



CAMILA MARQUES DE FRERIA

**INFLUÊNCIA DA GLIA NA SOBREVIVÊNCIA, CAPACIDADE
REGENERATIVA AXONAL E ESTABILIDADE SINÁPTICA DE
MOTONEURÔNIOS MEDULARES APÓS LESÃO CENTRAL E PERIFÉRICA**

CAMPINAS

2013



CAMILA MARQUES DE FRERIA

**INFLUÊNCIA DA GLIA NA SOBREVIVÊNCIA, CAPACIDADE
REGENERATIVA AXONAL E ESTABILIDADE SINÁPTICA DE
MOTONEURÔNIOS MEDULARES APÓS LESÃO CENTRAL E PERIFÉRICA**

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção de título de Doutora em Clínica Médica, área de concentração
Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA CAMILA
MARQUES DE FRERIA E ORIENTADA PELO PROF. DR.
ALEXANDRE L.R DE OLIVEIRA.

A handwritten signature in blue ink is positioned above a horizontal dashed line. The signature is stylized and appears to be the name of the supervisor, Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira.

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F891i Freria, Camila Marques de, 1980-
Influência da glia na sobrevivência, capacidade regenerativa axonal e estabilidade sináptica de motoneurônios medulares após lesão central e periférica / Camila Marques de Freria. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fator estimulador de colônias de granulócitos. 2. Receptor 4 Toll-like. 3. Receptor 2 Toll-like. 4. CX3CR1. 5. Neurônios motores. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Influence of glial cells on survival, axonal regeneration and synaptic plasticity of spinal motoneurons after peripheral and central injury.

Palavras-chave em inglês:

Granulocyte colony-stimulating factor

Toll-Like receptor 4

Toll-Like receptor 2

CX3CR1

Motor neurons

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira [Orientador]

Guilherme de Araújo Lucas

Flávia Carvalho Alcantara Gomes

Fábio Rogério

Lucia Elvira Alvares

Data da defesa: 22/02/2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

CAMILA MARQUES DE FRERIA

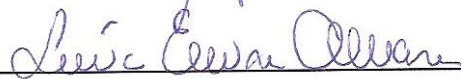
Orientador PROF. DR. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA

MEMBROS:

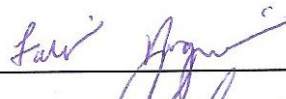
1. PROF. DR. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA



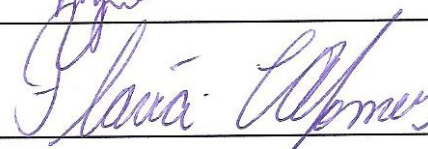
2. PROFA. DRA. LUCIA ELVIRA ALVARES



3. PROF. DR. FÁBIO ROGÉRIO



4. PROFA. DRA. FLÁVIA CARVALHO ALCANTARA



5. PROF. DR. GUILHERME DE ARAÚJO LUCAS



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 22 de fevereiro de 2013

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram,
estiveram presentes e acreditaram em meu potencial.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por me colocar nos lugares certos e me permitir conviver com pessoas maravilhosas em cada etapa da minha vida. Agradeço também pela força e sabedoria que me concede a cada dia.

Agradeço ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, a quem pacientemente me orientou neste trabalho tornando possível a realização desta tese. Agradeço também o seu apoio incondicional concedendo liberdade e independência para que eu pudesse executar minhas ideias no laboratório, o que contribuiu fortemente para o meu amadurecimento científico.

Ao professor Dr. Lício Augusto Velloso e Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad, a quem me forneceram os animais mutantes TLR4 e Knockout TLR2 utilizados nesta tese.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia: aos técnicos de laboratório, Nori e Marquinho, que sempre nos auxiliam nas técnicas de laboratório. À Marlene, Toni e Paulo Às técnicas do Centro de Microscopia Eletrônica, Antônia, Adriane e Stella que sempre nos auxiliaram no microscópio eletrônico de transmissão e à secretária Ana.

Ao Prof. Dr. Hernandes F. Carvalho e Prof. Carlos Lenz Cesar por autorizar a utilização do microscópio confocal do Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia (INFABIC). Agradeço a técnica do instituto INFABIC Mariana Ozello Baratti a quem me auxiliou na manipulação do microscópio confocal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, à coordenadora Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima, às secretárias Cristiane e Adriana.

Ao Biotério Central da UNICAMP, de onde vieram os animais utilizados nos experimentos da presente tese, e também às funcionárias Érica e Regina.

À FAPESP, meus agradecimentos pelo auxílio financeiro em equipamentos, material de consumo, bolsa e auxílio viagem, permitindo, assim, a viabilidade deste trabalho e do Laboratório de Regeneração Nervosa.

A todos os alunos do Departamento de Anatomia da UNICAMP e do Laboratório de Regeneração Nervosa: Sheila, Roberta, Gustavo, André, Rodrigo, Luciana, Aline, Suzana, Natália, Gabriela, Kyl, Mateus Perez e Mateus. Em especial gostaria de agradecer as amigas Sheila e Roberta pela ajuda e colaboração no laboratório e por suas amizades nos momentos de desconcentração.

À aluna de iniciação científica Gabriela Leite por ter me ajudado nas análises do nervo periférico dos animais TLR2 e à aluna de mestrado Luciana P. Cartarozzi por ter cuidado dos meus animais no período que estive nos EUA, realizando meu doutorado sanduíche.

Ao Diego Stéfani por sua paciência e companhia durante o meu doutorado. O seu apoio foi fundamental para o meu desenvolvimento científico e profissional.

Aos meus pais Maria e João e ao meu irmão Anderson que sempre estiveram presentes e me apoiaram. Especialmente a minha mãe querida, por me fortalecer com palavras de carinho e otimismo.

ACKNOWLEDGMENTS (The Ohio State University)

First I would like to acknowledge Dr. Phillip G. Popovich my mentor at The Ohio State University. Thank you for your patience with my English and for pushing me to do better. Without your guidance and support, I wouldn't have made it to this point. Thank you so much for this opportunity...It was a pleasure to be part of your team!!!

I would also like to acknowledge everyone in the Popovich's lab for all support and help. Ping Wein, thank you for all help in immunohistochemistry and confocal microscopy.

Jonh Gensel, thank you for making the work so much fun. Thank you for your guidance and help. You believed in my ideas and gave so much of your time to help me. I will always remember that. I enjoyed working with you!

Melissa Stenger, thank you for all your help. I don't have words to say thanks!! You are a very special person. You were my guardian angel when I most needed.

Kristina Kigerl, thanks for your guidance and help. Rezan, thanks for helping me to use the microscope.

Ming, thank you for helping me with surgery and for taking care of mice. Thanks to Wenmin for all help with the hybridization.

Jodie Hall and Andrew Gaudet, thank you so much for being friends and for being so supportive. Thanks for all fun activities...zoo, hockey game, pub, and break hour for chats.

Amy Tovar, thank you for lending your furniture for my apartment. Thanks for doing the snowman....I'll never give up of my dreams!!!

“A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis,
teriam ficado adormecidas ”

(Horácio)

SUMÁRIO

RESUMO.....	xxx
ABSTRACT.....	xxxii
1.INTRODUÇÃO GERAL.....	34
1.1 Motoneurônios e os modelos clássicos de lesões do SNC.....	34
1.2 O papel da inflamação no Sistema Nervoso (SN).....	38
2. OBJETIVOS.....	44
2. Objetivo geral do estudo.....	44
2.1 Objetivo Geral- Capítulo I.....	44
2.2 Objetivo Geral- Capítulo II.....	44
2.3 Objetivo Geral- Capítulo III.....	44
2.4 Objetivo Geral- Capítulo IV.....	44
3. METODOLOGIA GERAL.....	46
3.1 Linhagens de animais e técnicas utilizadas (Capítulos I,II,III, IV).....	46
3.2 Processamento dos espécimes para Imunoistoquímica (Capítulos I,II,III)....	47
3.2.1 Imunoistoquímica (Capítulos I,II,III).....	47
3.2.2 Análise quantitativa da imunoistoquímica da glia reativa e de marcadores sinápticos adjacentes à membrana dos motoneurônios medulares (Capítulos I,II,IV).....	48
3.3 Processamento dos espécimes para Microscopia eletrônica de transmissão (Capítulos I,II,III,IV).....	49
3.3.1 Análise das secções ultra-finas (Capítulos I,II,IV).....	50
3.4 Cultura celular primária de astrócitos (Capítulos I,II).....	51
CAPÍTULO I.....	54
1. Resumo.....	54

2. Introdução.....	55
3. Objetivos Específicos.....	57
4. Materiais e Métodos.....	58
4.1 Grupos de animais.....	58
4.2 Avulsão das raízes ventrais.....	58
4.3 Tratamento com G-CSF.....	59
4.4 Imunoistoquímica.....	60
4.5 Contagem da sobrevivência dos motoneurônios 2 semanas após avulsão das raízes ventrais.....	60
4.6 Análise de cultura celular primária de astrócitos.....	61
4.7 Análise ultraestrutural.....	62
4.8 Análise estatística.....	62
5. Resultados.....	63
5.1 O tratamento com G-CSF foi neuroprotetor após ARV.....	63
5.2 O tratamento com G-CSF reduz a retração sináptica após ARV.....	65
5.3 O tratamento com G-CSF após ARV aumenta a reatividade astrogliar <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	67
5.4 A reatividade da microglia não é afetada após tratamento com G-CSF.....	70
5.5 O tratamento com G-CSF reduz a perda sináptica após ARV.....	72
5.6 Padrões de distribuição dos terminais sinápticos após ARV.....	75
6. Discussão.....	77
7. Conclusões.....	80
CAPÍTULO II.....	82
1. Resumo.....	82
2. Introdução.....	83

3. Objetivos Específicos.....	85
4. Materiais e Métodos.....	86
4.1 Grupos de animais.....	86
4.2 Procedimentos cirúrgicos.....	87
4.3 Processamento dos tecidos.....	87
4.4 Imunoistoquímica.....	88
4.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	89
4.6 Western Blotting.....	89
4.7 Detecção de diferentes citocinas inflamatórias por Elisa-Array.....	90
4.8 RT-PCR.....	91
4.9 Cultura Celular.....	93
4.10 Ensaio de proliferação celular e imunocitoquímica.....	94
4.11 Análise estatística.....	95
5. Resultados.....	95
5.1 TLR2 e TLR4 apresentam efeitos opostos sobre a plasticidade após lesão nervosa periférica.....	95
5.2 A ausência do receptor Toll like 2 diminui a reatividade astrogial <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> e a expressão de interleucinas pró-inflamatórias.....	106
5.3 Na ausência de TLR4, a expressão de interleucinas pró-inflamatórias independe da reatividade glial.....	113
5.4 A expressão de MHC I e de neurotrofinas na ausência de TLR2 e TLR4.....	120
6. Discussão.....	125
7. Conclusões.....	129
CAPÍTULO III.....	131
1. Resumo.....	131
2. Introdução.....	132

3. Objetivos Específicos.....	135
4. Materiais e Métodos.....	135
4.1 Grupos de animais.....	135
4.2 Procedimento cirúrgico.....	136
4.3 Processamento dos tecidos.....	136
4.4 Imunoistoquímica.....	137
4.5 Quantificação das junções neuromusculares após regeneração do nervo isquiático.....	138
4.6 Análise das secções ultra-finas do nervo por microscopia eletrônica de transmissão.....	139
4.7 Análise funcional do nervo isquiático.....	139
4.8 Análise Estatística.....	141
5. Resultados.....	142
5.1 A ausência do receptor TLR4 aumentou a expressão do receptor de baixa afinidade para neurotrofinas no microambiente do segmento distal à lesão.....	142
5.2 A ausência do receptor Toll like 4 não interfere no número e nos diferentes tipos de fibras nervosas após axotomia.....	144
5.3 A ausência do receptor Toll like 4 não interfere no diâmetro das fibras mielínicas após lesão.....	146
5.4 Camundongos com deficiência no receptor Toll like 4 apresentam recuperação funcional mais precoce.....	150
5.5 Camundongos com deficiência no receptor Toll like 4 apresentam maior número de junções neuromusculares no músculo tibial anterior, após lesão periférica.....	152
5.6 A ausência do receptor TLR2 diminuiu a expressão do receptor de baixa afinidade para neurotrofinas no microambiente do segmento distal à lesão.....	154
5.7 Animais com ausência do receptor TLR2 não apresentam atraso no recrutamento de macrófagos no segmento proximal ou distal à lesão.....	156
5.8 Animais com ausência do receptor TLR2 apresentam quantidade	158

significativamente superior de fibras degeneradas.....	
5.9 A ausência do receptor TLR2 resulta em aumento do diâmetro de axônios mielínicos após lesão periférica.....	160
5.10 A ausência do receptor TLR2 não influencia nos valores morfométricos médios do nervo não lesado.....	163
5.11 A ausência do receptor TLR2 não influenciou na recuperação funcional após o esmagamento do nervo isquiático.....	165
6. Discussão.....	167
7. Conclusões.....	171
CAPÍTULO IV.....	173
1. Resumo.....	173
2. Introdução.....	174
3. Objetivos Específicos.....	178
4. Materiais e Métodos.....	179
4.1 Grupos experimentais e procedimento cirúrgico.....	179
4.2 Sacrifício dos animais.....	180
4.3 Imunoistoquímica.....	180
4.4 Hibridação <i>in situ</i>	182
4.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	182
4.6 Análise estatística.....	183
5. Resultados.....	183
5.1 A deleção de CX3CR1 não interfere na reatividade glial e formação da cicatriz glial.....	183
5.2 A deleção de CX3CR1 promove crescimento axonal após lesão medular	187
5.3 A ausência de CX3CR1 diminui a regulação da expressão de IRF5.....	192
5.4 Baixa expressão de IRF5 correlaciona com reduzido recrutamento de macrófagos M1 no local da lesão.....	194

5.5 A deleção de CX3CR1 preserva os contatos sinápticos em motoneurônios alfa após lesão medular.....	196
6. Discussão.....	199
7. Conclusões.....	202
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL.....	204
5. REFERÊNCIAS.....	209
6. ANEXOS.....	231
7. APÊNDICES.....	233

LISTA DE ABREVIATURAS

ARV- avulsão das raízes ventrais

ALS- esclerose lateral amiotrófica

BDNF- *Brain derived neurotrophic factor* (fator neurotrófico derivado do cérebro)

BrdU- 5-bromo-2'-deoxyuridine

BSA- *Bovine Serum Albumin* (albumina de soro bovino)

BHE- Barreira hematoencefálica

CSPG- Condroitin Sulfato Proteoglican (Proteoglicano de condroitin sulfato)

ChABC- Condroitinase ABC

DMEM- Meio de Eagle modificado pela Dulbecco

DAPI- 4'6'-diamidino-2-fenilindol

DFM- Diâmetro da fibra mielínica

DAM- Diâmetro do axônio mielínico

EBM- Espessura da bainha de mielina

EDTA- ácido etilenodiaminotetraacético

G-CSF - Granulocyte colony-stimulating factor (fator estimulador de colônias de granulócitos)

GDNF- *Glial cell derived neurotrophic factor* (fator derivado de células gliais)

GFAP- *Glial Fibrillary Acidic Protein* (proteína ácida fibrilar glial)

5HT- 5-hydroxytryptamine (serotonina)

HIS- Hibridação *in situ*

Iba-1- ionized calcium binding adaptor molecule 1

IFN γ - Interferon gama

iNOS- Óxido nítrico sintase

IRF5- Interferon regulator factor 5 (fator regulador de interferon 5)

IL1- Interleucina 1

LPS- Lipopolissacarídeo

TLRs- *Toll-like receptors* (receptores do tipo toll)

MAG- Myelin-associated glycoprotein (Glicoproteína associada à mielina)

MDM- macrófagos derivados da medula óssea

M1- Macrófagos pró-inflamatórios

M2- Macrófagos anti-inflamatórios

MET- Microscopia eletrônica de transmissão

MNs- Motoneurônios

MHC I- complexo principal de histocompatibilidade de classe I

NGF- *Nerve Growth Factor* – (Fator de crescimento do nervo)

Nogo-A - Neurite outgrowth inhibitor-A (inibidor de crescimento axonal)

OMgp- oligodendrocyte-myelin glycoprotein (proteína de mielina de oligodendrócitos)

PAMPs- Patógenos associados a padrões moleculares

RT-PCR -Reverse transcriptase polymerase chain reaction

SHG- Second Harmonic Generation (segundo harmônico)

SI- Sistema Imune

SN- Sistema nervoso

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP- Sistema Nervoso Periférico

TBS-T- *Tris-Buffered Saline Tween-20* (tampão Tris-Tween20)

TGF- *Transforming Growth Factor* (fator de crescimento de transformação)

TH1- Células T Helper 1

TH2- Células T Helper 2

TNF - *Tumoral Necrosis Factor* (Fator de necrose tumoral)

WB- Western Blotting

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de quantificação da densidade integrada de pixels nas adjacências dos motoneurônios medulares.....	48
Figura 2. Esquema representativo da localização de motoneurônios alfa medulares.....	50
Figura 3. Fotomicrografias representativas dos tipos de terminais sinápticos F, S e C.	51
Figura 4. Esquema demonstrando avulsão de raízes ventrais (L4-L6) na medula espinal.....	59
Figura 5. Avulsão das raízes ventrais e sobrevivência neuronal	64
Figura 6. Imunomarcção anti-sinaptofisina em animais Placebo e tratados com G-CSF.....	66
Figura 7. Imunomarcção anti- GFAP em animais Placebo e Tratados com G-CSF....	68
Figura 8. Cultura primária de astrócitos tratados com diferentes concentrações de G-CSF.....	69
Figura 9. Imunomarcção anti- Iba-1 em animais Placebo e Tratados com G-CSF.	71
Figura 10. Fotomicrografias do microambiente sináptico em animais Placebo e Tratados com G-CSF.....	73
Figura 11. Análise ultraestrutural da cobertura sináptica de motoneurônios alfa medulares nos grupos Placebo e Tratados com G-CSF.....	74
Figura 12. Análise do número de terminais sinápticos em contato com a superfície dos motoneurônios nos grupos Placebo e Tratados com G-CSF.....	75
Figura 13. Distribuição de frequência dos terminais na superfície dos motoneurônios após ARV.....	76
Figura 14. Imunomarcção anti- sinaptofisina e Western blotting em animais	97

C56BL/6J e TLR2 ^{-/-}	
Figura 15. Imunomarcção anti- sinaptofisina e Western blotting em animais C3H/HePas e C3H/HeJ.....	98
Figura 16. Imunomarcção anti- sinaptofisina em neonatos de C57BL/6J; TLR2 ^{-/-} ; C3H/HePas e C3H/HeJ.	101
Figura 17. Análise quantitativa ultraestrutural de terminais sinápticos em contato com os motoneurônios de animais C57BL/6J e TLR2 ^{-/-}	102
Figura 18. Análise quantitativa ultraestrutural de terminais sinápticos em contato com os motoneurônios de animais C3H/HePas e C3H/HeJ.....	104
Figura 19. Imunomarcção anti- GFAP <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> em animais C56BL/6J e TLR2 ^{-/-}	107
Figura 20. Níveis de mRNA de interleucinas pró-inflamatórias e neurotrofinas nos grupos C57BL/6J; TLR2 ^{-/-} ; C3H/HePas e C3H/HeJ.....	108
Figura 21. Ensaio de proliferação celular de astrócitos purificados a partir de C57BL/6J e TLR2 ^{-/-}	111
Figura 22. Imunomarcção anti- Iba-1 em camundongos C57BL/6J e TLR2 ^{-/-}	114
Figura 23. Imunomarcção anti- Iba-1 em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ.....	115
Figura 24. Imunomarcção anti- GFAP <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> em animais C3H/HePas e C3H/HeJ.....	117
Figura 25. Ensaio de proliferação celular de astrócitos purificados a partir de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ.....	118
Figura 26. Dupla marcação anti- MHC-I e Iba-1 e expressão de mRNA para microglobulina $\beta 2$ por RT-PCR em animais C57BL/6J e TLR2 ^{-/-}	122
Figura 27. Análise da expressão de MHC-I por Western blotting e microglobulina $\beta 2$	124

por RT-PCR em animais C3H/HePas e C3H/HeJ.....	
Figura 28. Imagem do equipamento Cat-Walk e pegadas digitalizadas.....	141
Figura 29. Imunomarcção das secções longitudinais nos seguimentos proximal e distal dos nervos após 2 semanas de esmagamento do nervo isquiático nos animais C3H/HePas e C3H/HeJ.....	143
Figura 30. Análise ultraestrutural do nervo isquiático 2 semanas após lesão em animais C3H/HePas e C3H/HeJ.....	145
Figura 31. Análise morfométrica de axônios mielínicos lesados nos grupos C3H/HePas e C3H/HeJ.....	147
Figura 32. Gráficos de distribuição de frequência para as fibras mielínicas contralaterais à lesão nos grupos C3H/HePas e C3H/HeJ.....	148
Figura 33. Gráficos de distribuição de frequência para as fibras mielínicas ipsilaterais à lesão nos grupos C3H/HePas e C3H/HeJ.....	149
Figura 34. Avaliação motora em porcentagem nos grupos C3H/HePas e C3H/HeJ...	151
Figura 35. Imunomarcção de junções neuromusculares imunoreativas a anti alfa bungarotoxina no músculo tibial anterior de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ...	153
Figura 36. Imunomarcção das secções longitudinais nos seguimentos proximal e distal dos nervos após 2 semanas de esmagamento nos animais C57BL/6J e TLR2 ^{-/-} .	155
Figura 37. Imunomarcção de macrófagos nos segmentos proximais e distais dos nervos lesionados após 3, 7 e 14 dias em animais C57BL/6J e TLR2 ^{-/-}	157
Figura 38. Análise ultraestrutural do nervo isquiático 2 semanas após lesão em animais C57BL/6J e TLR2 ^{-/-}	159
Figura 39. Análise morfométrica de axônios mielínicos regenerados nos grupos C57BL/6J e TLR2 ^{-/-}	161

Figura 40. Distribuição de frequência de fibras mielínicas ipsilaterais à lesão nos grupos C57BL/6J e TLR2 ^{-/-}	162
Figura 41. Distribuição de frequência para as fibras mielínicas contralaterais à lesão nos grupos C57BL/6J e TLR2 ^{-/-}	164
Figura 42. Avaliação motora, em porcentagem, nos grupos C57BL/6J e TLR2 ^{-/-}	166
Figura 43. Esquema de lesão traumática na medula (T9-T11).....	179
Figura 44. Taxa de proliferação de astrócitos e microglia, 7 dias após lesão medular, em animais CX3CR1 ^{-/-} e CX3CR1 ^{+/-}	184
Figura 45. Imunomarcção anti- GFAP, Iba-1 e CSPG em animais CX3CR1 ^{-/-} e CX3CR1 ^{+/-}	185
Figura 46. Análise do tecido preservado após lesão medular em animais CX3CR1 ^{-/-} e CX3CR1 ^{+/-}	186
Figura 47. Imunomarcção anti- 5 HT em axônios localizados na intumescência cervical de animais CX3CR1 ^{-/-} e CX3CR1 ^{+/-}	188
Figura 48. Imunomarcção anti- 5 HT em axônios localizados na intumescência lombar de animais CX3CR1 ^{-/-} e CX3CR1 ^{+/-}	189
Figura 49. Imunomarcção para neurofilamentos em animais CX3CR1 ^{-/-} e CX3CR1 ^{+/-}	190
Figura 50. Análise de imunoistoquímica e ultraestrutural de axônios presentes distalmente à lesão em animais CX3CR1 ^{-/-} e CX3CR1 ^{+/-}	191
Figura 51. Expressão de IRF5 visto por hibridação <i>in situ</i> nos animais CX3CR1 ^{-/-} e CX3CR1 ^{+/-}	193
Figura 52. Macrófagos com fenótipo M1 presentes no epicentro da lesão após 56 dias em animais CX3CR1 ^{-/-} e CX3CR1 ^{+/-}	195

Figura 53. Imunomarcção anti- sinaptofisina no corno ventral em animais CX3CR1 ^{-/-} e CX3CR1 ^{+/-}	197
Figura 54. Análise de ultraestrutura das sinapses em aposição aos motoneurônios alfa medulares em animais CX3CR1 ^{-/-} e CX3CR1 ^{+/-}	198

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes linhagens de animais, tipos de lesões e técnicas aplicadas para cada capítulo.....	46
Tabela 2. Média absoluta do número de neurônios por secção em animais Placebo e Tratados com G-CSF.....	65
Tabela 3. Sequência dos primers utilizados na técnica de RT-PCR em tempo real.....	93
Tabela 4. Processamento dos tecidos e técnicas utilizadas.....	137

RESUMO

Lesões nervosas periféricas e centrais levam à inflamação local e retrógrada, resultando em alterações axonais, perdas neuronais e sinápticas significativas. Juntamente a tais alterações, as células gliais tornam-se reativas, influenciando na remodelação do SNC após lesão. Os mecanismos que desencadeiam tais mudanças não são completamente compreendidos, mas é evidente que as moléculas classicamente relacionadas com o sistema imune estão envolvidas em tais eventos diretamente ou através da modulação da reatividade glial. Assim, nossa hipótese é que o controle da sinalização inflamatória após a lesão central ou periférica possa afetar indiretamente nos mecanismos endógenos de reparação no SNC, resultando em maior preservação das conexões neurais e melhor recuperação funcional. Para isso, realizamos lesões periféricas e centrais expondo os animais a diferentes microambientes de lesão a fim de investigar o papel das células gliais na sobrevivência, capacidade regenerativa axonal e estabilidade sináptica de motoneurônios medulares. Os resultados mostraram que, após lesão, a modulação da sinalização inflamatória através da administração de citocinas ou deleção de moléculas expressas na superfície das células gliais podem influenciar direta ou indiretamente na estabilidade dos circuitos neuronais, na regeneração axonal e sobrevivência neuronal. Desse modo, conclui-se que o controle da inflamação e da reatividade glial são, provavelmente, críticos para a plasticidade no Sistema Nervoso viabilizando, assim, novas estratégias de tratamentos.

ABSTRACT

Central or peripheral lesions result in local and retrograde inflammation , leading to axonal degeneration, synaptic and/or neuronal loss. Additionally, after injury, reactive glial cells are recruited to the lesion site, influencing the plasticity of the nervous system. The mechanisms which trigger such changes are not completely understood, but evidences have shown that molecules classically related to the immune system are involved in such events directly or indirectly by glial modulation. Based on this, our hypotheses is that the control of inflammatory signaling after central or peripheral injury may indirectly affect the endogenous repair mechanisms, resulting in a greater synaptic preservation and better functional recovery. In this sense, animals were submitted to both central and peripheral lesions in order to investigate the effects of glial cells on neuron survival, axonal regeneration and synaptic plasticity. The results showed that, after lesion, the modulation of inflammatory signaling by cytokines or knocking down molecules on glial surface, directly or indirectly influence the stability of neural circuits, neuronal survival and axonal regeneration. Thus, we believe that this are important findings, that may be critical to the development of new therapeutic strategies following nervous system injury.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Motoneurônios e os modelos clássicos de lesão do SNC.

Lesões do sistema nervoso central (SNC) caracterizam-se pela perda de funções motoras ou sensoriais que muitas vezes podem ser irreversíveis. Entretanto, sabe-se que a melhora funcional após lesão pode ser atribuída a alterações intrínsecas nos circuitos neurais, estando envolvidas as células gliais, a regulação de citocinas, receptores inflamatórios e fatores neurotróficos (Kim et al., 2004; Zanon et al., 2010; Donnelly et al., 2011). Desse modo, a regeneração axonal, a sobrevivência neuronal e a estabilidade sináptica dependerão, muitas vezes, do tipo e da extensão da lesão.

Diferentes modelos experimentais de lesão no SNC têm sido estudados com a finalidade de induzir degeneração ou plasticidade sináptica em motoneurônios e testar o potencial de diferentes tratamentos. Portanto, modelos clássicos de lesão, como transecção e esmagamento de nervo periférico (Liebermannn, 1971; Svensson & Aldskogius, 1999; Hammarberg et al., 1996), avulsão de raízes ventrais da medula (Koliatsos et al., 1994; Pihel et al., 1995; Cullheim et al., 1999; Chang e Havton, 2008) e lesão traumática da medula espinal (Morino et al., 2003; Huang et al., 2007; Shibuya et al., 2009) têm sido amplamente empregados. No presente trabalho foram abordadas três diferentes lesões: avulsão de raízes ventrais da medula espinal (intumescência lombar), axotomia periférica do nervo isquiático e compressão da medula espinal.

Os motoneurônios são neurônios de grandes dimensões presentes no corno ventral da medula espinal, ocupando a lâmina IX de Rexed. Sua distribuição na coluna anterior respeita um padrão somatotópico. Desse modo, neurônios que inervam os músculos proximais estão localizados ventro-lateralmente na medula espinal, enquanto que os

músculos distais são inervados pelos motoneurônios localizados dorso-lateralmente. Já os motoneurônios que inervam os músculos axiais constituem a lâmina IX medial, no corno ventral na medula espinal (Kandel, 1991).

O trauma ou interrupção do contato entre o motoneurônio e seu músculo alvo pode resultar em processos celulares que culminam com sua degeneração. Porém, a morte neuronal depende de diferentes fatores, tais como, o tipo de trauma e a idade do animal. As mudanças morfológicas que ocorrem nos neurônios após lesão incluem inchaço do corpo celular, aumento e deslocamento do núcleo para a periferia e desintegração da substância de Nissl (Lieberman 1971).

Sabe-se que lesões em indivíduos imaturos, principalmente no período neonatal, são particularmente graves e resultam em grande proporção de morte de neurônios motores. A proximidade da lesão em relação ao corpo celular do neurônio é outro fator crucial, que determina a ocorrência de apoptose/necrose desses (Lieberman 1971). Assim, acredita-se que os mecanismos relacionados à degeneração, nos casos acima mencionados, tenham relação com a interrupção do aporte de fatores tróficos derivados do músculo.

Um exemplo de grande relevância clínica, em relação à indução de morte neuronal, é a avulsão de raízes motoras na superfície da medula. Sabe-se que esta lesão induz a morte de motoneurônios em animais adultos, com apenas 20% de sobrevivência após a segunda e terceira semanas subsequentes à axotomia (Koliatsos et al., 1994). Ultraestruturalmente, após lesão proximal das raízes, observa-se, uma redução do número de contatos sinápticos no corpo neuronal e na região proximal dos dendritos (Lindå et al., 2000; Cullheim et al., 2002). Neste sentido, as primeiras duas semanas após a lesão, caracterizam-se como um

período crucial para a realização de tratamentos cirúrgicos e farmacológicos. Isto pois, é nesse intervalo de tempo que uma proporção significativa de motoneurônios axotomizados pode ser resgatada. O reimplante de raízes ventrais tem um caráter neuroprotetor, permitindo a regeneração axonal, além de resultar em reinervação funcional dos músculos (Culheim et al., 1989). Entretanto, apesar da cirurgia de reimplante, ainda há a necessidade de outras ferramentas na busca de estratégias que diminuam a morte neuronal pós-lesão e que direcionem os neuritos para repovoar as raízes reimplantadas (Cullheim,et al., 1999). Neste sentido a utilização de fármacos antes e após o procedimento cirúrgico é de extrema importância. Desse modo, ao longo dos anos, diferentes substâncias como fatores neurotróficos (Novikov et al., 1997; Chu et al., 2009), riluzole (Nogradi et al., 2007); N-acetyl-cysteine (Zhang et al., 2005) e o acetato de glatiramer (Scorisa et al., 2009) têm sido testadas. Recentemente, trabalhos têm demonstrado efeitos neuroprotetores do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) no SNC, sugerindo sua eficiente aplicação em lesões que acometem os neurônios motores (Henriques et al., 2010). Além disso, o G-CSF tem importante ação anti-apoptótica (Schneider et al., 2005); promove diferenciação de células neurais e a migração de células derivadas da medula óssea para regiões lesadas (Koda et al., 2007), reduz significativamente os níveis de indução de óxido nítrico sintase (iNOS) e diminui a ativação de microglias iNOS-positivas, (Solaroglu et al., 2006).

Semelhante à avulsão, na lesão nervosa periférica, o contato entre o motoneurônio e suas fibras musculares alvo torna-se comprometido. Neste tipo de lesão ocorrem alterações retrógradas no corpo celular do neurônio, denominadas cromatólise (Lidman *et al.*, 2002). Além disso, observa-se aumento da reatividade da microglia e dos astrócitos circundantes que influenciam no destacamento sináptico dos motoneurônios (Aldskogius & Svensson,

1993). As células gliais são capazes de expressar, na superfície celular, receptores que influenciam no destacamento ou preservação dos contatos sinápticos dos motoneurônios medulares. Tais receptores como o MHC I e moléculas da cascata do complemento exercem funções essenciais na formação, maturação e eliminação das conexões sinápticas (Huh et al., 2000; Oliveira et al., 2006; Fourgeaud & Boulanger, 2007; Berg et al., 2012). Os mecanismos envolvidos na interação glia e neurônio, ainda não são bem conhecidos. Entretanto, sabe-se que moléculas que originalmente foram identificadas no sistema imune também exercem funções não imunes no sistema nervoso, durante o desenvolvimento e após lesão (Boulanger, 2009). Assim, através do modelo de lesão periférica é possível pormenorizar as interações entre as células da glia e os motoneurônios.

Na lesão medular traumática ocorre hemorragia local, com o rompimento da barreira hemato-encefálica (BHE), seguida por uma rápida necrose que induz vasta morte neuronal e interrupção de vias ascendentes e descendentes (Hill et al., 2001). A ruptura dos feixes das fibras nervosas é devastadora, resultando em disfunções sensório-motoras acentuadas e persistentes abaixo da lesão. Sabe-se que a melhora funcional após lesão da medula espinal pode ser atribuída às alterações intrínsecas nos circuitos medulares distais, tais como o restabelecimento das vias descendentes ou a preservação da plasticidade sináptica em motoneurônios no corno ventral (Kim et al., 2004; Ballermann & Fouad 2006). Entretanto, a recuperação funcional depende da capacidade regenerativa dos axônios, que são deficientes em regenerar-se a longas distâncias (Schwab & Bartholdi, 1996). Após lesão traumática da medula, uma cascata de alterações moleculares e celulares é disparada pela inflamação. Logo, o controle destes processos definirá o sucesso da regeneração axonal (Benowitz & Popovich, 2011).

1.2 O papel da inflamação no Sistema Nervoso (SN).

Por muitos anos o SNC foi considerado um órgão imuno privilegiado, protegido pela barreira hemato-encefálica. No entanto, diversas circunstâncias patológicas e fisiológicas revelaram que a ação do SI no SNC constitui um importante mecanismo de resposta a lesões (Tillex & Hermans, 2007). Entretanto, o controle e a progressão da inflamação é, provavelmente, crítico para a sobrevivência neuronal, a regeneração axonal e a plasticidade após lesão (Popovich & Longbrake, et al., 2008). Ainda, a regeneração depende de fatores intrínsecos do microambiente que diferem tanto no SNP quanto no SNC. As diferentes capacidades regenerativas têm sido atribuídas ao microambiente do sistema nervoso, que é permissivo no SNP, porém inibitório no SNC (Fawcett et al., 1997). Assim, o modelo de lesão do nervo periférico é frequentemente usado para estudos de regeneração no SNC e SNP. Isto pois tal procedimento acarreta alterações no nervo periférico, que sofre degeneração Walleriana (DW) e no microambiente medular, pois os motoneurônios apresentam alterações anterógradas, em resposta à lesão do axônio.

A DW promove um microambiente favorável, permitindo a regeneração axonal. Em resposta à perda axonal, células de Schwann são recrutadas no local da lesão. Tais células executam um papel crucial na regeneração axonal, uma vez que, favorecem a reabsorção dos restos celulares, promovem o crescimento guiado dos axônios advindos do coto proximal, por expressarem moléculas de superfície que dirigem e estimulam a regeneração das fibras (Gaudet et al., 2011).

Recentes estudos têm demonstrado que as células de Schwann podem expressar, em sua superfície, receptores do tipo Toll (TLRs) (Goethals et al., 2010). Estes, por sua vez, são

receptores transmembrana de reconhecimento de padrões moleculares (PAMPs) que iniciam a resposta imune inata à diversos patógenos (Okun *et al.*, 2008). No SNP os TLRs exercem papel importante na ativação de células de Schwann e no recrutamento de macrófagos que, por sua vez, são fundamentais na remoção dos resíduos de mielina no local de lesão (Lee et al., 2006; Boivin et al., 2007). Os fragmentos celulares de mielina atuam como inibidores da regeneração, portanto a remoção destes facilita o brotamento axonal (Li et al., 1996; Liu et al., 2002; Simonen et al., 2003).

Uma lesão no SNC induz a reatividade das células gliais, refletindo uma comunicação bidirecional com os neurônios (Di Filippo *et al.*, 2008; Emirandetti *et al.*, 2006). Sendo assim, as células gliais são responsáveis por intermediar a interação entre o SN e o SI (Farina *et al.*, 2007). Tais interações ocorrem através de diversos receptores expressos na superfície de astrócitos, microglia e neurônios.

A co-expressão e autoregulação de G-CSF e seu receptor em neurônios após lesões no SNC, por exemplo, evidenciava um mecanismo de proteção neuronal autócrino (Solaroglu et al., 2006). Ainda, a dinâmica da regulação do G-CSF, após lesão, mostrou estar relacionada com a expressão de TLR4 (Li et al., 2009). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que TLR4 é expresso principalmente por microglia (Lehnardt et al., 2002; Lehnardt et al., 2003). Já o TLR2 pode ser expresso por microglia (Jack et al., 2005) e astrócitos (Olson et al., 2004; Phulwani et al., 2008). Além disso, os neurônios também expressam TLR, apresentando níveis elevados de TLR2 e TLR4 em resposta à lesão (Tang et al., 2007). Igualmente, outras moléculas envolvidas na imunidade inata, incluindo os componentes da cascata do complemento, são expressas por neurônios e exercem importante papel na plasticidade no SNC (Fourgeaud & Boulanger, 2007; Stevens et al., 2007). Sendo assim, é possível que os

TLRs, após lesão, estejam envolvidos na plasticidade sináptica, por intermediar a sinalização entre glia e neurônio.

Além disso, a quimiocina fractalcina CX3CL1, predominantemente expressa em neurônios, e o seu receptor CX3CR1, expresso por monócitos, células dendríticas e microglia (Nishiyori et al., 1998), são dinamicamente regulados após lesão no SNC. Isto sugere que a sinalização entre neurônio e glia também pode ser mediada através deste receptor (Harrison et al., 1998). Estudos mostram que a ativação via TLR4 regula a expressão dos receptores de quimiocina CX3CR1 (Boddeke et al., 1999; Pachot et al., 2008). Assim, a deficiência de CX3CR1 reduz a transcrição de NF- κ B, diminuindo os efeitos inflamatórios da ativação de TLR4 (Ishida et al., 2008).

As proporções da inflamação no SNC dependem principalmente do tipo da lesão. Assim, na lesão nervosa periférica e avulsão de raízes motoras, a reatividade glial limita-se, principalmente, às adjacências do motoneurônio afetado (Aldskogius et al., 1999), podendo, porém, se propagar a segmentos medulares adjacentes, não lesados. As propriedades funcionais específicas das células gliais recrutadas determinam sua influência sobre a sobrevivência neuronal, regeneração axonal e plasticidade sináptica (Aldskogius & Kozlova, 1998). Em resposta à lesão, a microglia ativada produz mediadores pró-inflamatórios citotóxicos (Chao et al., 1992), além de ser um dos elementos responsáveis pela retração sináptica em motoneurônios (Cullheim & Thams, 2007). Do mesmo modo, os astrócitos também influenciam no número de terminais sinápticos em aposição aos motoneurônios axotomizados (Emirandetti et al., 2006). Além disso, na avulsão das raízes ventrais, os astrócitos passam a ocupar os locais de lesão formando a cicatriz glial, que é considerada o principal impedimento para a regeneração axonal, uma vez que atua como

barreira física para o crescimento de axônios (Fawcett, 1997). Entretanto, os astrócitos também exercem papel neuroprotetor, uma vez que, após lesão, ocorre o rompimento e alteração da permeabilidade da BHE (Faulkner et al., 2004; Rolls et al., 2009). Assim, a cicatriz glial atua como uma barreira física impedindo a passagem de células e substâncias estranhas ao microambiente do SNC (Rolls et al., 2009). Trabalhos têm demonstrado que a quebra da barreira na avulsão pode desempenhar um papel essencial, por aumentar o acesso de fatores tróficos transmitidos do sangue para a área de lesão. Além disso, proteínas da matriz extracelular formam um caminho permissivo à regeneração axonal (Risling et al., 1992; Risling et al., 1993).

Já na lesão traumática medular, observa-se uma reatividade glial generalizada, estendendo-se por toda a área de lesão, diferentemente da axotomia periférica e da avulsão. Os astrócitos reativos secretam moléculas inibitórias que irão constituir a cicatriz glial. Os componentes da matriz extracelular, a cicatriz glial, e as proteínas associadas à mielina Nogo-A, MAG e OMgp são importantes fatores inibitórios do crescimento axonal (Yiu & He, 2006). Além disso, ocorre ativação da micróglia residente e o recrutamento de macrófagos derivados de monócitos. Evidências mostram que estes macrófagos podem promover tanto a regeneração dos axônios no SNC, como também podem ter características citotóxicas (Gensel et al., 2009). Os mecanismos que controlam tais funções antagônicas dos macrófagos no SNC, não são claramente conhecidos, mas certamente dependem da sinalização de quimiocinas, citocinas, e outras moléculas presentes no microambiente de lesão (Mantovani et al., 2004; Stout et al., 2005). A expressão do receptor CX3CR1 define a presença de dois subconjuntos de monócitos que determinam respostas inflamatórias antagônicas (Geissmann et al., 2003). Assim, fica evidente que os macrófagos podem exibir

diferentes padrões de função sob a influência de diferentes microambientes (Stout et al., 2005). De acordo com Donnelly et al. (2011), a ausência da sinalização de CX3CR1 atenuou a capacidade inflamatória e oxidativa da microglia e macrófagos, contribuindo para a recuperação funcional. Kigerl et al. (2009) sugerem que o crescimento e o brotamento axonal também podem ser influenciados por fatores facilitadores de crescimento derivados de macrófagos anti-inflamatórios. Assim, suspeita-se que o motivo de maior capacidade regenerativa de axônios no SNP comparado aos axônios no SNC, também deva-se às distintas respostas funcionais de macrófagos. Tal hipótese foi confirmada quando os monócitos estimulados *in vitro* com nervo periférico diferenciaram em macrófagos com aumentada habilidade fagocítica e capacidade de secretar fatores tróficos como o BDNF (Zeev-Brann et al., 1998).

Diante deste contexto, compreende-se que as respostas gliais dependem do tipo de lesão e da influência de diferentes microambientes. Desse modo, melhor entender estes distintos comportamentos pode ser uma ferramenta crucial no tratamento de lesões, uma vez que, o controle das funções das células gliais definirá sua influência sobre a capacidade regenerativa axonal, sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica dos neurônios. Assim, para o estudo destes fatores, foram analisados diferentes tipos de lesões e microambientes. A tese foi dividida em 4 capítulos, sendo os 3 primeiros desenvolvidos no laboratório de regeneração nervosa - Unicamp e o quarto capítulo realizado na Ohio State University-EUA. O primeiro trabalho refere-se à lesão por avulsão de raízes ventrais, o segundo e o terceiro, à lesão nervosa periférica e o quarto trabalho à lesão traumática medular.

2. OBJETIVOS

2. Objetivo Geral do estudo

Analisar os mecanismos moduladores das células gliais e a influência destas na sobrevivência, capacidade regenerativa axonal e estabilidade sináptica de motoneurônios medulares após lesão central e periférica.

2.1 Objetivo Geral - Capítulo I

Analisar a influência de G-CSF sobre a reatividade glial e plasticidade sináptica dos motoneurônios espinais em ratos submetidos à avulsão de raízes ventrais

2.2 Objetivo Geral- Capítulo II

Analisar a influência dos receptores tipo Toll 2 e Toll 4 na reatividade glial e na dinâmica das sinapses em aposição aos motoneurônios medulares do tipo alfa, em camundongos submetidos à lesão nervosa periférica.

2.3 Objetivo Geral- Capítulo III

Analisar o papel dos receptores TLR2 e TLR4 na regeneração e recuperação funcional após esmagamento do nervo periférico.

2.4 Objetivo Geral- Capítulo IV

Determinar se a deficiência de CX3CR1 atenua a capacidade inflamatória e oxidativa da microglia e macrófagos promovendo um ambiente favorável à regeneração de vias descendentes após lesão. Além disso, investigar se a deficiência do receptor CX3CR1^{-/-} contribui para maior preservação sináptica de motoneurônios alfa medulares.

3. METODOLOGIA GERAL

3.1 Linhagens de animais e técnicas utilizadas (Capítulos I, II, III e IV)

Capítulos	Linhagens	Tipos de lesão	Tempo de sobrevida após lesão	Técnicas
Capítulo I	Lewis adultos (6-8 semanas idade)	Avulsão	2 semanas	Imunoistoquímica e MET
	Lewis neonatos (1-3 dias)	Sem lesão		Cultura celular
Capítulo II	C57BL/6J adultos (6-8 semanas)	Transecção do nervo periférico	1 semana	Imunoistoquímica MET Western blotting RT-PCR
	TLR2 ^{-/-} adultos (6-8 semanas)			
	C3H/HePas adultos (6-8 semanas)			
	C3H/HeJ adultos (6-8 semanas)			
	C57BL/6J, TLR2 ^{-/-} , C3H/HePas, C3H/HeJ (neonatos – 1-3 dias)	Sem lesão		Cultura celular
Capítulo III	C57BL/6J adultos	Esmagamento do nervo periférico	2 semanas	Imunoistoquímica e MET
			3 e 7 dias	Imunoistoquímica
	TLR2 ^{-/-} adultos		2 semanas	Imunoistoquímica e MET
			3 e 7 dias	Imunoistoquímica
	C3H/HePas adultos		2 semanas	Imunoistoquímica e MET
			5 semanas	Imunoistoquímica
	C3H/HeJ adultos		2 semanas	Imunoistoquímica e MET
			5 semanas	Imunoistoquímica
Capítulo IV	CX3CR1 ^{-/-} adultos (7-10 semanas)	Contusão Medular focal	56 dias	Imunoistoquímica Hibridação <i>in situ</i> MET
	CX3CR1 ^{+/-} adultos (7-10 semanas)			

Tabela 1: Diferentes linhagens de animais, tipos de lesão e técnicas aplicadas para cada capítulo.

3.2 Processamento dos espécimes para Imunoistoquímica (Capítulos I, II e III).

Após os períodos de sobrevida pré-determinados, os animais foram anestesiados com a combinação de Kensol (xilazina, Köning, 10 mg/kg) e Vetaset (cetamina, Fort Dodge, 50 mg/kg) e em seguida submetidos à toracotomia e sacrificados via perfusão transcardíaca. Visando a lavagem total dos vasos e órgãos os animais foram submetidos primeiramente à perfusão de solução de salina (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,4). Posteriormente, foi realizada a fixação utilizando solução de formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio, pH 7,4. Após fixação, os espécimes foram dissecados e mantidos em fixador por 12 horas a 4°C. Passado este período, os espécimes foram incluídos em Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e congelados em n-Hexano à -35 a -40°C, em recipiente contendo nitrogênio líquido. Cortes histológicos com 12µm de espessura foram obtidos em criostato. As secções foram então transferidas para lâminas gelatinizadas e estocadas a -20°C até a realização das imunomarcações.

3.2.1 Imunoistoquímica (Capítulos I, II, III).

Para a realização da imunoistoquímica, as lâminas climatizadas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em TBS 5% Tween, sendo posteriormente bloqueadas com TBS 5% Tween a 3% BSA por 60 minutos. Após este período as lâminas foram incubadas em câmara úmida com 70µl de solução contendo anticorpo primário em TBS 5%, Tween a 1% e BSA por 3 horas. Após 3 séries de lavagens de 5 minutos em TBS 5% contendo Tween, as lâminas foram incubadas com os anticorpos secundários (1:250) conjugados com cianina 2 (CY-2) ou 3 (CY-3; Jackson Lab., USA) por 60 minutos. Os espécimes foram lavados em TBS 5% contendo Tween, montados em glicerol/PBS 0,1M (3:1) e observados em microscópio de fluorescência, utilizando-se os filtros para fluoresceína (CY-2) e rodamina (CY-3).

3.2.2 Análise quantitativa da imunoistoquímica da glia reativa e de marcadores sinápticos adjacentes á membrana dos motoneurônios medulares (Capítulos I, II, IV).

As imunomarcações foram observadas e digitalizadas em microscópio de fluorescência invertido (Eclipse TS100, Nikon, Tokyo, Japan) conectado a um sistema de aquisição de imagens (DXM1200F, Nikon, Tokyo, Japan). Todas as imagens foram adquiridas com ampliação final de x200 usando sempre configurações idênticas no software Metamorph. Para a quantificação, foram selecionadas três secções alternadas a partir do mesmo nível da medula espinal dos lados ipsilateral e contralateral de cada animal (n = 5 para cada grupo). A quantificação foi realizada com mudança de contraste através do software ImageJ (versão 1.33, National Institutes of Health, EUA). A densidade integrada de pixels foi medida em seis áreas representativas de todo o motoneurônio identificado no núcleo motor lateral de cada um dos lados (lados lesionado e não lesionado) (Figura 1). A razão ipsilateral / contralateral da densidade integrada de pixels foi calculada e então estabelecida a média para cada grupo $\pm$ erro padrão (Oliveira et al., 2004).

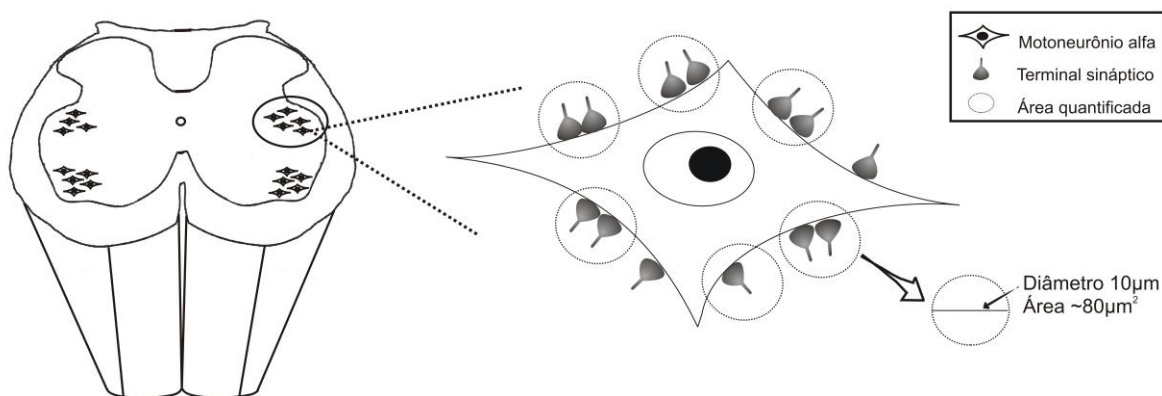


Figura1: Esquema de quantificação da densidade integrada de pixels nas adjacências dos motoneurônios medulares lâmina IX (região dorso-lateral do corno ventral).

3.3 Processamento dos espécimes para Microscopia eletrônica de transmissão (Capítulos I, II, III, IV).

Após os períodos de sobrevida pré-determinados, os animais foram anestesiados com a combinação de Kensol (xilazina, Köning, 10 mg/kg) e Vetaset (cetamina, Fort Dodge, 50 mg/kg), submetidos à toracotomia e sacrificados via perfusão transcardíaca. Visando a lavagem dos vasos e órgãos os animais foram submetidos à perfusão de solução de salina (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,4) e, posteriormente, fixados com solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em tampão fosfato de sódio, pH 7,4. Após fixação, os espécimes foram mantidos na mesma solução fixadora por 12 horas a 4°C. Passado esse período, as intumescências foram reduzidas em fragmentos ipsilateral e contra-lateral e lavadas em tampão fosfato 0,1M. Os fragmentos foram, então, pós-fixados por um período de 3 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,4. Seguindo-se à pós-fixação, os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcool e acetona e incluídos em resina (Durcupan, Sigma). Os blocos foram desbastados, realizadas secções semi-finas (0,5µm) e posteriormente cortes ultra-finos (500Å; ultramicrotomo LKB, Bromma 8800) coletados em telas de cobre com película de formvar. O espécimes foram então contrastados em acetato de uranila 2% em solução aquosa por 40 minutos e citrato de chumbo, por mais 5 minutos. Após contraste, os espécimes foram observados em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G² Spirit BioTwin (FEI Company, Holanda) operando a 120KV.

3.3.1 Análise das secções ultra-finas (Capítulos I,II,IV).

Neurônios com grandes corpos celulares (>35 µm em diâmetro), encontrados no grupo dorso-lateral da coluna anterior da medula e seccionados ao nível do plano nuclear foram identificados como α -motoneurônios pela presença de terminais sinápticos colinérgicos ou do tipo C. A superfície das células foi então sequencialmente digitalizada com uma câmara digital e uma ampliação de x11.000. As imagens foram montadas sequencialmente, utilizando-se um software vetorial (Figura 2). Os terminais sinápticos foram classificadas em três diferentes tipos (F, S e C), de acordo com a nomenclatura de Conradi (1969). Terminais tipo S, com vesículas esféricas, contêm principalmente o neurotransmissor excitatório glutamato, Terminais do tipo C apresentam vesículas esféricas contendo neurotransmissor acetil colina e possuem cisterna subsináptica. Terminais F contêm vesículas achatadas ou pleomórficas, preenchidas com glicina e/ou GABA, apresentado função inibitória (Figura 3). Para cada neurônio, foi calculado o número de terminais sinápticos por 100 µm de membrana celular e o percentual de comprimento de membrana, usando a ferramenta de medição do software ImageTool (versão 3.0, The University of Texas Health Center, TX). Um total de 2 motoneurônios foram analisados para cada animal, totalizando 10 neurônios por grupo experimental (Oliveira et al., 2004).

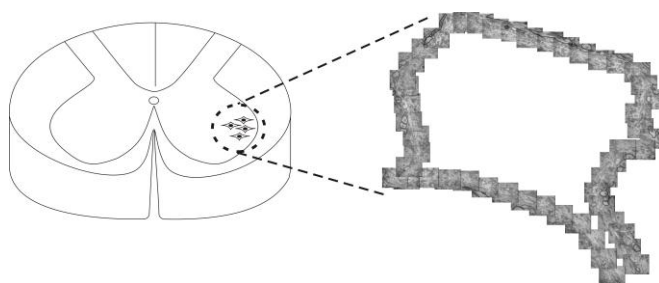


Figura 2: Esquema representando motoneurônios localizados no corno ventral, grupo dorso-lateral da medula espinal. Sequência de fotomicrografias eletrônicas de transmissão utilizada para reconstrução de um motoneurônio alfa.

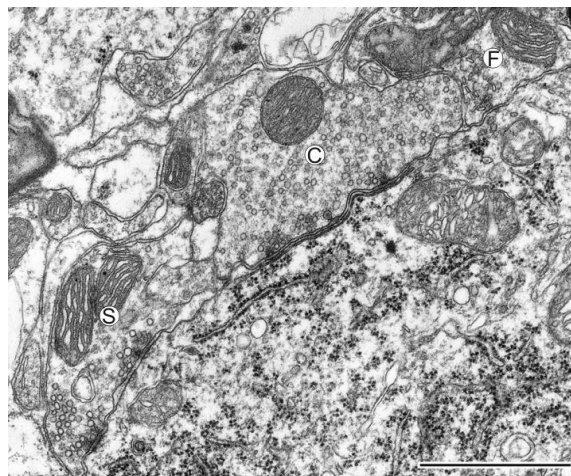


Figura 3: Fotomicrografia mostrando os três tipos de terminais pré-sinápticos (S, C e F) em aposição à membrana de um motoneurônio alfa medular. Escala = 2 μ m.

3.4 Cultura celular primária de astrócitos (Capítulos I,II).

As culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir córtices cerebrais de camundongos ou ratos de 1 a 2 dias de idade. De acordo com o método usado por McCarthy & Vellis (1980), os córtices cerebrais de camundongos ou ratos neonatais foram extraídos e, após a remoção das meninges e vasos sanguíneos, foram triturados e incubados em 0,05% de tripsina (em solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio) durante 10 min. Em seguida, foi adicionada DNase no tecido pré-digerido e a suspensão de células resultante foi centrifugada por 10 minutos em gradiente contendo 4% de albumina sérica bovina (BSA) e meio de Eagle modificado pela Dulbecco (DMEM). O precipitado celular foi ressuspenso em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Nutricell), penicilina e estreptomicina (1 UI/ml, Nutricell), fator de crescimento do nervo (NGF, 0,25ul/ml, Sigma), glicose (16 ul/ml, Nutricell) e insulina (1 ul/ml, Sigma) e semeadas em frascos de cultura de células 25 cm² (T25). As culturas de astrócitos primários

resultantes foram mantidas em incubadora a 37°C sob atmosfera de CO₂ a 5% durante 2 semanas. Após confluência, as culturas foram tripsinizadas e novamente submetidas a centrifugação de 10 min. O precipitado foi ressuspenso em meio glial e semeado em placas de cultura de 24 poços na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço. Estas placas foram colocadas em incubadora sob as mesmas condições (37°C, 5% de CO₂). O meio glial foi renovado a cada dois dias, e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

CAPÍTULO I

Efeito neuroprotetor do G-CSF sobre motoneurônios espinais após avulsão de raízes ventrais

1. Resumo

O fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF) é uma glicoproteína comumente utilizada no tratamento da neutropenia. Recentes estudos têm mostrado que o receptor de G-CSF (G-CSF-R) é expresso por neurônios no sistema nervoso central (CNS), sendo observados efeitos neuroprotetores do G-CSF após lesão. Desse modo, o presente trabalho teve o objetivo de analisar a influência do G-CSF sobre a reatividade glial e plasticidade sináptica de motoneurônios espinais em ratos submetidos à avulsão de raízes ventrais (ARV). Para isso, ratos Lewis machos (7 semanas de idade) foram submetidos a ARV unilateral de L4, L5 e L6 e divididos em dois grupos: tratado com G-CSF e placebo. O tratamento foi realizado via subcutânea na dose de 200 µg/kg/dia de G-CSF durante 5 dias após a lesão. Já, o grupo placebo recebeu solução salina tamponada. Após duas semanas, ambos os grupos foram sacrificados e as intumescências lombares processadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET), avaliação da sobrevivência neuronal e imunistoquímica com os anticorpos GFAP, Iba-1 e sinaptofisina. Além disso, foi realizada análise *in vitro* da reatividade glial e proliferação celular de astrócitos derivados de encéfalos extraídos de animais neonatos. Os resultados indicam um aumento de sobrevivência neuronal e preservação sináptica no grupo tratado com G-CSF. As análises em MET sustentam os resultados obtidos em imunistoquímica, revelando maior preservação da cobertura sináptica em animais tratados. Esta melhora da sobrevivência neuronal e preservação sináptica estão relacionadas com aumento na reatividade astrogliar

tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Os resultados *in vitro* mostraram aumentada taxa de proliferação celular em astrócitos tratados com G-CSF. Dessa forma, os resultados do presente trabalho sugerem que o G-CSF exerce importante influência na sobrevivência neuronal, reatividade astrogliar e estabilidade sináptica de terminais pré-sinápticos na medula espinal, indicando um possível efeito neuroprotector após lesões no SNC.

2. Introdução

Avulsão de raízes ventrais é uma lesão debilitante que normalmente está associada com trauma de alta energia, como ocorre em acidentes de moto, no qual o pescoço é violentamente afastado do ombro. Modelos de animais para o estudo dos efeitos da axotomia proximal foram desenvolvidos a fim de viabilizar o desenvolvimento de novas estratégias de reparo (Carlstedt, 2009). Desse modo, foi estabelecido um período crítico para intervenções cirúrgicas ou farmacológicas, o qual compreende as duas primeiras semanas após a lesão. Durante este período, uma proporção variável de motoneurônios axotomizados podem ser resgatados do processo de degeneração.

Um modelo experimental utilizado para investigar a degeneração neuronal adulta é avulsão das raízes ventrais (ARV) na superfície da medula espinal. A proximidade da lesão em relação ao corpo celular do motoneurônio induz perda neuronal de cerca de 80% durante as duas primeiras semanas pós-lesão (Koliatsos et al., 1994). Após ARV, ocorre reação inflamatória local e vigorosa ativação da glia residente, contribuindo para a

ocorrência de alterações nos circuitos espinais e perda aguda dos contatos sinápticos (Aldskogius & Kozlova, 1998; Aldskogius et al., 1999).

Ao longo dos anos, diferentes substâncias como fatores neurotróficos, riluzol, nimodipina, n-acetil-cisteína e miociclina (Tao et al, 1998;. Zhang et al, 2005;. Nogradi et al, 2007,.. Hoang et al, 2008; Sándor et al, 2010) têm sido utilizadas no reparo de lesões ou doenças que acometem o neurônio motor. Além disso, a terapia celular apresenta resultados bastante promissores (Rodrigues Hell et al., 2008; Su et al., 2009). Entretanto, atualmente, abordagens terapêuticas para evitar a perda neuronal após lesões proximais não são suficientemente eficazes, tornando necessária a investigação de novas abordagens farmacológicas. Desse modo, o potencial neuroprotetor do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) até o momento não foi testado no modelo de AVR.

O G-CSF é um fator de crescimento hematopoiético importante na proliferação e diferenciação de células de linhagem mielóide (Schneider *et al.*, 2005). Estruturalmente, G-CSF é uma glicoproteína que consiste de 4 hélices, com massa molecular de 19 KDa (Demetri et al., 1991). Os receptores de G-CSF estão presentes em diferentes células, tais como na medula óssea, fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, bem como em diferentes regiões do sistema nervoso, tanto em células gliais quanto em neurônios (Demetri & Griffin et al, 1991; Schneider et al, 2005b ; Solaroglu et al, 2006). Vários estudos têm demonstrado que o G-CSF desempenha um papel neuroprotetor importante em lesões do SNC. Assim, foram observados efeitos benéficos como ação anti-apoptótica em neurônios (Schneider et al, 2005b; Solaroglu et al, 2006), além de melhora dos sinais clínicos em animais com esclerose lateral amiotrófica (ALS) tratados com G-CSF (Pitzer et

al., 2008). Além disso, observou-se em modelos de lesão medular, mobilização de células da medula óssea para o local da lesão, contribuindo para a recuperação funcional (Koda et al., 2007). Tal fato é de grande interesse, uma vez que a utilização de células-tronco tem provado ser eficaz na recuperação de neurônios lesionados após o trauma (Rodrigues Hell et al., 2008). Assim, a possibilidade de obter, os benefícios da terapia de células-tronco, sem a necessidade de extração da medula óssea é uma vantagem bastante significativa no tratamento de G-CSF. Outro grande benefício do tratamento com G-CSF é o seu efeito anti-inflamatório. Estudos experimentais em esclerose múltipla demonstraram que o tratamento com G-CSF diminuiu os efeitos inflamatórios da doença, reduzindo consequentemente a gravidade da mesma (Zavala et al, 2002; Lee et al, 2005). Desse modo, a ação do G-CSF no processo inflamatório, possivelmente interfere na reatividade glial, minimizando os efeitos destas células nos processos de retração sináptica. Neste contexto, novas perspectivas são estabelecidas quanto ao uso desta molécula como ferramenta moduladora da reatividade glial e de lesões que acometem o neurônios motores.

3. Objetivos específicos

3.1 Objetivos Específicos

- Analisar a influência do G-CSF na preservação sináptica através da análise de imunoistoquímica da proteína sinaptofisina e a sobrevivência de motoneurônios medulares em animais submetidos a avulsão das raízes motoras L4, L5 e L6.

- Analisar a influência do G-CSF na reatividade astrogliar através da imunomarcacão de GFAP *in vitro* e *in vivo*.
- Analisar o efeito do G-CSF na reatividade da microglia através da imunomarcacão de Iba-1

4. Materiais e Métodos

4.1 Grupos de animais

Foram utilizados ratos machos adultos (6 a 8 semanas) pertencentes à linhagem Lewis, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram agrupados em mini-isoladores, com livre acesso à ração e água, com controle de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) e temperatura (21°C).

Para a análise *in vivo*, foram utilizados 10 animais divididos em 2 grupos: placebo e tratado com G-CSF. Ambos os grupos foram submetidos à axotomia das raízes ventrais. Para a análise *in vitro*, foram utilizados 5 animais neonatos Lewis de 1 a 2 dias de idade.

4.2 Avulsão das raízes ventrais

Os animais foram submetidos à laminectomia unilateral ao nível da intumescência lombar. A dura-máter foi aberta através de uma incisão e, após dissecação do ligamento denticulado, a medula espinal foi exposta. As raízes ventrais associadas à intumescência

lombar foram identificadas e avulsionadas na região de L4-L6. Após a lesão, a musculatura foi colocada na posição original e a fáscia e a pele foram suturadas. Os animais permaneceram em biotério durante o período de tratamento até o sacrifício.

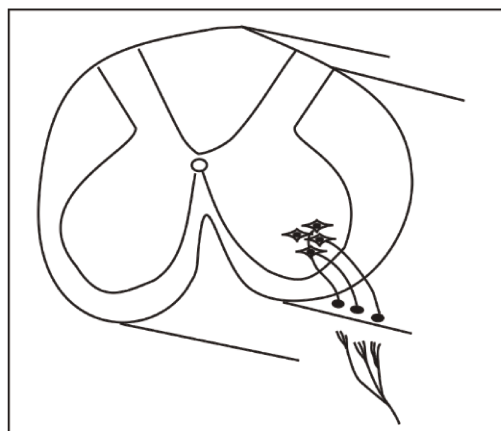


Figura 4: Esquema demonstrando a avulsão de raízes ventrais (L4-L6) na medula espinal.

4.3 Tratamento com G-CSF

O medicamento Myograft, princípio ativo G-CSF, foi fornecido pelo laboratório Bergamo. O fármaco G-CSF foi injetado via subcutânea na dose de 200 $\mu\text{g/Kg/dia}$ diluído em glicose à 2% por 5 dias, de acordo com Koda et al.(2007). O grupo placebo recebeu doses via subcutânea de solução salina tamponada, pH 7.4. Os respectivos tratamentos começaram trinta minutos após a avulsão das raízes, seguido diariamente por sucessivas injeções subcutâneas. Os animais foram sacrificados 2 semanas após lesão.

4.4 Imunoistoquímica

Foram realizados os protocolos mencionados anteriormente para o processamento das intumescências lombares, preparação das lâminas, imunoistoquímica, e análise quantitativa. Para a realização da imunoistoquímica, as lâminas climatizadas foram incubadas com os anticorpo primários anti-sinaptofisina (DAKO 1:100), anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) (Santa Cruz 1:100) e anti IBA-1(Wako 1:500).

4.5 Contagem da sobrevivência dos motoneurônios 2 semanas após a avulsão das raízes ventrais.

A contagem das células foi realizada através das secções histológicas dos segmentos lombares L4 a L6, 2 semanas após lesão e tratamento farmacológico ou placebo. As lâminas utilizadas na análise de sobrevivência neuronal foram as mesmas utilizadas nas análises de imunoistoquímicas. Desse modo, as lâminas foram coradas com corante de Nissl por 3 minutos e, em seguida, montadas com bálsamo e lamínula. Os motoneurônios foram identificados baseando-se na sua morfologia e localização no corno ventral da medula. Somente as células com o núcleo e nucléolo visíveis foram contadas. A contagem neuronal foi realizada em 20 secções alternadas, tanto ipsilateral quanto contralateral à lesão, para cada animal experimental, de forma a permitir a amostragem dos 3 segmentos medulares lesados. O número absoluto de motoneurônios do lado lesado e do contralateral, por secção, foram usados para calcular a porcentagem de células sobreviventes em cada

espécime. Para evitar-se contagem duplicada de neurônios sobreviventes, foi utilizada a fórmula Abercrombie & Johnson (1946):

$$N=nt/(t+d)$$

N é o número corrigido de neurônios contados, n é o número de células contadas, t é a espessura das secções (12 μ m) e d é o diâmetro das células. Como a diferença no tamanho significativamente afeta o número de células, o valor de d foi calculado especificamente para cada grupo experimental (ipsilateral e contralateral). Neste sentido, o diâmetro de 15 motoneurônios para cada grupo foi mensurado (Image Tool software, versão 3.00).

4.6 Análise de cultura celular primária de astrócitos.

Culturas primárias de astrócitos foram estabelecidas conforme protocolo já mencionado. Assim, o ensaio de proliferação celular foi realizado após serem lançadas as células em placas de 24 poços (2x10⁴ células/poços). A análise de proliferação celular foi realizada através da contagem dos núcleos corados com DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol) e assim foram estabelecidas as curvas de crescimento de astrócitos até três dias de tratamento para os grupos experimentais (controle- não tratado; 25ng/ml G-CSF; 100 ng/ml G-CSF e 500 ng/ml G-CSF). A reactividade dos astrócitos foi mensurada através da imunoreatividade anti-GFAP para os diferentes grupos experimentais após 3 dias de tratamento. Quatro imagens representativas de cada triplicata ou poço foram analisadas e a medida da densidade integrada de pixels foi obtida utilizando o software ImageJ (versão 1.33, National Institutes of Health, EUA).

4.7 Análise ultraestrutural

O processamento das intumescências lombares e a análise das secções ultra-finas por microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas conforme protocolos mencionados anteriormente. Dez motoneurônios foram analisados (dois neurônios por animal, n=5, grupos placebo e tratado com G-CSF). A superfície dos motoneurônios foi digitalizada utilizando-se uma câmara digital com ampliação de x11.000, e as imagens foram montadas sequencialmente, com auxílio de um software vetorial. Os números de terminais em aposição aos motoneurônios por 100 μm de comprimento da membrana celular foi quantificado através do software ImageTool (versão 3.0, The University of Texas Health Center). Além disso, foi calculada a porcentagem de contato sináptico dos terminais em relação ao comprimento da membrana e a distância entre os terminais sinápticos em aposição aos motoneurônios analisados (distribuição de frequências dos GAPS).

4.8 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*). Os dados foram submetidos a análise de variância seguida do teste post hoc de Bonferroni para os dados paramétricos ou Mann-Whitney U para dados não-paramétricos, utilizando-se o software Prisma 4.0.

5. Resultados

5.1 O tratamento com G-CSF foi neuroprotetor após ARV.

A sobrevivência neuronal foi obtida através da análise dos lados ipsi/ contralateral de motoneurônios presentes nas lâminas IX no corno ventral. Desse modo, os animais tratados com G-CSF, em relação ao grupo placebo, apresentaram menor perda neuronal após lesão das raízes (Figura 5C-5F). Tal resultado sugere que o tratamento de 5 dias após ARV garante um efeito neuroprotetor eficiente nos motoneurônios que persiste, pelo menos, por 2 semanas. O gráfico F representa os dados quantitativos entre os grupos placebo e tratados (placebo 23,53% $\pm$ 2,99; tratado com G-CSF 39,55% $\pm$ 2,69%, porcentagem de sobrevivência lados ipsi/ contralateral $\pm$ erro padrão; $p < 0,01$). A tabela 1, representa o número médio absoluto de neurônios amostrados por secções lombares da medula espinal lados ipsi/ contralaterais nos diferentes grupos experimentais.

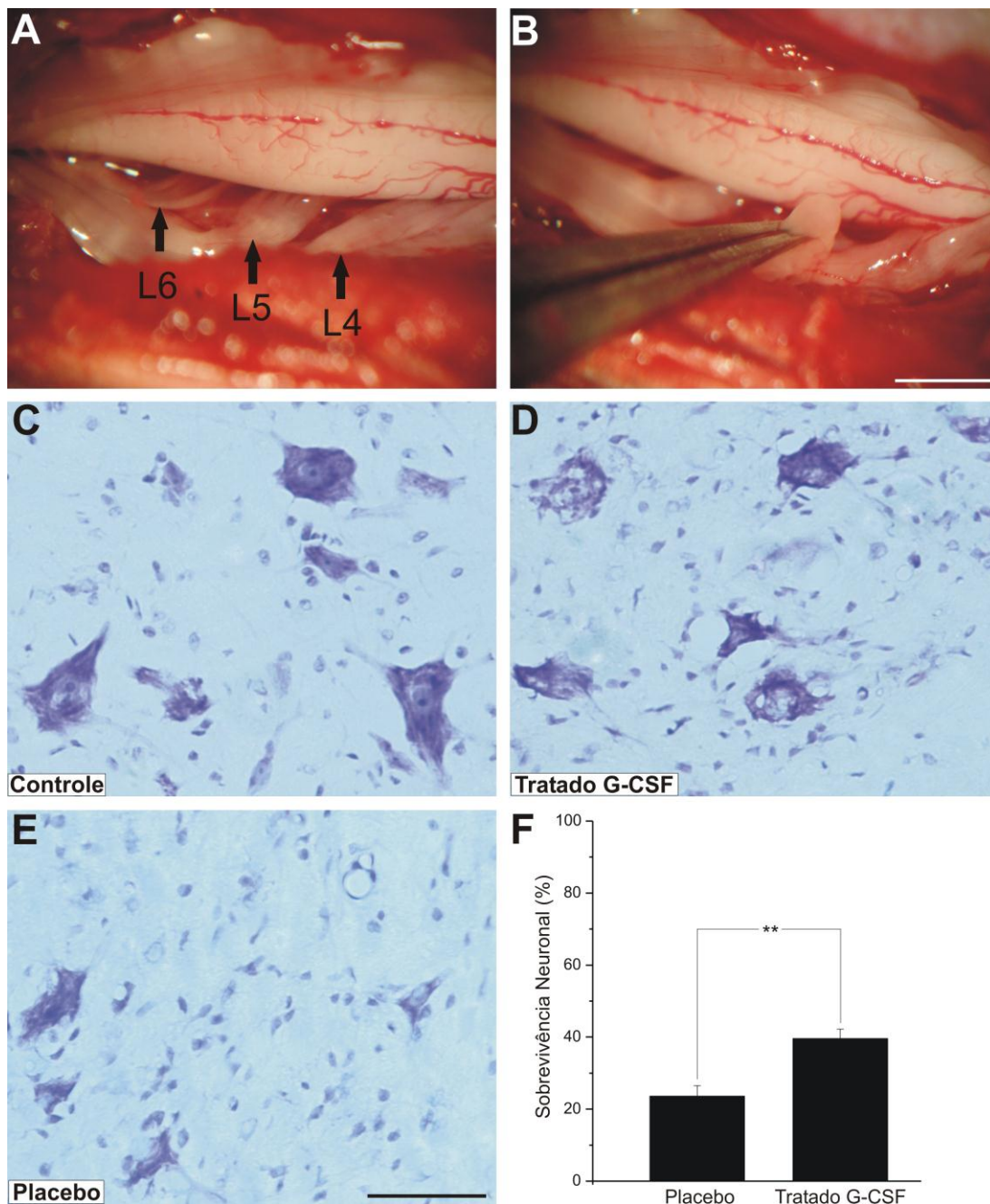


Figura 5: Avulsão das raízes ventrais. Identificação do isolamento (A) e desconexão (B) das raízes L4-L5. (C - E) Secções transversais da medula espinal, coradas com Cresil Violeta, ilustrando a sobrevivência de motoneurônios axotomizados. Lado Contralateral (C), Tratado com G-CSF (D) e Placebo (E). (F) Gráfico de sobrevivência neuronal, representado em porcentagem (ipsi/contralateral). $P \leq 0,01$. Barra de escala = 50 μ m.

<i>Grupos Experimentais</i>				
	Avulsão Tratado G-CSF (n=5)		Avulsão Placebo (n=5)	
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
Número de neurônios por secção	1.98± 0.28	5.03± 0.90	1.03± 0.51	4.80 ± 1.05
Fórmula de Abercrombie	49.95± 3.66	55.00± 4.60	41.74± 4.29	54.96± 9.56
diâmetro “d”				

Tabela 2: Média absoluta do número de neurônios por secção nos lados ipsilateral e contralateral da medula dos grupos placebo e tratado com G-CSF. Na linha abaixo está representada a média dos diâmetros dos neurônios nos diferentes grupos. Note que os motoneurônios nos animais tratados com G-CSF (lado ipsilateral- lesão) apresenta maior diâmetro comparado ao grupo placebo. Dados apresentados em média±desvio padrão.

5.2 O tratamento com G-CSF reduz a retração sináptica após ARV.

A análise quantitativa da proteína sináptica sinaptofisina foi realizada no núcleo motor da medula espinal nos grupos placebo e tratado com G-CSF após ARV. A Figura 6 (A-D) mostra exemplos representativos de expressão de sinaptofisina em diferentes grupos. A análise quantitativa revelou que o tratamento de G-CSF preservou a expressão de sinaptofisina nas adjacências dos motoneurônios lesionados. Tais resultados indicam que o G-CSF tem um efeito importante na manutenção da estabilidade sináptica após ARV (placebo $0,54 \pm 0,04$; tratado com G-CSF $0,77 \pm 0,02$; razão média dos lados ipsi/contralateral da medula espinal $\pm$ erro padrão; $p < 0,01$; Figura 6-E).

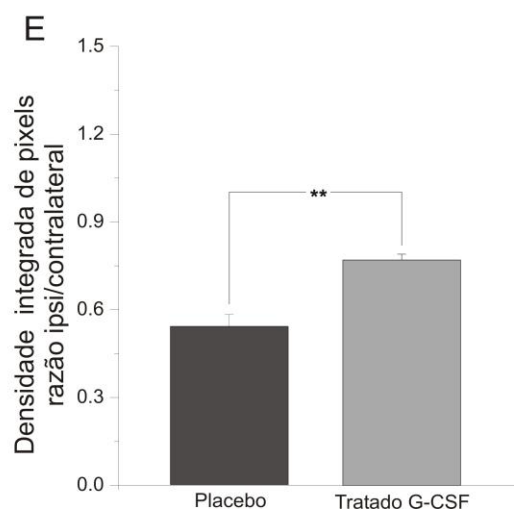
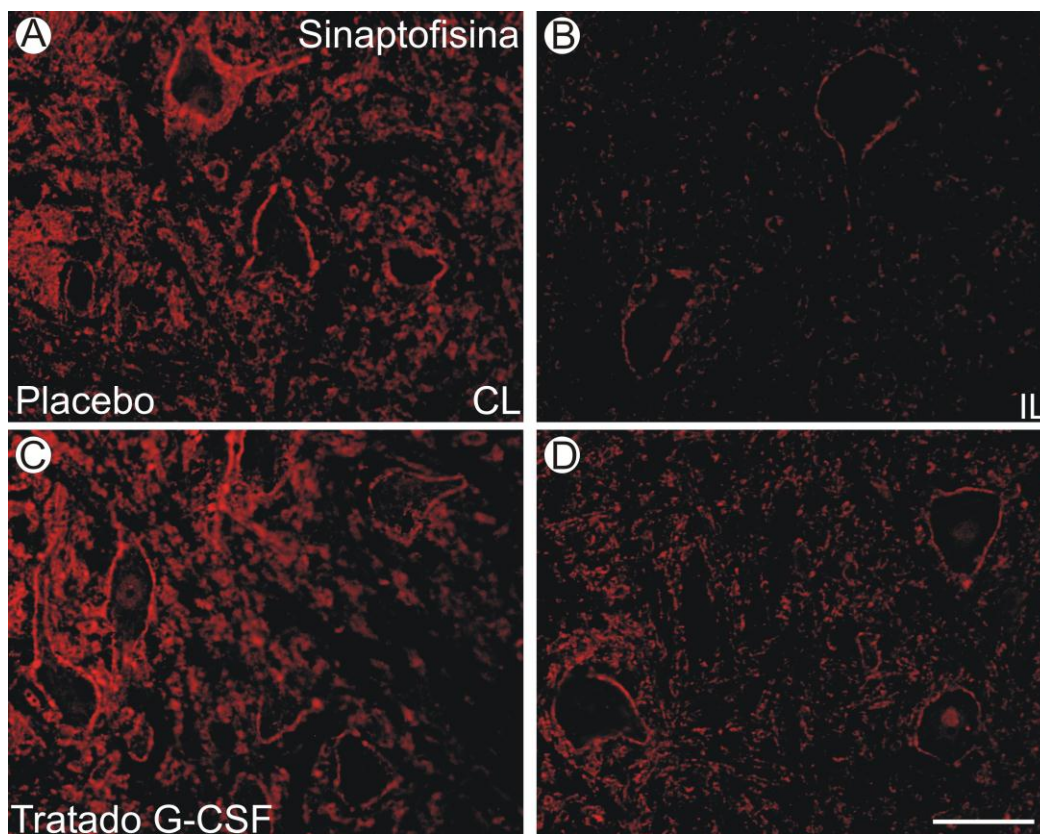


Figura 6: Imunomarcção anti- sinaptofisina no corno ventral da medula espinal. (A) Placebo contralateral (B) Placebo ipsilateral, (C) Tratado G-CSF contralateral e (D) Tratado G-CSF ipsilateral. (E) Gráfico representando a quantificação das imunomarcações para a razão dos lados ipsi/contralateral. Note-se a reduzida expressão de sinaptofisina no grupo Placebo. $p < 0,01$. Barra de escala 20 μ m.

5.3 O tratamento com G-CSF após ARV aumenta a reatividade astrogliar in vivo e in vitro.

A análise quantitativa mostrou um aumento da reatividade astrogliar em animais tratados com G-CSF após avulsão (placebo $1,55 \pm 0,05$; tratado com G-CSF de $2,03 \pm 0,09$; razão da média lado ipsi / contralateral $\pm$ erro padrão, $p < 0,01$, Figura 7).

No que diz respeito ao estudo *in vitro* (Figura 8 - A), houve aumento da proliferação de astrócitos durante os 3 dias de tratamento com G-CSF para as diferentes concentrações. A concentração de 100 ng/ml apresentou maior proliferação celular comparada às demais (placebo $1,24 \times 10^5 \pm 4,01 \times 10^4$; tratado com G-CSF 25ng/ml $2,09 \times 10^5 \pm 3,52 \times 10^4$; tratado com G-CSF 100ng/ml $2,82 \times 10^5 \pm 3,82 \times 10^4$; tratado com G-CSF 500ng/ml $2,24 \times 10^5 \pm 9,86 \times 10^4$, média $\pm$ erro padrão; $p < 0,05$; Figura 8-E). No gráfico F observa-se a reatividade astrogliar para as diferentes concentrações analisadas (placebo: $4,77 \times 10^5 \pm 5,66 \times 10^4$; G-CSF 25ng/ml: $5,17 \times 10^5 \pm 2,70 \times 10^4$; G-CSF 100 ng / ml: $5,38 \times 10^5 \pm 1,05 \times 10^4$; G-CSF 500ng/ml: $7,67 \pm 9,32 \times 10^5 \times 10^4$ média da densidade integrada de pixels $\pm$ erro padrão ; $p < 0,05$).

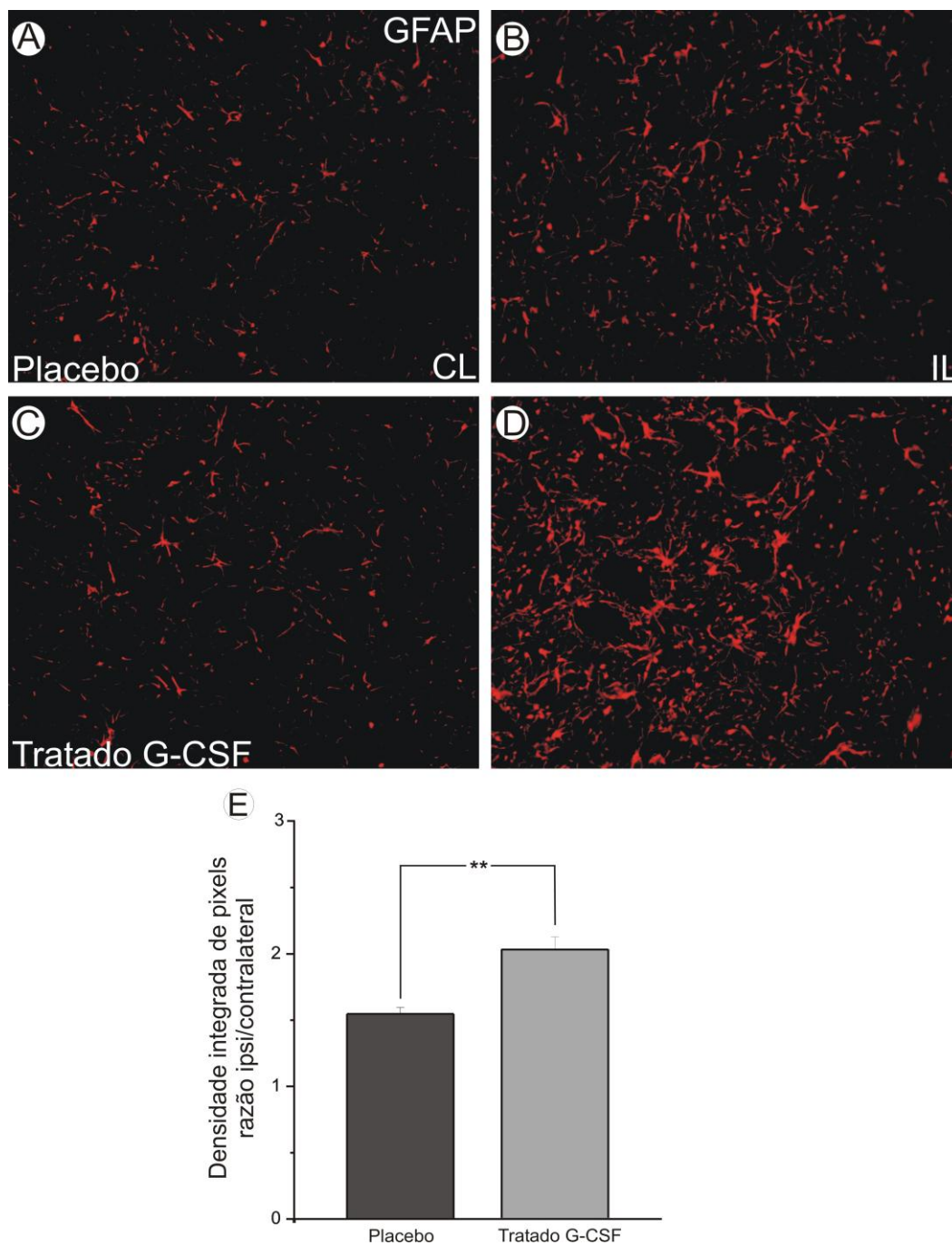


Figura 7: Imunomarcção para GFAP no corno ventral da medula espinal. (A) Placebo contralateral (B) Placebo ipsilateral, (C) Tratado G-CSF contralateral e (D) Tratado G-CSF ipsilateral. (E) Gráfico representando a quantificação das imunomarcações para razão dos lados ipsi/contralateral. Note aumentada reatividade astrogliar após tratamento. $p < 0,01$. Barra de escala = $20\mu\text{m}$.

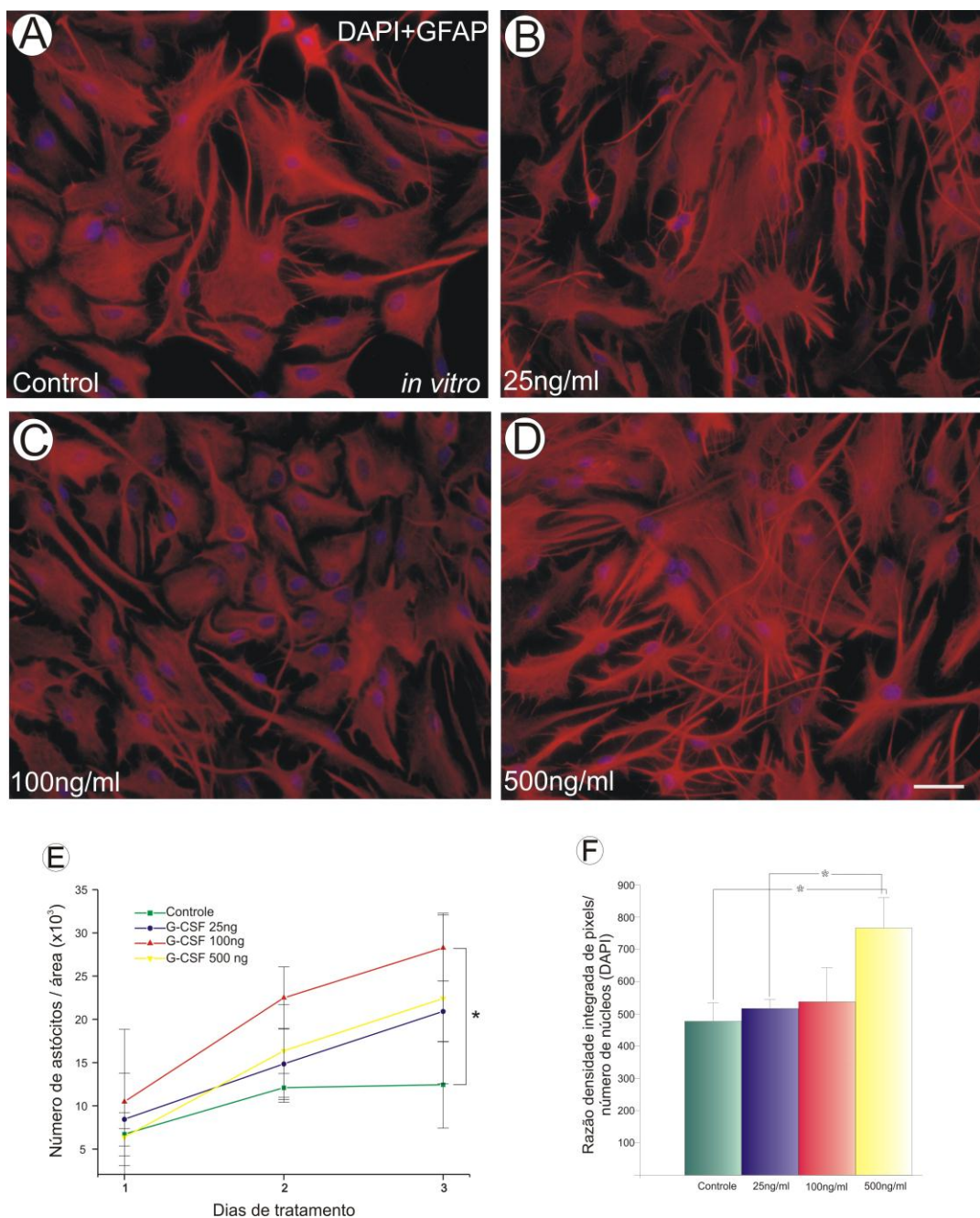


Figura 8: Cultura primária de astócitos tratados com diferentes concentrações de G-CSF, durante 3 dias. (A-D) Imunocitoquímica de astrócitos primários marcados com DAPI e anti- GFAP. (A) Grupo Controle, (B) 25 ng/mL, (C) 100 ng/mL e (D) 500 ng/mL. Os resultados mostraram aumento na taxa mitótica em astrócitos na presença de G-CSF. (E) Gráfico representando o crescimento celular. Note que a concentração de 100 ng/mL induziu maior proliferação celular. (F) Gráfico representando a densidade integrada de pixels da imunoreatividade anti- GFAP.

5.4 A reatividade da microglia não é afetada após tratamento com G-CSF.

A imunomarcção anti- Iba1 foi usada para avaliar o grau de reatividade da microglia nos grupos tratado e placebo. A Figura 9 mostra que a reatividade da microglia não foi alterada após o tratamento com G-CSF (Placebo $5,15 \pm 0,37$, Tratado com G-CSF $5,69 \pm 0,57$; razão ipsi/contralateral $\pm$ erro padrão).

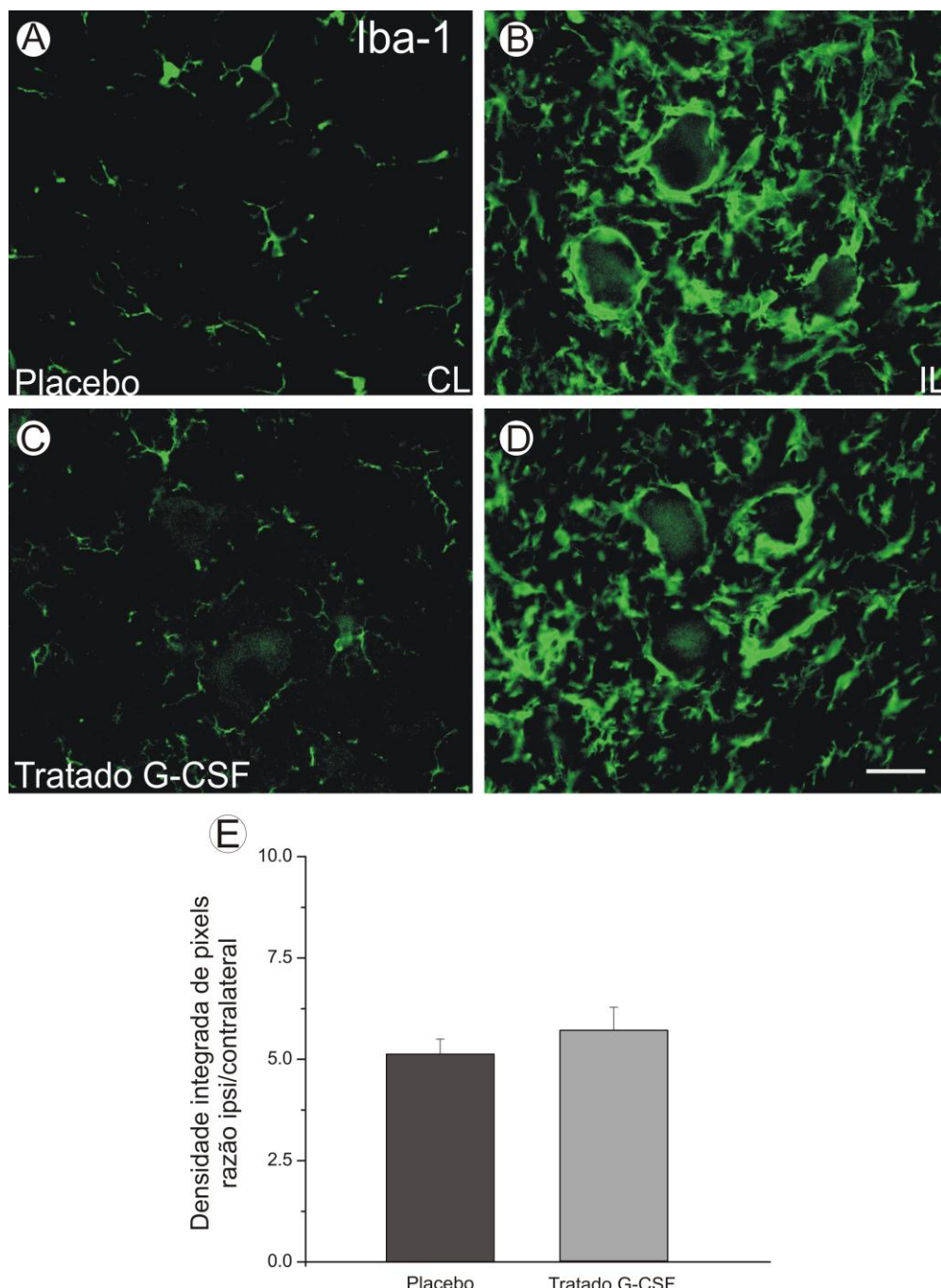


Figura 9: Imunomarcção anti- Iba-1 no corno ventral da medula espinal. (A) Placebo contralateral (B) Placebo ipsilateral, (C) Tratado G-CSF contralateral e (D) Tratado G-CSF ipsilateral. (E) Gráfico representando a quantificação das imunomarcações calculado através da razão dos lados ipsi/contralateral. Note que o tratamento não influenciou significativamente na reatividade microglial. Barra de escala = 20 μ m.

5.5 O tratamento com G-CSF reduz a perda sináptica após ARV.

A cobertura sináptica dos motoneurônios foi analisada através de microscopia eletrônica de transmissão. Algumas das alterações sinápticas observadas após a avulsão foram minimizadas após tratamento com G-CSF. A Figura 10 mostra que o grau de retração sináptica no grupo placebo foi maior comparado ao grupo tratado. A cobertura sináptica total dos neurônios ipsilaterais, no grupo placebo, diminuiu 48,72%, ao passo que a perda no grupo tratado foi de apenas 11,69% em relação aos seus correspondentes lados contralaterais (neurônios contralaterais grupo placebo: 45,78% $\pm$ 4,71%; neurônios ipsilaterais grupo placebo: 23,48% $\pm$ 0,94%, e neurônios contralaterais grupo tratado com G-CSF: 49,31% $\pm$ 4,20%, e neurônios ipsilaterais tratado com G-CSF: 41,24% $\pm$ 3,29%, porcentagem média de cobertura sináptica $\pm$ erro padrão, Figura 11). No lado lesado, o contato sináptico dos terminais / 100 μ m de membrana do motoneurônio, no grupo placebo, foi menor quando comparado com o grupo tratado. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos para os lados contralaterais (Placebo - lado contralateral: 42,68 $\pm$ 2,19; Placebo - lado ipsilateral: 19,25 $\pm$ 1,20; Tratado com G-CSF- lado contralateral: 39,50 $\pm$ 9,41; Tratado com G-CSF - lado ipsilateral: 36,00 $\pm$ 1,80; média $\pm$ erro padrão, Figura 11).

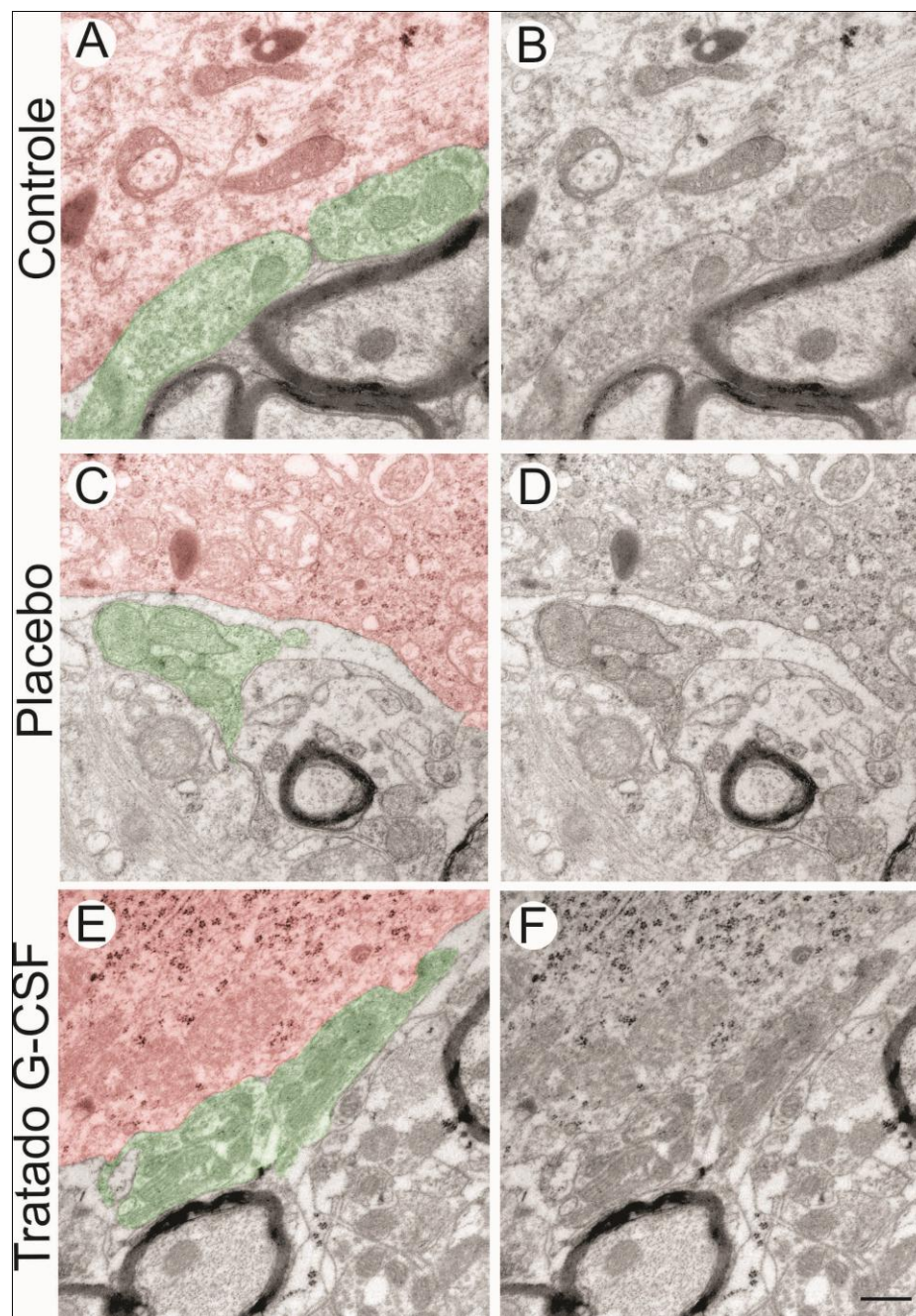


Figura 10: Fotomicrografias de transmissão do microambiente sináptico na superfície de motoneurônios presentes na coluna ventral da medula espinal. (A e B) Cobertura sináptica normal de um motoneurônio-alfa contralateral ao lado da lesão. (C e D) Exemplo representativo da superfície de motoneurônio em animal placebo, lado ipsilateral, mostrando destacados terminais sinápticos. (E e F) Exemplo representativo da superfície de animais tratados com G-CSF, lado ipsilateral. Barra de escala = 500nm.

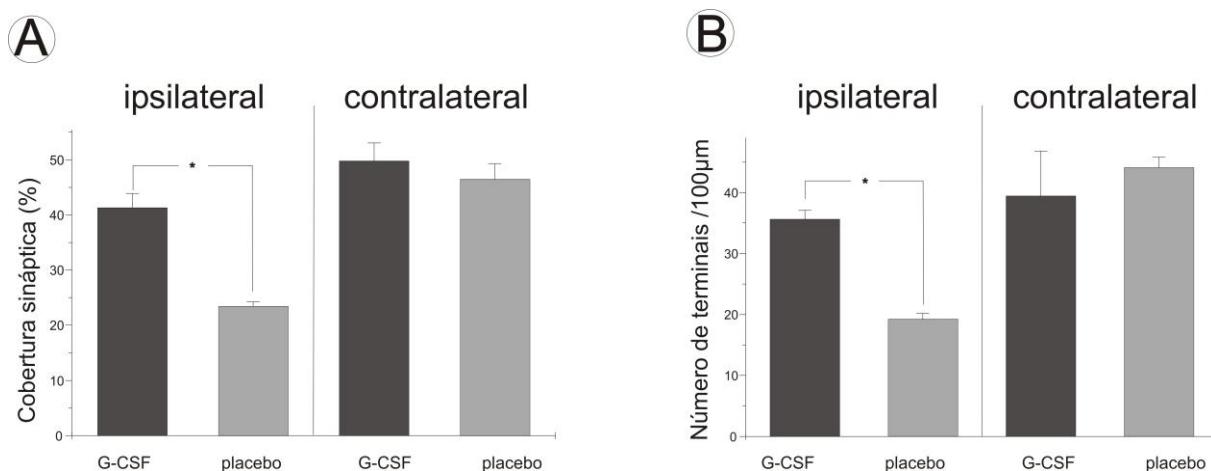


Figura 11: Análise ultraestrutural da cobertura sináptica de motoneurônios alfa medulares nos diferentes grupos analisados. (A) Análise quantitativa da cobertura sináptica total de motoneurônios. (B) Número de terminais/ 100 μm de membrana. Note, no grupo placebo, grande redução de terminais sinápticos em comparação ao grupo tratado com G-CSF. $p < 0,05$.

Adicionalmente às análises acima descritas, foi realizado um estudo dos diferentes tipos de terminais em aposição com a membrana dos motoneurônios amostrados, a fim de compreender melhor os efeitos positivos do G-CSF sobre os terminais inibitórios (F), excitatórios (S) e colinérgicos (C) (Figura 12). Assim, foi observado que o tratamento com o G-CSF preservou tanto os inputs excitatórios quanto os inputs inibitórios, comparativamente ao grupo placebo. Entretanto, esta preservação foi mais evidente para os terminais inibitórios (Figura 12 D e 12E).

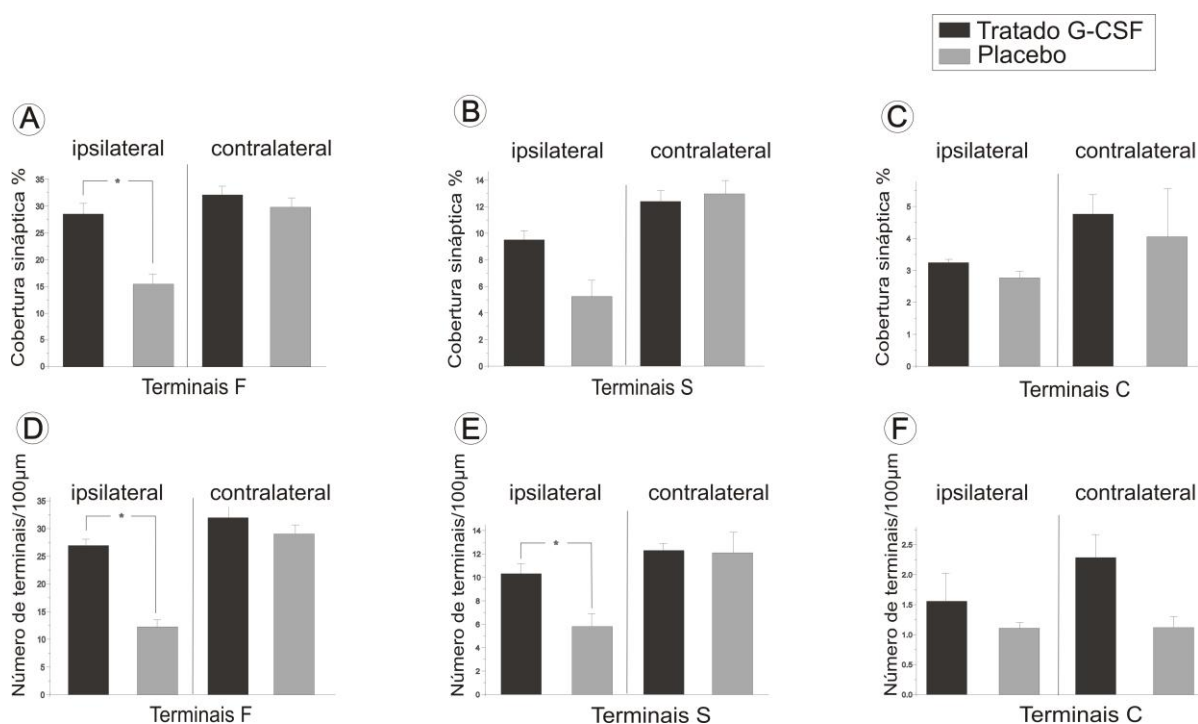


Figura 12: Análise dos terminais sinápticos baseada na morfologia das vesículas sinápticas. Análise quantitativa detalhada dos terminais F, S, C. (A-C) Cobertura sináptica. (D-F) Número de terminais/ 100µm de membrana dos motoneurônios. *=p<0,05.

5.6 Padrões de distribuição dos terminais sinápticos após ARV.

A Figura 13 representa o padrão de distribuição dos terminais sinápticos ao longo da superfície da membrana dos motoneurônios nos grupos experimentais Placebo e Tratado. Em neurônios normais (lado contralateral placebo e tratado), o intervalo entre os terminais foi geralmente curto, até 8 µm. Entretanto após ARV, o tamanho de tais intervalos no grupo placebo, lado ipsilateral aumentou para até 20 µm, resultando em uma diminuição da quantidade de espaços entre terminais. Já o lado ipsilateral do grupo tratado com G-CSF mostrou um padrão intermediário, evidenciando preservação parcial dos contatos sinápticos (Figura 13).

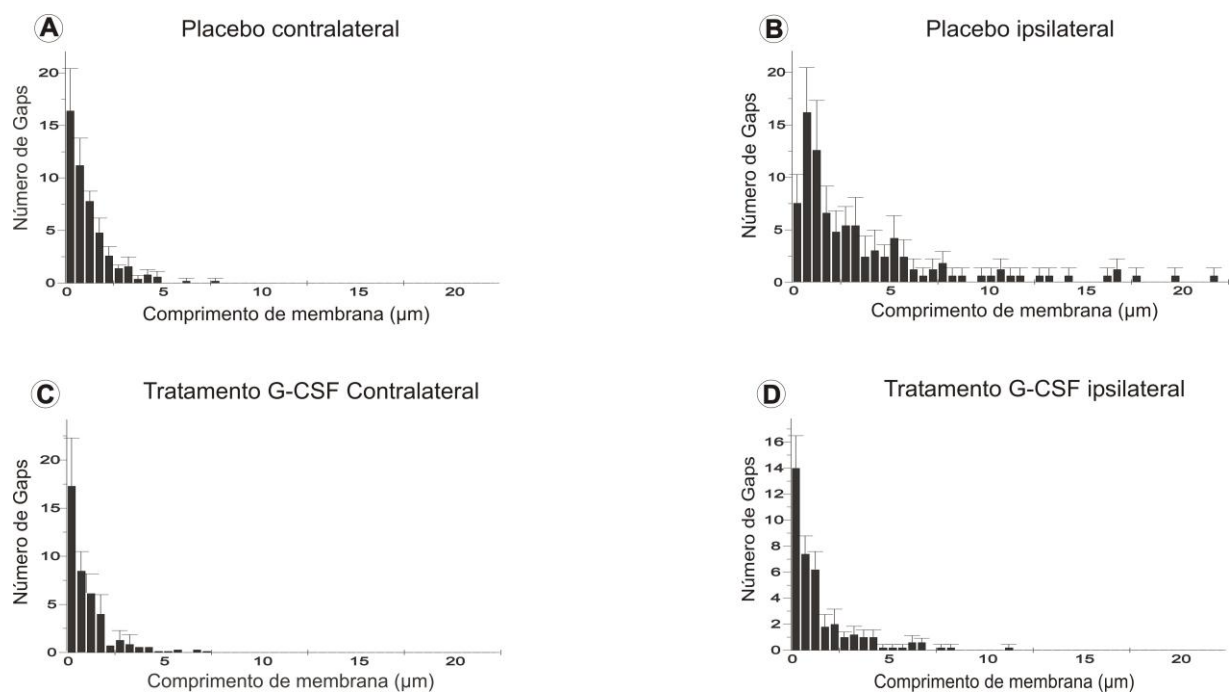


Figura 13: Distribuição de frequência dos terminais na superfície dos motoneurônios após ARV seguida de tratamento com placebo ou G-CSF. (A e C) Lados contralaterais mostram normal distribuição de intervalos entre os terminais pré-sinápticos. (B) O grupo placebo mostrou alta retração de terminais, resultando em diminuição da frequência de espaços entre inputs. (D) Note que o tratamento com G-CSF diminui a presença de grandes espaços entre os terminais, no lado ipsilateral.

6. Discussão

A avulsão de raízes ventrais é uma lesão proximal aos motoneurônios, na qual estas são desconectadas da superfície da medula espinal. Este tipo de lesão provoca graves processos degenerativos no corpo celular dos neurônios lesionados, de modo que cerca de 80% dessas células morrem dentro de duas semanas após a lesão (Koliatsos et al., 1994). Além destas alterações, os motoneurônios exibem alto grau de perda sináptica, principalmente dos contatos sinápticos excitatórios (Linda et al, 2000). Tal resposta trata-se de um mecanismo de sobrevivência do motoneurônio, em resposta à axotomia proximal, uma vez que tais estímulos podem ser excitotóxicos. Por outro lado, a perda sináptica extrema, após lesões dessa natureza, leva a maior impedimento da recuperação funcional (Kuno & Linas. 1970), de modo que há grande interesse clínico em minimizar ou reverter tal processo.

A avulsão do plexo braquial ou lombo-sacral em humanos está associada com acidentes de alta energia e com pacientes poli-traumatizados. Assim, o poli-traumatismo restringe os primeiros procedimentos de reparação, e a janela de duas semanas de sobrevivência dos motoneurônios geralmente termina antes que uma cirurgia de reimplante radicular possa ser realizada. Deste modo, o desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras para resgatar temporariamente tais motoneurônios é de grande importância e pode contribuir para um melhor resultado em termos de recuperação após a cirurgia reparadora tardia.

Trabalhos recentes trazem diferentes abordagens a fim de minimizar ou retardar a perda neuronal após lesões proximais de raízes nervosas. A utilização de fatores neurotróficos, tem provado ser positiva em vários casos (Li et al, 1995;. Oppenheim et al, 1995;. Zhou e Wu, 2006;. Eggers et al, 2010), porém poucos estudos têm abordado os mecanismos de

reestruturação dos circuitos medulares. Além disso, a administração de acetato de glatiramer, uma droga atualmente usada para tratar a forma remitente / recorrente da esclerose múltipla, resultou em neuroproteção, possivelmente devido ao aumento da expressão de BDNF, TGFP, IL-4 e IL-10 (Aharoni et al., 2003; Barbizan e Oliveira, 2010; Hammarberg et al, 2000;. Ziemssen et al, 2002). O uso de riluzole, um inibidor da liberação pré-sináptica do glutamato, é um outro exemplo de uma abordagem bem sucedida de fármaco neuroprotetor.

Diante desse cenário, o presente trabalho mostrou que o tratamento com G-CSF por 5 dias reduz cerca de 50 por cento da morte neuronal após ARV. Estes resultados indicam que os efeitos neuroprotetores da droga duram vários dias após o final da administração, o que é um diferencial em relação a outras substâncias, tais como o acetato de glatiramer, neurotrofina 3, que devem ser administrados diariamente (Nogradi et al, 2007;. Pintér et al, 2010). Além disso, a melhora da sobrevivência neuronal foi acompanhada por significativa preservação sináptica refletindo, portanto, uma melhor manutenção dos circuitos sinápticos medulares após lesão. Desse modo, tal medicamento poderia também ser aplicado em reimplantes de raízes posteriores, a fim de promover melhor recuperação funcional.

Juntamente com a preservação sináptica, o tratamento com G-CSF acarretou aumento da reatividade astrogliar, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estes resultados estão de acordo com uma possível ambígua função dos astrócitos após lesões no SNC. Assim, de um lado trabalhos mostram que os astrócitos reativos reduzem o número de sinapses (Emirandetti et al, 2006). No entanto, os astrócitos mais reativos podem também ser capazes de captar mais glutamato a partir do microambiente extracelular de motoneurônios lesados, reduzindo os possíveis efeitos excitotóxicos. De acordo com tal idéia, é possível que a ausência de

GFAP, em camundongos GFAP^{-/-}, esteja associada a uma diminuição da regulação dos transportadores de glutamato, tais como EAAT1/GLAST (glutamato / aspartato de transportador). Outros exemplos de diminuição da sobrevivência neuronal e aumento da sensibilidade à lesão cerebral podem ser encontrados em estudos com camundongos GFAP^{-/-} (Nawashiro et al, 1998 e 2000; Tanaka et al, 2002; Otani et al, 2006). Diante de tal fato, sugere-se que o G-CSF seja capaz de estimular a reação astrogliar de um modo neuroprotetor, contribuindo para a sobrevivência neuronal e estabilidade sináptica.

A microglia é outro tipo de célula glial que está intimamente relacionada com a plasticidade sináptica após lesão. O aumento da reatividade da microglia ocorre logo após a lesão no SNC e pode ser mantida por longos períodos. No entanto, no presente estudo, o tratamento com G-CSF não modificou a resposta da microglia após avulsão, que por sua vez aumentou igualmente para o grupo tratado e placebo. Esta observação, portanto, reforça o papel preponderante dos astrócitos durante a fase aguda pós-avulsão e o fato da preservação sináptica aqui descrita poder estar relacionada com a estabilização do microambiente circundante aos neurônios lesionados.

A preservação sináptica observada na análise ultraestrutural confirmou a análise de expressão de sinaptofisina, indicando conservação da cobertura sináptica de cerca de 80% em motoneurônios avulsionados. No que diz respeito ao número de terminais por 100 µm membrana de superfície dos motoneurônios, os resultados não mostraram diferenças significativas entre os lados ipsi e contralateral dos animais tratados com G-CSF. Tendo em conta que o tratamento foi realizado apenas durante os 5 primeiros dias após a lesão, considera-se que o G-CSF desempenhou um papel neuroprotetor bastante eficiente,

comparável ou superior à de outras substâncias, tais como o acetato de glatiramer e o gangliosídeo GM-1.

Em relação à análise dos terminais sinápticos F-, S- e C-, o G-CSF foi mais eficaz na preservação de sinapses inibitórias. Isto é particularmente importante, uma vez que se evita a excitotoxicidade do glutamato, e está de acordo com os dados discutidos anteriormente em relação à astrogliose, tanto *in vivo* como *in vitro*. Além disso, outro efeito positivo do tratamento com G-CSF foi observado na distribuição de frequência dos terminais ao longo da membrana dos motoneurônios. Nos animais tratados, pode-se observar distribuição de frequência semelhante ao padrão normal, ou seja, semelhante aos lados contralaterais dos neurônios. Tal fato indica que a preservação dos terminais após o tratamento visa a manutenção das sinapses em grupos, o que parece ser uma organização mais eficiente dos inputs.

Em resumo, os dados aqui apresentados demonstram que a administração de G-CSF por cinco dias, logo após a lesão, reduz a degeneração dos motoneurônios após avulsão. Tal efeito deve-se ao aumento da estabilidade dos circuitos sinápticos e à maior sobrevivência neuronal.

7. Conclusões

- O tratamento com G-CSF promove preservação dos contatos sinápticos e sobrevivência dos motoneurônios medulares após avulsão.
- O tratamento com G-CSF aumenta a reatividade astrogliar tanto *in vitro* quanto *in vivo*.
- O tratamento com G-CSF não interfere na reatividade da micróglia.

CAPÍTULO II

Efeitos opostos do receptor Toll like 2 e 4 na estabilidade sináptica e reatividade glial após axotomia periférica.

1. Resumo

As células da glia são responsáveis por intermediar a interação entre o Sistema Nervoso (SN) e o Sistema Imune (SI). Recentes estudos têm demonstrado que estas células expressam receptores do tipo Toll (TLRs) e podem interferir no processo de plasticidade no SNC. Assim, o presente estudo teve o objetivo de analisar a influência do receptor Toll like 2 e Toll like 4 na reatividade glial e na dinâmica das sinapses em aposição aos motoneurônios medulares de camundongos após lesão nervosa periférica. Para tal objetivo foram utilizados camundongos selvagens C3H/HePas, camundongos mutantes C3H/HeJ, camundongos C57BL/6J selvagens para TLR2 e camundongos knockout para TLR2. Todos os animais foram submetidos à transecção unilateral do nervo isquiático e sacrificados por meio de perfusão transcardíaca. As medulas espinais foram processadas para imunoistoquímica, microscopia eletrônica de transmissão (MET), cultura celular, Western blotting e RT-PCR. As culturas primárias de astrócitos foram derivadas de encéfalos extraídos de animais neonatos TLR2 normais e knock out e TLR4 normais e mutantes com 2 dias de nascimento. Os resultados mostraram que a expressão de TLR2 e TLR4 no SNC pode ter efeitos opostos sobre a estabilidade dos terminais pré-sinápticos na medula espinal. Desse modo, a presença do receptor TLR4 contribuiu para a preservação sináptica dos terminais em justaposição com os motoneurônios lesionados após lesão periférica, independentemente da expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I). Além disso, apesar de não haver diferenças morfológicas significativas na

reatividade glial, foi possível observar aumento nos níveis de RNAm para GDNF e diminuição de IL6. Já o receptor TLR2 induziu maior perda sináptica, correlacionando-se com aumento da astrogliose e da expressão de interleucinas pró-inflamatórias. Além disso, a ausência do receptor Toll Like 2 resultou no aumento da expressão de fatores neurotróficos e de MHC I. Desse modo, concluí-se que o TLR4 e TLR2 no SNC podem ter efeitos opostos sobre a estabilidade dos terminais pré-sinápticos na medula espinal, assim como na reação astrogliar, indicando possíveis funções destas proteínas nas respostas neuronais e gliais após lesão.

2. Introdução

As lesões de nervos periféricos levam à inflamação local e retrógrada, resultando em alterações sinápticas no SNC. Os mecanismos que desencadeiam tais mudanças não são completamente compreendidos, mas é evidente que as moléculas classicamente relacionadas com o sistema imune são fundamentais para tais eventos. Neste sentido, a expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I) por neurônios e células gliais tem sido implicado no processo de eliminação sináptica durante o desenvolvimento e após lesão em adulto (Huh et al., 2000; Oliveira et al., 2004). Mais recentemente, as moléculas da via clássica do complemento também mostraram importante papel no processo de refinamento dos circuitos neuronais e na resposta à lesão de nervo periférico (Fourgeaud et al., 2007). O modelo clássico de lesão periférica tem sido amplamente utilizado com a finalidade de aprofundar a compreensão dos mecanismos

subjacentes à eliminação de sinapses e das interações entre neurônios e células gliais após lesão (Aldskogius et al., 1999; Oliveira et al., 2004; Emirandette et al., 2006). Outra classe de moléculas do sistema imune inato que podem desempenhar papel importante na plasticidade sináptica são os receptores de tipo Toll (TLR). TLRs são proteínas transmembrana que desempenham papéis críticos como receptores de reconhecimento de padrões, sendo expressos por macrófagos, microglia (Lehnardt et al., 2002; Lehnardt et al., 2003; Lehnardt et al., 2010) , astrócitos (Jack et al., 2005; Henn et al., 2011), células de Schwann (Goethals et al., 2010), e neurônios (Tang et al., 2007). Os TLRs contribuem para a indução inicial de neuroinflamação no SNC, que é predominantemente modulada pela microglia e astrócitos (Lehnardt et al., 2010; Tang et al., 2007; Bowman et al., 2003; Olson et al., 2004). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que TLR4 é principalmente expresso por microglia (Lehnardt et al., 2002; Lehnardt et al., 2003). Já os TLR2 podem ser expressos tanto por microglia (Henn et al., 2010) quanto por astrócitos (Bowman et al., 2003; Phulwani et al., 2008). Assim, as células gliais têm tido importante papel na remodelação do SNC após lesão. Neste sentido, a transecção do nervo periférico em adultos resulta em astrogliose e reação microglial (Aldskogius et al., 1999) e consequentemente eliminação sináptica nas adjacências dos motoneurônios alfa. Com base em observações ultraestruturais, parte das sinapses inibitórias contendo glicina e GABA são seletivamente mantidas em justaposição com os motoneurônios lesionados. Por outro lado, a maioria dos terminais pré-sinápticos excitatórios sofre retração pela interposição de processos gliais entre os terminais e a membrana pós-sináptica. (Lindã et al., 2000). Há evidências que o grau de reação glial, bem como as moléculas de superfície que são expressas pelas células da glia possam influenciar na estabilidade dos circuitos neuronais e no resultado do processo

regenerativo (Oliveira et al., 2004; Aldskogius et al., 1999; Cullheim & Thams, 2007; Schiefer et al., 1999). Tendo em conta as alterações profundas nos circuitos da medula espinal após uma lesão periférica, é possível que os TLRs estejam envolvidos através da sinalização por glia e/ou neurônios. Logo, como consequência, os TLRs podem estar envolvidos na estabilidade sináptica diretamente ou através da modulação da reatividade glial. Com base em tais possibilidades, o presente estudo investigou o processo de plasticidade sináptica na medula espinal de camundongos mutantes para TLR4 e knockout para TLR2 após axotomia periférica.

3. Objetivos Específicos

- Avaliar a imunoreatividade anti-sinaptofisina em camundongos C3H/HePas, C3H/HeJ, C57BL/6J e TLR2^{-/-};
- Analisar, por microscopia eletrônica transmissão, às alterações sinápticas induzidas pela axotomia na ausência de TLR2 e deficiência de TLR4;
- Avaliar os níveis de expressão de MHC classe I em camundongos C3H/HePas; C3H/HeJ; C57BL/6J e TLR2^{-/-};
- Avaliar a reatividade astrogliar através da imunomarcagem de GFAP em camundongos C3H/HePas, C3H/HeJ, C57BL/6J e TLR2^{-/-};
- Avaliar a proliferação celular astrogliar em animais TLR4 e TLR2 por meio da técnica de incorporação de BrdU *in situ*.
- Avaliar a reatividade microglial através da imunomarcagem de Iba-1 em camundongos C3H/HePas, C3H/HeJ, C57BL/6J e TLR2^{-/-};

- Avaliar quantidade de mRNA transcripto para os genes GDNF e BDNF para os animais C3H/HePas, C3H/HeJ, C57BL/6J e TLR2^{-/-};
- Avaliar a quantidade de mRNA transcripto para as interleucinas pró-inflamatórias IL1 β e IL6 em animais C3H/HePas, C3H/HeJ, C57BL/6J e TLR2^{-/-}.

4. Materiais e Metodos

4.1 Grupos de animais

Para a análise *in vivo* foram utilizados camundongos adultos machos (6-8 semanas de idade) obtidos a partir do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB / Unicamp): C3H/HePas (selvagem, n = 20), C3H/HeJ (TLR 4 mutante, n = 20), C57BL/6J (selvagem, n = 20) e C57BL/6J TLR2^{-/-} (knockout n = 20). Os camundongos mutantes C3H/HeJ apresentam mutação no domínio citosólico do receptor TLR-4, expressando, portanto, um receptor não-funcional (Poltorak et al., 1998). O estudo foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Experimentação Animal aprovou (CEUA / IB / Unicamp, proc. 1656-1) e toda a habitação, cuidados cirúrgicos e pós-operatórios foram realizados de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Para a análise da imunoreatividade anti-sinaptofisina em neonatos foram utilizados 12 camundongos: C3H/HePas (selvagem, n = 3), C3H/HeJ (mutante, n = 3), C57BL/6J (selvagem, n = 3) e C57BL/6J TLR2^{-/-} (knockout n = 3), todos com 7 dias de vida.

Para a análise *in vitro* foram utilizados 20 animais neonatos com 2 dias de nascimento (C3H/HePas n=5, C3H/HeJ n=5, TLR2^{-/-} =5 e C57BL/6J n=5). As culturas primárias de

astrócitos foram preparadas a partir dos córtices cerebrais, segundo metodologia de McCarthy & Vellis (1980).

4.2 Procedimentos cirúrgicos

Todos os camundongos adultos foram submetidos à transecção do nervo isquiático esquerdo sob anestesia com Kensol (xilazina, Koning, 10 mg / kg) e Vetaset (cetamina, Fort Dodge, 50 mg / kg). Após a tricotomia da face posterior da coxa esquerda, foi realizada uma incisão da pele (aproximadamente 1,5 cm de comprimento) na região média da coxa, utilizando-se um bisturi. A pele e a musculatura da coxa foram cuidadosamente afastadas, expondo-se o nervo isquiático. Para a realização da transecção do nervo foi utilizada uma microtesoura, sendo removido um segmento de 2mm do coto distal do nervo, no intuito de evitar o contato entre os cotos proximal e distal. Após procedimento cirúrgico os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Regeneração Nervosa/ Unicamp até a realização dos experimentos.

4.3 Processamento dos tecidos

Uma semana após lesão, todos os animais foram sacrificados com super dose de anestésico e, em seguida, submetidos à perfusão transcardíaca. As intumescências lombares processadas para imunoistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão obedeceram o protocolo anteriormente citado para tais técnicas. Para as técnicas de Western blotting e RT-PCR, os animais foram perfundidos com solução salina (NaCl 0,9% em tampão fosfato

de sódio, pH 7,4). Posteriormente, 3 mm da intumescência lombar foram dissecados, separados os lado ipsi e contralateral e congelados em nitrogênio líquido.

4.4 Imunistoquímica

Os anticorpos utilizados em imunoistoquímica foram rato anti-MHC classe I (1:100, MHC-I 2105, Peninsula, CA, USA), coelho anti-sinaptofisina (1:100, Dako, CA, USA), cabra anti-GFAP (1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e coelho anti-Iba1 (1:700, Wako Chemicals USA, Richmond, VA, USA). As imunomarcações para sinaptofisina, GFAP e Iba-1 seguiram o protocolo anteriormente citado.

Para a imunomarcação de MHC I, as lâminas climatizadas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em TBS 5% Tween e, em seguida, foi realizada uma pós fixação, por 30 segundos, com acetona a -20°C para melhor exposição dos epítomos (de acordo com a bula do fabricante). Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos em TBS 5% Tween e bloqueio com TBS-T a 3% BSA por 60 minutos. Após este período as lâminas foram incubadas em câmara úmida com 70µl de solução contendo anticorpo primário anti-MHC classe I 1:100 em TBS 5% Tween a 1% BSA por 3 horas. Após 3 séries de lavagens de 5 minutos em TBS 5% Tween, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (1:250) conjugado com cianina 3 (CY-3) (Jackson Lab., USA) por 60 minutos. Os espécimes foram lavados em TBS 5% Tween, montados em glicerol/PBS 0,1M (3:1) e observados em microscópio de fluorescência, utilizando-se os filtros para rodamina (CY-3).

4.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Um total de 80 motoneurônios foram estudados (quatro neurônios por animal, n = 5 por grupo) para os quatro genótipos de camundongos. Para cada neurônio, foi calculado o número de terminais sinápticos por 100 µm de membrana celular e o percentual de cobertura sináptica por comprimento de membrana, usando a ferramenta de medição do software ImageTool (versão 3.0, The University of Texas Health Center, em Santo Antonio, TX).

4.6 Western Blotting

Para quantificar a proteína sinaptofisina e MHC I, 3mm das intumescências lombares (lados ipsi e contralateral) foram utilizados. As amostras foram então sonicadas durante 1 min em tampão de extração de proteína RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 8,0, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, 0,5% de ácido Na-desoxicolato, 0,1% de SDS e 1% de Triton X-100). A concentração total de proteína foi determinada utilizando o ensaio Bio-Rad de proteínas de Bradford. O Western blotting foi realizado após a eletroforese de 40-60 µg de proteína em cada amostra de tecido em um gel de poliacrilamida a 10% sob condições redutoras. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Höefer) para membranas de nitrocelulose (Hybond-ECL; Amersham Biosciences, Chalfont St. Giles, Reino Unido) sob corrente constante de 400mA em cuba refrigerada. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em TBS-T por uma hora sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida foram incubadas com leite desnatado a 1% em TBS-T contendo o anticorpo anti-MHC I na diluição de 1:1000 e anti-sinaptofisina na diluição de 1:1000. A

seguir, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase na diluição de 1:2500 por 45 minutos. Após nova série de lavagens, a atividade peroxidásica foi revelada através do emprego de luminol (sc-2048, Santa Cruz Biotechnology). Para a exposição e digitalização das bandas foi utilizado o sistema de captura Syngene G-Box. A intensidade de marcação obtida foi determinada por densidade integrada de pixels das bandas, utilizando o programa Image J (NIH, EUA). O controle de pipetagem das proteínas foi realizado com o anti-corpo beta-actina (policlonal, 1:1000, Abcam, EUA).

4.7 Detecção de diferentes citocinas inflamatórias por Elisa-Array

Após a perfusão com solução salina tamponada, as intumescências lombares dos camundongos axotomizados C3H/HePas e C3H/HeJ (n=4/grupo) foram retiradas e dissecadas, sendo os lados ipsi e contralateral da medula separados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultra-freezer (-80⁰C) até a utilização. Aproximadamente 3mm da intumescência foram utilizados para fazer o extrato protéico. Estas amostras foram pesadas e homogeneizadas em solução (RPMI+10% soro fetal bovino) 9ml/g de tecido, usando um ultrassom de ponta. O homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 4⁰C. O sobrenadante foi aplicado imediatamente na placa Elisa-Assay.

A metodologia aplicada seguiu as orientações segundo o fabricante do Kit- Mouse Inflammatory Cytokines Multi-Analyte ELISArray (SABioscience). A leitura da placa foi realizada em um leitor de Elisa com absorbância de 450 nm dentro de 30 minutos. As

citocinas analisadas foram: IL1A; IL1B; IL2; IL4; IL6; IL10; IL12; IL17A; INF alfa; TNF α ; G-CSF; GM-CSF. A leitura forneceu valores em absorbância, sugerindo quais citocinas foram alteradas nos grupos analisados. A partir desta análise foi realizada a técnica de RT-PCR para a quantificação de mRNA dos genes inflamatórios expressos na medula espinal após axotomia periférica do nervo isquiático.

4.8 RT-PCR

A quantificação dos genes de interesse β 2-microglobulina (cadeia pesada que compõe a molécula MHC I) , IL-6, IL-1 β , BDNF e GDNF foi determinada de forma relativa, sendo normalizada com relação a genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. Assim, os níveis de expressão relativa do RNAm alvo foram normalizados de acordo com o controle endógeno GAPDH. A expressão foi avaliada com base no gene constitutivo (GAPDH) e no calibrador, constituído pelo lado contralateral da intumescência lombar de camundongos C57BL/6J (selvagem) e TLR2^{-/-} (knockout), C3H/HePas (selvagem), C3H/HeJ (mutante), submetidos à axotomia nervo isquiático esquerdo, a partir do Ct destes grupos para cada gene testado. As amostras foram sonicadas durante 30 segundos e, em seguida, o RNA total foi extraído usando o reagente Ribozol, de acordo com as instruções do fabricante (Amresco, EUA).

O RNA obtido foi purificado utilizando um kit comercial (RNeasy Mini Kit-Qiagen). Cada uma das amostras (1 μ g) de RNA foi reversamente transcrito usando um kit comercial (AffinityScripts QPCR Kit de Síntese de ADNc, Agilent Technologies, La Jolla, CA, EUA)

num volume de reação final de 20 μ L. O RT-PCR foi realizado utilizando o sistema SYBR Green Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies), após uma desnaturação inicial de 10 min a 95 ° C, seguida de 45 ciclos de amplificação (95 ° C durante 30 s, seguidos de 72 ° C durante 1 min). As reações foram realizadas com 12,5 μ L de 2 $\times$ SYBR Green PCR mix mestre (Agilent Technologies), 0,2 μ M de cada primers forward e reverse e 50 ng de de cDNA num volume de reacção final de 20 μ L. As análises de curva de fusão foram realizadas no final da PCR, para verificar a identidade dos produtos. Curvas de fusão foram obtidas a 95 ° C durante 60s e 55 ° C durante 30 s. Todas as quantificações foram normalizados para o gene GAPDH. Um controle sem material genético foi incluído para identificar eventual contaminação e reacções inespecíficas. Cada uma das amostras (n = 4) foi testada em triplicata e em seguida utilizada para a análise dos dados relativos de transcrição, $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Os dados estão expressos como a razão ipsilateral/contralateral, adotando o lado não lesionado de cada genótipo como 100%. Abaixo encontram-se listados os primers forward (F) e reverse (R) utilizados neste trabalho (Tabela 2):

β 2-microglobulin	(F):5'ATGGCTCGCTCGGTGACCCTG 3'
	(R):5' CCGGTGGGTGGCGTGAGTATACTT 3'
GAPDH	(F): 5' TGCACCACCAACTGCTTA 3'
	(R): 5' GGATGCAGGGATGATGTTC 3'
IL6	(F): 5'AGTGGCTAAGGACCAAGACCATCCA 3'
	(R): 5'GGCATAACGCACTAGGTTTGCCGA 3'
IL1- β	(F): 5'GAGCTTGACGGCACCCCTCGC 3'
	(R): 5' AGCTTCGTGGCTGTGGAAAAAGTGT 3'
BDNF	(F): 5' CACTCCGACCCTGCCCCGC 3'
	(R): 5' CCCGCCAGACATGTCCAC 3'
GDNF	(F): 5' TGCCCGCCGGTAAGAGGCTT 3'
	(R): 5' TGGAGTCACTGGTCAGCGCGAA 3'

Tabela 3: Primes utilizados na técnica RT-PCR.

4.9 Cultura Celular

Culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir de células extraídas do córtex cerebral de camundongos C3H/HePas, C3H/HeJ, C57BL/6J e TLR2^{-/-} de acordo com o método utilizado por McCarthy & Vellis (1980) e protocolo descrito anteriormente.

4.10 Ensaio de proliferação celular e imunocitoquímica

Para o ensaio de proliferação, as células foram expostas a 50 μ M BrdU por 24h, 48h e 72h e em seguida fixadas nos respectivos períodos em 4% de paraformaldeído em PBS por 10 minutos. Após 3 lavagens em PBS, foram incubadas 10 minutos em PBS 0,2% de Triton X em temperatura ambiente. A seguir foram feitas 3 lavagens em PBS 0,1% Triton e a placa foi exposta a 1 hora de bloqueio em PBS 0,1% Tween 5% BSA a 4⁰C. Retirado o bloqueio, as células foram incubadas por 1 hora e 20 minutos a 37⁰C em anticorpo primário (anti-BrdU 1:100 abcam 6326-250) diluído em tampão bloqueio com 50U/ml de DNase. Após 3 lavagens de PBS 0,1% Tween, as células foram incubadas por 45 minutos a 37⁰C em anticorpo secundário conjugados com cianina 3(CY-3) (Jackson Lab., USA). Coloração com DAPI foi realizada em seguida, para se evidenciar os núcleos das células.

Para a realização da imunocitoquímica, as células, pós-fixadas em paraformaldeído 4% (em PBS 0,1M), foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em TBS 5% Tween, sendo posteriormente incubadas com TBS 5% Tween a 3% BSA por 60 minutos. Após este período a placa foi incubada com 100 μ l de anticorpo primário anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) em TBS 5%, Tween 1% e BSA, por 2 horas. A seguir a placa foi lavada 3 vezes por 5 minutos em TBS 5% Tween. Em sequência à primeira incubação, as placas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com cianina 3(CY-3) (Jackson Lab., USA) por 45 minutos. Para quantificação foi utilizado o software IMAGE J (versão 1.33U, National Institute of Health, USA). Para as marcações anti-GFAP, 4 regiões representativas de cada poço foram documentadas para a quantificação por densidade integrada de pixels.

A média aritmética foi calculada para cada cultura, sendo feita uma razão em relação aos núcleos marcados com DAPI.

4.11 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor $p < 0,05$ (*). Os dados foram submetidos a análise de variância de uma via, seguida do teste post hoc de Bonferroni para os dados paramétricos ou teste U de Mann-Whitney para dados não-paramétricos, utilizando-se do software Prisma 4.0.

5. Resultados

5.1 TLR2 e TLR4 apresentam efeitos opostos sobre a plasticidade sináptica após lesão nervosa periférica

Após lesão do nervo periférico, os receptores Toll like-2 e Toll like-4 apresentam efeitos opostos sobre a plasticidade sináptica. Para avaliar as mudanças na cobertura sináptica após lesão periférica, as secções da medula espinal foram imunomarcadas com anticorpo anti-sinaptofisina. A imunomarcção da proteína sinaptofisina revelou significativa redução da cobertura sináptica em camundongos C57BL/6J comparado aos animais knockout (C57BL/6J, $0,30 \pm 0,02$; TLR2^{-/-}, $0,46 \pm 0,01$; ipsilateral / contralateral relação de lados, $p < 0,001$, Figura 14-E). Por outro lado, a presença do receptor Toll like 4

preservou a cobertura sináptica após lesão. Na Figura 15 B e D, observa-se maior preservação sináptica no lado lesionado de animais selvagens comparado aos mutantes (C3H/HePas, $0,56 \pm 0,03$; C3H/HeJ, $0,26 \pm 0,04$; razão ipsilateral / contralateral; $p < 0,001$, Figura 15-E). Semelhante aos resultados de imunomarcação *in situ*, a análise de Western blotting mostrou maior preservação de cobertura sináptica no lado lesado de animais knockout para TLR2 (contralateral: C57BL/6J, $2,54 \pm 0,73$, TLR2^{-/-}, $3,40 \pm 0,13$, $p > 0,05$; ipsilateral: C57BL/6J, $1,75 \pm 0,3$; TLR2^{-/-}, $2,62 \pm 0,20$, $p < 0,05$, Figura 14 F). Porém, em animais TLR4 o WB não mostrou diferenças significativas (contralateral: C3H/HePas $1,18 \pm 0,18$; C3H/HeJ $1,10 \pm 0,32$, $p > 0,05$; ipsilateral: C3H/HePas $0,92 \pm 0,22$; C3H/HeJ $0,80 \pm 0,20$, $p > 0,05$; Figura 15 F).

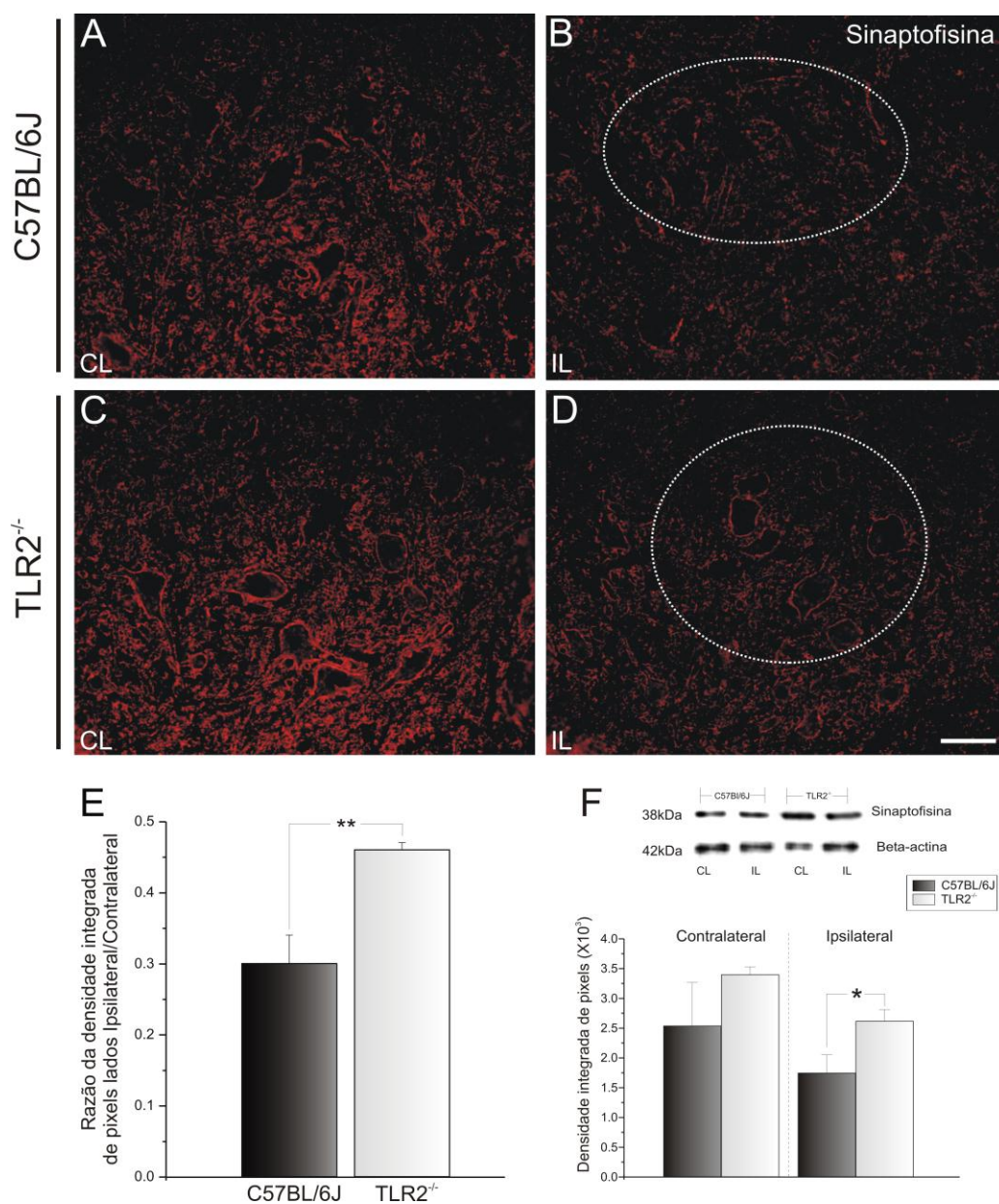


Figura 14: Imagens representativas da imunomarcção anti-sinaptofisina em C57BL/6J e TLR2^{-/-}, 1 semana após axotomia unilateral. Após lesão, observa-se uma forte perda da marcação, especialmente nas áreas em torno dos neurônios motores. Esta redução foi mais intensa nos camundongos C57BL/6J (B) comparado aos TLR2^{-/-} (D). O círculo pontilhado indica o núcleo motor contendo os neurônios motores alfa. (E) Gráfico representando a razão da densidade integrada de pixels ipsilateral/contralateral ** P < 0,01. (F) A análise de Western blot da expressão de sinaptofisina em camundongos C57BL/6J e TLR2^{-/-}. Note maior preservação sináptica em TLR2^{-/-} após axotomia periférica. β -actina foi utilizada como controle de pipetagem. * P < 0,05. Barra de escala: 50 μ m.

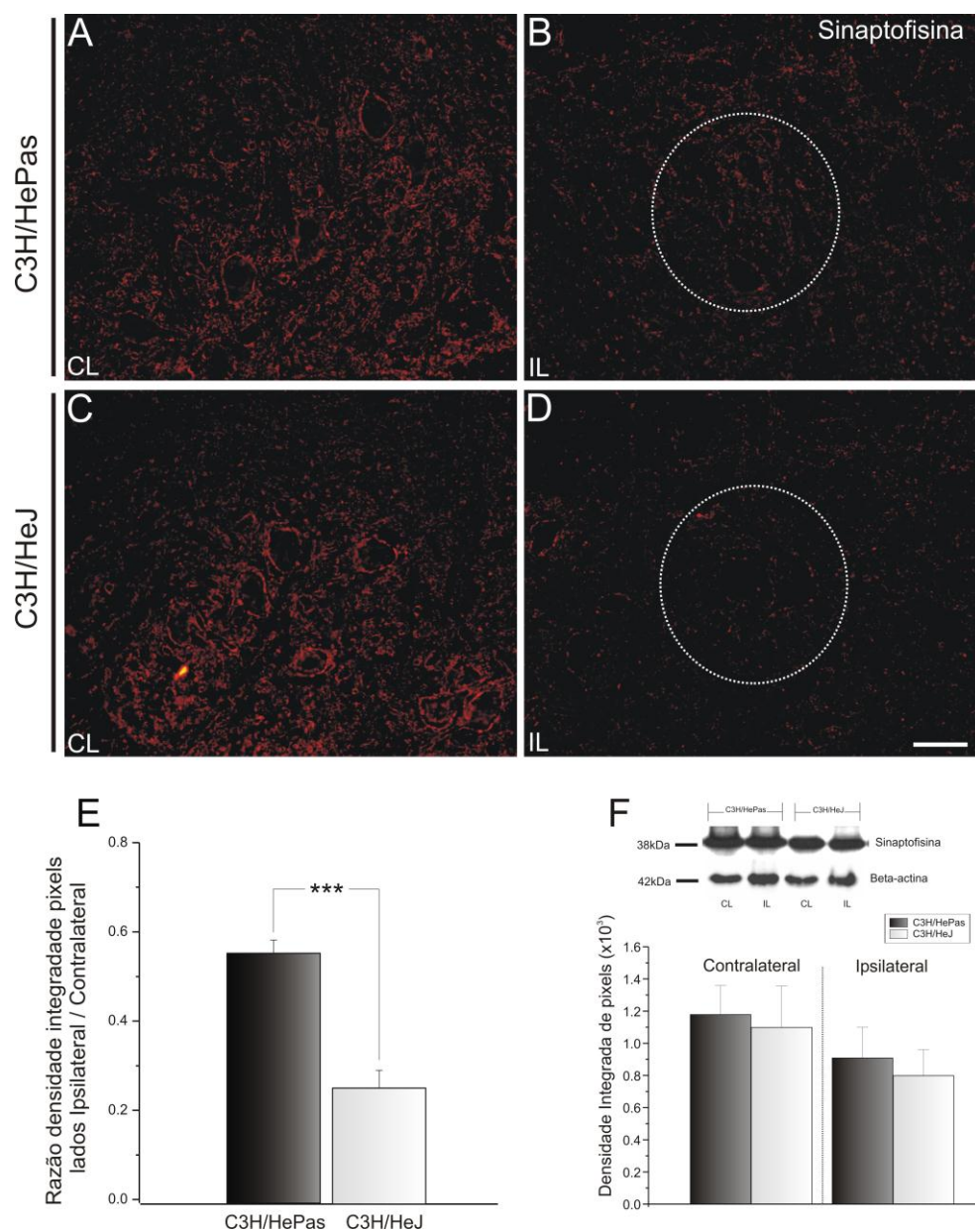


Figura 15: Imagens representativas da imunomarcção anti-sinaptofisina em C3H/HePas e C3H/HeJ, 1 semana após axotomia unilateral. Após lesão, observa-se forte perda da marcação, especialmente nas áreas em torno dos neurônios motores. (B) Camundongos C3H/HePas apresentam maior preservação sináptica comparado aos camundongos C3H/HeJ (D). O círculo pontilhado indica o núcleo motor contendo os neurônios motores alfa. (E) Gráfico representando a razão da densidade integrada de pixels ipsilateral/contralateral *** P < 0,001. (F) Análise de Western blot da expressão de sinaptofisina em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ. Note que não houve diferença sináptica significativa entre os grupos. β -actina foi utilizada como controle de pipetagem. * P < 0,05. Barra de escala: 50 μ m.

Alterações sutis que ocorrem no microambiente sináptico foram observadas na análise ultra-estrutural dos terminais em aposição com os motoneurônios alfa medulares. Assim, a ausência de TLR2 preservou os contatos sinápticos após axotomia periférica, sendo revelada maior cobertura sináptica em ambos os lados em camundongos knockout (contralateral: C57BL/6J, 46,24% $\pm$ 2,06%, TLR2-/-, 58,00% $\pm$ 2,81%, $p < 0,05$; ipsilateral: C57BL / 6J, 30,15% $\pm$ 1,73%; TLR2-/-, 41,12% $\pm$ 2,43%, $p < 0,05$, Figura 17 E). Este maior contato sináptico verificado em ambos os lados está relacionado com o comprimento dos terminais (superfície de aposição) e não ao aumento do número de sinapses (C57BL/6J, 2,22 $\pm$ 0,18; TLR2-/-, 3,49 $\pm$ 0,18, $p < 0,001$; ipsilateral: C57BL/6J, 2,13 $\pm$ 0,13; TLR2-/-, 3,10 $\pm$ 0,36, $p < 0,05$, Figura 17 G). Já a ausência de TLR4 promoveu maior eliminação sináptica (C3H/HePas, 45,43% $\pm$ 1,15%, C3H/HeJ, 31,19% $\pm$ 2,42%, $p < 0,01$). Além disso, o lado contralateral, em animais selvagens para TLR4, apresentou maior comprimento dos terminais, resultando em aumento da cobertura sináptica total em comparação ao mutante (C3H/HePas, 3,01 $\pm$ 0,16; C3H/HeJ, 2,56% $\pm$ 0,10, $p < 0,05$, Figura 18-G). Tais resultados sugerem que a deficiência do TLR4 promove alterações sinápticas independentes da lesão. No entanto, estas alterações não foram relacionadas com o número de terminais, tal como observado nos lados ipsilaterais (C3H/HePas, 48,53 $\pm$ 3,56; C3H/HeJ, 37,99% $\pm$ 1,61, $p < 0,05$, Figura 18F). Porém, uma vez observadas tais alterações no lado contralateral à lesão, sugerimos que estas decorreram durante o período de maturação sináptica. Desse modo, a expressão da proteína sinaptofisina em animais neonatos foram analisadas. Contudo, os resultados mostraram que ambos os receptores Toll like 2 e Toll like 4 não interferem na densidade sináptica em neonatos (C57BL//6J, $4,57 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^3$; TLR2^{-/-},

$4,46 \times 10^4 \pm 0,075 \times 10^3$; C3H/HePas, $4,35 \times 10^4 \pm 0,91 \times 10^3$ C3H/HeJ $3,98 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^3$,
Figura 16)

A análise quantitativa dos terminais F, S e C, foi investigada em MET. De acordo com Conradi (1969), os terminais pré-sinápticos nos neurônios motores foram tipados de acordo com a forma das suas vesículas sinápticas. No lado lesado, maior número de terminais tipo F foram preservados em animais knockout (C57BL/6J, $21,18\% \pm 1,41\%$, TLR2^{-/-}, $30,62 \pm 2,40$, $p < 0,05$, Figura 17-H). Da mesma forma, um maior número de terminais de F foram preservados em camundongos C3H/HePas comparativamente aos mutantes (C3H/HePas, $35,99\% \pm 1,99\%$, C3H/HeJ, $22,36\% \pm 2,28\%$, $p < 0,01$, Figura 18-H). Além disso, em camundongos selvagens observou-se maior número de terminais F no lado não lesionado, quando comparado aos mutantes para TLR4 (C3H/HePas, $43,60\% \pm 2,94\%$, C3H/HeJ, $32,38\% \pm 2,83\%$, $p < 0,01$, Figura 18 H). Consequentemente, o número de terminais do tipo S também foi aumentado em camundongos selvagens, possivelmente tratando-se de um mecanismo de compensação, com a finalidade de equilibrar o número de terminais excitatórios e inibitórios (C3H/HePas, $11,58 \pm 0,95$; C3H/HeJ, $6,94 \pm 0,62$, $p < 0,05$, Figura 18-I). No entanto, não houve diferenças para os terminais S no lado lesado de camundongos TLR2 ou TLR4.

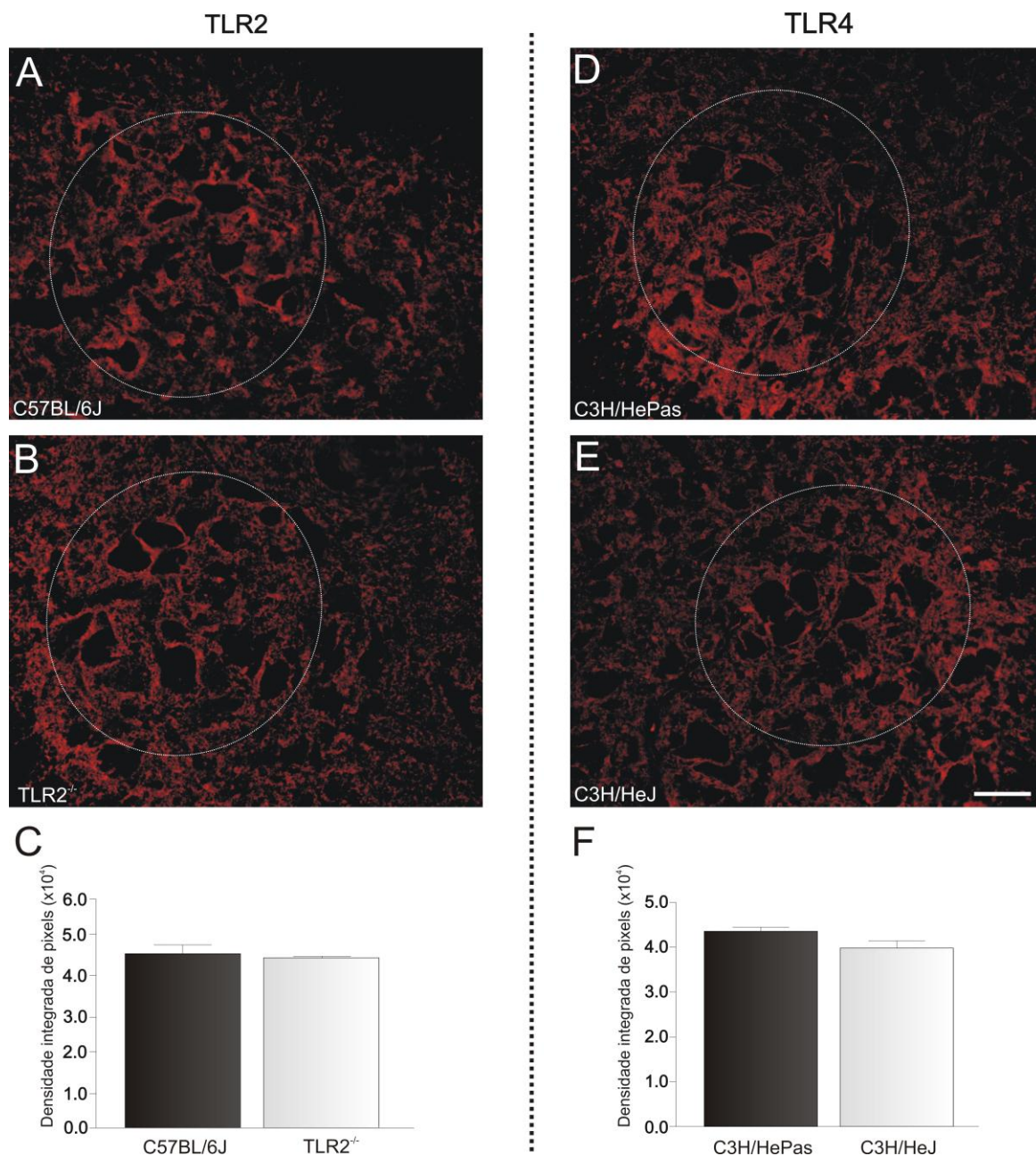


Figura 16: Imagens representativas da imunomarcação anti- sinaptofisina em camundongos (A) C57BL/6J; (B) TLR2^{-/-}; (D) C3H/HePas e (E) C3H/HeJ com 7 dias de vida. (C e F) Gráficos representando a densidade integrada de pixels para a imunomarcação de sinaptofisina. Observe que não houve diferença estatística entre os animais, demonstrando que os receptores TLR2 e TLR4 não interferem na eliminação sináptica no período neonatal. O círculo pontilhado indica o núcleo motor contendo os neurônios motores alfa. Barra de escala = 50µm.

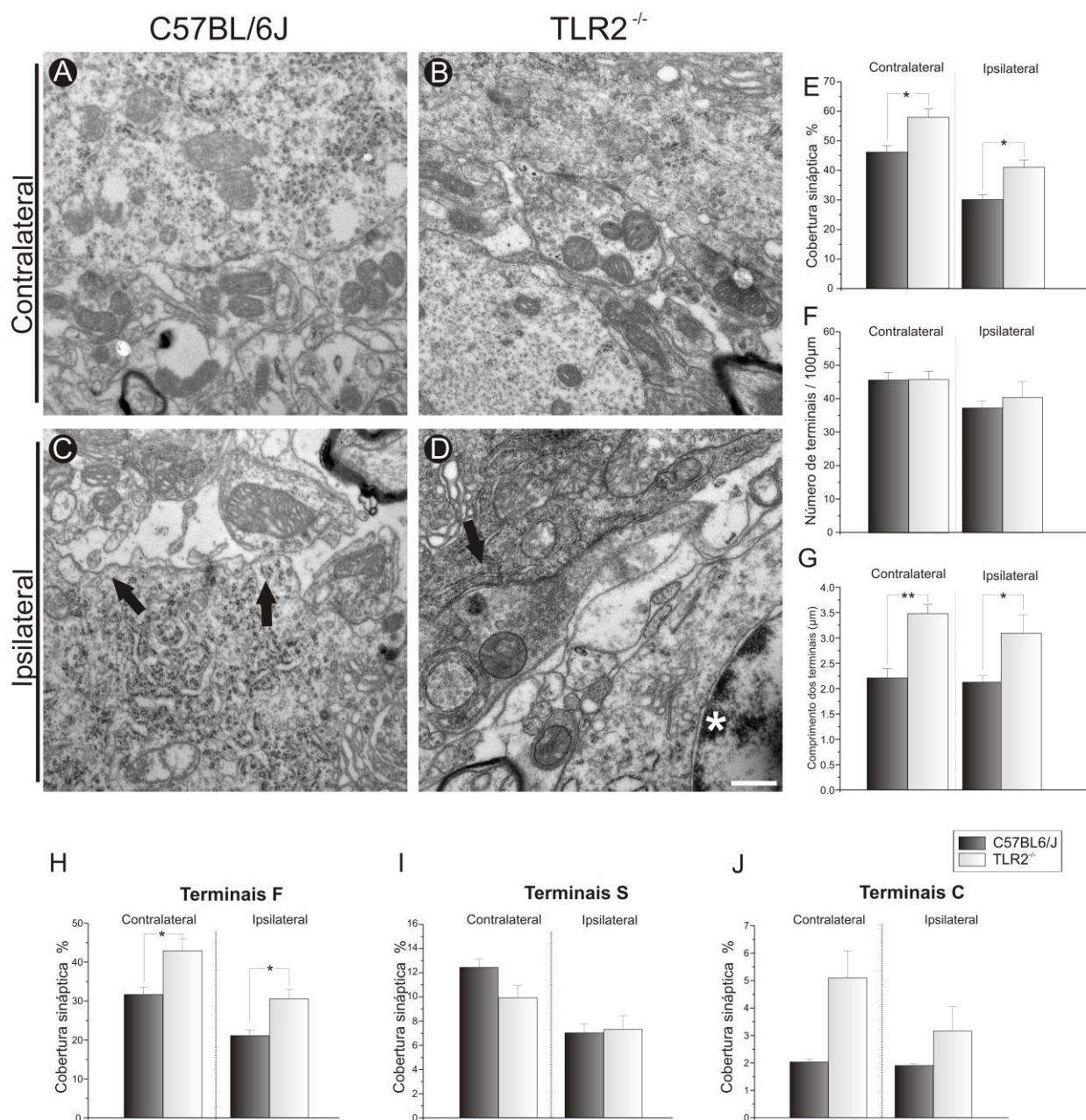


Figura 17: Análise quantitativa em ultraestrutura dos terminais sinápticos em contato com a superfície de motoneurônios após axotomia. Micrografias representativas da superfície de motoneurônios C57BL/6J (A, C) e TLR2^{-/-} (B, D). Uma semana após lesão periférica, (C) camundongos C57BL/6J apresentaram maior destacamento sinápticos comparado com camundongos TLR2^{-/-} (D). As setas pretas indicam terminais sinápticos (C) separados ou (D), em contato com membrana dos motoneurônios. Asterisco branco indica um astrócito próximo ao terminal sináptico. (E) Gráfico da cobertura total sináptica em neurônios colaterais e ipsilateral; houve maior cobertura sináptica em camundongos TLR2^{-/-} comparados com C57BL/6J em ambos os lados. (F) Gráfico do número total de terminais sinápticos por 100 µm de membrana do neurônio motor; note ausência de diferença entre os grupos. (G) Gráfico do comprimento dos terminais em relação à membrana de motoneurônios contralaterais e ipsilaterais à lesão, mostrando diferenças antes e depois da axotomia. (H-J) Gráficos número de terminais F-, S-e C- por 100 µm de membrana no neurônio motor. Foi observada maior perda de terminais tipo F em animais C57BL/6J. * p <0,05, ** p <0,01. Barra de escala: 0,5 µm.

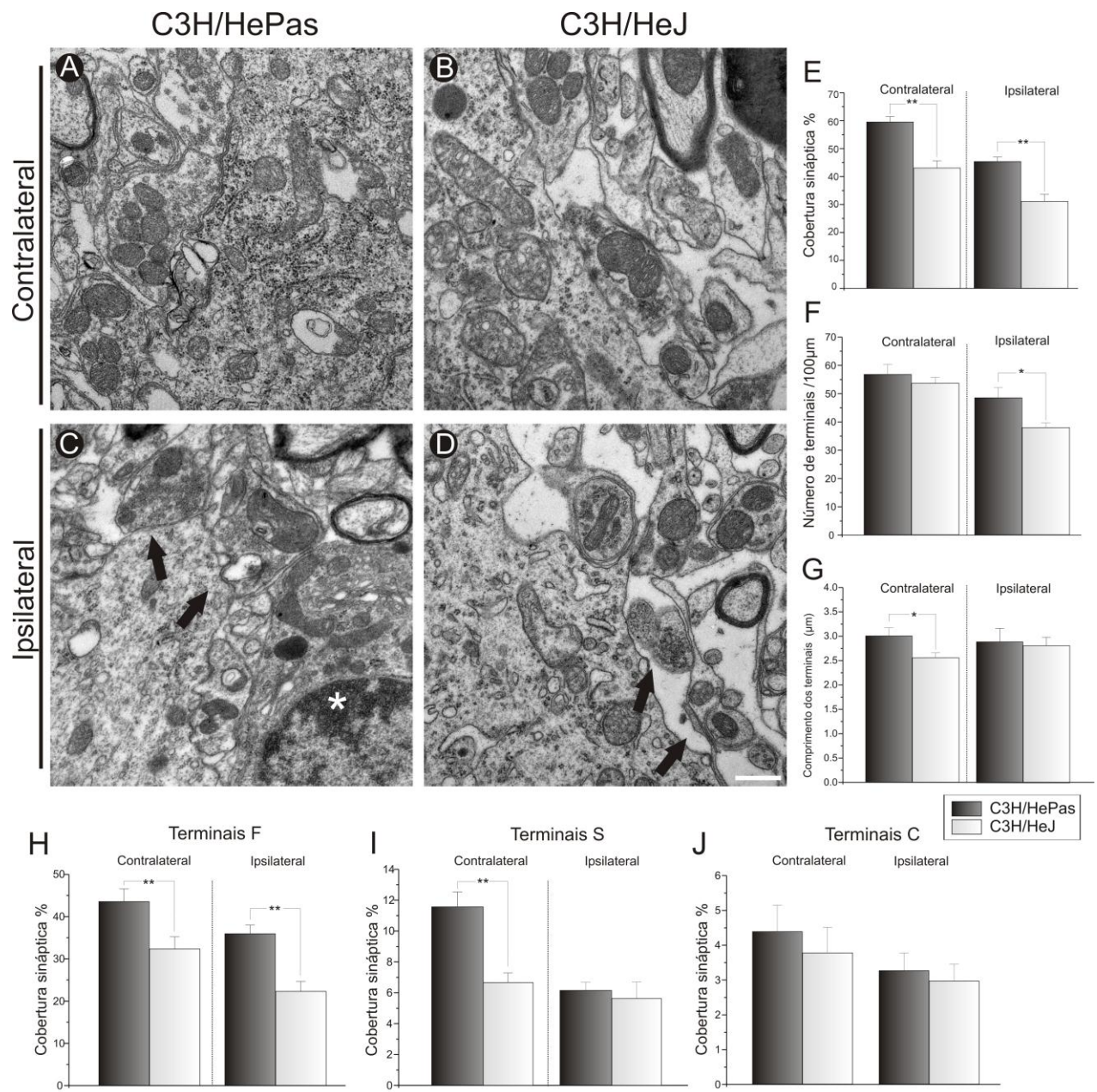


Figura 18: Análise quantitativa em ultraestrutura dos terminais sinápticos em contato com a superfície de motoneurônios após axotomia. Micrografias representativas da superfície de motoneurônios contralaterais e ipsilaterais (A, C) C3H/HePas, (B, D) C3H/HeJ. Uma semana pós lesão periférica, observa-se maior preservação dos terminais sinápticos em animais C3H/HePas (B) comparados aos mutantes TLR4 (D). (E) Gráfico da cobertura sináptica total nos motoneurônios, tanto lados contralateral quanto ipsilateral. As setas pretas indicam os terminais sinápticos (C) em contato, ou (D) retraídos da membrana do neurônio. O asterisco em branco indica uma célula microglial próxima ao terminal sináptico. (E) Gráfico da cobertura total sináptica em neurônios lesados e não lesados. Observa-se maior cobertura sináptica em camundongos selvagens em comparação aos mutantes em ambos os lados. (F) Gráfico do número total de terminais sinápticos por 100 μm de membrana do motoneurônio. (G) Gráfico do comprimento de terminais em contato com a membrana do motoneurônio lesionado e não lesionado. (H-J) Gráficos representando o número de terminais F-, S-e C por 100 μm de membrana dos neurônios motores amostrados. Maior preservação de terminais do tipo F foi observada em animais C3H/HePas antes e após axotomia. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. Barra de escala: 0,5 μm .

5.2 A ausência do receptor Toll like 2 diminui a reatividade astrogial in vivo e in vitro e a expressão de interleucinas pró-inflamatórias.

Análise quantitativa da imunoreatividade para GFAP foi executada em torno dos motoneurônios medulares. Assim, foi observada diferente expressão basal nos lados contralaterais nos animais selvagens e knockout (C57BL/6J, $4,27 \times 10^3 \pm 0,20 \times 10^3$; TLR2^{-/-}, $1,61 \times 10^3 \pm 0,08 \times 10^3$, $p < 0,01$, Figura 19 A e C). No entanto, *in vitro*, culturas de astrócitos, mostraram semelhante imunoreatividade para GFAP (Figura 19 G e H). Após lesão, tal diferença entre os grupos para a reatividade astrogial conservou-se (C57BL/6J, $7,02 \times 10^3 \pm 0,08$; TLR2^{-/-}, $3,33 \times 10^3 \pm 0,10$, $p < 0,001$, Figura 19 B e D). Estes achados sugerem que a sinalização do TLR2 interfere na reatividade astrogial mesmo antes da lesão.

Para investigar a possibilidade de interferência da astroglia na presença dos mRNAs para IL6 e IL1 β , foi realizado RT-PCR em tempo real. Os resultados mostram que na ausência de TLR2 diminuiu a expressão de interleucinas pró-inflamatórias após axotomia periférica (IL6: C57BL/6J, $4,19 \pm 0,40$; TLR2^{-/-}, $1,86 \pm 0,17$, $p < 0,05$; IL1 β : C57BL/6J, $4,34 \pm 0,79$; TLR2^{-/-}, $1,85 \pm 0,09$, $p < 0,05$, Figura 20 A e B).

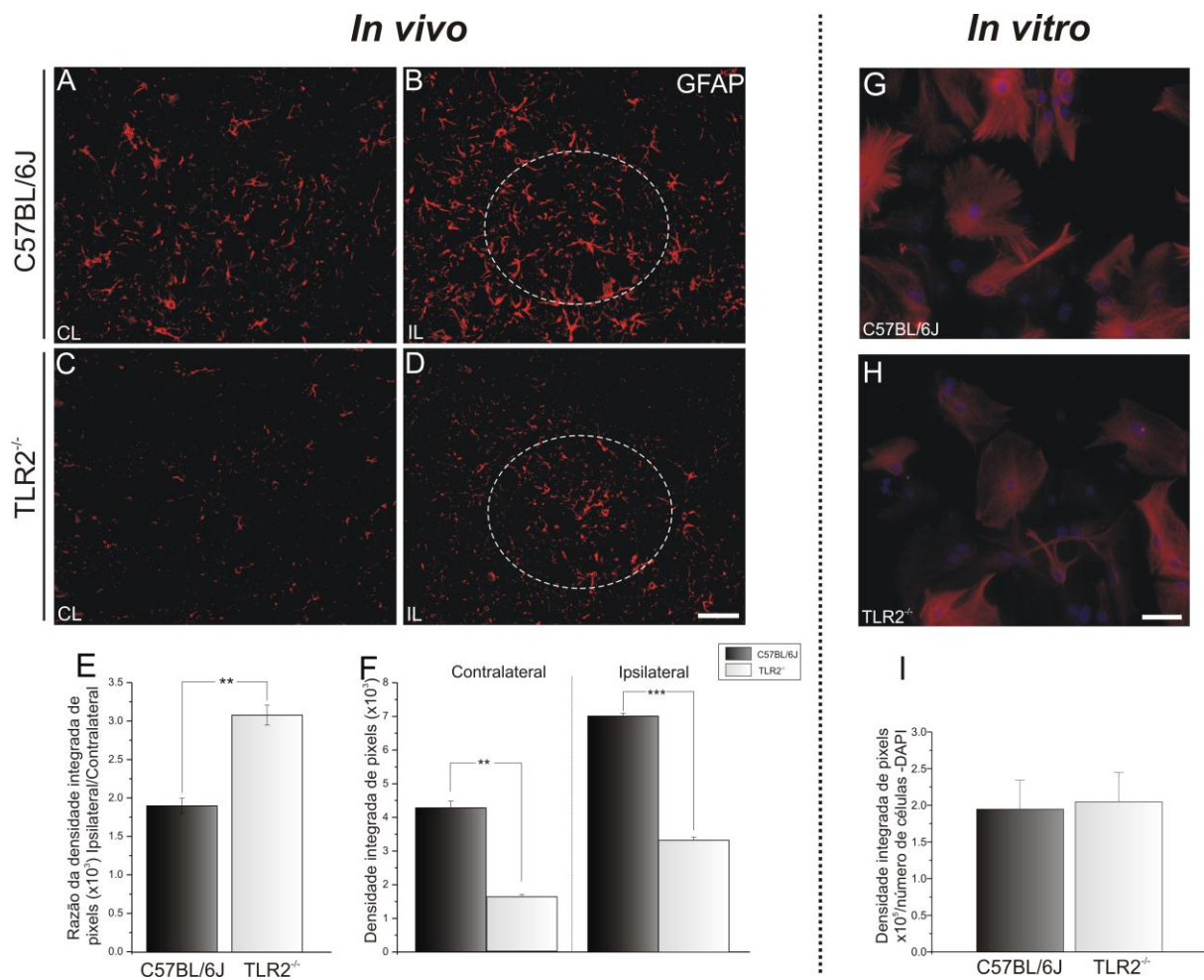
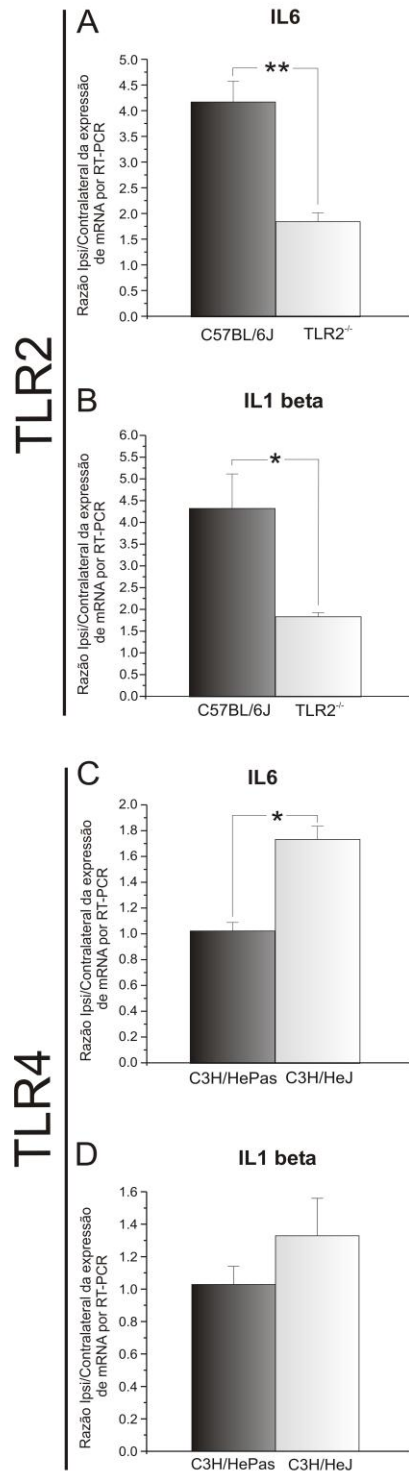


Figura 19: Imagens representativas de imunomarcção anti proteína GFAP para os animais C57BL/6J e TLR2^{-/-}, 1 semana após axotomia unilateral. (A, C) lado contralateral da medula espinal lombar; observa-se aumento basal da reatividade glial em animais C57BL/6J comparados aos TLR2^{-/-}. (B, D) Imunomarcção anti GFAP, aonde observa-se aumento da reatividade em ambos os grupos após lesão, porém houve maior incremento nos animais selvagens. (E) Gráfico representando a razão da densidade integrada de pixels para os lados ipsi e contralateral. (F) Gráfico da densidade integrada de pixels para os lados lesionado e não lesionado ** P <0,01 e *** P <0,001. (G, H) Culturas purificadas de astrócitos de animais C57BL/6J e TLR2^{-/-}. (I) Gráfico mostrando nenhuma diferença significativa para a imunomarcção anti- GFAP entre os grupos experimentais. Barra de escala: 50 μ m.

Interleucinas



Neurotrofinas

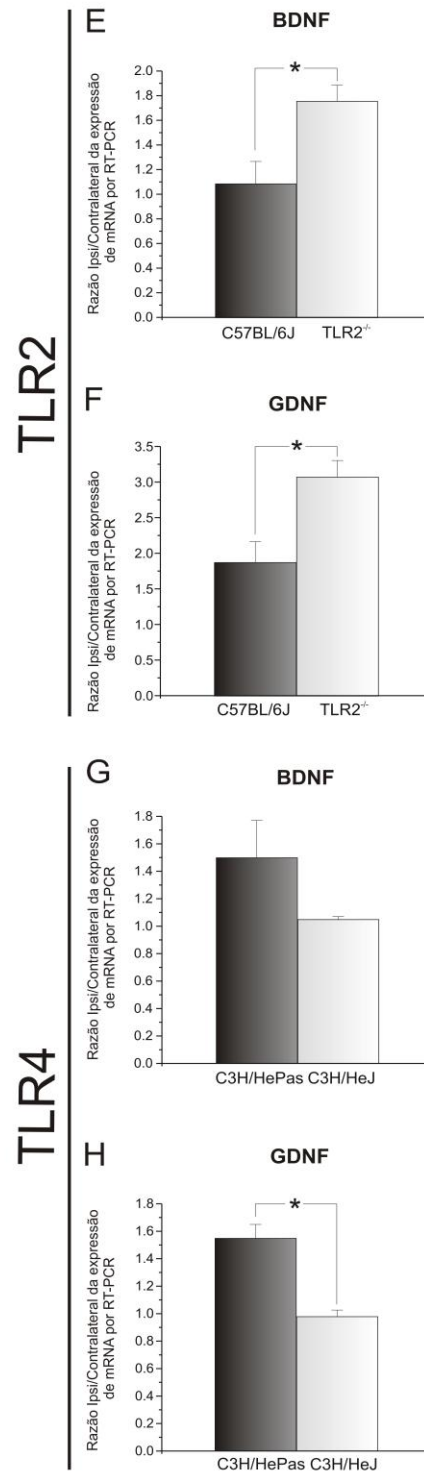


Figura 20: Níveis de mRNA de interleucina e de neurotrofinas após axotomia. (A, B) Gráficos mostrando os níveis de mRNA das interleucinas IL-6 e IL-1 β na medula espinal de C57BL/6J e TLR2^{-/-}. (C, D) Gráficos mostram a quantidade relativa de transcritos gênicos para IL-6 e IL-1 β na medula espinal de C3H/HePas e C3H/HeJ. (E, F) Gráficos mostrando os níveis de mRNA para BDNF e GDNF, na medula lombar de C57BL/6J e TLR2^{-/-}. (G, H) Gráficos mostrando níveis de mRNA de BDNF e GDNF na medula lombar de C3H/HePas e C3H/HeJ. Note que a ausência de TLR2 aumentou a expressão de GDNF e diminuiu a expressão de IL-6 e IL-1 β . Já a mutação de TLR4 resultou em menores quantidades de transcritos gênicos para BDNF após axotomia unilateral do nervo isquiático, enquanto que resultou na regulação positiva de IL-6 e negativa de RNAm para GDNF. * P <0,05. Barra de escala: 50 μ m.

Adicionalmente, culturas primárias de astrócitos foram realizadas para investigar *in vitro* a hiperplasia e hipertrofia astrogliar. Uma pergunta importante foi se além da hipertrofia glial, a ausência de TLR2 também teve algum efeito na proliferação de astrócitos (hiperplasia). Para este efeito, citoquímica com DAPI foi empregada para analisar o número de astrócitos em culturas de camundongos do tipo selvagem e knockout. Os resultados indicam maior número de células positivas para BrdU em culturas de animais selvagens comparativamente com as culturas derivadas de knockouts (Figura 21 G-L). A taxa mitótica foi calculada a partir da razão de BrdU / DAPI. Após 24 ou 48 horas de cultura, não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos, mas a taxa mitótica de 72 horas foi estatisticamente maior nas culturas de animais selvagens (72 horas: C57BL/6J, $0,86 \pm 0,27$; TLR2 - / -, $0,63 \pm 0,02$, $p < 0,001$, Figura 21 S). Como pode ser observado na Figura 21-T, a ausência de TLR2 teve um efeito significativo sobre a taxa de proliferação de astrócitos. Após 24 horas de cultura, o número de astrócitos em culturas derivadas de animais selvagens foi significativamente maior do que em culturas derivadas de knockouts. As diferenças entre as culturas selvagens e knockout foram significativas em 48 e 72 horas (número de células marcadas com DAPI: 48 horas: C57BL/6J, $6,62 \times 10^4 \pm 0,38 \times 10^4$; TLR2^{-/-}, $3,84 \times 10^4 \pm 0,17 \times 10^4$, $p < 0,001$; 72 horas: C57BL/6J, $8,5 \times 10^4 \pm 0,61 \times 10^4$; TLR2^{-/-}, $5,9 \times 10^4 \pm 0,55 \times 10^4$, $p < 0,01$).

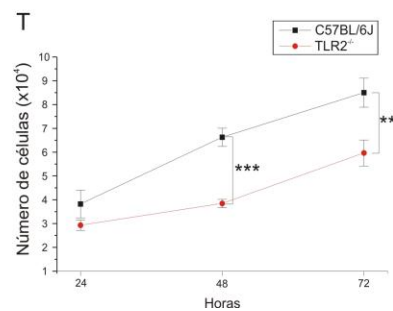
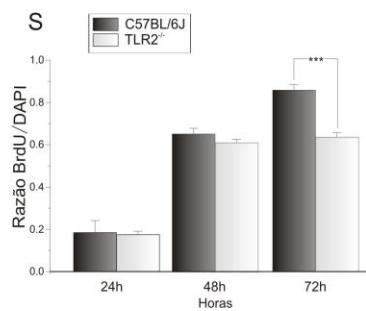
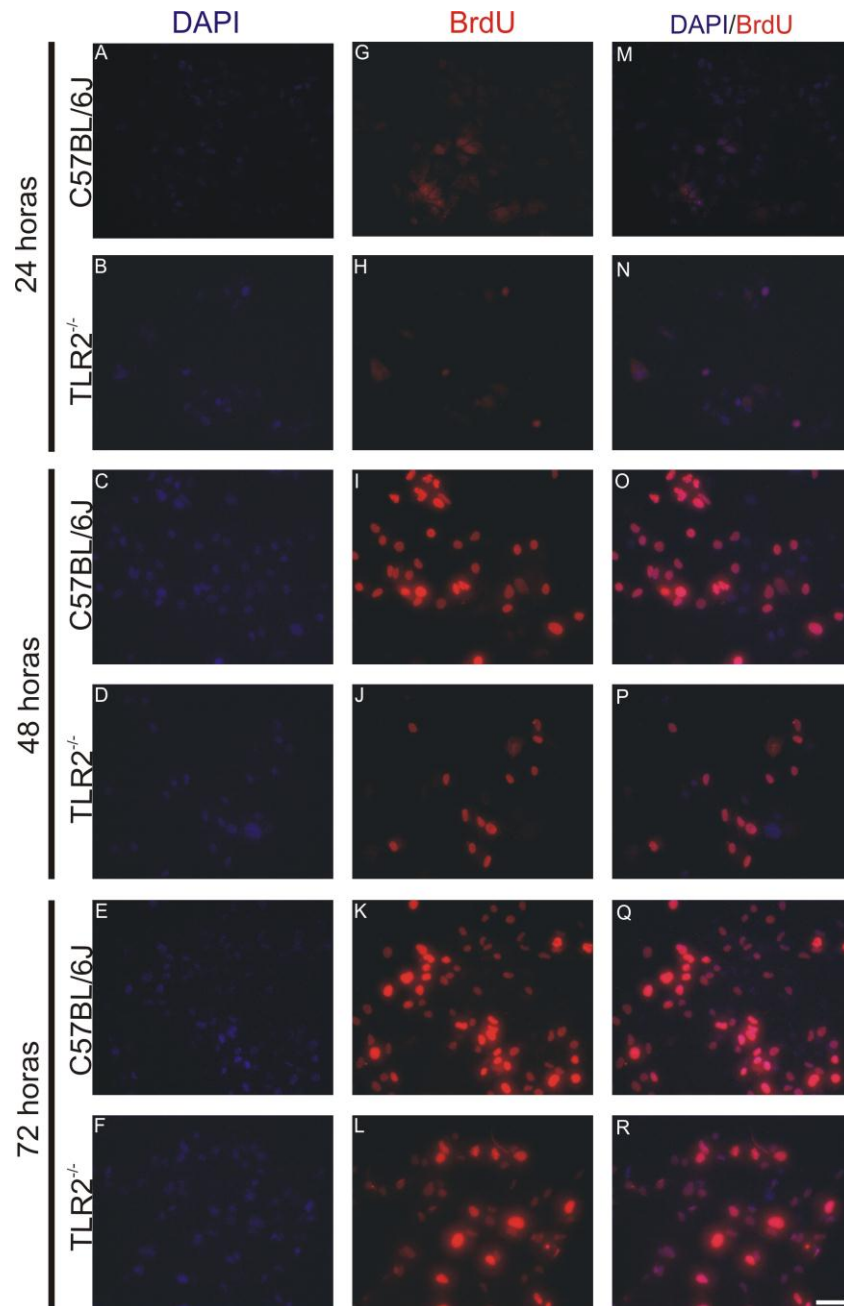


Figura 21: Ensaio de proliferação celular em cultura de astrócitos purificados a partir de C57BL/6J e TLR2^{-/-}. (A-R) Citoquímica com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e imunoistoquímica com 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) em cultura celular cultivada por 3 dias. (A-F) marcação simples DAPI (AF) e (G-L) BrdU. (M-R) dupla marcação com BrdU e DAPI. Note maior número de células em cultura de células de C57BL/6J (S). Gráfico mostrando a razão de BrdU e DAPI; note que as culturas de células C57BL/6J apresentam maior taxa de proliferação, especialmente 72 horas de cultivo. Gráfico (T) mostrando o número de astrócitos para cada dia, evidenciando que a ausência de TLR2 afetou o crescimento de células após 48 horas ** P <0,01; *** P <0,001

5.3 Na ausência de TLR4, a expressão de interleucina pró-inflamatória independe da reatividade glial.

A reatividade microglial foi mínima no lado não lesionado para todos os quatro grupos (Figuras 22 e 23). Entretanto, embora a axotomia tenha estimulado um aumento da reatividade da microglia, nenhuma diferença significativa entre os grupos pôde ser observada (relação lado ipsilateral/contralateral : C57BL/6J, $9,41 \pm 1,09$; TLR2-/-, $10,12 \pm 0,59$, Figura 8; relação lado ipsilateral/contralateral: C3H/HePas, $9,20 \pm 1,57$; C3H/HeJ, $8,57 \pm 1,97$, Figura 22). Já a reatividade astrogliar, apesar de ser mais intensa no lado ipsilateral, também não apresentou diferenças significativas entre os grupos (relação lado ipsilateral / contralateral: C3H/HePas, $2,12 \pm 0,43$; C3H/HeJ, $1,96 \pm 0,08$, Figura 24 E).

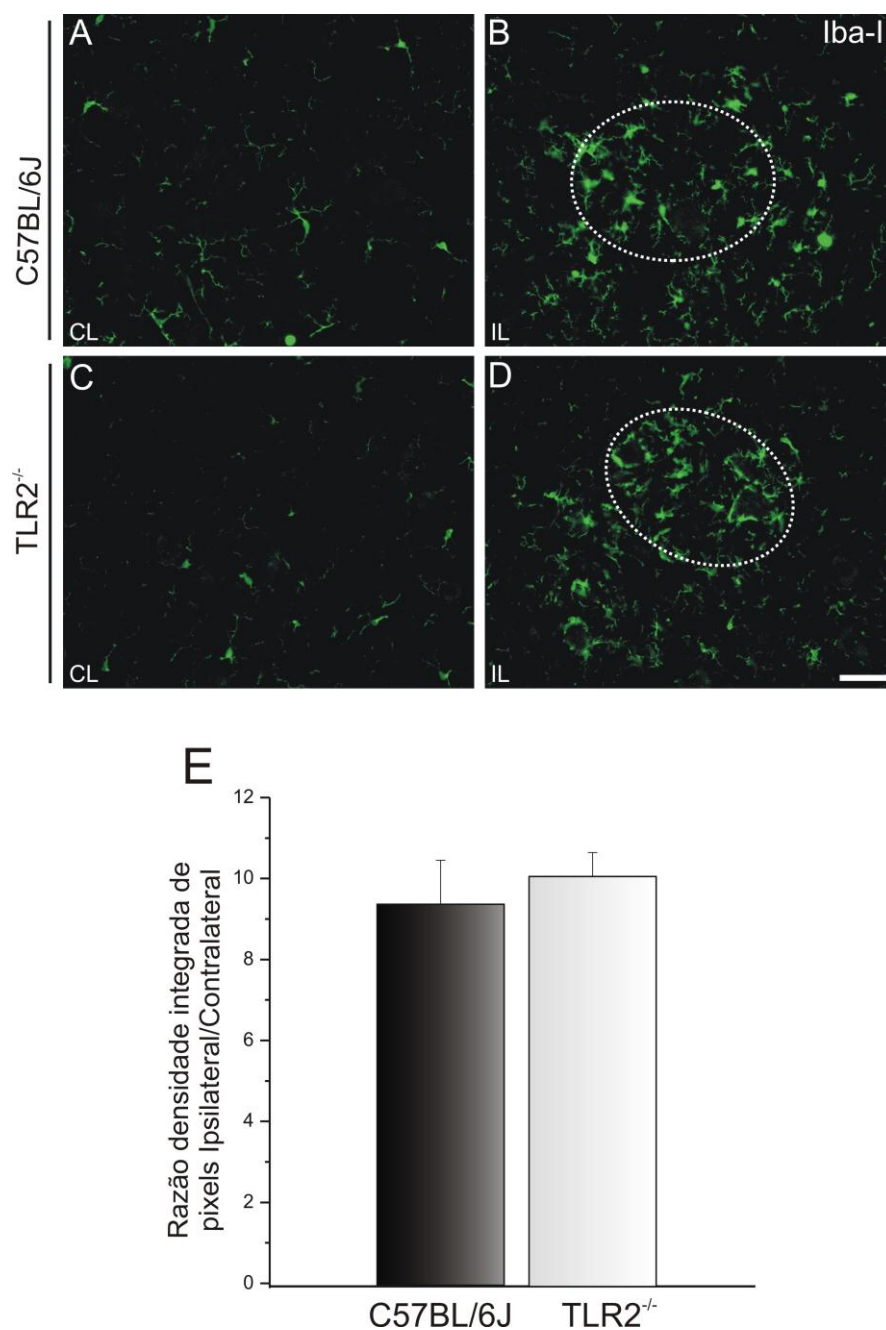


Figura 22: Imagens representativas da imunomarcção microglial (anti-Iba-1) em camundongos C57BL/6J e TLR2^{-/-}, uma semana após a axotomia unilateral do nervo isquiático. (A, C) lado contralateral e (B, D) lado ipsilateral. Note aumentada expressão de Iba-1, especialmente nas adjacências de motoneurônios sujeitos à axotomia. Ambos grupos apresentam semelhante reatividade microglial. O círculo pontilhado indica o núcleo motor contendo os motoneurônios alfa. (E) Gráfico representa a razão da densidade integrada de pixels dos lados ipsi e contralateral ($P > 0,05$). Barra de escala: 50 μ m.

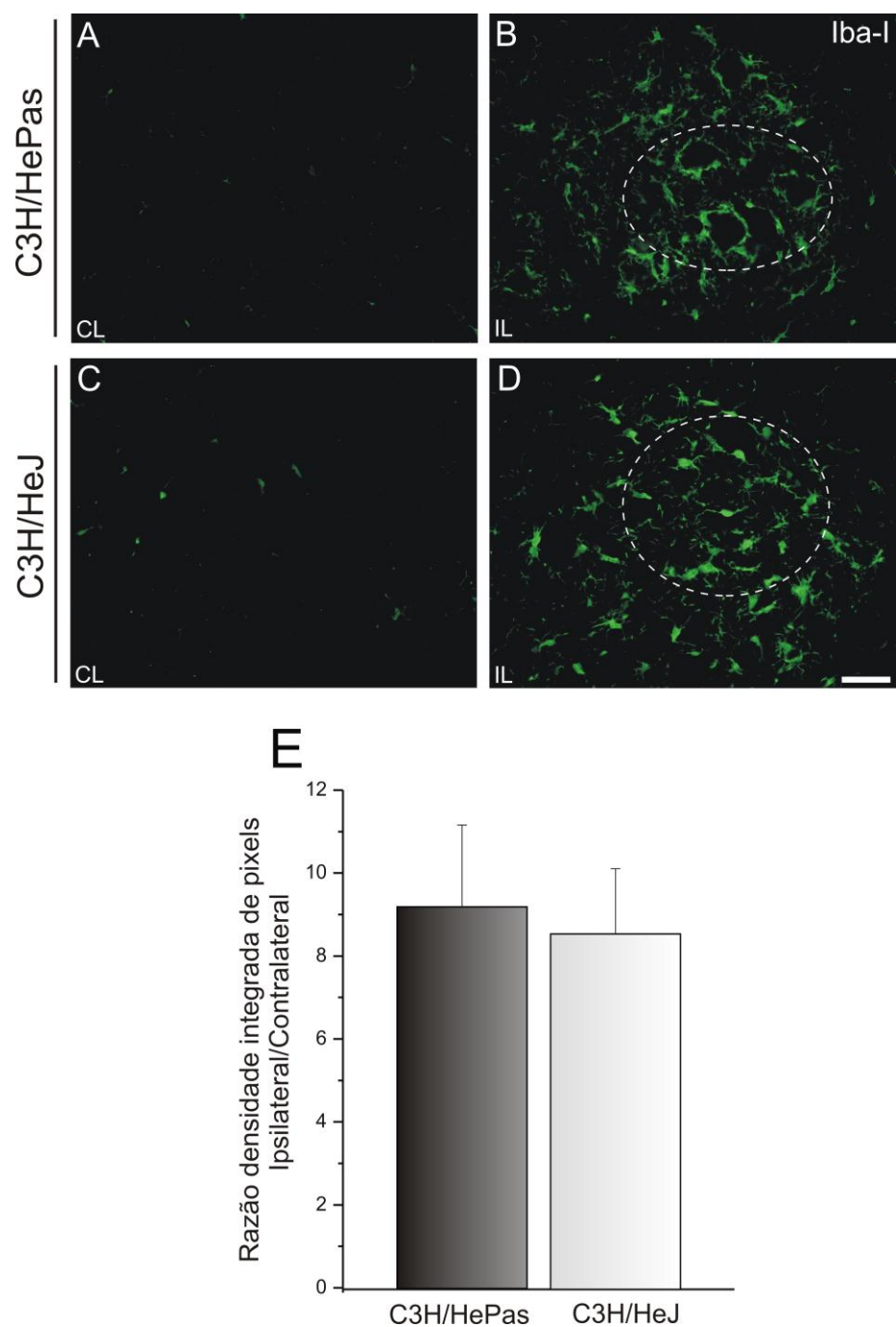


Figura 23: Imagens representativas da imunomarcagem microglial (anti-Iba-1) em C3H/HePas e C3H/HeJ, uma semana após axotomia unilateral do nervo isquiático. (A, C) lado não lesionado e (B, D) lado lesionado em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ. Note elevada e equivalente expressão de Iba1 na superfície dos neurônios, em ambos os grupos experimentais. O círculo pontilhado indica o núcleo motor contendo os neurônios motores alfa. (E) Gráfico da razão da densidade integrada de pixels dos lados ipsi e contralateral ($P > 0,05$). Barra de escala: 50 μm .

A ausência de alterações na reatividade glial entre os animais selvagens e mutantes para TLR4 nos levou a analisar, por RT-PCR, a expressão de genes de interleucinas pró-inflamatórias como IL1 β e IL6. Os resultados demonstram que a ausência do receptor Toll Like 4 alterou a expressão dos genes para IL6. No entanto, não houve alterações na expressão de IL1 β após axotomia (IL6: C3H/HePas, $1,03 \pm 0,064$; C3H/HeJ, $1,74 \pm 0,10$, $p < 0,05$; IL1 β : C3H/HePas, $1,03 \pm 0,11$; C3H/HeJ, $1,33 \pm 0,23$; $p > 0,05$ Figura 20 C e D).

A reatividade astrogliar também foi investigada em culturas primárias de astrócitos de animais mutantes e selvagens para TLR4. Análise *in vitro* confirmou os resultados *in vivo*, sem diferença na reatividade astrocitária (C3H/HePas, $2,14 \times 10^5 \pm 0,38 \times 10^5$; C3H/HeJ, $1,50 \times 10^5 \pm 0,14 \times 10^5$, Figura 24 H). Em seguida, um ensaio de proliferação celular foi realizado utilizando a técnica de incorporação de BrdU. A taxa mitótica foi analisada e calculada pela proporção de DAPI e a marcação com BrdU. Não houve diferenças significativas entre as taxas de mitose entre selvagens e mutantes (Figura 25). Estes resultados indicam que a deficiência de TLR4 não interfere na reatividade e proliferação astrogliar *in vivo* ou *in vitro*.

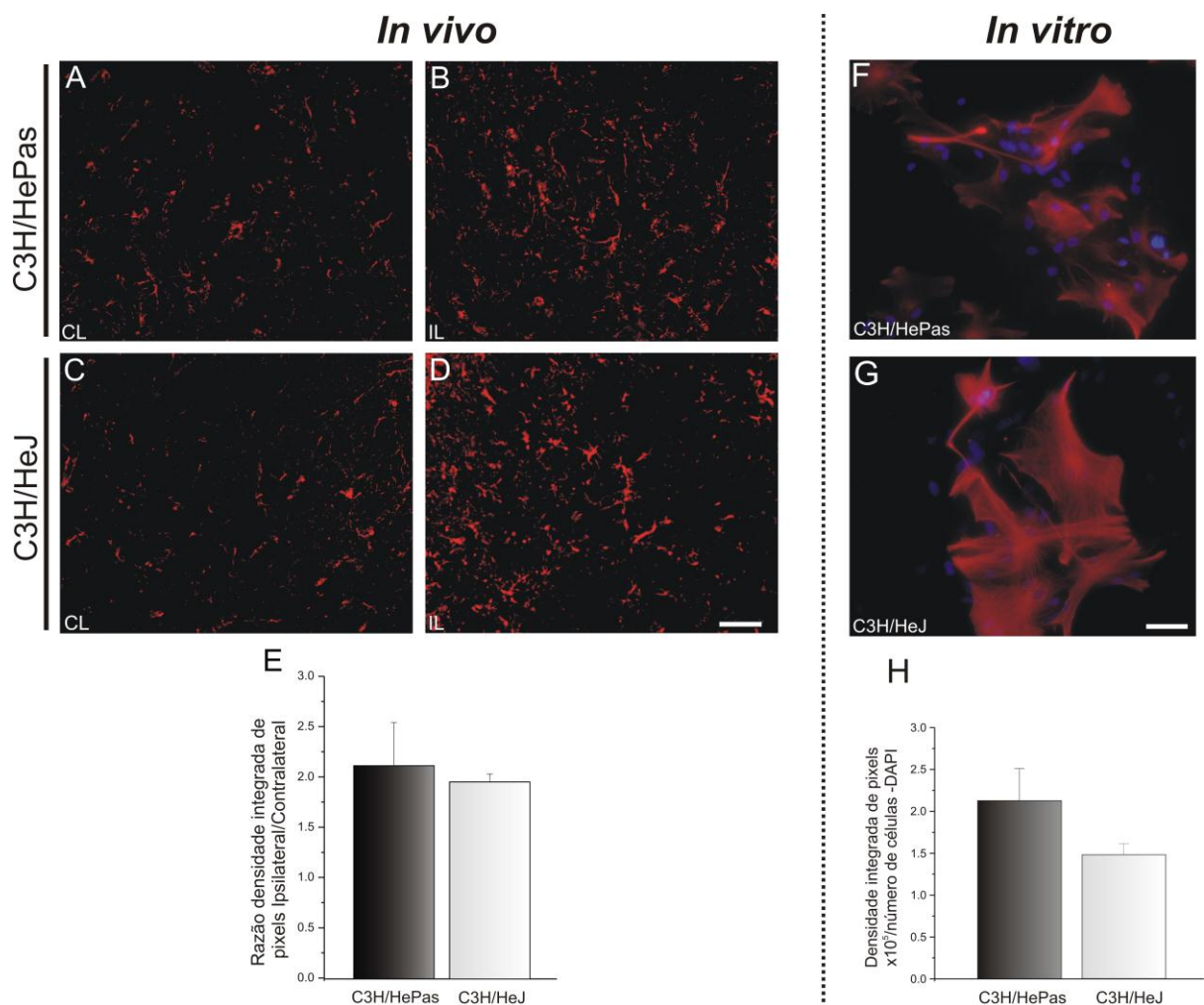


Figura 24: Imagens representativas da imunomarcação anti proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ, uma semana após axotomia unilateral do nervo isquiático. (A, C) lado contralateral (B, D) lado ipsilateral da medula lombar. Após lesão, a expressão de GFAP aumentou em ambos os grupos, sem diferenças entre os grupos. (E) Gráfico representa a razão da densidade integrada de pixels do lado ipsi e contralateral. (F, G) Culturas purificadas de astrócitos mostram a reactividade em astrócitos de animais C3H/HePas e C3H/HeJ. (H) Gráfico não mostra nenhuma diferença significativa entre os grupos. Barra de escala: 50 μ m.

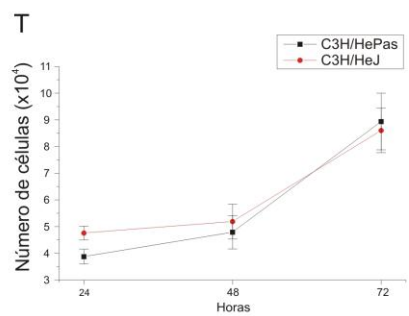
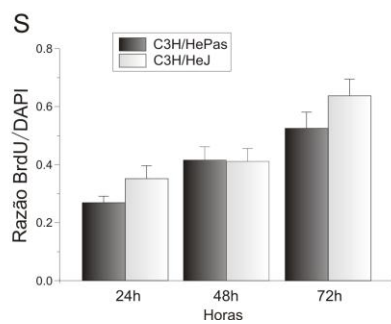
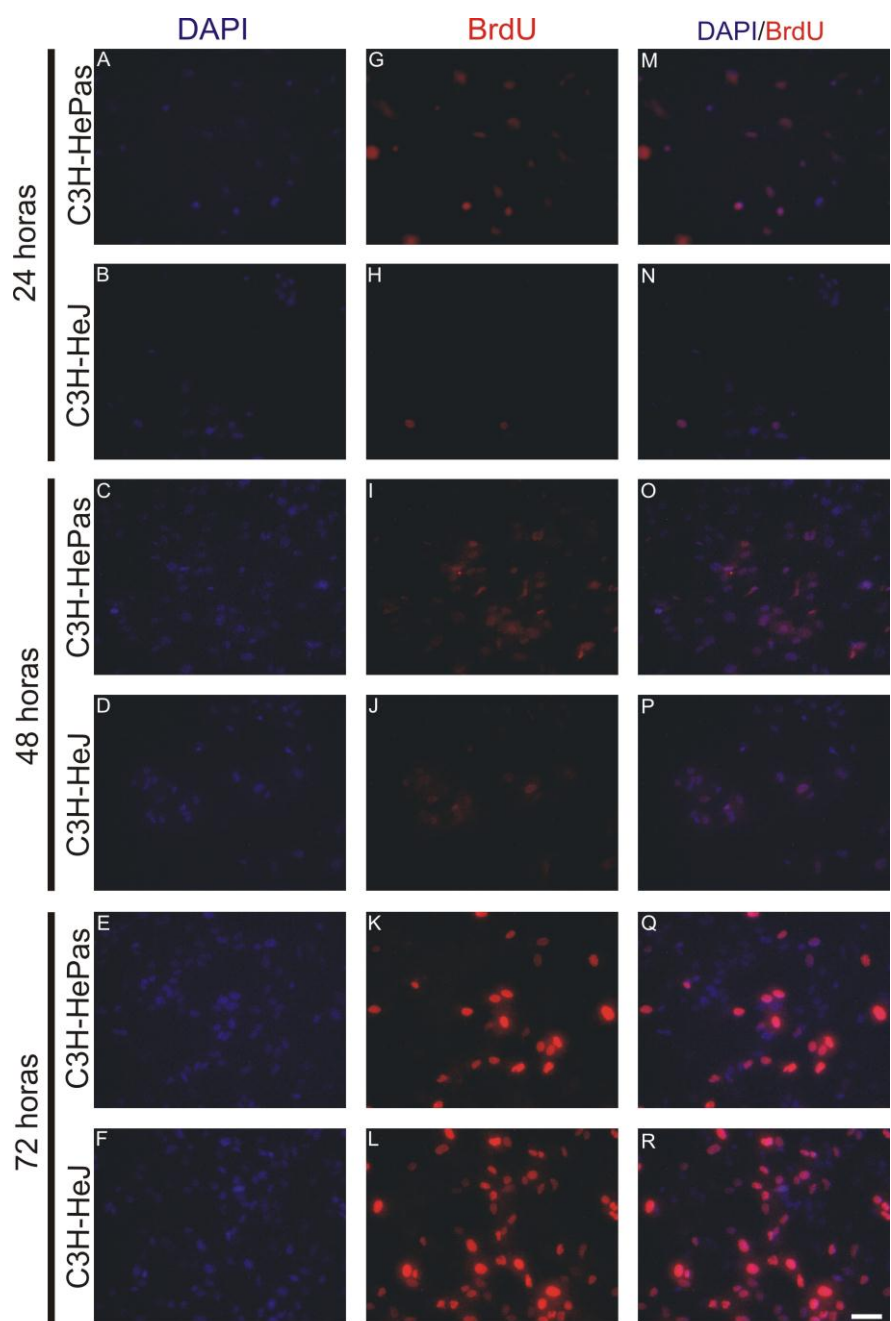


Figura 25: Ensaio de proliferação celular em cultura de astrócitos purificados a partir de córtices de C3H/HePas e C3H/HeJ. (A-R) Imunomarcção de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) em cultura celular cultivada por 3 dias). (A-F) marcação simples DAPI (AF) e (G-L) BrdU. (M-R) dupla marcação com BrdU e DAPI. (S) Gráfico mostrando a razão de BrdU e DAPI; não havendo diferença na taxa de proliferação celular entre C3H/HePas e C3H/HeJ durante os 3 dias de cultura. (T) Gráfico mostrando o número de astrócitos para cada dia; Observa-se que a ausência da sinalização pelo TLR4 não afeta a proliferação dos astrócitos. Barra de escala: 50 μ m.

5.4 A expressão de MHC I e de neurotrofinas na ausência de TLR2 e TLR4.

Uma semana após axotomia, uma clara mudança no nível de MHC classe I foi detectada nos motoneurônios lesados de camundongos C57BL/6J e knockout. A expressão da proteína foi claramente superior no lado lesionado nos 2 grupos (Figura 26 G, J comparada com A, D). No entanto, os camundongos knockout apresentaram uma maior expressão de MHC de classe I em torno dos neurônios motores comparada ao selvagem (C57BL/6J, $2.47 \times 10^3 \pm 0.38 \times 10^3$; TLR2^{-/-} $4.03 \times 10^3 \pm 0.85 \times 10^3$, $p < 0,05$, Figura 26 M). Para determinar se a microglia expressa MHC I, duplas marcações foram realizadas utilizando os anticorpos anti-Iba-1 e MHC I (Figura 12). Como mostrado na Figura 26 - I e L, houve colocalização entre o marcador microglial e MHC I, o que indica que a microglia foi responsável pela expressão de MHC I elevada em camundongos knockout. Além disso, RT-PCR foi realizada para examinar os níveis de transcrição de $\beta 2$ -microglobulina na ausência de TLR2. A transcrição de $\beta 2$ -microglobulina foi significativamente maior em camundongos knockout (C57BL/6J $1,04 \pm 0,21$; TLR2^{-/-} $1,43 \pm 0,11$; $p < 0,05$, Figura 26). Estes resultados mostram que a presença do receptor Toll like 2 interfere na expressão de MHC I. Além disso, a ausência da expressão de TLR2 aumenta a expressão de neurotrofinas no SNC, como aferido pelos níveis de mRNAs de BDNF e GDNF, os quais foram mais altamente expressos em camundongos knockout (BDNF: C57BL/6J, $1,09 \pm 0,18$; TLR2^{-/-} $1,76 \pm 0,13$, $p < 0,05$, Figura 20 E ; GDNF: C57BL/6J, $1,88 \pm 0,29$; TLR2^{-/-} $3,08 \pm 0,23$, $p < 0,05$, Figura 20 F).

Para avaliar se a sinalização de TLR4 é capaz de modular a expressão das neurotrofinas, justificando o aumento na plasticidade sináptica, RT-PCR foi realizado para examinar os níveis de transcrição do GDNF e BDNF. Os resultados revelaram que a preservação da

cobertura sináptica após lesão foi correlacionada com a regulação positiva da expressão de neurotrofinas (BDNF: C3H/HePas, $1,50 \pm 0,27$; C3H/HeJ $1,05 \pm 0,02$, $p > 0,05$, Figura 7 G; GDNF: C3H/HePas, $1,55 \pm 0,10$; C3H/HeJ $0,98 \pm 0,04$, $p < 0,05$, Figura 20 H). Já a expressão de MHC I não pôde ser detectada em torno dos motoneurônios por imunomarcação. Desse modo, realizamos a técnica de WB porém, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos (contralateral: C3H/HePas, $3,46 \times 10^3 \pm 0,37 \times 10^3$; C3H/HeJ, $3,18 \times 10^3 \pm 0,15 \times 10^3$; ipsilateral: C3H/HePas, $3,99 \times 10^3 \pm 0,45 \times 10^3$; C3H/HeJ, $3,75 \times 10^3 \pm 0,26 \times 10^3$; Figura 27-A). Da mesma forma, os resultados de RT-PCR não apresentaram diferenças significativas na expressão mRNA para $\beta 2$ -microglobulina (C3H/HePas, $2,99 \pm 0,79$; C3H/HeJ, $1,80 \pm 0,39$; Figura 27-B).

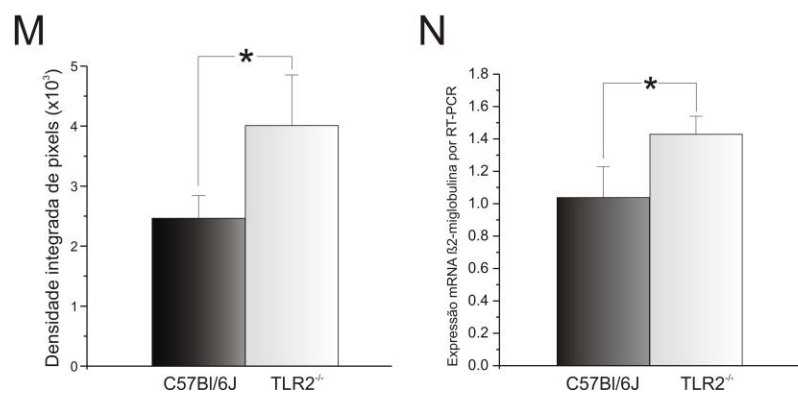
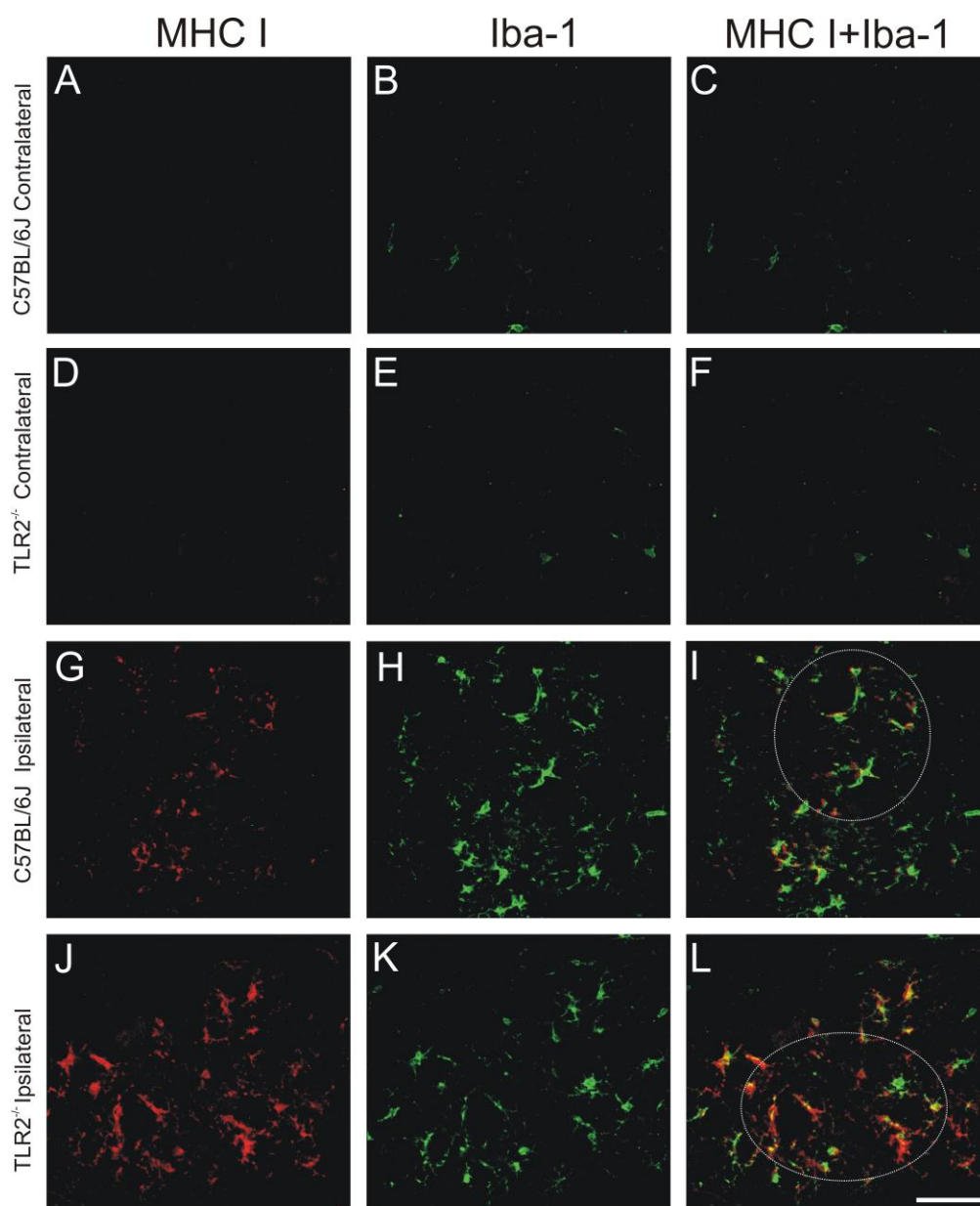


Figura 26: Dupla marcação com anticorpos anti complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC I) e Iba1 em camundongos C57BL/6J e TLR2^{-/-}, uma semana após a axotomia. (B, E) O lado contralateral mostrou marcação com Iba-1. (A, D) Marcação MHC I lado contralateral em ambos os grupos. Após a lesão, observa-se aumento da expressão de MHC I em TLR2^{-/-} (J) comparado com C57BL/6J (G). (I, L) Dupla marcação anti- Iba1 e MHC I. Note a colocalização (L) indicando que a microglia expressa MHC I. (M) Gráfico representa a quantificação da densidade integrada de pixels para MHC I adjacente aos motoneurônios. (N) Expressão de mRNA para β 2-microglobulina determinada por PCR. (M e N) Gráficos mostram maior expressão de MHC I em TLR2^{-/-} comparativamente a camundongos C57BL/6J. *p <0,05. Barra de escala: 50 μ m.

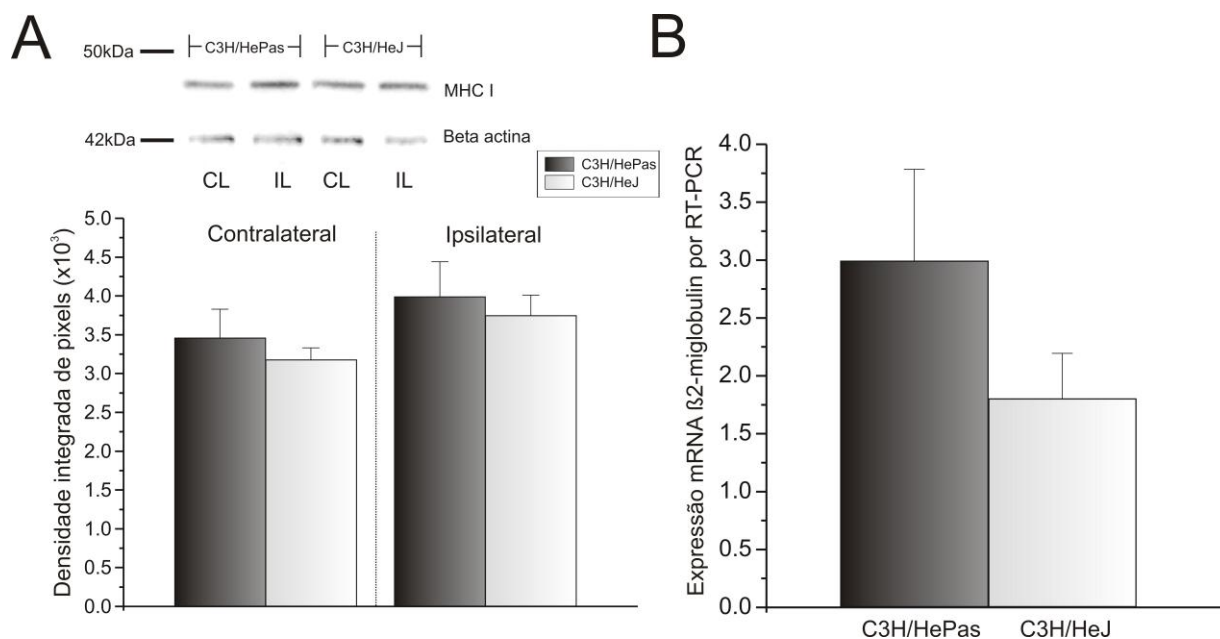


Figura 27: Complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I) e β 2-microglobulinaníveis na medula espinal de animais C3H/HePas e C3H/HeJ após axotomia. (A) Análise por Western blotting da expressão de MHC I na medula lombar dos lados contralateral e ipsilateral. Observa-se aumento da expressão de MHC I após lesão, porém não houve diferença entre os grupos. β -actina foi utilizada como controlo de amostra. CL = contralateral; IL = ipsilateral. (B) Expressão de mRNA de β 2 microglobulina determinado por PCR na medula lombar de C3H/HePas e C3H/HeJ. (B) O gráfico mostra aumento da expressão do gene β 2-microglobulina após lesão, porém não houve diferença entre os grupos.

6. Discussão

A resposta retrógrada para axotomia é um fenômeno bem conhecido que ocorre nas adjacências dos motoneurônios lesionados na medula espinal. Esta reação à lesão tem sido amplamente investigada, e há evidências de que tais alterações no microambiente da medula espinal possam determinar um melhor ou pior resultado regenerativo. Diversas moléculas têm sido implicadas neste processo, incluindo algumas caracteristicamente relacionadas com a resposta imune clássica e não clássica, incluindo MHC I, TCR e moléculas do sistema complemento. Desta forma, muitas moléculas exclusivamente ligadas a processos imunes também podem ser expressas na superfície de neurônios e células da glia, desempenhando função importante na plasticidade do SNC (Boulanger et al., 2003). Da mesma forma, os TLRs, são receptores de padrões de reconhecimento do sistema imune inato, e também podem interferir na plasticidade do SNC (Ma et al., 2006; Boivin et al., 2007). Torna-se importante, portanto, estudar a influencia destes receptores na plasticidade sináptica após lesão nervosa periférica. Nossos resultados indicam efeitos opostos dos receptores TLR2 e TLR4. Nós demonstramos que a ausência de TLR4 acarreta maior perda de contatos sinápticos após lesão, sugerindo um papel protetor do TLR4 nos circuitos medulares.

Uma hipótese para explicar este resultado é que os receptores de TLR4 presentes no sistema nervoso central podem regular a activação da microglia no local de lesão (Lehnardt et al., 2010; Jack et al., 2005; Olson et al., 2004). Células gliais reativas estão envolvidas na modulação dos processos sinápticos, induzindo o deslocamento dos terminais pré-sinápticos de motoneurônios axotomizados (Aldskogius et al., 1999; Cullheim & Thams,

2007; Schiefer et al., 1999). Além disso, as células gliais reativas liberam interleucinas no local da lesão (Benveniste et al., 1990; Lee et al., 1993), podendo ser neuroprotetoras e influenciar na regulação positiva de neurotrofinas e outros factores de crescimento (John et al., 2005; Pinteaux et al., 2006). No entanto, a superexpressão de interleucinas pode ativar respostas inflamatórias, conduzindo à degeneração e perda neuronal (Hailer et al., 2005). Os resultados do presente estudo mostram que a sinalização de TLR4 não interferiu na reatividade glial. No entanto, a presença do receptor Toll like 4 aumentou a expressão do gene GDNF e diminuiu a expressão de IL6. Tais fatos, sugerem que a sinalização de TLR4 contribui para a preservação dos contatos sinápticos independentemente da expressão de MHC I.

Com relação aos efeitos opostos dos receptores Toll like 2 e Toll like 4 na preservação dos contatos sinápticos após axotomia periférica, acreditamos que isso deva-se a diferentes razões. Assim, como observado nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, a expressão do receptor Toll like 2 correlaciona-se com aumento da reatividade e proliferação astrogliar. Esta descoberta é particularmente interessante, uma vez que o aumento da reatividade astrogliar está relacionado com maior retração sináptica de terminais (Emirandetti et al., 2006). Portanto, é possível que a expressão TLR2 supera a importância da astrogliose no processo de destacamento sináptico. Tal resultado está de acordo com trabalhos que mostram a participação das células gliais no processo de eliminação sináptica após dano neuronal (Aldskogius et al., 1999; Emirandetti et al., 2006; Cullheim & Thams, 2007). Embora a reação microglial em nosso estudo não foi significativamente diferente entre as duas linhagens, a proteína MHC I foi co-localizada com o Iba-1, indicando que a microglia expressa MHC I após a axotomia. Além disso, nossos dados mostram aumento na

expressão da proteína e do gene MHC classe I em camundongos knockout. Como mencionado anteriormente, o MHC I desempenha um papel importante na manutenção dos terminais sinápticos (Oliveira et al., 2004). Portanto, camundongos transgênicos com maior expressão neuronal de MHC I apresentam melhor resultado regenerativo (Kim et al., 2007). Os resultados indicam que a expressão TLR2 supera MHC I em importância no que diz respeito à estabilidade sináptica, uma vez que camundongos TLR2^{-/-} exibiram altos níveis de MHC I, e consequentemente maior preservação dos contatos sinápticos. Este achado é importante, pois indica que o envolvimento de moléculas relacionadas ao sistema imunológico é ainda mais complexo e abrangente do que o anteriormente previsto.

Além disso, o TLR2 pode também influenciar na secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF α , IL-6 e quimiocinas, incluindo interferon gama, liberadas pela microglia e por astrócitos ativados (Kim et al., 2007). Os astrócitos são a principal fonte de IL-6 no SNC após lesão (Lee et al., 1993); em contrapartida, TNF- α e IL-1 β podem regular positivamente a produção de IL-6 por astrócitos (John et al., 2004). A ausência de TLR2 reduz a expressão de interleucinas pró-inflamatórias e, por sua vez, a ativação de microglia e astrócitos (Kim et al., 2007). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com este paradigma; pois camundongos knockout com reduzida reactividade astrogliar também apresentaram reduzidos níveis de mRNA para IL1 β e IL6.

Fatores neurotróficos como BDNF, que promove a regeneração axonal e sobrevivência em neurónios motores espinais após lesão (Boyd et al., 2003) também são capazes de modular a transmissão sináptica e regular os contatos sinápticos entre neurónios (Black et al., 1999; Novikov et al., 2000). Além disso, GDNF possui importante papel na regeneração axonal e de motoneurónios (Naveilhan et al., 1997; Boyd et al., 2003). No

presente estudo, os mRNAs de BDNF e GDNF foram regulados positivamente em camundongos knockout para TLR2, 1 semana após a lesão. Este fato sugere que a ausência de TLR2 consistentemente contribuiu para a preservação dos contactos sinápticos, apesar da expressão aumentada de MHC I.

Além da preservação dos contatos sinápticos, o equilíbrio entre os inputs excitatórios e inibitórios é crucial. Este conceito foi investigado no presente estudo por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Segundo Lindå et al., 2000 existe uma eliminação preferencial de terminais glutamatérgicos sobre terminais contendo glicina e GABA, após axotomia. Tal fato reflete a existência de uma resposta neuroprotectora frente à lesão, evitando os efeitos excitotóxicos. Embora nenhuma diferença tenha sido detetada em terminais glutamatérgicos, foi possível observar maior preservação de terminais inibitórios, do tipo F, em camundongos knockout. Além disso, camundongos TLR2^{-/-} apresentaram maior superfície de aposição dos terminais em contato com os motoneurônios, tanto em neurônios não lesados (contralaterais) quanto do lado lesado (ipsilaterais).

As alterações contralaterais à lesão constituem-se um achado ainda não totalmente compreendido. No sentido de melhor entender esse fato, realizamos uma avaliação da cobertura sináptica de animais mutantes e knockouts durante a primeira semana pós-natal, período onde ocorre grande eliminação sináptica na medula espinal. Contudo, alterações na sinalização de TLR4 e TLR2 não influenciaram na imunoreatividade para sinaptofisina, indicando que os animais transgênicos não apresentaram alterações significativas na densidade sináptica no período por nós estudado. Assim, é possível que tais alterações sinápticas no lado contralateral sejam uma resposta secundária à lesão, talvez envolvendo

brotamento de colaterais de neurônios internunciais de circuitos intramedulares. Assim, novos estudos serão necessários para compreender tal fenômeno.

7. Conclusões

- A presença do receptor TLR4 preserva os terminais sinápticos, independentemente da expressão de MHC-I e da reatividade glial;
- A presença de TLR4 aumenta a expressão do fator neurotrófico GDNF e diminui a expressão de genes pró-inflamatórios como IL6;
- Os receptores Toll Like 2 e Toll Like 4 têm pouca influência sobre a reatividade microglial após lesão periférica.
- A ausência do receptor Toll like 2 preserva contatos sinápticos, correlacionado-se com aumento da expressão de MHC I no lado ipsilateral à lesão.
- Camundongos com ausência do receptor TLR2 apresentam menor reatividade astrogliar e, conseqüentemente, menor expressão de genes pró-inflamatórios;
- A ausência de TLR2 aumenta a expressão de genes para fatores neurotróficos como BDNF e GDNF.

Efeitos antagônicos dos receptores Toll like 2 e 4 na lesão nervosa periférica e na recuperação funcional após lesão do nervo isquiático

1. Resumo

Lesão de nervos periféricos desencadeia uma série de processos que resultam na perda de variadas funções motoras e sensoriais. A recuperação de tais funções depende dos eventos celulares e moleculares inicialmente ligados à degeneração Walleriana, um processo inflamatório que tem a função de preparar o ambiente do nervo distal à lesão para receber os brotamentos axonais em regeneração. Evidências mostram que os receptores Toll-like são expressos na superfície de células de Schwann, ativando a resposta inata e, conseqüentemente, atuando no curso da regeneração periférica (Boivin et al., 2007; Goethals et al., 2010). Desse modo, o presente estudo teve por objetivo analisar o papel dos receptores TLR2 e TLR4 na regeneração e recuperação funcional após lesão de nervo periférico. Dessa forma, 58 animais (13 C3H/HeJ, 13 C3H/HePas; 16 C57Bl/6J e 16 TLR2^{-/-}) foram submetidos ao esmagamento unilateral do nervo isquiático. Após 3, 7 e 14 dias e 5 semanas de cirurgia, parte dos animais foram anestesiados e sacrificados por perfusão transcardíaca. Os nervos isquiáticos foram processados para imunoistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para análise funcional, 20 animais (5 C3H/HeJ, 5 C3H/HePas, 5 C57Bl6/J e 5 TLR2^{-/-}) foram acompanhados no treino de marcha até 8 semanas após lesão. Os resultados mostraram que os animais C3H/HeJ apresentam rápida recuperação funcional acompanhada por maior expressão de p75NTR e neurofilamentos comparativamente ao grupo C3H/HePas. Entretanto, tal recuperação funcional não foi, provavelmente, consequência de aumento no número de fibras mielínicas

ou aumento na espessura das fibras mielinizadas. Interessantemente, a melhor recuperação motora nos animais mutantes pode estar relacionada a um aumento no número de junções neuromusculares. . Já os resultados em animais TLR2 knockout mostraram que a ausência de Toll like 2 teve influência negativa na reorganização do microambiente do nervo. Assim, o grupo controle apresentou superior expressão de p75NGFR e neurofilamentos no segmento distal do nervo isquiático. Por outro lado, foi observado, na análise ultraestrutural, um aumento da espessura da bainha em axônios regenerados de animais knockout, apesar de uma igual recuperação funcional em ambos os grupos, após 8 semanas da lesão. Assim, nossos resultados mostram efeitos opostos dos receptores TLR4 e TLR2 na reorganização e velocidade de recuperação após lesão periférica. Por um lado, a ausência de TLR4 funcional leva a um aumento transitório do sucesso regenerativo. Por outro lado, a falta de TLR2, de maneira geral, parece ser compensada por outros mecanismos, não comprometendo o resultado final da recuperação funcional.

2. Introdução

Nervos periféricos são frequentemente lesados em acidentes automobilísticos, quedas, fraturas, acidentes de trabalho ou em esportes de alto impacto. Assim, quando o axônio é desconectado do corpo celular seu segmento distal gradualmente se degenera e, eventualmente, é reabsorvido, evento denominado degeneração Walleriana (Ide, 1996). Concomitantemente com a fragmentação da bainha de mielina e dos axônios lesados presentes no segmento distal ocorrem o recrutamento de macrófagos e a proliferação das células de Schwann (Hörste et al., 2007).

A regeneração axonal ocorre a partir dos nós de Ranvier próximos ao sítio da lesão, emergindo da porção proximal à injúria, com crescimento em direção ao segmento distal do nervo. As bandas de Büngner são formadas após as bainhas de mielina e axônios em degeneração serem removidos pelos macrófagos e pelas próprias células de Schwann. As bandas de Büngner promovem um ambiente favorável ao crescimento axonal sendo fundamentais para a regeneração axonal (Ide, 1996). Da mesma forma, as células de Schwann são elementos não neurais importantes para o reparo do SNP. Influenciam o processo regenerativo provendo fatores de crescimento como o NGF, BDNF, CNTF e GDNF, dando suporte e orientação ao crescimento axonal e, ainda, servem como interface entre axônios e o microambiente endoneural (Ide, 1996; Chen et al., 2007).

O Sistema Nervoso Periférico (SNP) apresenta uma maior capacidade regenerativa quando comparado ao Sistema Nervoso Central (SNC). Entretanto, em lesões graves, o reparo completo é raro e a recuperação funcional é precária (Ide, 1996; Pereira Lopes et al., 2006). Assim, o sucesso da regeneração nervosa periférica depende muito dos eventos celulares e moleculares da degeneração Walleriana. Ainda, a imunidade inata é crucial para o curso da degeneração Walleriana, uma vez que as células do sistema imune ajudam a transformar o tecido nervoso periférico em um ambiente favorável à regeneração (Gaudet et al., 2012). Evidências sugerem que receptores toll-like são fatores determinantes na ativação de respostas neuroinflamatórias no sistema nervoso após lesão. De acordo com Goethals et al. (2010), as células de Schwann expressam níveis relativamente elevados de TLRs, que podem reconhecer peptídeos endógenos resultantes da degeneração nervosa, sendo assim capazes de recrutar macrófagos que farão a fagocitose dos restos celulares. Os

macrófagos são responsáveis por fagocitar, processar e apresentar antígenos para as células T. São fundamentais para a remoção dos axônios em degeneração, contribuindo para a formação das bandas de Büngner, que promovem o crescimento axonal e a reconexão dos cotos proximal e distal (Sanders & Jones, 2006). A remoção da mielina degenerada é crítica para a reparação no SNP, uma vez que esta contém moléculas que inibem a regeneração dos axônios em crescimento (Fawcett et al., 1997). Descobertas recentes demonstraram que a deficiência na sinalização de TLR gera um atraso no recrutamento de macrófagos e, portanto, uma falha nos processos regenerativos do nervo e na função motora (Boivin et al., 2007). Por outro lado, a ativação de TLR2 ou TLR4, no SNC, acelera a fagocitose de fragmentos de mielina, promovendo melhor recuperação das funções nervosas periféricas (Kigerl et al., 2007). Tal evento, no SNC, é bastante relevante, uma vez que as lesões periféricas desencadeiam respostas retrógradas como a reatividade glial, que pode influenciar na amenização ou amplificação do processo cromatolítico que ocorre nos corpos dos neurônios medulares axotomizados. Dessa forma, tais ocorrências no SNC, indiretamente, influenciam na capacidade regenerativa dos neurônios após lesão periférica (Aldskogius & Kozlova, 1998).

Diante deste contexto, os receptores Toll Like, que tradicionalmente estão associados com mecanismos imunológicos, também podem desempenhar importante papel na plasticidade do SN. Logo, é de grande importância a compreensão destes processos, a fim de viabilizar novas terapias e estratégias capazes de otimizar a regeneração nervosa periférica.

3. Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial regenerativo axonal em camundongos C3H/HePas, C3H/HeJ, C57BL/6J e TLR2^{-/-}; por meio de imunoistoquímica após 2 semanas de esmagamento do nervo isquiático.
- Avaliar o potencial regenerativo axonal em camundongos C3H/HePas, C3H/HeJ, C57BL/6J e TLR2^{-/-}, por meio de contagem de fibras regeneradas, em degeneração e regeneração, 2 semanas após o esmagamento do nervo isquiático.
- Análise morfométricamente as fibras mielínicas em camundongos C3H/HePas, C3H/HeJ, C57BL/6J e TLR2^{-/-}, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, 2 semanas após o esmagamento do nervo isquiático.
- Análisar a recuperação funcional do nervo isquiático em animais TLR4 e TLR2, através do sistema Cat Walk, até 8 semanas após esmagamento do nervo.

4. Materiais e Métodos

4.1 Grupos de animais

Foram utilizados camundongos adultos machos (6-8 semanas de idade) obtidos a partir do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB / Unicamp): C3H/HePas (selvagem, n = 18), C3H/HeJ (mutante, n = 18), C57BL/6J (selvagem, n = 21) e TLR2^{-/-} (knockout n = 21).

4.2 Procedimento cirúrgico

Para o esmagamento do nervo, foi utilizada uma pinça nº 4, empregando-se uma pressão constante durante 10 segundos de forma padronizada para todos os animais (Xin et al., 1990). Um ponto cirúrgico no tecido muscular adjacente ao local do esmagamento foi realizado para marcação do local a ser removido para análise. Por fim, após procedimento cirúrgico de esmagamento, a musculatura foi reposicionada e a pele suturada. Os camundongos foram mantidos em biotério até o término do experimento.

4.3 Processamento dos tecidos

Após período determinado conforme a tabela 3, todos os animais foram sacrificados com dose letal de anestésico e, em seguida, submetidos à perfusão transcardíaca.

Os animais C57BL/6J (n=15); TLR2^{-/-} (n=15); C3H/HePas (n=15) e C3H/HeJ (n=15) foram sacrificados 2 semanas após a lesão. Os nervos ipsi e contralaterais foram processados para imunoistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão conforme protocolo anteriormente citado.

Parte dos animais C57BL/6J (n=3) e TLR2^{-/-} (n=3) foram sacrificados 3 dias e 7 dias após a lesão de esmagamento. Os nervos dissecados foram processados para imunoistoquímica segundo protocolo já mencionado.

Outro grupo de animais C3H/HePas (n=3) e C3H/HeJ (n=3) foi sacrificado 5 semanas após lesão periférica e os músculos tibiais anteriores foram processados para análise de imunoistoquímica. Para isso, os animais foram perfundidos primeiramente com salina e em

seguida com fixador formalina 4%. Após perfusão os músculos tibial anterior ipsi e contralaterais foram dissecados e colocados em tampão fixador por 12 horas. Após 3 lavagens de 5 minutos em tampão fosfato pH 7,40, os espécimes foram imersos em tampão contendo sacarose 30% por 1 dia. Em seguida, os músculos foram congelados a - 40°C em meio de congelamento (TissueTek). Secções de 18µm do músculo tibial anterior foram obtidas em criostato e as lâminas foram estocadas em freezer à -20°C até sua utilização.

<i>Grupo de animais</i>	<i>Período Sacrifício após lesão</i>	<i>Tecido processado e técnica realizada</i>
C3H/HePas	2 semanas	(Nervo) MET e Imunoistoquímica
	5 semanas	(Músculo) Imunoistoquímica
C3H/HeJ	2 semanas	(Nervo) MET e Imunoistoquímica
	5 semanas	(Músculo) Imunoistoquímica
C57BL/6J	3 dias	(Nervo) Imunoistoquímica
	7 dias	(Nervo) Imunoistoquímica
	14 dias	(Nervo) MET e Imunoistoquímica
TLR2 ^{-/-}	3 dias	(Nervo) Imunoistoquímica
	7 dias	(Nervo) Imunoistoquímica
	14 dias	(Nervo) MET e Imunoistoquímica

Tabela 4: Grupos experimentais utilizados nos diferentes experimentos, indicando o período do sacrifício, tecidos processados e as técnicas utilizadas para cada análise.

4.4 Imunoistoquímica

Para as imunomarcações foram utilizados os anticorpos anti- p75^{NTR}, neurofilamentos, Iba-1 e alfa-bungarotoxina. As imunomarcações foram observadas e documentadas utilizando o microscópio de fluorescência invertido (Nikon-Eclipse TS100) conectado a um sistema de aquisição de imagens (câmera Nikon DXM1200F e programa de captura de imagens Metamorph). Para a análise qualitativa, foram selecionadas imagens

representativas de cada espécime para os grupos C3H/HePas; C3H/HeJ, C57BL/6J e TLR2^{-/-}.

Para análise quantitativa de macrófagos reativos foi calculada a densidade integrada de pixels de 3 imagens representativas do segmento proximal e distal do nervo nos grupos C57BL/6J e TLR2^{-/-}. A densidade integrada de pixels foi obtida numa mesma área de 0,025 mm², padronizada para todas as figuras analisadas.

4.5 Quantificação das junções neuromusculares após regeneração do nervo isquiático.

Cortes congelados longitudinais com 18 µm de espessura do músculo tibial anterior ipsi e contralateral à lesão foram imunomarcados com anticorpo anti- α - bungarotoxina conjugado com CY3 coelho. Já a marcação de miosina foi observada através da técnica de segunda harmônica (second harmonic generation - SHG), usando microscopia confocal a laser. Toda a extensão do músculo foi obtida em microscópio de fluorescência invertido conectado a um sistema de aquisição de imagens. As imagens foram montadas e um programa vetorial, completando toda a extensão do músculo. As junções neuromusculares, imunorreativas aos receptores de acetilcolina, foram quantificados nos lados ipsi e contralateral dos grupos C3H/HePas e C3H/HeJ.

4.6 Análise das secções ultra-finas do nervo por microscopia eletrônica de transmissão.

Cortes ultra-finos das porções distais dos nervos isquiático dos lados ipsi e contralaterais foram digitalizados em um microscópio eletrônico de transmissão Spirit BioTwin G2 (FEI Company, Holanda) em um aumento de 1700X, com uma câmera de alta resolução (Eagle 2K, FEI Company, Holanda). Vinte e cinco imagens, equivalendo aproximadamente 50% da área total do nervo, foram capturas e montadas sequencialmente por meio do software photomontage (FEI Company, Holanda). Nos lados ipsilaterais do nervo isquiático foram quantificados o número de fibras degeneradas, mielínicas e amielínicas.

As imagens, correspondendo 50% da área do nervo, foram utilizadas para a análise morfométrica dos axônios nos lados ipsi e contralateral. Assim, as medidas do diâmetro das fibras e dos axônios mielínicos foram obtidas a partir dos valores dos respectivos perímetros (P), aplicando-se a fórmula $D=P/\pi$. A diferença entre o diâmetro das fibras mielínicas [DFM] e o diâmetro dos axônios mielínicos [DAM] dividido por 2, forneceu a espessura da bainha de mielina [EBM] (Mayhew & Sharma, 1984). A Razão “g” (RZG), correspondente ao quociente entre DAM e DFM ($RZG = DAM/DFM$), é um parâmetro morfométrico que expressa a regeneração funcional do nervo (Smith & Koles, 1970) e também foi calculado.

4.7 Análise funcional do nervo isquiático.

Foram realizadas avaliações motoras semanais em todos os animais dos grupos experimentais (C3H/HePas, C3H/HeJ, C57BL/6J e TLR2^{-/-}) antes do esmagamento e até a

8ª semana pós-lesão. Após o esmagamento do nervo isquiático, os animais foram avaliados duas vezes por semana através do “walking track test” (CatWalk, Noldus Inc., Holanda).

Para a avaliação da marcha, os animais foram colocados para andar ao longo de uma passarela com um assoalho de vidro (100 cm comprimento x 15 cm largura x 0.6 cm espessura) localizado em uma sala escura (Figura 28A). Uma lâmpada fluorescente destacou somente a pressão das patas dos animais em contato com o assoalho de vidro (Figura 28-B). O assoalho desse corredor é monitorado por uma câmera equipada com uma objetiva grande angular capaz de detectar a média de intensidade em pixels. A intensidade do sinal variou de acordo com a pressão aplicada pela pata do animal. Quanto maior a pressão exercida pela pata do animal, maior o contato e intensidade em pixels. Esses sinais foram digitalizados pelo programa CatWalk (Noldus Inc., Holanda). As medições foram feitas de acordo com os seguintes parâmetros:

1- intensidade da pressão exercida pela pegada

2- índice de recuperação motora do nervo isquiático.

As medições foram feitas de acordo com dois parâmetros: a distância entre o primeiro e o quinto dedo (toe spread, TS) e a distância entre o terceiro dedo e o calcanhar (print length, PL). Estes parâmetros foram utilizados para a medição das pegadas das patas posterior direita (lesada) e posterior direita (normal) e os valores foram utilizados na seguinte fórmula, descrita por DeMedinaceli *et al* (1982): $SFI = 118.9 (ETS \ NTS/NTS) - 51.2(ELP - NLP/NLP) - 7.5 (E = \text{lado lesionado}, N = \text{lado normal})$.

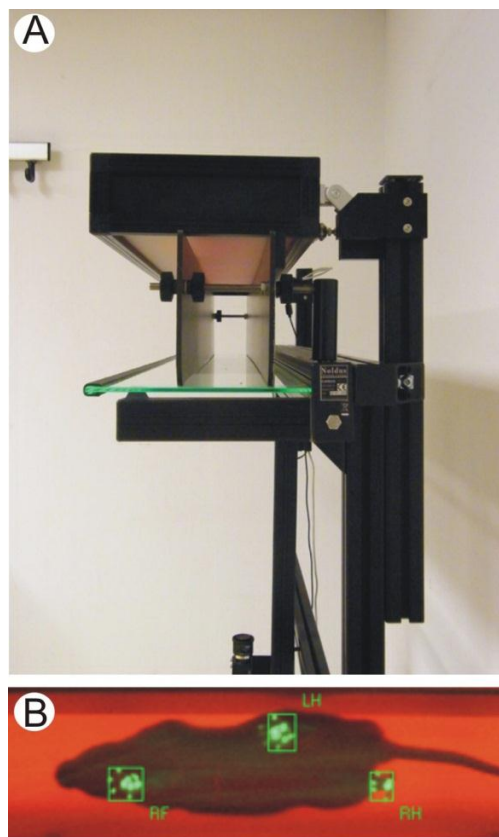


Figura 28: A- Imagem do equipamento CatWalk, B- Imagem ilustrando as pegadas capturadas pelo equipamento.

4.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através dos testes *U* de Mann Whitney e *t* de Student para dados não paramétricos e paramétricos respectivamente, assumindo-se $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

5. Resultados

5.1 A ausência do receptor TLR4 aumentou a expressão do receptor de baixa afinidade para neurotrofinas no microambiente do segmento distal à lesão

Os resultados qualitativos das imunomarcações dos nervos submetidos ao esmagamento estão representados na Figura 29. Observa-se que os camundongos com ausência do receptor TLR4 possuem maior expressão de p75^{NTR} e neurofilamentos no segmento distal do nervo lesionado. O aumento da expressão destes fatores sugere maior capacidade regenerativa axonal (Figura 29-J; K; L).

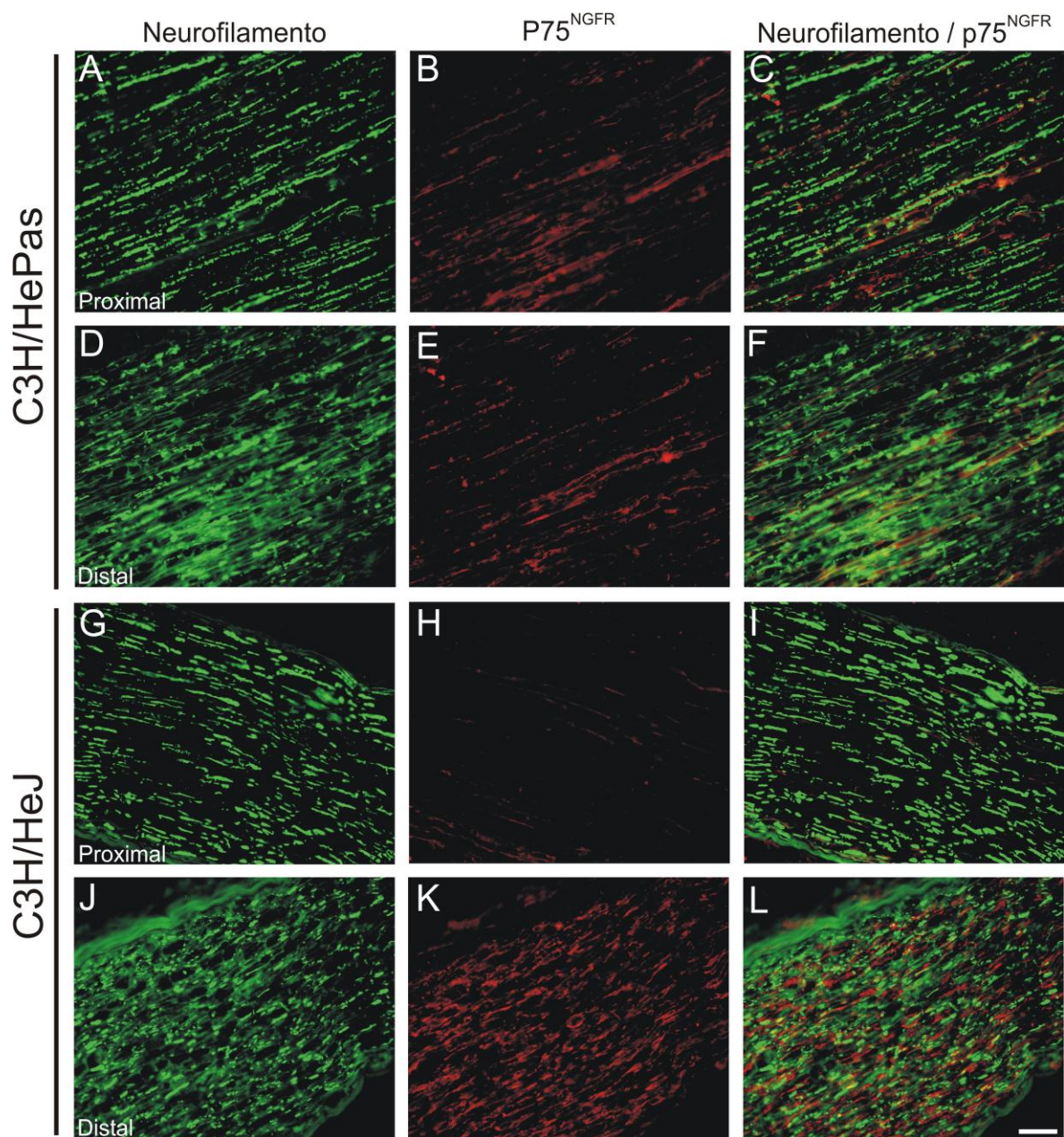


Figura 29: Imunomarcação das secções longitudinais nos segmentos proximal e distal dos nervos isquiáticos após 2 semanas de esmagamento. (A-C) Segmento proximal C3H/HePas, (D-F) segmento distal C3H/HePas, (G-I) segmento proximal C3H/HeJ, (J-L) segmento distal C3H/HeJ. (A,D,G,H) anti-neurofilamento, (B,E,H,K) anti-p75^{NTR}; (C,F,I,L) neurofilamento/p75^{NTR}. Note maior expressão de neurofilamento e NGF-R no segmento distal do grupo C3H/HeJ. Barra de escala= 50µm.

5.2 A ausência do receptor Toll like 4 não interfere no número e nos diferentes tipos de fibras nervosas após axotomia.

Imagens de ultraestrutura do nervo estão representadas na Figura 30 (A-D). A contagem de axônios degenerados, mielínicos e amielínicos está representada pelo gráfico Figura 30E. As quantificações mostraram que não houve diferenças significativas nos números de axônios mielínicos, amielínicos e degenerados (C3H/HePas $765 \pm 88,73$; $215,8 \pm 6,81$; $70 \pm 7,23$, C3H/HeJ $660 \pm 73,94$; $233 \pm 16,26$; $63,6 \pm 5,24$ número de fibras amielínica, mielínicas e degeneradas respectivamente $\pm$ erro padrão). A aparente diferença dos diâmetros das fibras observadas entre os grupos, Figura 30 C-D, foi analisada pela morfometria axonal.

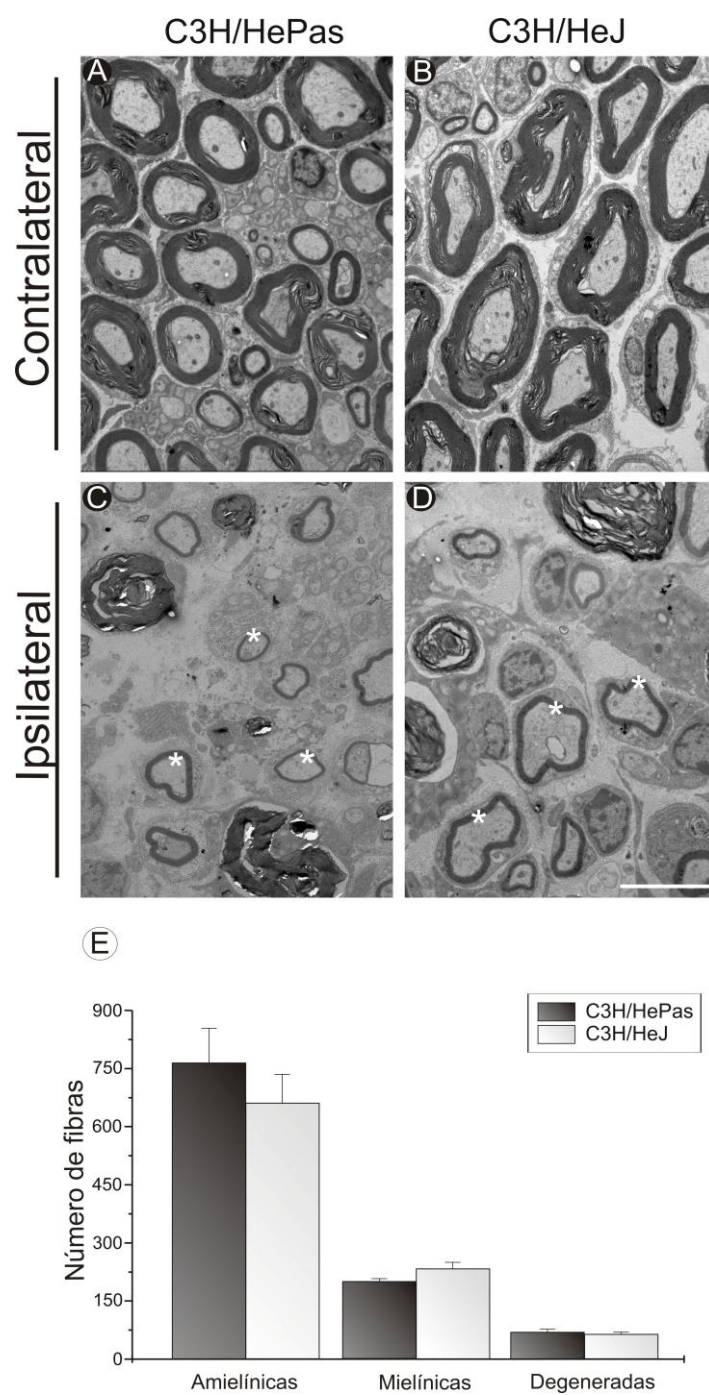


Figura 30: Imagens de ultraestrutura do nervo isquiático dos grupos C3H/HePas e C3H/HeJ (A-D). (A,B) Lados contralaterais 2 semanas após lesão de esmagamento. (C-D) Lados ipsilaterais após 2 semanas de lesão. (E) Gráfico da quantificação do número de fibras mielínicas, amielínicas e degeneradas. Asteriscos indicam fibras mielínicas. Barra de escala= 5 μ m.

5.3 A ausência do receptor Toll like 4 não interfere no diâmetro das fibras mielínicas antes e após lesão.

A análise morfométrica das fibras mielínicas (DFM), axônios (DAM) e espessura da bainha de mielina (EBM) foi realizada nos lados ipsi e contralaterais à lesão nos grupos C3H/HePas e C3H/HeJ (Figuras. 31, 32 e 33). Os animais C3H/HePas e C3H/HeJ apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando de 3,25 a 8,75 μm e médias $7,55\pm0,39$ e $6,67\pm0,46$ respectivamente. Para o diâmetro dos axônios mielínicos foi observado, nos grupos C3H/HePas e C3H/HeJ, diâmetro variando de 1,75 a 6,25 μm e médias $9,45\pm1,38$ e $8,78\pm0,90$ respectivamente. Já a EBM variou de 0,35 a 1,35 μm e médias de $6,73\pm0,57$ e $7,90\pm0,54$ respectivamente. Desse modo, observa-se que a presença do receptor TLR4 não influenciou nos parâmetros morfométricos de DFM, DAM e EBM nos nervos contralaterais à lesão nos grupos C3H/HePas e C3H/HeJ.

Após lesão, os animais C3H/HePas e C3H/HeJ apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando de 1 a 6 μm e médias $2,85\pm0,107$ e $3,02\pm0,097$, respectivamente. As maiores porcentagens de fibras foram observadas nos intervalos de 2,25 a 3,75 μm , correspondendo a 34,47% e 30,94% do total de fibras respectivamente. Neste, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos. Do mesmo modo, não foi observada diferença estatística para o DAM. Assim, o DAM em animais C3H/HePas e C3H/HeJ variou de 1,75 a 3,25 μm e médias $2,26\pm0,078$ e $2,38\pm0,092$, respectivamente. A EBM variou de 0,05 a 1 μm e média $0,292\pm0,014$ e $0,316\pm0,008$, respectivamente nos animais C3H/HePas e C3H/HeJ. As maiores porcentagens de fibras foram observadas no

intervalo de 0,175 a 0,375, correspondendo a 38,09% e 33,23% do total de fibras, não sendo observado, portanto, diferença significativa entre os grupos (Figura 31).

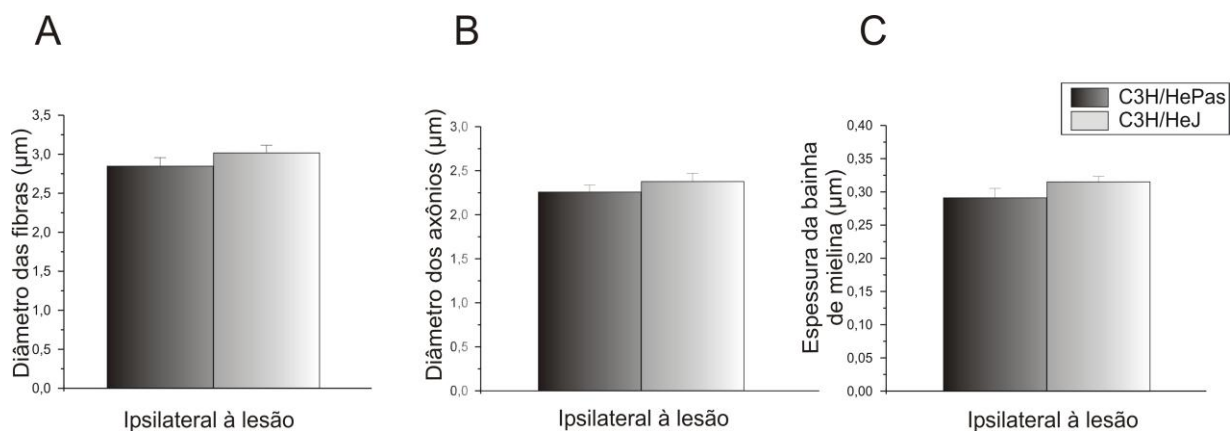


Figura 31: Gráficos correspondentes à análise morfométria dos axônios mielínicos lesados para os grupos C3H/HePas e C3H/HeJ (A) Gráfico da média do diâmetro das fibras mielínicas. (B) Gráfico da média do diâmetro dos axônios mielínicos. (C) Gráfico da média da espessura da bainha mielínica (EBM). Note que não houve diferença significativa entre os grupos.

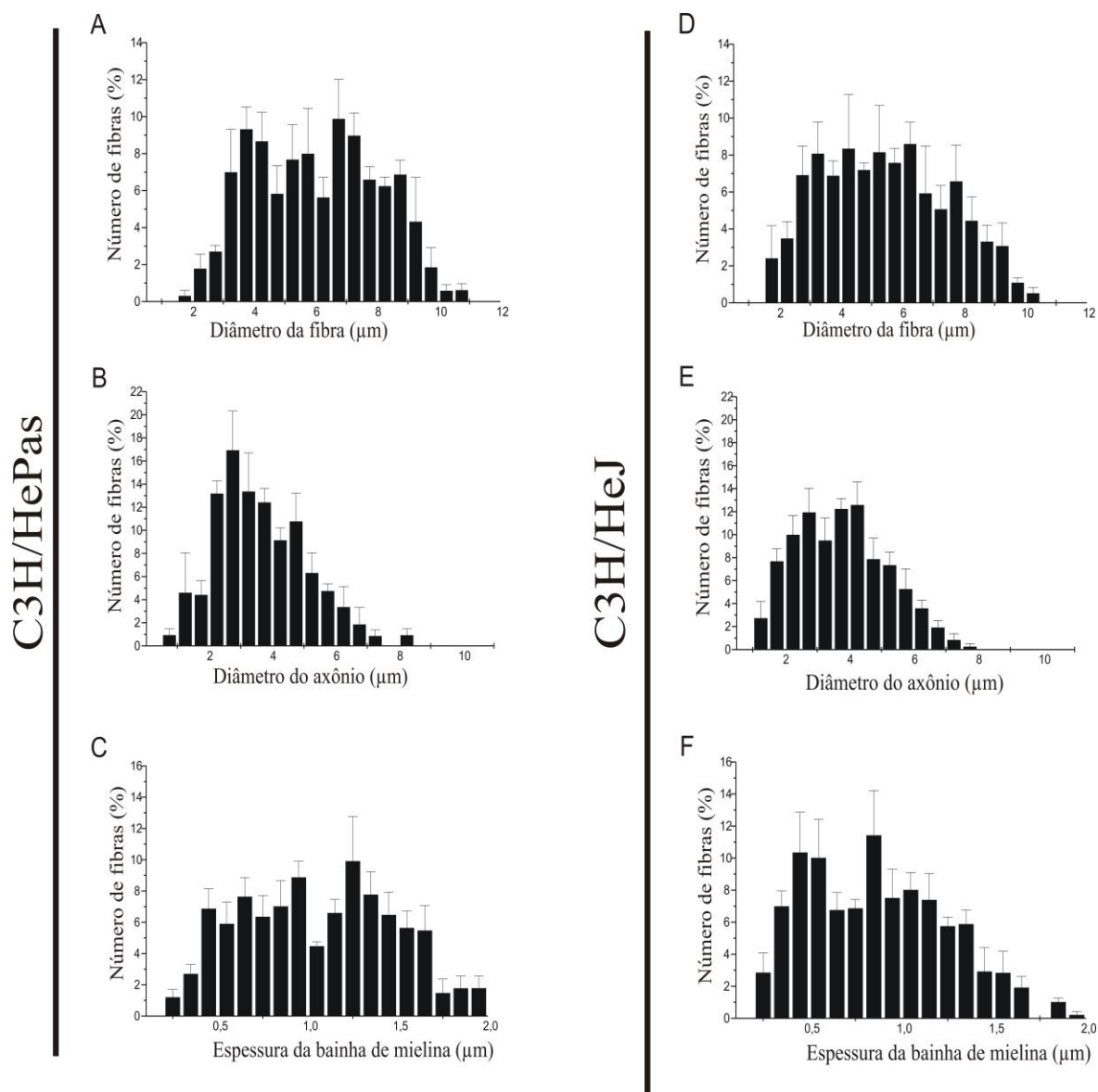


Figura 32: Gráficos de distribuição de frequência para as fibras mielínicas dos grupos C3H/HePas (A,B,C) e C3H/HeJ (D,E,F) contralateral à lesão. (A e D) Gráfico de distribuição de frequência do diâmetro das fibras mielínicas. (B e E) Gráfico de distribuição de frequência do diâmetro dos axônios mielínicos. (C e F) Gráfico de distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina (EBM).

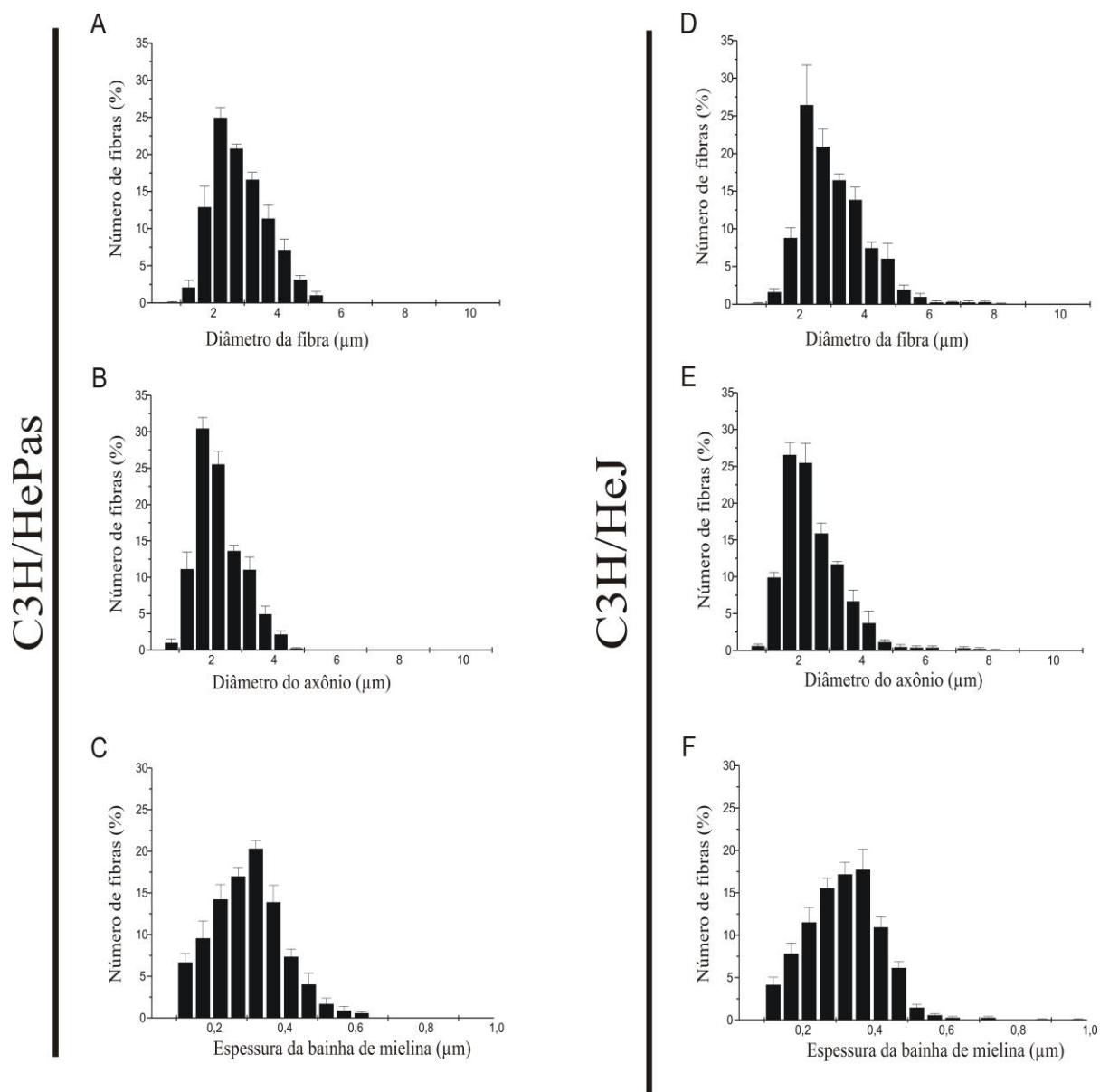


Figura 33: Gráficos de distribuição de frequência para as fibras mielínicas dos grupos C3H/HePas (A,B,C) e C3H/HeJ (D,E,F) após lesão. (A e D). Gráfico de distribuição de frequência do diâmetro das fibras mielínicas. (B e E). Gráfico de distribuição de frequência do diâmetro dos axônios mielínicos. (C e F). Gráfico de distribuição de frequência da espessura da bainha mielíca (EBM).

5.4 Camundongos com deficiência no receptor Toll like 4 apresentam recuperação funcional mais precoce.

Os resultados quantitativos das avaliações motoras realizadas semanalmente nos grupos experimentais (C3H/HePas e C3H/HeJ) antes do esmagamento e até a 8ª semana pós-lesão estão representados na Figura 34 (A-B). Na Figura 34-A, o gráfico representa o índice funcional do nervo isquiático. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos no final do processo regenerativo, observa-se que o grupo C3H/HeJ apresentou melhor desempenho motor a partir da 5ª semana e recuperação motora total na 6ª semana. Por outro lado, o grupo C3H/HePas obteve recuperação funcional tardia comparado ao mutante.

Os resultados da razão do máximo contato das patas traseiras, em relação às patas ipsi e contralaterais à lesão, estão representados na Figura 34-B. Nota-se que o grupo C3H/HeJ apresentou, a partir da 4ª semana, maior contato das patas e, significativa diferença comparada ao grupo controle na 5ª e 6ª semana (C3/HePas 1ª semana 27,44%±5,49%; 2ª semana 75,29%±5,3%; 3ª semana 73,24%±4,41%; 4ª semana 77,31%±3,81%; 5ª semana 80,86%±4,01%; 6ª semana 82,06%±2,43%; 7ª semana 88,71%±10,19%; 8ª semana 87,29%±3,03%, C3H/HeJ 1ª semana 21,72%±6,16%; 2ª semana 58,36%±12,92%; 3ª semana 73,42%±5,77%; 4ª semana 88,42%±8,19%; 5ª semana 114,24%±6,65%; 6ª semana 112,85%±4,45%; 7ª semana 113,49%±2,68%; 8ª semana 107,04%±5,52%; razão máximo contato das patas traseiras ipsi/contralateral ± erro padrão). Desse modo, sugere-se que os animais C3H/HeJ apresentam recuperação funcional mais rápida, comparativamente ao C3H/HePas. Logo, a ausência do receptor Toll like 4 tem um efeito positivo no SNP, favorecendo o restabelecimento da inervação após axotomia periférica.

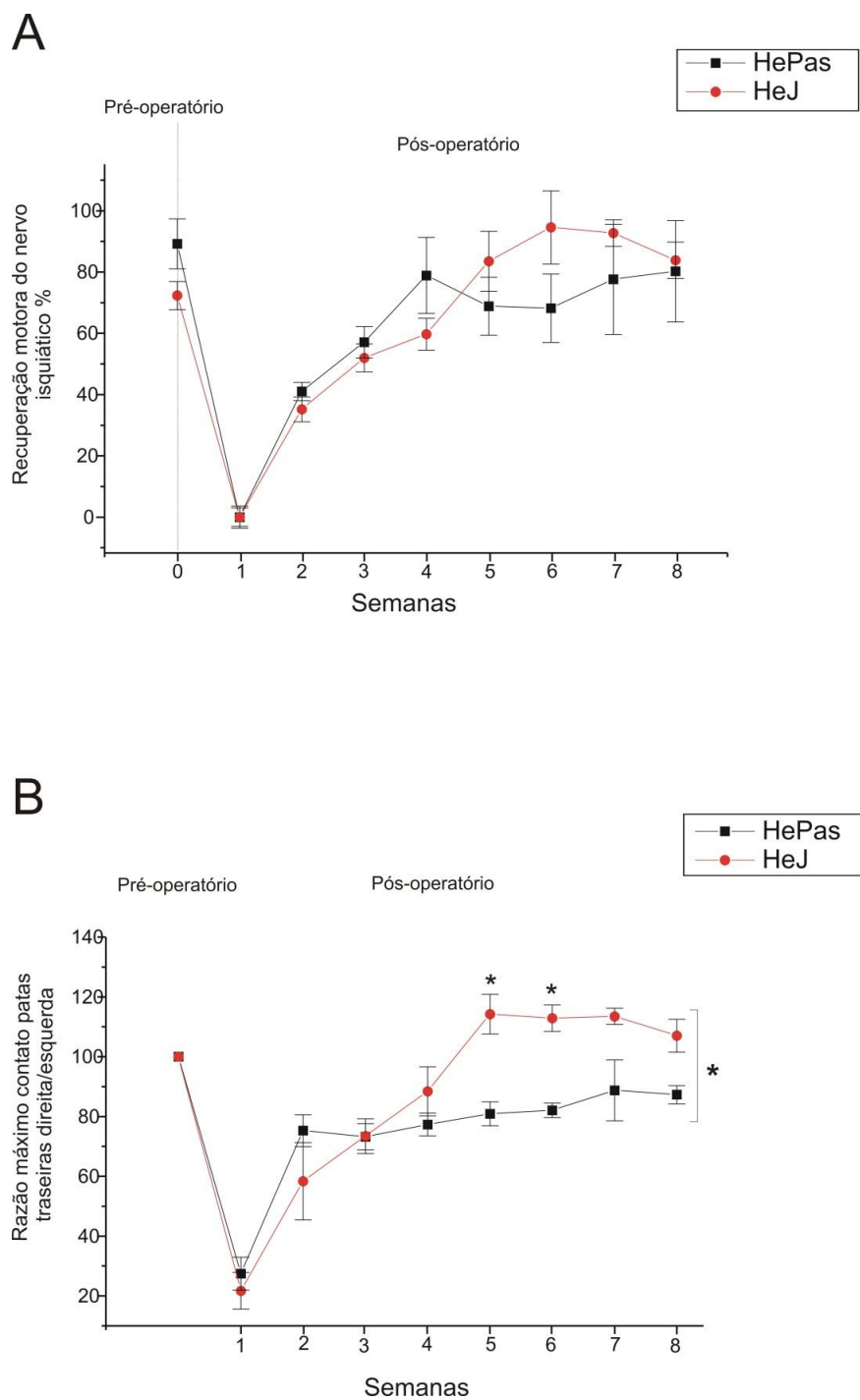


Figura 34: Gráfico da avaliação motora, em porcentagem, dos grupos C3H/HePas e C3H/HeJ. **(A)** Gráfico de recuperação motora do nervo isquiático, em porcentagem. **(B)** Gráfico da razão de máximo contato das patas traseiras direita/esquerda.

5.5 Camundongos com deficiência no receptor Toll like 4 apresentam maior número de junções neuromusculares no músculo tibial anterior, após lesão periférica.

Os terminais nervosos do músculo tibial anterior contra e ipsilateral à lesão foram imunomarcados em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ empregando-se um anticorpo anti- α - bungarotoxina (Figura 35 A,B,D,F). Os resultados quantitativos mostraram aumento do número de junções neuromusculares em animais C3H/HeJ após lesão (Músculo tibial anterior esquerdo C3H/HePas $59,03 \pm 6,30$; C3H/HeJ $60,83 \pm 7,31$ Figura 35-H). Estes resultados sugerem que ausência do receptor Toll like 4 promove maior brotamento de terminais axonais motores, resultando em um aumento no tamanho das unidades motoras. Porém, nenhuma diferença foi observada no músculo tibial anterior contralateral à lesão (músculo tibial anterior direito C3H/HePas $38,17 \pm 1,42$; C3H/HeJ $45,67 \pm 1,96$).

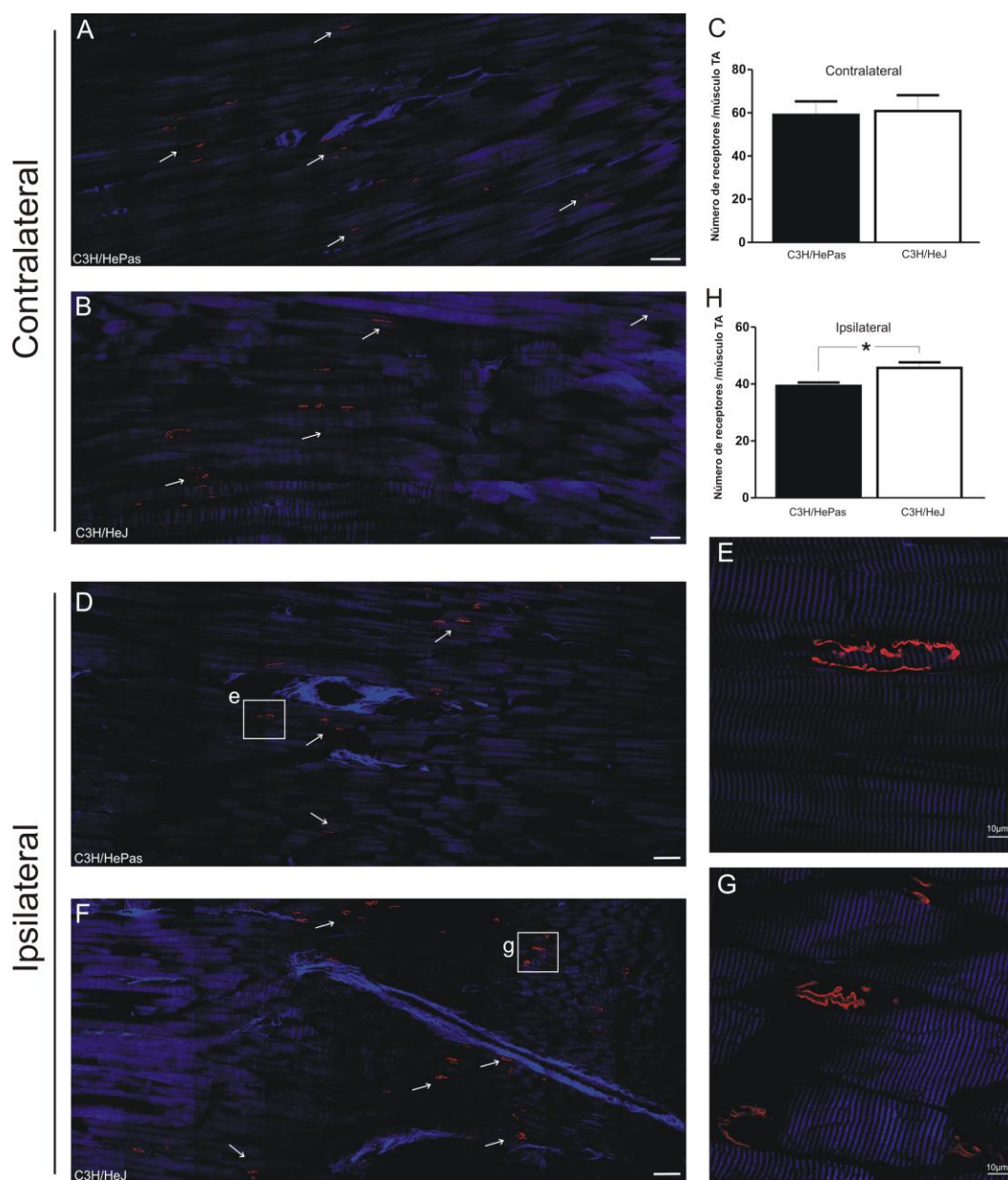


Figura 35: Imunomarcção de junções neuromusculares, imunoreativas a anti- alfa bungarotoxina, no músculo tibial anterior de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ. (A e B) músculos tibiais anteriores contralaterais à lesão. (D e F) músculos tibiais anteriores ipsilaterais à lesão. Caixas brancas em (D e F) representam as imagens ampliadas em (E) e (G). (C) Gráfico do número de receptores por músculo contralateral à lesão. (H) Gráfico quantitativo do número de receptores por músculo ipsilateral à lesão. Miosina marcada em azul através da técnica de segundo harmônico laser confocal. Setas brancas indicam conjuntos de receptores de acetilcolina na junção neuromuscular. Barra de escala= 100 µm.

5.6 A ausência do receptor TLR2 diminui a expressão do receptor de baixa afinidade para neurotrofinas no microambiente do segmento distal à lesão.

Os resultados qualitativos das imunomarcações dos nervos submetidos ao esmagamento estão representados na Figura 36. Observa-se que os camundongos com ausência do receptor TLR2 possuem menor expressão de p75^{NTR} e neurofilamentos no segmento distal do nervo lesionado. Tal fato pode ser relacionado com menor capacidade regenerativa axonal (Figura 36-D; E; F).

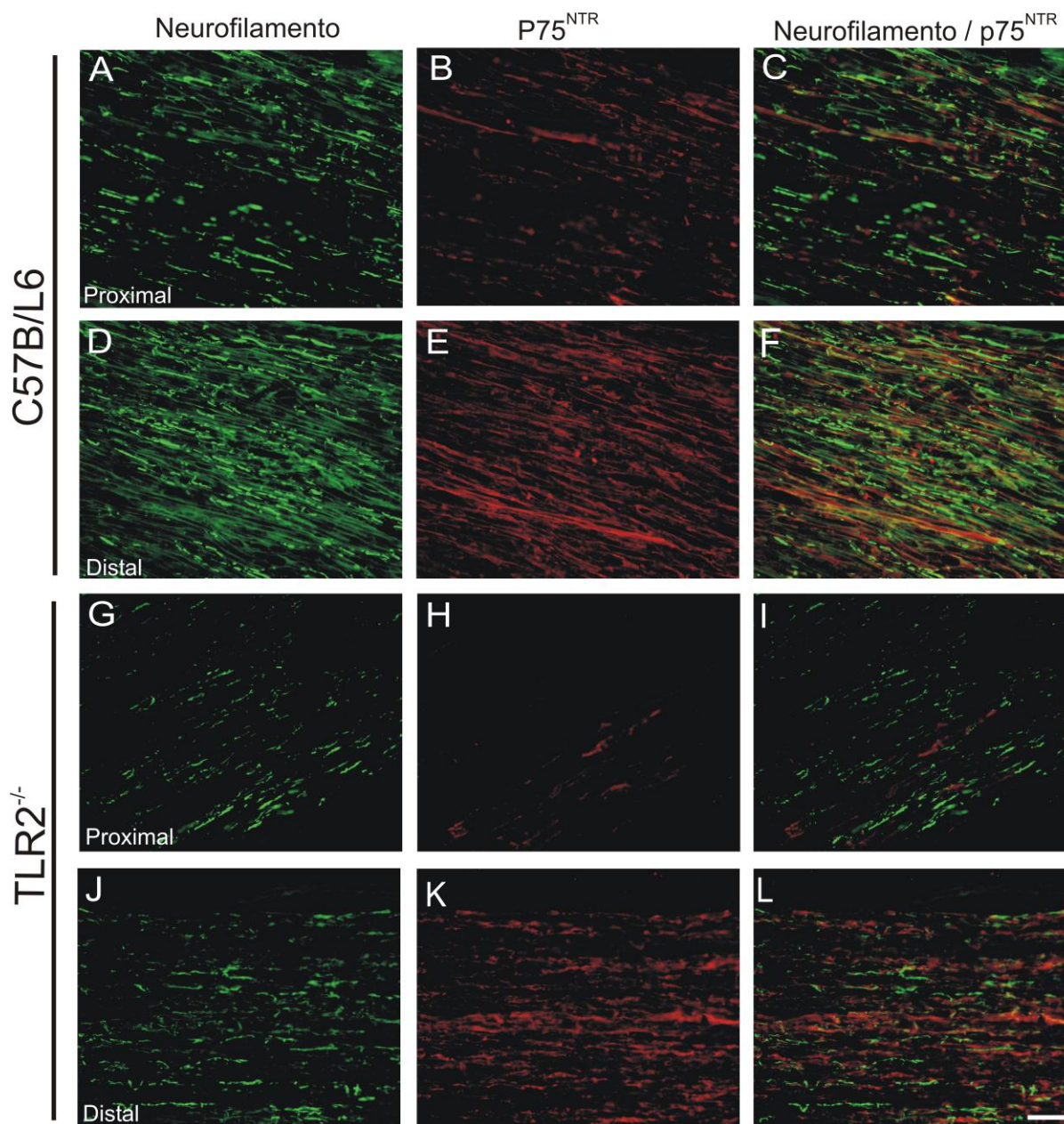


Figura 36: Imunomarcacão de secções longitudinais nos segmentos proximal e distal dos nervos isquiáticos após 2 semanas de esmagamento. (A-C) Segmento proximal, na região da lesão, grupo C57BL/6J, (D-F) segmento distal grupo C57BL/6J, (G-I) segmento proximal grupo TLR2^{-/-}, (J-L) segmento distal grupo TLR2^{-/-}. (A,D,G,J) anti-neurofilamentos, (B,E,H,K) anti- p75^{NTR}, (C,F,I,L) dupla marcação anti-neurofilamento + p75^{NTR}. Note maior imunorreatividade anti-neurofilamentos e p75^{NTR} no segmento distal do nervo no grupo controle (C57BL/6J). Barra de escala 50µm.

5.7 Animais com ausência do receptor TLR2 não apresentam atraso no recrutamento de macrófagos no segmento proximal ou distal à lesão.

Os resultados qualitativos das imunomarcações anti- macrófagos no nervo após 3, 7 e 14 dias do esmagamento do nervo isquiático em animais C57BL/6J e TLR2^{-/-} estão representados na Figura 37. Observa-se que os camundongos com ausência do receptor Toll like 2 não apresentaram atraso no recrutamento de macrófagos comparativamente ao grupo controle (3 dias proximal: C57BL/6J 33,01±7,44; TLR2^{-/-} 30,46±4,43; 3 dias distal: C57BL/6J 20,49±1,08; TLR2^{-/-} 31,16±1,64; 7 dias proximal: C57BL/6J 47,47±4,52; TLR2^{-/-} 43,78±7,81; 7 dias distal: C57BL/6J 43,96±6,56; TLR2^{-/-} 45,51±3,67; 14 dias proximal: C57BL/6J 28,16±5,94; TLR2^{-/-} 15,76±1,69; 14 dias distal: C57BL/6J 29,22±3,89; TLR2^{-/-} 31,16±1,69 Figura 37 M, N, O).

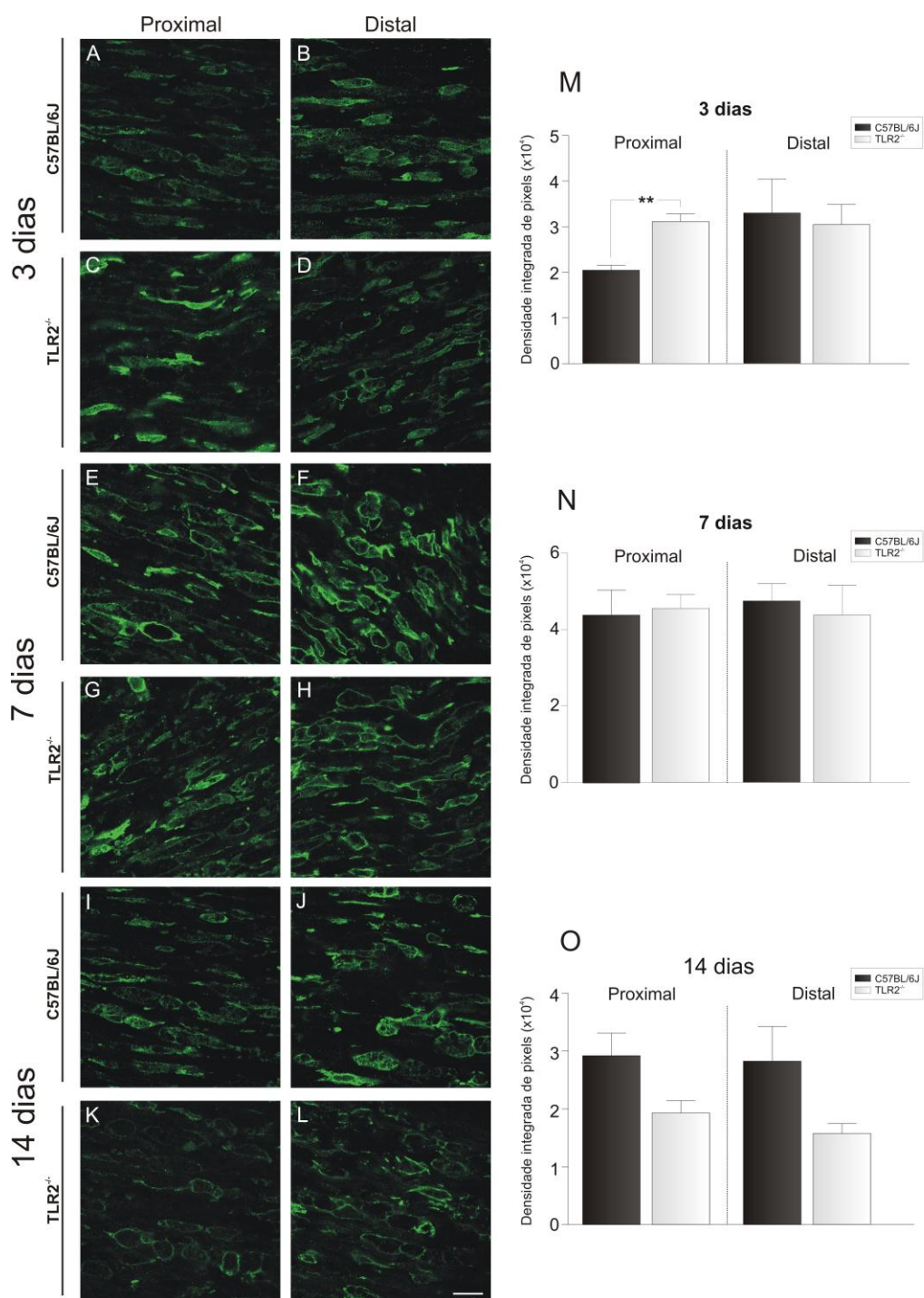


Figura 37: Imunomarcacão de macrófagos anti- Iba1 nos segmentos proximais e distais dos nervos lesados após 3, 7 e 14 dias em animais C57BL/6J e TLR2^{-/-}. (A-C-E-G-I-K) segmento proximal do nervo isquiático após lesão. (B-D-F-H-J-L) segmento distal do nervo isquiático após lesão. (M, N, O) Gráficos representando a densidade integrada de pixels referente à imunomarcacão para macrófagos reativos. Barra de escala= 50 µm.

5.8 Animais com ausência do receptor TLR2 apresentam quantidade significativamente superior de fibras degeneradas.

Imagens de ultraestrutura do nervo, nos diferentes grupos experimentais estão representadas na Figura 38 (A-D). A contagem do número de axônios degenerados, mielínicos e amielínicos está representada pelo gráfico Figura 38E. As quantificações mostraram que não houve diferenças significativas dos números de axônios amielínicos e mielínicos entre os grupos (C57BL/6J $198,86 \pm 88,93$; $177,8 \pm 5,84$; TLR2^{-/-} $207,73 \pm 92,89$; $193,2 \pm 7,97$; número de fibras amielínicas e mielínicas, respectivamente $\pm$ erro padrão). Entretanto, foi observado número significativamente superior de fibras degeneradas em animais com ausência do receptor TLR2. Figura 38E (C57BL/6J $39,4 \pm 3,28$; TLR2^{-/-} $52 \pm 3,38$; número de fibras degeneradas $\pm$ erro padrão). Note que este número aumentado de fibras degeneradas nos animais TLR2^{-/-} não influenciou negativamente na recuperação funcional.

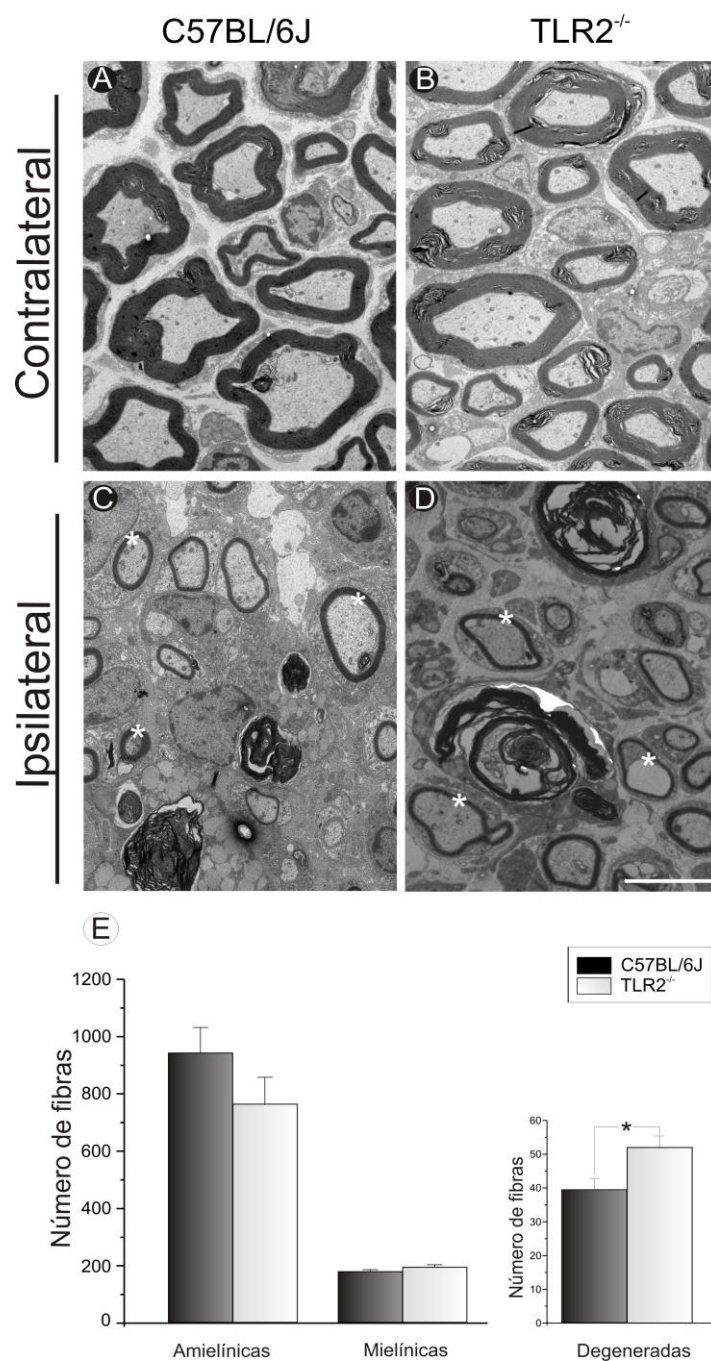


Figura 38: Imagens de ultraestrutura (microscopia eletrônica de transmissão) do nervo isquiático nos grupos C57BL/6J e TLR2^{-/-} (A-D). (A, B) Lados contralaterais, 2 semanas após esmagamento do nervo isquiático. (C, D) Lados ipsilaterais, após 2 semanas de lesão. (E) Gráficos da quantificação do número de fibras mielínicas, amielínicas e degeneradas. Asteriscos indicam fibras regeneradas após lesão. Note aumento de fibras degeneradas nos animais com ausência do receptor TLR2^{-/-}. Barra de escala= 5µm.

5.9 Ausência do receptor TLR2 resulta em aumento do diâmetro de axônios mielínicos após lesão periférica.

A morfometria das fibras mielínicas (DFM), axônios (DAM) e espessura da bainha mielínica (EBM) foi analisada nos grupos C57BL/6J e TLR2^{-/-} (Figura 39 e 40). Os animais C57BL/6J e TLR2^{-/-} apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando de 1 a 6 μm e médias $2,86 \pm 0,08$ e $3,18 \pm 0,11$ respectivamente. As maiores percentagens de fibras foram observadas nos intervalos de 2,25 a 3,25 μm , correspondendo a 67,5% e 64,0% do total de fibras respectivamente. Nesta comparação, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos. Já o diâmetro dos axônios mielínicos dos animais C57BL/6J e TLR2^{-/-} variou de 0,5 a 5,25 μm e médias $2,17 \pm 0,06$ e $2,44 \pm 0,08$ respectivamente. As maiores percentagens de fibras para o grupo C57BL/6J foram observadas nos intervalos de 1,75 a 2,75 μm , 71,5% do total de fibras e no intervalo de 3,25 a 4,25 μm , 12,9%. Já o grupo TLR2^{-/-}, no intervalo de 1,75 a 2,75 μm , corresponde a 62% do total de fibras e no intervalo de 3,25 a 4,25 μm corresponde 31% do total de fibras. Desse modo, comparado ao grupo controle, os animais TLR2^{-/-} apresentaram significativo aumento no diâmetro dos axônios mielínicos após lesão. A EBM variou de 0,05 a 1 μm e média $0,34 \pm 0,01$ e $0,36 \pm 0,02$ respectivamente nos animais C57BL/6J e TLR2^{-/-}. As maiores percentagens de fibras foram observadas no intervalo de 0,25 a 0,45, correspondendo a 85,5% e 87,7% do total de fibras, não sendo observada, portanto, diferença significativa entre os grupos.

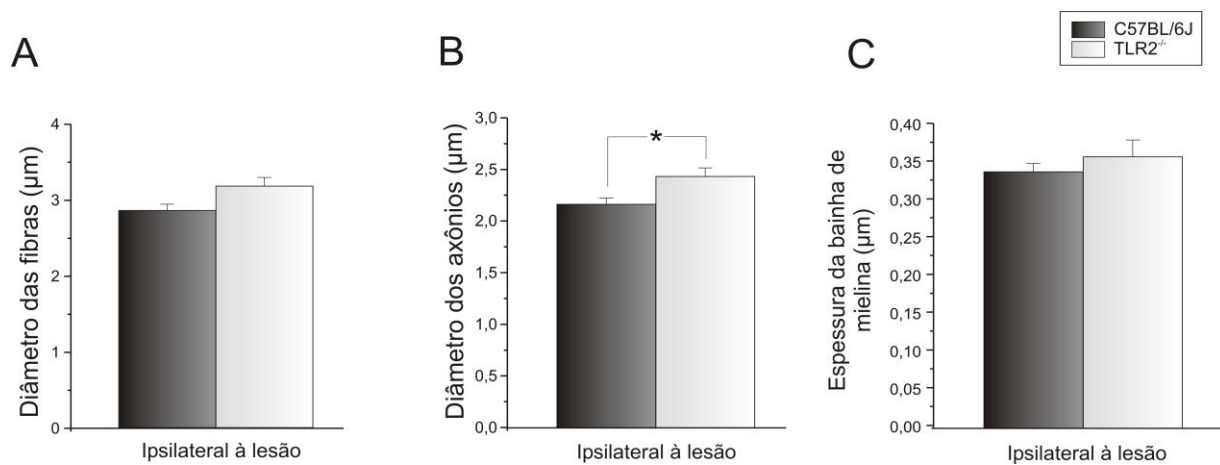


Figura 39: Análise morfométria dos axônios mielínicos regenerados nos grupos C57BL/6J e TLR2^{-/-}. (A) Gráfico da média do diâmetro das fibras mielínicas. (B) Gráfico da média do diâmetro dos axônios mielínicos. (C) Gráfico da média da espessura da bainha de mielina (EBM). Note diferença significativa entre os grupos para a média do diâmetro dos axônios mielínicos após lesão.

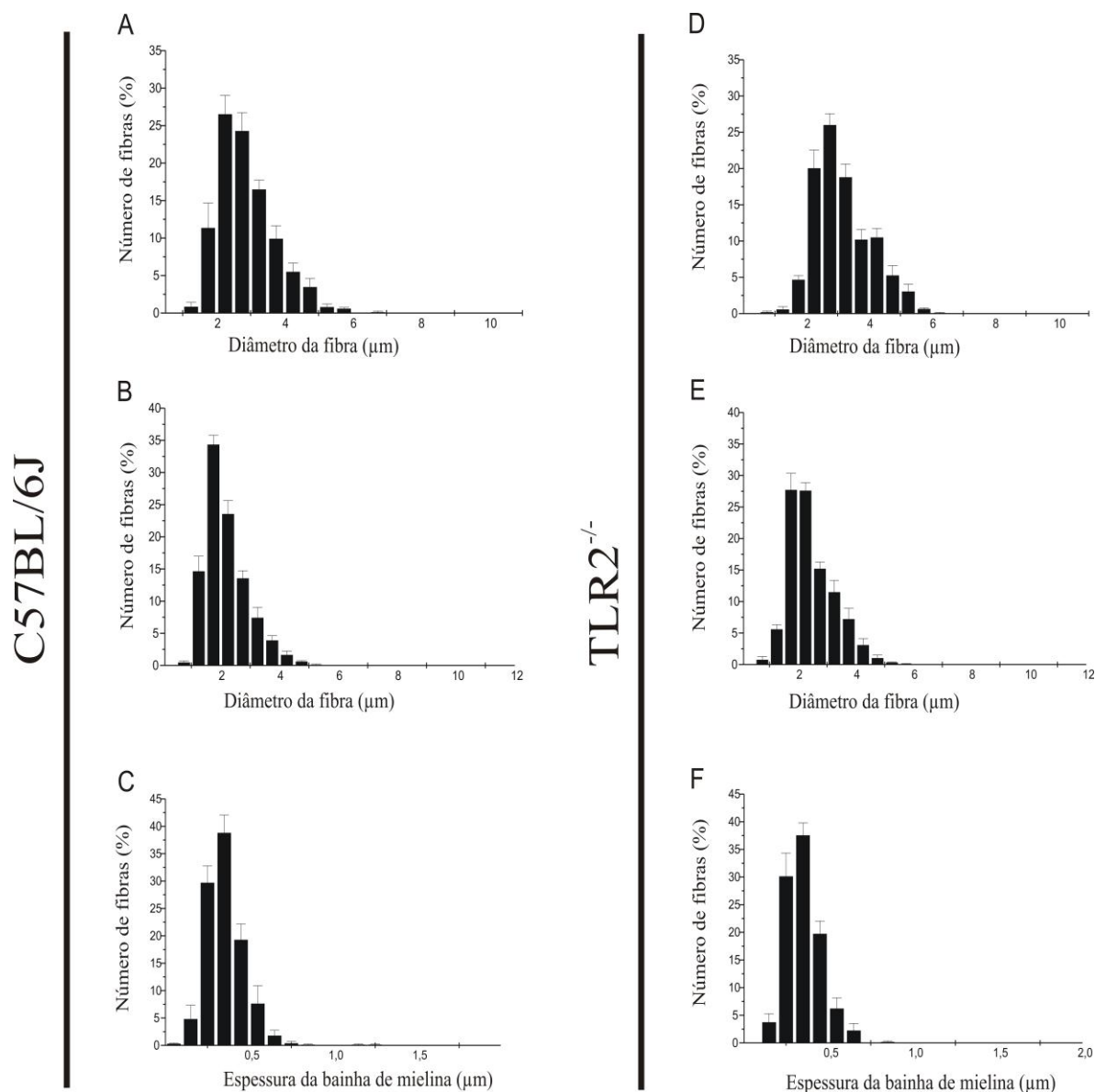
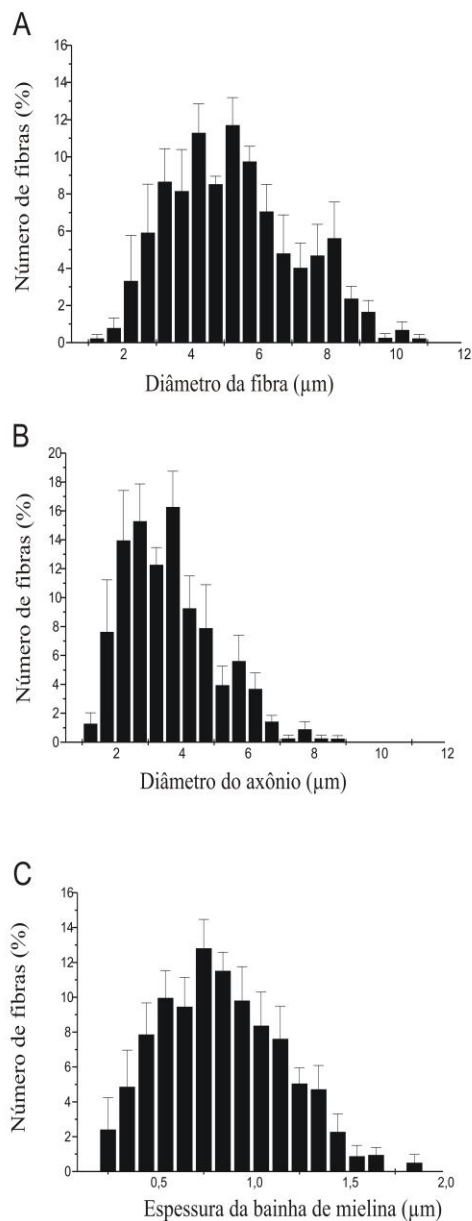


Figura 40: Distribuição de frequência para as fibras nervosas dos grupos C57BL/6J (A,B,C) e TLR2^{-/-} (D,E,F), após esmagamento do nervo isquiático e sobrevida de 2 semanas. (A e D) Gráfico de distribuição de frequência do diâmetro das fibras mielínicas. (B e E) Gráfico de distribuição de frequência do diâmetro dos axônios mielínicos. (C e F) Gráfico de distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina (EBM).

5.10 A ausência do receptor TLR2 não influencia nos valores morfométricos médios do nervo não lesado.

A análise morfométrica das fibras mielínicas (DFM), axônios (DAM) e espessura da bainha de mielina (EBM) nos lados contralaterais à lesão nos grupos C57BL/6J e TLR2^{-/-} estão representados na Figura 41. Os animais C57BL/6J e TLR2^{-/-} apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando de 2,75 a 9,75 μm e médias $6,52 \pm 1,04$ e $6,25 \pm 0,51$ respectivamente. Para o diâmetro dos axônios mielínicos foi observado, nos grupos C57BL/6J e TLR2^{-/-}, diâmetro variando de 2,25 a 6,75 μm e médias $9,64 \pm 1,61$ e $9,08 \pm 1,13$, respectivamente. Já a análise da EBM variou de 0,45 a 1,65 μm e médias de $7,44 \pm 1,18$ e $7,16 \pm 0,53$, respectivamente. Diante destes resultados, observa-se que a presença do receptor TLR2 não influenciou, em termos médios, nas análises morfométricas de DFM, DAM e EBM, visto que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, nos nervos contralaterais á lesão.

C57BL/6J



TLR2^{-/-}

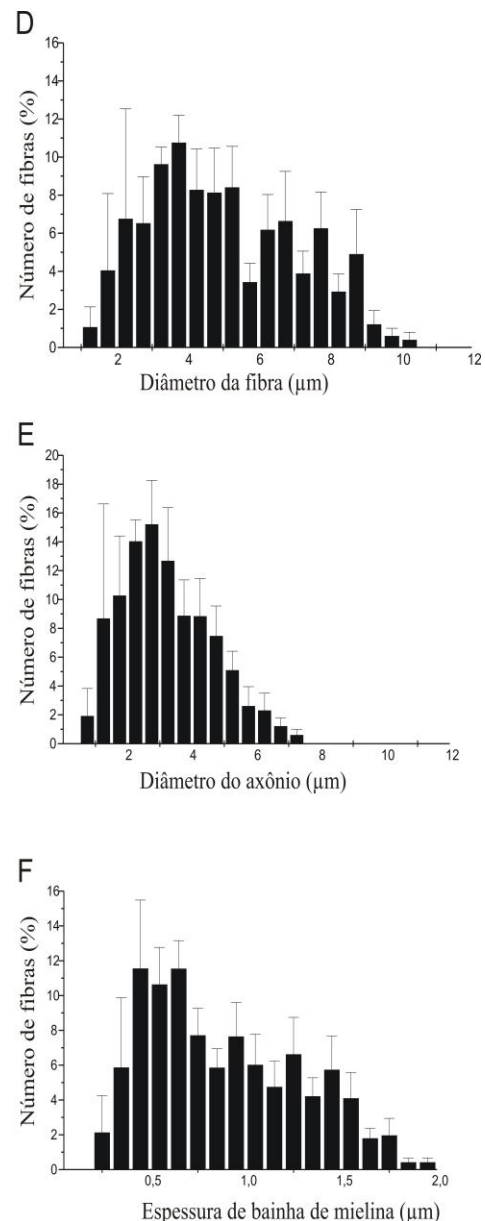


Figura 41: Distribuição de frequência das fibras nervosas dos grupos C57BL/6J (A,B,C) e TLR2^{-/-} (D,E,F) contralateral à lesão. (A e D) Gráfico de distribuição de frequência do diâmetro das fibras mielínicas. (B e E) Gráfico de distribuição de frequência do diâmetro dos axônios mielínicos. (C e F) Gráfico de distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina (EBM).

5.11 A ausência do receptor TLR2 não influenciou na recuperação funcional após o esmagamento do nervo isquiático.

Os resultados quantitativos das avaliações motoras realizadas semanalmente nos grupos experimentais (C57BL/6J e TLR2^{-/-}) pré e pós-lesão estão representados nos gráficos A e B, Figura 42. Aplicada a fórmula proposta por DeMedinaceli *et al.*, (1982), foram obtidos os índices de recuperação motora do nervo isquiático e a porcentagem de recuperação entre os grupos até a 8ª semana pós lesão. Observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos (Gráficos A e B- Figura 42) (pré-operatório - Controle 94%±0,27%; TLR2^{-/-} 100%±0,43%; 1ª semana pós-operatória - Controle - 0%±1,14%; TLR2^{-/-} 0%±1,29%; 2ª semana pós-operatória - Controle 12%±0,48%; TLR2^{-/-} 28%±0,82%; 3ª semana pós-operatória - Controle 70%±0,44%; TLR2^{-/-} 66%±1,07%; 4ª semana pós-operatória - Controle 93%±0,14%; TLR2^{-/-} 73%±1,43%; 5ª semana pós-operatória - Controle 100%±0,37%; TLR2^{-/-} 94%±0,55%; 6ª semana pós-operatória - Controle -71%±0,74%; TLR2^{-/-} 93%±0,87%; 7ª semana pós-operatória - Controle 84%±0,86%; TLR2^{-/-} 93%±0,82%; 8ª semana pós-operatória - Controle 96%±0,55%; TLR2^{-/-} 94%±0,71%; média dos índices de recuperação motora em porcentagem - 5 animais por grupo/ média±erro padrão, Figura 42). Para a razão de contato máximo das patas traseiras direita/ esquerda também não foi verificada diferença significativa.

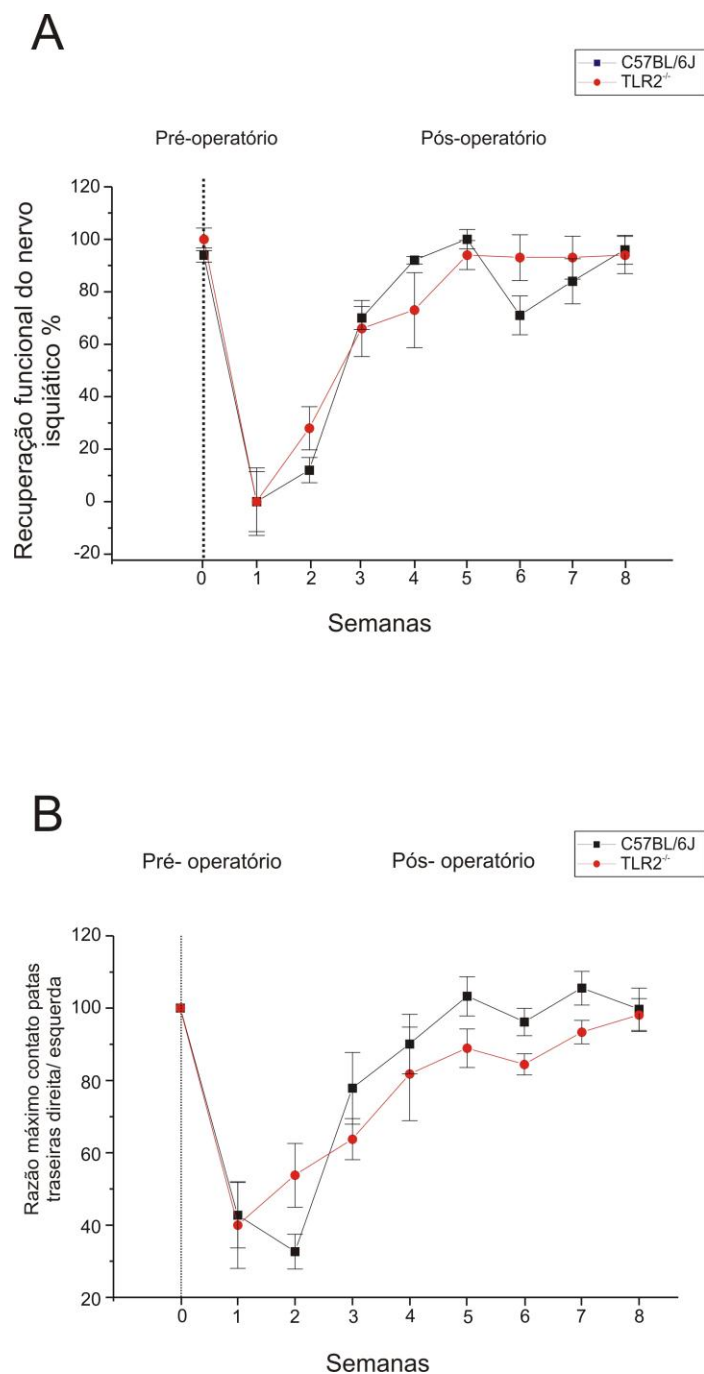


Figura 42: O gráfico (A) mostra os índices de recuperação funcional do nervo isquiático, realizada semanalmente nos grupos experimentais (C57BL/6J e TLR2^{-/-}), pré-lesão e até a 8ª semana pós-esmagamento do nervo isquiático. O gráfico (B) mostra a razão do contato máximo das patas traseiras direita/esquerda, calculada semanalmente nos grupos experimentais (C57BL/6J e TLR2^{-/-}) pré-lesão até a 8ª semana pós-esmagamento do nervo isquiático. Note que não houve diferença significativa entre os grupos.

6. Discussão

É bem conhecido, que diferentemente dos neurônios do SNC, os neurônios do SNP apresentam um potencial intrínseco para regeneração após axotomia. Assim sendo, após a lesão periférica, uma específica e orquestrada sequência de eventos histopatológicos acontecem, os quais eventualmente resultam em total ou parcial regeneração do nervo lesado (Lee et al., 2006).

Um evento importante que ocorre após a lesão periférica, é a degeneração Walleriana, a qual propicia a remoção dos resíduos mielínicos e celulares do tecido afetado, visando alcançar o sucesso na reparação periférica. Este evento é mediado pelas células de Schwann e células do sistema imune que, após serem ativadas, apresentam capacidade fagocítica (Lee et al., 2006). Trabalhos mostram que as células de Schwann também podem adotar papel semelhante aos macrófagos, com capacidade de se desdiferenciar, proliferar e ainda de secretar citocinas e fatores neurotróficos de crescimento (Martini et al., 2008). Ainda não está claro, mas acredita-se que as células de Schwann se tornam ativadas via sinalização dos TLRs (Bovin et al., 2007; Karanth et al., 2006; Lee et al., 2006). Além disso, estudos recentes mostraram que a ativação dos receptores Toll like (TLRs) após lesão periférica aumenta o recrutamento de macrófagos para a região de lesão, favorecendo a regeneração nervosa e a recuperação motora (Boivin et al., 2007).

No presente trabalho, foi possível verificar que a presença dos receptores TLR2 e TLR4 têm efeitos opostos no SNP. Assim, a presença do receptor Toll like 2 e a ausência do receptor Toll like 4 resultam em uma maior expressão de p75^{NTR} e neurofilamentos no segmento distal do nervo lesionado. Assim, acreditamos que a elevação da quantidade de

p75^{NTR}, expresso por células de Schwann ativadas contribua para um crescimento axonal dirigido, bem como remielinização mais eficiente. Tais resultados estão de acordo com o estudo de Song et al., (2006), que demonstraram que o número de axônios mielinizados, bem como a espessura da bainha de mielina em nervos lesados, foram reduzidos em camundongos transgênicos deficientes para p75^{NTR}.

Em relação aos neurofilamentos, estes são proteínas do citoesqueleto do axônio, essenciais para o alongamento das fibras, o que possibilita o prolongamento dos brotos axonais em direção ao órgão alvo (Tetzlaff *et al.*, 1988). Desse modo, a menor imunoreatividade anti- neurofilamentos pode corresponder a uma menor capacidade de crescimento axonal. Porém, tal hipótese não foi confirmada nos grupos TLR2^{-/-} e selvagens para TLR4, uma vez que não houve diferença estatística no número de fibras mielínicas. Tal fato indica que outras moléculas e mecanismos envolvidos no processo regenerativo apresentam efeito compensatório em tais situações experimentais.

Dos parâmetros morfológicos, a EBM ilustra mais diretamente o nível de atividade das células de Schwann durante a regeneração, estando também relacionada à recuperação funcional do nervo. Adicionalmente, a DMF e a DAM são elementos que contribuem para a compreensão do processo regenerativo no SNP. Tais parâmetros já foram anteriormente utilizados na avaliação da evolução do processo regenerativo axonal por diversos autores (Arbuthnott et al., 1980; Rushton, 1951). Neste trabalho, curiosamente, foi observado aumento significativo no diâmetro de axônios mielínicos em regeneração, na 2ª semana após lesão periférica em animais com ausência do receptor TLR2^{-/-}. Paradoxalmente, nestes mesmos animais, observou-se aumento significativo do número de fibras em processo

degenerativo, sugerindo uma evolução mais lenta da degeneração Walleriana. É possível, portanto, que efeitos compensatórios, como a maior preservação sináptica em animais knockout observados no capítulo II desta tese, promovam a igualdade da recuperação funcional entre os grupos. Apoiando estes dados, diferentes estudos mostraram que as relações entre diâmetro da fibra e do axônio podem interferir na velocidade de condução do impulso nervoso ao músculo alvo (Arbuthnott et al., 1980; Smith & Koles, 1970). Sendo assim, Kanaya et al. (1996) mostraram que a velocidade de condução (DFM/DAM) é um parâmetro que melhor corresponde os resultados de recuperação funcional.

Ao contrário do observado em animais TLR2^{-/-}, a análise ultraestrutural do nervo periférico em TLR4 mutantes não mostrou diferencia significativa no número de fibras em degeneração, mielínicas e amielínicas. Do mesmo modo, não houve diferença no diâmetro das fibras e nos axônios mielínicos entre os grupos. Por outro lado, os animais com deficiência para TLR4 apresentaram melhor desempenho motor comparado ao grupo controle. Neste contexto, os resultados de imunoistoquímica corroboram com a hipótese de que a ausência do receptor Toll like 4 possa atuar positivamente na regeneração axonal, uma vez que observou-se maior expressão de neurofilamentos e p75^{NTR}, revelando maior capacidade regenerativa no nervo de animais C3H/HeJ.

Curiosamente, pôde-se observar que, até a 2ª semana pós-lesão, os animais com a presença de TLR4 apresentaram um melhor desempenho motor. Este fato coincide com o pico de infiltração de macrófagos que ocorre 14 dias após a lesão (Martini *et al.*, 2008). Boivin *et al.* (2007) mostraram que a presença de TLR2 e TLR4 facilita, através da citocina pró-inflamatória IL- 1 β , o recrutamento de macrófagos. Assim, recentes estudos mostram

que a expressão dos Toll like acelera a degeneração Walleriana, promovendo a regeneração nervosa (Boivin *et al.*, 2007). Em acordo, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a presença do TLR4 é fundamental nos primeiros estágios da lesão a fim de eliminar os restos celulares durante a degeneração Walleriana. Porém, após a 5 semana, os animais com ausência de TLR4 superaram os animais controle adquirindo melhor desempenho funcional. Este melhor desempenho funcional, provavelmente está relacionado com o achado do presente estudo, que demonstra a presença de um maior número de junções neuromusculares nos animais mutantes para TLR4, indicando aumento da unidade motora. Assim, é possível que, nos animais deficientes para TLR4 uma menor quantidade de axônios motores que atinjam o músculo alvo já sejam suficientes para recuperar a funcionalidade do mesmo.. Tal capacidade de brotamento de axônios terminais neste grupo é apoiada pela maior expressão de neurofilamentos e de p75^{NTR} observadas no segmento distal do nervo.

Tendo-se em vista o acima discutido, os dados obtidos neste estudo mostram que os receptores do tipo toll apresentam grande relevância no processo regenerativo do SNP. Tal importância supera, portanto, a função clássica na resposta imune inata de tais moléculas. Podemos afirmar, desta forma, que existe uma função particularmente importante dos receptores do tipo toll na biologia do processo regenerativo tanto no SNC quanto no SNP. Portanto, a compreensão do papel destes receptores pode contribuir para o surgimento de novas estratégias no tratamento de lesões nervosas otimizando a recuperação funcional sensorial e motora.

7. Conclusões

- A presença do receptor Toll like 2 e a ausência do receptor Toll like 4 aumentam a expressão de p75^{NTR} e neurofilamentos no segmento distal do nervo lesado.
- A ausência do receptor Toll like 4 não influencia nos parâmetros morfológicos DMF, DAM e EBM no nervo ipsi e contralateral à lesão.
- A ausência do receptor Toll like 2 resulta em axônios regenerados com diâmetro médio significativamente superior, em relação à linhagem selvagem.
- A ausência do receptor Toll like 2 influencia no número de fibras degeneradas, 2 semanas após lesão.
- A ausência do receptor Toll like 2 não interfere no recrutamento de macrófagos no segmento proximal e distal do nervo.
- A ausência de TLR4 promove melhor desempenho funcional e maior formação de junções neuromusculares após 5 semanas do esmagamento do nervo isquiático.

CAPÍTULO IV

Deleção de CX3CR1 diminui o potencial pró-inflamatório de macrófagos, promovendo brotamento de fibras serotoninérgicas e preservando contatos sinápticos em motoneurônios distais à lesão após contusão medular focal.

1. Resumo

A regeneração axonal no SNC adulto é na maior parte mal sucedida devido à formação de cicatriz glial. Numerosas moléculas inibidoras de crescimento axonal produzidas por astrócitos reativos estão presentes no SNC após lesão, impedindo assim o restabelecimento das conexões. Recentes estudos mostraram que camundongos deficientes em CX3CR1 tiveram maior preservação axonal e recuperação da função após a lesão medular. Ainda, observou-se que a deficiência da sinalização de CX3CR1 diminui o efeito prejudicial da inflamação causada por macrófagos. Com base nesses dados, previmos que o ambiente de lesão pode tornar-se mais permissivo ao crescimento e ao brotamento de axônios supra-espinais e ou proprioceptivos. Desse modo, o principal objetivo do presente estudo foi determinar se a deficiência de CX3CR1 aumenta a regeneração ou o surgimento de vias serotoninérgicas descendentes (5-HT +) após lesão medular. Para este propósito, 13 camundongos machos e fêmeas CX3CR1^{+/-} (n = 6) ou CX3CR1^{-/-} (n = 7) foram anestesiados e em seguida submetidos à lesão medular por contusão (75kdyn). Cinquenta e seis dias após a lesão, a medula espinal foi processada para imunoistoquímica, hibridação *in situ* (HIS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Usando HIS, confirmou-se que a deficiência do CX3CR1 reduz severamente a sinalização inflamatória da microglia e ou de macrófagos por meio da diminuição da expressão de fator regulador de interferon -5 (interferon-regulator-factor -IRF -5), um fator de transcrição que regula os genes

envolvidos na diferenciação de macrófagos inflamatórios. Ainda, a deficiência de CX3CR1 aumentou ~40% da densidade de 5-HT caudais ao epicentro da lesão e foi associada com significativa preservação de terminais pré-sinápticos em motoneurônios (MNs) medulares. Desse modo, camundongos CX3CR1^{+/-} apresentaram ~41% da cobertura sináptica, comparado á ~ 53% em CX3CR1^{-/-}. Estes dados indicam que a redução da inflamação no local e abaixo da lesão confere neuroproteção, permitindo que axônios supraespinhais (5-HT+), poupados ou regenerados após lesão, sejam capazes de atravessar o local lesado. Tais dados sugerem que a manipulação genética ou farmacológica de macrófagos pode ser útil para promover a plasticidade após a lesão traumática medular.

2. Introdução

Lesões da medula espinal são caracterizadas por perda de funções motoras e sensoriais em áreas abaixo do nível da lesão. Lesões medulares afetam cerca de 250.000 pessoas nos Estados Unidos, com cerca de 11.000 novas lesões a cada ano. A maioria das pessoas acometidas são do sexo masculino, com idade média de 37 anos. A causa mais comum de lesões dessa natureza são acidentes automobilísticos, violência, incluindo-se armas de fogo, acidentes de trabalho, quedas e acidentes em esportes. (Christopher Reeve Paralysis Foundation, 2012).

A lesão primária na medula espinal caracteriza-se por trauma que inicialmente induz morte neuronal e ruptura de feixes axonais ascendentes e descendentes. Já a inflamação caracteriza-se por ser um processo secundário após o trauma mecânico (Liu et al., 1997; Hill et al., 2001; Zang et al., 2011). Por muitos anos o SNC foi considerado um órgão

imuno privilegiado, protegido pela barreira hemato-encefálica. Entretanto, a medula espinal é susceptível à robusta resposta inflamatória após lesão. Estudo comparando a habilidade relativa do cérebro e da medula espinal em responder a inflamação, mostrou que a resposta inflamatória medular é três vezes maior que no cérebro (Schnell et al., 1999). Acredita-se que a inflamação seja essencial para que ocorra uma eficaz reparação e recuperação do tecido lesado (Benowitz & Popovich, 2011). Entretanto, esta relação é ambígua no sistema nervoso central (SNC), visto que mesmo iniciada a resposta inflamatória, a reparação do tecido é ineficiente e a incapacidade funcional é permanente. Isso levou ao questionamento do significado funcional da neuroinflamação pós-trauma e controvérsias sobre este assunto ainda persistem (Popovich & Longbrake, 2008).

Desse modo, apesar de contraditório o papel da inflamação no SNC, sabe-se que a resposta inflamatória é necessária para que ocorra a remoção de células mortas e de tecidos necrosados presentes no local da lesão (Benowitz & Popovich, 2011). A remoção de resíduos de mielina é uma função importante da inflamação pós-lesão, uma vez que estes fragmentos celulares atuam como inibidores da regeneração (Li et al., 1996; Liu et al., 2002; Simonen et al., 2003). Por outro lado, após lesão traumática da medula é disparada uma cascata de alterações moleculares e celulares, que atuam como barreiras à regeneração axonal. As células gliais no SNC medeiam um desfavorável microambiente, sintetizando moléculas neurotóxicas e tecido cicatricial. Desse modo, a acumulação da cicatriz glial dentro e em torno dos locais de lesão atua como uma barreira física e molecular para a regeneração axonal e recuperação da função motora pós-lesão (Rolls et al., 2009). Uma classe de moléculas inibidoras associadas com a cicatriz glial e constituinte da matriz

extracelular são os proteoglicanos de condroitim sulfato (CSPGs). CSPGs consistem de um cerne protéico, decorado com cadeias laterais de condroitim sulfato, que são inibidores potentes de neuritos e podem desempenhar um papel prejudicial na regeneração pós-lesão (Rolls et al., 2009). Por isso, alguns enfoques terapêuticos têm usado ChABC (condroitinase ABC), a fim de diminuir a sinalização inibitória via receptores de CSPG e assim, promover o crescimento, neuroproteção e brotamento axonal no local da lesão (Barritt et al, 2006;. Bradbury & Carter, 2011; Cafferty et al. 2007; Crespo et al, 2007). Além disso, outras ferramentas terapêuticas também têm sido aplicadas a fim de viabilizar a regeneração axonal pós-lesão. Kigerl et al. (2009) mostraram que o meio condicionado de macrófagos anti-inflamatórios (M2) promove o crescimento axonal de neurônios sobre substratos de CSPG. Desse modo, tal estudo sugere que o crescimento e o brotamento axonal também podem ser influenciados por fatores facilitadores de crescimento derivados de macrófagos anti-inflamatórios. Por outro lado, os macrófagos (M1) ativados podem aumentar a neurotoxicidade e induzir a retração dos axônios, colaborando para a deficiência na regeneração. Estes efeitos contrastantes são resultado da migração de macrófagos com propriedades opostas, ou seja, pró-inflamatória (M1) ou anti-inflamatórias (M2). Os mecanismos que controlam tais funções de macrófagos no SNC, não são claramente conhecidos mas, certamente, dependem da sinalização de quimiocinas, citocinas, e outras moléculas presentes no microambiente da lesão (Mantovani et al., 2004; Stout et al., 2005). Desse modo, descobrir uma possível ferramenta capaz de controlar tais mudanças de fenótipos em macrófagos, é um suposto alvo terapêutico, visto que os macrófagos (M2) podem regular a resposta glial pós-lesão, reduzir a secreção de matriz extracelular e aumentar a produção de substâncias neuroprotetoras (Kigerl et al., 2009).

Sendo assim, CX3CR1 é importante para a manutenção da função de macrófagos e microglia, tanto em tecidos sadios quanto em tecidos lesionados (Zujovic et al, 2000; Mizuno et al, 2003.). Tal receptor é principalmente detectável em microglia, mas não em neurônios, enquanto que a expressão de CX3CL1 tem sido observada predominantemente em neurônios (Nishiyori et al., 1998). Além disso, CX3CL1 e CX3CR1 são dinamicamente regulados, após SCI, sugerindo que tais quimiocinas podem influenciar no microambiente durante lesão (Boddeke et al., 1999; Hughes et al., 2002). De acordo com estudo realizado pelo grupo do professor Popovich, a perda da sinalização de CX3CR1 atenua a capacidade inflamatória e oxidativa da microglia e de macrófagos, contribuindo para a recuperação funcional (Donnelly et al., 2011).

Sabe-se que a melhora funcional, após lesão da medula espinal, também pode ser atribuída à alterações e/ou ajustes nos circuitos medulares intrínsecos, proximais e caudais ao epicentro da injúria, resultando no restabelecimento parcial de vias descendentes ou na preservação de inputs aos motoneurônios (Kim et al., 2004). Desse modo, a extensão de axônios regenerados ou preservados após lesão pode fazer contatos sinápticos com novos alvos, promovendo alguma recuperação funcional. Na literatura, as vias rafespinais são amplamente investigadas após lesão medular, visto a habilidade primária deste tracto em regenerar-se após lesão (Saruhashi et al., 1996). Experiências anatômicas e fisiológicas sustentam a hipótese de que as vias serotoninérgicas descendentes estão envolvidas no controle da locomoção por modular a atividade dos motoneurônios no corno ventral (Jacobs & Fornal, 1997; Schmidt e Jordan, 2000; Ballermann & Fouad, 2006). Assim, axônios serotoninérgicos mantêm a excitabilidade dos motoneurônios por meio da regulação das

correntes de cálcio (Hounsgaard & Kiehn, 1985;. Murray et al, 2010). Além disso, em animais adultos e em desenvolvimento, um número considerável de sinapses são eliminadas, na medula espinal, após inibição de serotonina (5HT), sugerindo que 5HT pode ser necessária para a formação e manutenção de redes sinápticas (Okado et al., 1993).

Neste estudo mostramos que a sinalização CX3CR1 pode reduzir a intensidade de inflamação no local da lesão, diminuindo a migração de macrófagos pró-inflamatórios. Portanto, o controle da sinalização inflamatória após SCI contribui para o brotamento de fibras serotoninérgicas , assim como a manutenção de contatos sinápticos nos motoneurônios caudais à lesão .

3. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da ausência do receptor CX3CR1 na regeneração ou preservação das vias serotoninérgicas após lesão medular;
- Avaliar o efeito da ausência do receptor CX3CR1 na reatividade glial e na cicatriz glial;
- Identificar os diferentes tipos de macrófagos presentes no epicentro da lesão em camundongos CX3CR1^{-/-} e CX3CR1^{+/-};
- Avaliar a preservação da densidade sináptica de motoneurônios alfa medulares localizados caudalmente à lesão através de imunoistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão;

- Análise da proliferação de macrófagos, micróglia e astrócitos no epicentro da lesão, através da incorporação de BrdU

4. Materiais e Métodos

4.1 Grupos experimentais e procedimento cirúrgico

Foram utilizados camundongos adultos machos e fêmeas CX3CR1^{-/-} (Knockout) e CX3CR1^{+/-} (Heterozigoto). Os camundongos Knockout foram gerados mediante a inserção dos genes para proteína verde fluorescente (GFP) nos alelos do gene CX3CR1 (Jung et al., 2000). Os animais foram acomodados em caixas plásticas padrão, sob condições ambientais controladas e de livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos experimentais, cirúrgicos e pós-operatórios foram realizados de acordo com o Comitê de Ética de cuidado com animais da Ohio State University. Após 10 semanas de vida, camundongos machos e fêmeas foram submetidos à laminectomia em T9 -10 e contusão da medula espinal (75kdyn), sob anestesia (Figura 43). Após lesão, os camundongos receberam injeções de BrdU (50mg/kg de peso corporal, intraperitoneal) durante 7 dias.

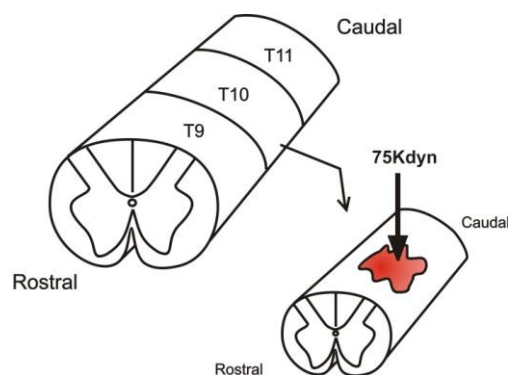


Figura 43: Esquema de lesão traumática medular (T9-T11). Seta indicando local da contusão e força aplicada (75 Kdyn).

4.2 Sacrifício dos animais

Após o período de sobrevivência pré-determinado (56 dias após lesão), os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de cetamina (80 mg / kg) e xilazina (40 mg / kg). Após perfusão com salina tamponada, os animais (n=5/grupo) foram perfundidos com 50 mL de fixador paraformaldeído (4%) em PBS (0,1 M; pH 7,4), através do ventrículo esquerdo. A medula espinal foi dissecada e pós-fixada por 2 horas e então lavada em tampão Fosfato 0,1M, pH 7,4. As amostras foram crioprotegidas em sacarose 30% por 4 dias. Os espécimes foram reduzidos em porções de 1cm caudal, cervical e epicentro e, em seguida, congeladas em gelo seco. Secções seriais transversas (10µm de espessura) foram obtidas em criostato, montadas em lâminas e estocadas a -20°C até utilização.

A imunohistoquímica foi realizada após delimitarmos a região de lesão. Para isto, as lâminas foram marcadas com erichrome cyanine (EC) a fim de distinguir a mielina intacta e a massa cinzenta do tecido lesionado. Foram delimitados o epicentro da lesão e os intervalos de 0,4mm e 0,8mm caudal e rostral ao epicentro.

4.3 Imunohistoquímica

Para a realização da imunohistoquímica, as lâminas foram inicialmente climatizadas, lavadas com PBS 0,1M e bloqueadas com 4% BSA (albumina de soro bovino) e 0,2% Tween em PBS 0,1M por 1 hora. Após bloqueio, foram utilizados os anticorpos primários (GFAP 1:1000 anti-coelho; IBA-1 anti-coelho 1:1000; neurofilamento anti-galinha 1:500;

5-HT anti-coelho 1:2500; CSPGS anti-camundongo 1:800; sinapsina anti-cabra 1:200; CD 16/32 anti-rato 1:800) e incubados overnight á 4°C em câmara úmida. No dia seguinte as lâminas foram lavadas em PBS 0,1M, sendo aplicado anticorpo secundário Cy2 e Cy3 1:500 diluído em PBS 0,1M e BSA 1% por uma hora, em câmara úmida, à temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas em PBS 0,1M, montadas em Immuno-Mount (Thermo Scientific) sendo posteriormente analisadas em microscópio confocal a laser Olympus FluoView FV1000 (Olympus).

Para imunomarcção anti- BrdU, as lâminas foram pré tratadas em H₂O₂/metanol 6% durante 15 min para extinguir as peroxidases endógenas. Após lavagem foi aplicado 0,2 M de HCL à 37 ° C por 20 minutos. Após lavagem em PBS 0,1 M, as lâminas foram bloqueadas por 1 hora em temperatura ambiente. Após bloqueio foi aplicado anticorpo primário (BrdU anti-rato, 1:100) e incubados overnight a 4 ° C em câmara úmida. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS 0,1 M (pH 7,4) e anticorpo secundário biotinylated foi incubado por 1 hora. Após lavagens foi utilizando o reagente Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame CA) e DAB como um substrato (Vector Laboratories, Burlingame CA). As lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e montadas com lamínulas em Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). As imagens foram obtidas em câmara digital de Zeiss AxioCam adaptada a um microscópio Zeiss Axioplan.

4.4 Hibridação in situ

As lâminas foram inicialmente megulhadas em solução de HCL 0,2N e, em seguida, lavadas duas vezes em PBS 0,1M. As secções foram tratadas com proteinase K durante 10 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, colocadas em paraformaldeído a 4% durante 5 min e lavadas em PBS. Após lavagens, as lâminas foram acetiladas com trietanolamina e anidrido acético seguido por uma lavagem de PBS. Após secas, as lâminas foram cobertas com uma solução de hibridação, em seguida cobertas com lamínulas e incubadas em câmara úmida durante a noite a 65 °C. No dia seguinte as laminas foram removidas e lavadas. Uma lavagem vigorosa foi realizada a 55 °C durante 20 min seguida de incubação em citrato de sódio saturado (SSC). Após a lavagem, foi realizado protocolo de imunohistoquímica específico.

4.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Após perfusão em salina, os camundongos CX3CR1^{-/-} e CX3CR1^{+/-} receberam 100 ml de fixador contendo 2,5% glutaraldeído e 1,0% paraformaldeído em tampão fosfato (pH 7,4). As medulas dissecadas foram armazenadas overnight em fixador a 4°C. Os espécimes foram reduzidos, osmicados, desidratados e emblocados em resina Epon-Spurr. Secções ultrafinas dos segmentos L4-L6 foram colocadas em telas de cobre revestidas com formvar e, em seguida, foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Neurônios seccionados no plano nuclear e com corpo celular > 35 µm de diâmetro foram localizados no corno ventral e identificados como motoneurônios alfa pela presença de terminais

colinérgicos. A superfície das células foi digitalizada sequencialmente com uma ampliação de x11.000 e, em seguida, montadas utilizando-se um software vetorial. O comprimento dos terminais sinápticos em aposição à membrana dos motoneurônios foi calculado em porcentagem, usando a ferramenta de medição do software Image Tool (versão 3.0, The University of Texas Health Center, em Santo Antonio, TX, EUA).

4.6 Análise estatística

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Na comparação entre os 2 grupos, foi utilizado teste *t* de Student para dados paramétricos e teste *U* de Mann-Whitney para dados não paramétricos. O software utilizado foi o Prisma 4.0 e adotado o nível de significância $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1 A deleção de CX3CR1 não interfere na reatividade glial e formação de cicatriz glial.

Estudos prévios no grupo do professor Popovich mostraram que a deleção de CX3CR1 prejudica a sinalização pró-inflamatória, promovendo recuperação funcional após lesão traumática medular (Donnelly et al., 2011).

Para entender melhor como as alterações nos sinais inflamatórios influenciam distal ou localmente no ambiente de lesão, o presente estudo investigou as alterações na medula espinal que podem contribuir para a recuperação funcional. Assim, nosso trabalho mostrou

que a ausência de CX3CR1 não alterou a proliferação celular (Figura 44) ou a reatividade glial (Figura 45). Além disso, não foi encontrada evidência de alterações na imunomarcação para CSPG em até 800 μ m proximal / distal ao local da lesão.

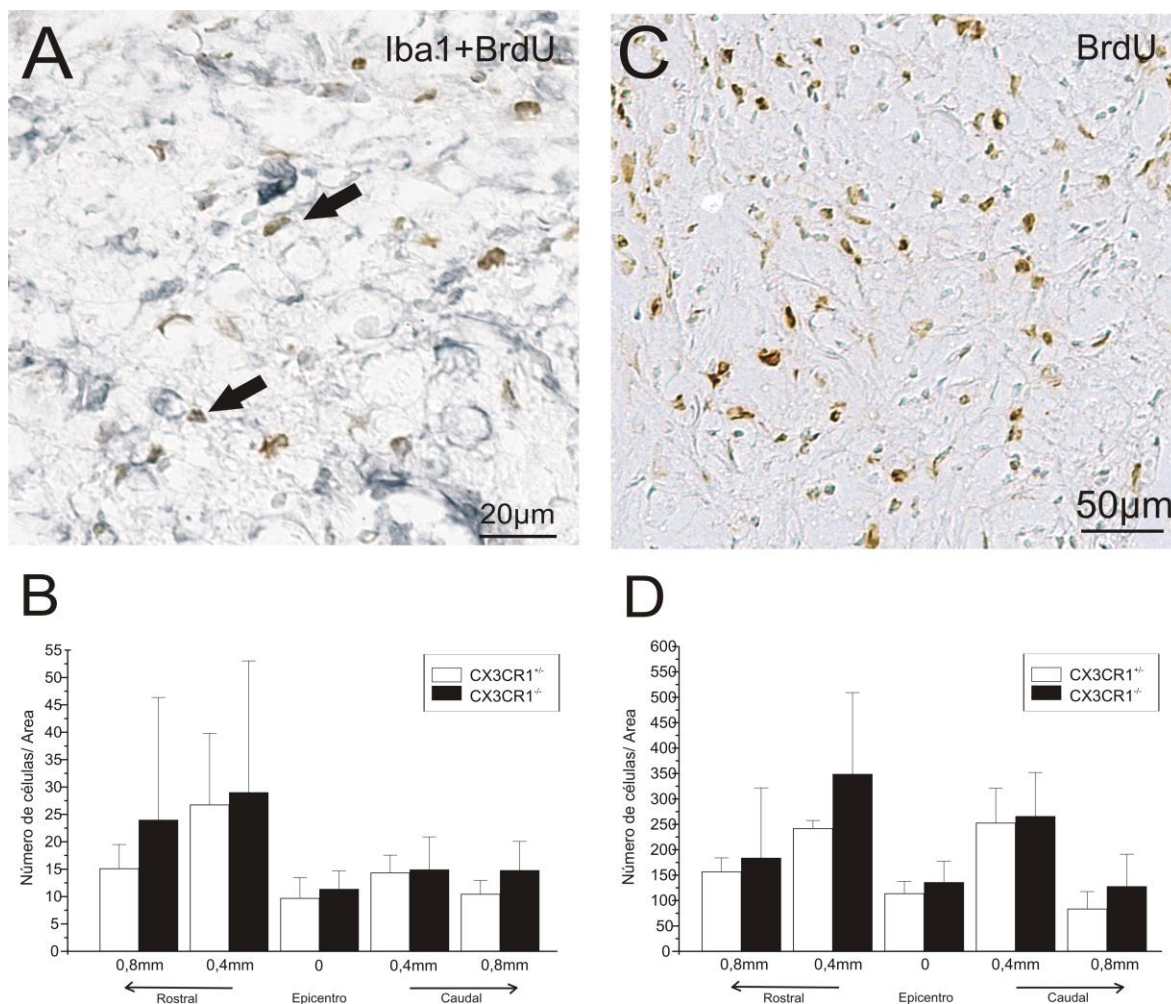


Figura 44: Taxa de proliferação celular sete dias pós-lesão. Dupla marcação para BrdU e Iba-1 (A); marcação para BrdU (C). (B) Quantificação das células duplamente marcadas com BrdU e Iba-1. (D) Quantificação do número de células positivamente marcadas com BrdU. Não houve diferença significativa na taxa de proliferação celular entre CX3CR1^{-/-} e CX3CR1^{+/+}.

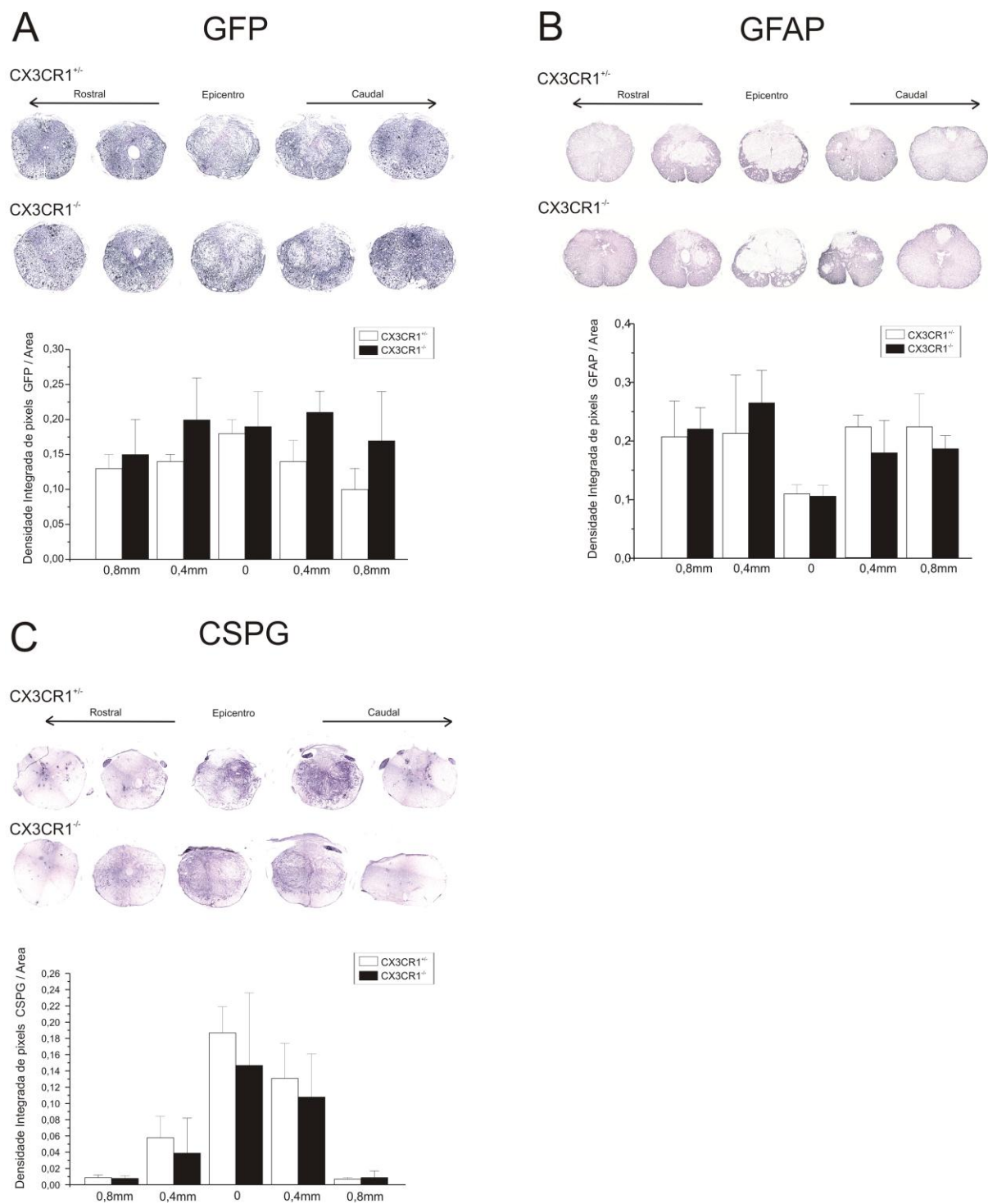


Figura 45: Imunomarcacão para (A) GFP, (B) GFAP e (C) CSPGs. Note que não houve diferença entre os grupos.

Em relação à análise quantitativa do tecido poupado e a área da lesão, também não houve diferenças entre os grupos (epicentro: Heterozigoto $13,7\% \pm 2,25\%$; Knockout $15,5\% \pm 2,5\%$; rostral 400 μm Heterozigoto $48,6\% \pm 0,82\%$; Knockout $51,40\% \pm 2,7\%$; rostral 800 μm Heterozigoto $52,1\% \pm 2,43\%$; Knockout $56,98\% \pm 0,75\%$; caudal 400 m Heterozigoto $31,3\% \pm 2,96\%$; Knockout $37,5\% \pm 6,9\%$; caudal 800 μm Heterozigoto $55,3\% \pm 0,64\%$; Knockout $52,9\% \pm 1,39\%$; Figura 46).

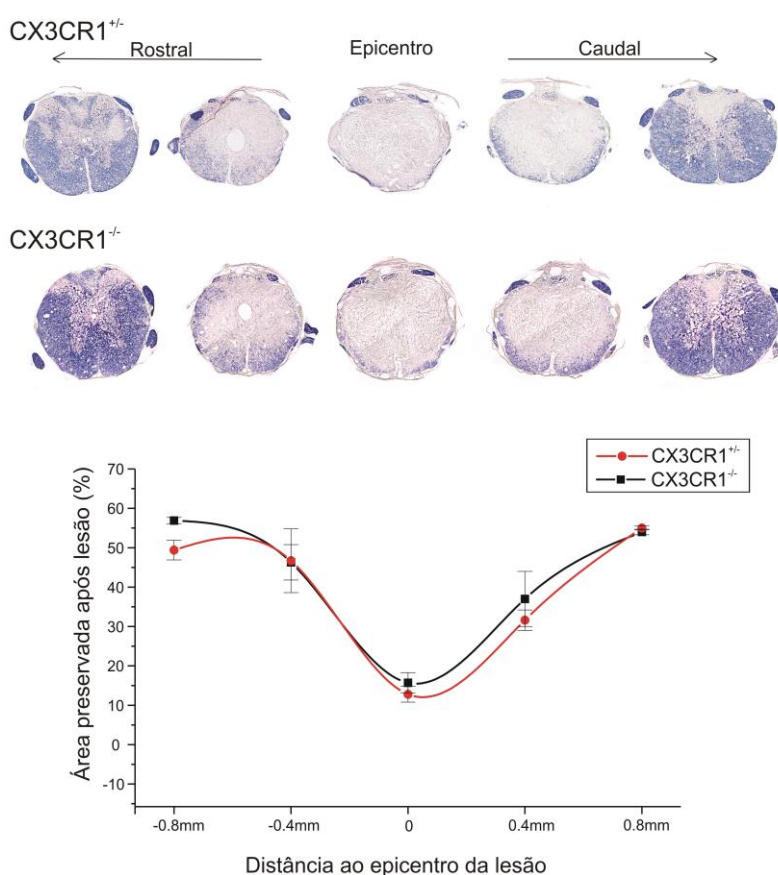


Figura 46: Análise da mielina preservada após lesão, determinada por Eriochrome Cianine (EC). Lado direito corresponde à porção caudal e esquerda rostral à medula. Nenhuma diferença entre os grupos $CX3CR1^{+/-}$ and $CX3CR1^{-/-}$ foi observada.

5.2 A deleção de CX3CR1 promove crescimento axonal após lesão medular.

Estudos anteriores no grupo do professor Popovich mostraram que a ausência do receptor CX3CR1 promove recuperação funcional após lesão traumática (Donnelly et al., 2011). Para entender melhor as mudanças neuroanatômicas na medula espinal que podem contribuir para tal recuperação funcional, os brotamentos de axônios serotoninérgicos foram analisados por imunoistoquímica. O sistema serotoninérgico é conhecido por ser responsável por modulação do ritmo locomotor na medula espinal. Para avaliar a reinervação axonal ou a capacidade de brotamento, rostral e caudal, a porcentagem da superfície ocupada pelos axônios positivos para 5HT foi quantificada no corno ventral em ambos os lados da medula espinal para os camundongos heterozigotos e knockout.

A quantificação de 5HT, rostral à lesão, não foi significativamente diferente entre os grupos (Heterozigoto $0,18 \pm 0,02$; Knockout $0,193 \pm 0,041$; Figura 47-C). No entanto, caudal à lesão, um aumento substancial de axônios positivos para 5HT, distribuídos ao longo do corno ventral, foi observado em camundongos knockout, ao passo que em camundongos heterozigotos, apenas alguns pequenos neuritos foram identificados (Heterozigoto $0,063 \pm 0,03$; Knockout $0,12 \pm 0,04$; Figura 48-E).

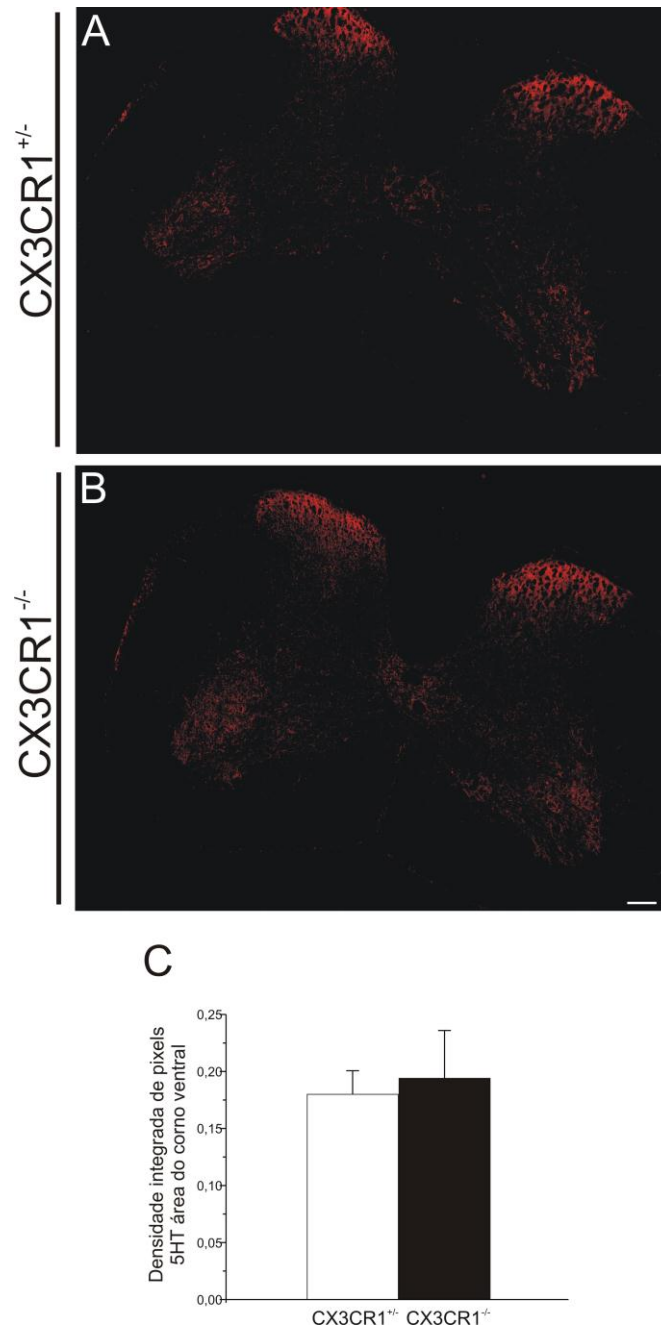


Figura 47: Detecção de imunofluorescência de axônios serotoninérgicos localizados na intumescência cervical (C5-T1) (AB). (C) Quantificação da imunomarcagem de serotonina no corno ventral intumescência cervical. Observe que não houve diferença significativa na densidade das fibras 5HT + entre os grupos CX3CR1^{-/-} e CX3CR1^{+/-}. Barra de escala 100µm.

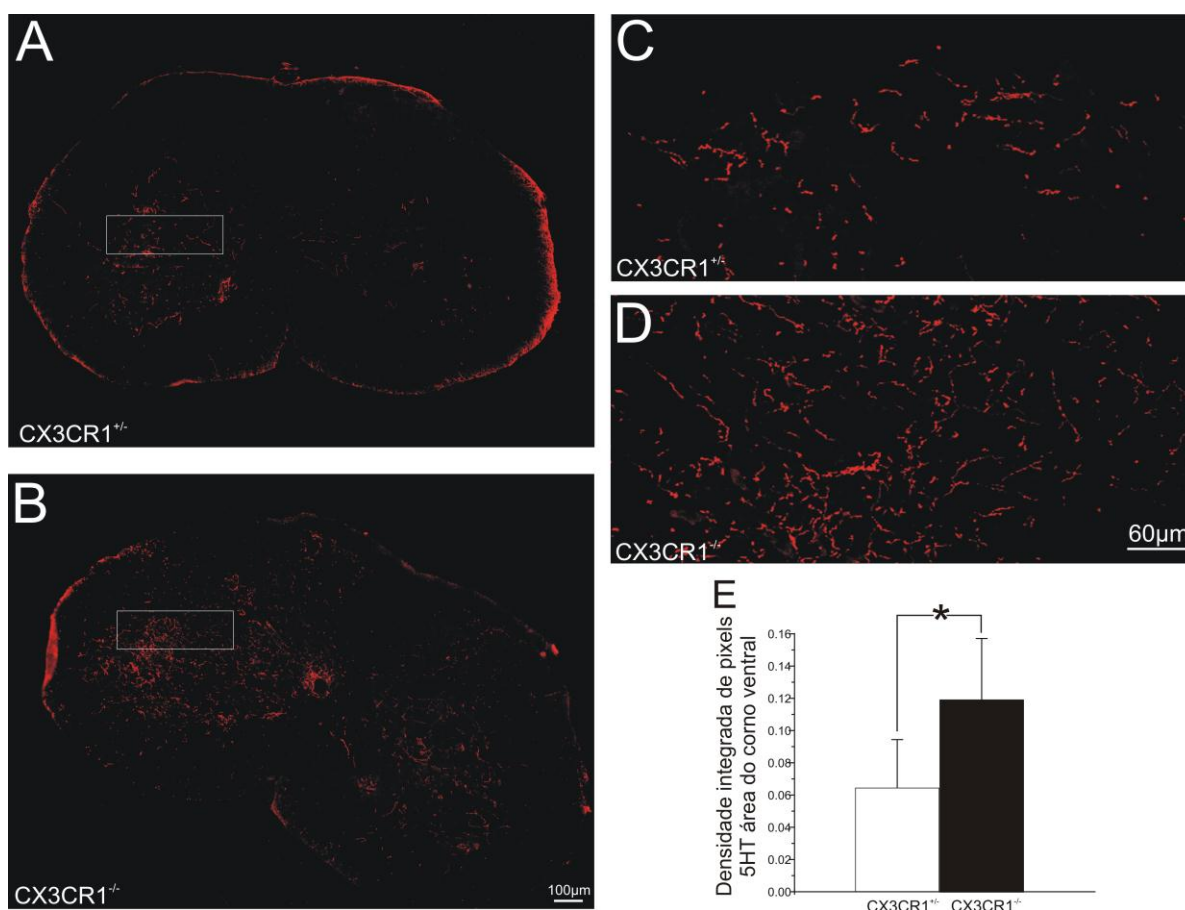


Figura 48: Ausência de CX3CR1 aumentou o brotamento de fibras serotoninérgicas após lesão traumática da medula espinal. (AD) Imunomarcção de fibras serotoninérgicas na intumescência lombar (L3-L5). Os retângulos brancos em (A) e (B) representam as imagens ampliadas em (C) e (D). Observa-se que as fibras 5HT + estão uniformemente distribuídas no corno ventral da medula espinal e, particularmente, próximo aos motoneurônios em camundongos deficientes em CX3CR1. Por outro lado, CX3CR1^{+/-} mostra menos fibras imunomarcadas em comparação a CX3CR1^{-/-}.

Em acordo com os resultados da 5HT, a imunomarcção anti-neurofilamentos, 0,8 micrômetros caudal ao local lesado, também confirmou a maior capacidade de crescimento axonal nos animais knockout após lesão (heterozigótica $0,09 \pm 0,027$; Knockout $0,15 \pm 0,026$; Figura 49). Consistentemente, a avaliação ultra-estrutural revelou a presença de

numerosos axônios mielinizados em CX3CR1^{-/-}. Além disso, foram observados, nos camundongos knockout, numerosas fibras nervosas se alongando para a região central da medula espinal (Figura 50).

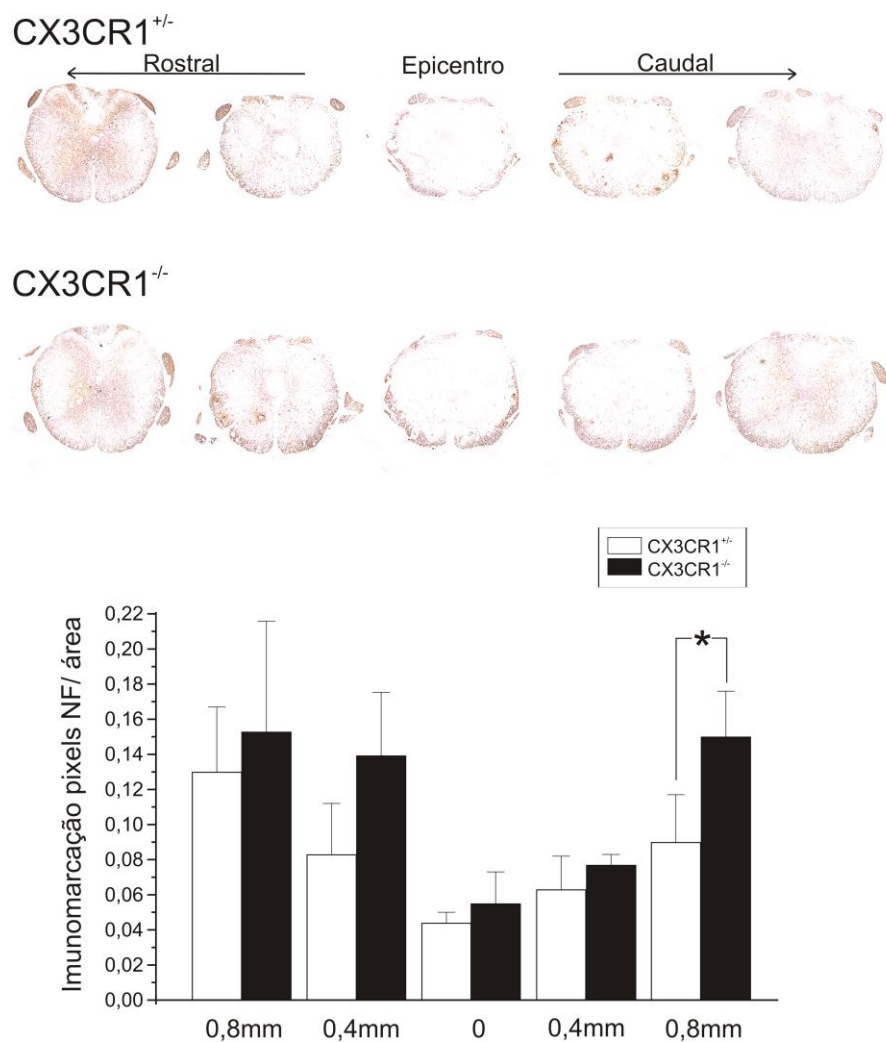


Figura 49: Imunomarcacão anti- neurofilamentos. Os lados direito e esquerdo do gráfico correspondem às regiões caudal e rostral respectivamente. Observe aumento significativo de crescimento de axônios 0,8 μ m caudal ao local lesado em camundongos knockout após lesão. Isto indica que os axônios são capazes de superar o ambiente não permissivo no local da lesão.

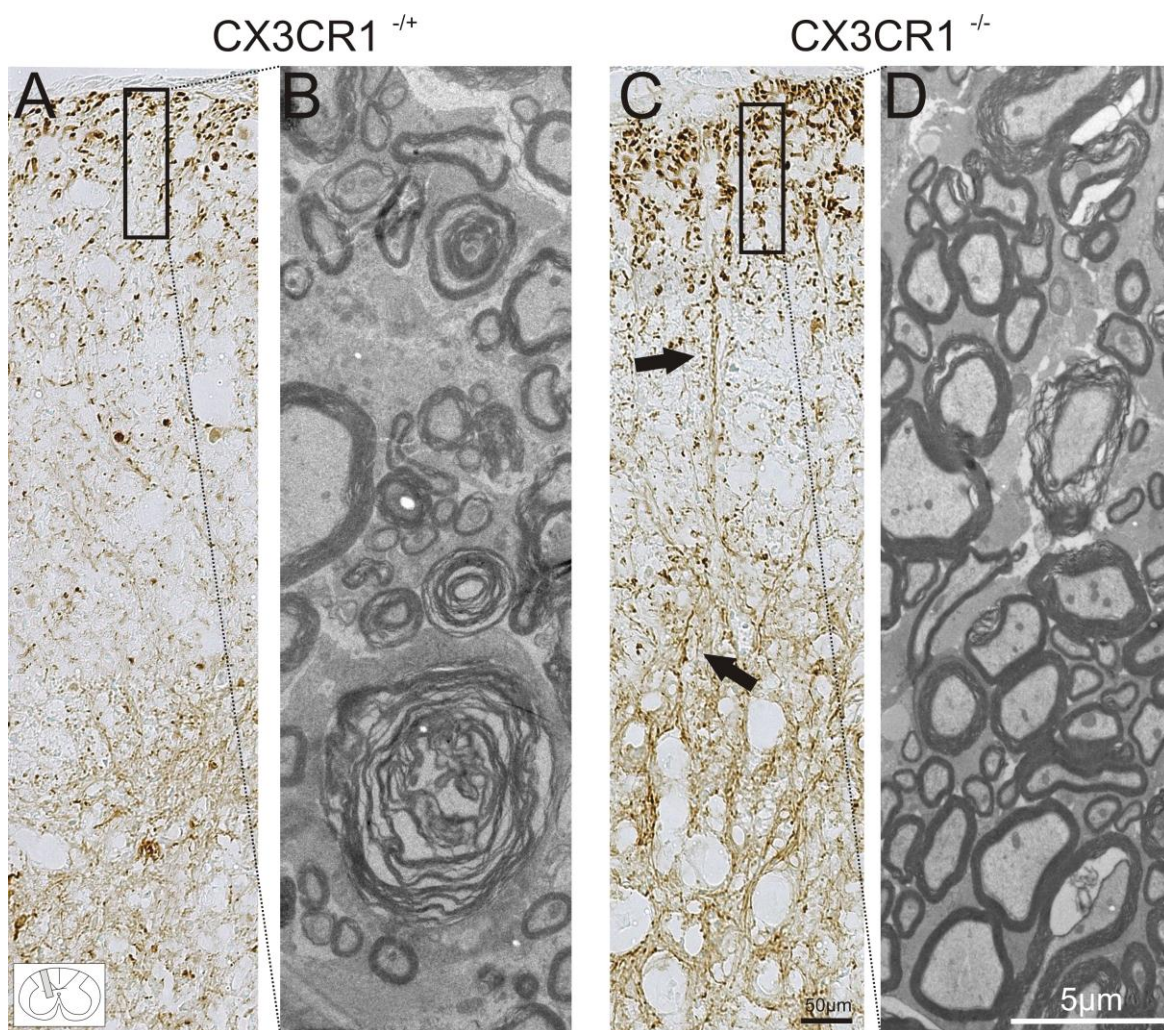


Figura 50: (AC) Imagens representativas da imunomarcção anti- neurofilamentos 0,8 μm caudal ao epicentro de lesão. As setas indicam numerosos neuritos alongando-se em direção ao centro da medula espinal em camundongos CX3CR1^{-/-}. (BD) vista ultra-estrutural das regiões apresentadas no AC revelam a presença de numerosos axônios mielinizados em camundongos deficientes em CX3CR1.

5.3 A ausência de CX3CR1 diminui a regulação da expressão de IRF5.

A ativação de IRF5 em animais knockout e heterozigotos após lesão medular foi analisada e os resultados mostraram que a deleção de CX3CR1 marcadamente diminui a expressão de IRF5 no epicentro da lesão (Heterozigoto $0,065 \pm 0,065$; $0,015 \pm 0,019$ Knockout; Figura 51-F). Além disso, IRF5 foi identificado em células GFP, sugerindo que os macrófagos podem expressar IRF5. Assim, a quantificação de células GFP positivas que expressam IRF5 mostrou que CX3CR1 é capaz de modular a transcrição de IRF5 em macrófagos (Figura 51-G).

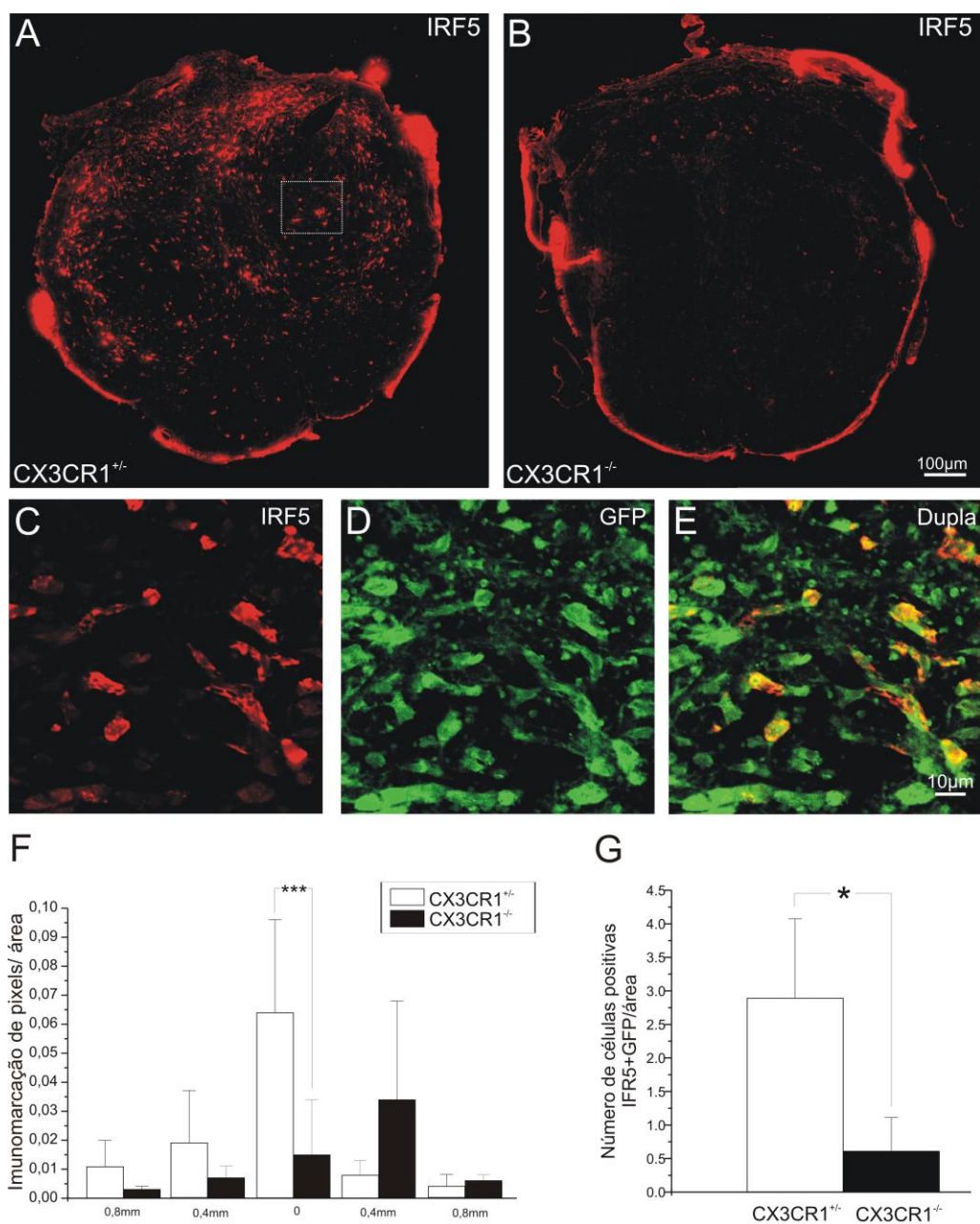


Figura 51: Expressão de IRF5 visto por hibridação *in situ* (AE). (C-D-E) imagens ampliadas de área destacada em (A), mostrando a colocalização entre IRF5 (vermelho) e GFP (verde). (F) - Quantificação da expressão de IRF5 por secção revela um significativo aumento da regulação da expressão IRF5 no epicentro da lesão em CX3CR1^{+/+} *** p <0,001. (G) Quantificação de células positivas IRF5 + GFP demonstrando um aumento de células GFP expressando IRF5 no epicentro da lesão em CX3CR1^{+/+}, * p <0,05.

5.4 Baixa expressão de IRF5 correlaciona com reduzido recrutamento de macrófagos M1 no local da lesão.

Para determinar se o crescimento axonal em camundongos deficientes foi resultado da diminuição do recrutamento de monócitos, foi realizada a imunomarcação de macrófagos com fenótipo M1 no epicentro da lesão. Elevada expressão de IRF5 coincidiu com um aumento do recrutamento de macrófagos M1. Os resultados quantitativos mostram um aumento de expressão IRF5 correlacionado com macrófagos M1 em camundongos heterozigotos (Heterozigoto $2,10 \pm 0,41$; Knockout de $1,18 \pm 0,12$; Figura 52).

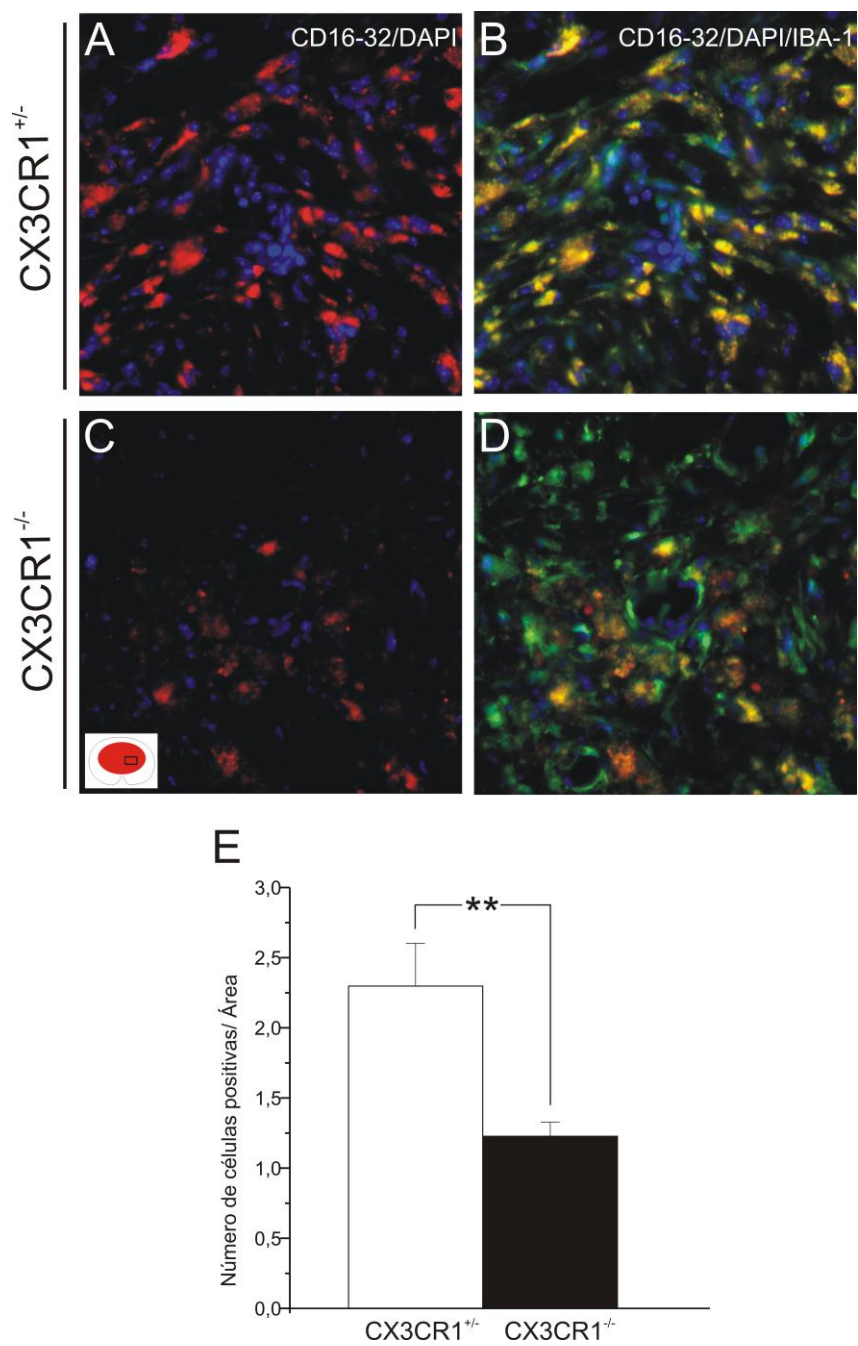


Figura 52: Macrófagos com fenótipo M1 presentes no local da lesão medular 56 dias após lesão. (E) Quantificação de macrófagos expressando fenótipo M1 (CD16/32 marcador). Observe um maior número de macrófagos M1 em CX3CR1^{+/-} comparado com CX3CR1^{-/-}.

5.5 A deleção de CX3CR1 preserva os contatos sinápticos em motoneurônios alfa após lesão medular.

A fim de avaliar a plasticidade sináptica em camundongos knockout e heterozigotos para CX3CR1 foi realizada imunomarcação anti- sinapsina. A imunomarcação foi quantificada nas adjacências de motoneurônios localizados no corno anterior da medula espinal em ambos os grupos. Os resultados mostraram que a deleção de CX3CR1 preservou a cobertura sináptica nos motoneurônios após lesão medular, assim como promoveu maior crescimento axonal (Heterozigoto $21,41 \pm 2,54$; Knockout $37,42 \pm 2,50$; Figura 53).

A análise ultraestrutural confirmou os resultados de imunomarcação obtidos para sinapsina, mostrando que a deleção de CX3CR1 aparentemente interfere na manutenção de circuitos espinais após lesão. Assim, a análise ultraestrutural mostrou maior preservação dos contatos sinápticos em animais knockout ($CX3CR1^{+/-}$ $41,60\% \pm 10,53$; $CX3CR1^{-/-}$ $52,62\% \pm 1,98$; Figura 48-C). No entanto, a deleção de CX3CR1 não foi capaz de alterar o número de terminais sinápticos / $100\mu\text{m}$ de membrana motoneuronal ($CX3CR1^{+/-}$ $39,10 \pm 5,33$; $CX3CR1^{-/-}$ $44,88 \pm 6,28$; Figura 54-D).

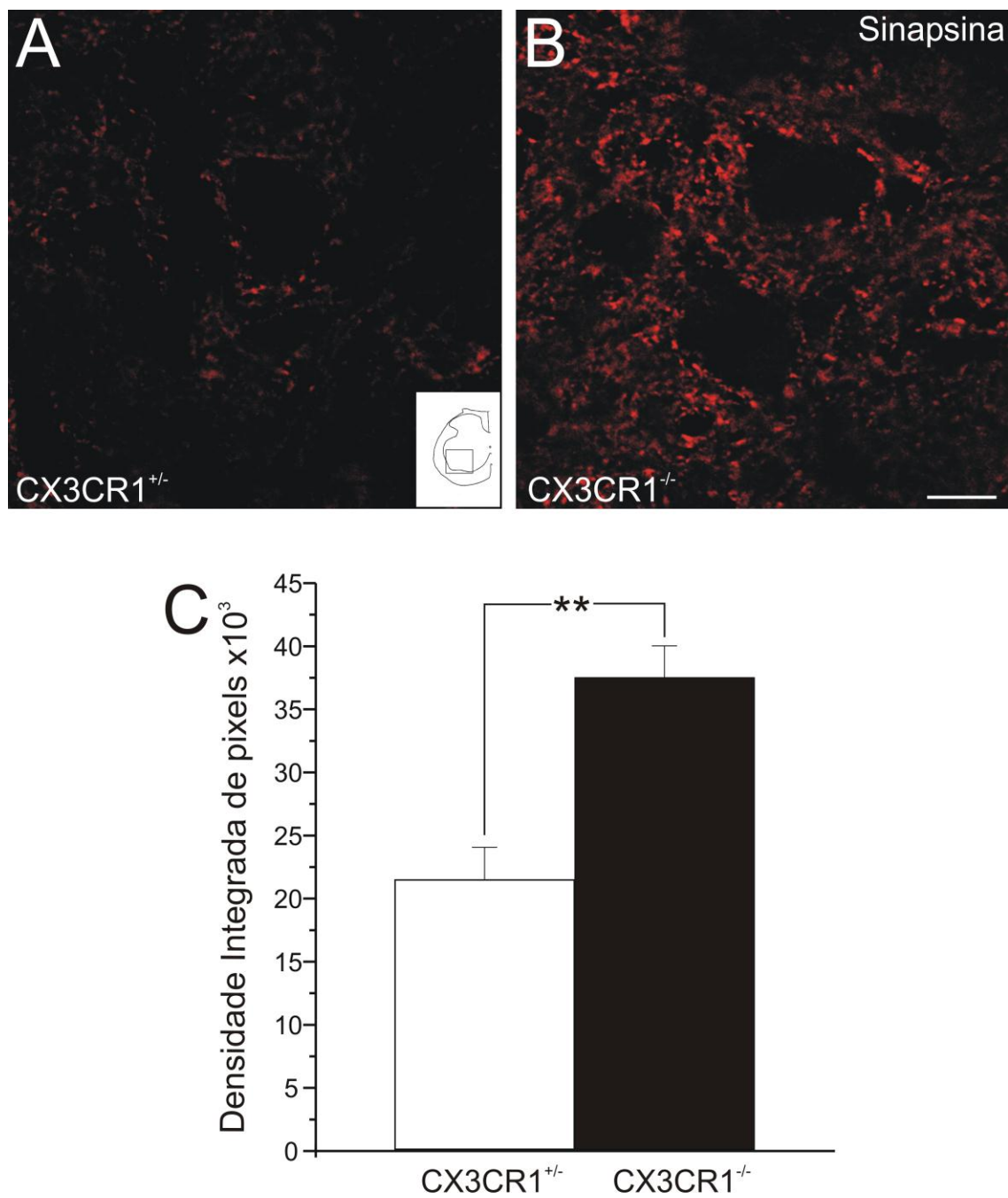


Figura 53: Imagens representativas de sinapsina na intumescência lombar (L3-L5), corno ventral em CX3CR1^{+/-} (A) e CX3CR1^{-/-} (B). (C) Quantificação da sinapsina no corno ventral, 56 dias após lesão medular. Note que a expressão de sinapsina é maior em CX3CR1^{-/-}, mostrando significativa preservação ou surgimento de tais circuitos sinápticos após lesão ** p < 0,01. Barra de escala 20µm.

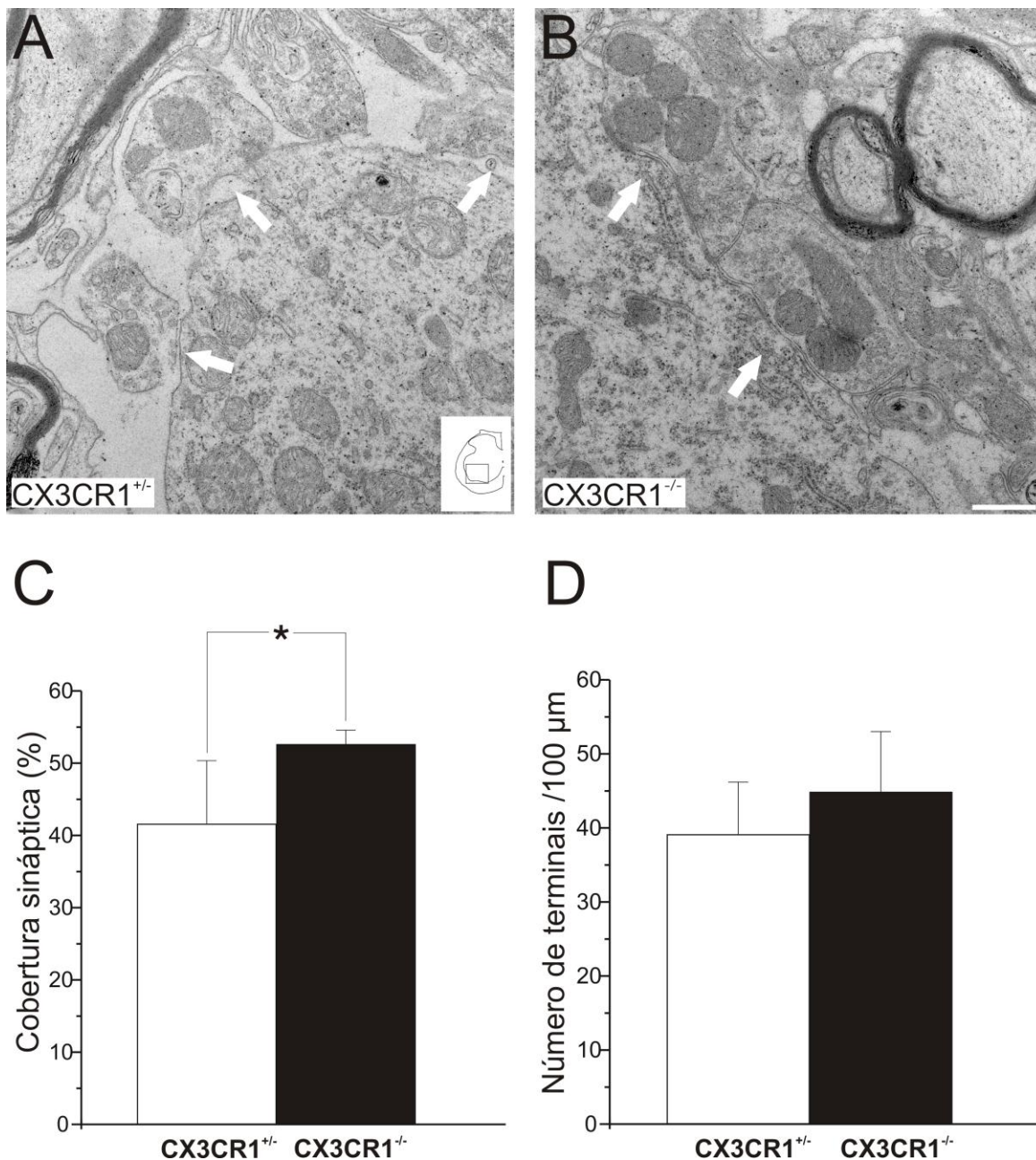


Figura 54: Análise ultraestrutural das sinapses em aposição aos motoneurônios alfa. Imagens representativas da superfície dos motoneurônios em CX3CR1^{+/-} e CX3CR1^{-/-} (AB). (C) Quantificação da porcentagem de cobertura sináptica, nota-se preservação significativa dos contatos sinápticos, * = $p < 0,05$. (C) A quantificação do número de terminais por 100 mm de comprimento de membrana dos motoneurônios. Setas (A) indicam os terminais retraídos em relação à membrana dos motoneurônios. Setas (B) mostram terminais sinápticos em aposição com os motoneurônios. Barra de escala: 0,5μm.

6. Discussão

Os macrófagos são capazes de alterar seu fenótipo funcional de pro-inflamatório (M1) para anti-inflamatório (M2) em resposta a citocinas e alterações no ambiente em que se encontram (Mantovani et al, 2004; Stout et al, 2005). Desse modo, dependendo do seu fenótipo e condição de ativação, os macrófagos podem iniciar mecanismos de lesão secundárias que contribuem para a degeneração neural. Assim, macrófagos M1 prejudicam a reparação no SNC, já os macrófagos M2 são capazes de regular a resposta glial, reduzindo a secreção de matrix extracelular, além de aumentar a produção de substâncias neuroprotetoras (Gensel et al, 2009; Nakajima et al, 2012). Portanto, a possibilidade de controlar tal fenótipo, torna-se uma importante ferramenta terapêutica com a finalidade de aumentar a capacidade regenerativa no SNC (Horn et al., 2008).

Evidências recentes sugerem que a modulação de quimiocinas pode interferir na polarização de macrófagos, promovendo a reparação e o remodelamento do tecido (Mantovani et al., 2004). A expressão de CX3CL1 e CX3CR1 é dinamicamente regulada após lesão e está envolvida no recrutamento de macrófagos e microglia durante a neuroinflamação (Boddeke et al., 1999). Estudos revelam que a ausência da sinalização de CX3CR1 promove neuroproteção e recuperação funcional. Tais benefícios estão associados com a supressão da sinalização inflamatória em microglia e macrófagos derivados de monócitos (MDM) (Donnelly et al, 2011). Assim, a deleção de CX3CR1 é capaz de reverter os resultados negativos após lesão, promovendo maior regeneração axonal.

Diante disso, como a melhora funcional após lesão medular atribui-se ao restabelecimento parcial de vias descendentes e ou de contatos sinápticos, o objetivo do trabalho foi verificar o efeito do CX3CR1 em tais eventos. Assim, foi detectado maior

brotamento de fibras, possivelmente do trato rafespinal (5-HT), caudal ao local de lesão, em camundongos deficientes para CX3CR1. É importante notar que resultados anatômicos e fisiológicos apoiam a hipótese de que vias serotoninérgicas descendentes estão envolvidas, indiretamente, no controle de locomoção por modulação da atividade dos motoneurônios no corno ventral (Jacobs e Fornal, 1997; Schmidt e Jordan, 2000; Ballermann & Fouad, 2006). A inervação de serotonina mantém a excitabilidade dos motoneurônios, regulando as correntes de cálcio (Hounsgaard & Kiehn, 1985; Murray et al, 2010). Além disso, após redução de 5-HT, foi observada considerável perda de sinapses na medula espinal de animais adultos ou em desenvolvimento, sugerindo que o 5-HT tem participação importante na formação e manutenção de circuitos espinais (Okado et al., 1993). De acordo com nossos resultados, camundongos knockout para CX3CR1 apresentaram maior brotamento de axônios 5HT caudal à lesão e, conseqüentemente, aumento na preservação sináptica em neurônios motores. Com base nessas observações, nossa hipótese é que a presença de fibras serotoninérgicas influencia positivamente no microambiente dos motoneurônios, preservando os contatos sinápticos em camundongos CX3CR1^{-/-}.

Os dados presentes também revelam que os axônios foram capazes de atravessar a cicatriz glial, que normalmente inibe o crescimento de neuritos e a regeneração após a lesão. Sabe-se que os astrócitos, quando reativos e hipertróficos, são os principais secretores de molécula inibidora como CSPGs, principal molécula componente da cicatriz glial. Entretanto, neste trabalho a deleção do CX3CR1 não influenciou na reatividade astrocitária. Além disso, não há evidência significativa de alterações anatômicas e diferenças na reatividade da microglia e na expressão de CSPGs entre os grupos. Certamente, a influência da sinalização do CX3CR1 limita-se ao microambiente de lesão, o

que explica a ausência de alterações globais como a reatividade glial. Logo, na tentativa de entendermos quais alterações endógenas ocorreram neste microambiente, análises *in situ* foram realizadas. Estes resultados mostraram que a ausência de CX3CR1 diminuiu a expressão do fator regulador de interferon (IRF5). Logo, os mecanismos moleculares responsáveis pela indução IRF5 são dependentes da sinalização de CX3CR1. Trabalhos recentes revelam que o IRF-5 criticamente contribui para a indução mediada por TLRs de uma série de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-6 e IL-12, tanto em células dendríticas e macrófagos (Takaoka et al., 2005). Aqui, mostramos que a expressão elevada de IRF5 foi associada com aumento de macrófagos M1. Tal resultado está de acordo com Krausgruber et al, (2010), os quais mostraram que IRF5 promove a polarização de macrófagos inflamatórios responsáveis pelas respostas Th1. Assim, tais evidências reforçam que os divergentes fenótipos de macrófagos derivam da polarização funcional do sistema mononuclear fagocitário. Uma das principais características da polarização de macrófagos M1 é a eficiente resposta Th1 gerada através do reconhecimento de antígenos. Curiosamente, CX3CR1 é preferencialmente expresso em células Th1 pró-inflamatórias e / ou células citotóxicas (Mantovani et al., 2004). Portanto, uma vez que os macrófagos podem mudar o seu fenótipo funcional em resposta a alterações no ambiente, sugere-se que a sinalização de CX3CR1 é capaz de influenciar o destino de macrófagos M1 para o local da lesão (Stout et al., 2005). Segundo, Donnelly et al. (2011) a deficiência CX3CR1 pode atenuar o dano tecidual e melhorar a recuperação funcional, reduzindo os efeitos prejudiciais dos MDM. Aqui mostramos que esta melhora funcional é decorrente da redução da carga pró-inflamatória, resultante da redução de macrófagos M1. Assim, tais alterações no microambiente de lesão levaram à regeneração axonal e à preservação

sináptica. Tais achados são muito promissores, já que a capacidade de manipular o fenótipo funcional de macrófagos pode ser uma importante ferramenta terapêutica em lesões traumáticas medulares.

7. Conclusões

- A deleção de CX3CR1 não interferiu na reatividade glial e na formação da cicatriz glial;
- A deleção de CX3CR1 promoveu crescimento axonal após lesão medular;
- A ausência de CX3CR1 diminuiu a regulação da expressão de IRF5;
- A baixa expressão de IRF5 está correlacionada com reduzido recrutamento de macrófagos M1 no local da lesão;
- A deleção de CX3CR1 preservou os contatos sinápticos em motoneurônios alfa após lesão medular.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL

Por muitos anos o SNC foi considerado um órgão imuno privilegiado, protegido pela barreira hemato-encefálica. No entanto, diversas circunstâncias patológicas e fisiológicas revelaram que a ação do SI no SNC constitui um importante mecanismo de resposta à lesões (Tillex & Hermans, 2007). Assim, as células gliais são responsáveis por intermediar esta via bidirecional de comunicação entre SI e SN (Aldskogius & Kozlova, 1998).

Na superfície das células gliais são expressas moléculas que medeiam a interação entre SI e SN. Os receptores Toll like são expressos na superfície de macrófagos, células dendríticas, células T regulatórias, neurônios, astrócitos, microglia (Okun *et al.*, 2008, Jack *et al.*, 2005) e células de Schwann (Goethals *et al.*, 2010). Outras moléculas de superfície como o receptor CX3CR1 são expressos por monócitos, células dendríticas e microglia (Nishiyori *et al.*, 1998). Tais moléculas são dinamicamente reguladas após lesão no SNC, sugerindo que a sinalização entre neurônio e glia também pode ser mediada através destes receptores (Harrison *et al.*, 1998). Neste trabalho mostramos que, após lesão, estas moléculas participam da preservação sináptica e da regeneração axonal.

Estudos mostram que a ativação via TLR4 regula a expressão dos receptores de quimiocina CX3CR1 (Boddeke *et al.*, 1999; Pachot *et al.*, 2008). Assim, a deficiência deste receptor reduz a transcrição de NF- κ B, diminuindo os efeitos inflamatórios da ativação de TLR4 (Ishida *et al.*, 2008). Além disso, a dinâmica da expressão da citocina G-CSF mostrou estar relacionada com a expressão de TLR4 (Li *et al.*, 2009). Tal fato deixa clara a correlação de tais eventos no SNC. Assim, certamente, a manipulação da expressão de tais moléculas torna-se excelentes ferramentas de ajuste dos processos inflamatórios, promovendo um microambiente favorável à regeneração e a plasticidade sináptica.

Por sua vez, este ambiente favorável depende do tipo e extensão da lesão, além das citocinas e interleucinas liberadas localmente. Outro fator determinante é a capacidade regenerativa do tecido lesado. Assim, axônios no SNC têm uma capacidade regenerativa menor comparativamente ao SNP (Schwab & Bartholdi, 1996). Neste sentido, o presente estudo mostrou que as moléculas TLRs tiveram efeitos antagônicos no SNC e SNP. Assim, a presença do receptor Toll like 4, que no SNC foi benéfica para a preservação sináptica, no SNP parece não contribuir para a regeneração. Semelhantemente, a ausência do receptor Toll like 2 foi benéfica para a preservação sináptica, porém, não contribuiu para a regeneração periférica.

Tal fato parece bastante contraditório, uma vez que, tem-se postulado que o restabelecimento das propriedades dos motoneurônios é dependente da ocorrência de regeneração axonal. Entretanto, trabalhos mostram que, alta regeneração axonal não corresponde necessariamente com maior restabelecimento dos circuitos sinápticos. Sabha et al (2008) mostraram que camundongos A/J apresentam alta capacidade regenerativa axonal porém, com elevada perda de terminais sinápticos 1 semana após lesão. Isto deixa claro que a inflamação tem influências antagônicas no SNP e SNC, podendo interferir na regeneração axonal. Kigerl et al (2009) mostraram que o crescimento e o brotamento axonal é influenciado por fatores facilitadores de crescimento derivados de macrófagos anti-inflamatórios. Assim, sugere-se que o motivo de maior capacidade regenerativa de axônios no SNP comparado aos axônios no SNC, deve-se as distintas respostas funcionais de macrófagos. Os mecanismos que controlam tais eventos, certamente dependem da sinalização de quimiocinas, citocinas, e outras moléculas presentes no microambiente de lesão (Mantovani et al., 2004; Stout et al., 2005). Nosso trabalho mostrou que a ausência de

CX3CR1 favoreceu a regeneração axonal e a preservação sináptica, por reduzir o aporte inflamatório após lesão traumática medular.

Estudos mostram que a ativação bem sucedida de microglia e macrófagos é essencial para a eficiente remoção fagocítica de resíduos de mielina (Rotshenker, 2003; Vallieres et al., 2006). Estas células também produzem citocinas e fatores de crescimento que podem promover a sobrevivência de neurônio, remielinização, oligodendrogênese e angiogênese. Provavelmente, estas funções corroboram com os resultados aqui obtidos, uma vez que a ausência de CX3CR1 diminuiu a presença de macrófagos M1 no local da lesão, promovendo assim o crescimento de neuritos caudal à lesão.

Esta relação ambígua das células gliais no SN, ora promovendo a regeneração, ora impedindo a plasticidade e a melhora funcional também pode ser observada em astrócitos. Trabalhos mostram que os astrócitos podem assumir fenótipos diferentes em função do meio (Garg et al., 2009). Assim, de um lado, o tratamento de G-CSF após avulsão aumentou a proliferação de astrócitos com funções neuroprotetoras, favorecendo a sobrevivência neuronal e a preservação sináptica. Por outro lado, o estudo de camundongos selvagens para Toll like 2 mostrou que aumentada reatividade astrogliar está correlacionada com maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e maior perda sináptica após lesão periférica.

Diante deste contexto, compreende-se que as respostas gliais dependem do tipo de lesão e da influência de diferentes microambientes. Ainda, sugere-se que a manipulação de tais moléculas, expressas na superfície das células gliais, possam alterar sua atividade, facilitando a regeneração ou plasticidade no SN. Logo, a compreensão de tais eventos pode ser uma ferramenta crucial no tratamento de lesões periféricas e centrais.

Finalmente, o controle e a progressão da inflamação e da reatividade glial são, provavelmente, críticos para a sobrevivência neuronal, a regeneração axonal e a plasticidade após lesão.

5. REFERÊNCIAS

- Abercrombie, M., Johnson, M.L. Quantitative histology of Wallerian degeneration: I. Nuclear population in rabbit sciatic nerve. *J Anat.* 1946; 80: 37-50.
- Aharoni, R., Kayhan, B., Eilam, R., Sela, M., Arnon, R.,. Gatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 14157-14162.
- Aldskogius H, Kozlova EN. Central neuron-glial and glial-glial interactions following axon injury. *Progress. in Neurobiol.* 1998;55: 1-26.
- Aldskogius H, Liu L, Svensson M.. Glial Responses to Synaptic Damage and Plasticity. *J Neurosci Res.* 1999; 58: 33-41.
- Andrews EM, Richards RJ, Yin FQ, Viapiano MS, Jakeman LB. Alterations in chondroitin sulfate proteoglycan expression occur both at and far from the site of spinal contusion injury. *Exp Neurol.* 2012; 235(1):174-87.
- Barbizan, R., Oliveira, A.L.R. Impact of acute inflammation on spinal motoneuron synaptic plasticity following ventral root avulsion. *J. Neuroinflam.* 2010; 7: 29-45.
- Ballermann M, Fouad K. Spontaneous locomotor recovery in spinal cord injured rats is accompanied by anatomical plasticity of reticulospinal fibers. *Eur J Neurosci.* 2006; 23(8):1988-96.
- Barritt AW, Davies M, Marchand F, Hartley R, Grist J, Yip P, McMahon SB, Bradbury EJ. Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2006; 26(42):10856-67.

Benowitz LI, Popovich PG. Inflammation and axon regeneration. *Curr Opin Neurol.* 2011; 24(6):577-83.

Benveniste EN, Sparacio SM, Norris JG, Grenett HE, Fuller GM. Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J Neuroimmunol.* 1990; 30(2-3):201-212

Berg A, Zelano J, Stephan A, Thams S, Barres BA, Pekny M, Pekna M, Cullheim S. Reduced removal of synaptic terminals from axotomized spinal motoneurons in the absence of complement C3. *Exp Neurol.* 2012; 237(1):8-17.

Boivin A, Pineau I, Barrette B, Filali M, Vallieres N, Rivest S, Lacroix S. Toll like receptor signaling is critical for wallerian degeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *J Neurosci.* 2007; 27:12565-12576.

Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I. Cultured astrocytes express toll like receptor for bacterial products. *Glial.* 2003; 43:281-291.

Boddeke EW, Meigel I, Frentzel S, Biber K, Renn LQ, Gebicke-Härter P. Functional expression of the fractalkine (CX3CR1) receptor and its regulation by lipopolysaccharide in rat microglia. *Eur J Pharmacol.* 1999; 374(2):309-13.

Boulanger LM. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron.* 2009; 64(1):93-109.

Boyd JG; Gordon T. Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo. *Experimental Neurology* 2003, 183:610-619.

Black IB. Trophic regulation of synaptic plasticity. *J Neurobiol* 1999, 41(1):108-18.

Referencias

- Bradbury EJ, Carter LM. Manipulating the glial scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain Res Bull.* 2011; 84(4-5):306-16.
- Cafferty WB, Yang SH, Duffy PJ, Li S, Strittmatter SM. Functional axonal regeneration through astrocytic scar genetically modified to digest chondroitin sulfate proteoglycans. 2007. *J Neurosci.* 28; 27(9):2176-85.
- Carlstedt, T., Nerve root replantation. *Neurosurg Clin N Am.* 2009; 20: 39-50.
- Crespo D, Asher RA, Lin R, Rhodes KE, Fawcett JW. How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? *Exp Neurol.* 2007; 200(2):159-71.
- Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol.* 1992; 149:2736 – 2741.
- Chang HY, Havton LA. Surgical implantation of avulsed lumbosacral ventral roots promotes restoration of bladder morphology in rats. *Exp Neurol.* 2008; 214(1):117-24.
- Chu TH, Li SY, Guo A, Wong WM, Yuan Q, Wu W. Implantation of neurotrophic factor-treated sensory nerve graft enhances survival and axonal regeneration of motoneurons after spinal root avulsion. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009; 68(1):94-101.
- Chen ZL., Yu W., Strickland S. Peripheral Regeneration. *Annu Rev Neurosci* 2007; 30:209-233.
- Conradi, S. On motoneuron synaptology in adult cats. *Acta. Physiol. Scand.* 1969; 332: 1-57.
- Cullheim S, Thams S. The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Res Rev.* 2007; 55(1):89-96.

Cullheim, S.; Carlstedt, T.; Rising, M. Axon regeneration of spinal motoneurons following a lesion at the cord-ventral root interface. *Spin Cord*. 1999; 37: 811-819.

Cullheim S, Wallquist W, Hammarberg H, Lindå H, Piehl F, Carlstedt T, Risling M. Properties of motoneurons underlying their regenerative capacity after axon lesions in the ventral funiculus or at the surface of the spinal cord. *Brain Res Brain Res Rev*. 2002; 40(1-3):309-16.

De Medinaceli L, Derenzo E, Wyatt RJ. Rat sciatic functional index data management system with digitized input. *Comp Biom Res*. 1984;17:185-192.

Demetri, G.D., Griffin, J.D. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 1991; 78: 2791-2808.

Di Filippo M, Sarchielli P, Picconi B, Cavabresi P.. Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel immune centred, therapeutic approach to neurological disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2008; 29:402-412.

Donnelly DJ, Longbrake EE, Shawler TM, Kigerl KA, Lai W, Tovar CA, Ransohoff RM, Popovich PG. Deficient CX3CR1 signaling promotes recovery after mouse spinal cord injury by limiting the recruitment and activation of Ly6Clo/iNOS⁺ macrophages. *J Neurosci*. 2011; 31(27):9910-22.

Eggers, R., Tannemaat, M.R., Ehlert, E.M., Verhaagen, J A spatio-temporal analysis of motoneuron survival, axonal regeneration and neurotrophic factor expression after lumbar ventral root avulsion and implantation. *Exp Neurol*. 2010; 223: 207-220.

Emirandetti A, Zanon RG, Sabha JR, Oliveira ALR. Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. *Brain Res* 2006; 1095:35-42

Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 2007; 28:138-145.

Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2004; 24(9):2143-55.

Fawcett, J. W. Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system. *Cell Tissue Res.* 1997; 290(2): 371-377.

Fourgeaud L, Boulanger LM. Synapse remodeling, compliments of the complement system. *Cell* 2007, 131(6):1034-1036.

Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.* 2011; 8:110.

Garg SK, Kipnis J, Banerjee R. IFN-gamma and IL-4 differentially shape metabolic responses and neuroprotective phenotype of astrocytes. *J Neurochem.* 2009; 108(5):1155-66.

Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19(1):71-82.

- Gensel JC, Nakamura S, Guan Z, van Rooijen N, Ankeny DP, Popovich PG. Macrophages promote axon regeneration with concurrent neurotoxicity. *J Neurosci.*2009; 29(12):3956-68.
- Goethals S, Ydens E, Timmerman V, Janssens S. Toll-like receptor expression in the peripheral nerve. *Glia.* 2010; 23.
- Hammarberg, H.; Piehl, F.; Cullheim, S.; Fjell, J.; Hökfelt, T.; Fried, K. GDNF mRNA in Schwann cells and DRG satellite cells after chronic sciatic nerve injury. *Neuroreport.*1996; 7(4):857-60.
- Hammarberg, H., Lidman, O., Lundberg, C., Eltayeb, S.Y., Gielen, A.W., Muhallab, S., Svenningsson, A., Lindå, H., van Der Meide, P.H., Cullheim, S., Olsson, T., Piehl, F. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci.* 2000; 20: 5283-5291.
- Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(18):10896-901.
- Hailer NP, Vogt C, Korf HW, Dehghani F. Interleukin-1beta exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 2005; 21(9):2347-2360.
- Henriques A, Pitzer C, Dupuis L, Schneider A. G-CSF protects motoneurons against axotomy-induced apoptotic death in neonatal mice. *BMC Neurosci.* 2010; 11:25.

Henn A, Kirner S, Leist M. TLR2 hypersensitivity of astrocytes as functional consequence of previous inflammatory episodes. *J Immunol* 2011; 186(5):3237–3247.

Hill CE, Beattie MS, Bresnahan JC. Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol*. 2001; 171(1):153-69.

Hoang, T.X., Akhavan, M., Wu, J., Havton, L.A. Minocycline protects motor but not autonomic neurons after cauda equina injury. *Exp. Brain Res*. 2008;189, 71-77.

Hounsgaard J, Kiehn O. Ca^{2+} dependent bistability induced by serotonin in spinal motoneurons. *Exp Brain Res*. 1985; 57(2):422-5.

Hörste GMZ., Hu W., Hartung H., Lehmann HC., Kieseier BC. The immunocompetence of Schwann cells. *Muscle Nerve*. 2008; 37:3-13.

Horn KP, Busch SA, Hawthorne AL, van Rooijen N, Silver J. Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions. *J Neurosci*. 2008; 28:9330 –9341.

Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ: Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 2000; 290(5499):2155-2159.

Huang WL, George KJ, Ibba V, Liu MC, Averill S, Quartu M, Hamlyn PJ, Priestley JV. The characteristics of neuronal injury in a static compression model of spinal cord injury in adult rats. *Eur J Neurosci*. 2007; 25(2):362-72.

Hughes PM, Botham MS, Frentzel S, Mir A, Perry VH. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. *Glia*. 2002; 37(4):314-27.

Ide C. Peripheral nerve regeneration; *Neuroscience Research* 1996; 25:101-121.

Ishida Y, Hayashi T, Goto T, Kimura A, Akimoto S, Mukaida N, Kondo T. Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis. *J Immunol*. 2008; 181:4208– 4218.

Jacobs BL, Fornal CA. Serotonin and motor activity. *Curr Opin Neurobiol*. 1997; 7(6):820-5.

John GR, Lee SC, Song X, Rivieccio M, Brosnan CF. IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia* 2005; 49(2):161-176.

Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A, Antel JP. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J. Immunol*. 2005; 22:4320-4330.

Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*. 2000; 20(11):4106-14.

Kandel E.R, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of Neural Science*, 4th Edition: McGraw-Hill. 2000.

Karanth S, Yang G, Yeh J, Richardson PM. Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian Degeneration of peripheral nerves. *Exp Neurol*. 2006; 202: 161-166.

Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M, Udalova IA. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. 2011. *Nat Immunol*. 12(3):231-8.

Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*. 2009; 28;29(43):13435-44.

Kigerl KA, Lai W, Rivest S, Hart RP, Satoskar AR, Popovich PG. Toll like receptor (TLR)2 and TLR4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. *J. Neurochemistry*. 2007;102:37-5.

Kim JE, Liu BP, Park JH, Strittmatter SM. Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury. *Neuron*. 2004; 44(3):439-51.

Koda M, Nishi o Y, Kamada T, Someya Y, Okawa A, Mori C, Yoshinaga K, Okada S, Moriya H, Yamazaki M.. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res*. 2007,1149:223–231.

- Koliatsos, V. E.; Price, W. L.; Pardo, C. A.; Price, D. L. Ventral root avulsion: An experimental model for death of adult motor neurons. *J Comp Neurol.* 1994, 342: 35-44.
- Kuno, M., Llina's, R. Alterations of synaptic action in chromatolysed motoneurons of the cat. *J. Physiol.* 1970; 210: 823–838.
- Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 1993, 150(7):2659-2667.
- Lee, S.T., Chu, K., Jung, K.H., Ko, S.Y., Kim, E.H., Sinn, D.I., Lee, Y.S., Lo, E.H., Kim, M., Roh, J.K.. Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2005,1058: 120-128.
- Lee H, Jo EK, Choi SY, Oh SB, Park K, Kim JS, Lee SJ. Necrotic neuronal cells induce inflammatory Schwann cell activation via TLR2 and TLR3: implication in Wallerian degeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 350(3):742-7.
- Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 2002, 22(7):2478-2486.
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a toll like receptor 4 dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;14:8514-8519.
- Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 2010; 58(3):253-263.

Li M, Shibata A, Li C, Braun PE, McKerracher L, Roder J, Kater SB, David S. Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse. *J Neurosci Res.* 1996; 46: 404-414.

Li, L., Wu, W., Lin, L. F., Lei, M., Oppenheim, R.W., Houenou, L.J.,. Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1995, 92: 9771-9775.

Li ZX, Li QY, Qiao J, Lu CZ, Xiao BG. Granulocyte-colony stimulating factor is involved in low-dose LPS-induced neuroprotection. *Neurosci Lett.* 2009; 465(2):128-32.

Lieberman, A. R. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev Neurobiol.* 1971; 14: 49-124.

Lidman O, Fraidakis M, Lycke N, Olson L, Olsson T, Piehl F. Facial nerve lesion response; strain differences but no involvement of IFN-gamma, STAT4 or STAT6. *Neuroreport.* 2002; 13(13):1589-93.

Lindå H, Shupliakov O, Örnung G, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Risling M, Cullheim S. Ultrastructural evidence for a preferential elimination of glutamate-immunoreactive synaptic terminals from spinal motoneurons after intramedullary axotomy. *J Comp Neurol.* 2000; 425:10-23.

Lieberman AR. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol.* 1971;14:49-124.

Liu BP, Fournier A, GrandPre T, Strittmatter SM. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science*. 2002; 297: 1190-1193.

Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*. 1997; 17(14):5395-406.

Ma Y, Li J, Chiu I, Wang Y, Sloane JA, Lü J, Kosaras B, Sidman RL, Volpe JJ, Vartanian T. Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis. *J Cell Biol* 2006, 175(2):209-215.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004; 25(12):677-86.

Martini R, Fischer S, López-Vales R, David S. Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia*. 2008; 56(14):1566-77.

McCarthy, K.D. and de Vellis, J., Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*. 1980; 85:890-902.

Morino T, Ogata T, Horiuchi H, Takeba J, Okumura H, Miyazaki T, Yamamoto H. Delayed neuronal damage related to microglia proliferation after mild spinal cord compression injury. *Neurosci Res*. 2003; 46(3):309-18.

Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, Suzumura A. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res*. 2003; 979(1-2):65-70.

Murray KC, Nakae A, Stephens MJ, Rank M, D'Amico J, Harvey PJ, Li X, Harris RL, Ballou EW, Anelli R, Heckman CJ, Mashimo T, Vavrek R, Sanelli L, Gorassini MA, Bennett DJ, Fouad K. Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT_{2C} receptors. *Nat Med.* 2010; 16(6):694-700.

Nakajima H, Uchida K, Rodriguez Guerrero A, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, Long G, Wright K, Johnson E, Baba H. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Promotes the Alternative Pathway of Macrophage Activation and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. 2012. *J Neurotrauma.* Jan 10. [Epub ahead of print]

Naveilhan P, ElShamy WM, Ernfors P. Differential regulation of mRNAs for GDNF and its receptors Ret and GDNFR alpha after sciatic nerve lesion in the mouse. *Eur J Neurosci* 1997, 9(7):1450-1460

Nawashiro, H., Messing, A., Azzam, N., Brenner, M. Mice lacking GFAP are hypersensitive to traumatic cerebrospinal injury. *Neuroreport.* 1998, 9: 1691-1696.

Nawashiro, H., Brenner, M., Fukui, S., Shima, K., Hallenbeck, J.M. High susceptibility to cerebral ischemia in GFAP-null mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000, 20:1040-1044.

Nishiyori A, Minami M, Ohtani Y, Takami S, Yamamoto J, Kawaguchi N, Kume T, Akaike A, Satoh M. Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Lett.* 1998; 429(2):167-72.

Nógrádi A, Szabó A, Pintér S, Vrbová G. Delayed riluzole treatment is able to rescue injured rat spinal motoneurons. *Neuroscience.* 2007, 19;144(2):431-8.

Novikov L, Novikova L, Kellerth JO. Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience*. 1997;79(3):765-74.

Novikov LN, Novikova LN, Holmberg P, Kellerth J. Exogenous brain-derived neurotrophic factor regulates the synaptic composition of axonally lesioned and normal adult rat motoneurons. *Neuroscience* 2000; 100(1):171-181.

Oppenheim RW, Houenou LJ, Johnson JE, Lin LF, Li L, Lo AC, Newsome AL, Prevette DM, Wang S.. Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature* 1995; 373:344–346.

Okado N, Cheng L, Tanatsugu Y, Hamada S, Hamaguchi K. Synaptic loss following removal of serotonergic fibers in newly hatched and adult chickens. *J Neurobiol*. 1993; 24(5):687-98.

Okun E, Griffioen KJ, D Lathia J, Tang S, Mattson MP, Arumugam TV. Toll like receptor in neurodegeneration *Brain Res. Rev.* in press. 2009; 59(2):278-92.

Oliveira AL, Thams S, Lidman O, Piehl F, Hökfelt T, Kärre K, Lindå H, Culheim S. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc Natl Acad Sci*. 2004; 101:17843–17848.

Olson JK, Miller SD: Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 2004; 173(6):3916–3924.

Otani, N., Nawashiro, H., Fukui. S., Ooigawa, H., Ohsumi, A., Toyooka, T., Shima, K., Gomi, H., Brenner, M. Enhanced hippocampal neurodegeneration after traumatic or kainate excitotoxicity in GFAP-null mice. *J Clin Neurosci*. 2006; 13, 934-938.

Pachot A, Cazalis MA, Venet F, Turrel F, Faudot C, Voirin N, Diasparra J, Bourgoïn N, Poitevin F, Mougin B, Lepape A, Monneret G. Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. *J Immunol*. 2008; 180:6421– 6429.

Pereira Lopes FR, Camargo de Moura Campos L, Dias Corrêa J Jr, Balduino A, Lora S, Langone F, Borojevic R, Blanco Martinez AM. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Exp Neurol*. 2006; 198(2):457-68.

Phulwani NK, Esen N, Syed MM, Kielian T. TLR2 expression in astrocytes is induced by TNF-alpha- and NF-kappa B-dependent pathways. *J Immunol* 2008; 181(6):3841–3849.

Piehl, F.; Tabar, G.; Cullheim, S. Expression of NMDA receptor mRNAs in rat motoneurons is down-regulated after axotomy. *Eur J Neurosci*. 1995; 7(10): 2101-2110.

Pintér S, Gloviczki B, Szabó A, Márton G, Nógrádi A. Increased survival and reinnervation of cervical motoneurons by riluzole after avulsion of the C7 ventral root. *J Neurotrauma*. 2010; 27(12):2273-82.

Pinteaux E, Rothwell NJ, Boutin H. Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia. *Glia* 2006; 53(5):551-556.

Pitzer, C., Kruger, C., Plaas, C., Kirsch, F., Dittgen, T., Muller, R., Laage, R., Kastner, S., Suess, S., Spoelgen, R., Henriques, A., Ehrenreich, H., Schabitz, W., Bach, A., Schneider,

A. Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2008; 131: 3335-3347.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282(5396):2085–2088.

Popovich PG, Longbrake EE. Can the immune system be harnessed to repair the CNS? *Nat Rev Neurosci*. 2008; 9(6):481-93.

Risling M. , Fried K. , Lindå H. , Cullheim S. and Meier M. Changes in nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in the spinal cord after ventral funiculus lesion in adult cats *Journal of Neurocytology*. 1992; 21(2): 79-93.

Risling M, Fried K, Linda H, Carlstedt T, Cullheim S. Regrowth of motor axons following spinal cord lesions: distribution of laminin and collagen in the CNS scar tissue. *Brain Res Bull*. 1993; 30(3-4):405-14.

Rodrigues Hell RC, Silva Costa MM, Goes AM, Oliveira AL. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. *Neurobiol Dis*. 2009; 33(2):290-300.

Rolls A, Shechter R, Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10(3):235-41.

- Rotshenker, S. Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/ MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease. *J. Mol. Neurosci.* 2003; 21, 65–72.
- Sabha M, Emirandetti A, Cullheim S, Oliveira AL. MHC I expression and synaptic plasticity in different mice strains after axotomy. *Synapse.* 2008;62:137-148.
- Sanders P, De Keyser J. Janus faces of microglia in multiple sclerosis. *Brain. Res. Rev.* 2007; 54:274-285.
- Saruhashi Y, Young W, Perkins R. The recovery of 5-HT immunoreactivity in lumbosacral spinal cord and locomotor function after thoracic hemisection. *Exp Neurol.* 1996; 139(2):203-13.
- Scorisa JM, Zanon RG, Freria CM, de Oliveira AL.. Glatirameracetate positively influences spinal motoneuron survival and synaptic plasticity after ventral root avulsion. *Neurosci Lett.* 2009; 451:34–39.
- Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci.* 1999; 11: 3648-3658.
- Schmidt BJ, Jordan LM. The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull.* 2000; 53(5):689-710.
- Schneider, A., Kuger, C., Steigleder, T., Weber, D., Pitzer, C., Laage, R., Aronowski, J., Maurer, M.H., Gassler, N., Mier, W., Hasselblatt, M., Kollmar, R., Schwab, S., Sommer, C., Bach, A., Kuhn, H.G., Schabitz, W.R. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal

ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J. Clin. Invest.* 2005, 115: 2083-2098.

Schneider, A., Kuhn, H.G., Schabitz, W.R. A role for G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) in the central nervous system. *Cell cycle.* 2005; 4:1753-1757.

Schiefer J, Kampe K, Dodt HU, Zieglgänsberger W, Kreutzberg GW: Microglial motility in the rat facial nucleus following peripheral axotomy. *J Neurocytol* 1999; 28(6):439–453.

Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev.*1996; 76(2):319-70.

Shibuya S, Yamamoto T, Itano T. Glial and axonal regeneration following spinal cord injury. *Cell Adh Migr.* 2009; 3(1):99-106.

Simonen M, Pedersen V, Weinmann O, Schnell L, Buss A, Ledermann B, Christ F, Sansig G, van der PH, Schwab ME. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron.* 2003; 38:201-211.

Smith RS, Koles ZL. Myelinated nerve fibers: computed effect of myelin thickness on conduction velocity. *Am. J. Physiol.* 1970; 219:1256-1258.

Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell.* 2007; 131(6):1164-78.

Solaroglu, I., Cahill, J., Jadhav, V., Zhang, J.H. A novel neuroprotectant granulocyte colony stimulating factor. *Stroke*. 2006; 37: 1123-1128.

Song XY, Zhou FHH, Zhong JH, Wu LLY, Zhou XF. Knockout of p75 impairs remyelination of injured sciatic nerve in mice. *Journal of Neurochemistry*. 2006; 96: 833-842.

Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol*. 2005; 175(1):342-9.

Su, H., Zhang, W., Guo, J., Guo, A., Yuan, Q., Wu, W. Neural progenitor cells enhance the survival and axonal regeneration of injured motoneurons after transplantation into the avulsed ventral horn of adult rats. *J Neurotrauma*. 2009; 26, 67-80.

Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S, Mattson MP. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(34):13798-13803.

Tanaka, H., Katoh, A., Oguro, K., Shimazaki, K., Gomi, H., Itohara, S., Masuzawa, T., Kawai, N. Disturbance of hippocampal long-term potentiation after transient ischemia in GFAP deficient mice. *J Neurosci Res*. 2002; 67: 11-20.

Tao, R., Aldskogius, H. Influence of FK506, Cyclosporin A, Testosterone and Nimodipine on Motoneuron Survival Following Axotomy. *Restor Neurol Neurosci*. 1998; 12:239-246.

Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, Kano S, Honda K, Ohba Y, Mak TW, Taniguchi T. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors.. *Nature*. 2005; 434(7030):243-9.

Tetzlaff W, Graeber MB, Bisby MA, Kreutzberg GW. Increased glial fibrillary acidic protein synthesis in astrocytes during retrograde reaction of the rat facial nucleus. *Glia*. 1988; 1:90-95

Tilleux S, Hermans E. Neuroinflammation and Regulation of Glial Glutamate Uptake in Neurological Disorders. *J. Neurosci. Res*. 2007; 85:2059-2070.

Vallieres, N., Berard, J. L., David, S. & Lacroix, S. Systemic injections of lipopolysaccharide accelerates myelin phagocytosis during Wallerian degeneration in the injured mouse spinal cord. *Glia*, 2006; 53:103–113

Xin L, Richardson PM, Gervais F, Skamene E. A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6J mice. *Brain Res*. 1990; 510:144-146.

Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7(8):617-27.

Zanon RG, Cartarozzi LP, Victório SC, Moraes JC, Morari J, Velloso LA, Oliveira AL. Interferon (IFN) beta treatment induces major histocompatibility complex (MHC) class I expression in the spinal cord and enhances axonal growth and motor function recovery following sciatic nerve crush in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2010; 36(6):515-34.

Zavala, F., Abad, S., Ezine, S., Taupin, V., Masson, A. G-CSF therapy of ongoing experimental allergic encephalomyelitis via chemokine- and cytokine-based immune deviation. *J. Immunol.* 2002; 168: 2011-2019.

Zeev-Brann, AB, Lazarov-Spiegler O, Brenner T, Schwartz M. Differential effects of central and peripheral nerves on macrophages and microglia. *Glia.* 1998; 23: 181–190.

Zhang CG, Welin D, Novikov L, Kellerth JO, Wiberg M, Hart AM.. Motoneuron protection by N-acetyl-cysteine after ventral root avulsion and ventral rhizotomy. *Br J Plast Surg.* 2005; 58: 765-773.

Zhang SX, Huang F, Gates M, White J, Holmberg EG. Histological repair of damaged spinal cord tissue from chronic contusion injury of rat: a LM observation. *Histol Histopathol.* 2011; 26(1):45-58.

Zhou, L.H., Wu, W. Survival of injured spinal motoneurons in adult rat upon treatment with glial cell line-derived neurotrophic factor at 2 weeks but not at 4 weeks after root avulsion. *J. Neurotrauma* 200; 23, 920–927.

Ziemssen, T., Kümpfel, T., Klinkert, W.E., Neuhaus, O., Hohlfeld, R. Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. *Brain-derived neurotrophic factor. Brain.* 2002; 125:2381-2391.

Zujovic V, Benavides J, Vigé X, Carter C, Taupin V Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia.* 2000;29(4):305-15.

6. ANEXOS

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada **“INFLUÊNCIA DA GLIA NA SOBREVIVÊNCIA, CAPACIDADE REGENERATIVA AXONAL E ESTABILIDADE SINÁPTICA DE MOTONEURÔNIOS MEDULARES APÓS LESÃO CENTRAL E PERIFÉRICA”**.

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(x) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto **No. 2006/07** , Instituição: Universidade Estadual de Campinas.

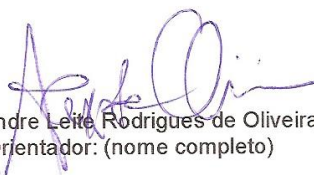
(x) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais ,
projeto No. 1656-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas.
projeto No. 2104-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas.
projeto No. 1832-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Camila Marques de Freria
Aluno: (nome completo)



Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Orientador: (nome completo)



Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Deferido 27/02/13

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

7. APÊNDICES

Granulocyte Colony Stimulating Factor Neuroprotective Effects on Spinal Motoneurons After Ventral Root Avulsion

CAMILA MARQUES DE FRERIA,* ROBERTA BARBIZAN, AND
ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA*
Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology,
University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

KEY WORDS ventral root avulsion; G-CSF; spinal motoneuron; glial cells; synaptic plasticity

ABSTRACT G-CSF is a glycoprotein commonly used to treat neutropenia. Recent studies have shown that the G-CSF receptor (G-CSF-R) is expressed by neurons in the central nervous system (CNS), and neuroprotective effects of G-CSF have been observed. In this study, the influence of G-CSF treatment on the glial reactivity and synaptic plasticity of spinal motoneurons in rats subjected to ventral root avulsion (VRA) was investigated. Lewis rats (7 weeks old) were subjected to unilateral VRA and divided into two groups: G-CSF and placebo treated. The drug treated animals were injected subcutaneously with 200 µg/kg/day of G-CSF for 5 days post lesion. The placebo group received saline buffer. After 2 weeks, both groups were sacrificed and their lumbar intumescences processed for transmission electron microscopy (TEM), motoneuron counting, and immunohistochemistry with antibodies against GFAP, Iba-1, and synaptophysin. Furthermore, *in vitro* analysis was carried out, using newborn cortical derived astrocytes. The results indicated increased neuronal survival in the G-CSF treated group coupled with synaptic preservation. TEM analyses revealed an improved preservation of the synaptic covering in treated animals. Additionally, the drug treated group showed an increase in astroglial reactivity both *in vivo* and *in vitro*. The astrocytes also presented an increased cell proliferation rate when compared with the controls after 3 days of culturing. In conclusion, the present results suggest that G-CSF has an influence on the stability of presynaptic terminals in the spinal cord as well as on the astroglial reaction, indicating a possible neuroprotective action. **Synapse** 66:128–141, 2012. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

Ventral root avulsion (VRA) is a debilitating lesion which is usually associated with a high energy trauma such as a motorbike accident, when the neck is violently moved away from the shoulder by traction. Experimental animal models studying the effects of such proximal axotomy have been developed and have facilitated the development of surgical repair strategies (Carlstedt, 2009). In this sense, a therapeutic window has been established, comprising the first 2 weeks after lesion. During this period, a variable proportion of axotomized motoneurons may be rescued from degeneration if certain pharmacological treatments are carried out. Over the years, different substances have been tested, including neurotrophic factors, riluzole, nimodipine, *n*-acetyl cysteine, and minocycline (Hoang et al., 2008; Nógrádi et al., 2007; Tao and Aldskogius, 1998; Zhang et al., 2005). Cell

therapy has also been used with promising outcomes (Su et al., 2009).

To date, the trophic and neuroprotective potential of the granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) has not been tested after ventral root avulsion. G-CSF is a glycoprotein used to treat neutropenia, which stimulates the proliferation of hematopoietic cells and differentiation of the myeloid lineage (Schneider et al., 2005ba). G-CSF receptors are pres-

Contract grant sponsor: CNPq

*Correspondence to: Camila Marques de Freria or Alexandre L.R. Oliveira, Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. E-mail: camilafreia@yahoo.com or aloliveira@unicamp.br

Received 16 August 2011; Accepted 14 September 2011

DOI: 10.1002/yn.20893

Published online 27 September 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

© 2011 WILEY PERIODICALS, INC.

RESEARCH

Open Access

Opposing effects of Toll-like receptors 2 and 4 on synaptic stability in the spinal cord after peripheral nerve injury

Camila Marques Freria¹, Licio Augusto Velloso² and Alexandre LR Oliveira^{1*}

Abstract

Background: Glial cells are involved in the synaptic elimination process that follows neuronal lesions, and are also responsible for mediating the interaction between the nervous and immune systems. Neurons and glial cells express Toll-like receptors (TLRs), which may affect the plasticity of the central nervous system (CNS). Because TLRs might also have non-immune functions in spinal-cord injury (SCI), we aimed to investigate the influence of TLR2 and TLR4 on synaptic plasticity and glial reactivity after peripheral nerve axotomy.

Methods: The lumbar spinal cords of C3H/HePas wild-type (WT) mice, C3H/HeJ TLR4-mutant mice, C57BL/6J WT mice, and C57BL/6J TLR2 knockout (KO) mice were studied after unilateral sciatic nerve transection. The mice were killed via intracardiac perfusion, and the spinal cord was processed for immunohistochemistry, transmission electron microscopy (TEM), western blotting, cell culture, and reverse transcriptase PCR. Primary cultures of astrocytes from newborn mice were established to study the astrocyte response in the absence of TLR2 and the deficiency of TLR4 expression.

Results: The results showed that TLR4 and TLR2 expression in the CNS may have opposite effects on the stability of presynaptic terminals in the spinal cord. First, TLR4 contributed to synaptic preservation of terminals in apposition to lesioned motor neurons after peripheral injury, regardless of major histocompatibility complex class I (MHC I) expression. In addition, in the presence of TLR4, there was upregulation of glial cell-derived neurotrophic factor and downregulation of interleukin-6, but no morphological differences in glial reactivity were seen. By contrast, TLR2 expression led to greater synaptic loss, correlating with increased astrogliosis and upregulation of pro-inflammatory interleukins. Moreover, the absence of TLR2 resulted in the upregulation of neurotrophic factors and MHC I expression.

Conclusion: TLR4 and TLR2 in the CNS may have opposite effects on the stability of presynaptic terminals in the spinal cord and in astroglial reactions, indicating possible roles for these proteins in neuronal and glial responses to injury.

Introduction

Peripheral nerve lesions lead to local and retrograde inflammation, resulting in synaptic changes in the central nervous system (CNS). The mechanisms that trigger such changes are not fully understood, but it is clear that molecules classically related to the immune system are pivotal. Expression of major histocompatibility complex

class I (MHC I) by neurons and glial cells has been implicated in the synaptic elimination process during development and after lesions in adulthood [1-3]. More recently, molecules from the classic complement pathway have also been implicated in the process of refinement of neural circuits and as important players in the response to peripheral nerve injury [4]. This classic model for studying the retrograde reaction to axon transection has been widely used, and has improved our understanding of the mechanisms underlying synapse elimination and of the interactions between neurons and glial cells after injury [2,5,6].

* Correspondence: alro@unicamp.br

¹Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2012 Freria et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.