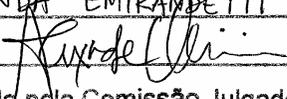


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

AMANDA EMIRANDETTI

ATIVIDADE ASTROCITÁRIA E SUA RELAÇÃO COM AS  
ALTERAÇÕES SINAPTOLÓGICAS EM CAMUNDONGOS DE  
DIFERENTES LINHAGENS ISOGÊNICAS APÓS A  
TRANSECÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) AMANDA EMIRANDETTI  e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Campinas

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

<b>Em48a</b>	<p>Emirandetti, Amanda Atividade astrocitária e sua relação com as alterações sinapológicas em camundongos de diferentes linhagens isogênicas após a transecção do nervo isquiático / Amanda Emirandetti. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.</p> <p>Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Medula espinhal. 2. Sinapses. 3. Astrócitos. 4. Neurônios motores. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
--------------	--

**Título em inglês:** Astrocytic reaction and spinal cord synaptic changes in different isogenic mice strains after sciatic nerve transection.

**Palavras-chave em inglês:** Spinal cord; Synapses; Astrocytes; Motor neurons.

**Área de concentração:** Anatomia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Elenice Aparecida de Moraes, Leonilda Maria Barbosa dos Santos.

**Data da defesa:** 17/08/2006.

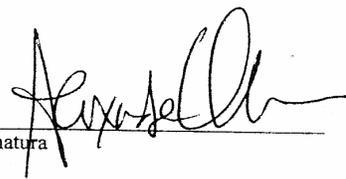
**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 17 de Agosto de 2006.

**BANCA EXAMINADORA**

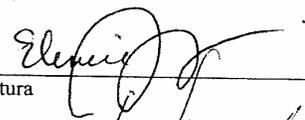
Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
(Orientador)

Assinatura



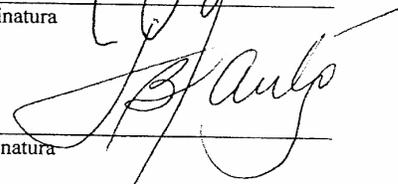
Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Assinatura



Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Assinatura



Prof. Dr. Benito Pereira Damasceno

Assinatura

---

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Assinatura

---

À minha mãe, grande batalhadora, agradeço por ter me apoiado em  
cada etapa da minha vida.

A o Rogério, meu companheiro, pelo suporte emocional e intelectual.

E spero um dia poder retribuir todo esse esforço.

À C aroline por me trazer paz apenas com uma simples conversa.

E u amo vocês!

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, por ter confiado em meu potencial e estar sempre presente durante a execução das técnicas. Agradeço também pela amizade que foi consolidada durante esse período.

Aos colegas do Laboratório de Regeneração Nervosa Karina, Renata, Amauri, Mário, Ana e Jéssica e estagiárias pela amizade, apoio e auxílios que me foram concedidos durante essa etapa da minha vida. Eu nunca me esquecerei de vocês.

Aos técnicos do Departamento de Anatomia Marcos Aurélio e Nori pela amizade e auxílios durante a execução das técnicas de microscopia eletrônica e de imunocitoquímica.

À Maria Antônia e Adriana do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB, pelo auxílio técnico e disponibilidade em me ajudar em diversos procedimentos.

Aos Professores Paulo Pinto Joazeiro, Benito Pereira Damasceno e Leonilda Maria Barbosa dos Santos, pelas sugestões realizadas na pré-banca.

À Liliam Panagio, secretária da Pós-Graduação do IB, pela disponibilidade em me auxiliar quando necessário.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Anatomia, que de alguma forma colaboraram para que este trabalho fosse concretizado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia pela oportunidade de utilizar os laboratórios quando necessário.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização dessa dissertação.

À CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT.....	xv
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....	xvi
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Organização geral do Sistema Nervoso .....	1
1.2. Os motoneurônios medulares .....	3
1.3. Células gliais.....	5
1.4. Astrócitos .....	6
1.5. Reatividade glial e resposta imune .....	9
1.6. Resposta dos motoneurônios à lesão nervosa e neuroplasticidade .....	10
1.7. Resposta dos astrócitos à lesão nervosa .....	11
1.8. Regeneração nervosa periférica .....	14
OBJETIVOS .....	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1. Estudo <i>in vivo</i> .....	18
2.1.1. Animais e grupos experimentais .....	18
2.1.2. Transecção do nervo isquiático.....	19
2.1.3. Sacrifício dos camundongos .....	19
2.1.4. Imunohistoquímica.....	20
2.1.5. Microscopia eletrônica de transmissão convencional.....	22
2.1.6. Imunocitoquímica .....	24
2.2. Estudo <i>in vitro</i> .....	25
2.2.1. Cultura celular.....	25
2.2.2. Imunohistoquímica.....	26
3. RESULTADOS .....	28
3.1. Resultados <i>in vivo</i> .....	28

3.1.1. Detecção imunohistoquímica da expressão de GFAP e ezrina.....	28
3.1.2. Caracterização dos aspectos ultraestruturais da lesão.....	38
3.1.3. Expressão imunocitoquímica de GFAP e ezrina .....	44
3.2. Resultados <i>in vitro</i> .....	44
4. DISCUSSÃO .....	48
5. CONCLUSÕES .....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
ANEXO I – Artigo .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	bovine serum albumin
CGRP	calcitonin gene-related peptide
DAPI	4',6' – diamidino-2-phenylindole dihydro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAse	enzima que cataliza a clivagem de ácido desoxirribonucléico
ERM	proteínas da família ERM (ezrina-radixina-moesina)
ERMBMPs	moléculas que se ligam à proteínas da família ERM
GABA	gamma-aminobutyric acid
GAP-43	growth associated protein 43
GFAP	glial fibrillary acidic protein
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
ICAM-2	intercellular adhesion molecule 2
IFN-?	interferon gama
KO	knock-out
MET	microscopia eletrônica de transmissão
mGluR3	metabotropic glutamate receptor subtype 3
mGluR5	metabotropic glutamate receptor subtype 5
MHC-I	complexo principal de histocompatibilidade - I
MHC-II	complexo principal de histocompatibilidade-II
NMDA	n- metil-d-aspartato
PB	phosphate buffer
PBS	phosphate buffered saline
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucléico mensageiro
SN	sistema nervoso
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
TCR	T-cell receptor
TPBS	tris- phosphate buffered saline
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização citoarquitetônica da medula espinhal.....	3
Figura 2. Fotomicrografia do microambiente sináptico. ....	5
Figura 3. Seqüência de fotomicrografias eletrônicas utilizadas para a reconstrução de um motoneurônio alfa.....	23
Figura 4. Imunomarcção para a proteína GFAP na região dorso-lateral do corno ventral da medula espinhal, uma semana após a transecção do nervo isquiático em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J .....	29
Figura 5. Gráfico representando a expressão de GFAP em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J, uma semana após a transecção unilateral do nervo isquiático .....	30
Figura 6. Imunomarcção anti-ezrina na região dorso-lateral do corno ventral da medula espinhal, uma semana após a transecção do nervo isquiático em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J .....	31
Figura 7. Gráfico da expressão de ezrina em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J, uma semana de transecção do nervo isquiático .....	32
Figura 8. Imunomarcção com anti-GFAP na região dorso-lateral do corno ventral da medula espinhal, três semanas após a transecção do nervo isquiático em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J .....	33
Figura 9. Gráfico da expressão de GFAP em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J, três semanas após a transecção do nervo isquiático .....	34
Figura 10. Gráfico da expressão de GFAP em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J uma e três semanas após a transecção do nervo isquiático .....	35

Figura 11. Imunomarcacão para ezrina, três semanas após a transecção do nervo isquiático, em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J .....	36
Figura 12. Gráfico da expressão de ezrina em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J, três semanas após a transecção do nervo isquiático .....	37
Figura 13. Gráfico da expressão de ezrina em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J, uma e três semanas após a transecção do nervo isquiático .....	38
Figura 14. Fotomicrografias do microambiente sináptico na coluna ventral da medula nos lados ipsilateral e contralateral à transecção do nervo isquiático, na linhagem A/J, uma semana após a lesão .....	39
Figura 15. Fotomicrografias do microambiente sináptico da coluna ventral da medula nos lados ipsilateral e contralateral à transecção do nervo isquiático, na linhagem Balb/cJ, uma semana após a lesão .....	40
Figura 16. Fotomicrografias do microambiente sináptico da coluna ventral da medula nos lados ipsilateral e contralateral à transecção do nervo isquiático, na linhagem C57BL/6J, uma semana após a lesão .....	41
Figura 17. Gráficos da distribuição da frequência de comprimentos dos intervalos entre os terminais sinápticos ao longo da superfície do corpo dos motoneurônios alfa não transecionados .....	42
Figura 18. Gráficos da distribuição de frequência do comprimento dos intervalos entre os terminais sinápticos ao longo da superfície do corpo dos motoneurônios alfa transecionados ...	43
Figura 19. Fotomicrografias eletrônicas do lado ipsilateral à transecção do nervo isquiático contendo imunomarcacão para ezrina e GFAP, respectivamente, uma semana após a transecção do nervo isquiático.....	44

Figura 20. Culturas primárias de astrócitos corticais nas linhagens A/J e C57BL/6J .....46

Figura 21. Culturas primárias de astrócitos corticais e co-culturas com neurônios espinhais nas linhagens A/J e C57BL/6J .....47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais.....18

## RESUMO

Astrócitos são elementos fundamentais para o funcionamento normal do sistema nervoso central (SNC). Estas células exibem inúmeras funções, podendo modular a excitabilidade neural e a transmissão de impulsos nervosos através de seus processos lamelares finos que se localizam nas adjacências das sinapses. Todavia, astrócitos também podem desempenhar funções na integridade da fisiologia do sistema nervoso (SN) após uma lesão. A astrogliose após lesão nervosa é caracterizada pela hiperplasia e hipertrofia do corpo celular e dos processos astrocitários, os quais bloqueiam a regeneração axonal. No entanto, a reatividade astrocitária também possui aspectos positivos, como a produção de fatores neurotróficos. Apesar de a plasticidade sináptica após lesão seja um fenômeno conhecido, os mecanismos envolvidos em tal evento ainda permanecem desconhecidos. Nesse sentido, células gliais, especialmente astrócitos, podem exibir importantes papéis nos processos de mudança do SN, influenciando a retração dos terminais sinápticos tanto quanto promovendo um ambiente peri-sináptico propício, afetando o reestabelecimento dos botões que foram retraídos. Nesse trabalho, estudou-se a resposta astrocitária após a axotomia em camundongos das linhagens C57BL/6J, Balb/cJ e A/J, utilizando-se técnicas de imunofluorescência, microscopia eletrônica de transmissão e cultura celular. Nesse sentido, foram apresentadas evidências de que camundongos das linhagens isogênicas C57BL/6J, Balb/cJ e A/J exibem diferentes intensidades de reatividade astrocitária após lesão periférica *in vivo*, sendo estas diferenças significativas entre A/J ( $3,87 \pm 0,07$ , média  $\pm$  erro padrão, GFAP e  $3,76 \pm 0,16$ , ezrina) e C57BL/6J ( $2,35 \pm 0,024$ ,  $p < 0,0001$ ; GFAP e  $2,69 \pm 0,26$ , ezrina,  $p < 0,001$ ). Ainda, astrócitos derivados de córtices de camundongos cultivados *in vitro* exibiram diferença significativa na imunomarcagem com anti-GFAP e anti-ezrina entre as linhagens A/J ( $22,60 \pm 1,63$ , média  $\pm$  erro padrão, GFAP e  $18,47 \pm 1,31$ , ezrina) e C57BL/6J ( $13,22 \pm 1,80$ ;  $p < 0,001$ , GFAP,  $13,95 \pm 1,16$ , ezrina  $p < 0,05$ ). Adicionalmente, a astrogliose nas adjacências dos motoneurônios axotomizados foi menor em animais C57BL/6J quando comparado com A/J, sugerindo que a diferença da reatividade astrocitária possui influência direta na sinaptogênese *in vitro*. Ainda, a análise estrutural quantitativa indicou maior retração sináptica nas linhagens A/J e Balb/cJ em relação ao C57BL/6J, uma semana após a transecção do nervo isquiático. Nossos resultados demonstram que o aumento da astrogliose pode influenciar o grau de plasticidade

sináptica na medula espinhal, que possivelmente influencia a regeneração axonal dos motoneurônios lesionados.

## ABSTRACT

Astrocytes are of major importance for normal functioning of the central nervous system (CNS). These cells have been shown to play a large number of different functions in the brain. They can modulate the neural excitability and signal transmission by their thin lamellar process surrounding synapses. Moreover, astrocytes play a major role in preserving and restoring structural and physiological integrity following injury to the CNS. Astrogliosis is characterized by hyperplasia and hypertrophy of cell bodies and processes, which has been considered to block axonal regeneration, but reactivity of glial cells at the lesion site has also positive aspects, such as the production of neurotrophic factors. Although synaptic plasticity is a widespread phenomenon, the underlying mechanisms leading to its occurrence are virtually unknown. In this sense, glial cells, especially astrocytes, may have a role in network changes of the nervous system, influencing the retraction of boutons as well as providing a proper perisynaptic environment, thereby affecting the replacement of inputs. In the present work, we have studied the astrocytic response after axotomy in C57BL/6J, Balb/cJ and A/J mice, using immunofluorescence, transmission electron microscopy and cell cultures techniques. In this sense, we present evidence that A/J, Balb/cJ and C57BL/6J isogenic mice display different astrocyte reactivity after a peripheral lesion *in vivo* (A/J;  $3.87 \pm 0.07$ - GFAP and  $3.76 \pm 0.16$  - ezrin / C57BL/6J;  $2.35 \pm 0.024$  - GFAP,  $p < 0.0001$  and  $2.69 \pm 0.26$  - ezrin,  $p < 0.001$ ). Further, astrocytes from mice cortices were isolated and expanded *in vitro*, showing a significant difference in GFAP and ezrin labeling between AJ ( $22.60 \pm 1.63$  - GFAP and  $18.47 \pm 1.31$  - ezrin) and C57BL/6J mice ( $13.22 \pm 1.80$  - GFAP,  $p < 0.001$  and  $13.95 \pm 1.16$  - ezrin,  $p < 0.05$ ). Also, astrogliosis surrounding axotomized motoneurons C57BL/6J is lower than A/J mice and such a difference has a direct influence on *in vitro* synaptogenesis. Indeed, ultrastructural quantitative analysis showed more intense synaptic detachment in A/J and Balb/cJ strains after sciatic nerve transection than in C57BL/6J mice. Our findings demonstrate that an increased astrogliosis influences the degree of synaptic plasticity in the spinal cord, which may in turn contribute to the axonal regeneration of lesioned motoneurons.

## ESTRUTURA DA TESE

O presente trabalho contém cinco capítulos, descritos a seguir:

O **Capítulo 1** apresenta uma introdução do estudo, bem como os objetivos do mesmo;

O **Capítulo 2** apresenta os materiais e métodos utilizados para a realização dos experimentos relacionados à dissertação;

O **Capítulo 3** mostra os resultados obtidos;

O **Capítulo 4** discute os resultados, relacionando-os com os dados presentes na literatura

O **Capítulo 5** apresenta as conclusões.

Ainda, a presente dissertação possibilitou a elaboração de um artigo científico, apresentado em anexo, aceito para publicação na revista *Brain Research*.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Organização geral do Sistema Nervoso

O sistema nervoso (SN) possui a função de promover ajustes homeostáticos, processar informações sensoriais e controlar as respostas motoras, mediar funções autonômicas, sendo responsável por organizar comportamentos, pelo aprendizado e memória. Está dividido em duas partes: o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Nervoso Periférico (SNP).

O desenvolvimento do SN é um processo complexo que se inicia com a formação da placa neural, constituída por células neuroectodérmicas e, subseqüentemente, com o aparecimento do tubo neural. A porção cranial dilatada do tubo neural, também denominada arquencéfalo, origina o encéfalo adulto. Subseqüentemente formam-se diferentes dilatações ou vesículas encefálicas: o prosencéfalo, que dá origem ao telencéfalo e diencéfalo; o mesencéfalo, que não se modifica e o rombencéfalo, que forma o metencéfalo e mielencéfalo (KANDEL et al., 2000). A porção caudal do tubo neural origina a medula espinhal. Das margens da placa neural, origina-se uma população especial de células constituindo a chamada crista neural. Estas células irão destacar-se do tubo neural, migrando para regiões específicas do corpo, originando diferentes tipos celulares como, por exemplo, as células de Schwann (WEBSTER e FAVILLA, 1984). As células derivadas da crista neural também originam importantes componentes do SNP, tais como gânglios das raízes dorsais, seus neurônios e células gliais (KANDEL et al., 2000). Por outro lado, neurônios medulares, células gliais da medula espinhal e células ependimárias têm sua origem no epitélio adjacente do canal central (BAKER et al., 1997).

Morfológica e funcionalmente, o SNC pode ser dividido em substância branca, composta de células da glia e fibras nervosas mielínicas que constituem os chamados tratos medulares e substância cinzenta, densamente povoada por corpos celulares (somas) de neurônios, bem como fibras nervosas circundadas por capilares sanguíneos. Em corte transversal da medula espinhal, a substância cinzenta apresenta a forma aproximada de um H, podendo ser identificadas duas

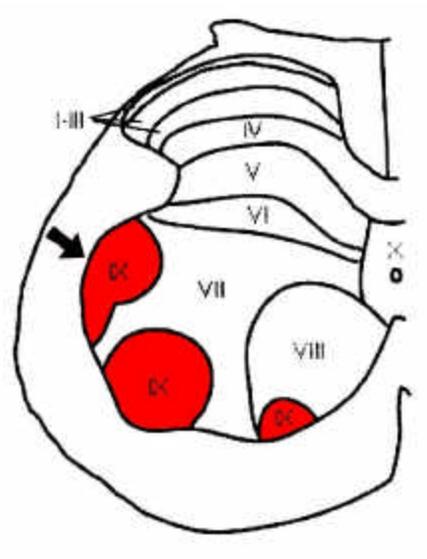
colunas ou cornos de cada lado da linha mediana. Estas se encontram interligadas por uma zona intermediária, que nas regiões torácica e sacral apresentam-se em continuidade com as colunas laterais, que contêm os motoneurônios responsáveis por parte da inervação das vísceras. A coluna posterior, mais estreita, contém neurônios internunciais responsáveis por receber impulsos aferentes advindos das raízes dorsais. A coluna anterior, mais robusta, contém neurônios motores inferiores ou medulares responsáveis pela inervação da musculatura estriada esquelética (BURT, 1993; KANDEL et al., 2000).

Levando-se em consideração a organização dos neurônios na substância cinzenta medular, em 1952 Rexed propôs uma forma de sistematização de sua estrutura, expressada por um mapa citoarquitetônico obtido a partir da correlação entre as conexões sinápticas e dados eletrofisiológicos (figura 1). A substância cinzenta foi então subdividida em dez lâminas: as lâminas I-VI correspondem ao corno posterior da medula, a VII à zona intermediária e as lâminas VIII e IX compreendem o corno anterior, sendo os locais que contêm interneurônios que contribuem na regulação da excitabilidade dos motoneurônios gama e motoneurônios alfa, que inervam a musculatura estriada esquelética. A lâmina IX, portanto, contém os núcleos motores, que possuem diferentes dimensões de acordo com o segmento medular considerado, caracterizando assim o aparecimento das intumescências cervical (inervação dos membros superiores) e lombar (inervação dos membros inferiores) ao longo da medula espinhal (REXED, 1952; 1954 *apud* KANDEL et al., 2000).

A organização espacial dos diferentes neurônios presentes nos núcleos motores obedece a critérios anatômicos e funcionais. De acordo com estes princípios, os motoneurônios que inervam os músculos mais proximais estão localizados medialmente em relação aos que inervam músculos mais distais, que são laterais. Os núcleos motores que inervam os músculos axiais formam um grupo distinto na porção mais medial do corno ventral da medula, estendendo-se através de todo seu comprimento. Nos segmentos medulares cervicais e lombares, existe um adensamento de núcleos motores dispostos na porção lateral do corno anterior. Motoneurônios presentes nesses núcleos, que inervam músculos presentes no cingulo dos membros superiores e inferiores (ombro e quadril) são mediais, enquanto que os que inervam os músculos distais são laterais. Por outro lado, o critério funcional divide os núcleos em porção ventral, contendo motoneurônios que

inervam os músculos extensores e porção dorsal, contendo motoneurônios inervam os músculos flexores (KANDEL et al., 2000).

### Dorsal



### Ventral

Figura 1. Organização citoarquitetônica da medula espinhal. A imagem representa um corte transversal da medula ao nível dos segmentos medulares L4-L5. A lâmina IX está destacada em vermelho. A seta indica o grupo de motoneurônios alfa, em posição dorso-lateral, que inervam os músculos da região posterior da coxa, perna e pé.

## 1.2. Os motoneurônios medulares

Os motoneurônios constituem-se num proeminente grupo de neurônios colinérgicos do SNC. Morfológica e funcionalmente, podem ser de dois tipos: motoneurônios-a, que possuem um corpo celular com diâmetro de aproximadamente 80-100 $\mu$ m e comprimento axonal de até 1m e motoneurônios-?, que inervam fibras musculares intrafusais (KANDEL et al., 2000). Motoneurônios- a apresentam uma “árvore” dendrítica que estima-se receber até 100.000 terminações sinápticas (ULFHAKE e CULLHEIM, 1988). Os dois tipos de motoneurônios estão presentes na lâmina IX (BURKE et al., 1997). Estão circundados por dendritos e botões

sinápticos, sendo que aproximadamente metade da membrana celular do soma é recoberta por extensões gliais (WENDELL-SMITH et al., 1966). Conradi (1969) descreveu, na região lombossacral da medula espinhal, um íntimo contato entre dendritos de motoneurônios adjacentes com botões sinápticos. Nesse sentido, o complexo sináptico é definido como uma junção especializada entre duas extensões neuronais: a membrana pré-sináptica, que contém as vesículas sinápticas e a membrana pós-sináptica, contendo uma quantidade variável de material eletrondenso (GRAY e GUILLERY, 1966).

Os botões sinápticos dos motoneurônios da medula espinhal podem ser classificados em vários tipos, de acordo com seu tamanho e com a morfologia de suas vesículas sinápticas (BODIAN, 1964; CONRADI, 1969). Na superfície do corpo celular e região proximal dos dendritos, botões colinérgicos, com 3-7 $\mu$ m de comprimento podem ser observados, sendo denominados botões sinápticos tipo C ou L (ROSENBLUTH, 1962; GRAY e GUILLERY, 1966; CONRADI, 1969; BRÄNNSTRÖM e KELLERTH, 1998), raramente encontrados no SNC (NAGY et al., 1993). Estes são os maiores botões em aposição à superfície dos motoneurônios e apresentam grande número de vesículas sinápticas esféricas, densamente justapostas, com 35 a 50nm de diâmetro. Apresentam também uma cisterna localizada na membrana pós-sináptica denominada cisterna sub-sináptica, que está em continuidade com o retículo endoplasmático granular (ROSENBLUTH, 1962; BODIAN, 1964; CONRADI, 1969), sendo esta uma característica que difere estes botões dos demais (figura 2). Estes botões não são, todavia, observados em todos os motoneurônios. Sendo assim, a presença de botões do tipo C é suficiente para a classificação de uma célula nervosa como sendo um motoneurônio alfa. Outros quatro tipos de botões podem ser encontrados ao longo da superfície celular: S, T, e F, localizados em todas as regiões da superfície dos neurônios e M, encontrado exclusivamente na porção proximal dos dendritos (CONRADI, 1969). Os botões tipo S (Spherical) possuem 0.5-4 $\mu$ m de comprimento e contêm vesículas esféricas com diâmetro de 35-50nm. Botões sinápticos com as mesmas características, porém com fenda sináptica de maior espessura foram classificados como tipo T (Táxi). Em ambos os casos, o neurotransmissor presente nas vesículas sinápticas é o glutamato. Os terminais do tipo F, por sua vez, apresentam vesículas achatadas (Flattened) com dimensões de 20-30 x 40-60nm, sendo o neurotransmissor predominantemente glicina e/ou

GABA. Os botões M, com 4-7 $\mu$ m de comprimento também possuem vesículas esféricas de 35-50nm de diâmetro (CONRADI, 1969; BRÄNNSTRÖM e KELLERTH, 1998).

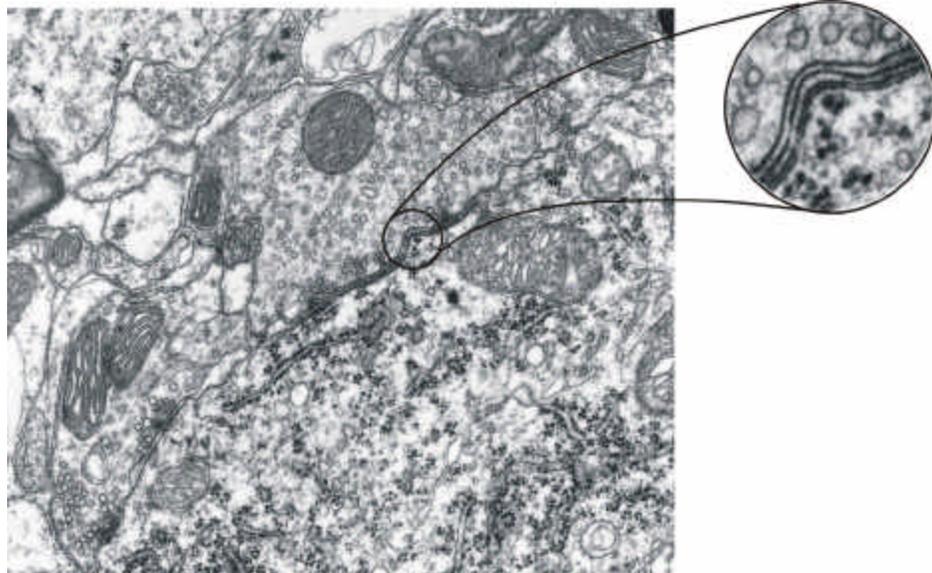


Figura 2. Fotomicrografia do microambiente sináptico. Observa-se a presença de terminal sináptico do tipo C na coluna ventral do segmento lombar da medula espinhal. A imagem ampliada indica uma cisterna sub-sináptica, que caracteriza esse tipo de terminal. Nota-se também a presença de vesículas sinápticas esféricas superiormente à cisterna. Aumento de 27.000x.

### 1.3. Células gliais

Glia é um termo grego que significa “cola”, inicialmente empregado pelo neuropatologista Rudolf Virchow (1846) para denominar células do SN que estão em íntimo contato com neurônios. As células gliais ocupam metade do volume do tecido nervoso, na proporção de dez células para cada neurônio (KETTENMANN, 1995). Essa população pode ser dividida em células macrogliais, (oligodendrócitos, astrócitos e células ependimárias) e células microgliais, que possuem características morfofuncionais de células fagocíticas do Sistema Imune (ROUACH e GIAUME, 2001). Células de Schwann, que se localizam no SNP, também são consideradas elementos gliais (ARAQUE et al., 1999; CASTONGUAY et al., 2001).

A glia exibe uma variedade de funções, o que lhe confere uma posição de destaque nos processos de homeostase neuronal. Neste aspecto, recentes evidências experimentais indicam que estas células apresentam papéis ativos em diferentes eventos do SN (STREIT et al., 1999; ALOISI et al., 2000; CASTONGUAY et al., 2001; DONG e BENVENISTE, 2001; HAYDON, 2001; NEUMANN, 2001; HATTON, 2002; ARAQUE e PEREA, 2004). Estas funções serão abordadas nos tópicos subseqüentes.

#### 1.4. Astrócitos

São células gliais com formato estrelado, constituindo o tipo glial predominante do SNC (ARAQUE e PEREA, 2004). Podem ser divididos em três categorias, de acordo com a morfologia de seus prolongamentos citoplasmáticos e localização no SNC: astrócitos protoplasmáticos (localizados na substância cinzenta), astrócitos fibrosos e radiais (ambos presentes na substância branca) (KETTENMANN, 1995).

Em relação aos prolongamentos citoplasmáticos denominados processos astrocitários perivasculares ou “pés vasculares”, estes se constituem num importante componente estrutural da barreira hemato-encefálica (RISAU e WOLBURG, 1990), pois contém junções oclusivas, representando o limite entre elementos do sangue e o SNC (RUBIN e STADDON, 1999). A ablação destas células leva ao edema vasogênico e a falha do restabelecimento da barreira hemato-encefálica (BUSH et al., 1999; DA SILVA et al., 2004).

Adicionalmente aos processos citoplasmáticos mais evidentes, apresentam também projeções celulares extremamente finas e livres de organelas, com até 50 nm de espessura, que envolvem tanto o corpo celular quanto os dendritos dos neurônios. Estas projeções representam aproximadamente 70 a 80% da membrana plasmática dos astrócitos e são particularmente abundantes nas adjacências das regiões sinápticas (WOLFF, 1970; SPACEK, 1985). São denominados processos astrocitários perisinápticos ou periféricos (DEROUICHE e

FROTSCHER, 2001; DEROUICHE et al., 2002). De fato, aproximadamente 60% das sinapses no hipocampo, por exemplo, possuem processos perisinápticos justapostos (VENTURA e HARRIS, 1999).

Até o século passado, acreditava-se que astrócitos fossem elementos inexcitáveis e que desempenhassem papel passivo, sendo apenas relacionado ao suporte metabólico dos neurônios. Porém, diversas outras funções das células gliais têm sido propostas, indicando que estas células possuem a capacidade de agir ativamente na resposta do SN. Essa hipótese foi investigada por muitos autores após a descoberta de receptores para neurotransmissores na membrana astrogliar (SHAO e MCCARTHY, 1994; CHIU e KRIEGLER, 1994; VERKHRATSKY e STEINHÄUSER, 2000). Dentre eles destacam-se o receptor ionotrópico (NMDA) e os metabotrópicos (mGluR3 e mGluR5) para glutamato (SCHOOLS e KIMELBERG, 1999), particularmente nas adjacências das terminações glutamatérgicas (ROTHSTEIN et al., 1994; DEROUICHE e RAUEN, 1995). Convém mencionar a existência de outros receptores, como os GABAérgicos, adrenérgicos, purinérgicos, colinérgicos e serotoninérgicos, assim como receptores para vários peptídeos incluindo-se a substância P e o neuropeptídeo Y (CASTONGUAY, 2001). Canais iônicos também são encontrados em células gliais, como os canais de sódio, que estão envolvidos no controle das atividades de vários transportadores, particularmente do  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  da ATPase e do transportador  $\text{Na}^+/\text{glutamato}$  (VERKHRATSKY e STEINHÄUSER, 2000). Além disso, canais de cálcio (principalmente dos grupos L e T), que atuam na modulação da inibição sináptica (BORMAN, 1988) e de potássio (NEWMAN e REICHENBACH, 1996; VERKHRATSKY e STEINHÄUSER, 2000), também podem ser encontrados em células da glia. Adicionalmente, a presença de canais de cloro está associada com o controle do pH extracelular e com a regulação do volume celular (DEITMER e ROSE, 1996).

Através de estudos envolvendo co-cultura de neurônios e células gliais, foi demonstrado que o aumento de  $\text{Ca}^{++}$  resultou na modulação da atividade neuronal (ARAQUE et al., 1999; ARAQUE e PEREA, 2004; PARPURA et al., 1994), demonstrando que os astrócitos são sensíveis à variação do  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, através de um mecanismo bidirecional de interações com as sinapses (CASTONGUAY et al., 2001), o que justifica o seu envolvimento na plasticidade sináptica (ALLEN e BARRES, 2005). De fato, Ullian e cols. (2001) demonstraram que astrócitos influenciam o número de sinapses funcionais quando co-cultivados com neurônios

do SNC, promovendo a sinaptogênese *in vitro*, (DONG e BENVENISTE, 2001; SMITH, 1998; ALLEN e BARRES, 2005).

A capacidade de regular a atividade neuronal e a transmissão sináptica permitiu classificar os processos finos dos astrócitos como um “terceiro elemento” das sinapses (ARAQUE et al., 1999). Essa habilidade de modular a excitabilidade neural, através da difusão de íons e de neurotransmissores, foi associada aos processos gliais peri-sinápticos baseado na habilidade de modificarem rapidamente o seu volume (HANSON, 1994; HANSON e RÖNNBÄCK, 1995). Assim, há evidências que processos citoplasmáticos dos astrócitos regulam o microambiente peri-sináptico, bem como limitam a difusão dos íons e neurotransmissores (VANDENBRANDEN et al., 1996; VERNADAKIS, 1996; RUSAKOV e KULLMANN, 1998; CHVATAL e SYKOVA, 2000; VERKHRATSKY e STEINHÄUSER, 2000), conferindo a essas células um alto grau de sensibilidade a mudanças no microambiente do neurópilo (CASTONGUAY et al., 2001; SHAO e MCCARTHY, 1994).

Os astrócitos também provém o ácido quinurênico, o qual se constitui em um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (ROBERTS et al., 1992). Particularmente nas adjacências de terminações glutamatérgicas, atua no metabolismo do glutamato na fenda sináptica (OLIET et al., 2001), através de transportadores de glutamato (ROTHSTEIN et al., 1994; DEROUICHE e RAUEN, 1995) e glutamina sintetase (NORENBERG e MARTINEZ-HERNANDEZ, 1979; DEROUICHE e FROTSHER, 1991). Dessa forma, há evidências que as projeções astrocitárias sejam de grande importância na modulação da excitabilidade neuronal e, conseqüentemente, na transmissão nervosa (KANG et al., 1998; GROSCHE et al., 1999). Assim, astrócitos têm a capacidade de responder a mudanças da homeostase do tecido nervoso e, em condições patológicas, através da formação da cicatriz glial, participar da retração e eliminação das terminações sinápticas, desempenhando papel ativo na plasticidade do SN (ALDSKOGIUS e KOZLOVA, 1998; ALDSKOGIUS et al., 1999). Contudo, apesar da plasticidade dos processos astrogliais ser um fenômeno reconhecido (THEODOSIS e POULAIN, 1993), os mecanismos moleculares que ocorrem em tais eventos ainda são pouco conhecidos.

Outras funções destas células incluem a modulação da função neuronal através da liberação de fatores neurotróficos que participam do desenvolvimento neural, (SCHWARTZ e

MISHLER, 1990; DEROUICHE, 2001; DONG e BENVENISTE, 2001), como substrato para a migração neuronal e crescimento axonal (RAKIC, 1995) e produção de laminina (LIESI et al., 1983).

### 1.5. Reatividade glial e resposta imune

Em condições normais, a barreira hematoencefálica previne a entrada de células imunocompetentes, citocinas e anticorpos no SNC. Dessa forma, a função imune do SNC é um fator condicional, sendo mínima em um organismo sadio. Apenas uma reduzida proporção de linfócitos T atravessa esta barreira, migrando para o parênquima cerebral (NEUMANN, 2001). O reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos T é mediado por moléculas do complexo de histocompatibilidade principal I e II (MHC I e MHC II). Estas moléculas são proteínas transmembrana polimórficas encontradas na superfície de quase todas as células nucleadas (PLOENGH et al., 1981). Por intermédio dessas moléculas, peptídeos são apresentados aos linfócitos T, que através de seus receptores (TCR), reconhecem o complexo antígeno peptídeo-MHC (BABBITT et al., 1985; PARNES, 1989). No SNC intacto, a expressão do complexo principal de histocompatibilidade I e II (MHC I e MHC II) é variável, sendo normalmente bastante baixa (WILLIAMS et al., 1980; WONG et al., 1984; LINDÅ et al., 1998). Todavia, genes de MHC classe I são induzíveis em células gliais e neurônios durante infecções virais, inflamação, tumores (TRAN et al., 1998) e exposição à citocinas, como interferon- beta (ZANON e OLIVEIRA, 2006) e gama (IFN- $\gamma$ ) (LINDSLEY et al., 1988; GOGATE e al., 1991). Astrócitos e microglias tornam-se reativos, sendo capazes de apresentar MHC I e MHC II. No entanto, o papel dos astrócitos na apresentação de antígeno tem sido questionado (ALOISI et al., 2000; DONG e BENVENISTE, 2001).

## 1.6. Resposta dos motoneurônios à lesão nervosa e neuroplasticidade

O desenvolvimento do SN é um processo complexo que depende não somente do estabelecimento de novos circuitos, mas também da eliminação de sinapses inadequadas. Tal processo de plasticidade sináptica também está presente na resposta retrógrada a uma lesão axonal (LIEBERMANN, 1971; BARRON, 1983; TITMUS e FABER, 1990; ALDSKOGIUS et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002). Assim, após uma axotomia, durante a primeira semana pós natal, aproximadamente metade da população de motoneurônios lesionados degenera nas primeiras três semanas (LOWRIE et al., 1994; LINDÅ et al., 2000) pelo processo de apoptose (TIRAIHI e REZAIIE, 2003). Os demais cinquenta por cento sofrem uma alteração de estado funcional, passando de um modo de transmissão sináptica para um modo regenerativo. Essas alterações envolvem modificações moleculares e estruturais no corpo celular dos motoneurônios axotomizados, em conjunto denominadas cromatólise. Assim, a expressão de proteínas relacionadas à transmissão sináptica diminui grandemente, ao passo em que a expressão de proteínas estruturais, tais como CGRP (calcitonin gene-related protein) e GAP-43 (gap junction protein connexin-43) aumenta (LINDÅ et al., 1992; PIEHL et al., 1993; PIEHL et al., 1998).

No adulto, as sinapses também podem ser eliminadas, porém sem a ocorrência, necessariamente, de morte neuronal. Dessa forma, a transecção periférica dos axônios resulta em uma extensiva retração dos terminais pré-sinápticos medulares que fazem contato com os motoneurônios axotomizados (BLINZINGER e KREUTZBERG, 1968; DELGADO-GARCIA et al., 1988; ALDSKOGIUS et al., 1999; LINDÅ et al., 2000). Acredita-se que esta deafferenciação atenua o potencial excitotóxico dos terminais glutamatérgicos (MENDELL et al., 1976; LINDÅ et al., 2000). De fato, Bränström e Kellerth (1998) observaram uma diminuição da cobertura sináptica do corpo celular de motoneurônios alfa (87%) em relação à cobertura dos dendritos (57%) após a axotomia permanente do ramo do nervo fibular para o músculo gastrocnêmio medial. Essa eliminação de botões sinápticos é mais evidente em terminais glutamatérgicos excitatórios do tipo S, afetando 90% desses terminais, enquanto que terminais inibitórios GABAérgicos do tipo F apresentaram uma diminuição de 70% após a axotomia intramedular de motoneurônios (LINDÅ et al., 2000). O mecanismo de eliminação das sinapses da superfície dos

motoneurônios está, provavelmente, associado à ação das células gliais (RONNEVI, 1977; CHEN, 1978; WOLFF e MISSLER, 1992).

Recentemente, a expressão do complexo principal de histocompatibilidade I (MHC I) vem sendo relacionada com a plasticidade das sinapses (EDSTRÖM et al., 2004). Tal fato foi bastante surpreendente, uma vez que, há pouco tempo atrás, acreditava-se que neurônios fossem incapazes de expressar MHC classe I (NEWMAN, 2001). Recentemente, Oliveira e cols. (2004) sugeriram a possibilidade de existir a influência de moléculas de MHC I no processo de estabilização bem como eliminação das sinapses após a transecção do nervo isquiático. Tal hipótese explicaria o porquê de neurônios aumentarem a expressão de MHC I na superfície celular após axotomia periférica (OLSSON et al., 1989; LINDÅ et al., 1998; LINDÅ, 2000). Todavia, não se sabe em que células o MHC I é capaz de manifestar seu efeito, catalisando a retração das sinapses. Neste aspecto, os resultados de Oliveira et al. (2004), sustentam a hipótese de que moléculas do MHC I possuem uma função importante na estabilização de contatos sinápticos específicos no SN adulto após lesão. Tal mecanismo pode ser de grande importância para a determinação da capacidade regenerativa axonal do neurônio axotomizado.

## 1.7. Resposta dos astrócitos à lesão nervosa

Lesões ao SNC adulto como resultado de traumas, desordens genéticas ou alterações bioquímicas induzem uma série de mudanças fisiológicas incluindo-se isquemia local, edema, formação de radicais livres, reação inflamatória e a ativação de células gliais (ENG et al., 2000). Tanto astrócitos quanto microglias tornam-se reativas, constituindo a chamada gliose reativa, caracterizada pela hipertrofia do corpo e processos celulares dos astrócitos e pela hiperplasia de ambos os tipos celulares (PRIVAT et al., 1981; NORTON et al., 1992; ENG et al., 2000). Esta reação também ocorre após a axotomia periférica dos neurônios localizados no núcleo do nervo facial (HURLEY e COLEMAN, 2003) e apresenta diferenças significativas entre camundongos

de diferentes linhagens isogênicas, como o C57BL/6J, Balb/cJ e A/J (LIDMAN et al., 2002; EMIRANDETTI et al., 2006).

A resposta astrocitária se desenvolve por uma conversão fenotípica das células sobreviventes, caracterizando a astrogliose (GIMENEZ y RIBOTTA et al., 2001). No local da lesão, freqüentemente ocupam o sítio de neurônios degenerados, formando a chamada cicatriz glial que é considerada o principal impedimento para a regeneração axonal, uma vez que atua como uma barreira física para os axônios em crescimento (RAMON Y CAJAL, 1913-1914; REIER et al., 1989; NORTON et al., 1992; FAWCETT, 1997; RIDET et al., 1997; BABA, 1998; NORTON, 1999; ENG et al., 2000; GIMENEZ Y RIBOTTA et al., 2001; PRIVAT, 2003; ROGERS et al., 2003). Essa constatação foi reforçada por Gimenez y Ribotta e cols. (1995), que desenvolveram um modelo *in vivo* de lesão medular de ratos, permitindo analisar a formação da cicatriz glial e monitorar a regeneração axonal tanto anatomicamente quanto funcionalmente. Também nesse contexto, Privat (2003) utilizando-se de camundongos knock-out (KO) para GFAP e vimentina observou que a ausência da reatividade glial, após a hemiseccção da medula espinhal permitiu o crescimento das fibras nervosas em regeneração. Todavia, a reatividade glial possui aspectos positivos, como a produção de fatores neurotróficos e de moléculas de adesão (GIMENEZ Y RIBOTTA et al., 2001; BABA, 1998).

Além dos aspectos que dizem respeito à reatividade glial, há evidências que sugerem que astrócitos reativos exibam alguma função sobre a eliminação dos terminais pré-sinápticos e estabelecimento de inervação colateral após axotomia periférica. A separação dos terminais da superfície da membrana plasmática pode estar associada com a gliose reativa envolvendo tanto astrócitos quanto microglia, uma vez que a resposta glial coincide com a perda de sinapses em motoneurônios alfa medulares em cromatólise (CHEN, 1978). Estudando o desenvolvimento pós-natal normal de gatos, Ronnevi (1977) observou que existe uma fagocitose espontânea de terminais sinápticos em contato com motoneurônios medulares por astrócitos e microglias, evidenciando a função destas células nos fenômenos de plasticidade do SNC normal. Entretanto, apesar das células microgliais se encontrarem em contato direto com o pericário dos motoneurônios (BLINZINGER e KREUTZBERG, 1968), a sua participação nesse processo ainda é controversa (ALDSKOGIUS et al., 1999), pois os delgados processos astrocitários interpõem-se entre neurônios e microglia (CHEN, 1978; REISERT et al., 1984; SVENSSON e

ALDSKOGIUS, 1993). Esta ocorrência é reforçada pelo fato de não existir proliferação destas células após a axotomia periférica (TSENG et al., 1996). Realmente, Brännström e Kellerth (1998) observaram que células da microglia tornam-se ativas apenas após três semanas de axotomia, enquanto que a atividade dos astrócitos foi mais precoce e permaneceu durante todos os períodos estudados.

Duas proteínas da rede de filamentos intermediários de astrócitos foram identificadas em astrócitos reativos nos anos de 1976 e 1981, respectivamente: GFAP (glial fibrillary acidic protein; BIGNAMI e DAHL, 1976) e vimentina (DAHL, 1981). Mais recentemente, uma terceira proteína, denominada nestina, foi identificada em células progenitoras do SNC. Filamentos intermediários de astrócitos imaturos e de seus precursores são compostos, portanto, de nestina e também de vimentina (BIGNAMI et al., 1982; LENDAHL et al., 1990). Porém, ao passo que a expressão de nestina em astrócitos maduros cessa e de vimentina diminui, a de GFAP é estimulada significativamente (LEND AHL et al., 1990).

Como um membro da família de proteínas do citoesqueleto, GFAP possui função na modulação da motilidade e morfologia glial, pois promove a estabilidade estrutural dos processos astrocitários (ENG et al., 2000). A hipertrofia astrocitária após a lesão dos motoneurônios resulta do aumento da expressão de GFAP (GRAEBER e KREUTZBERG, 1986; MCCALL et al., 1996; FAWCETT, 1997; NORTON, 1999) concomitantemente com o aumento do RNAm dessa proteína (TETZLAFF et al., 1988). Paralelamente, porém em menor grau, aumenta a expressão de vimentina, caracterizando-as como proteínas indicadoras da astrogliose reativa (PEKNY, 2001; GIMENEZ Y RIBOTTA et al., 2001).

Por outro lado, os processos astrocitários periféricos menores que 0.5 $\mu$ m de espessura não contêm GFAP, e sim as proteínas denominadas ezrina e radixin, que constituem duas das chamadas “actin binding ERM proteins” (DEROUICHE e FROTSCHER, 2001; DEROUICHE et al., 2002). Através de seu domínio amino-terminal, a ezrina associa-se com receptores de membrana ERMBMPs (ERM binding membrane proteins) como o CD44, CD43 e moléculas ICAM-1 e ICAM-2 (YONEMURA et al., 1993; TSUKITA et al., 1994; TSUKITA et al., 1997; DEROUICHE et al., 2002) em diversos tipos celulares como linfócitos (BRETSCHER et al., 2000) e astrócitos (DEROUICHE, 2001), enquanto que seu domínio carboxi-terminal associa-se

com o citoesqueleto de actina, possibilitando seu envolvimento na manutenção da morfologia e da motilidade celular (LOUVET-VALLÉ, 2000). A motilidade celular é, portanto, dependente da interação entre os receptores de superfície e o citoesqueleto (GEIGER et al., 1984) e da adesão celular (BRETSCHER et al., 2000). Nesse contexto, a regulação positiva da expressão de F-actina (filamentos intermediários contendo actina) evidencia um aumento da motilidade celular e da plasticidade dos processos sinápticos em astrócitos reativos, sendo que a sua presença pode também estar envolvida na formação da cicatriz glial, tanto *in vivo* (ABD-EL-BASSET e FEODOROFF, 1997) quanto *in vitro* (FEDOROFF et al., 1987). De fato, estes processos que compõem o terceiro elemento das sinapses, exibem uma grande capacidade de alteração morfológica, caracterizando, de acordo com Hirrlinger e cols. (2004), dois tipos de projeções celulares finas: as projeções de membrana ao longo da superfície neuronal e aquelas que emitem extensões no microambiente sináptico.

## 1.8. Regeneração nervosa periférica

Diferentemente do que ocorre após um trauma do SNC, uma lesão ao SNP adulto induz respostas celulares capazes de levar à regeneração axonal (GUTH, 1956; IDE, 1996). Isso ocorre devido à produção de moléculas estimulatórias no microambiente axonal, induzindo o seu crescimento, e também da ausência da barreira física gerada pela cicatriz glial, como já mencionado.

Após a transecção completa de um nervo periférico, há perda da continuidade do nervo e a sua retração (SUNDERLAND, 1990; TERENGI, 1999), passando este a apresentar um coto proximal e um coto distal (LUNDBORG, 1993). As fibras do coto distal sofrem degeneração Walleriana, que inclui o colapso do citoesqueleto, fragmentação axonal e o recrutamento de macrófagos dos vasos sanguíneos (BRUCK, 1997), fornecendo ambiente favorável para a regeneração axonal (IDE, 1996).

Estudos utilizando esmagamento e transecção nervosa periférica do nervo isquiático indicam que distintas linhagens de camundongos apresentam capacidades regenerativas significativamente diferentes (LU et al., 1990; DA-SILVA et al., 1991; LU et al., 1994; LAINETTI et al., 1995; OLIVEIRA e LANGONE, 2000; DE LA HOZ et al., 2003). Verificou-se que, após o esmagamento do nervo fibular, o potencial regenerativo variava entre elas, sendo mais baixo nos animais da linhagem C57BL/6J, em relação aos animais A/J (LU et al., 1990). Estes dados foram confirmados por Da-Silva e cols. (1991) e Lainetti e cols. (1995), estudando a regeneração nervosa periférica nas mesmas linhagens, fazendo uso da técnica de reparo de nervos por tubulização.

A razão primeira que levou Lu e cols. (1990) a analisarem o potencial regenerativo de nervos nas diferentes linhagens, foi o fato das mesmas apresentarem diferenças no recrutamento de macrófagos. Considerando que tais diferenças são geneticamente determinadas e o importante papel destas células na regeneração nervosa periférica, formularam a hipótese da existência de uma correlação entre tais fatos. Porém, os resultados não permitiram confirmar essa hipótese. Em 1994, os mesmos autores relacionaram a deficiente regeneração axonal da linhagem C57BL/6J a fatores genéticos, envolvendo múltiplo loci de genes, afetando principalmente os neurônios sensitivos. (LU et al., 1994). Esta hipótese foi reforçada pela observação de que essa linhagem apresenta uma maior perda de neurônios sensitivos após axotomia, quando comparada à linhagem A/J (PIERUCCI e OLIVEIRA, 2006). Ainda, através da utilização da técnica do TUNEL, capaz de detectar a fragmentação do DNA, pôde-se demonstrar que uma grande porcentagem da morte neuronal ocorre por apoptose (OLIVEIRA, 2001).

Ainda, outro estudo em nosso laboratório, onde empregou-se a técnica de alotransplantes entre as linhagens C57BL/6J, A/J e Balb/cJ, reforçou a hipótese de que essa menor capacidade regenerativa axonal pode ser conseqüência de diferenças no potencial regenerativo dos próprios neurônios lesionados (OLIVEIRA e LANGONE, 2000).

Assim sendo, o emprego de linhagens de animais isogênicos neurologicamente normais, que apresentam diferentes capacidades regenerativas após uma lesão nervosa, pode ser considerada como um interessante modelo para o estudo da importância relativa dos

componentes neurais, gliais e mesmo de elementos da matriz extracelular no processo de regeneração nervosa.

## OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral investigar a possível correlação entre as variações da capacidade regenerativa dos axônios, observadas entre as linhagens de camundongos isogênicos C57BL/6J, A/J e Balb/cJ e suas diferenças no que diz respeito à reatividade astrocitária, bem como sua relação com a plasticidade sináptica após axotomia periférica.

Especificamente, foi nosso intuito analisar:

1. A expressão de GFAP e ezrina nas linhagens isogênicas A/J, Balb/cJ e C57BL/6J, uma e três semanas após a transecção do nervo isquiático;
2. A expressão de GFAP e ezrina *in vitro* em culturas primárias de astrócitos oriundos das linhagens A/J e C57BL/6J;
3. A expressão de sinaptofisina *in vitro* em co-culturas de astrócitos oriundos das linhagens A/J e C57BL/6J e neurônios medulares de ratos Sprague-Dawley;
4. A retração sináptica nas três linhagens, uma semana após a transecção do nervo isquiático;
5. A identificação ultraestrutural dos processos astrocitários em íntimo contato com a membrana plasmática dos motoneurônios axotomizados, através da técnica de imunocitoquímica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Estudo *in vivo*

#### 2.1.1. Animais e grupos experimentais

Para realização do presente estudo, foram utilizados camundongos machos adultos (6 a 8 semanas) pertencentes às linhagens isogênicas A/J, Balb/cJ e C57BL/6J, totalizando 12 animais de cada linhagem, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos em Biotério próprio do Departamento de Anatomia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), acomodados em caixas plásticas padrão, sob condições ambientais controladas (temperatura e luz) e livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA – IB – Unicamp, protocolo número 837-1.

Os grupos experimentais foram divididos de acordo com a linhagem dos camundongos e tempo de sobrevida após a transecção do nervo isquiático, totalizando seis grupos, como mostra a tabela 1. Portanto, não existem grupos controle para este estudo, já que os lados não transecionados foram utilizados para a análise dos resultados.

Tabela 1: Grupos Experimentais

	<b>Transecção 1 semana</b>	<b>Transecção 3 semanas</b>
A/J	Grupo 1	Grupo 4
Balb/cJ	Grupo 2	Grupo 5
C57BL/6J	Grupo 3	Grupo 6

### 2.1.2. Transecção do nervo isquiático

Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente em condições de assepsia com uma mistura de Vetaset (cetamina, Fort Dodge, 50mg/kg) e Kensol (xilazina, Körnig, 10mg/kg), na quantidade de 0,12 ml/25g de peso corpóreo. Após a tricotomia da face posterior da coxa esquerda, foi realizada a 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 realização da transecção ao nível do forame obturado. A lesão foi realizada com uma microtesoura, sendo um segmento de 2mm do coto distal do nervo removidos e o coto distal desviado de sua direção natural no intuito de evitar-se um realinhamento entre os cotos. A musculatura foi então reposicionada e a pele suturada. Os camundongos foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp até o momento do sacrifício.

### 2.1.3. Sacrifício dos camundongos

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% uma e três semanas de sobrevida após a lesão. Seguiu-se então a perfusão transcardíaca com solução salina tamponada (PBS) a 0,9% (0,1 M e pH 7,4, 20ml/camundongo). As metodologias descritas a seguir foram realizadas de acordo com a técnica empregada.

#### 2.1.4. Imunohistoquímica

Seguindo-se a perfusão de salina tamponada, foi realizada a perfusão com solução fixadora tamponada contendo formaldeído 10 % em tampão fosfato (PB, 0,1M e pH 7,4, 20ml/camundongo; n=3 para cada grupo). Posteriormente à fixação, a intumescência lombar dos animais foi dissecada por meio de laminectomia. As meninges foram retiradas e as medulas permaneceram em mesmo fixador por 12 horas, a uma temperatura de 4°C. Após este período, foram lavadas três vezes em PB (0,1M; pH 7,4) sendo transferidas para uma solução de sacarose 20%, a 4°C por 12 horas. Com o auxílio de lupa, as raízes nervosas foram cuidadosamente removidas, tomando-se os devidos cuidados para que a orientação dos espécimes não fosse perdida. As medulas foram incluídas em Tissue-Tek (Miles Inc., USA), com a extremidade cranial voltada inferiormente e congeladas a -40°C em isopentano, em recipiente térmico contendo nitrogênio líquido. Cortes histológicos com 12 µm de espessura foram obtidos em criostato. Uma vez estabelecido o nível do agrupamento de neurônios localizados na porção dorso-lateral da coluna ventral da medula espinhal, as secções foram transferidas para lâminas gelatinizadas e estocadas a -20°C até a realização das imunomarcações.

Para a realização da imunohistoquímica, as lâminas foram inicialmente climatizadas e imersas em PB 0,01M, pH 7,4 durante 15 minutos (3 × 5 minutos), sendo posteriormente incubadas em câmara úmida, onde os anticorpos primários foram aplicados, sendo o período de incubação variando de 12 a 18 horas, a uma temperatura de 4°C. Os anticorpos primários empregados foram: cabra anti-GFAP (Santa Cruz, C-19, SC-6170; 1:200) e cabra anti-ezrina (Chemicon, AB3843; 1:100) ambos diluídos em PBS (0,1M; pH 7,4) suplementado com albumina bovina (BSA 1%) e Triton a 0,3% (X-100).

Em seqüência à primeira incubação, as lâminas foram lavadas novamente em PB (0,01M; pH 7,4) durante 15 minutos (3 × 5 minutos) e incubadas com os anticorpos secundários macaco anti-cabra CY3 (Jackson Lab., USA; 1:250) diluídos em PBS / BSA por 45 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente. Os espécimes foram lavados novamente em PB 0,01M, montados em glicerol/PBS 0,01M (3:1) e armazenados em freezer, sob temperatura de -20°C.

### **Análise quantitativa dos resultados**

As lâminas imunomarcadas foram observadas em microscópio confocal (Bio-Rad) utilizando-se os filtros para rodamina (CY3). Os parâmetros do microscópio foram padronizados para os dois anticorpos, sendo utilizados abertura da íris de 3.3 e potência do laser a 30%. Para a análise qualitativa, imagens representativas do lado direito (não lesado) e do lado esquerdo (lesado) de cada linhagem, foram usadas para a montagem de pranchas, utilizando-se um programa vetorial.

Para a quantificação, foram selecionadas três imagens representativas do lado ipsilateral e três imagens do lado contralateral à lesão de cada animal de todos os grupos (aumento total de 400x). A densidade integrada de pixels, que representa a intensidade da imunomarcção das proteínas foi medida em 12 áreas do núcleo motor lateral do corno anterior da medula espinhal ao redor dos motoneurônios, de acordo com Oliveira e cols. (2004), utilizando-se o software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institutes of Health, USA). A proporção de densidade integrada de pixels (lado ipsilateral/lado contralateral) foi calculada para cada animal e então estabelecida a média das proporções para cada grupo  $\pm$  erro padrão.

### **Análise estatística**

A partir dos valores obtidos, a média e o erro padrão em cada grupo experimental foram calculados. As eventuais diferenças entre os grupos experimentais foram analisadas pela ANOVA seguida do teste t de Student (valores paramétricos) ou Mann-Whitney (valores não paramétricos), assumindo-se  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*) e utilizando-se as funções estatísticas do programa BioEstat.

### 2.1.5. Microscopia eletrônica de transmissão convencional

Camundongos lesionados (n=3/grupo; grupos 1, 2 e 3) foram perfundidos com 20ml de fixador contendo glutaraldeído 2.5% e paraformaldeído 0.5% em PBS (0,1M; pH 7,4 através do ventrículo esquerdo, subseqüentemente à solução salina tamponada. A região lombar das medulas foi dissecada, livre das meninges e armazenada no mesmo fixador a 4°C. Os espécimes foram então reduzidos em fragmentos cujas raízes nervosas foram retiradas e pós-fixados com tetróxido de ósmio por 2 horas. Seguiu-se então a desidratação e inclusão em Durcupan (Fluka, cód. 44610). Secções semi-finas foram obtidas e analisadas após coloração com azul de toluidina, a fim de estabelecer o nível onde se encontravam os neurônios em situação dorso-lateral no corno ventral da medula. Uma vez evidenciados, secções ultra-finas do segmento lesionado obtidas em ultramicrótomo (Leica, ultracut – UCT) foram coletadas em grids de cobre revestidos com formvar, contrastadas com acetato de uranila 4% durante 30 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos, sendo examinados sob um microscópio eletrônico Leo 906, operando a 60KV.

#### **Análise quantitativa dos resultados**

Os motoneurônios alfa do corno ventral da medula, correspondentes ao grupo do nervo isquiático, foram localizados com o aumento de 27.560x, segundo a classificação de Conradi, (1969). Assim, os motoneurônios contendo terminações sinápticas tipo C e com características cromatolíticas, foram fotografados para análise quantitativa. A superfície das células foi digitalizada em um aumento de 10.000x e montada seqüencialmente em programa vetorial, como mostra o exemplo que se segue:

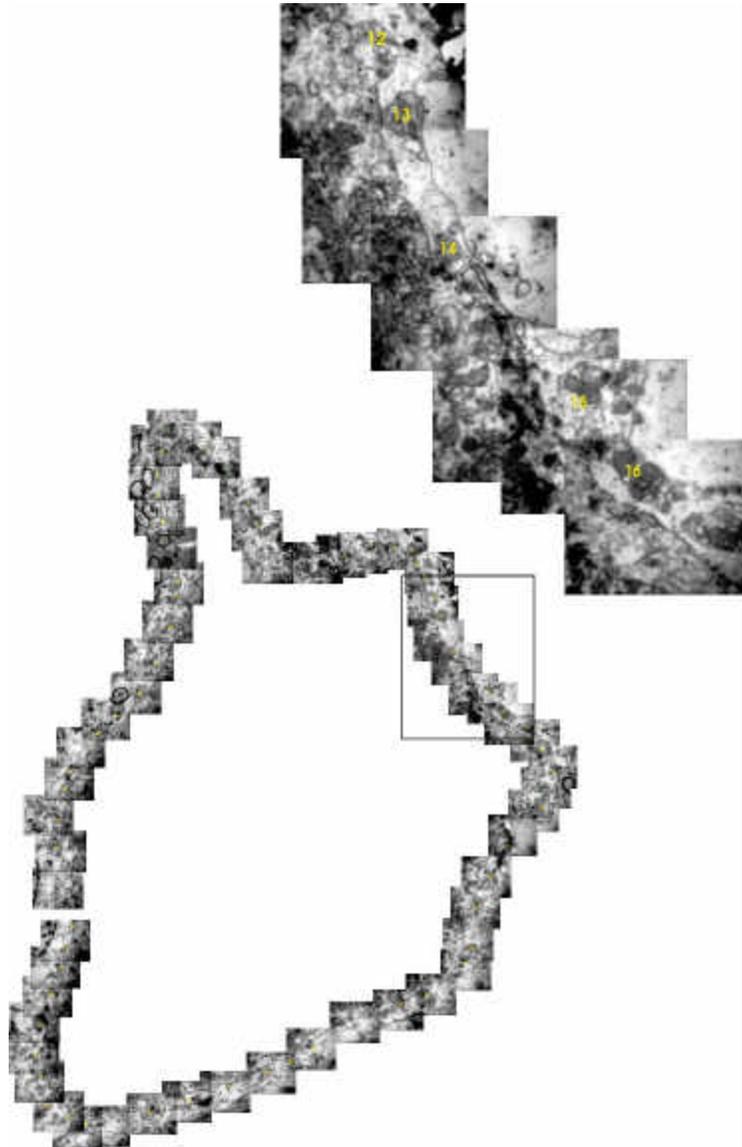


Figura 3. Seqüência de fotomicrografias eletrônicas utilizadas para a reconstrução de um motoneurônio alfa. Na ampliação é possível observar terminais sinápticos retraídos, numerados seqüencialmente.

Os espaços entre os botões sinápticos em aposição à membrana plasmática do corpo celular dos motoneurônios (gaps) do lado lesado e do lado não lesado foram medidos com a utilização do software IMAGE TOOL (version 3.0, National Institutes of Health, USA).

### 2.1.6. Imunocitoquímica

Camundongos cujo nervo isquiático fora transeccionado unilateralmente (n=3/grupo; grupos 1, 2 e 3) foram perfundidos com salina tamponada seguida por 20ml de fixador contendo glutaraldeído 0,5% e paraformaldeído 1% em PBS (0,1M, pH 7,4) através do ventrículo esquerdo. A região lombar das medulas foi dissecada e armazenada no mesmo fixador a 4°C. Os espécimes foram então reduzidos e secções transversais com aproximadamente 200µm de espessura foram obtidas em vibrátomo, sendo transferidas para tampão cacodilato (0,1M, pH 7,4). Após 12 horas a 4°C, os espécimes foram desidratados em uma série crescente de etanol até álcool absoluto, quando foram transferidos para recipientes contendo a resina LR Gold (Fluka, cat. no.62659). Os frascos contendo os espécimes foram mantidos em rotor, sendo a resina substituída a cada 12 horas por três vezes. Em seguida, a resina pura foi substituída por uma solução de LR Gold + benzoin metil éter (Sigma, 0,1% v/v), permanecendo no rotor por adicionais 24 horas. Subseqüentemente, nova solução de LR Gold + acelerador 0,1% foi adicionada, sendo os espécimes incluídos em cápsulas apropriadas. A resina foi polimerizada sob luz ultra-violeta e em baixa temperatura (-20° C). Após a polimerização da resina, os espécimes foram desbastados e cortes semi-finos foram obtidos para referência, como descrito para MET. Secções ultrafinas foram montadas sobre grids de níquel do tipo “slot”, revestidos com formvar e processados para imunomarcção.

A primeira etapa da imunomarcção consistiu na solubilização da resina por meio de incubação em borato de sódio (NaBH<sub>4</sub>) e glicina em tampão TPBS (Tris+PBS), durante 3 a 4 minutos. Após lavagem em TPBS (3 x 5 minutos), os cortes ultrafinos foram incubados com albumina humana a 1% em TPBS (10 minutos) e, em seguida, aplicou-se o anticorpo primário

(cabra anti-GFAP e cabra anti-ezrina, os mesmos empregados para a imunohistoquímica; 1:100). Após 12 horas, os espécimes foram lavados em TPBS (2 x 5 minutos) e novo bloqueio com albumina humana foi realizado. Este foi seguido pela incubação com tampão Tris 0,05M (5 minutos) contendo polietilenoglicol, a fim de assegurar-se uma adequada distribuição das partículas de ouro coloidal. O anticorpo secundário (cabra anti-coelho) associado a partículas de ouro coloidal de 12nm de diâmetro (Amersham, Auroprobe<sup>TM</sup>, cod. RPN422) foi então adicionado, sendo a incubação realizada por um período de 2 horas. Em seguida, os grids foram lavados em água destilada, secos e posteriormente, contrastados com acetato de uranila 2% (6 minutos) e citrato de chumbo (30 segundos) foram então observados em um microscópio eletrônico de transmissão Leo 906 operando a 60KV. A superfície dos motoneurônios dorso-laterais da coluna anterior da medula foi analisada e documentada. As imagens de MET convencional (21560x) e de immunogold foram processadas digitalmente utilizando-se um programa vetorial.

## 2.2. Estudo *in vitro*

### 2.2.1. Cultura celular

Culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir de células extraídas do córtex cerebral de camundongos A/J e C57BL/6J (1 a 2 dias de vida pós-natal: P1 e P2), de acordo com o método utilizado por McCarthy e de Vellis (1980). Os animais foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os camundongos foram mantidos sob hipotermia profunda, sendo os hemisférios corticais dissecados, livres de meninges e de vasos sanguíneos, sendo fragmentados em pequenas porções. Os fragmentos foram lavados em PBS (3x) sem  $\text{Ca}^{++}$  nem  $\text{Mg}^+$  e suspensos em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Em seguida, os espécimes foram incubados em tripsina 0.05% em PBS 0,9% (0,1M e pH 7.4) por 10 minutos. A suspensão resultante foi sujeita a

centrifugação (1.300 rpm) por 10 minutos em albumina bovina (BSA) 4% em meio DMEM. O precipitado celular foi então ressuspensionado em DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% (FCS), penicilina e streptomomicina (1µl/ml) e aplicado em frascos de cultura celular (25 cm<sup>2</sup>). As culturas primárias resultantes foram mantidas em incubadora a 37°C sob atmosfera a 5% CO<sub>2</sub> por uma semana. Atingida a confluência, a cultura foi submetida novamente à tripnização e centrifugada (1.100 rpm) na intenção de separar os diferentes tipos celulares (principalmente neurônios e outros tipos gliais). As culturas foram então sub-cultivadas em placas de 24 poços. Para as co-culturas, neurônios medulares de embriões de ratos Sprague-Dawley (E15) foram adicionados às camadas confluentes de astrócitos e mantidos por dez dias. Após este período, as culturas foram fixadas e processadas para a imunohistoquímica.

### 2.2.2. Imunohistoquímica

As culturas primárias e as co-culturas foram fixadas com paraformaldeído em DMEM, lavadas várias vezes em PBS e incubadas por 2 horas com anticorpos coelho anti-sinaptofisina (1:200, Santa Cruz), para a análise do estabelecimento das sinapses *in vitro* (ISHIMATSU et al., 2006), cabra anti-GFAP (1:100, Santa Cruz) e cabra anti-ezrina (1:100, Santa Cruz). Após a incubação com o anticorpo primário, as culturas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado CY3 (1:250, Jackson Immunoresearch) durante 45 minutos. Os preparados foram montados com uma mistura de glicerol/PBS (3:1) e o método de quantificação foi o mesmo utilizado para o estudo *in vivo* das proteínas GFAP e ezrina. Para avaliar o número de astrócitos existentes nas culturas primárias, as células foram coradas (quatro poços de cada linhagem) com 4',6' - diamidino-2-phenylindole dihydro (DAPI) (0,2 µg/ml, Sigma).

### **Análise quantitativa**

As imunomarcações com anti-GFAP, anti-ezrina e anti-sinaptofisina foram observadas e documentadas com o microscópio de fluorescência invertido (ZEISS – AXIOVERT – S100) conectado a um sistema confocal (BioRad). A densidade integrada de pixels foi quantificada da mesma forma que o experimento *in vivo*, com o software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institutes of Health, USA). A partir das mensurações, foi estabelecida a média  $\pm$  erro padrão para cada grupo experimental. O número de núcleos foi contado em dez áreas ( $5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  cada área) representativas de cada poço (quatro poços) para cada linhagem e então estabelecida a média  $\pm$  erro padrão das contagens para cada uma das linhagens.

### **Análise estatística**

As médias foram comparadas utilizando-se o teste t de Student para dados paramétricos e o teste U de Mann-Withney para dados não paramétricos, assumindo-se  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*), utilizando-se as funções estatísticas do programa BioEstat.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Resultados *in vivo*

##### 3.1.1. Detecção imunohistoquímica da expressão de GFAP e ezrina

A imunomarcacão *in vivo* revelou uma expressão basal de GFAP semelhante nas três linhagens (figura 4 – B, D e F). No entanto, após uma semana de transecção do nervo isquiático, o grau de astrogliose no lado ipsilateral à lesão aumentou, sendo mais intenso na linhagem A/J (figura 4 – A, C e E). A figura 5 indica uma diferença estatística entre os resultados desta linhagem ( $3,88 \pm 0,08$ ; média da densidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão  $\pm$  erro padrão) em relação à C57BL/6J ( $2,35 \pm 0,02$ ;  $p < 0,001$ ). Os resultados da linhagem Balb/cJ foram intermediários em relação as outras duas linhagens ( $3,08 \pm 0,04$ ; média  $\pm$  erro padrão). Adicionalmente, também houve diferença significativa entre Balb/cJ e A/J ( $p < 0,01$ ) e entre Balb/cJ e C57BL/6 ( $p < 0,05$ ), como demonstrado na figura 5.

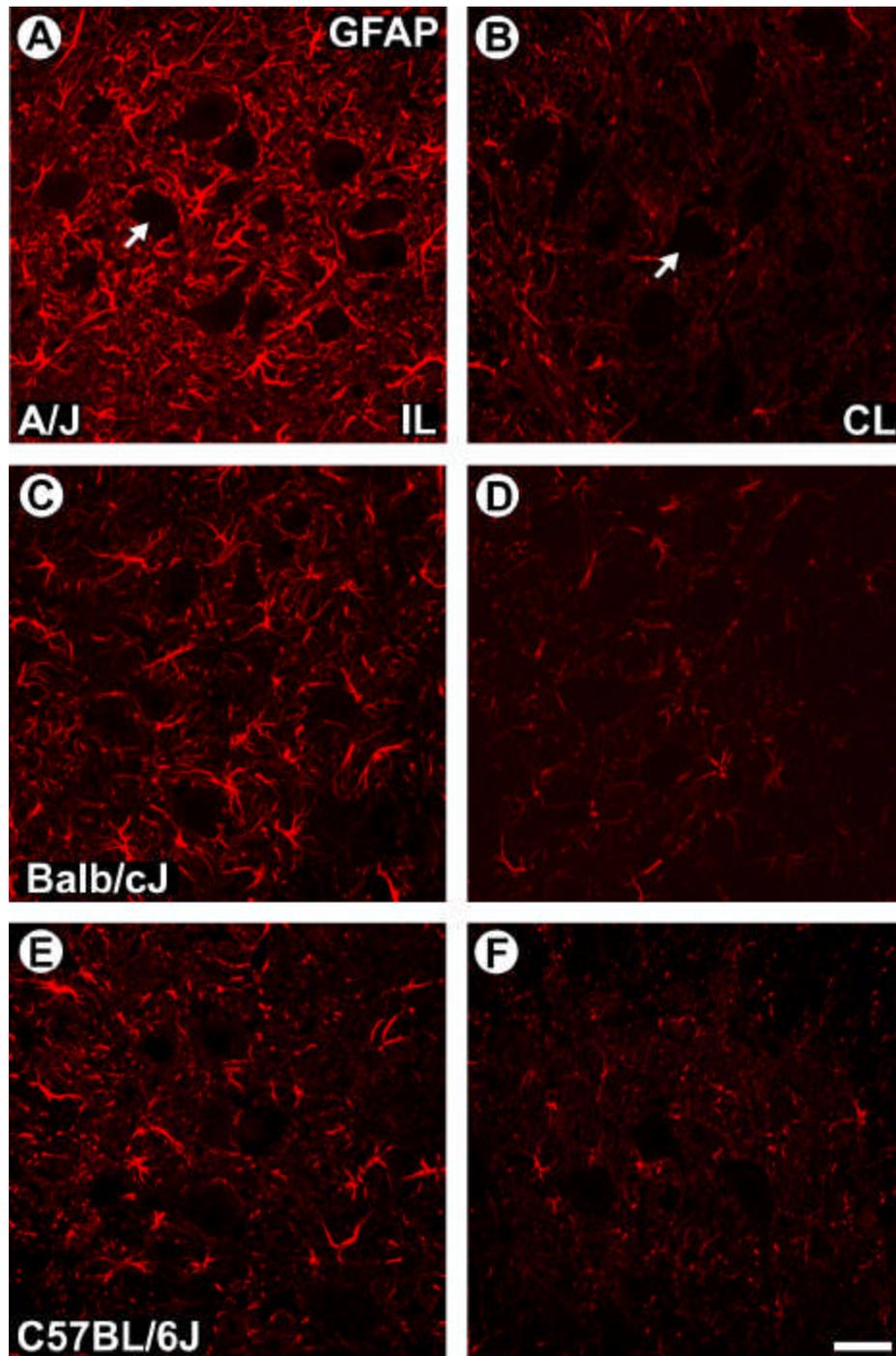


Figura 4. Imunomarcção para a proteína GFAP na região dorso-lateral do corno ventral da medula espinhal, uma semana após a transecção do nervo isquiático em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J. IL – ipsilateral à lesão, CL – contralateral à lesão. B, D e F indicam a mesma expressão basal desta proteína no lado CL à axotomia. Observa-se a intensa marcação dos processos celulares dos astrócitos, particularmente daqueles em íntimo contato com o corpo dos motoneurônios medulares (representados pelas setas) em A, C e E. Barra de escala= 50 $\mu$ m.

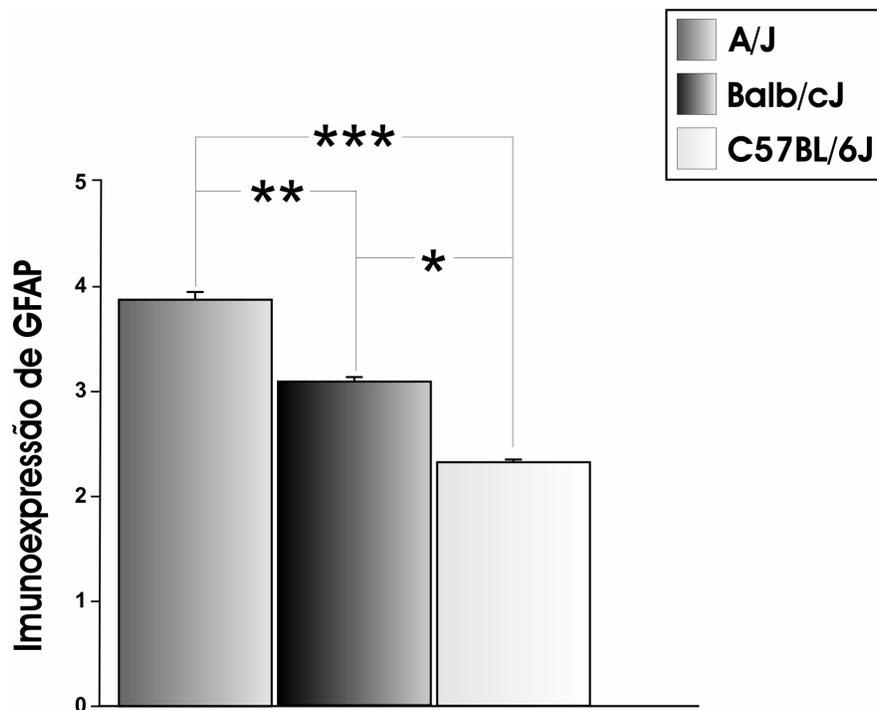


Figura 5. Gráfico representando a expressão de GFAP em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J uma semana após a transecção unilateral do nervo isquiático. Os resultados indicam a média das razões (IL/CL à lesão) da densidade integrada de pixels nas três linhagens. Observa-se as diferenças entre A/J e C57BL/6J ( $p < 0,001$ ), entre A/J e Balb/cJ ( $p < 0,01$ ) e Balb/cJ e C57BL/6J ( $p < 0,05$ ).

A expressão de ezrina também mostrou-se elevada nas três linhagens, após uma semana da lesão (figura 6 – A, C e E). As médias das razões foram de  $3,77 \pm 0,16$  (média  $\pm$  erro padrão) na linhagem A/J e  $2,69 \pm 0,26$  no C57BL/6J, o que indica uma diferença significativa entre estas duas linhagens ( $p < 0,05$ ). A expressão de ezrina em animais Balb/cJ ( $2,71 \pm 0,23$ ) foi semelhante à linhagem C57BL/6J, havendo também uma diferença estatística quando comparada ao A/J ( $p < 0,05$ ; figura 7). No entanto, o lado contralateral à axotomia apresentou a mesma expressão basal de ezrina nas três linhagens (figura 6 – B, D e F).

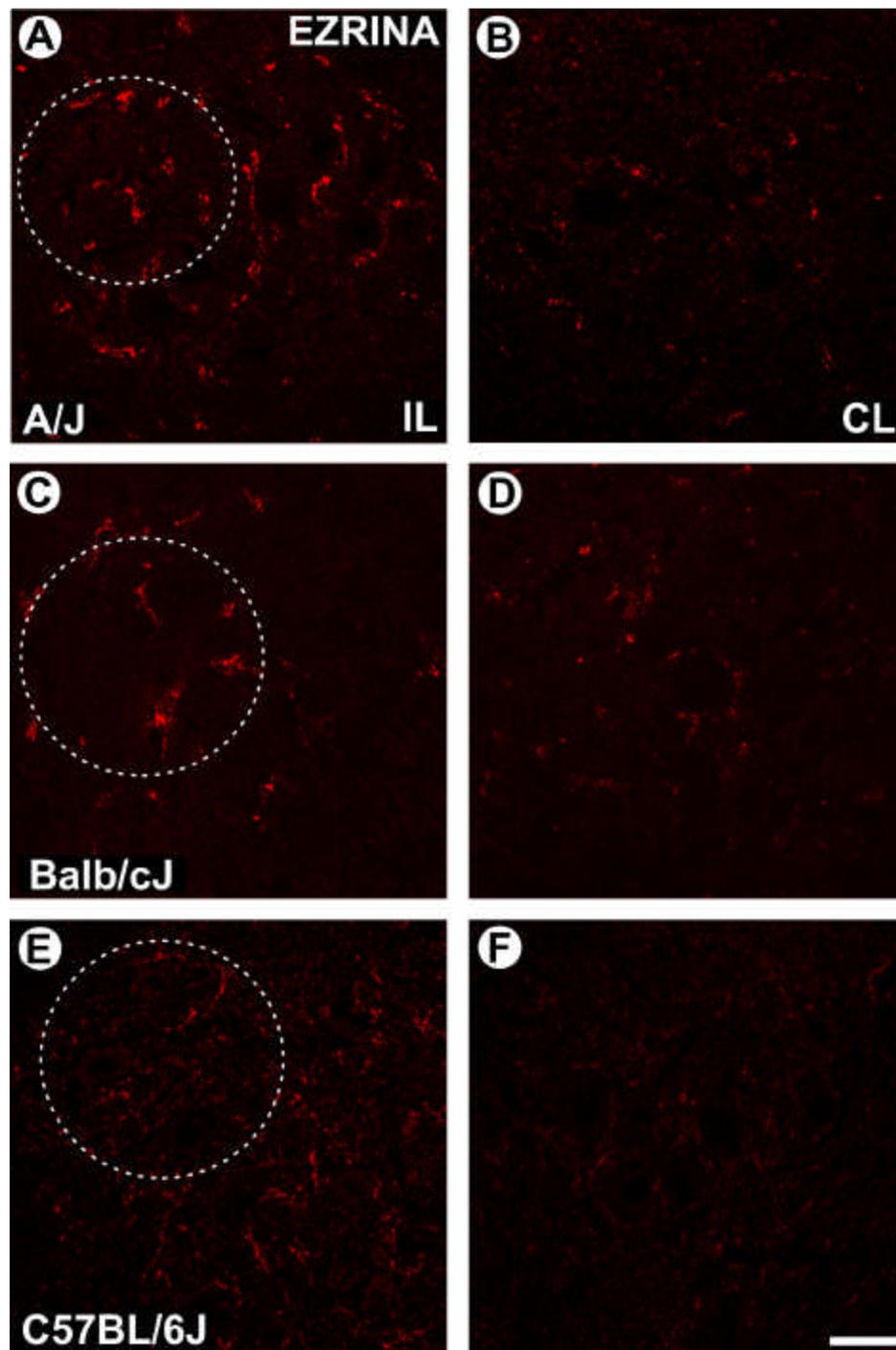


Figura 6. Imunomarcção anti-ezrina na região dorso-lateral do corno ventral da medula espinhal, uma semana após a transecção do nervo isquiático em camundongos *AJ*, *Balb/cJ* e *C57BL/6J*. IL – ipsilateral à lesão, CL – contralateral à lesão. A, C e E mostram o aumento da expressão da proteína no *A/J*, *Balb/cJ* e *C57BL/6J*, respectivamente (indicado nas áreas demarcadas). B, D e F – Expressão basal de ezrina no lado CL à lesão. Barra de escala= 50 $\mu$ m.

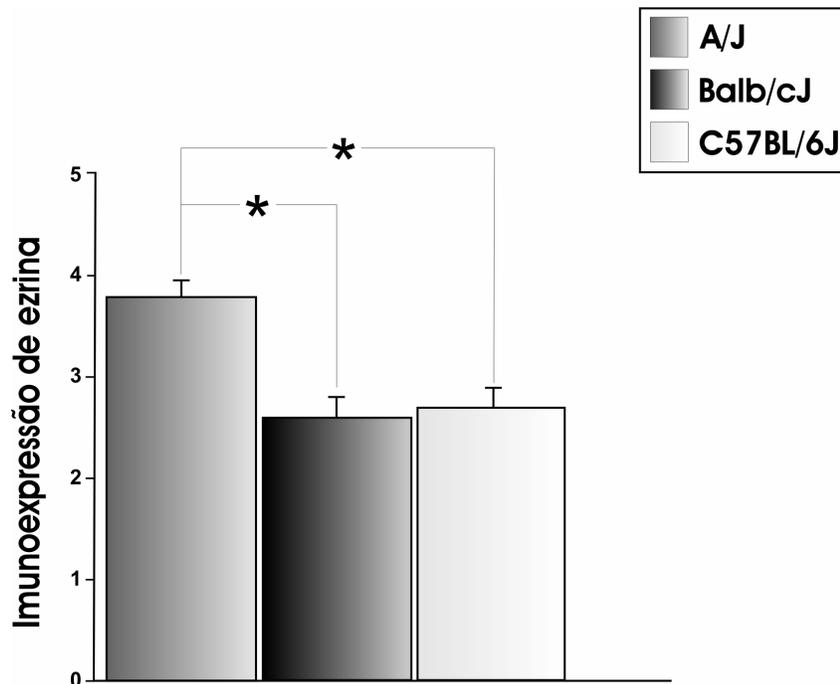


Figura 7. Gráfico da expressão de ezrina em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J após uma semana de transecção do nervo isquiático. Observe a diferença significativa entre os dados das linhagens A/J e C57BL/6J ( $p < 0,05$ ) e entre o A/J e Balb/cJ ( $p < 0,05$ ).

Após 21 dias de sobrevivência, a expressão de GFAP nos lados contralateral e ipsilateral à lesão manteve-se estável em relação ao grupo se 7 dias (figura 8 – A, C e E). Dessa forma, a linhagem C57BL/6J apresentou uma média de  $2,68 \pm 0,17$  (média  $\pm$  erro padrão); Balb/cJ,  $3,51 \pm 0,19$  e A/J,  $3,97 \pm 0,26$  (figura 9). Complementarmente, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos após uma e três semanas da axotomia (figura 10).

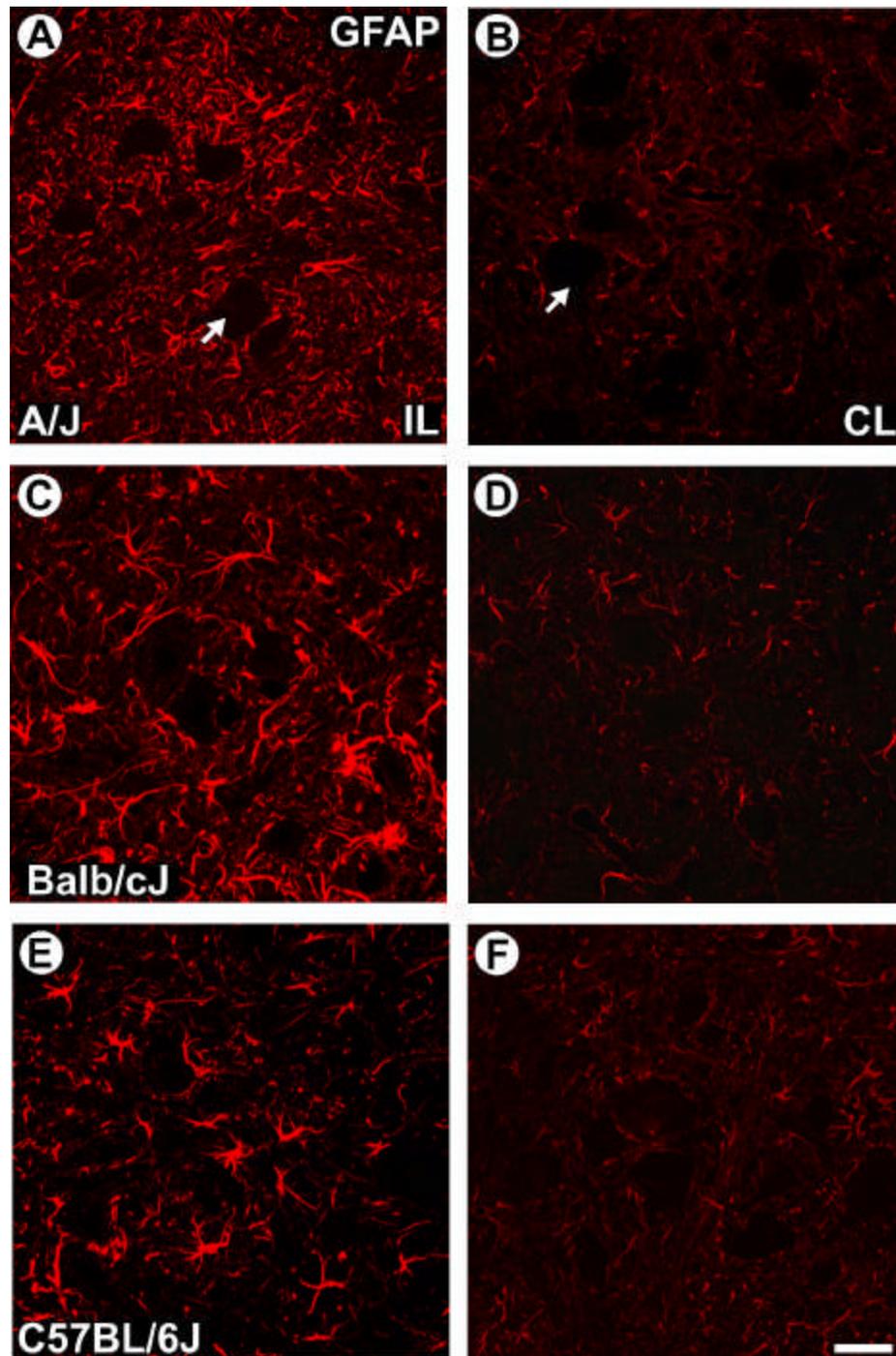


Figura 8. Imunomarcacão com anti-GFAP na região dorso-lateral do corno ventral da medula espinhal, três semanas após a transeco do nervo isquiático em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J. IL – ipsilateral  lesão, CL – contralateral  lesão. A, C e E indicam a astroglicose nas três linhagens, respectivamente. As setas indicam os corpos celulares dos motoneurônios. B, D e F – Expressão basal de GFAP no lado contralateral  lesão. Barra de escala = 50µm.

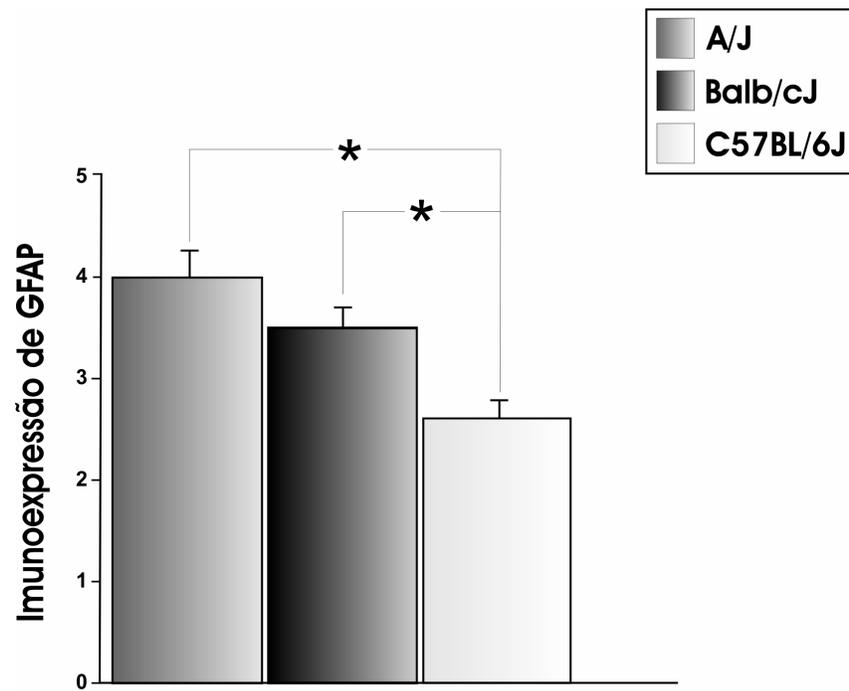


Figura 9. Gráfico da expressão de GFAP em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J, três semanas após a transecção do nervo isquiático, indicando diferença entre as linhagens A/J e C57BL/6J ( $p < 0,05$ ) e entre C57BL/6J e Balb/cJ ( $p < 0,05$ ).

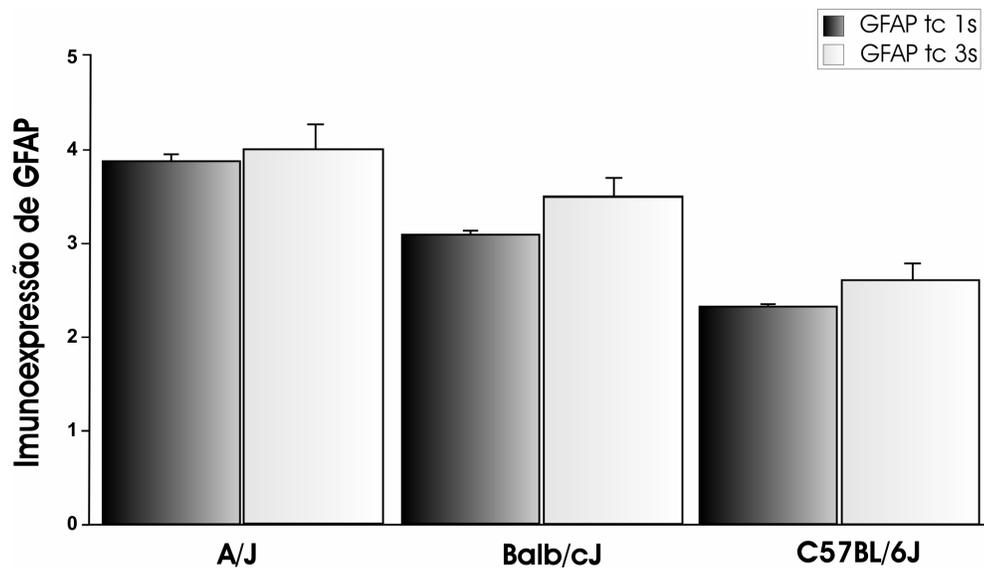


Figura 10. Gráfico da expressão de GFAP em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J uma e três semanas após a transecção do nervo isquiático. A análise estatística dos resultados não indicou diferença significativa ao comparar-se os tempos de sobrevivência.

As diferenças na expressão de ezrina 21 dias após a axotomia foram semelhantes aos resultados de uma semana de lesão nas três linhagens estudadas (figura 11). Dessa forma, camundongos C57BL/6J apresentaram uma razão de  $2,43 \pm 0,13$  (média  $\pm$  erro padrão) e A/J  $3,48 \pm 0,23$ ,  $p < 0,01$ ), representados no gráfico da figura 12. Os resultados da linhagem Balb/cJ mantiveram-se, novamente, em posição intermediária às outras duas linhagens ( $2,88 \pm 0,18$ ). A expressão de GFAP e de ezrina nos lados contralaterais à axotomia foi análoga às aquelas observadas nos diferentes grupos experimentais. Não houve diferença significativa da expressão de ezrina ao compararem-se as médias de uma e três semanas de transecção, em cada linhagem isogênica (figura 13).

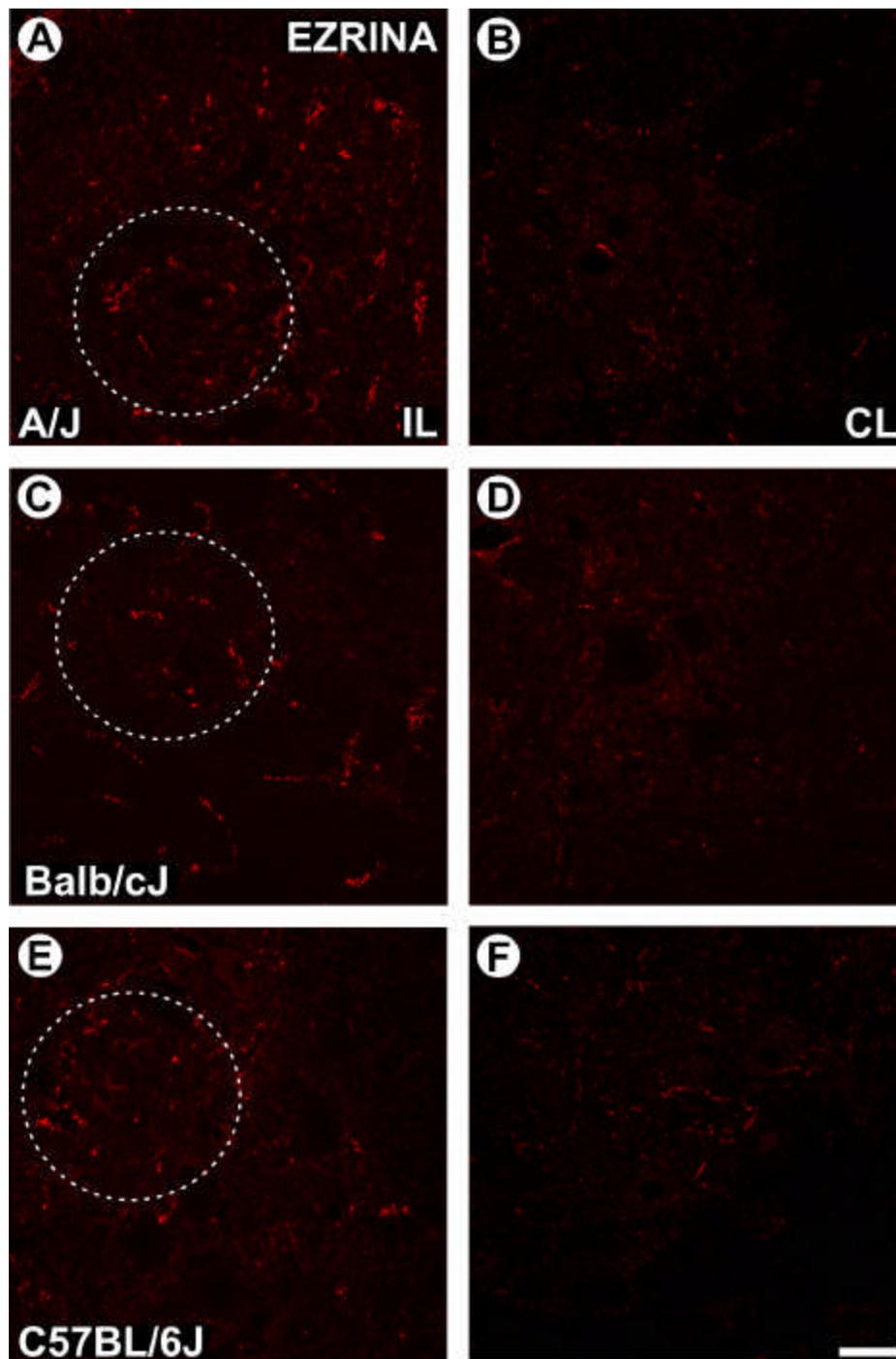


Figura 11. Imunomarcção para ezrina, três semanas após a transecção do nervo isquiático, em camundongos *A/J*, *Balb/cJ* e *C57BL/6J*. IL – ipsilateral à lesão, CL – contralateral à lesão. A, C e E – A expressão de ezrina evidencia o aumento da expressão desta proteína nas três linhagens (áreas demarcadas). B, D e F – Imagens representando a expressão basal de ezrina no lado CL. Barra de escala = 50µm.

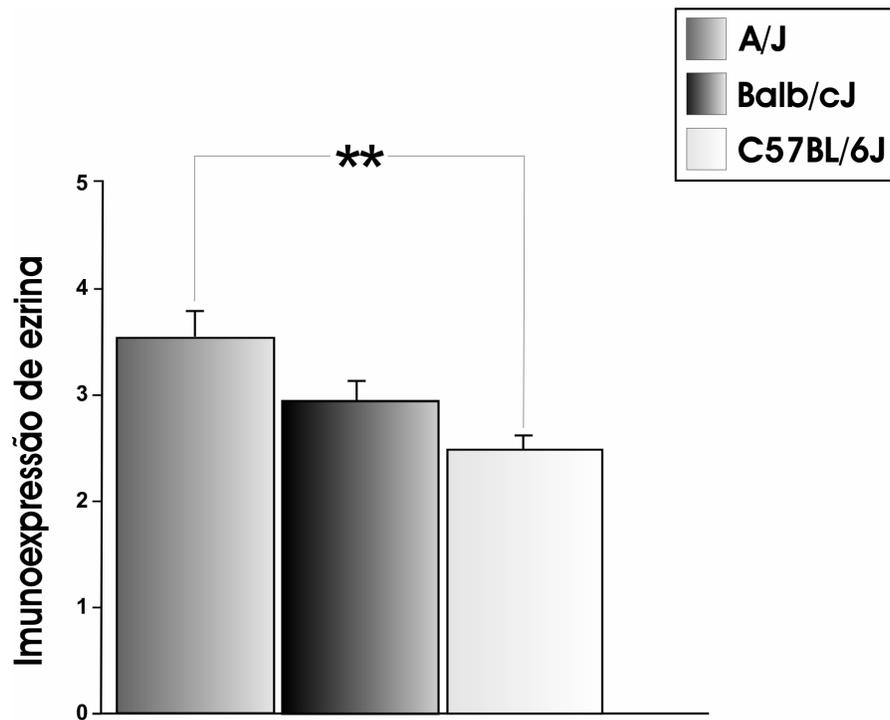


Figura 12. Gráfico da expressão de ezrina em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J três semanas após a transecção do nervo isquiático, indicando diferença entre as linhagens A/J e C57BL/6J ( $p < 0,01$ ).

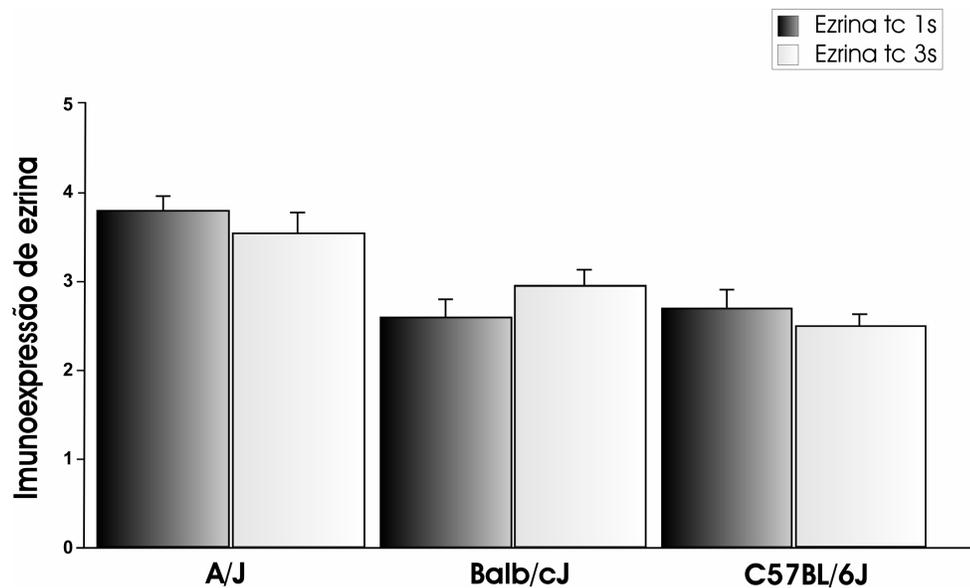


Figura 13. Gráfico da expressão de ezrina em camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J uma e três semanas após a transecção do nervo isquiático. A análise estatística dos resultados não indicou diferença significativa ao comparar-se os tempos de sobrevivência.

### 3.1.2. Caracterização dos aspectos ultraestruturais da lesão

Os resultados de microscopia eletrônica de transmissão convencional estão apresentados nas figuras subsequentes e demonstram a ocorrência de retração dos terminais sinápticos, no lado ipsilateral, uma semana após a lesão do nervo isquiático, nas três linhagens estudadas. As figuras 14, 15 e 16 mostram as imagens representativas do lado lesado (A, C) e não lesado (B, D) nas linhagens A/J, Balb/cJ e C57BL/6J, respectivamente. Observe-se um terminal retraído indicado pelo asterisco nas imagens 14 – C, 15 – C e 16 – C. O estudo do lado contralateral à lesão mostrou terminais sinápticos intactos em contato com a membrana plasmática dos motoneurônios alfa medulares.

Os espaços entre os terminais que se mantiveram em aposição à membrana pré-sináptica foram medidos nas três linhagens isogênicas, calculando-se a sua distribuição de frequência em

intervalos de  $1\mu\text{m}$ . Tais intervalos foram identificados ultraestruturalmente como sendo projeções citoplasmáticas dos astrócitos.

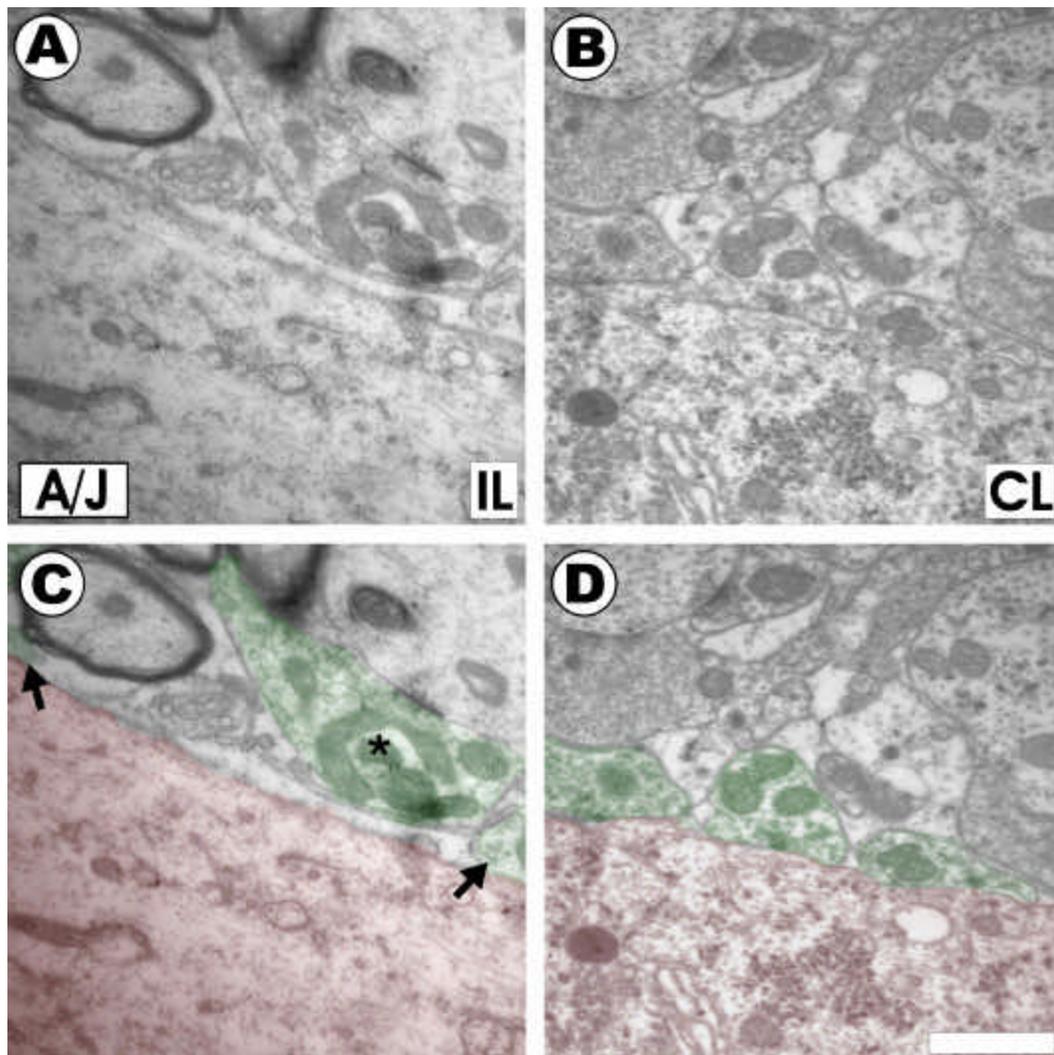


Figura 14. A e B – Fotomicrografias do microambiente sináptico na coluna ventral da medula nos lados ipsilateral (IL) e contralateral (CL) à transecção do nervo isquiático, na linhagem A/J, uma semana após a lesão. C e D – Terminais sinápticos (em verde) e os motoneurônios alfa (em vermelho). Observe um terminal sináptico retraído, indicado pelo asterisco na imagem C. As setas representam terminais em aposição à membrana plasmática dos motoneurônios, sendo o espaço entre eles ocupado por prolongamentos dos astrócitos. No lado CL à lesão, é possível observar a íntima relação dos terminais com a membrana do motoneurônio. Barra de escala =  $1,3\mu\text{m}$ .

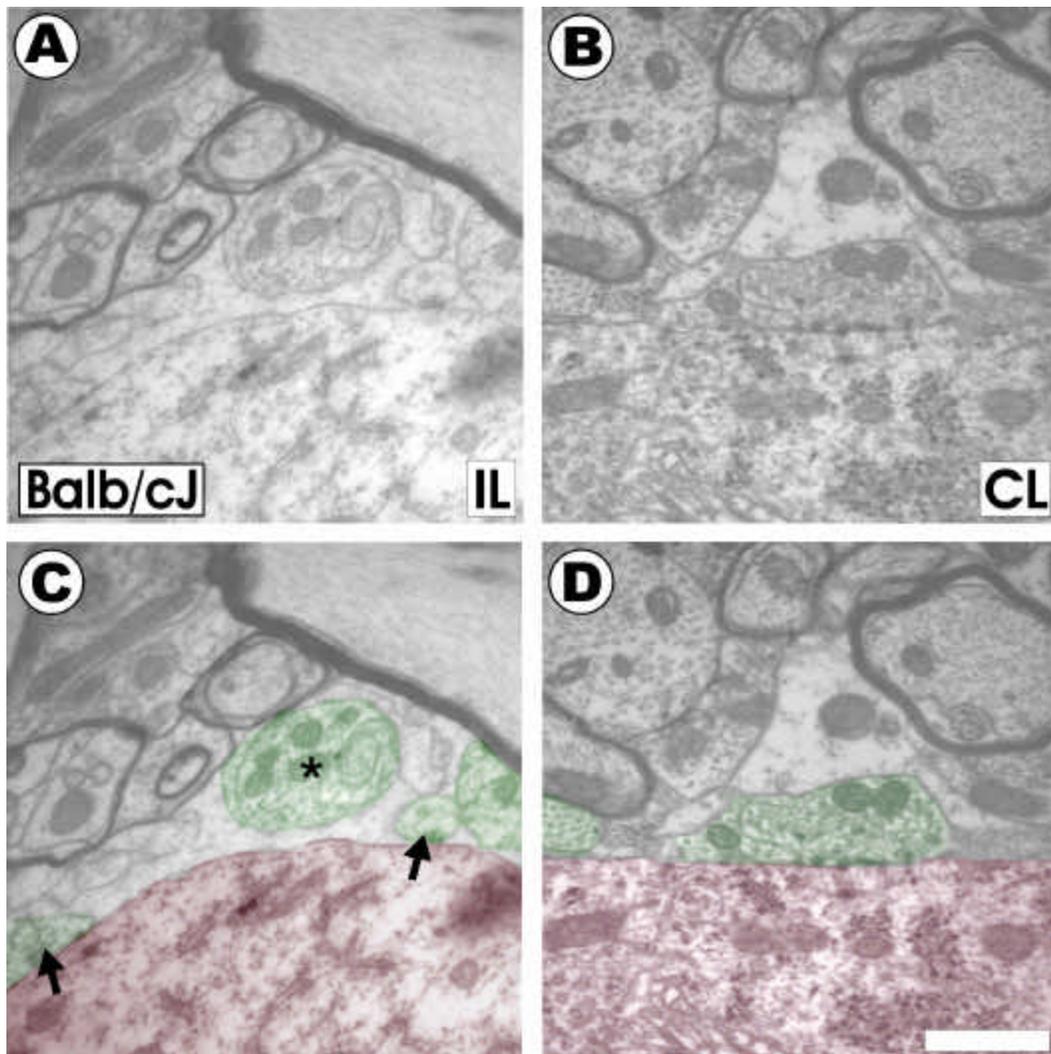


Figura 15. A e B – Fotomicrografias do microambiente sináptico da coluna ventral da medula nos lados ipsilateral (IL) e contralateral (CL) à transecção do nervo isquiático, na linhagem Balb/cJ, uma semana após a lesão. C e D – Terminais sinápticos (em verde) e os motoneurônios alfa (em vermelho). Observe um terminal sináptico retraído, indicado pelo asterisco na imagem C. As setas representam terminais em aposição à membrana plasmática dos motoneurônios, sendo o espaço entre eles ocupado por prolongamentos dos astrócitos. No lado CL à lesão, é possível observar a íntima relação dos terminais com a membrana do motoneurônio. Barra de escala = 1,3 $\mu$ m.

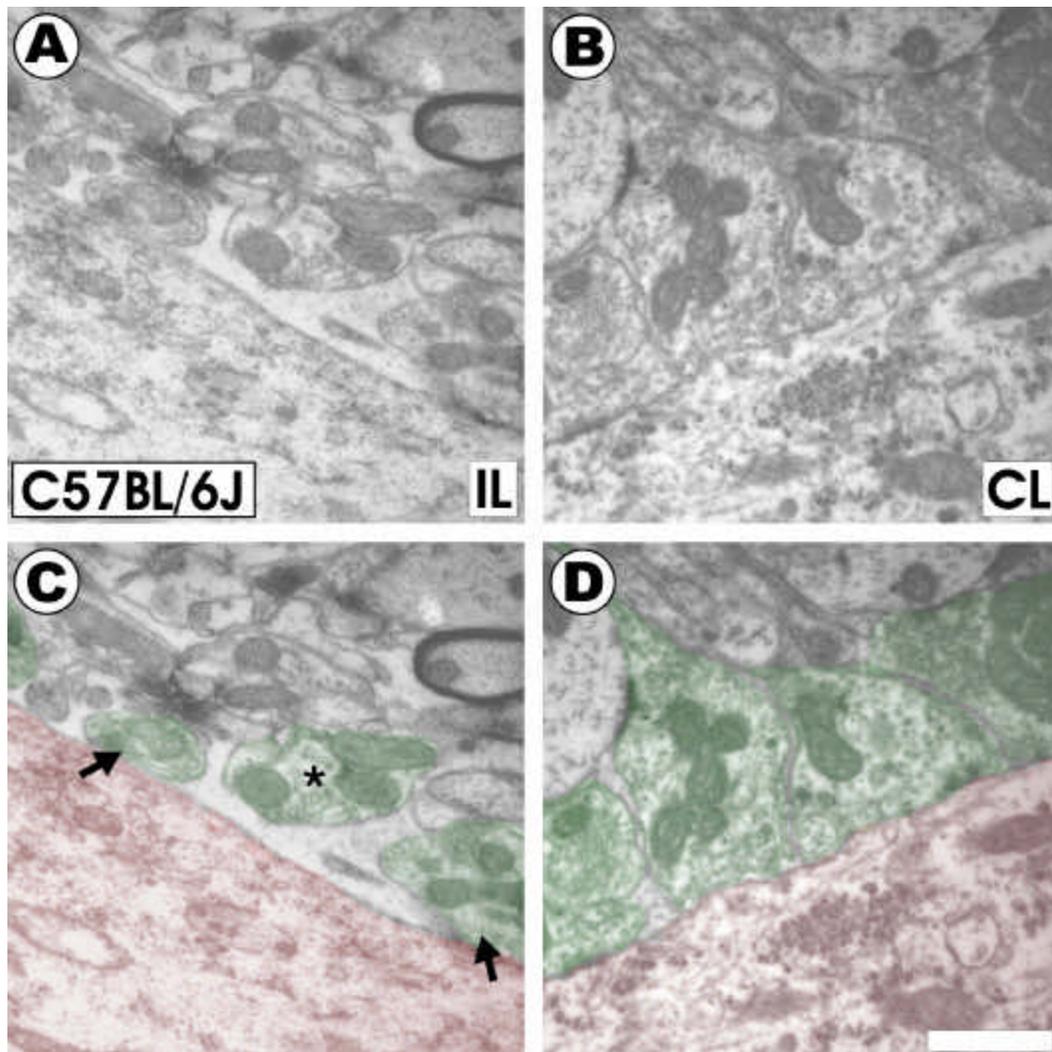
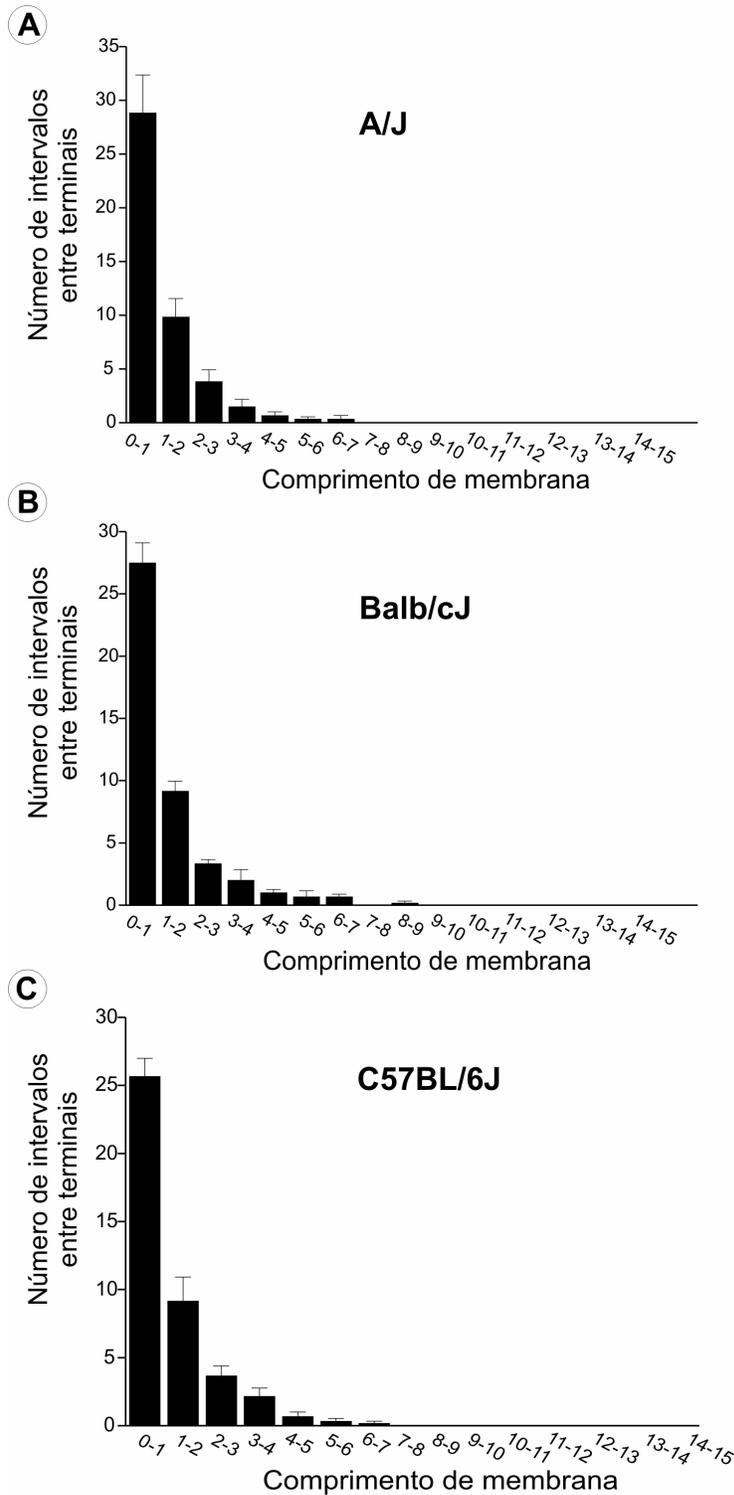
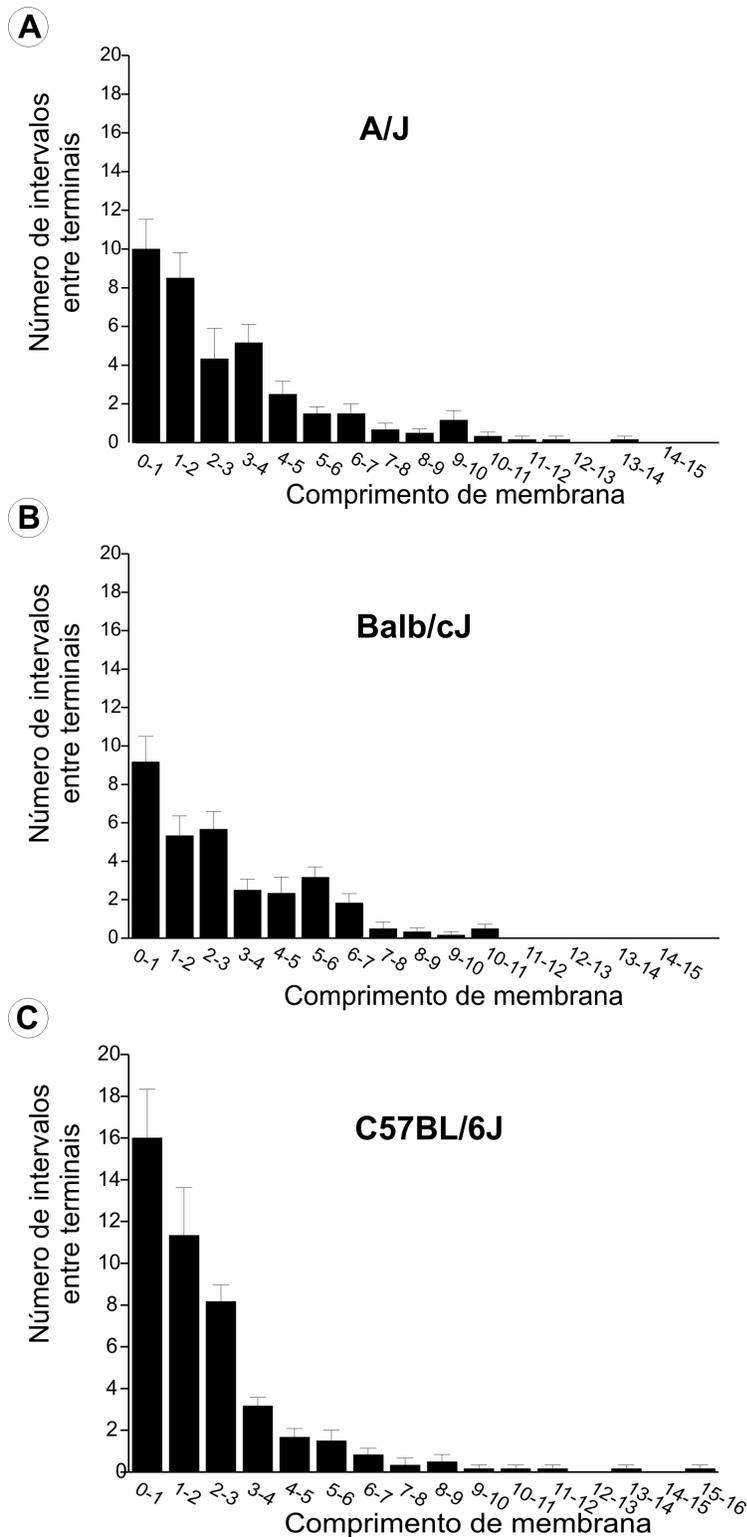


Figura 16. A e B – Fotomicrografias do microambiente sináptico da coluna ventral da medula nos lados ipsilateral (IL) e contralateral (CL) à transecção do nervo isquiático, na linhagem C57BL/6J, uma semana após a lesão. C e D – Terminais sinápticos (em verde) e os motoneurônios alfa (em vermelho). Observe um terminal sináptico retraído, indicado pelo asterisco na imagem C. As setas representam terminais em aposição à membrana plasmática dos motoneurônios, sendo o espaço entre eles ocupado por prolongamentos dos astrócitos. Note que este espaço é menor do que os espaços apresentados nas Figuras 14 e 15. No lado CL à lesão, é possível observar a íntima relação dos terminais com a membrana do motoneurônio. Barra de escala = 1,3 $\mu$ m.



O resultado da análise dessa distribuição de frequência, no lado não lesionado revelou a prevalência de espaços de até 7 $\mu$ m nos camundongos A/J e C57BL/6J e de até 9 $\mu$ m nos Balb/cJ (figura 17). Todavia, o intervalo de 0 a 2 $\mu$ m abrangeu aproximadamente 80% do total de espaços entre os terminais nas três linhagens, indicando um padrão semelhante de distribuição dos terminais sinápticos nas três linhagens, em condições de normalidade.

Figura 17. Gráficos da distribuição da frequência de comprimentos (em  $\mu$ m) dos intervalos entre os terminais sinápticos ao longo da superfície do corpo dos motoneurônios alfa não transeccionados. A, B e C indicam as frequências dos comprimentos nos camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J, respectivamente. Nota-se que não houve diferença entre essas linhagens.



Interessantemente, uma semana após a transecção do nervo isquiático observou-se uma redução da frequência de intervalos de 0 a 1μm nas três linhagens. Porém, nos animais C57BL/6J esta diminuição foi significativamente menor. Adicionalmente, o surgimento de intervalos maiores que 9μm nos camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J indicam a retração dos botões sinápticos nas três linhagens, sendo que essa retração foi maior em camundongos A/J e Balb/cJ comparativamente aos animais C57BL/6J.

Figura 18. Gráficos da distribuição da frequência de comprimentos (em μm) dos intervalos entre os terminais sinápticos ao longo da superfície do corpo dos motoneurônios alfa transecionados. A, B e C indicam os comprimentos nos camundongos A/J, Balb/cJ e C57BL/6J, respectivamente. Nota-se a diferença na distribuição da frequência dos comprimentos dos intervalos entre essas linhagens, indicando maior ocorrência de terminais retraídos em animais A/J e Balb/cJ do que em animais C57BL/6J.

### 3.1.3. Expressão imunocitoquímica de GFAP e ezrina

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão associadas à imunomarcagem foram positivas para as proteínas GFAP e ezrina (figura 19). Observe em A e B as partículas de ouro coloidal (áreas demarcadas), evidenciando a presença das duas proteínas nas projeções finas dos astrócitos.

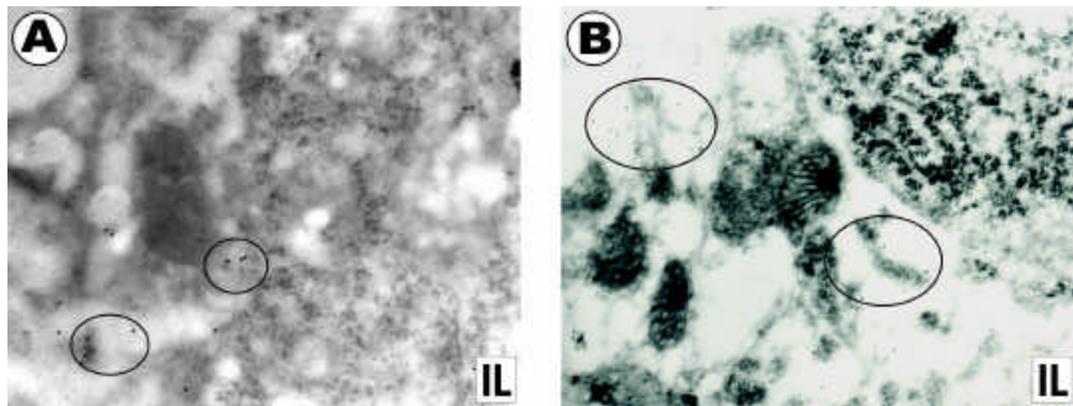


Figura 19. – Fotomicrografias eletrônicas do lado ipsilateral à transecção do nervo isquiático contendo imunomarcagem para ezrina (A) e GFAP (B), uma semana após a transecção do nervo isquiático, em animais da linhagem Balb/cJ. Observe as projeções astrocíticas impregnadas com ouro coloidal, evidenciada nas áreas demarcadas. Aumento de 27.000x.

## 3.2. Resultados *in vitro*

No sentido de reforçar os resultados *in vivo* foram realizadas culturas primárias de astrócitos das linhagens C57BL/6J e A/J, visto que estas apresentaram diferenças significativas na astrogliose reativa. Para tal finalidade, as células foram imunomarcadas com anti-GFAP e anti-ezrina (figura 20 – D, E e F). A análise quantitativa da reatividade astrogliar *in vitro* revelou uma expressão de GFAP 150% superior na linhagem A/J em relação à C57BL/6J (AJ,  $22,60 \pm 1,63$ , média  $\pm$  erro padrão; C57BL/6J,  $13,22 \pm 1,80$ ;  $p < 0,001$ ). Para certificar de que as culturas

possuíam o mesmo número de células, os núcleos dos astrócitos originados de A/J e C57BL/6J foram marcados com DAPI. Os resultados da marcação não indicaram diferença entre as linhagens, como observado nas imagens A, B e C (figura 20), demonstrando que a diferença de astrogliose não foi resultado de proliferação celular desigual entre as linhagens.

A imunomarcação com ezrina também exibiu diferença significativa entre estas duas linhagens (figura 21, A, B e C), sendo que A/J apresentou níveis maiores de marcação ( $18.47 \pm 1,31$ , média  $\pm$  erro padrão) em relação à C57BL/6J ( $13,95 \pm 1,16$ ), como ilustrado no gráfico em I. A significância destes dados revelou um  $p < 0,05$ , empregando-se o teste t de Student.

### **Impacto da reação astrogliar na sinaptogênese**

Para avaliar a relação entre a reatividade astrogliar e o processo de estabelecimento de novas sinapses, foram realizadas co-culturas de neurônios medulares e astrócitos corticais. Os terminais imunomarcados com anti-sinaptofisina foram contados dez dias após a efetivação das co-culturas. Como ilustrado nas imagens D a F da figura 21, neurônios cultivados com astrócitos originados da linhagem A/J estabeleceram um número inferior de contatos sinápticos. Em contraste, neurônios da mesma origem quando cultivados com astrócitos derivados de C57BL/6J desenvolveram um número de conexões sinápticas significativamente superior. A figura 21 – F revela uma diferença de 200% na habilidade neuronal de formar novas sinapses, dependendo do substrato glial (A/J,  $64,08 \pm 8,27$ , média  $\pm$  erro padrão; C57BL/6J,  $145,61 \pm 15,72$ ; teste de Mann-Whitney,  $p < 0,01$ ).

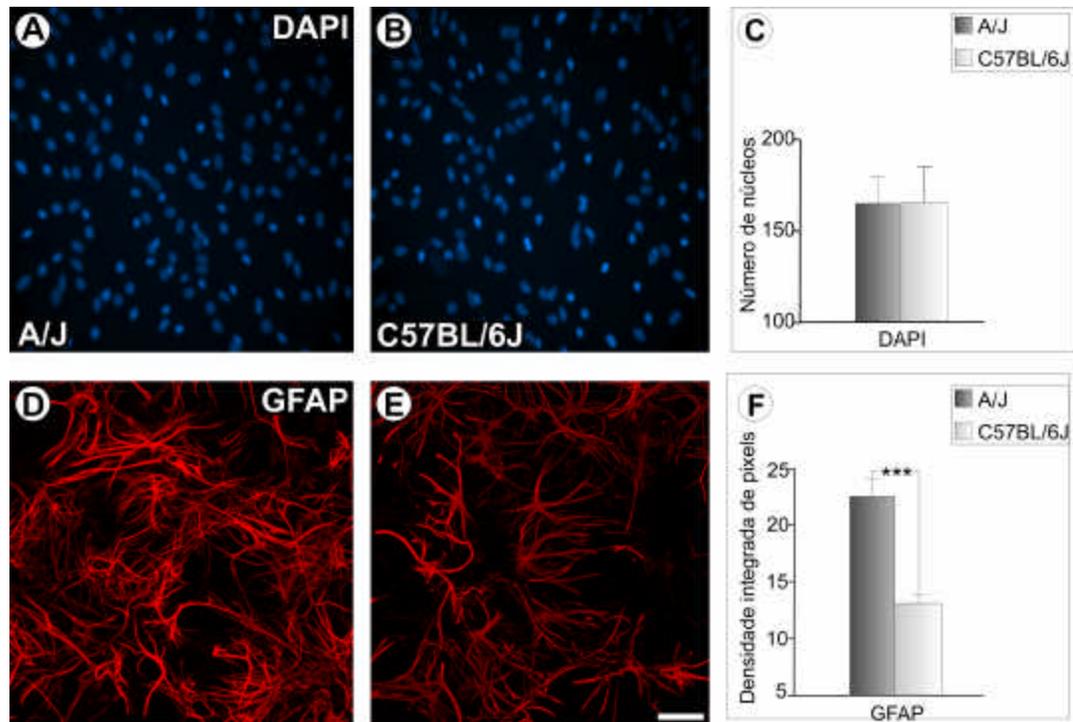


Figura 20. - Culturas primárias de astrócitos corticais nas linhagens A/J (coluna à esquerda) e C57BL/6J (coluna à direita). A e B – Marcação com 4',6' - diamidino-2-phenylindole dihydro (DAPI) nas mesmas culturas, respectivamente. C – Observa-se que não há diferença estatística entre o número de núcleos nas culturas de ambas as linhagens (área =  $5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ). D e E – Imunomarcagem com anti-GFAP indicando maior expressão dessa proteína na linhagem A/J. O gráfico em F representa os dados quantitativos da expressão de GFAP ( $p < 0,001$ ). Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

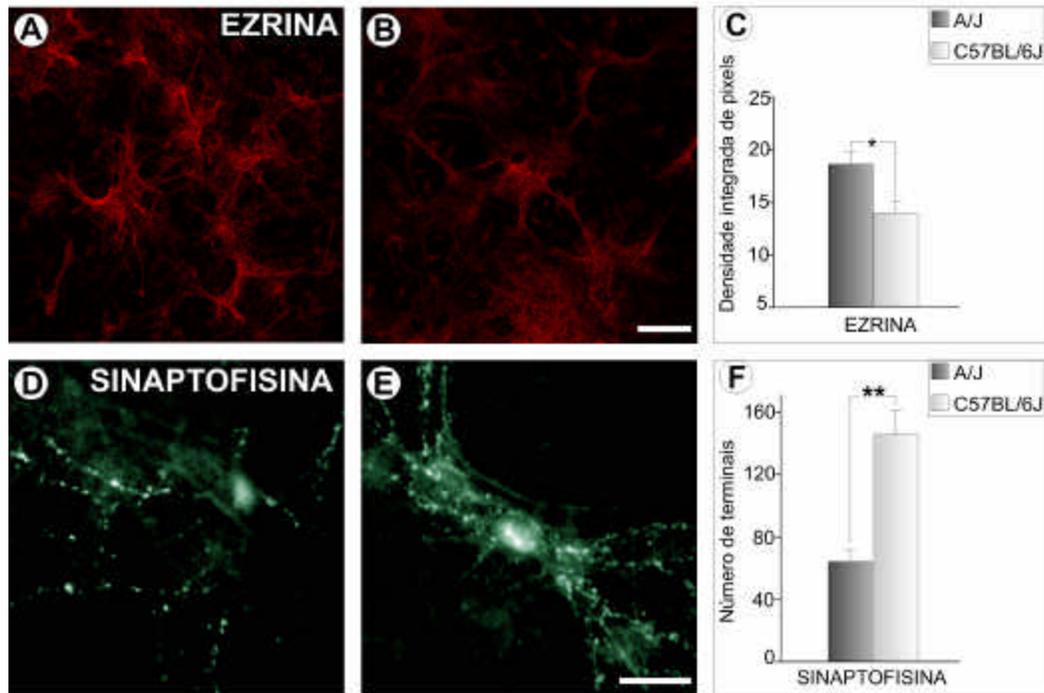


Figura 21. - Culturas primárias de astrócitos corticais e co-culturas com neurônios espinhais nas linhagens A/J (coluna à esquerda) e C57BL/6J (coluna à direita). A e B – Imunomarcagem com anti-ezrina indicou maior expressão dessa proteína em cultura primária de astrócitos originados de animais A/J. C – Gráfico indicando diferença estatística entre as linhagens ( $p < 0,05$ ). D e E – As co-culturas imunomarcadas com anti-sinaptofisina evidenciaram menor quantidade de contatos sinápticos entre neurônios quando cultivados com astrócitos oriundos de camundongos A/J. O gráfico em F mostra o número de contatos sinápticos por área ( $5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,01$ ). Barra de escala =  $50 \mu\text{m}$ .

## 4. DISCUSSÃO

Até recentemente, as células gliais eram consideradas como elementos estruturais passivos, desempenhando papel pouco relevante para a homeostasia do Sistema Nervoso. Recentes estudos, todavia, indicam que estas células possuem a capacidade de atuar efetivamente durante os eventos de transmissão e plasticidade sináptica (CASTONGUAY et al, 2001; ARAQUE et al, 1999; ARAQUE e PEREA, 2004; GIMENEZ y RIBOTTA et al, 2001; SHAO e McCARTHY, 1994; DEROUICHE et al, 2002). Têm-se dado ênfase ao estudo dos efeitos da astrogliose no processo de plasticidade do SN após lesão, apesar dos mecanismos celulares e moleculares que ocorrem em tais eventos ainda serem pouco conhecidos. O melhor entendimento da astrogliose bem como da função dos astrócitos na neuroplasticidade possibilitarão o desenvolvimento de estratégias que acelerem o processo de regeneração nervosa. Nesse contexto, Woerly e cols. (2004) estudando a reatividade glial após a transecção da medula espinhal observaram que implantes de hidrogel (NeuroGel) constituíram-se num bom substrato para a regeneração axonal. Também, o estudo da astrogliose após a avulsão de raízes ventrais medulares forneceu evidências de que a ativação glial é regulada geneticamente, podendo interferir no grau de neurodegeneração (LUNDBERG et al., 2001).

Levando-se em conta a necessidade de melhor entender os mecanismos envolvidos na regeneração nervosa, avaliamos, no presente estudo, as diferenças na intensidade da reação astrocitária em camundongos das linhagens A/J, Balb/cJ e C57BL/6J. Apresentamos evidências que a reatividade glial pode variar entre linhagens de camundongos, reforçando os dados da literatura (LIDMAN et al., 2002). Nos experimentos *in vivo* e *in vitro* associados à imunomarcção com GFAP e ezrina, os resultados de imunohistoquímica mostraram um aumento da reatividade astrocitária uma e três semanas após a transecção do nervo isquiático nas linhagens estudadas. Nesse aspecto, a linhagem A/J apresentou maior expressão de GFAP (glial fibrillary acidic protein) 7 e 21 dias após a axotomia, indicando uma astrogliose mais intensa nesses camundongos, comparativamente às outras linhagens. Interessantemente tal reatividade mostrou-se concentrada nos prolongamentos dos astrócitos em íntimo contato com o corpo celular dos

motoneurônios axotomizados. Adicionalmente, os animais C57BL/6J exibiram níveis de expressão relativamente baixos de GFAP.

Lu e cols. descreveram em 1990 que animais C57BL/6J exibem uma capacidade de regeneração axonal até cinco vezes menor do que camundongos A/J, concluindo que essa diferença poderia ser explicada pelo fato de apresentarem diferentes capacidades no recrutamento de macrófagos. No entanto, Oliveira e Langone (2000) empregaram a técnica de alotransplantes entre as linhagens C57BL/6J, A/J e Balb/cJ, chegando à conclusão de que essa menor capacidade regenerativa axonal pode ser consequência de diferenças no potencial regenerativo dos próprios neurônios lesionados. Levando-se em conta que os animais A/J apresentam uma taxa de regeneração axonal superior às demais linhagens estudadas, acreditamos que uma astrogliose reativa mais intensa possa influenciar positivamente na regeneração nervosa subsequente.

A transecção de um nervo periférico como o nervo isquiático é um modelo experimental bem estabelecido para o estudo da correlação entre reatividade e a resposta neuronal à lesão (LUNDBERG et al., 2001). Isso se deve ao fato de que neste modelo, em particular, os únicos elementos diretamente afetados pela lesão são os axônios dos neurônios medulares. Assim, todas as alterações observadas nas adjacências dos corpos dos motoneurônios, incluindo-se a astrogliose reativa, devem-se a uma direta comunicação neurônio/glial. Entre outros efeitos, a axotomia distal induz a ativação astrogliar tanto quanto a retração dos terminais pré-sinápticos em contato com o corpo celular e dendritos (BRÄNNSTRÖM e KELLERTH, 1998; ALDSKOGIUS et al., 1999). Essa retração é mais intensa nos terminais que fazem sinapse com o corpo celular dos motoneurônios alfa, sendo descrita uma diminuição de até 83% da cobertura sináptica (BRÄNNSTRÖM e KELLERTH, 1998). Estes eventos ocorrem na fase aguda do trauma e são influenciados pela alteração do estado fisiológico dos neurônios que passam de um estado de transmissão para uma condição de sobrevivência e regeneração (PIEHL et al., 1998).

Todavia, o papel dos astrócitos após o estabelecimento de uma doença, trauma ou axotomia parece ambíguo. Nesse sentido, há evidências de que estas células atuam como barreira física ao crescimento dos axônios através da formação da cicatriz glial (REIER et al., 1989, FAWCETT e ASHER, 1999), porém podem estimular a sua regeneração através da liberação de fatores neurotróficos (BABA, 1998; DONG e BENVENISTE, 2001; RIBOTTA et al., 2001).

Assim, astrócitos têm influência direta na estabilização e manutenção dos contatos sinápticos (WALZ, 1989; SHAO e MCCARTHY, 1994; ARAQUE e PEREA, 2004) podendo interferir nos processos de plasticidade sináptica após uma lesão (ALDSKOGIUS et al., 1999).

Para avaliar o impacto da astrogliose na sinaptogênese, astrócitos corticais derivados de A/J e C57BL/6J foram co-cultivados com neurônios medulares de ratos Sprague-Dawley. Como a sinaptofisina é uma proteína relacionada à transmissão sináptica e a diminuição de sua expressão está relacionada com a retração dos terminais após uma lesão periférica, anticorpo anti-sinaptofisina foi utilizado para avaliar o número de contatos desenvolvidos entre os neurônios *in vitro*. Ainda, essa proteína pode ser utilizada como um marcador da plasticidade sináptica após lesão nervosa periférica (GUNTINAS-LICHIUS et al., 1994) e também após outros traumas como a hemiseção da medula espinhal (NACIMIENTO et al., 1995). A imunomarcagem com sinaptofisina indicou que neurônios medulares derivados de ratos Sprague-Dawley apresentaram menor capacidade de formação de sinapses quando comparado com a linhagem C57BL/6J. Assim, demonstramos que o estabelecimento de contatos sinápticos pode ser influenciado pela reação dos astrócitos. Uma vez que a sinaptogênese está diretamente relacionada com os fenômenos de plasticidade sináptica, o melhor entendimento dos fatores capazes de exercer influência sobre sua ocorrência é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias visando à recuperação do SN após lesões.

Apesar da relevância dos resultados imunohistoquímicos com GFAP, os processos citoplasmáticos mais delgados adjacentes às sinapses não contém esta proteína, e sim, uma outra denominada ezrina (DEROUICHE e FROTHER, 2001; DEROUICHE et al., 2002), integrante da família de proteínas ERM (LOUVETT-VALLÉE, 2000). Essas se ligam ao citoesqueleto de actina e a proteínas transmembrana de alguns tipos celulares. Levando-se em conta este fato, investigamos adicionalmente a expressão de ezrina, que também aumentou nessas linhagens após a lesão. Similarmente à expressão de GFAP, a linhagem A/J apresentou intensidade superior de imunomarcagem para ezrina após uma e três semanas da lesão, em relação às outras linhagens. O aumento da produção dessa molécula indica que a astrogliose reativa é também acompanhada de um aumento da expressão de proteínas actino-dependentes.

Para reforçar os resultados *in vivo*, culturas primárias de astrócitos provenientes de córtices de camundongos A/J e C57BL/6J foram incubadas com anticorpos anti-GFAP e anti-ezrina. Os astrócitos derivados de animais A/J produziram projeções celulares marcadas intensamente com esses anticorpos, em comparação às células derivadas da linhagem C57BL/6J ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Tais resultados sugerem que os processos astrocitários apresentam potencial de atuar em eventos relacionados à plasticidade sináptica, sendo sensíveis a mudanças no microambiente do neurópilo, confirmando a hipótese de Aldskogius e cols. (1999).

Adicionalmente aos dados de imunohistoquímica, os resultados da análise ultraestrutural também forneceram evidências de que a astrogliose pode afetar a estabilidade das sinapses após axotomia periférica. Assim, foram observadas diferentes intensidades de retração sináptica nas três linhagens isogênicas uma semana após a lesão. De fato, camundongos A/J apresentaram os maiores índices de retração de botões sinápticos, dando subsídios à hipótese de que os processos astrocitários influenciam na neuroplasticidade (CONRADI, 1969; GRAEBER e KREUTZBERG, 1986; ENGEL e KREUTZBERG, 1988; BRÄNNSTRÖM e KELLERTH, 1998; JAROSINSKI e MASSA, 2002; WEKERLE, 2005). Ainda, os intervalos entre os terminais que permaneceram em oposição à membrana do motoneurônio alfa axotomizado foram ocupados pelos processos dos astrócitos nas proximidades das áreas de retração sináptica, o que foi confirmado pela imunomarcagem para GFAP e ezrina em microscopia eletrônica, com emprego de ouro coloidal. Esse fato reforçou a idéia que os processos periféricos são importantes durante o processo de eliminação dos botões pré-sinápticos como sugerido por Aldskogius e cols (1999).

Os resultados imunohistoquímicos e de microscopia eletrônica mostram uma interessante correlação entre a reatividade glial subsequente a axotomia e o processo de retração sináptica que ocorre ao nível de medula espinhal. É interessante ressaltar que a lesão empregada em nosso estudo foi periférica, sendo afetados unicamente os motoneurônios. Dessa maneira, todas as alterações no microambiente medular são necessariamente induzidas por esses neurônios, havendo indícios que isso ocorra através da expressão diferencial do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I). Uma vez que diferentes linhagens isogênicas expressam diferentes níveis de MHC I após axotomia periférica (MAEHLÉN, 1989; LINDÅ et al., 1998; LINDMAN et al., 2002), o aumento da produção de ezrina pode estar relacionado com este fenômeno. Tal hipótese é reforçada pelo fato de que a ezrina participa do processo de

formação da sinapse imunológica, facilitando a conjugação entre o linfócito T e a célula apresentadora de antígeno (DAS et al., 2002). Nesse sentido, linfócitos T emitem extensões de membrana que dependem da dinâmica de proteínas como a actina e a miosina sendo, portanto, capazes de entrar em contato com a superfície da célula apresentadora de antígeno (DAS et al., 2001; ROUMIER et al., 2002; FAURE et al., 2004).

Assim sendo, esses dois tipos de junções sinápticas compartilham características em comum, porém pouco se sabe sobre os mecanismos de sinalização do MHC I através dos astrócitos. Sugerimos que os processos astrogliais finos, uma vez que contêm proteínas do complexo ERM e possuem um alto grau de plasticidade às mudanças do ambiente neuronal, participem da sinalização com os neurônios durante o processo de plasticidade sináptica, seja ele durante o estabelecimento de doenças ou após traumas do SN. Dessa forma, o suposto mecanismo de interação entre moléculas de MHC classe I e processos astrocitários após uma axotomia pode permitir ao neurônio modificar o seu estado funcional, mantendo apenas um número mínimo de sinapses ativas durante o processo de regeneração axonal (OLIVEIRA et al., 2004). A partir dessa estratégia, estes podem, adicionalmente, evitar fenômenos de excitotoxicidade por glutamato, pela retração dos respectivos terminais excitatórios que contêm esse neurotransmissor.

## 5. CONCLUSÕES

1. Camundongos A/J apresentaram astrogliose mais intensa, em relação aos Balb/cJ e C57BL/6J, visualizada através da expressão diferencial de GFAP.
2. A astrogliose é acompanhada pelo aumento da expressão da proteína actino-dependente ezrina, que foi mais intensa em animais A/J, constituindo-se também em um indicador da astrogliose reativa.
3. A plasticidade dos processos astrocitários finos provavelmente contribui para a retração das sinapses após axotomia, mais intensa na linhagem A/J.
4. A reatividade astrogliar influencia a capacidade dos neurônios de estabelecer contatos sinápticos *in vitro*.
5. A astrogliose, por estar associada ao processo de retração sináptica, favorece a mudança do estado funcional dos neurônios após axotomia periférica.
6. Levando-se em conta que os animais da linhagem A/J apresentam uma taxa de regeneração axonal superior às demais, acreditamos que esses eventos sejam benéficos para a regeneração nervosa subsequente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL-BASSET, E.M., FEODOROFF, S. 1997. Upregulation of F-actin and a-actinin in reactive astrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 49:608-616.

ALDSKOGIUS, H., KOZLOVA, E.N. 1998. Central neuron-glia and glial-glia interactions following axon injury. *Prog. Neurobiol.*, 55(1):1-26.

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

ALLEN, N.J., BARRES, B.A. 2005. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 15:542-548.

ALOISI, F., RIA, F., ADORINI, L. 2000. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol. Today*, 21:141-147.

ARAQUE, A., PARPURA, V., SANZGIRI, R. P., HAYDON, P. G. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.*, 22:208-215.

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

BABA, A. 1998. Role of endothelin B receptor signals in reactive astrocytes. *Life Sci.*, 62 (17/18):1711-1715.

BABBITT, B.P., ALLEN, P.M., MATSUEDA, G., HABER, E., UNANUE, E.R. 1985. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature*, 317:359-361.

BAKER, C.V.H., BRONNER-FRASER, M. 1997. The origins of the neural crest. Part I: embryonic induction. *Mech. Dev.*, 69:3-11.

- BARRON, K.D. 1983. Axon reaction and central nervous system regeneration. In: Seil, F.J. Nerve, organ and tissue regeneration: research perspectives. *Academic Press*, New York, 3-36p.
- BIGNAMI, A., DAHL, D. 1976. The astrocytic response to stabbing. Immunofluorescence studies with antibodies to astrocytic-specific protein (GFAP) in mammalian and sub-mammalian vertebrates. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2:99-110.
- BIGNAMI, A.T., RAJU, T., DAHL, D. 1982. Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. In vivo and in vitro immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera. *Dev. Biol.*, 91:286-295.
- BLINZINGER, K., KREUTZBERG, G. 1968. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 85(2):145-57.
- BODIAN, D. 1964. An electron-microscopic study of the monkey spinal cord. *Bull. Hopk. Hosp.*, 114:13-119.
- BORMAN, J., KATTENMANN, H. 1988. Patch-clamp study of gamma-aminobutyric acid receptor CI channels in cultured astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 9336-9340.
- BRÄNNSTRÖM, T., KELLERTH, J.O. 1998. Changes in synaptology of adult cat spinal alpha-motoneurons after axotomy. *Exp. Brain Res.*, 118:1-13.
- BRETSCHER, A., CHAMBERS, D., NGUYEN, R., RECZEK, D. 2000. ERM-merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 16:113-143.
- BRUCK, W. 1997. The role of macrophages in Wallerian degeneration. 1997. *Brain Pathol.*, 7:741-752.

BURKE, R.E., STRICK, P.L., KANDA, K., KIM, C.C., WALMSLEY, B. 1977. Anatomy of medial gastrocnemius and soleus motor nuclei in cat spinal cord. *J. Neurophysiol.*, 40:667-680.

BURT, A.M. 1993. Neuroanatomia. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan S.A.*, 412p.

BUSH, T.G., PUVANACHANDRA, M., HORNER, C.H., POLITO, A., OSTENFELD, T., SVENDSEN, C.N., MUCKE, L., JOHNSON, M.H., SOFRONIEW, M.V. 1999. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration and neurite outgrowth after ablation of scar forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*, 23:297-308.

CASTONGUAY, A., LÉVESQUE, S., ROBITAILLE, R. 2001. Glial cells as active partners in synaptic functions. *Prog. Brain Res.*, 132: 227-240.

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

CHEN, D.H. 1978. Qualitative and quantitative study of synaptic displacement in chromatolyzed spinal motoneurons of the cat. *J. Comp. Neurol.*, 177(4):635-64.

CHIU, S.Y., KRIEGLER, S. 1994. Neurotransmitter-mediated signaling between axons and glial cells. *Glia*, 11(2):191-200.

CONRADI, S. 1969. On motoneuron synaptology in adult cats. *Acta Physiol. Scand.*, 332:1-57

DAHL, D. 1981. The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *J. Neurosci. Res.*, 6:741-748.

DAS, V., NAL, B., ROUMIER, A., MEAS-YEDID V., ZIMMER, C., OLIVO-MARIN, J., ROUX, P., FERRIER, P., DAUTRY-VARSAT, A., ALCOVER, A. 2002. Membrane-cytoskeleton interactions during the formation of the immunological synapse and subsequent T-cell activation. *Immunol. Rev.*, 189:123-135.

DA SILVA, G.H., HYSLOP, S., ALICE DA CRUZ-HOFLING, M. 2004. Lonomia obliqua caterpillar venom increases permeability of the blood-brain barrier in rats. *Toxicon*, 44(6):625-634.

DA-SILVA, C.F., PEREIRA, F.C. 1991. Differences in axon regeneration among strains of mice after nerve transection and entubulization repair. *Third IBRO World Congress of Neuroscience*, Montreal, (Abstract), 27p.

DEITMER, J.W., ROSE, C.R. 1996. pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog. Neurobiol.*, 48:73-103.

DE LA HOZ, C.L., OLIVEIRA, A.L., QUEIROZ, L.S., LANGONE, F. 2003. Wallerian degeneration in C57BL/6J and A/J mice: differences in time course of neurofilament and myelin breakdown, macrophage recruitment and iNOS expression. *J. Anat.*, 203(6):567-578.

DELGADO-GARCIA, J.M., DEL POZO, F., SPENCER, R.F., BAKER, R. 1988. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat - III. Axotomized motoneurons. *Neurosci.*, 24(1):143-160.

DEROUICHE, A., RAUEN, T. 1995. Coincidence of glutamate-aspartate-transporter- (GLAST) and glutamine synthetase- (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J. Neurosci. Res.*, 42:131-143.

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

DEROUICHE, A., ANLAUF, E., AUMANN, G., MÜHLSTÄDT, B., LAVIALLE, M. 2002. Anatomical aspects of glia-synapse interaction: the perisynaptic glial sheath consists of specialized astrocyte compartment. *J. Physiol.*, 96:177-182.

DONG, Y., BENVENISTE, E.M. 2001. Immune function of astrocytes. *Glia*, 36:330-341.

EDSTRÖM, E., KULLBERG, S., MING, Y., ZHENG, H., ULFHAKE, B. 2004. MHC class I,  $\beta_2$  microglobulin, and INF- $\gamma$  receptor are upregulated in aged motoneurons. *J. Neurosci. Res.*, 78: 892-900.

EMIRANDETTI, A., ZANON, R.G., JR, M.S., OLIVEIRA, A.L.R. Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. *Brain Res., In Press.*

ENG, L.F., GHIRNIKAR, R.S., LEE, Y.L. 2000. Glial Fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.*, 25(9/10): 1439-1451.

FAURE, S., SALAZAR-FONTANA, L.I., SEMICHON, M., TYBULEWICZ, V.L.J., BISMUTH, G., TRAUTMANN, A., GERMAIN, R.N., BELON, J. 2004. ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat. Immunol.*, 5(3): 272-280.

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

FAWCETT, J.W., ASHER, R.A. 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.*, 49:377-391.

FEODOROFF, S. 1987. From neuroepithelium to mature astrocytes. In Althaus H.H., Seifert, W. (eds): "Glial-neuronal communication in development and regeneration". Berlin: Springer-Verlag Heidelberg 5-25p.

GEIGER, B., AVNUR, Z., RINNERTHALER, G., HINSSEN, H., SMALL, V.J. 1984. Microfilament-organizing centers in areas of cell contact: cytoskeletal interactions during cell attachment and locomotion. *J. Cell Biol.*, 99(1/2):83-91.

GIMENEZ Y RIBOTTA, M., RAJAOFETRA, N., MORIN-RICHAUD, C., ALONSO, G., BOCHELEN, D., SANDILLON, F., LEGRAND, A., MERSEL, M., PRIVAT, A. 1995.

Oxysterol (7 $\beta$ -Hydroxicholesteryl-3-oleate) promotes serotonergic reinnervation in the lesioned rat spinal cord by reducing glial reaction. *J. Neurosci. Res.*, 41:79-95.

GIMENEZ Y RIBOTTA, M., MENET, V., PRIVAT, A. 2001. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. *Prog. Brain Res.*, 132:587-610.

GOGATE, N., BAKHIET, M., KRISTENSSON, K., NORRBY, E., OLSSON, T. 1991. Gamma interferon expression and major histocompatibility complex induction during measles and vesicular stomatitis virus infections of the brain. *J. Neuroimmunol.*, 31:19-26.

GRAEBER, M.B., KREUTZBERG, G.W. 1986. Astrocytes increase in glial fibrillary acidic protein during retrograde changes of facial motor neurons. *J. Neurocytol.*, 15:363-373.

GRAY, E.G., GUILLERY, R.W. Synaptic morphology in the normal and degenerating nervous system. 1966. *Int. Rev. Cytol.*, 19:111-182.

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

GUNTINAS-LICHIUS, O., NEISS, W.F., GUNKEL, A., STENNERT, E. 1994. Differences in glial, synaptic and motoneuron responses in the facial nucleus of the rat brainstem following facial nerve resection and nerve suture reanastomosis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 251:410-417.

GUTH, L. 1956. Regeneration in the mammalian peripheral nervous system. *Physiol. Rev.*, 36:441-478.

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

- HANSON, E., RÖNNBÄCK, L. 1995. Astrocytes in glutamate neurotransmission. *Faseb J.*, 9:343-350.
- HATTON, G.I. 2002. Glial-neuronal interactions in the mammalian brain. *Adv. Physiol. Educ.*, 26:225-237.
- HAYDON, P.G. 2001. Glia: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2:185-193.
- HEATH, P.R., SHAW, P.J. 2002. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle nerve*, 26:438-458.
- HIRRLINGER, J., HÜLSMANN, SWEN., KIRCHHOFF, FRANK. 2004. Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *Eur. J. Neurosci.*, 20:2235-2239.
- HURLEY, S.D., COLEMAN, P.D. 2003. Facial nerve axotomy in aged young adult rats: analysis of the glial response. *Neurobiol. Aging.*, 24(3):511-518.
- IDE, C. 1996. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci. Res.*, 25(2):101-121.
- ISHIMATSU, Y., MORIYA-ITO, K., MURAMOTO, K., ICHIKAWA, M. 2006. Modification of synapse formation of accessory olfactory bulb neurons by coculture with vomeronasal neurons. *Chem. Senses*, 31:371-378.
- KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSEL, T.M. 2000. Principles of Neural Science, 4<sup>th</sup> Edition: *McGraw-Hill*.
- KANG, J., JIANG, L., GOLDMAN, S.A., NEDERGAARD, M. 1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.*, 1:683-692.
- KETTENMANN, H., RANSOM, B.R. (Eds.) 1995. Neuroglia, *Oxf. Univ. Press*, Oxford.
- LAINETTI, R.D., PEREIRA, F.C., DA-SILVA, C.F. 1995. Reduced sensory neuron regeneration by C57BL/6J mice. *Br. J. Med. Biol. Res.*, 28: 781-785.

LEND AHL, U., ZIMMERMAN, L.B., McKay, R.D. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60:585-595.

LIDMAN, O., FRAIDAKIS, M., LYCKE, N., OLSON, L., OLSSON, T., PIEHL, F. 2002. Facial nerve lesion response; strain differences but no improvement of IFN- $\gamma$ , STAT4 or STAT6. *Neuroreport*, 13(13):1589-1593.

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

LIESI, P., DAHL, D., VAHERI, A. 1983. Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture. *J. Cell Biol.*, 96: 920-924.

LINDÅ, H., PIEHL, F., DAGERLIND, A., VERGE, V.M., ARVIDSSON, U., CULLHEIM, S., RISLING, M., UFHAKE, B., HOKFELT, T. 1992. Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons. *Exp. Brain Res.*, 91:284-295.

LINDÅ, H., HAMMARBERG, H., CULLHEIM, S., LEVINOVITZ, A., KHADEMI, M., OLSSON, T. 1998. Expression of MHC class I and  $\beta$ 2-microglobulin in rat spinal motoneurons; regulatory influences by INF-gamma and axotomy. *Exp. Neurol.*, 150:282-295.

LINDÅ, H., SHUPLIAKOV, O., ORNUG, G., OTTERSEN, O.P., STORM-MATHISEN, J., RISLING, M., CULLHEIM, S. 2000. Ultrastructural evidence for a preferential elimination of glutamate-immunoreactive synaptic terminals from spinal motoneurons after intramedullary axotomy. *J.Comp. Neurol.*, 425(1):10-23.

LINDSLEY, M.D., THIEMANN, F.L., RODRIGUEZ, M. 1988. Expression of class I antigen in C57/BL10 and SJL mice following Theiler's virus infection. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 47:324.

- LOUVETT-VALLÉE S. 2000. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol. Cell.* 92:305-316.
- LOWRIE, M.B., LAVALETTE, D., DAVIES, C.E. 1994. Time course of motoneurone death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. *Dev. Neurosci.*, 16(5/6):279-284.
- LU, L., RICHARDSON, P.M., GERVAIS, F., SKAMENE, E. 1990. A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6J mice. *Brain Res.*, 510:144-146.
- LU, X., SKAMENE, E., RICHARDSON, P.M. 1994. Studies of axonal regeneration in C57BL/6J and A/J mice. *Brain Res.*, 652: 174-176.
- LUNDBERG, C., LIDMAN, O., HOLMDAHL, R., OLSSON, T., PIEHL, F. 2001. Neurodegeneration and glial activation patterns after mechanical nerve injury are differentially regulated by non-MHC genes in congenic inbred rat strains. *J. Comp. Neurol.*, 431(1):75-87.
- LUNDBORG, G. 1993. Peripheral nerve injuries: pathophysiology and strategies for treatment. *J. Hand Ther.*, 6(3):179-188.
- MCCALL, M.A., GREGG, R.G., BEHRINGER, R.R., BRENNER, M., DELANEY, C.L., GALBREATH, E.J., ZHANG, C.L., PEARCE, R.A., CHIU, S.Y., MESSING, A. 1996. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Neurobiol.*, 93: 6361-6366.
- MCGRAW, J., HIEBERT, G.W., STEEVES, J.D. 2001. Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J. Neurosci. Res.*, 63(2):109-115.
- MENDELL, L.M., MUNSON, J.B., SCOTT, J.G. 1976. Alterations of synapses on axotomized motoneurons. *J. Physiol.*, 255:67-79.
- NACIMIENTO, W., SAPPOK, T., BROOK, G.A., TOTH, L., SCHOEN, S.W., NOTH, J., KREUTZBERG, G.W. 1995. Structural changes of anterior horn neurons and their synaptic input

caudal to a low thoracic spinal cord hemisection in the adult rat: a light and electron microscopic study. *Acta Neuropathol.*, 90:552-564.

NAGY, J.I., YAMAMOTO, T., JORDAN, L.M. 1993. Evidence for the cholinergic nature of C-terminals associated with subsurface cisterns in alpha-motoneurons of rat. *Synapse*, 15:17-32.

NEWMAN, E.A., REICHENBACH, A. 1996. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.*, 19:307-312.

NEUMANN, H. 2001. Control of glial immune functions by neurons. *Glia*, 36:191-199.

NOREMBERG, M.D., MARTINEZ-HERNANDEZ, A. 1979. Fine structural localization of glutamine synthase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.*, 161(2):303-310.

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

NORTON, W.T. 1999. Cell reactions following acute brain injury: a review. *Neurochem. Res.*, 24: 213-218.

OLIET, S.H., PIET, R., POULAIN, D.A. 2001. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science*, 292(5518):923-926.

OLIVEIRA, A.L., LANGONE, F. 2000. Non-neuronal cells are not the limiting factor for the low axonal regeneration in C57BL/6J mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33:1467-1475.

OLIVEIRA, A.L., 2001. Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 34:375-380.

OLIVEIRA, A.L., RISLING, M., NEGRO, A., LANGONE, F., CULLHEIM, S. 2002. Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. *J Com. Neurol.*, 447(4):381-393.

OLIVEIRA, A.L., THAMS, S., LIDMAN, O., PIEHL, F., HÖKFELT, T., KÄRRE, KLAS, LINDÅ H., CULLHEM, STAFFAN. 2004. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *PNAS*, 101(51):17843-17848.

OLSSON, T., KRISTENSSON, K., LJUNGDAHL, A., MAEHLEN, J., HOLMDAHL, R., KLARESKOG, L. 1989. Gamma-interferon-like immunoreactivity in axotomized rat motor neurons. *J. Neurosci.*, 9:3870-3875.

PARNES, J.R. 1989. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv. Immunol.*, 44:265-311.

PARPURA, V., BASARSKY, T.A., LIU, F., JEFTINIJA, K., JEFTINIJA, S., HAYDON, P.G. 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signaling. *Nature*, 369(6483):744-747.

PEKNY, M. 2001. Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice. *Prog. Brain Res.*, 132:23-30.

PIEHL, F., ARVIDSSON, U., JOHNSON, H., CULLHEIM, S., DAGERLIND, A., ULFHAKE, B., CAO, Y., ELDE, R., PETTERSSON, R.F., TERENIUS, L. 1993. GAP-43, aFGF, CCK and alpha- and beta-CGRP in rat spinal motoneurons subjected to axotomy and/or dorsal root severance. *Eur. J. Neurosci.*, 5:1321-1333.

PIEHL, F., HAMMARBERG, H., HOKFELT, T., CULLHEIM, S. 1998. Regulatory effects of trophic factors on expression and distribution of CGRP and GAP-43 in rat motoneurons. *J. Neurosci. Res.*, 51:1-14.

PIERUCCI, A., OLIVEIRA, A.L.R. 2006. Increased sensory neuron apoptotic death 2 weeks after peripheral axotomy in C57BL/6J mice compared to A/J mice. *Neurosci. Lett.*, 396:127-131.

PLOEGH, H.L., ORR, H.T., STROMINGER, J.L. 1981. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell*, 24:287-299.

- PRIVAT, A., VALAT, J., FULCRAND, J. 1981. Proliferation of neuroglial cell lines in the degenerating optic nerve of young rats. A radioautographic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 40:46-60.
- PRIVAT, A. 2003. Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals. *Glia*, 43:91-93.
- RAKIC, P. 1995. Radial glial cells: scaffolding for brain construction. In: Kettenmann, H., Ransom, B.R. (Eds.). *Neuroglia. Oxf. Univ. Press*, New York, 746:762.
- RAMON Y CAJAL. 1913-1914. Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Madrid: Moya.
- REIER, P.J., ENG, L.F., JAKEMAN, L. 1989. Reactive astrocyte and axonal outgrowth in the injured CNS: is gliosis really an impediment to regeneration? *Neur. Reg. Transpl. Front. Clin. Neurosci.*, 6:193-209.
- REISERT, I., WILDEMANN, G., GRAB, D., PILGRIM, C. 1984. The glial reaction in the course of axonal regeneration: a stereological study of the rat hypoglossal nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 299:121-128.
- REXED, B. 1952. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 96:415-496.
- REXED, B. 1954. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 100:297-379.
- RIDET, J.L., MALHOTRA, S.K., PRIVAT, A., GAGE, F.H. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.*, 20(12):570-577.
- RISAU, W., WOLBURG, H. 1990. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.*, 13(5):174-178.

- ROBERTS, R.C., DU, F., MCCARHY, K.E., OKUNO, E., SCHWARTZ, R. 1992. Immunocytochemical localization of kynurenine aminotransferase in the rat striatum: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, 326:82-90.
- ROGERS, S.D., CHRISTOPHER, M.P., JAMES, D.P., HIROMI, H., JOSEPH, R.G., PATRICK, W. M. 2003. Endothelin B receptors are expressed by astrocytes and regulate astrocyte hypertrophy in the normal and injured CNS. *Glia*, 41:180-190.
- RONNEVI, L-O. 1977. Spontaneous phagocytosis of boutons on spinal motoneurons during early postnatal development. An electron microscopical study in the cat. *J. Neurocytol.*, 6(5):487-504.
- ROSENBLUTH, J. 1962. Subsurface cisterns and their relationship to the neuronal plasma membrane. *J. Cell Biol.*, 13:405-421.
- ROTHSTEIN, J.D., MARTIN, L., LEVEY, A.I., DYKES-HOBERG, M., JIN, L., WU, D., NASH, N., KUNCL, R.W. 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, 13(3):713-725.
- ROUACH, N., GIAUME, C. 2001. Connexins and gap junctional communication in astrocytes are targets for neuroglial interaction *Prog. Brain Res.*, 132:203-214.
- ROUMIER, A., OLIVO-MARIN, J.C., ARPIN, M., MICHEL, F., MARTIN, M., MANGEAT, O.C., DAUTRY-VARSAT, A., ALCOVER, A. 2001. The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation. *Immunity*, 15:715-728.
- RUBIN, L.L., STADDON, J.M. 1999. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev. Neurosci.*, 22:11-28.

- RUSAKOV, D.A., KULLMANN, D.M. 1998. Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *J. Neurosci.*, 18: 3158-3170.
- SCHOOLS, G.P., KIMELBERG, H.K. 1999. mGluR3 and mGluR5 are the predominant metabotropic glutamate receptor mRNAs expressed in hippocampal astrocytes acutely isolated young rats. *J. Neurosci. Res.* 58(4):533-543.
- SCHWARTZ, J.P., MISHLER, K. 1990. Beta-adrenergic receptor regulation, through cyclic AMP, of nerve growth factor expression in rat cortical and cerebellar astrocytes. *Cell Mol. Neurobiol.*, 10:447-457.
- SHAO, Y., MCCARTHY, K.D. 1994. Plasticity of astrocytes. *Glia*, 11:147-155.
- SMITH, S. J. 1998. Glia help synapses form and function. *Curr. Biol.*, 8(5):1580-160.
- SPACEK, J. 1985. Three-dimensional analysis of dendritic spines. III. Glial sheets. *Anat. Embryol.*, 171:245-252.
- STREIT, W.J., WALTER S.A., PENNEL, N.A. 1999. Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.*, 57: 563-581.
- SUNDERLAND, S.S. 1990. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle & Nerve*, 13:771-784p.
- SVENSSON, M., ALDSKOGIUS, H. 1993. Synaptic density of axotomized hypoglossal motoneurons following pharmacological blockade of the microglial cell proliferation. *Exp. Neurol.*, 120:123-131.
- TERENGGHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. 1999. *J. Anat*, 194:1-14.

TETZLAFF, W., GRAEBER, M.B., BISBY, M.A., KREUTZBERG, G.W. 1988. Increased glial fibrillary acidic protein synthesis in astrocytes during retrograde reaction of the rat facial nucleus. *Glia*, 1:90-95.

THEODOSIS, D.T., POULAIN, D.A. 1993. Activity-dependent neuronal-glial and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neurosci.*, 57:501-535.

TIRAIHI, T., REZAIE, M.J. 2003. Apoptosis onset and Bax protein distribution in spinal motoneurons of newborn rats following sciatic nerve axotomy. *Int. J. Neurosci.*, 113:1163-1175.

TITMUS, M.J. FABER D.S. 1990. Axotomy-induced alterations in the electrophysiological characteristics of neurons. *Prog. Neurobiol.*, 35:1-51.

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

TSENG, G.F., WANG, Y.I., LAI, Q.C. 1996. Perineuronal microglial reactivity following proximal and distal axotomy of rat rubrospinal neurons. *Brain Res.*, 715:32-43.

TSUKITA, S., OISHI, K., SATO, N., SAGARA, J., KAWAI, A., TSUKITA, S. 1994. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.*, 126 (2):391-401.

TSUKITA, S., YONEMURA, S., TSUKITA, S. 1997. ERM proteins: head-to-tail regulation of actin plasma membrane interaction. *Trends Biochem. Sci.*, 22(2):53-58.

ULFHAKE, B., CULLHEIM, S. 1988. Postnatal development of cat hind limb motoneurons. III: Changes in size of motoneurons supplying the triceps surae muscle. *J Comp. Neurol.*, 278:103-120.

ULLIAN, E.M., SAPPERSTEIN, S.K., CHRISTOPHERSON, K.S., BARRES, B.A. 2001. Control of synapse number by glia. *Science*. 291:657-661.

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

VENTURA, R., HARRIS, K.M. 1999. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J. Neurosci.*, 16:6897-6906.

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

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

WALZ, W. 1989. Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog. Neurobiol.*, 33(4):309-333.

WEBSTER, H.F., FAVILLA, J.Y. 1984. Development of peripheral fibers. In: *Peripheral Neuropathy*. Eds. P.J. Dyck, P.K. Thomas, E.H. Lambert, R.P. Bunge. Philadelphia, Saunders. P. 329-359.

WEKERLE, H. 2005. Planting and pruning in the brain: MHC antigens involved in synaptic plasticity? *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 102(1):3-4.

WENDELL-SMITH, C.P., BLUNT, M.J., BALDWIN, F. The ultrastructural characterization of macroglial cell types. 1966. *J. Comp. Neurol.*, 127(2):219-240.

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

WOERLY, S., Doan, V.D., Sosa, N., de Vellis, J., Espinosa-Jeffrey, A. 2004. Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord. *J. Neurosci. Res.*, 75(2):262-272.

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

WOLFF, J.R., Missler, M. 1992. Synaptic reorganization in developing and adult nervous systems. *Anat. Anz.*, 174:393-403.

WONG, G., BARTLETT, P., CLARK-LEWIS, I., BATTYE, F., SCHRADER, J. 1984. Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature*, 310:688-691.

YONEMURA, S., NAGAFUSHI, A.S., TSUKUYTA, N.S. 1993. Concentration of an integral membrane protein, CD43 (leukosialin, sialophorin), in the cleavage furrow through the interaction of its cytoplasmic domain with actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.*, 120:437-449.

ZANON, R.G., OLIVEIRA, A.L. 2006. MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transection. *Exp. Neurol.*, (Epub ahead of print).



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)**BRAIN  
RESEARCH**

## Research Report

**Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy**Amanda Emirandetti, Renata Graciele Zanon, Mario Sabha Jr.,  
Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira\*

Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP) Campinas, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 4 April 2006

## Keywords:

Spinal cord

Synapse elimination

Motoneuron

Glial

CNS plasticity

## ABSTRACT

Although synaptic plasticity is a widespread phenomenon, the underlying mechanisms leading to its occurrence are virtually unknown. In this sense, glial cells, especially astrocytes, may have a role in network changes of the nervous system, influencing the retraction of boutons as well as providing a proper perisynaptic environment, thereby affecting the replacement of inputs. Interestingly, the glial reaction does vary between strains of rats and mice. In this sense, we present evidence that C57BL/6J and A/J isogenic mice present different astrocyte reactivity after a peripheral lesion *in vivo* as well as *in vitro*, by analyzing primary cell cultures. Such a difference in the glial reaction has a direct influence on *in vivo* number of pre-synaptic terminals and on *in vitro* synaptogenesis.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**1. Introduction**

Virtually every lesion to the nervous system results in rearrangement of the synaptic connections in the affected network. Such changes include the retraction of nerve terminals, which occurs in the early stages after injury and may persist for a variable period of time (Brännström and Kellerth, 1998; Lindá et al., 1992). A series of factors may influence this process so that pre and post-synaptic neurons as well as glial cells are thought to be key players (Aldskogius et al., 1999).

Glial responses to synaptic damage and plasticity have been revised by Aldskogius et al. (1999), who proposed three typical situations for damage, namely retrograde transsynaptic, transganglionic and anterograde Wallerian degeneration. In all cases, the basic mechanisms for the occurrence of synaptic plasticity are poorly understood. Nevertheless the role of astrocytes appears to be crucial since the displacement

of pre-synaptic terminals from the post-synaptic membrane is accompanied by the projection of thin, sheet-like astrocytic processes (Derouiche and Frotscher, 2001; Derouiche et al., 2002).

Interestingly, the role of glial cells may be dual. On one hand they became activated and phagocytose degenerating terminals (Bechmann and Nitsch, 1997). On the other hand, the glial response is particularly vital for reestablishing a proper microenvironment for the replacement of the inputs (Aldskogius et al., 1999). In this sense, a differential glial response to injury might be a relevant factor influencing terminal retraction as well as re-apposition after regeneration (Engel and Kreutzberg, 1988). In mice, a degree of difference in astrocytic response to a peripheral axotomy has been described between C57BL/6J and 129/SvJ. Interestingly, the latter is a poor responder to many autoimmune disease protocols whereas C57BL/6J is generally susceptible (Lidman et al., 2002).

\* Corresponding author. Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Fax: +55 19 3788 6101.

E-mail address: [alroli@unicamp.br](mailto:alroli@unicamp.br) (A.L.R. de Oliveira).

The present study was carried out in order to better understand the role of astrocyte response after injury and the possible relationship between glial responsiveness and the number of pre-synaptic terminals and synaptogenesis. In this way, a main difference in GFAP (glial fibrillary acidic protein) expression *in vivo* and *in vitro* between C57BL/6J and A/J mice was described. Such a difference resulted in greater synaptic elimination in the spinal cord after ipsilateral transection of the sciatic nerve. Also, cortical neurons cultured over C57BL/6J astrocytes generated a statistically greater number of synapses in comparison with A/J. The present results demonstrate that astrocyte reactivity directly influences synaptogenesis as well as the number of pre-synaptic terminals.

## 2. Results

### 2.1. Differential astrocytic reaction in C57BL/6J and A/J mice

Immunoreactivity to GFAP and ezrin was used *in vivo* and *in vitro* in order to analyze the degree of glial reactivity in C57BL/6J and A/J mice (Figs. 1 and 2). *In vivo* immunostaining revealed the same basal expression of GFAP and ezrin in both isogenic strains. However, 1 week after ipsilateral sciatic nerve transection, the degree of reactive astrogliosis

was higher in A/J mice than in C57BL/6J. This was particularly evident in the area surrounding the axotomized motoneurons (Figs. 1A and C; Figs. 2A and C). In order to reinforce the morphological observations, quantification of the labeling was performed in a series of sections from each strain. For this purpose every image was obtained under the same standardized confocal settings. The ratio between the ipsi/contralateral measurements was calculated, revealing a four-fold increase in GFAP protein expression in A/J and a two-fold increase in C57BL/6J (A/J,  $3.88 \pm 0.08$  mean  $\pm$  SEM; C57BL/6J,  $2.36 \pm 0.02$ ). This difference was statistically significant at  $P < 0.001$  (Student's *t* test), demonstrating a differential GFAP up-regulation after axotomy between the studied mice strains (Fig. 1E). Similar results were obtained for ezrin labeling, demonstrating a stronger up-regulation in A/J mice in comparison to C57BL/6J (A/J,  $3.77 \pm 0.28$  mean  $\pm$  SEM; C57BL/6J,  $2.70 \pm 0.46$ ; Fig. 2E).

The astroglial reactivity was also investigated *in vitro* with primary cultures of both A/J and C57BL/6J cells, which were maintained under the same experimental conditions. In order to make sure that cell survival and number were similar in both strains, DAPI staining of nuclear DNA was employed to analyze the number of viable astrocytes in both cultures (Figs. 3A and B). As seen in Fig. 3C, there was no statistical difference between the strains, regarding cell number.

The comparison of glial reactivity in both strains was performed by immunostaining with anti-GFAP and anti-ezrin

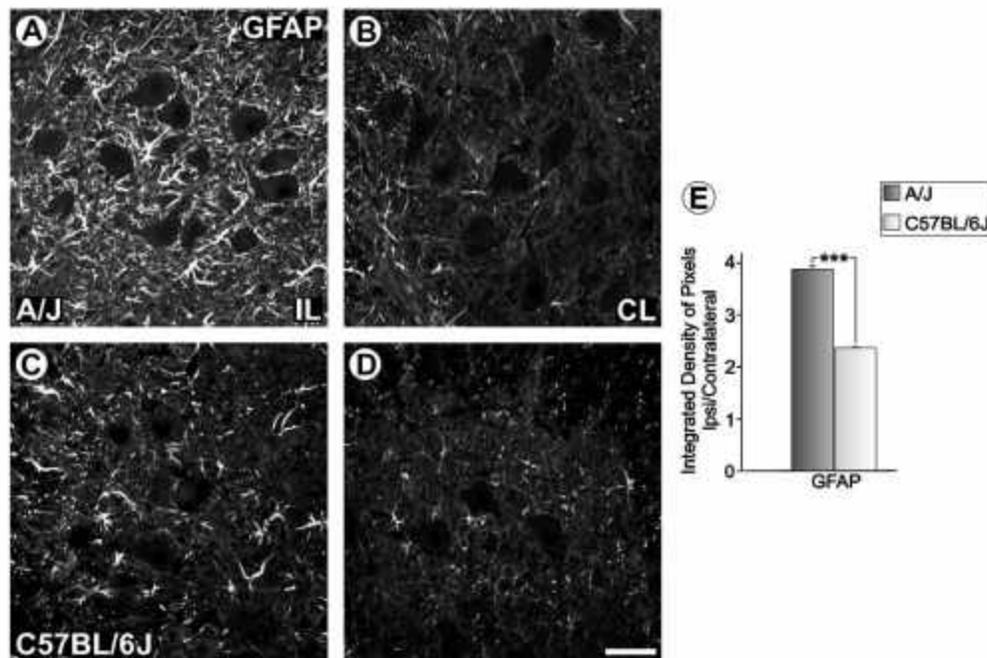


Fig. 1 - The *in vivo* expression of GFAP in astrocytes of the spinal cord from A/J and C57BL/6J mice. (A and C) Ipsilateral (IL, injured) side of the spinal cord 1 week after sciatic nerve transection; (B and D) Contralateral (CL, non-injured) side. The labeling of A/J astrocytes is especially intense in the surroundings of the axotomized motoneurons. The graph in panel E represents the quantification of GFAP staining ( $P < 0.001$ ). Scale bar = 50  $\mu$ m.

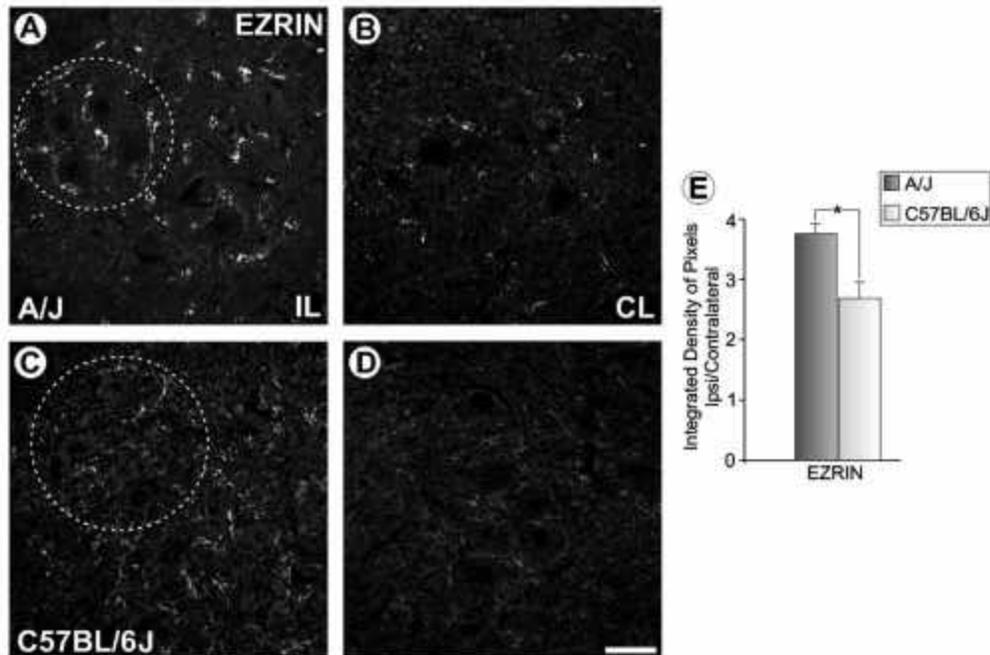


Fig. 2 - The in vivo expression of ezrin in anterior horn of the spinal cord from A/J and C57BL/6J mice. (A and C) Ipsilateral (IL, injured) side of the spinal cord 1 week after sciatic nerve transection; (B and D) Contralateral (CL, non-injured) side. Note that the ezrin labeling in A/J sciatic nucleus (dashed circles) is more intense. (E) The graph in panel E represents the quantification of ezrin staining ( $P < 0.05$ ). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

antibodies (Figs. 3D, E, G and H). In accordance with the in vivo observations, astrocytes from A/J mice revealed a greater expression of GFAP. This was combined with the formation of complex intermingled cellular processes, creating an intricate network, which was not as evident in the C57BL/6J cultures (Figs. 3D and E). The quantitative analysis was consistent with the morphological data, revealing a 150% greater immunolabeling in the A/J cultures, which was statistically significant at a  $P < 0.001$  (A/J,  $22.60 \pm 1.63$  mean  $\pm$  SEM; C57BL/6J,  $13.22 \pm 1.80$ ;  $P < 0.001$ , Student's *t* test; Fig. 3F).

The labeling of ezrin immunoreactivity also displayed a substantial difference between strains (Figs. 3G and H). Similarly to the GFAP labeling, the A/J mice astrocytes presented greater levels of ezrin staining, which were statistically significant compared to C57BL/6J (A/J,  $18.47 \pm 1.31$  mean  $\pm$  SEM; C57BL/6J,  $13.95 \pm 1.16$ ; Student's *t* test,  $P < 0.05$ ; Fig. 3I).

## 2.2. Impact of the glial reaction on synaptic elimination and synaptogenesis

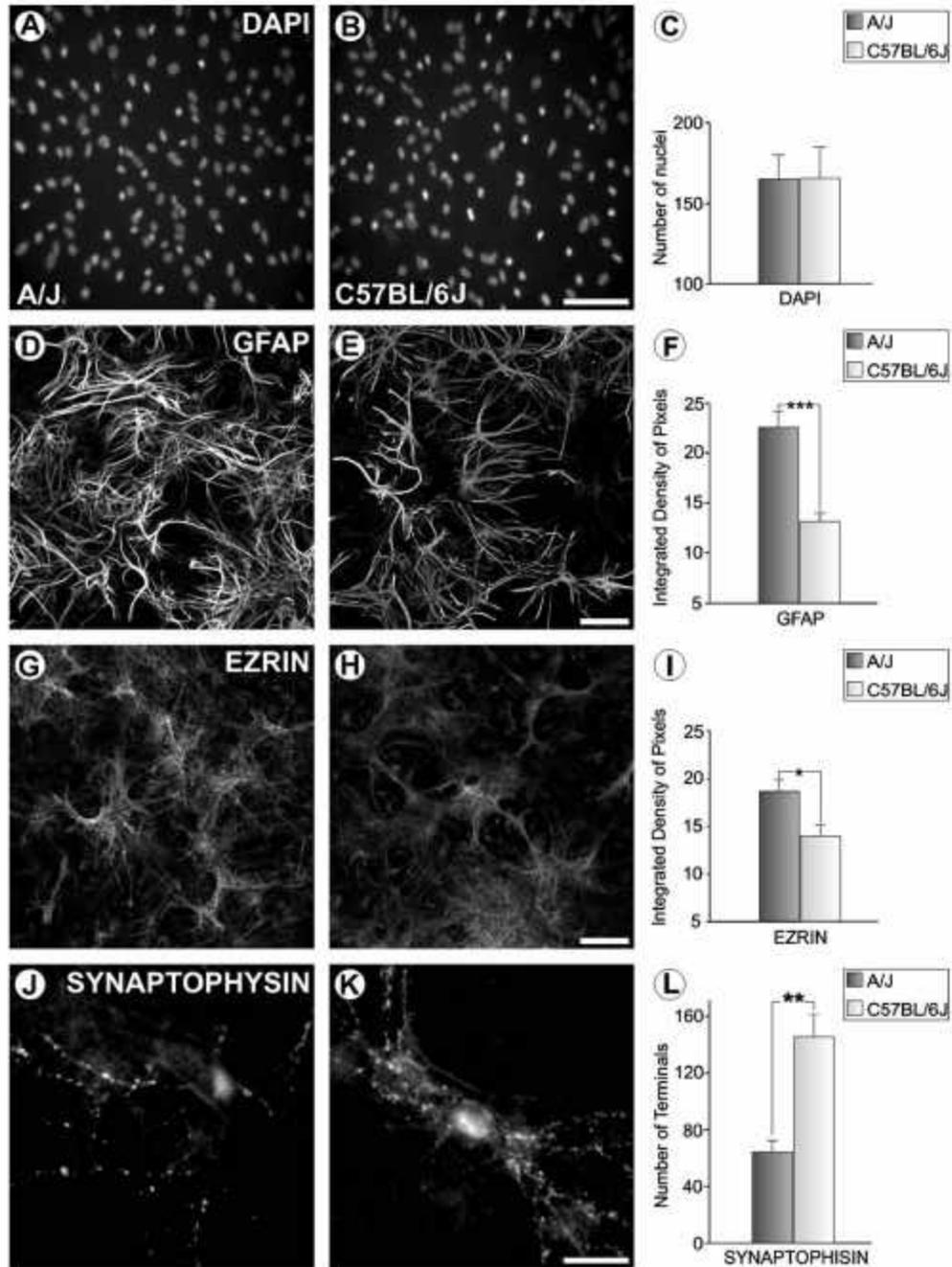
In order to assess the relationship between astrocyte reactivity and the synaptic elimination process after peripheral axotomy, quantitative measurements of the immunoreactivity of the synaptic protein synaptophysin were performed in the spinal cord motor nuclei of A/J and C57BL/6J mice. The

immunolabeling found in the contralateral motor area was compared with that of the ipsilateral ventral horn. Only large motoneurons present in the dorsolateral nucleus containing motoneurons supplying the distal hind limb muscles were considered for analysis. As seen in Figs. 4A and C, the levels of synaptophysin after axotomy of the sciatic nerve decreased in both the A/J and C57BL/6J mice. However, there was a consistent decrease in the staining, particularly located adjacent to the cell surface of large motoneurons within the sciatic nerve pool. Interestingly, the decrease in labeling in this area, which contains a large number of inputs apposed to the alpha motoneurons, was augmented in the A/J specimens. Although, no distinction of the nature of the inputs was possible, since every active pre-synaptic terminal was labeled by the synaptophysin antibody, an estimate of the covering based on the degree of staining was performed in a standardized manner, similar to Oliveira et al. (2004). This method revealed a statistically significant decrease in the covering of injured A/J neurons when compared to those of C57BL/6J. The results are presented in Fig. 4F and show a 20% decrease in labeling in A/J mice (A/J,  $0.48 \pm 0.06$  mean  $\pm$  SEM; C57BL/6J,  $0.72 \pm 0.05$ ; Mann-Whitney *U* test,  $P < 0.05$ ).

The co-cultures of spinal neurons and cortical astrocytes revealed that synaptogenesis was indeed influenced by the glial reactivity. This was assessed by counting the synaptophysin-positive terminals, 10 days after co-culturing.

As shown in Figs. 3J to L, the neurons co-cultured on the more reactive A/J astrocytes were able to establish a small number of synaptic contacts. In contrast, neurons from the same source,

if co-cultured on the less reactive C57BL/6J derived astrocytes, formed a significantly greater number of connections. This is depicted in Fig. 3L, which reveals a difference of about 200% in



the neuronal ability to form new synapses, depending on the reactivity of the glial substrate (A/J,  $64.08 \pm 8.27$  mean  $\pm$  SEM; C57BL/6J,  $145.61 \pm 15.72$ ; Mann-Whitney U test,  $P < 0.01$ ).

### 3. Discussion

Glial reactivity has been described as a particularly important factor in the outcome of an injury to the nervous system. In this sense, the plasticity process that follows lesion is directly influenced by the glial response (Aldskogius et al., 1999). This is mostly due to the close neuronal/glia relationship in the nervous tissue. With respect to this, astrocytes have a direct influence on the stabilization and maintenance of synaptic contacts, providing a proper microenvironment surrounding the active synapses (Araque and Pera, 2004; Shao and McCarthy, 1994; Walz, 1989), limiting the diffusion of different ions and neurotransmitters and modulating neuronal excitability (Castonguay et al., 2001; Walz, 1989).

The transection of a peripheral nerve, such as the sciatic nerve, is a well-known experimental model for inducing reactivity of neuronal and glial cells in the nervous system (Lundberg et al., 2001). Amongst other effects, distal axotomy elicits astroglial activation as well as pre-synaptic retraction from injured motoneuron cell bodies and dendrites (Brännström and Kellerth, 1998; Aldskogius et al., 1999). These events have been related in the early response to injury and are influenced by a shift in the physiological state of the alpha motoneurons, which change from a transmitting to a survival and regeneration state (Piehl et al., 1998). So far, the role of reactive gliosis has been interpreted as dual, since local inflammation, to a certain degree, is thought to be beneficial to the neurons, providing a local source of trophic factors (Baba, 1998; Dong and Benveniste, 2001; Ribotta and Privat, 2001). Conversely, reactive glia may hinder the re wiring of lost connections and serve as scar tissue, blocking axonal growth (Reier et al., 1989; Fawcett and Asher, 1999).

In the present study, it was shown that the glial reaction may vary amongst mice strains, reinforcing the data from the literature (Lidman et al., 2002). Additionally, the present results provide evidence that the astrocytic reaction after injury, directly affects the ratio of input elimination in the spinal cord. In this sense, A/J mice, which displayed more robust astrocyte response to the nerve transection, showed a statistically significant decrease in synaptophysin staining when compared to C57BL/6J mice. In vitro experiments were in agreement with the in vivo results, and showed that A/J astrocytes produced tighter cell projection networks that were more intensely stained with GFAP antibody in comparison to C57BL/6J derived cells.

Another finding was that A/J derived astrocytes expressed increased levels of ezrin, which is one of three ERM (ezrin, radixin, and moesin) proteins (Louvet-Vallée, 2000) found in the thinnest astrocytic processes (Derouiche and Frotsher, 2001). Such cell lamellar processes are of pivotal importance during the synaptic elimination process. By electron microscopy, they have been shown to intermingle between the retracted pre-synaptic terminal and the post-synaptic membrane (Derouiche and Frotsher, 2001). This particular finding is in line with the observation that in the A/J spinal cord there is a more intense retraction of synapses from the injured neuron cell bodies.

In order to show the correlation between a more reactive glia and synaptic formation/elimination, co-cultures of embryonic rat neurons and astrocytes from A/J and C57BL/6J mice were performed. Such experimental design was used in order to evaluate the response of neurons from a single source to the glial reaction from both mice strains. In vitro synaptogenesis was monitored by synaptophysin immunostaining and revealed a greatly reduced number of synaptic contacts between neurons cultivated on A/J derived astrocytes. On the other hand, the synaptic input formation was greater when neurons were cultured on the less reactive astrocytes from C57BL/6J. Although it cannot be ruled out the possibility that different results may have been seen, if strain-matched neuron/astrocyte cultures were used, the present data reinforce the function of reactive gliosis in synaptic plasticity events.

### 4. Experimental procedures

#### 4.1. In vivo experiments

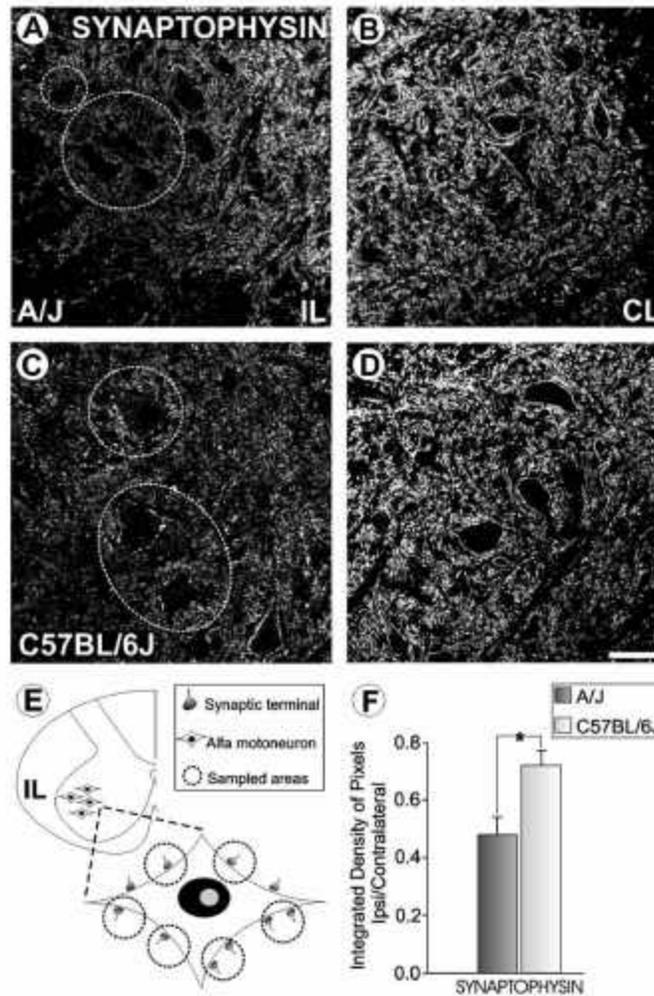
##### 4.1.1. Animals

Adult male C57BL/6J and A/J mice ( $n = 5$  for each strain), 6–8 weeks old ( $\sim 25.0$  g of body weight), were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB/Unicamp) and were housed under a 12-h light/dark cycle with free access to food and water. The Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation approved the study (CEEA/IB/Unicamp, proc. 793-1) and the experiments were carried out in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

##### 4.1.2. Surgical procedures and tissue preparation

The mice were anesthetized with a mixture of Kensol (xylasin, Köning, 10 mg/kg) and Vetaset (Cetamin, Fort Dodge, 50 mg/kg; 1:1, 0.12 ml/25 g, i.p.) and subjected to left sciatic nerve transection at the obturator tendon level. A

**Fig. 3 – (A and B) DAPI staining showing the number of cell nuclei in A/J and C57BL/6J primary cultures, (C) Graph demonstrating no statistical difference between the number of nuclei in A/J and C57BL/6J cultures. (D and E) GFAP immunolabeling showing the increased reactivity in A/J derived cells. The graph in panel F represents the quantitative data obtained by measuring the GFAP staining ( $P < 0.001$ ). (G and H) The ezrin immunolabeling is more intense in A/J derived astrocytes. (I) Quantitative data related to ezrin labeling ( $P < 0.05$ ). (J and K) Synaptophysin labeling depicting the synaptic contacts between cultured neurons. Observe the smaller amount of synaptic terminals between neurons cultured on the more reactive A/J derived astrocytes. The graph in panel L shows the number of synaptophysin positive profiles in a fixed area of  $5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0.01$ ). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .**



**Fig. 4** - The in vivo expression of synaptophysin in the anterior horn of the spinal cord from A/J and C57BL/6J mice. (A and C) Ipsilateral (IP, injured) side of the spinal cord 1 week after transection of the sciatic nerve; (B and D) Contralateral (CL, non-injured) side. Observe the decrease in labeling especially in the surroundings of the axotomized motoneurons (dashed circles), indicating a decrease in synaptic covering at the surface of these cells. (E) Schematic drawing of the ipsilateral sciatic nerve pool in anterior horn of the spinal cord. One alpha-motoneuron is shown in detail together with pre-synaptic terminals. Six areas (dashed circles) were obtained from the surface of each motoneuron in the pool for the measurements of the integrated density of pixels (synaptophysin labeling). The graph (F) indicates that the decrease in synaptic covering is enhanced in A/J mice ( $P < 0.05$ ). Scale bar = 50  $\mu$ m.

2-mm-long segment of the distal stump was removed to avoid regeneration. The muscle and skin were sutured and the animals allowed to survive for another week. All the mice were then sacrificed with an overdose of anesthetic and subjected to transcardial perfusion with 0.1 M PBS (20 ml, pH 7.4) and fixed with 10% formaldehyde in PBS for immunohistochemistry. The spinal cords were dissected out and frozen.

#### 4.1.3. Immunohistochemistry

The lumbar spinal cords were frozen in liquid nitrogen at  $-40^{\circ}\text{C}$  for cryostat sectioning (12  $\mu$ m). Primary rabbit anti-synaptophysin (1:200, Dako), goat anti-GFAP (1:100, Santa Cruz) and goat anti-ezrin (1:200, Santa Cruz) were used, diluted in a solution containing BSA and Triton x-100 in 0.01 M PBS. The sections were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in a moist chamber. After rinsing in 0.01 M PBS, the sections

were incubated with a Cy3 or Cy2-conjugated secondary anti-sera (1:250, Jackson Immunoresearch) for 45 min in a humid chamber at room temperature. The sections were then rinsed in PBS, mounted in a mixture of glycerol/PBS (3:1), and observed with a laser scanning confocal microscope (Bio-Rad). For quantitative measurements, ten representative images of the each side of the ventral horn were captured at a final magnification of  $\times 400$ . Quantification was performed using the enhance contrast and density slicing feature of IMAGEJ software (version 1.33u, National Institutes of Health, USA). The integrated density in pixels was measured in six areas of the lateral motor nucleus from each side (injured and uninjured sides, Fig. 4E). The injured/uninjured ratio of the integrated density in pixels was calculated for each section and then as the mean value for each spinal cord. The data is represented as the mean  $\pm$  standard error (SE).

#### 4.2. In vitro experiments

##### 4.2.1. Cell cultures

Primary cultures of astrocytes were prepared from the cerebral cortices of 1 to 2 day-old C57BL/6J and A/J mice, according to the method used by McCarthy and de Vellis (1980). The animals were obtained from CEMIB/Unicamp. Briefly, cortical hemispheres from neonatal mice were dissected out and, after removal of the meninges and blood vessels, were chopped and incubated in 0.05% trypsin (in phosphate buffered saline) for 4 min. DNase was added to the predigested tissue. The resulting cell suspension was subjected to a 10 min centrifugation (1300 rpm) in bovine serum albumin (BSA) 4% in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). The cell precipitate was re-suspended in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Nutricell), penicillin and streptomycin (1  $\mu$ l/ml, Nutricell), nerve growth factor (NGF, 0.25  $\mu$ l/ml, Sigma), glucose (16  $\mu$ l/ml, Nutricell), insulin (1  $\mu$ l/ml, Sigma) and seeded in cell culture flasks (25 cm<sup>2</sup>). The resulting astrocyte primary cultures were kept in an incubator at 37 °C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 1 week. Upon confluence, the flasks were shaken for 15 min on a rotatory shaker in order to further remove the loosely adherent cells (mainly neurons, and other glial cells). After shaking, the cultures were rinsed in PBS, detached and subcultured in 24-well cell culture plates. For the co-cultures, purified spinal cord neurons from embryos of Sprague–Dawley rats (E15) were plated on the confluent layer of astrocytes and maintained for 10 days. After this period, the cultures were fixed and processed for immunohistochemistry.

##### 4.2.2. Immunocytochemistry

The cultures were fixed with 4% paraformaldehyde in DMEM, rinsed several times in PBS and incubated for 2 h with rabbit anti-synaptophysin (1:200, Dako), goat anti-GFAP (1:100, Santa Cruz) and rat anti-ezrin (1:200, Santa Cruz) antibodies. After incubating with the primary anti-sera, the cultures were rinsed in PBS and incubated for 45 min with Cy3-conjugated secondary anti-sera (1:250, Jackson immunoresearch). Cells were then mounted in a mixture of glycerol/PBS (3:1) and the morphological analysis as well as the quantification method was the same used in the in vivo study for GFAP and ezrin staining. The immunolabeling was observed and documented with an inverted fluorescence microscope (ZEISS-AXIOVERT-

S100) connected to a confocal system (BioRad). The images were analyzed with the IMAGE TOOL software (version 3.0, National Institutes of Health, USA). Synaptophysin staining quantification was performed by the evaluation of the number of positive profiles in a fixed area of  $5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ .

In order to evaluate the number of astrocytes in the cultures from A/J and C57BL/6J mice, cells were stained (4 wells from each strain) with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.2  $\mu$ g/ml, Sigma) and the number of nuclei was counted in ten representative areas of each well.

##### 4.2.3. Statistical analysis

The data were analyzed using a two-tailed Student *t* test for parametric data or with a two-tailed Mann–Whitney *U* test for non-parametric data at  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.001$  (\*\*) and  $P < 0.001$  (\*\*).

#### Acknowledgments

This work received a grant from FAPESP (proc. 03/08969-9). R.G. Zanon and A. Emirandetti were supported by PhD scholarships from CAPES and CNPq/Brazil.

#### REFERENCES

- Aldskogius, H., Liu, L., Svensson, M., 1999. Glial responses to synaptic damage and plasticity. *J. Neurosci. Res.* 58, 33–41.
- Araque, A., Pera, G., 2004. Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia* 47, 241–248.
- Baba, A., 1998. Role of endothelin B receptor signals in reactive astrocytes. *Life Sci.* 67, 1711–1715.
- Bechmann, I., Nitsch, R., 1997. Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion—A light, confocal and electron microscopic study using a phagocytosis dependent labeling technique. *Glia* 20, 145–154.
- Brännström, T., Kellerth, J., 1998. Changes in synaptology of adult cat spinal  $\alpha$ -motoneurons after axotomy. *Exp. Brain Res.* 118, 1–13.
- Castonguay, A., Lèvesque, S., Robitaille, R., 2001. Glial cells as active partners in synaptic functions. *Prog. Brain Res.* 132, 227–240.
- Derouiche, A., Frotsher, M., 2001. Peripheral astrocyte processes: monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. *Glia* 36, 330–341.
- Derouiche, A., Anlauf, E., Aumann, G., Mühlstädt, B., Lavialle, M., 2002. Anatomical aspects of glia–synapse interaction: the perisynaptic glial sheath consists of specialized astrocyte compartment. *J. Physiol.* 96, 177–182.
- Dong, Y., Benveniste, E.M., 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180–190.
- Engel, A.K., Kreutzberg, G.W., 1988. Neuronal surface changes in the dorsal vagal motor nucleus of the guinea pig in response to axotomy. *J. Comp. Neurol.* 275 (2), 181–200.
- Fawcett, J.W., Asher, R.A., 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* 46 (6), 377–391.
- Lidman, O., Fraidakis, M., Lycke, N., Olson, L., Olsson, T., Piehl, F., 2002. Facial nerve lesion response; strain differences but no involvement of IFN- $\gamma$ . STAT4 or STAT6. *NeuroReport* 13 (13), 1589–1593.
- Lindá, H., Piehl, F., Dägerlind, A., Verge, V.M., Arvidsson, U., Cullheim, S., Risling, M., Ufnake, B., Hökfelt, T., 1992. Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal

- cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons. *Exp. Brain Res.* 91, 284–295.
- Louvet-Vallée, S., 2000. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol. Cell* 92, 305–316.
- Lundberg, C., Lidman, O., Holmdahl, R., Olsson, T., Piehl, F., 2001. Neurodegeneration and glial activation patterns after mechanical nerve injury are differentially regulated by MHC genes in congenic inbred rat strains. *J. Comp. Neurol.* 431, 75–87.
- McCarthy, K.D., De Vellis, J., 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85 (3), 890–902.
- Oliveira, ALR., Thams, S., Lidman, O., Piehl, F., Hökfelt, T., Kärre, K., Linda, H., Cullheim, S., 2004. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (51), 17843–17848.
- Piehl, F., Hammarberg, H., Hökfelt, T., Cullheim, S., 1998. Regulatory effects of trophic factors on expression and distribution of CGRP and GAP-43 in rat motoneurons. *J. Neurosci. Res.* 51, 1–14.
- Reier, P.J., Eng, L.F., Jakeman, L., 1989. Reactive astrocyte and axonal outgrowth in the injured CNS: is gliosis really an impediment to regeneration? *Neural Reg. Transpl.* 6, 183–209.
- Ribotta, M.G., Privat, V.M., 2001. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. *Prog. Brain Res.* 132, 587–610.
- Shao, Y., McCarthy, K.D., 1994. Plasticity of astrocytes. *Glia* 11 (2), 147–155.
- Walz, W., 1989. Role of cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog. Neurobiol.* 33, 309–333.