - Comparação através de imunofluorescência com o anticorpo anti-heparam

FIGURA 19 - Gráfico de intensidade de fluorescência por área (%Área) para o heparam sulfato, comparando gânglio 24 horas após a degeneração com gânglio controle (Teste T, $p < 0,05$)

FIGURA 20 - Comparação através de imunofluorescência com o anticorpo anti-dermatam

FIGURA 21 - Gráfico de fluorescência por área (%Área) para dermatam sulfato, comparando gânglio 24 horas após a degeneração com gânglio controle (Teste T, $p < 0,05$)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Anticorpos primários utilizados nos experimento de imunofluorescência

TABELA 2: Anticorpos secundários utilizados no experimento de imunofluorescência

TABELA 3: Enzima utilizada no experimento de eletroforese em gel de agarose.

LISTA DE ABREVIÇÕES

3-AP	3-acetilpiridina
3-APAD	3-AP-adeninedinucleotide

3-APADP	3-AP- adeninad nucleotídeo de fosfato
AH	ácido hialurônico
BSA	albumina de soro bovino
C4S	condroitim-4-sulfatado
C6S	condroitim-6-sulfatado
CS	condroitim sulfato
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMB	azul de dimetilmetileno, do inglês dimethylmethyl blue
DS	dermatam sulfato
GABA	ácido gama-aminobutírico
GAGs	glicosaminoglicanos
HE	hematoxilina e eosina
HS	heparam sulfato
KS	queratam sulfato
MEC	matriz extracelular
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PBS	tampão fosfato salino
PG	proteoglicano
RPN	rede perineuronal
SNC	sistema nervoso central
TUJ	β -III-tubulina

Sumário

1. Resumo	1
2. Introdução	2
2.1. Definição de regeneração	2
2.2. Ascídia	3

2.3. Sistema Nervoso Central das áscidias	5
2.4. Processo de regeneração no SNC	7
2.5. Glicosaminoglicanos	8
2.6. Glicosaminoglicanos e a Rede Perineuronal	10
2.7. Envolvimento dos GAGs na regeneração	11
2.8. A neurotoxina 3-acetilpiridina	13
3. Justificativa.....	14
4. Objetivo.....	14
4.2. Objetivos Específicos:	15
5. Materiais e Métodos.....	15
5.1. Coleta e Manutenção dos animais.....	15
5.2. Injeção sistêmica de 3AP – para indução da degeneração	16
5.4. Imunofluorescência	17
5.5. Extração de GAGs.....	19
5.6. Eletroforese em gel de agarose.....	19
5.7. Quantificação da fluorescência.....	21
5.8. Análise Estatística.....	21
6. Resultados	21
6.1. Caracterização do Sistema Nervoso Central da ascídia <i>Phallusia nigra</i>	21
6.2. Gânglio 24h após a indução da degeneração e GAGs.....	26
7. Conclusão	33
8. Perspectivas	33
9. Referências Bibliográficas.....	34

1. Resumo

As ascídias são invertebrados marinhos que pertencem ao filo Chordata, subfilo Urochordata e, devido a sua proximidade filogenética com o Vertebrata possuem várias semelhanças com este, inclusive no sistema nervoso central (SNC). Entretanto, apesar de semelhantes apresentam diferentes capacidades regenerativas. Enquanto, os vertebrados regeneram o SNC somente durante a fase embrionária e com várias restrições, as ascídias têm a capacidade de regenerar completamente seu SNC após completa ablação em adultos. Estudos recentes mostram que várias substâncias têm participação na regeneração parcial do SNC em vertebrados como os glicosaminoglicanos (GAGs). Estes foram vistos como constituintes de uma matriz extracelular especializada conhecida como rede perineuronal (RPN). Alguns GAGs da RPN como o heparan sulfato (HS) que possui capacidade de estimular o crescimento de dendritos, e outros como o condroitim sulfato (CS) conhecido por inibir. No presente estudo, foi induzida a degeneração do SNC central da *Phallusia nigra* utilizando a neurotoxina 3-acetilpiridina (3-AP), que promove a lesão química em neurônios. Além disso, foi investigado o perfil de GAGs do SNC da ascídia através de extração e eletroforese em gel de agarose. A neurotoxina 3-AP foi administrada na circulação sistêmica da ascídia, e ao fim de 24 horas após a aplicação da droga, os animais foram eutanasiados e o SNC dissecado e processado para microscopia de luz. Foram realizados também, ensaios de imunofluorescência para traçar o perfil degenerativo e regenerativo do SNC utilizando-se anticorpos, anti- β -III-tubulina (TUJ – marcador de neurofilamento), anti-heparan sulfato, e anti-dermatam sulfato. Dessa forma, a eletroforese em gel de agarose demonstrou a presença de dermatam sulfato (DS) e HS na matriz extracelular (MEC) do SNC mais especificamente na RPN. E, 24 horas após a injeção de 3-AP foi observado vacuolização e desorganização tecidual, quando comparada com os animais controle. A imunofluorescência com TUJ mostrou redução de neurônios no córtex neural. E na MEC observou-se aumento de HS e DS no SNC. Estes resultados demonstram em conjunto que o HS e DS estão envolvidos no processo de regeneração do SNC da *Phallusia nigra* assim como observado nos mamíferos.

2. Introdução

2.1. Definição de regeneração

Muitos animais possuem capacidade de regenerar partes do seu corpo, porém, apresentam diferentes aspectos e limitações no processo de regeneração. Em 1740, *Tremblay* descobriu que a hidra poderia regenerar-se após uma bissecção, desde então a regeneração passou a ser amplamente estudada no campo científico (Lenhoff & Lenhoff, 1991).

Já se sabe que o subfilo Vertebrata (Figura 1), apresenta capacidade regenerativa limitada, enquanto o subfilo Urochordata, grupo irmão dos Vertebrata, apresenta alta capacidade regenerativa, e que esta capacidade não diminui durante a fase adulta da vida dos animais deste subfilo (Lenhoff *et al.*, 1988, 1991).

Como Urochordata e Vertebrata são do mesmo filo, Chordata, apresentam algumas características em comum como: presença de notocorda, tubo nervoso dorsal, fendas branquiais e cauda pós-anal, em pelo menos uma fase de sua vida. Nos vertebrados, a notocorda está presente somente na fase embrionária e larval e em adultos é substituída pela coluna vertebral, enquanto nos urocordados, a notocorda sofre regressão, e o tubo neural vai dar origem ao complexo nervoso do organismo adulto (Brusca, 2003).

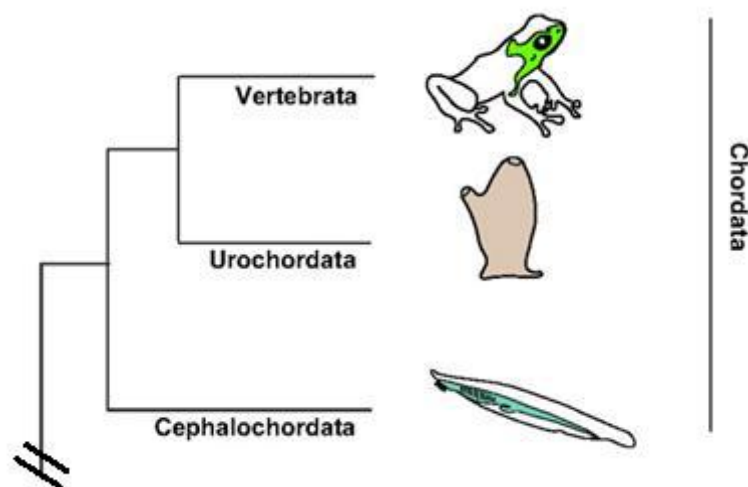


Figura 1: Cladograma do filo dos Chordata. Adaptado de: Röttinger E, and Lowe C J Development 2012;139:2463-2475

As ascídias, que pertencem ao subfilo Urochordata, possuem ainda a capacidade regenerar completamente seu SNC após ablação em adultos (Bollneret *al.*, 1992), regenerando também morfológica e funcionalmente (Dahlberget *al.*, 2009), enquanto os mamíferos possuem capacidade de regeneração do SNC parcial e limitada ao estágio de embrião (Tanaka & Ferretti, 2009) (Figura 2).

Devido às características citadas, as ascídias se tornam bons modelos para estudo comparativo quanto a degeneração e regeneração do SNC (Dahlberg, *et al.*, 2009).

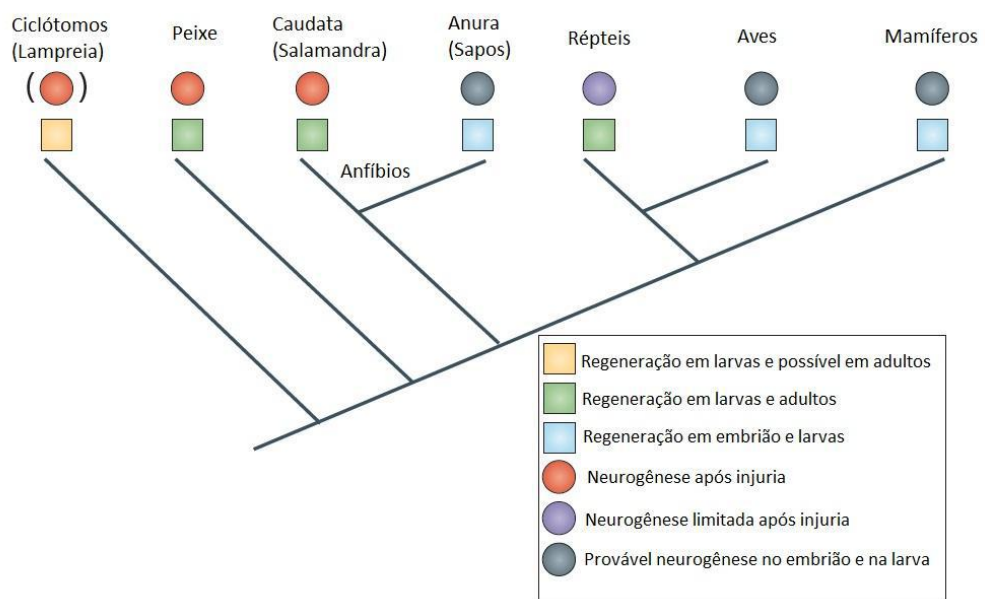


Figura 2: Visão filogenética da capacidade de regeneração do SNC. Adaptado de: Tanaka & Ferretti, 2009.

2.2. Ascídia

Ascídias são animais marinhos sésseis, distribuídos por todo o mundo, inclusive por toda a costa do Brasil. As ascídias podem ser solitárias ou coloniais, vivem em águas rasas ou profundas, podendo estar fixadas em rochas, ou substratos artificiais como cascos de navios, píeres. Possuem ampla distribuição, e isso se deve principalmente ao fato de a dispersão de seus componentes ocorrer em duas situações – estágio larval (livre-natante), e por gametas (Lambert, 2005).

A ascídia *Phallusia nigra* é uma espécie de ascídia solitária oriunda do Mar Vermelho e do Oceano Índico ocidental. Foi introduzida em vários locais, incluindo

Flórida, Havaí, Mar Mediterrâneo, Golfo do México e do Caribe ao sul para o Brasil (Figura 3). É comum ver seu crescimento e sua coloração distinta a torna visível nas rochas, manguezais, recifes de corais e substratos artificiais. Sua túnica é firme, suave e raramente incrustado com algas, detritos ou outros invertebrados. A túnica pode ser marrom escuro, azul-preto ou preto, e os animais mais jovens pode possuir cor cinza. Sua forma é oval ou alongado, e se fixa aos substratos por sua base. O sifão oral é dorsal, aproximando-se do sifão atrial (Bonnet e Rocha, 2011). A *Phallusia nigra* ocasionalmente cresce até 10-11 cm de altura, e muitas vezes é maior do que 6-7 cm e diâmetro de 3-5 cm (Van Name, 1921; Van Name, 1945).

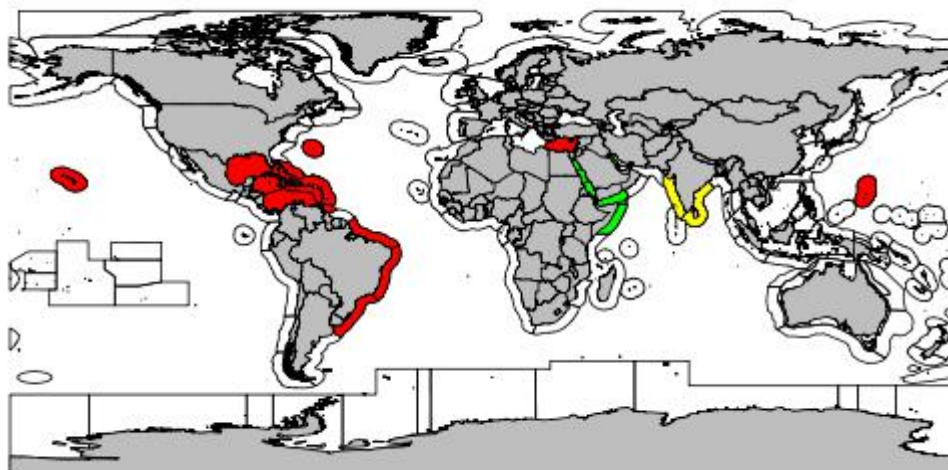


Figura 3: Distribuição da ascídia *Phallusia nigra*; Verde – nativa (naturais da região), Vermelho –introduzida,; Amarelo –criptogênica.

Retirado de: <http://invasions.si.edu/nemesis/>. Acessado em 10/12/2013.

As ascídias durante a fase larval (Figura 4A) apresentam notocorda, que após a larva encontrar um local para se fixar através das papilas adesivas, regride e então, forma o tubo neural, e deste tubo neural forma-se o complexo neural do animal adulto (Figura 4B) (Ruppert & Barnes, 1996).

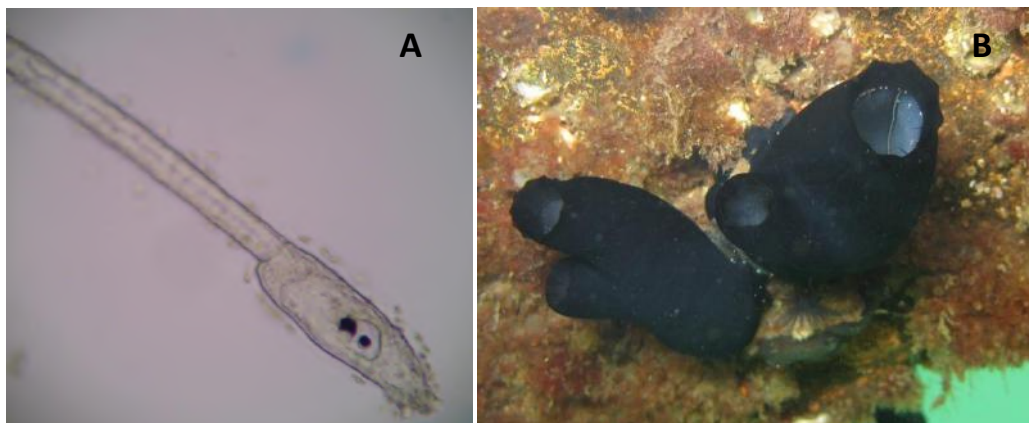


Figura 4: Ascídia *Phallusia nigra* em duas fases de sua vida. A) fase larval; B) fase adulta.
Retirado de: http://biogeodb.stri.si.edu/bocas_database/search/species/1193

2.3. Sistema Nervoso Central das áscidias

A larva de ascídia, por possuir notocorda no estágio larval e esta ter origem mesodérmica, é qualificada como um ancestral do cérebro de vertebrado, o que faz com que seja a mais estudada dentre os demais invertebrados até o momento (Brusca & Brusca 2003). Em estudos recentes, os neurônios das larvas de ascídias foram classificados, baseando-se em suas propriedades neurotransmissoras, e os tipos de neurônios identificados até agora foram: glutamatérgicos, colinérgicos, ácido gama-aminobutírico (GABA), serotoninérgicos, neuropeptídeos dentre outros (Horie *et al.*, 2009).

As partes anteriores do SNC da ascídia larval, ou seja, a vesícula sensorial, cérebro posterior, e gânglio visceral, contribuem para a formação do SNC adulto. Assim, os componentes do SNC da larva são mantidos mesmo que o plano do seu corpo seja submetido a extenso rearranjo durante a metamorfose para formar as ascídias adultas. Além disso, o eixo anteroposterior do SNC das larvas também é herdado de modo a formar o SNC adulto (Wada *et al.*, 1999; Imai *et al.*, 2009). Em contraste com a manutenção de forma geral do SNC durante a metamorfose, com os neurônios é diferente, a maioria dos neurônios de larvas, com exceção de neurônios colinérgicos, desaparecem durante o processo de formação de adultos, e a maioria das “novas” células do SNC adulto, são fornecidas a partir de células endimárias larvares (Horie *et al.*, 2011).

O sistema nervoso central das ascídias adultas ou complexo neural é composto por um gânglio cerebral, nervos da parede do corpo, o nervo visceral, o plexo dorsal em fita, estruturas sensoriais conectadas aos sifões e a glândula neural. Esta que conecta o lúmen da brânquia a um funil ciliado através de um ducto ciliado que acredita-se ser um análogo a hipófise de mamíferos entre outras hipóteses. Entretanto, nenhuma similaridade histológica ou fisiológica foi encontrada entre glândula neural e a hipófise (Ruppert, 1990; Dahlberg *et al.*, 2009).

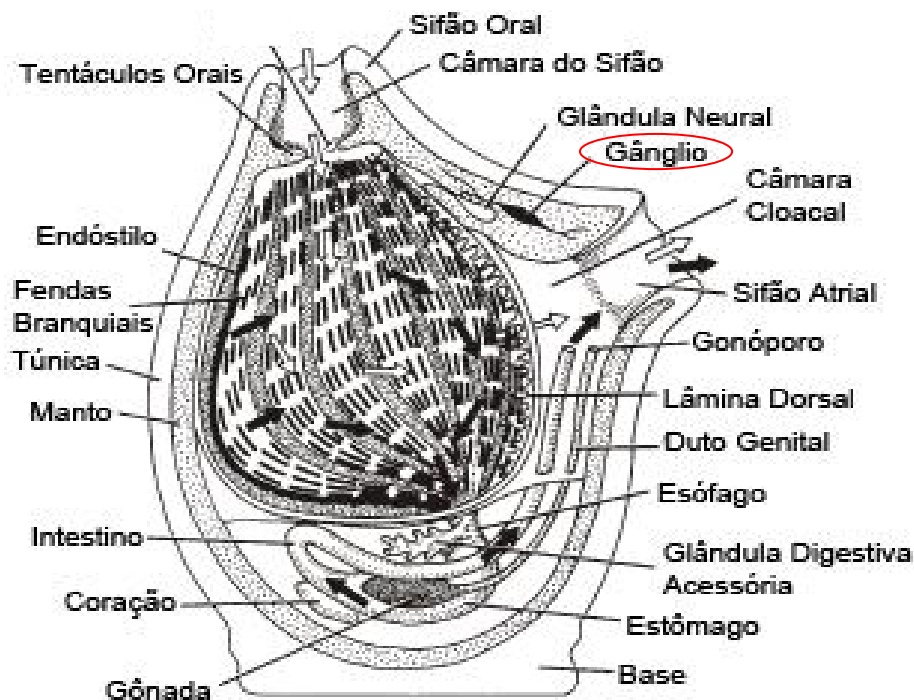


Figura 5: Esquema do interior de uma ascídia solitária. Destacado em vermelho a localização do gânglio das ascídias. Modificado de Brusca & Brusca, 2003

O gânglio cerebral localiza-se numa região mediana e dorsal entre os dois sifões das ascídias (Figura 5), num corte longitudinal apresenta-se em várias camadas de corpos celulares na região do córtex do gânglio e um material fibroso na medula além de uma zona de transição (Koyama *et al.*, 1993).

2.4. Processo de regeneração no SNC

Ao se tratar do assunto de regeneração do sistema nervoso, deve-se primeiro avaliar qual o tipo de dano causado (injúria ou químico) e qual o local da lesão. Um dos fatores mais importantes neste contexto é a axonogênese, a neurogênese e a sinaptogênese, onde a axonogênese ocorre para restabelecer a função de um neurônio com injúria no axônio, a neurogênese que é a produção de novos neurônios a partir de precursores (Tanaka & Ferratti, 2009) e a sinaptogênese é o estabelecimento de novas sinapses entre neurônios (Duman *et al.*, 2012).

Quando observamos a regeneração no subfilo dos vertebrados (Figura 2), podemos observar, que na sua maioria, quanto mais primitivo o animal na escala filogenética, maior a sua capacidade de regeneração (larva ou embrião e adulto), e também maior sua capacidade de neurogênese. Esta característica foi sendo diminuída ou perdida durante a evolução, mais próximo dos mamíferos esta característica vai se perdendo, acontecendo apenas a regeneração e neurogênese em embriões (Tanaka & Ferratti, 2009).

Em ascídias, sabe-se que a espécie *Ciona intestinalis* após sofrer a ablação completa do complexo neural em adultos, incluindo a parte da brânquia e da parede do corpo, o mesmo se regenera completamente dentro de cerca de um mês (Bollner *et al.*, 1992). Sendo que a taxa de regeneração completa depende da temperatura, alimentação, estresse e do ambiente no qual o animal está inserido (Petersen *et al.*, 1997).

Os tipos celulares envolvidos no processo de regeneração ainda são desconhecidos, mas é possível que células tronco-indiferenciadas hematopoiéticas (hemoblastos) estejam envolvidas no processo de regeneração (Bollner *et al.*, 1995). Além dos hemoblastos, outra possível fonte de neuroblastos que contribui para a regeneração das ascídias pode ser o cordão dorsal, que é uma estrutura epitelial originária do complexo neural que conecta este até os ovários presente em algumas espécies (Bollner *et al.*, 1995).

Outro grupo de substância que tem sido altamente estudado no contexto da regeneração do SNC são os glicosaminoglicanos (GAGs) (Moon *et al.*, 2001; Bradbury *et al.*, 2002).

2.5. Glicosaminoglicanos

Os GAGs são heteropolissacarídeos longos, não-ramificados, formados por unidades repetidas de dissacarídeos constituídos por um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou açúcar neutro (galactose no queratam sulfato) e uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina). Além da carboxila, esses compostos apresentam grupamentos sulfato (exceto ácido hialurônico), o que lhes atribui carga negativa elevada (Mathews, 1975).

Os GAGs são classificados em seis tipos de acordo com suas composições monoméricas, tipo de ligações glicosídicas intra- e inter-dissacarídicas, grau e posição da sulfatação (Figura 5). Estes são: condroitim4- e 6- sulfato (C4S, C6S), queratam sulfato (KS), ácido hialurônico (AH), DS, heparina e HS. Os GAGs sulfatados aparecem amplamente distribuídos na escala filogenética, desde espongiários até mamíferos superiores (Dietrich *et al.*, 1989; Medeiros *et al.*, 2000). HS, CS e DS apresentam uma distribuição específica em cada tecido, independente da espécie estudada. A heparina apresenta uma distribuição irregular em diferentes tecidos (Nader e Dietrich, 1989).

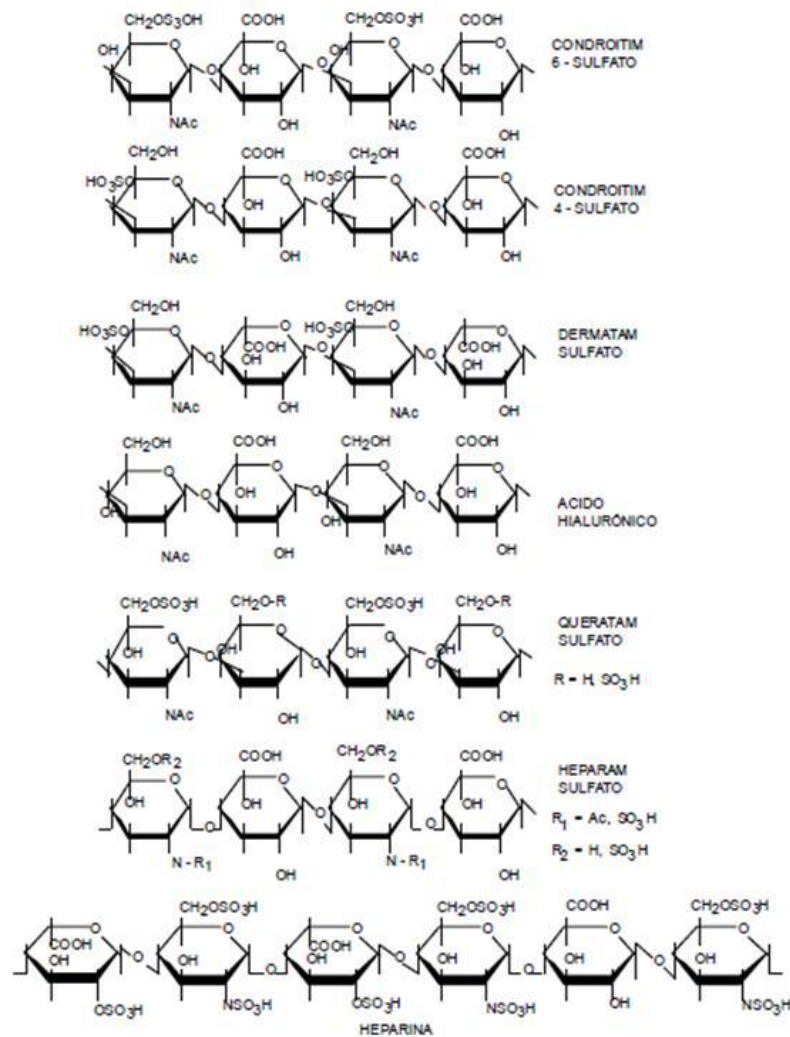


Figura 6: Unidades estruturais dos glicosaminoglicanos.

Retirado de: Tese de doutorado de Yvette May Coulson-Thomas, 2008.

Os GAGs são encontrados nas células sob a forma de proteoglicanos, exceto o AH. Os PG que contém de HS, DS, C4S e C6S são componentes presentes em todas as células de mamífero e de suas superfícies (Dietrich, 1984), e são importantes componentes constituintes da MEC e da membrana basal, podendo se localizar também na superfície das células ou em grânulos citoplasmáticos, assim como são presentes no SNC também na MEC e na região que circunda os neurônios chamada de rede perineuronal (RPN).

A atividade biológica de cada PG depende das propriedades do seu esqueleto protéico, da estrutura química do(s) seu(s) GAG(s) covalentemente ligado(s) e sua localização. E o tipo de cadeia de GAG ligada exerce uma grande influência na sua função biológica (Dietrich, 1984; Esko, 1991). Os PGs atuam como organizadores de

tecidos e influenciam no crescimento celular e na maturação dos tecidos especializados, têm um importante papel como filtro biológico, pois modulam a atividade de determinados fatores de crescimento, atuam na organização estrutural da MEC e regulação da interação célula-célula e célula-matriz, podem atuar no crescimento e invasão tumoral, podem atuar na plasticidade de neurônios (Iozzo, 1998; Bernfield *et al.*, 1992; 1999).

2.6. Glicosaminoglicanos e a Rede Perineuronal

Além de os GAGs serem encontrados na MEC do SNC, estes também são encontrados em uma estrutura especial conhecida como RPN (Figura 7) que é uma região altamente condensada e especializada que rodeia corpos celulares e dendritos proximais de algumas classes de neurônios (Celio e Blumcke 1994; Celio *et al.*, 1998; Yamaguchi 2000; Murakami e Ohtsuka, 2003b). Os componentes desta RPN, se difere da composição da MEC, sendo em geral compostos por PGCS. A função das RPNs não está totalmente estabelecida, mas existem várias hipóteses como, estabilização sináptica, a limitação da plasticidade sináptica (Hockfield *et al.*, 1990; Corveti e Rossi, 2005), apoio a homeostase de íons em torno de neurônios de alta atividade (Hartig *et al.*, 1999) e neuroproteção (Bruckner *et al.*, 1999; Hartig *et al.*, 2001b; Morawski *et al.*, 2004).

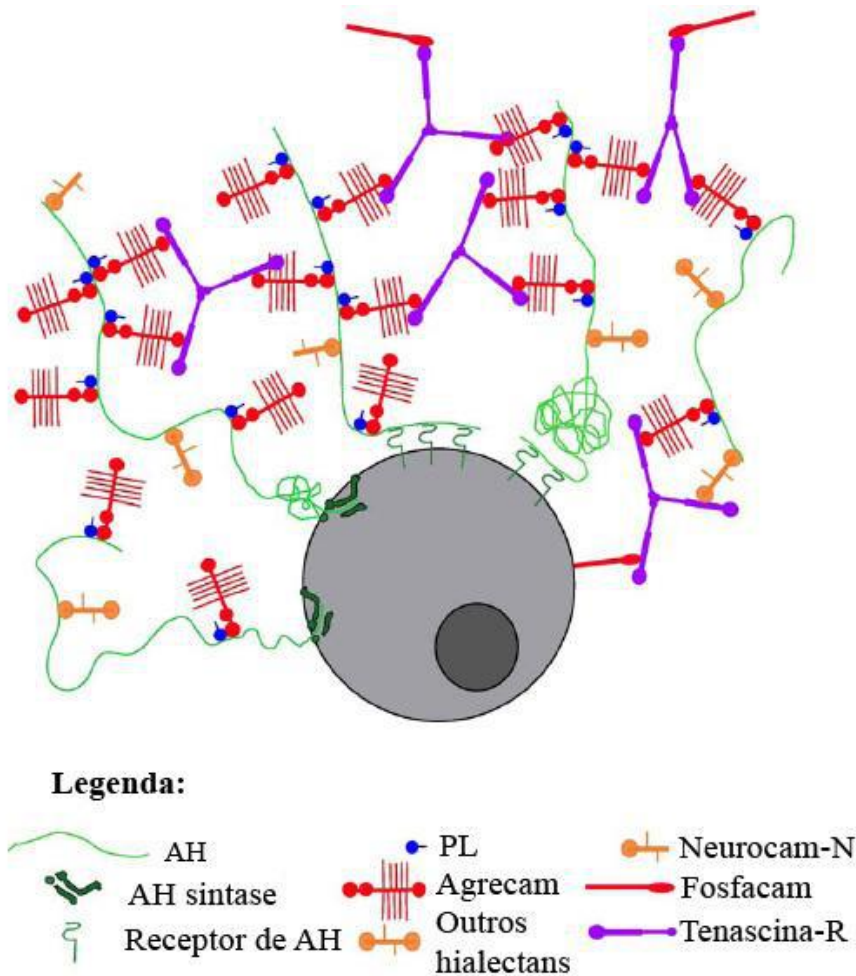


Figura 7. Esquema hipotético da composição das redes perineuronais. (AH)ácido hialurônico; (PL) proteína de ligação. Figura modificada de Galtrey e Fawcett, 2007.

2.7. Envolvimento dos GAGs na regeneração

Os proteoglicanos de CS (PGCS) estão envolvidos com a formação de uma cicatriz glial após a injúria do SNC, tendo como principais ações a inibição da regeneração axonal (Matsui e Oohira, 2004) e restrição da plasticidade (Rhodes e Fawcett, 2004). Estudos mostram que com a remoção das cadeias de CS através da enzima condroitinase ABC, a atividade inibitória dos PGs de CS é removida assim como a das células gliais *in vitro* (Smith-Thomas *et al.*, 1995, McKeon *et al.*, 1995) . E *in vivo*, foi visto que, o tratamento com condroitinase ABC aumenta a regeneração dos axônios dos neurônios dopaminérgicos (Moon *et al.*, 2001) e promove a regeneração e recuperação funcional dos axônios após lesão na medula espinhal (Bradbury *et al.* , 2002; Yick *et al.* , 2003; Caggiano *et al.* , 2005) .

Foi visto também que para o CS ser inibitório é necessário que se tenha um padrão de sulfatação, o C4S tem característica inibitória (Snow *et al.*, 1990) ao passo que o dermatam-2,6-disulfatado, e o condroitim-4,6-disulfatado promove o alongamento de axônios embrionários *in vitro* (Clement *et al.*, 1998 e 1999) . Além de ter sido visto que após uma lesão, o padrão de sulfatação dos PGCS mudam, onde no SNC normal a composição é na sua maioria C4S, após uma lesão foi observado um aumento nos níveis de C6S no SNC de ratos (Properzi *et al.*, 2005).

O PGHS tem envolvimento na orientação e crescimento de axônios (Holt e Dickson, 2005). Foi visto, que a adição de HS exógena ou remoção de HS pode perturbar o crescimento dos axônios na culturas de embriões de baratas, causando desorganização dos axônios e crescimento desordenado (Wang e Denburg, 1992). E além disso, no sistema óptico do *Xenopus*, o tratamento com HS exógena, ou digestão enzimática PGHS, faz com que os axônios da retina tenham desvio do seu alvo, o tecto óptico (Irie *et al.*, 2002).

Existem ainda evidências de que os PGHS também podem participar também, na proliferação de células precursoras neuronais durante cerebral precoce desenvolvimento. E estudos observam que os PGHS são mais expressos durante a época do pico de proliferação no cérebro em desenvolvimento e que estão localizadas em regiões ventriculares do cérebro onde as células precursoras proliferam (Ford-Perriss *et al.*, 2003).

De modo geral, foi observado que tanto o HS, quanto o CS tem participação no desenvolvimento do SNC. O HS apresenta característica de estimulador de crescimento de neuritos (Irie *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, Steigemann *et al.*, 2004; Rhuner *et al.*, 2005), e o C6S, é altamente expresso durante o desenvolvimento, já em adultos a maior expressão é de C4S, considerado como inibidor do crescimento de neuritos (Oohira *et al.*, 2000; Maeda 2010).

Outro GAG muito estudado atualmente é o DS, ele também está envolvido na regeneração de maneira positiva, modulando positivamente o crescimento de neuritos (Hong-Peng Li, 2013). Foi visto que o DS super sulfatado se liga a fatores de crescimento vinculados a heparina (Bao *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007) e este pode ser o motivo de sua modulação positiva.

Os glicosaminoglicanos também estão sendo estudados no contexto de doenças neurodegenerativas, como por exemplo, em casos de epilepsia onde se tem alterações nos PGCS que podem ter influencia no acontecimento das convulsões (Okamoto *et al.*, 2003) e na doença de Alzheimer foi vista a redução de RPNs (Kobayashi *et al.*, 1989 , Baig *et al.*, 2005), dessa forma, podemos perceber que mais estudos devem ser realizados nessa área para se entender de que maneira os GAGs podem influenciar na regeneração do SNC e por que nos vertebrados isto não acontece.

2.8. A neurotoxina 3-acetilpiridina

A neurotoxina de 3-acetilpiridina (3-AP) (Figura 8) é um antagonista competitivo da nicotinamida que induz degeneração seletiva de subconjuntos do complexo olivar inferior de neurônios após administração sistêmica em roedores, onde neurônios de alta atividade são mais severamente afetados. Também foi observada perda neuronal no hipocampo em formação, da porção compacta da substância negra e vários núcleos do tronco cerebral (Balaban 1985; Desclin e Colin 1980). O padrão de perda de células se assemelha à de uma doença neurodegenerativa humana, a atrofia olivopontocerebelar. No cérebro, 3-AP é rapidamente convertida em 3-AP-adeninedinucleotideo (3-APAD) e 3-AP - adeninadinucleotideo de fosfato (3-APADP) por nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADP)-Glicohidrolase, levando a uma depleção funcional de nicotinamida e NADP e ao comprometimento posterior de transferência de íons de hidrogênio em muitas reações enzimáticas dependentes de nicotinamida/NADP, interferindo também na produção de trifosfato de adenosina (ATP) (Herklen 1968).

Estudos *in vitro* revelaram que as vias mais afetadas envolvem etapas chaves do ciclo das pentoses fosfato e na redução de glutathiona oxidada pela glutathionaredutase. A glutathiona reduzida é um dos mais abundantes tióis intracelulares SNC e age como o principal antioxidante celular para decompor o peróxido de hidrogênio(H_2O_2) (Schulz *et al.* 1995; Sethy *et al.* 1996)

Quando há redução nos níveis de glutathiona reduzida, diminui a capacidade das células para compensar o estresse oxidativo e pode tornar neurônios mais vulneráveis à comprometimentos metabólicos. (Reed, 1990; Wullner *et al.*, 1995).

Sendo assim a neurotoxina pode ter sua toxicidade tanto pela interferência no ciclo das pentoses influenciando na produção de ATP, como pelo aumento de radicais livres levando ao dano direto em organelas.

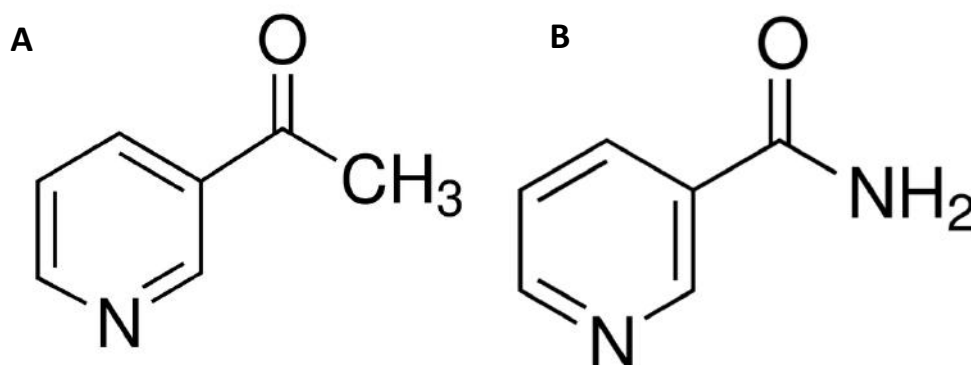


Figura 8: A) Fórmula estrutural da 3-acetilpiridina; B) Fórmula Estrutural da nicotinamida.

Retirado de: <http://www.sigmaaldrich.com/>

3. Justificativa

A ascídia *Phallusia nigra* não possui descrição dos componentes e organização do SNC e de quais os fatores influenciam na regeneração do seu SNC. É um excelente modelo para estudos comparativos devido a sua proximidade com os vertebrados na escala filogenética. Além disso, os estudos dos GAGs no envolvimento com a regeneração, podem servir de base para pesquisas na área de doenças neurodegenerativas. Desta maneira, temos como objetivo descrever o perfil dos GAGs do SNC da ascídia e estudar o envolvimento dos destes no SNC da ascídia *Phallusia nigra*, através da indução da sua neurodegeneração pela neurotoxina 3-AP.

4. Objetivo

4.1. Objetivos Gerais:

Caracterizar os GAGs do SNC e investigar o envolvimento dos GAGs no processo de degeneração e regeneração do SNC da ascídia *Phallusia nigra*.

4.2. Objetivos Específicos:

- Verificar o perfil dos GAGs no SNC da ascídia *Phallusia nigra*;
- Induzir a degeneração do SNC das ascídias utilizando-se a droga 3-AP;
- Investigar a alteração do perfil dos GAGs após a indução da degeneração no SNC da ascídia *Phallusia nigra*

5. Materiais e Métodos

5.1. Coleta e Manutenção dos animais

As coletas foram bimensais e realizadas no Porto do Forno, em Arraial do Cabo ou na Praia dos Anjos, Búzios, a fim de evitar a depredação da espécie nos locais (Figura 9 e 10). As ascídias foram mantidas em aquário com temperatura (21°C), pH (entre 8 e 8,5), salinidade (35) e com foto período controlados, objetivando mimetizar as condições ambientais.



Figura 9: Foto do Porto do forno, Arraial do Cabo. Retirado de:
<http://www.rayerland.com.br/gallery/Images/Harraial052.jpg>



Figura 10: Foto de Armação de Búzios, Retirado de: Google Maps <http://goo.gl/maps/jE0Vu>

5.2. Injeção sistêmica de 3AP – para indução da degeneração

As ascídias foram pesadas e depois anestesiada com cristais de mentol dissolvidos em água do mar (200mg/L). Após a anestesia, foi aplicado uma dose sistêmica de 65 mg/Kg de 3AP. O animal experimental foi isolada e mantida no aquário em condições ambientais controladas por 24h e então foi eutanasiada para posterior uso nos experimentos.

5.3. Preparo para microscopia de luz

O complexo neural da ascídia foi dissecado e fixado com paraformaldeído 4%, desidratado em concentrações crescentes de etanol (70-100%) e infiltrado em paraplast (Sigma). Os cortes de 5 μ m foram cortados no micrótono (Leica, modelo RM2245), depois foram corados com corantes de rotina hematoxilina e eosina e azul de dimetilmetileno (DMB) para observar a estrutura do complexo neural normal e degenerado (24h após a injeção da 3AP).

A hematoxilina é um corante acidófilo sendo atraída por componentes do tecido ácidos como o núcleo que cora em cor roxa, a eosina é um corante basófilo que cora os elementos básicos, como o citoplasma na cor rosa. O DMB é um corante básico,

que possui propriedade de metacromasia, ou seja, o corante mostra coloração azul na ausência de GAGs sulfatados quando na presença destes, torna-se róseo.

5.4. Imunofluorescência

O gânglio fixado e emblocado em paraplast foi cortado no micrótono (Leica, modelo RM2245) em cortes de 5 μm e foram usados também para imunofluorescência.

Depois de se obter o material nas lâminas, foi realizada a desparafinização com três vezes no xilol (2 minutos cada), e álcool em concentrações decrescentes (100% à 70%; 1 minuto cada).

Para a realização da imunohistoquímica, foi utilizado para exposição dos sítios protéicos, metanol por 15 minutos. Em seguida o Triton X-100 3% solubilizado tampão fosfato salino, (PBS) com pH 7,4-7,6 por 10 minutos, para que o acesso do anticorpo ao interior das células fosse facilitado. Para eliminar as possibilidades de uma marcação cruzada ou inespecífica, foi usado albumina de soro bovino (BSA). Entre cada uma dessas etapas, realizou-se lavagem com PBS. Somente depois desse procedimento o anticorpo primário, solubilizado com PBS, foi adicionado ao material. Os anticorpos utilizados (TABELA 1) para observar as estruturas do complexo neural (controle e após degeneração) foram o marcador da proteína anti- β -III-tubulina de neurofilamento (anti- β -III-tubulina – TUJ) e marcadores para GAG, anti-HS, que reage com epítipo de resíduo de glicosamina N-não substituído de HS, anti-DS(Sugahara, 2A12) produzido a partir do dermatam sulfato da ascídia *Phallusia nigra*, (Sugahara *et al.*, 2005). O TUJ (sigma) foi utilizado na concentração de 1:100, o anti-HS (seikagaku) na concentração de 1:100 e o anti-DS (Sugahara) 1:200, o tempo de incubação foi de 24h.

No dia seguinte, após 24h com o anticorpo primário, os cortes foram lavados com PBS e novamente expostos ao BSA, visando evitar ao máximo uma marcação inespecífica. O anticorpo secundário (TABELA 2) diluído em PBS com BSA, novamente visando a menor chance de marcação inespecífica, foi adicionado aos cortes permanecendo por 1 hora. Para marcar os núcleos celulares, foi usado 4',6-diamidino-2-phenylindol- DAPI, um marcador de DNA, que atravessa as membranas

sem danificar as células, permanecendo por 2 minutos nos cortes. Entre cada etapa descrita, lavagens com PBS foram feitas.

Por último montou-se as lâminas com meio de montagem fluoromout® (Sigma F4680), que conserva a fluorescência por mais tempo, e então depois de secas, levou-se ao microscópio óptico eletrônico Olympus (BX 51) acoplado a uma câmera digital (DPF1) para observação.

Tabela1 – Anticorpos primários utilizados nos experimento de imunofluorescência

Anticorpo Primário	Produzido em	Diluição	Empresa
Anti-Heparam Sulfato	Camundongo	1:100	Seikagaku
Anti-Dermatam Sulfato	Camundongo	1:200	Sugahara*
Anti-β-III-Tubulina	Camundongo	1:100	Sigma

*Pesquisador do Japão criador do anticorpo

Tabela 2 –Anticorpos secundários utilizados no experimento de imunofluorescência

Anticorpo Secundário	Produzido em	Utilizado em	Diluição	Empresa
Alexa Fluor 546 (A11030)	Cabra	Camundongo	1:500	Invitrogen

Tabela 3 - Enzima utilizada no experimento de eletroforese em gel de agarose

Enzima	Produzido em	Empresa
Condroitinase ABC (C3667)	Proteus vulgaris	Sigma

5.5. Extração de GAGs

Aproximadamente 12 gânglios das ascídias controle foram colocados em acetona para que fosse extraída toda a porção lipídica destes. Em seguida, secou-se a acetona em estufa (60°C). Depois, para extração proteolítica foi adicionado papaína 10% do peso seco do pó cetônico obtido na extração, e tampão digestão utilizando o volume de 10 vezes o peso do pó obtido. Em seguida as amostras foram levadas para banho-maria a 60°C, foram feitas três extrações cada uma com duração de 1 dia, no banho-maria, depois do banho-maria, as amostras eram centrifugadas e ao sobrenadante era adicionado etanol para precipitar os GAGs, depois o sobrenadante com etanol era descartado obtendo as frações de GAGs. A eletroforese teve um total de 3 dias e a fração obtida de cada dia foi chamada de: primeiro dia, fração 1; segundo dia, fração 2; e terceiro dia, fração 3.

5.6. Eletroforese em gel de agarose

As frações obtidas foram re-suspensas em água e as amostras foram aplicadas no gel de agarose e, em seguida, realizado a eletroforese (BioRad/ Power Pac™ Basic 041BR93482).

Para este experimento foram obtidas 2 placas, uma com corrida com padrão de HS, padrão de CS, fração 1 (F1), fração 2 (F2) e fração 3 (F3) e outra com padrão contendo HS, DS e CS (Pd), fração sem tratamento (Am), fração com tratamento de condroitinase ABC (ABC) e fração com tratamento de ácido nitroso (HNO₂).

A enzima Condroitinase ABC catalisa a degradação eliminativa de polissacarídeos contendo as ligações 1,4-β-D-hexosaminil e 1,3-β-D-glucuronosil ou ligações 1,3-α-L-iduronosil de dissacarídeos que contenham o grupo 4-deoxi-β-D-gluc-4-enuronosil. Sendo assim, atua sobre o C4S, C6S e DS como demonstrado na figura 11 abaixo, além de ainda agir lentamente sobre o AH.

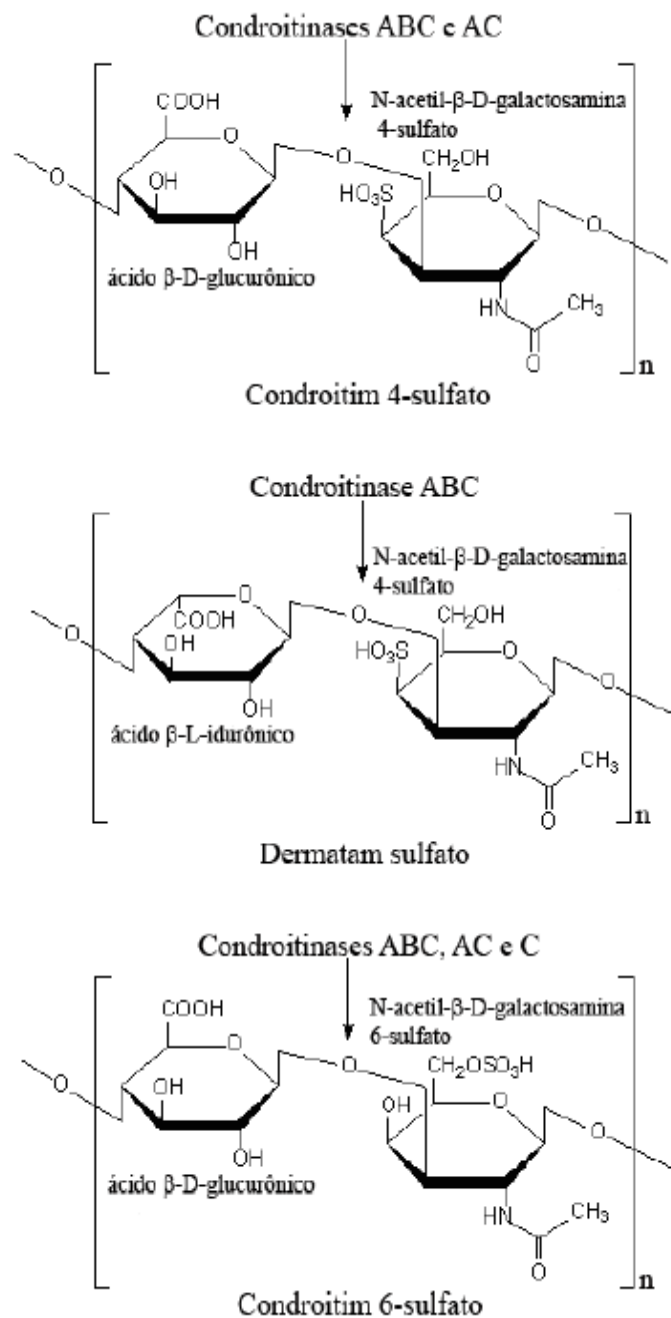


Figura 11: Ação da condroitinase ABC. Figura modificada da página da <http://www.sigmaaldrich.com/>

Ácido nítrico foi preparado na proporção de 1:1 de Ácido Sulfúrico 0,5M e Nitrito de Sódio 1M, e para a reação a solução foi utilizado na concentração de 1:1 de ácido nítrico e solução amostra.

O ácido nítrico faz uma clivagem deaminativa que causa a despolimerização das cadeias de heparina e HS. Ácido nítrico pode ser utilizado em pH de 1,5 ou em pH mais elevado de 4. Em ambas as condições o efeito do ácido nítrico é a

clivagem desaminativa. Dessa maneira a clivagem ocorre entre uma galactosamina N sulfatada e uma galactosamina N acetilada; e/ou entre uma galactosamina N-sulfatada e um ácido idurônico. Como esta é uma reação deaminativa, a clivagem independe da presença das sulfatações fazendo com que esta seja específica para heparina e HS, não agindo sobre CS e DS.

5.7. Quantificação da fluorescência

Para confirmação dos dados obtidos através das imunofluorescências, foram realizadas análises no programa ImageJ 1.47t da quantificação da fluorescência por área da imagem, foram utilizadas 3 imagens de 3 animais para cada resultado obtido, do gânglio controle e gânglio 24h após a degeneração.

5.8. Análise Estatística

Os resultados obtidos na quantificação de fluorescência são apresentados como médias \pm SE para cada tipo de anticorpo analisado. A significância de variações entre diferentes tratamentos ou grupos foi analisada por Teste tstudent não pareado. A significância foi estabelecida em $P < 0,05$ através dos programas GraphPadPrism versão 5.0 de Software GraphPad.

6. Resultados

6.1. Caracterização do Sistema Nervoso Central da ascídia *Phallusianigra*

No gânglio controle corado com hematoxilina e eosina (Figura 12A) pode-se observar na periferia (córtex) corpos celulares enquanto na parte interna (medula) observa-se a presença de outros tipos celulares, na *Ciona intestinalis* descreveu-se a presença de células gliais (Nicol e Meinertzhagen 1991; Imai e Meinertzhagen 2007). Na medula também é onde possivelmente ficam localizados os prolongamentos dos neurônios, porém nas ascídias os prolongamentos não são mielinizados (Gould *et al.*, 2005).

No gânglio corado com DMB (Figura 12B) pode-se observar que o córtex do gânglio apresenta coloração rósea, ou seja, o corante sofreu metacromasia, sugerindo a presença de GAGs, possivelmente na região da rede perineuronal,

como descrito anteriormente, esta é localizada ao redor dos neurônios (Celio e Blumcke 1994; Celio *et al.*, 1998; . Yamaguchi 2000; Murakami e Ohtsuka 2003b).

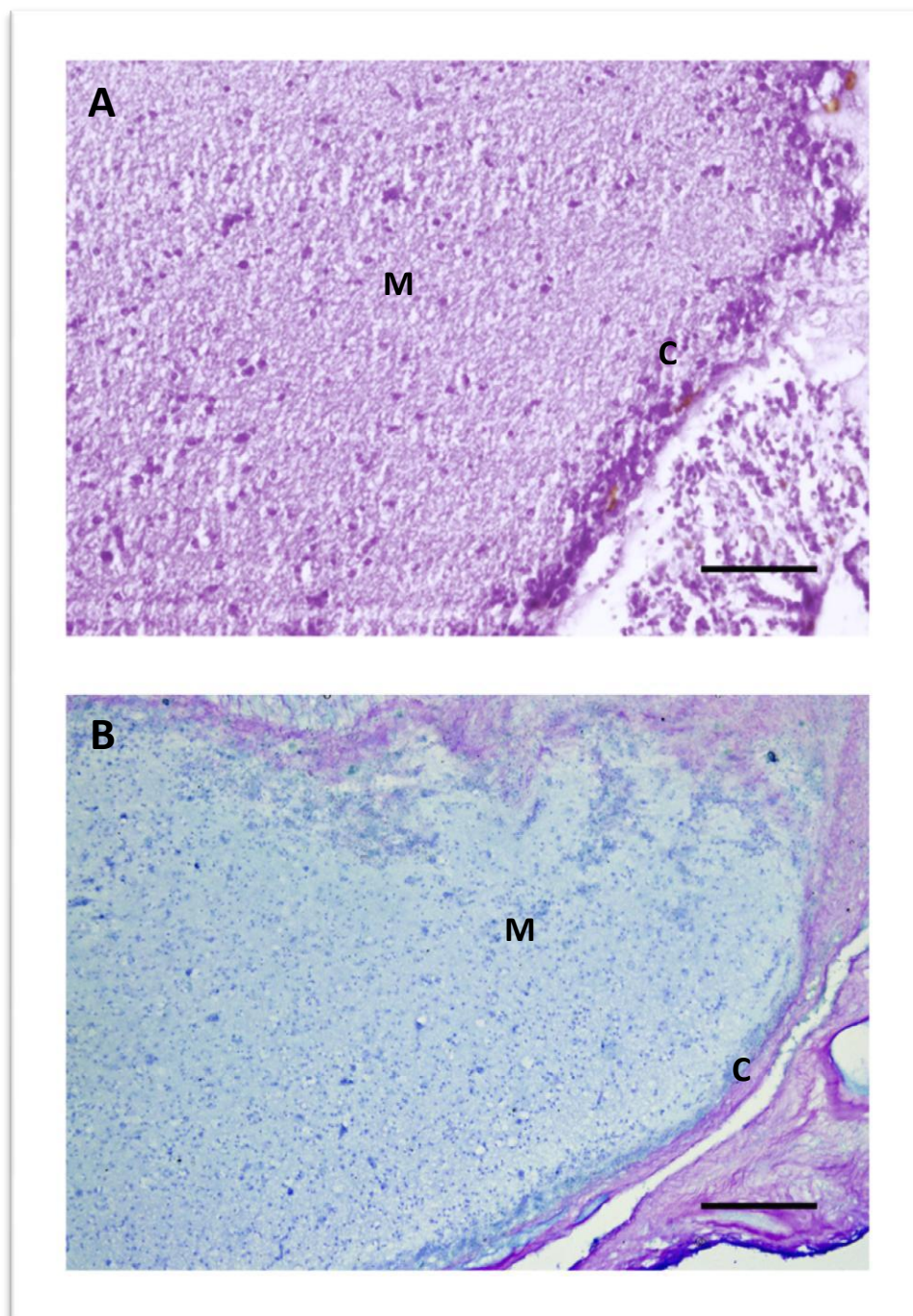


Figura 12: Gânglio da ascídia *Phallusia nigra* controle corado com corante de rotina HE e DMBA) Gânglio controle corado com hematoxilina e eosina (escala 50 μ m) B) Gânglio controle corado com DMB (escala 50 μ m); Onde C é o córtex e M a medula.

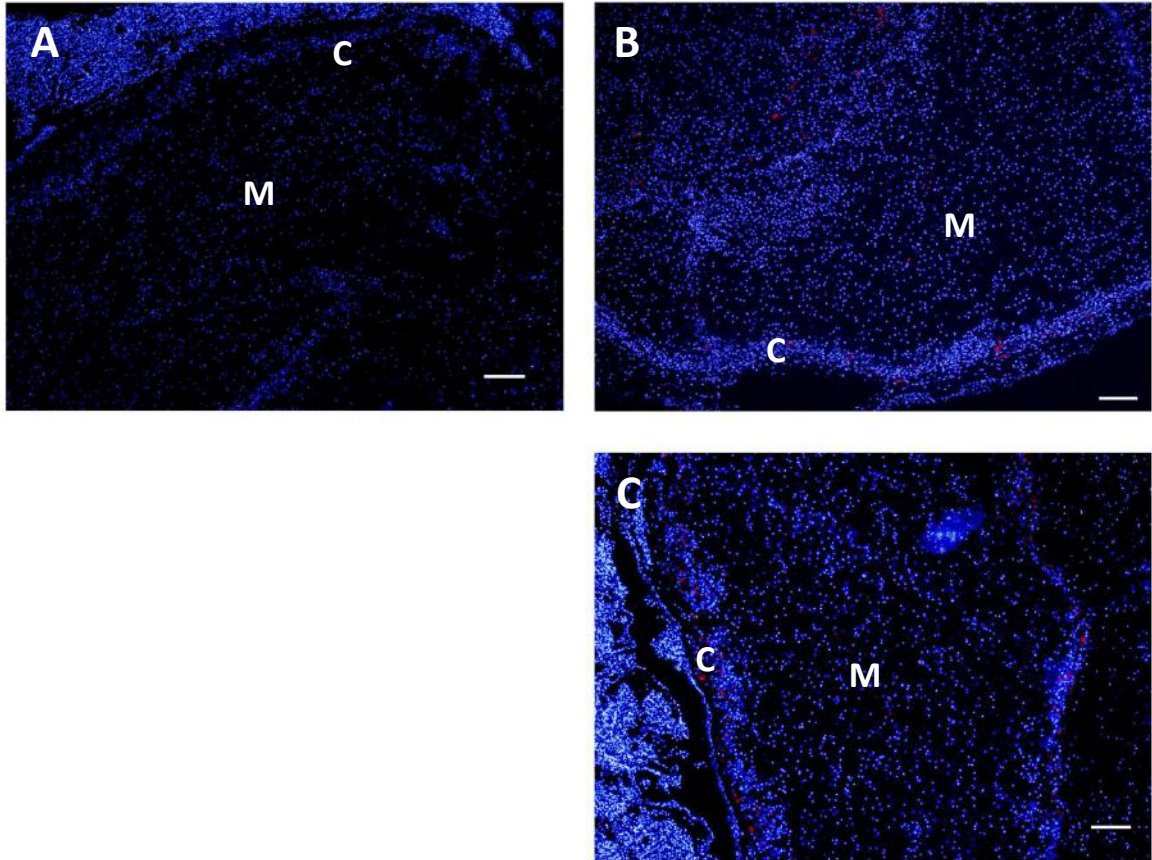


Figura 13: Imunofluorescência do gânglio controle com anti-heparam sulfato e anti-dermatam sulfato A) Imunofluorescência do gânglio sem anti-corpo primário B) Imunofluorescência do gânglio controle com anti corpo anti-heparam sulfato; C) Imunofluorescencia do gânglio controle com anti-dermatam sulfato (escala 50µm). Onde C é o córtex e M a medula.

Tanto a marcação de HS quanto a DS demonstram que estes GAGs estão presentes no glânglio da ascídia (Figura 13), mesmo que em baixa concentração, e na sua maioria estes se encontram na região periférica do gânglio provavelmente na região da rede perineuronal. A presença de heparinóides já foi descrita nos tecidos da ascídia *Styela plicata* (Gandra *et al.*, 2005), assim como a presença de DS foi descrita nas vísceras da ascídia *Phallusia nigra* (Pavão e Mourão, 2005).

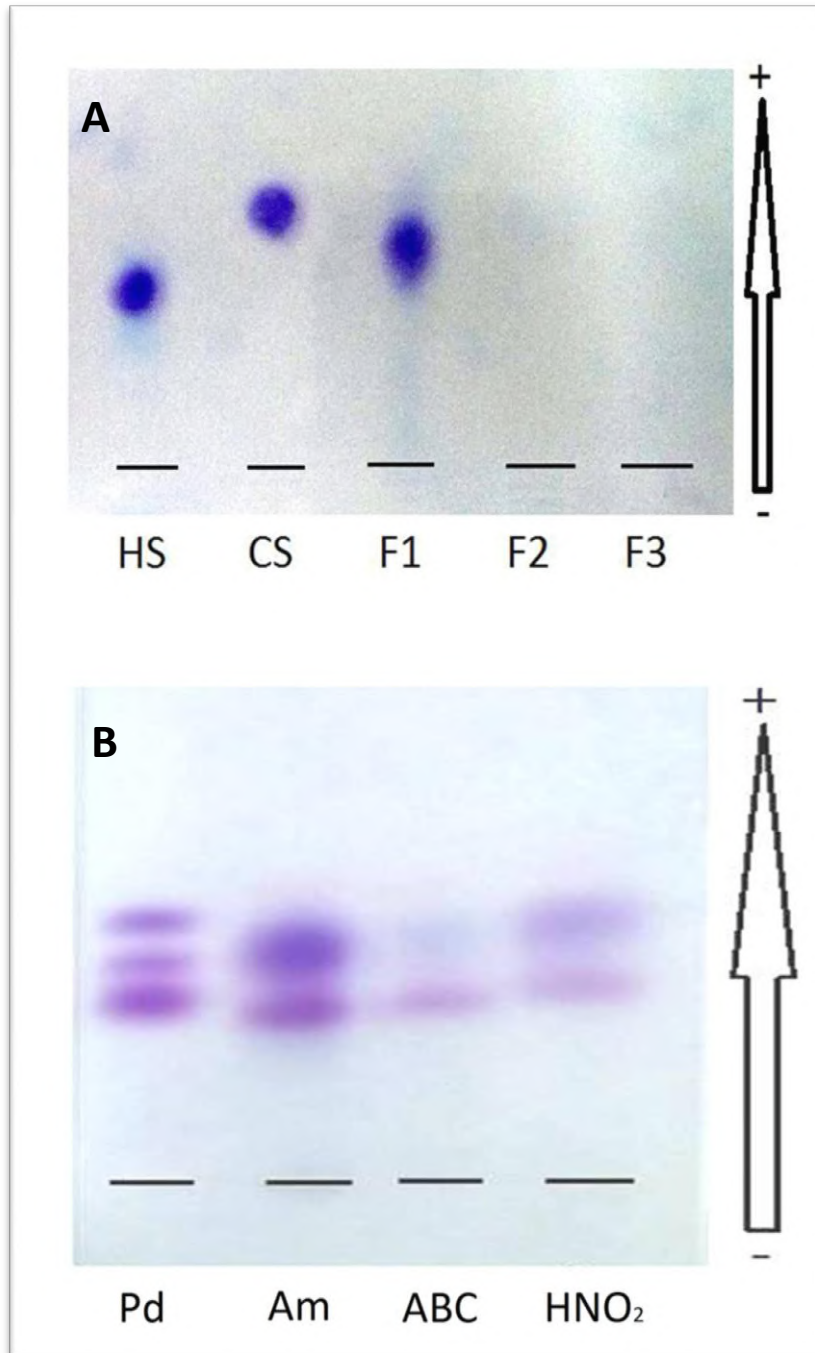


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose: A) Extração de GAGs do gânglio controle da ascídia onde HS e CS são os padrões e F1, F2 e F3 as frações extraídas; B) Extração de GAGs do gânglio controle onde Pd é o padrão contendo HS, DS e CS, Am é amostra sem tratamento, ABC amostra com tratamento da enzima condroitinase ABC e Ác.N amostra com tratamento de ácido nitroso.

A eletroforese da Figura 14A confirmou a presença de GAGs no gânglio da ascídia *Phallusia nigra* apresentando migração entre as bandas de HS e CS dos padrões e apenas apresentando GAG na primeira fração extraída.

Já o gel da figura 14B confirma a presença de DS quando se compara a migração da amostra pura com a amostra tratada com condroitinase ABC, com a degradação da banda que migra entre HS e CS, além disso, na amostra tratada com Ácido Nitroso, sugerimos a presença de heparinóide, já que não houve total degradação da banda na presença do ácido, e para melhor análise serão feito tratamento da amostra com a enzima condroitinase AC que não cliva a DS..

Comparando os resultados da eletrofoerese em gel de agarose do gânglio da ascídia *Phallusia nigra*, com os resultados das imunofluorescências, e com o descrito na literatura, podemos sugerir que assim como nas vísceras da ascídia (Pavão e Mourão, 2005), o DS também é presente no gânglio, e que este provavelmente se encontra na região da rede perineuronal, mesmo que em baixa concentração.

Através da eletrofoerese em gel de agarose (Figura 15B) não se pôde afirmar que realmente havia HS no gânglio. Talvez, a concentração deste seja muito pequena de forma que não seja possível de observar neste tipo de teste.

6.2. Gânglio 24h após a indução da degeneração e GAGs

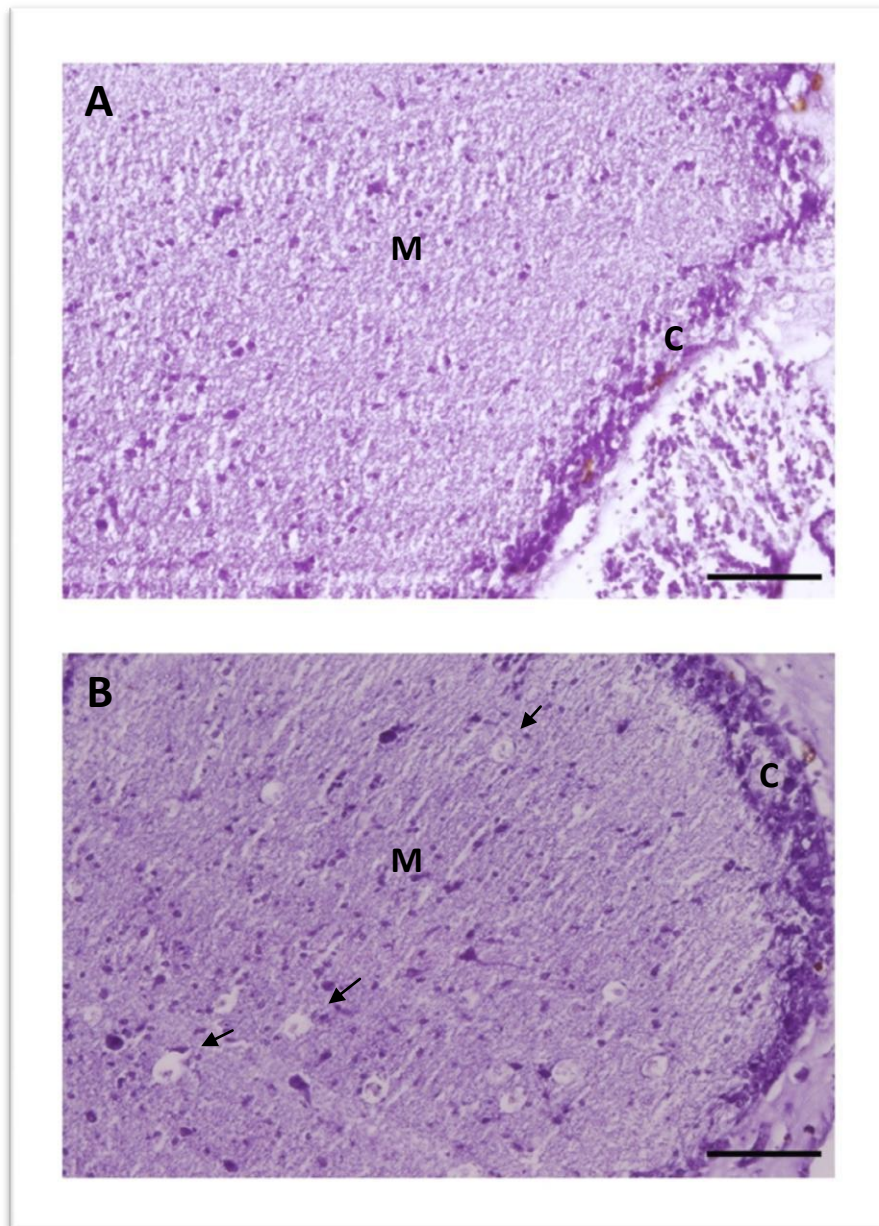


Figura 15: Comparação entre os gânglios controle e 24h após indução da degeneração com hematoxilina e eosina; A) Gânglio controle corado com hematoxilina e eosina (escala 50 μ m); B) Gânglio após 24h da indução da degeneração (escala 50 μ m); Setas: Vacuolizações. Onde C é o córtex e M a medula.

Conforme é possível observar na Figura 15, após 24h da indução da degeneração o gânglio se encontra com vacuolizações e desorganização celular. Isto indica que provavelmente, a neurotoxina 3-AP induziu degeneração no gânglio

da ascídia, da mesma forma que degenera em vertebrados como o lagarto e camundongos (Lopez-Garcia *et al.*,2002; Araújo, 2011).

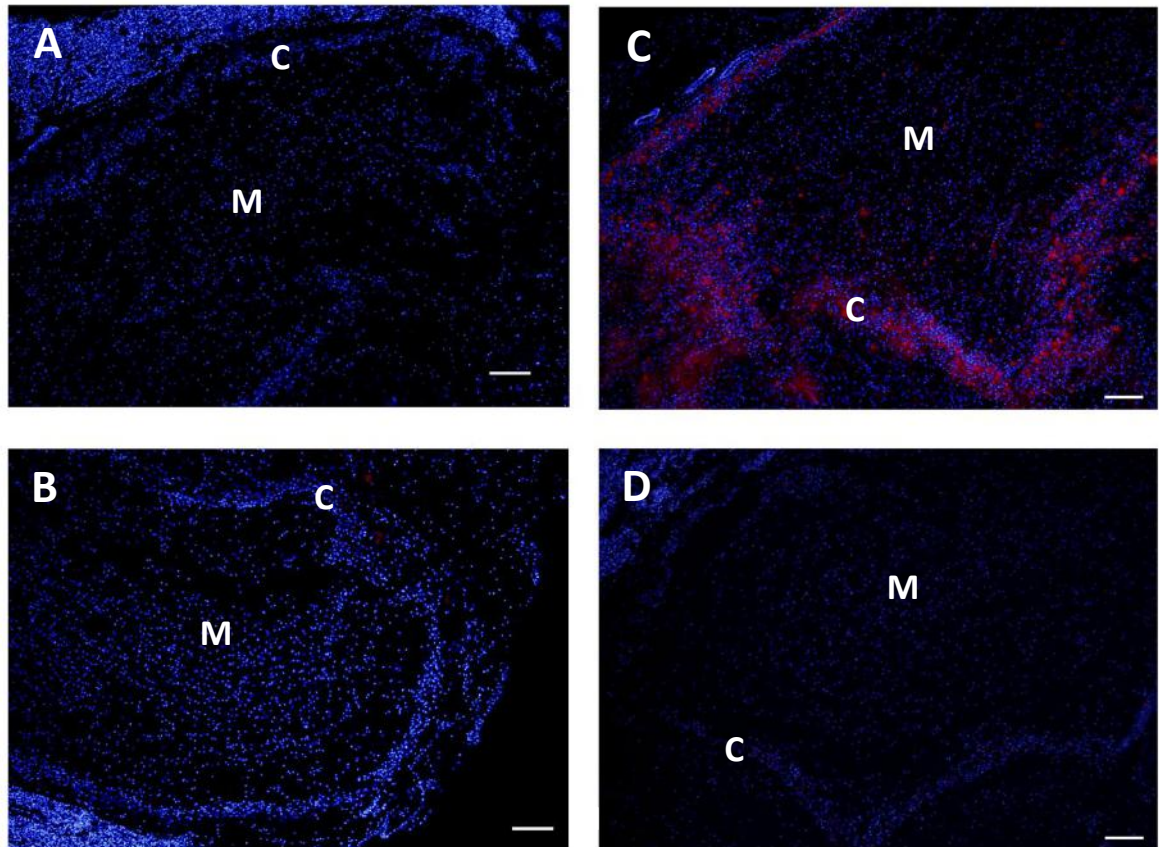


Figura 16: Comparação através de imunofluorescência com o anticorpo anti- β III-tubulina. A) Imunofluorescência do gânglio controle sem anti corpo primário; B) Imunofluorescência do gânglio 24h sem anti corpo primário; C) Imunofluorescência do gânglio controle com anticorpo anti- β III-tubulina; D) Imunofluorescência do gânglio 24h após a indução da degeneração com anticorpo anti- β III-tubulina (escala 50 μ m); Onde C é o córtex e M a medula.

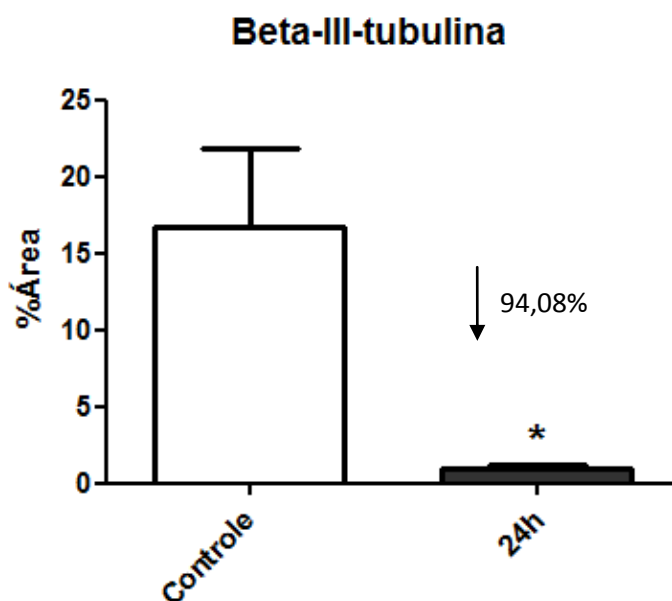


Figura 17: Gráfico de fluorescência por área (%Área) para beta-III-tubulina, comparando gânglio 24 horas após a degeneração com gânglio controle (Teste T, $p < 0,05$). A diminuição foi de 94,08% em relação ao controle. Controle é o gânglio controle e 24h é o gânglio após 24h da indução da degeneração.

A imunofluorescência realizada com anticorpo anti- β III-tubulina (Figura 16) mostram que após 24h da indução da degeneração os neurofilamentos dos neurônios não estão mais sendo marcados provavelmente devido a alterações na morfologia da célula sendo um indício de morte celular.

O gráfico da figura 16 comprova que está havendo diminuição da fluorescência por área do gânglio quando se compara a %Área do gânglio 24h após a degeneração com o gânglio controle, a diferença entre as colunas controle e 24h foi de 15,74% \pm 5,113% sendo significativa ($p < 0,05$), e a diminuição em percentual foi de 98,08%.

A coloração de HE, juntamente com a imunofluorescência do gânglio 24h após a indução da degeneração sugere que a neurotoxina está agindo nos neurônios no SNC da ascídia *Phallusia nigra*.

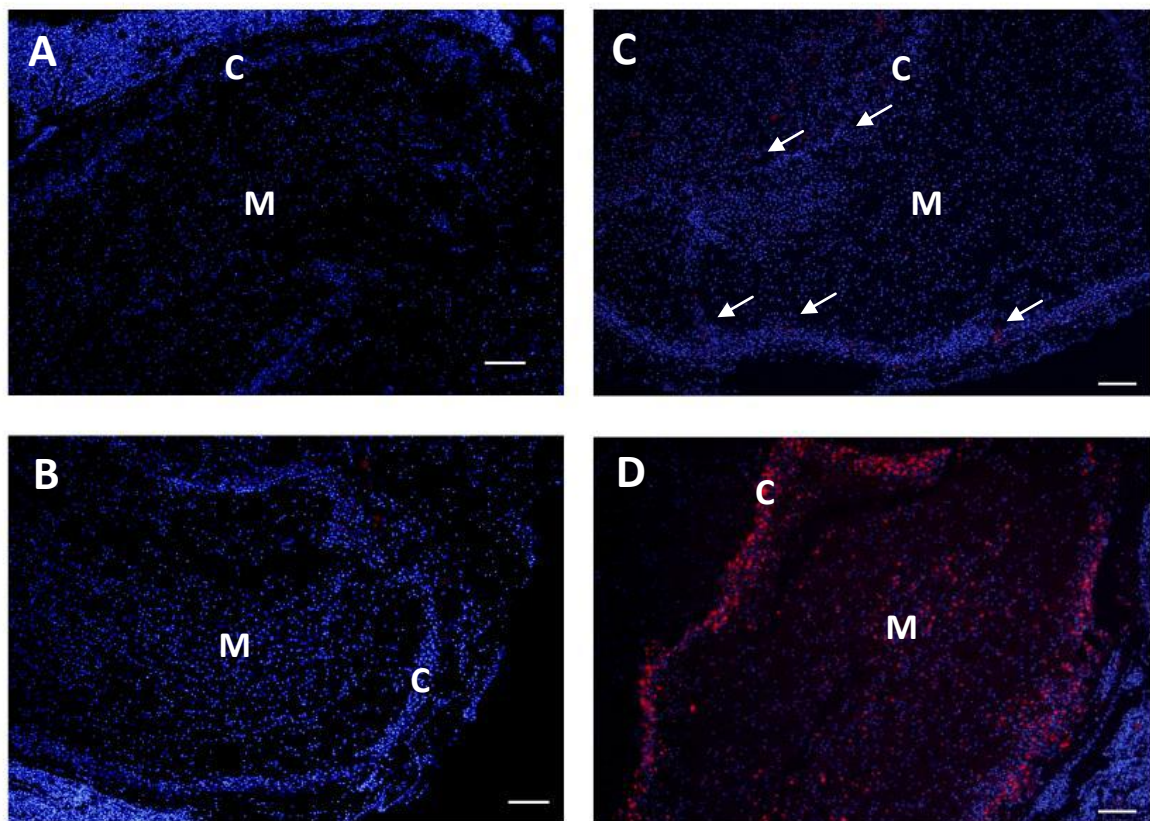


Figura 18: Comparação através de imunofluorescência com o anticorpo anti-heparam. A) Imunofluorescência do gânglio controle sem anti corpo primário; B) Imunofluorescência do gânglio 24h sem anti corpo primário; C) Imunofluorescência do gânglio controle com anticorpo anti-heparam sulfato; setas indicam alguns pontos com marcação; D) Imunofluorescência do gânglio 24h após a indução da degeneração com anticorpo anti-heparam sulfato (escala 50 μ m); Onde C é o córtex e M a medula.

A imunofluorescência com o anticorpo anti-heparam sulfato (Figura 18) indica que 24h após a indução da degeneração o heparam sulfato se encontra mais expresso no gânglio da ascídia *Phallusia nigra*, principalmente na região do córtex.

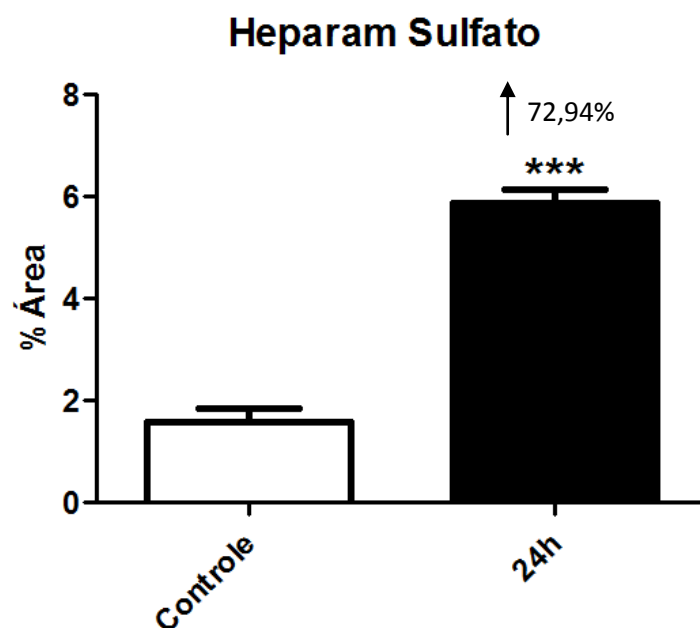


Figura 19: Gráfico de intensidade de fluorescência por área (%Área) para o heparam sulfato, comparando gânglio 24 horas após a degeneração com gânglio controle (Teste T, $p < 0,05$). O aumento foi de 72,94% em relação ao controle. Controle é o gânglio controle e 24h é o gânglio após 24h da indução da degeneração.

Conforme a figura 19, o gráfico comprova que está havendo aumento da intensidade da fluorescência por área do gânglio quando se compara a %Área do gânglio 24h após a degeneração com o gânglio controle, a diferença entre as colunas controle e 24h foi de $4,294\% \pm 0,3749\%$ sendo foi significativa ($p < 0,05$), e o aumento em percentual foi de 72,94%.

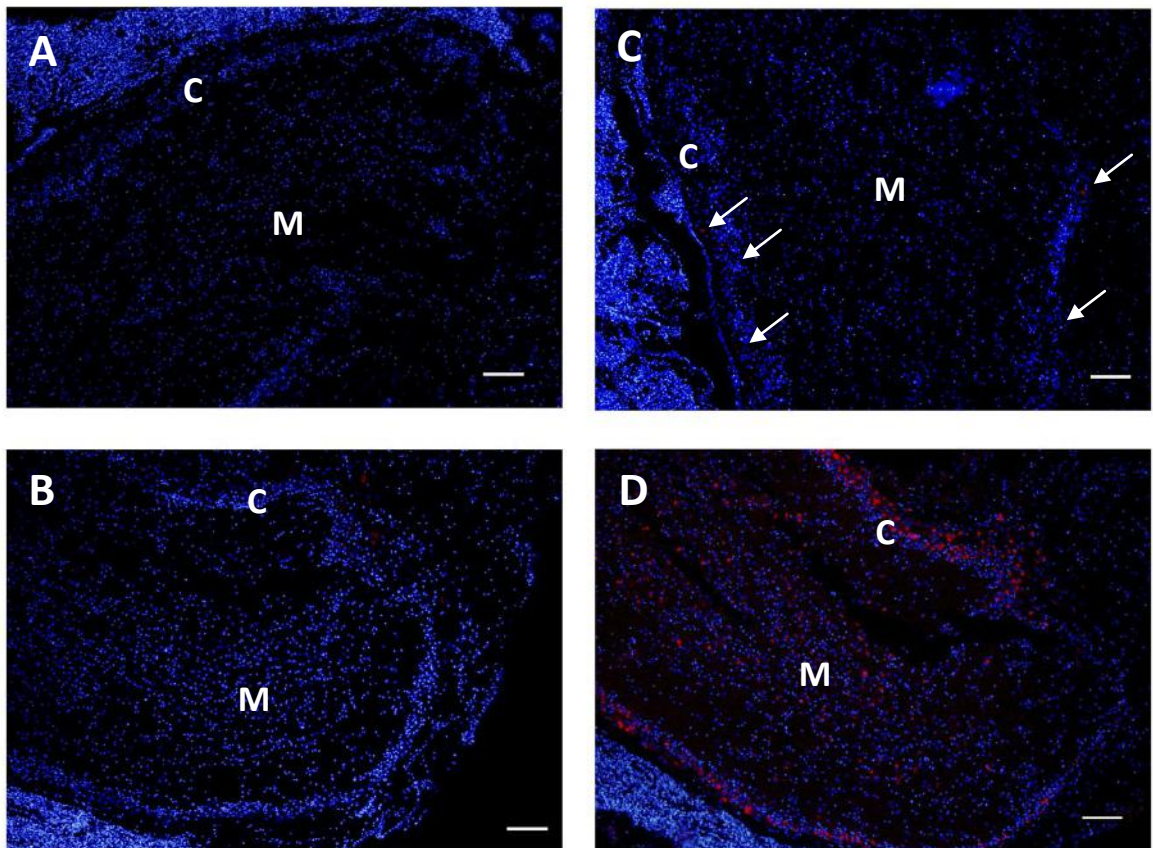


Figura 20: Comparação através de imunofluorescência com o anticorpo anti-dermatam; A) Imunofluorescência do gânglio controle sem anti-corpo primário; B) Imunofluorescência do gânglio 24h sem anti-corpo primário; C) Imunofluorescência do gânglio controle com anticorpo anti-dermatam sulfato, setas indicam alguns pontos com marcação; D) Imunofluorescência do gânglio 24h após a indução da degeneração com anticorpo anti-dermatam sulfato (escala 50 μ m); Onde C é o córtex e M a medula.

Na imunofluorescência com o anticorpo anti-HS (Figura 20), verificou-se que assim como no gânglio controle, a marcação foi mais presente na região do córtex, o que pode indicar a presença do HS na RPN, ou quando degenerado, como um fator possivelmente envolvido na regeneração.

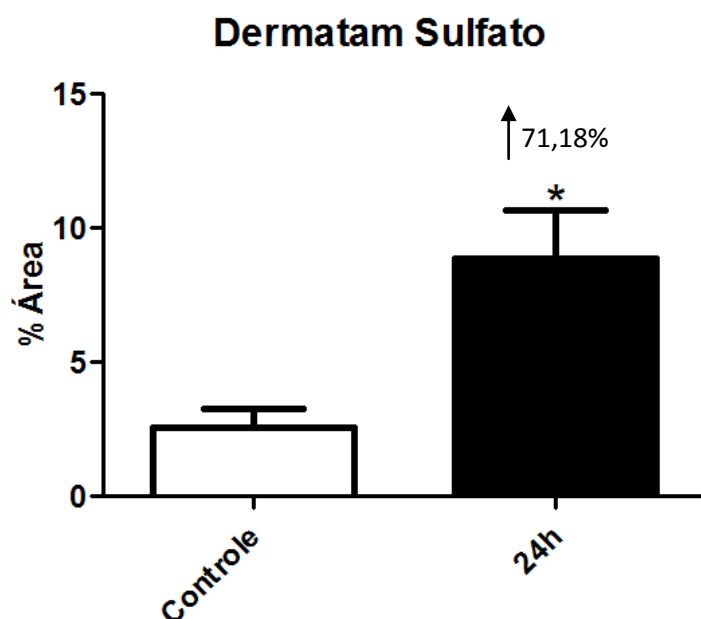


Figura 21: Gráfico de fluorescência por área (%Área) para dermatam sulfato, comparando gânglio 24 horas após a degeneração com gânglio controle (Teste T, $p < 0,05$); O aumento foi de 71,18% em relação ao controle. Controle é o gânglio controle e 24h é o gânglio após 24h da indução da degeneração.

No gráfico que mostra expressão de DS (figura 21), a diferença %Área também foi significativa $6,316\% \pm 1,913\%$ ($p < 0,05$), a diferença percentual foi de 71,18%.

Através das imunofluorescências feitas com anti-HS (Figura 18) e anti-DS (Figura 20), e da quantificação do aumento da intensidade de fluorescência por área do gânglio, foi verificado que após 24h da indução da degeneração houve aumento tanto do HS como DS.

O DS, como dito anteriormente, já havia sido verificado nas vísceras da ascídia *Phallusia nigra*, porém nunca havia sido observado no gânglio do animal, assim como o HS também não havia sido quantificado e nem descrito no gânglio da ascídia.

Já se sabe que o HS e o DS atuam modulando positivamente o crescimento de neuritos (Hong-Peng Li, 2013; Irie *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, Steigemann *et al.*, 2004; Rhuner *et al.*, 2005), dessa forma, os resultados obtidos, sugerem que o aumento da presença destes GAGs no SNC da ascídia 24h após a degeneração,

provavelmente estão relacionados com o envolvimento destes para restabelecer o funcionamento normal do gânglio.

7. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que no gânglio da ascídia *Phallusia nigra* controle provavelmente, tem-se naturalmente a presença GAGs, estando estes aparentemente na RPN. Neste estudo também foi possível observar, que nos animais controle o HS e do DS estão aparentemente no gânglio da ascídia *Phallusia nigra*, e que com a degeneração do SNC do animal a expressão destes foi aumentada indicando o possível envolvimento destes na regeneração do sistema.

Somente estes estudos não são o suficiente para descrever como os GAGs participam da regeneração do SNC da ascídia *Phallusia nigra*. Dessa forma são necessários mais estudos com este animal para elucidar a participação dos GAGs na degeneração e regeneração do SNC da ascídia.

8. Perspectivas

- Realizar os experimentos com os animais após 10 dias da indução da degeneração;
- Imunoeletromicroscopia dos GAGs;
- Caracterização dos GAGs por SAX acoplado a HLPC;
- Cultura de neurônios da ascídias;
- Adicionar HS, CS e DS e avaliar o crescimento dos neuritos.

9. Referências Bibliográficas

- Abdul, Jaffar Ali H.; Sivakumar, V. (2007) Occurrence and distribution of ascidians in Vizhinjam Bay (south west coast of India)., *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342: 189-190
- Barnes, Robert D. (1983) *Invertebrate zoology.*, Saunders, Philadelphia. Pp.
- Bernfield M, Gotte M, Park PM, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J , ZakoM. Function of cell surface heparin sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.*1999; 68: 729-77.
- Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL , Lose EJ. *Biology of the syndecan.* *Annu Rev Biochem.*1992; 8: 365-93.
- Bingham, Brian L. (1992) Life histories in an epifaunal community: Coupling of adult and larval processes., *Ecology* 73: 2244-2259
- Bonnet, Nadia Y. K.; Rocha, Rosana M. (2011) The family Ascidiidae (Herdman) (Tunicata: Ascidiacea) in Bocas del Toro, Panama. Description of six new species., *Zootaxa* 2864: 1-33
- Bradbury, E.J., Moon, L., D.F., Popat, R.J., et al.(2002). Chondroitinase ABC promotes axon regeneration and functional recovery following spinal cord injury. *Nature* 416, 636–640.
- Brusca, R. C., Brusca, G. J. *Other Deuterostomes: Chaetognatha, Hemichordata, Chordata* pp. 855-864, *Em: Invertebrates* (2003) 2^a ed, 902 pp.
- Caggiano, A.O., Zimber, M.P., Ganguly, A., Blight, A.R., And Gruskin, E.A. (2005). Chondroitinase ABC I improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal cord. *J. Neurotrauma* 22, 226–239.
- Carlton, James T.; Eldredge, Lucius (2009) Marine bioinvasions of Hawaii: The introduced and cryptogenic marine and estuarine animals and plants of the Hawaiian archipelago., *Bishop Museum Bulletin in Cultural and Environmental Studies* 4: 1-202
- Clement, A.M., Nadanaka, S., Masayama, K., Mandl, C., Sugahara, K., Faissner, A., 1998. The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with

chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 273,28444–28453.

Clement, A.M., Sugahara, K., Faissner, A., 1999. Chondroitin sulfate E promotes neurite outgrowth of rat embryonic day 18 hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 269, 125–128.

Coles S. L., DeFelice R. C., Eldredge, L. G. (2002b) Nonindigenous marine species at Waikîkî and Hawai`i kai, Oahu, Hawai`i, Bishop Museum Technical Report 25: 1-255

Coles, S. L.; DeFelice, R. C. ;Eldredge, L. G. (2002a) Nonindigenous marine species in Kaneohe Bay, Oahu, Hawai`i, Bishop Museum Technical Report 24: 1-364

da Rocha, Rosa Morales and 13 authors (2010) Inventory of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the National Park La Restinga, Isla Margarita, Venezuela, *Biota Neotropica* 10: published online

da Rocha, Rosana M.; Faria, Suzana B.; Moreno, Tatiane R. (2005) Ascidians from Bocas del Toro, Panama, *Caribbean Journal of Science* 41: 600-612 da Rocha, Rosana Moreira; Lotufo, Tito Monteiro da Cruz; Rodrigues, Sérgio de Almeida (1999) The biology of *Phallusia nigra* Savigny, 1816 (Tunicata: Ascidiacea) in southern Brazil: Spatial distribution and reproductive cycle, *Bulletin of Marine Science* 64: 77-87

Dahlberg, Carl et al. Refining the *Ciona intestinalis* model of central nervous system regeneration. *PloS one*, v. 4, n. 2, p. e4458, 2009.

Dias, G. M.; Rocha, R. M.; Lotufo, T. M. C.; Kremer, L. P. (2013) Fifty years of ascidian biodiversity research in Sao Sebastiao, Brazil, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93: 273-282

Dietrich, C. P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...*[et al.], v. 17, n. 1, p. 5-15, 1983.

Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Paiva, J.F.; Santos, E.A.; Holme, K.R.; Perlin, A.S. - Heparin in mollusks: chemical, enzymatic degradation and ¹³C and ¹H

n.m.r.spectroscopical evidence for the maintenance of the structure through evolution. *IntJ. Biol. Macromol.* 11, 361,1989.

Eldredge, L. G.; Smith, C. M. (2001) Introduced marine species of Hawaii, Bishop Museum Technical Report 21: 1-60

Esko, Jeffrey D. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Current opinion in cell biology*, v. 3, n. 5, p. 805-816, 1991

Galtrey, Clare M.; Fawcett, James W. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. **Brain research reviews**, v. 54, n. 1, p. 1-18, 2007.

Goodbody, Ivan (1962) The biology of *Ascidia nigra* (Savigny). I. Survival and mortality in an adult population, *Biological Bulletin* 122: 40-51

Goodbody, Ivan (1963) The biology of *Ascidia nigra* (Savigny). II. The development and survival of young ascidians, *Biological Bulletin* 124: 31-44

Goodbody, Ivan (1965) The biology of *Ascidia nigra* (Savigny). III. The annual pattern of colonization, *Biological Bulletin* 129: 128-133

Goodbody, Ivan (2004) Diversity and distribution of ascidians (Tunicata) at Twin Cays, Belize, *Atoll Research Bulletin* 524: 1-22

Gould RM, Morrison HG, Gilland E, Campbell RK (2005) Myelin tetraspanfamily proteins but no non-tetraspan family proteins are present in the ascidian(*Ciona intestinalis*) genome. *Biol Bull* 209: 49–66.

Imai, K. S., Stolfi, A., Levine, M.&Satou, Y. Gene regulatory networks underlying the compartmentalization of the *Ciona* central nervous system. *Development* 136,285–293 (2009).

IRIE, Atsushi et al. Specific heparan sulfate structures involved in retinal axon targeting. **Development**, v. 129, n. 1, p. 61-70, 2002.

Izquierdo-Muñoz, Andrés; Díaz-Valdés, Marta; Ramos-Esplá, Alfonso A. (2009) Recent non-indigenous ascidians in the Mediterranean Sea., *Memoirs of the Museum of Victoria* 4: 59-64

Kondilatos, Gerasimos; Corsini-Foka, Maria; Pancucci-Papadopoulou, Maria-Antonietta (2010) Occurrence of the first non-indigenous ascidian *Phallusianigra Savigny, 1816* (Tunicata: Ascidiacea) in Greek waters, *Aquatic Invasions* 5: published online

Koyama, H., Kusunoki, T. Organization of the cerebral ganglion of the colonial ascidian *Polyandrocarpamisakiensis*. *J. Comp. Neurol.* (1993) 338:549-559

Kwok, Jessica CF et al. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. **Developmental Neurobiology**, v. 71, n. 11, p. 1073-1089, 2011. JOHNSON, Karl G. et al. Axonal heparan sulfate proteoglycans regulate the distribution and efficiency of the repellent slit during midline axon guidance. **Current biology**, v. 14, n. 6, p. 499-504, 2004.

Lambert, Gretchen (2002) Nonindigenous ascidians in tropical waters., *Pacific Science* 56: 191-298

Lambert, Gretchen (2003) Marine biodiversity of Guam: the Ascidiacea., *Micronesica* 35-36: 584-593

Lemaire, P.; Smith, W. C.; Nishida, H. Ascidians and the plasticity of the chordate developmental program. *Current Biology* (2008) 620-631

Lenhoff, H. M., Lenhoff, S. G. Em: A History of regeneration research: milestones in the evolution of a science – Abraham Trembley and the origins of research on regeneration in animals (1991) 47-66

Lenhoff, H. M., Lenhoff, S. G. Trembley's polyps. *Sci. Am.* (1988) 256: 108-113.

Lindeman, Kenyon C.; McCarthy, Daniel A.; Holloway-Adkins, Karen; Snyder, David B. (2009) Ecological function of nearshore hardbottom habitats in East Florida: A literature synthesis, CSA International, Inc., Stuart FL. Pp.

Locke, Andrea (2009) A screening procedure for potential tunicate invaders of Atlantic Canada., *Aquatic Invasions* 4: 71-79

Lopez-Garcia, C., Molowny, A., Nacher, J., Ponsoda, X., Sancho-bielsa, F., Alonso-llosa, G. The lizard cerebral cortex as a model to study neuronal regeneration. *Ann. Brazil. Acad. Sci.* (2002) 74: 85-104.

Mackie GO (1995) On the 'visceral nervous system' of *Ciona*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 75: 141–151.

Marins, Flavia O.; Novaes, Roberto L. M.; Rocha, Rosana M.; Junquiera, Andrea O. R. (2010) Non indigenous ascidians in port and natural environments in a tropical Brazilian bay, *Zoologia* 27: 213-222

Mathews, Martin B. Connective tissue. *Macromolecular structure and evolution. Molecular biology, biochemistry, and biophysics*, n. 19, p. 1, 1975.

McKeon, R.J., Hoke, A., Silver, J., 1995. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp. Neurol.* 136, 32–43.

Medeiros, Guilherme F., et al. "Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1475.3 (2000): 287-294.

Meinertzhagen, I.A., Okamura, Y. The larval ascidian nervous system: the chordate brain from its small beginnings *Trends in Neurosciences* (2001) 24 (7): 401-410.

Millar R (1953) *Ciona* Liverpool. England: University Liverpool Press.

Monniot, C.; Monniot, F. (1985) [Littoral ascidians of Guadeloupe Island: IX. Characteristics of populations, ecology, relationships with the world fauna] (French), *Tethys* 11: 203-213

Monniot, C.; Monniot, F. (1997) Records of ascidians from Bahrain, Arabian Gulf with three new species., *Journal of Natural History* 31: 1623-1643

Moon, L.D., Asher, R.A., Rhodes, K.E., Fawcett, J.W., 2001. Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat. Neurosci.* 4, 465–466.

Moon, L.D.F., Asher, R.A., Rhodes, K.E., Fawcett, J.W., 2002. Relationship between sprouting axons, proteoglycans and glial cells following unilateral nigrostriatal axotomy in the adult rat. *Neuroscience* 109, 101–117.

Nader, Helena B. et al. Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. *Journal of cellular physiology*, v. 140, n. 2, p. 305-310, 1989.

Oliveira Filho, R. R.; Lotufo, T. M. C.; (2010) New records of introduced ascidians at Ceara State harbors, Northern Brazil. *International Invasive Sea Squirt Conference-III - Woods Hole April 26-28, 2010*

<http://www.whoi.edu/page.do?pid=33341&tid=282&cid=72284>

Petersen, J.K., Schou, O., Thor, P. In situ growth of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.) and the blue mussel *Mytilus edulis* in an eelgrass meadow. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (1997) 218: 1–11.

Properzi, F., Asher, R.A., Fawcett, J.W., 2003. Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 335–336.

Properzi, F., Carulli, D., Asher, R.A., Muir, E., Camargo, L.M., van Kuppevelt, T.H., ten Dam, G.B., Furukawa, Y., Mikami, T., Sugahara, K., Toida, T., Geller, H.M., Fawcett, J.W., 2005. Chondroitin 6-sulphate synthesis is up-regulated in injured CNS, induced by injury-related cytokines and enhanced in axon-growth inhibitory glia. *Eur. J. Neurosci.* 21, 378–390.

Rhiner C, Gysi S, Fröhli E, Hengartner MO, Hajnal A (2005) Syndecan regulates cell migration and axon guidance in *C. elegans*. *Development* 132: 4621-4633. doi:10.1242/dev.02042. PubMed: 16176946.

Rocha, Rosana M.; Bonnet, Nadia Y. K.; Baptista, Maria S.; Beltramin, Fabiele S. (2012) Introduced and native phlebobranch and stolidobranch solitary ascidians (Tunicata: Ascidiacea) around Salvador, Bahia, Brazil, *Zoologia* 29: 39-53

Ruppert E.E., Structure, ultrastructure and function of neural gland complex of *Ascidia interrupta* (Chordata, Ascidiacea): clarification of the hypotheses regarding the evolution of the vertebrate anterior pituitary. *Acta Zoologica* (1990) 71, 135-149.

Sanchez Alvarado, A., Regeneration in the metazoans: why does it happen. *Bioessays* 22, 578–590 (2000).

Shenkar, N.; Loya, Y. (2008) Ecology and sytematics of the ascidian fauna in the Gulf of Eilat (Aqaba), Magnes Press, Jerusalem. Pp. 197-237

Smith-Thomas, L.C., Stevens, J., Fok-Seang, J., Faissner, A., Rogers, J.H., Fawcett, J.W., 1995. Increased axon regeneration inastrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesisinhibitors. J. Cell Sci. 108, 1307–1315.

Steigemann P, Molitor A, Fellert S, Jäckle H, Vorbrüggen G (2004) Heparan sulfate proteoglycan syndecan promotes axonal and myotube guidance by slit/robo signaling. CurrBiol 14: 225–230. doi:10.1016/ j.sbi.2004.03.002. PubMed: 14761655.

Tanaka, Elly M.; Ferretti, Patrizia.Considering the evolution of regeneration in the central nervous system.Nature Reviews Neuroscience, v. 10, n. 10, p. 713-723, 2009.

Thessalou-Legaki, M. and 38 authors (2012) New Mediterranean biodiversity records (December 2012), Mediterranean Marine Science 13: 312-327

Van Name, Willard G. (1921) Ascidians of the West Indian region and southeastern United States., Bulletin of the American Museum of Natural History 44: 283-494

Wada, H., Saiga, H., Satoh, N. & Holland, P. W. Tripartite organization of theancestral chordate brain and the antiquity of placodes: insight from ascidian Pax-2/5/8, Hox and Otx genes. Development 125, 1113–1122 (1998).

Weiss, Charles M. (1948) The seasonal occurrence of sedentary marine organisms in Biscayne Bay, Florida., Ecology 29: 153-172

Woods Hole Oceanographic Institution (1952) Chapter 9. The principal fouling organisms., United States Naval Institute., Washington, D.C.. Pp. 118-164

Yick, L.W., Wu, W., So, K.F., Yip, H.K., And Shum, D.K.(2000). Chondroitinase ABC promotes axonal regenerationof Clarke’s neurons after spinal cord injury. NeuroReport 11,1063–1067.

Duman, Ronald S., and Nanxin Li. "A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 367.1601 (2012): 2475-2484.