

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MARIO JOSÉ JORGE SABHA JÚNIOR

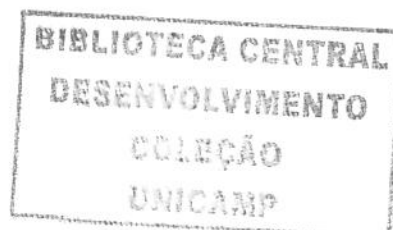
**“EXPRESSÃO DO MHC CLASSE I E SUA INFLUÊNCIA SOBRE AS
ALTERAÇÕES SINAPTOLÓGICAS EM CAMUNDONGOS DE
DIFERENTES LINHAGENS ISOGÊNICAS, 1 E 3 SEMANAS APÓS A
TRANSECÇÃO DO NERVO CIÁTICO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Mario José Jorge Sabha Jr.
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Campinas - 2007



UNIDADE BC
 Nº CHAMADA: T/ UNICAMP
Sa 135e
 V. _____ Ed. _____
 TOMBO BC/ 71962
 PROC. 16-145-07
 C ☐ D ☒
 PREÇO 11.00
 DATA 3.4.07
 BIB-ID 406340

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Sa13e

Sabha Júnior, Mário José Jorge

Expressão do MHC Classe I e sua influência sobre as alterações sinaptológicas em camundongos de diferentes linhagens isogênicas, 1 e 3 semanas após a transecção do nervo ciático / Mário José Jorge Sabha Júnior. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
 Tese (doutorado) -- Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1.Histocompatibilidade. 2.Sinapse. 3.Sistema nervoso. 4. Sistema nervoso central. I. Sabha Júnior, Mário José Jorge. II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Amr/ib

Título em inglês: Expression of MHC Class I influences synaptological changes in different isogenic mice strains, 1 and 3 weeks after sciatic nerve transection.

Palavras-chave em inglês: Major histocompatibility complex, Motoneurons, Beta 2 – microglobulin, Synapses, MHC Class 1, Nervous System, Central Nervous System

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Silvia Lacchini, Leonilda Barbosa dos Santos, Selma Candelária Genari, Amaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Data da defesa: 19/10/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 19 de Janeiro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

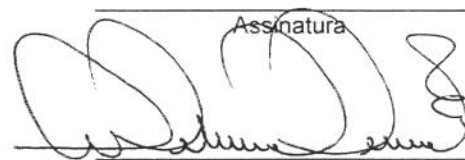
Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira (Orientador)


Assinatura

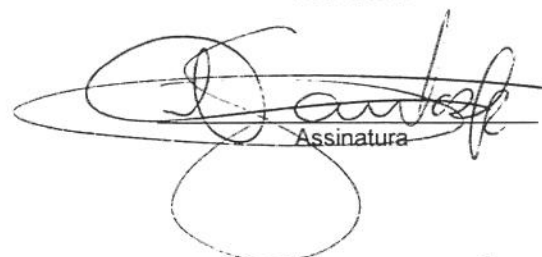
Profa. Dra. Sílvia Lacchini


Assinatura

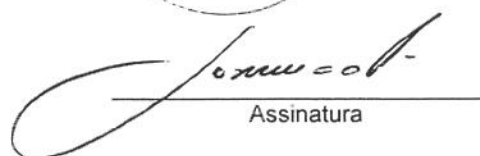
Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos


Assinatura

Profa. Dra. Selma Candelária Genari


Assinatura

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior


Assinatura

Prof. Dr. José Meciano Filho


Assinatura

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello


Assinatura

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

200714623

DEDICATÓRIA

“Aos queridos pais, a quem chamo de verdadeiros amigos, pois através deles surgiu minha oportunidade de crescer e amadurecer diante das diversas experiências que passei. Agradeço por terem me dado a vida e por terem me criado com tanto amor, dedicação e atenção”.

AGRADECIMENTOS

- Ao brilhante Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, a quem pacientemente me orientou e coordenou nos passos deste trabalho, para que a realização desta tese fosse possível. Sempre me estimulando ao conhecimento e atualização de todas as formas possíveis, me despertando também ao crescimento não apenas como seu aluno, mas também como indivíduo. Por isso tornou-se um grande amigo e meu ídolo científico.
- À Profa. Dra. Sílvia Lachini, Profa. Dra. Leonilda Barbosa dos Santos, Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello, pela contribuição atenciosa e sugestões durante a finalização da tese, além delas, agradeço também à Profa. Dra. Selma Candelária Genari e Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari.
- Ao Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior, Prof. Dr. José Meciano Filho e Profa. Dra. Leonilda Barbosa dos Santos, professores que avaliaram meu projeto de qualificação com suas valiosas observações, as quais me foram de grande utilidade.
- Aos técnicos do laboratório de Anatomia do IB, UNICAMP, Norivaldo Celestino e Marco Aurélio R. de Paula, que sempre nos auxiliaram com boa vontade e presteza, cedendo sua atenção e conhecimento sempre que necessário.
- Ao Biotério Central da UNICAMP (CEMIB), de onde vieram os animais que participaram desta tese, e também à vida de cada um dos animais envolvidos nos experimentos.

- À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento deste projeto, desde o início, permitindo a viabilidade do laboratório de regeneração nervosa e dos experimentos realizados.
- A todos os alunos do laboratório de Anatomia do IB, UNICAMP, em especial àqueles do laboratório de regeneração nervosa do Prof. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira: Amanda Emirandetti, Amauri Peirucci, Aninha e Jéssica, Karina Brito Marques, Renata Zannon, que tanto me ensinaram no convívio diário, sempre com boas atitudes de coleguismo e respeito mútuo.
- Aos meus pais Mário José Jorge Sabha e Dirce Bondesan Sabha que sempre me apoiaram e ainda continuam a me incentivar na busca dos caminhos que eu escolho, independente de entenderem ou não os rumos, hora tranquilos, hora conturbados que experiencio, seja na vida pessoal ou na profissional. Muito obrigado meus pais, amo vocês!
- À minha irmã, professora e amigona Profa. Dra. Maricene Sabha, quem sempre me estimulou ao estudo nas diversas fases da minha vida, desde muito pequeno, adolescente (lembra Cene?), até a vida adulta. Essa irmã me ajuda em todas as “paradas”. Cene, te amo viu?
- Aos melhores e preferidos tios, tio Décio e tia Jú (Julieta), que também são exemplos de perseverança, superação e amizade. Obrigado por poder usufruir de sua companhia e dos momentos de descanso na casa de praia. Por falar nisso, estou precisando dela para as próximas férias (ah,ah,ah...).
- Aos divertidos primos Maurício, Marcos e Sílvia que não encontro sempre, mas estão no meu coração, e em meus pensamentos, por tudo o que

passamos e pela alegria que sinto quando conseguimos nos ver. Um abraço especial pro César e pras lindas sobrinhas Marcela e Gabriela.

- À nossa segunda família, da tia Maurien, que ano após ano, até hoje nos proporcionam momentos de felicidade e união. Beijos e abraços pra Pare, Bel, Paulo Hass, Nanda e Dú, Vó Maria, Melissa, Júnior, Luana e irmãzinha; Marjorie e Batata; Raul e Lílian; Marião e namorada; Matheus e Dani; Lucas e Diogo. Bem, devo ter esquecido alguém, mas enfim, obrigado a todos vocês pelo carinho e sincera amizade.
- Não poderia deixar de agradecer à família do professor Alexandre, pois sua esposa Célia e o filhão Felipe me receberam com todo seu carinho e atenção, sempre que precisei interromper o sossego do lar, em finais de semana, domingos e feriados. Ainda por cima sem horário definido. O pior de tudo é que não foram só 1 ou 2 vezes (Risos !!!). Obrigado a vocês pela compreensão, e um grande abraço.
- Aos grandes amigos e irmãos de coração, Wanderlei M. Trindade e Roberta Reis Trindade, que estão grávidos esperando minha sobrinha querida Ana Beatriz. Quero vocês por perto em mais esta importante conquista. Adoro vocês, meus irmãos...
- Ao amigo de infância Rodrigo Davis, que nem sempre vejo, mas que está sempre presente em meus pensamentos. Rodrigão, valeu por ser sempre um exemplo de humildade e autenticidade. Você é o irmão que eu não tive, um abraço com muito carinho...

- À minha melhor amiga e namorada Márcia Helena Marangoni, quem muito me auxiliou em várias das difíceis passagens da minha vida, me fazendo lembrar, com seu amor, carinho e atenção, que as experiências passadas também têm seu valor para nos transformar em quem somos hoje. Marcinha, te amo muito, obrigado por sua companhia e pelo seu amor, baby. Beijão especial pro Odair e pra dona Neuzinha.
- Aos alunos dos cursos de Educação Física e Fisioterapia da UNIPINHAL, que me ensinam cada vez mais a ser professor e a gostar de lecionar, testando principalmente minha firmeza, paciência, por vezes desafiando meu bom humor e motivação.
- A todos os profissionais da hidroterapia da Academia Catarina, que trabalham comigo diariamente, contribuindo para a reabilitação dos pacientes que recebemos. Trabalho em equipe, que é sempre agradável com esta boa companhia.
- A todos os pacientes (ortopédicos e neurológicos) da hidroterapia, que sempre confiam em meus conhecimentos e dispõem de tempo e muitas vezes de paciência, para o sucesso de sua reabilitação física.
- Aos pacientes do consultório de terapia metafísica, fisioterapia e acupuntura, seja no aconselhamento individual ou em grupo (em nossos cursos, palestras e vivências). Sou muito grato por confiarem a mim, os seus sofrimentos. Pra vocês, faço sempre o meu melhor possível, tentando promover a cura, ou auxiliar nos processos físicos e/ou psico-emocionais.

- Aos mestres do auto-conhecimento que estão sempre presentes, tanto nesses momentos de vitória, como também nos momentos de aconselhamento espiritual e auto-conhecimento, nos quais preciso me interiorizar, concentrando toda a minha força interna para transcender as dificuldades. Obrigado aos mestres Pai Tomás, Elisabeth, Pagé Torú, mestre Jing Lou, Astor, Irineu, Manolo e a todos os outros amigos que nos auxiliam indiretamente no processo do entendimento da vida, em casa, no consultório e na vida pessoal.
- A todos os colegas e professores do curso de aconselhamento metafísico trans-energético, dos quais sempre me lembro saudosamente, em especial dos professores: Luíz Antônio Gasparetto, Lousanne Arnoldi de Lucca, Maria Aparecida Martins, Cleide Dalanese, Celso, Cristina, Lúcio e Cláudia. Obrigado por tê-los conhecido e passado momentos de aprendizado com tanto bom humor e respeito. Saibam que nunca esquecerei dos amigos da “Turma D” de aconselhamento metafísico e de vocês, professores.
- Ei, vocês aí, que foram citados acima. Estou esperando todos para a apresentação da minha tese de Doutorado, hein? Risos...
- Aos animais que tive e me ensinaram muito com seu amor e com sua vida. Apesar de vocês não estarem comigo, meu amor por vocês ainda é real e nosso convívio inesquecível. Sou grato por terem existido em minha vida, me ajudando a segurar “as barras” mais difíceis, principalmente a vocês, meu cão Rimsky e aos meus gatos Milla, Luna e Juki.

- Agradeço mais uma vez à minha vida, e que as forças divinas invisíveis, que nos sustentam e nos mantêm diariamente, continuem a nos guiar e orientar, fazendo com que a humanidade entenda os propósitos da evolução como ser humano, dispondo dos meios necessários para prosperar em todas as áreas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS	17
RESUMO	20
ABSTRACT	22
ESTRUTURA DA TESE	24
1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Os neurônios motores e suas sinapses	26
1.2. O complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e sua interação com o Sistema Nervoso e suas sinapses	27
1.3. Células gliais e a plasticidade sináptica	31
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Procedimentos cirúrgicos e preparação dos espécimens	40
3.2 Imunohistoquímica (IH)	41
3.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	42
3.3.1 Análise ultraestrutural da retração sináptica	42
3.4 Hibridização <i>in situ</i>	43
3.5 Análise estatística	45

4	RESULTADOS	47
4.1	Imunohistoquímica (IH)	48
4.1.1	Expressão de MHC I	48
4.1.2	Expressão de sinaptofisina	49
4.2	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	50
4.2.1	Cobertura sináptica total	51
4.2.2	Cobertura sináptica dos terminais F, S e C	51
4.2.3	Número de terminais sinápticos F, S e C	52
4.3	Hibridização <i>in situ</i>	54
4.3.1	Expressão de microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2$ -m)	54
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÕES	62
7.	FIGURAS E TABELAS	64
8.	ANEXO	84
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Fotomicrografia eletrônica identificando os terminais sinápticos (tipos S, C e F) em aposição e retração.....	65
Figura 2 – Fotomicrografias eletrônicas utilizadas na reconstrução de um motoneurônio alfa.....	66
Figura 3 – Expressão de mRNA da proteína GAP43, uma semana após a transecção do nervo ciático.....	67
Figura 4 – Imunomarcação para MHC classe I, uma semana após a transecção do nervo ciático.....	68
Figura 5 – Imunomarcação para MHC classe I, três semanas após a transecção do nervo ciático.....	69
Figura 6 – Gráfico da Imunomarcação para MHC classe I, uma e três semanas após a transecção do nervo ciático.....	70
Figura 7 – Gráfico da Imunomarcação para sinaptofisina, uma e três semanas após a transecção do nervo ciático.....	71
Figura 8 – Imunomarcação para sinaptofisina, uma semana após a transecção do nervo ciático.....	72
Figura 9 – Imunomarcação para sinaptofisina, três semanas após a transecção do nervo ciático.....	73
Figura 10 – Cobertura sináptica total, em animais não lesados, uma e três semana após transecção.....	74
Figura 11 – Cobertura sináptica dos terminais F, S e C de animais não lesados.....	75
Figura 12 – Cobertura sináptica de terminais F, S e C, 1 semana após a transecção do nervo ciático.....	76
Figura 13 – Cobertura sináptica de terminais F, S e C, 3 semanas após a transecção do nervo ciático.....	77
Figura 14 – Número de terminais sinápticos F, S e C/100µm de membrana de animais não lesados.....	78

Figura 15 – Número de terminais sinápticos F, S e C/100µm de membrana, 1 semana após a transecção do nervo ciático.....	79
Figura 16 – Número de terminais sinápticos F, S e C/100µm de membrana, 3 semanas após a transecção do nervo ciático.....	80
Figura 17 – Intervalos entre os terminais sinápticos, 3 semanas após a transecção do nervo ciático.....	81
Figura 18 – Expressão de microglobulina beta 2, uma semana após a transecção do nervo ciático.....	82
Figura 19 – Expressão de mRNA da proteína microglobulina beta 2, uma semana após a transecção do nervo ciático.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

β2-m	microglobulina beta 2
BSA	Albumina do Soro Bovino
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CY-2	cianina 2
CY-3	cianina 3
DAPI	4',6 – dihidro diamidino-2-fenilhidol
DMEM	meio de “Eagle” modificado
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNase	enzima que cataliza a clivagem de ácido desoxirribonucleico
ERM	proteínas da família ERM (ezrina-radixina-moesina)
ERMBMPs	moléculas que se ligam à proteínas da família ERM
ET_AR e ET_BR	receptores de endotelina
GABA	ácido gama-aminobutírico
GAP-43	proteína 43 associada ao crescimento
GFAP	proteína glial fibrilar acítica
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1
ICAM-2	molécula de adesão intercelular 2
IFN-γ	interferon gama

IH	Imunohistoquímica
KO	knock-out
MET	microscopia eletrônica de transmissão
mGluR3	receptor glutamatérgico metabotrópico do subtipo 3
mGluR5	receptor glutamatérgico metabotrópico do subtipo 5
MHC-I	complexo principal de histocompatibilidade - I
MHC-II	complexo principal de histocompatibilidade-II
NMDA	n-metil-d-aspartato
PB	tampão fosfato
PBS	salina tamponada
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
RNA_m	ácido ribonucléico mensageiro
³⁵S	isótopo 35 do enxofre
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SSC	salina de citrato de sódio
Syph	sinaptofisina
TC1S	uma semana após a transecção do nervo ciático
TC3S	três semanas após a transecção do nervo ciático
TCR	receptor da célula T
TdT	desoxinucleotidil transferase

TPBS

salina tamponada tris/ fosfato

TUNELterminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and
labeling

RESUMO

O estabelecimento das redes nervosas que compõem o Sistema Nervoso Central (SNC) é um processo imensamente complexo dependente, não somente da formação de novos pontos de comunicação, as sinapses, mas também da eliminação de sinapses supranumerárias ou incorretas durante o desenvolvimento. Recentemente, foi descrito um mecanismo demonstrando que a ausência da expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe I) no SNC, diminui a remoção de conexões sinápticas extranumerárias durante o desenvolvimento e aumenta a retração sináptica no animal adulto. Interessantemente, a transecção do axônio induz uma extensa retração dos terminais pré-sinápticos da superfície do corpo celular e dendritos dos neurônios axotomizados. No presente trabalho, investigamos as alterações sinaptológicas nos motoneurônios alfa da intumescência lombar em três linhagens de camundongos isogênicos (C57BL/6J, A/J e Balb/cJ), após 1 e 3 semanas da transecção do nervo ciático. Nesse sentido, estudamos a cobertura sináptica dos corpos celulares dos motoneurônios após a lesão. Foram utilizadas medulas espinhais de camundongos machos adultos, as quais foram processadas e analisadas para imunohistoquímica (IH) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para IH, foram utilizados anticorpos anti-MHC e anti-sinaptofisina conjugados com anticorpos secundários CY-2 ou CY-3 e analisados em microscópio confocal. Os resultados mostraram aumento significativo da expressão de MHC I na linhagem A/J, comparativamente à Balb/cJ e C57BL/6J, 1 semana após axotomia. Contudo, mostraram níveis similares de expressão desta molécula 3 semanas após axotomia. Adicionalmente, observamos uma diminuição significativa da expressão de sinaptofisina na linhagem A/J, após 1 semana da transecção do nervo ciático. Após 3 semanas da lesão nervosa, todas as linhagens, apresentaram níveis similares de expressão de sinaptofisina. Os resultados da MET, após 1 semana da transecção do nervo ciático, mostraram menor cobertura sináptica na linhagem A/J, comparada à Balb/cJ e C57BL/6J. Contudo, 3 semanas após a lesão a linhagem C57BL/6J apresentou menor cobertura sináptica, enquanto A/J e Balb/cJ recuperam suas aferências. Concluímos que a expressão de MHC I influencia o processo de eliminação sináptica e, possivelmente contribui para o potencial regenerativo dos neurônios axotomizados.

ABSTRACT

The wiring of the Central Nervous System (CNS) is an immensely complex process, not only dependent on new communication points, the synapses, but also on the elimination of exuberant or inappropriate synapses during development. Earlier studies have shown that the absence of class I major histocompatibility complex (class I MHC) in the CNS decreases synaptic elimination during CNS development and increases synaptic retraction in adult. Thus, an axon transection has been shown to induce an extensive detachment of presynaptic terminals from perikarya and dendrites of axotomized neurons. In the present work, we investigated synaptological changes in alpha motoneurons from lumbar intumescence in three mice isogenic strains (C57/BL6J, A/J and Balb/cJ), 1 and 3 weeks after sciatic nerve transection. For this purpose we studied ultrastructurally the synaptic covering of the cell soma of sciatic motoneurons after the lesion. Therefore, spinal cords from adult male mice were processed for transmission electron microscopy (TEM) and imunohistochemistry (IH). For IH, anti-MHC I and anti-synaptophysin antibodies were used, conjugated with CY2 or CY3 secondary antibodies and analyzed with a confocal microscope. The results showed a significant increased expression of MHC I in A/J strain in comparison to Balb/cJ and C57BL/6J, 1 week after axotomy. Nevertheless, the immunoreactivity levels of this molecule 3 weeks after axotomy did not differ among the studied mice strains. Additionally, a conspicuous decrease of synaptophysin expression in A/J mice was observed 1 week after sciatic transection. Similarly to the MHC I immunolabeling, 3 weeks after lesion, all mice strains showed similar levels of synaptophysin expression. The results from TEM 1 week after lesion showed a lower synaptic covering in A/J mice in comparison to Balb/cJ and C57BL/6J, although 3 weeks after axotomy C57BL/6J displayed a lower synaptic covering, while A/J and Balb/cJ strains recovered their afferents, We conclude that the level of MHC I expression influences the synaptic elimination process and possibly contributes to the regenerative potencial of the axotomized neurons.



ESTRUTURA DA TESE

O presente trabalho contém nove capítulos, descritos a seguir:

Capítulo 1 - Apresenta a introdução da tese;

Capítulo 2 - Contém os objetivos gerais e específicos da tese;

Capítulo 3 - Apresenta os materiais e métodos utilizados para a realização dos experimentos;

Capítulo 4 - Mostra os resultados obtidos;

Capítulo 5 - Discute os resultados, relacionando-os com os dados presentes na literatura;

Capítulo 6 - Apresenta as conclusões;

Capítulo 7 - Apresenta as figuras e tabelas;

Capítulo 8 - Apresenta, em anexo, um artigo científico (anexo1) publicado, na revista *Brain Research*.

Capítulo 9 - Apresenta as referências bibliográficas utilizadas;

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os neurônios motores e suas sinapses

O sistema nervoso pode ser funcionalmente dividido em sistema nervoso somático e visceral (ou autônomo). Estes dois sistemas apresentam neurônios motores (ou motoneurônios) enviando impulsos ao órgão-alvo. Os motoneurônios viscerais são neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo, cujos corpos se situam na substância cinzenta intermédio lateral da medula espinhal e se destinam à inervação de músculos lisos, cardíaco e glândulas. Os neurônios motores somáticos destinam-se à inervação dos músculos estriados esqueléticos e têm seu corpo localizado no corno anterior ou ventral da medula.

Os motoneurônios somáticos podem ser ainda classificados em alfa e gama. Os primeiros possuem um grande corpo celular e seu axônio tem dimensões superiores aos gama. Inervam as fibras musculares extra-fusais, enquanto os motoneurônios gama são menores e possuem axônios mais finos e inervam as fibras musculares intra-fusais, desempenhando importante papel de regulação do tônus muscular.

O microambiente medular e sua interação com os motoneurônios são cruciais para a sobrevivência dos mesmos, assim como para sua conectividade sináptica e funcional (Huh et al., 2000; Oliveira et al., 2001). Os motoneurônios alfa recebem, em seu corpo celular e dendritos, milhares de sinapses, classificadas em três grandes grupos: do tipo S, que possuem vesículas esféricas, contendo o aminoácido excitatório glutamato, assim como os do tipo M (aferência 1a-glutamatérgica), considerados também como esféricos (S); do tipo F, que possuem apenas vesículas achatadas (glicina) ou achatadas e esféricas (glicina e

GABA), sendo inibitórios; do tipo C, os quais são excitatórios e colinérgicos. Apenas os motoneurônios alfa possuem terminações do tipo C, sendo estas cruciais para sua correta identificação em nível ultraestrutural.

1.2 O complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e sua interação com o Sistema Nervoso e suas sinapses.

O estabelecimento das redes nervosas que compõem o Sistema Nervoso Central (SNC) é um processo imensamente complexo, não somente dependente da formação de novos pontos de comunicação, as sinapses, mas também, durante o desenvolvimento, da eliminação de sinapses supranumerárias ou incorretas. Os mecanismos por trás do processo de eliminação sináptica no SNC são virtualmente desconhecidos. Porém, recentemente, um mecanismo envolvendo a expressão, por parte dos neurônios, do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe I) foi proposto por Huh et al. (2000). Tal hipótese foi bastante surpreendente uma vez que, historicamente, os neurônios têm sido descritos como incapazes de expressar moléculas relacionadas à resposta imunológica, tais como MHC classe I e II sendo, dessa forma, considerados “imunoprivilegiados” (Lampson e Hickey, 1986; Ljunggren e Kärre, 1990; Joly et al., 1991; Mucke e Oldstone, 1992; Rall et al., 1994). Em contraposição a essa idéia, Huh et al. (2000) demonstraram que camundongos transgênicos, incapazes de expressar o MHC classe I, apresentavam uma falha no processo de segregação das aferências provenientes da retina para o corpo geniculado lateral, durante o desenvolvimento do sistema visual. Tal observação

levou à conclusão de que o sinal proveniente do MHC classe I, produzido tanto pelos neurônios quanto pela glia circunjacente, é de fundamental importância para a remoção de conexões sinápticas extranumerárias durante o desenvolvimento e, como mRNA para MHC classe I tem sido identificado em muitas populações neuronais, sugeriu-se que os próprios neurônios estejam envolvidos nessa sinalização. Estudos recentes têm reforçado esta hipótese, os quais envolvem a plasticidade sináptica e a capacidade regenerativa de camundongos “knockout” para uma subunidade do MHC classe I, a microglobulina beta 2, em comparação com camundongos controle (Oliveira et al., 2004).

As sinapses podem ser eliminadas ou retraídas do neurônio pós-sináptico, também no animal adulto. Assim, demonstrou-se que a transecção do axônio induz uma extensa retração dos terminais pré-sinápticos da superfície do corpo celular e dendritos dos neurônios axotomizados (Blinzinger e Kreutzberg, 1968; Sumner, 1975; Chen et al., 1977; Barron, 1983; Delgado-Garcia et al., 1988; Lindå et al., 1992; Aldskogius e Svensson, 1993; Tseng e Hu, 1996; Brännström e Kellerth, 1998; Lindå et al., 2000; Oliveira et al., 2004). Os mecanismos por trás do processo de retração sináptica permanecem desconhecidos, apesar de existirem evidências de que astrócitos reativos sejam peças fundamentais em tal evento (Conradi, 1969; Graeber e Kreutzberg, 1986; Engel e Kreutzberg, 1988; Brännström e Kellerth, 1998; Jarosinski e Massa, 2002).

Tendo-se em vista que os níveis de mRNA para MHC classe I e, em particular, microglobulina beta 2, aumentam consideravelmente em motoneurônios medulares após axotomia periférica, principalmente durante o período de retração sináptica, é possível que tal complexo esteja envolvido nesse fenômeno (Streit et

al., 1989; Maehlen et al., 1989; Lindå et al., 1998; Corriveau et al., 1998; Lidman et al., 1999; Lindå et al., 1999; Oliveira et al., 2004). Assim, testamos a hipótese de que a eliminação sináptica após uma axotomia seja, pelo menos em parte, dependente da presença do MHC classe I da mesma forma demonstrada por Huh et al. (2000). Em um estudo prévio, foi realizada a transecção do nervo ciático em camundongos “knock out” para a proteína microglobulina beta 2, os quais, de acordo com a hipótese sugerida por Huh et al. (2000), deveriam apresentar um grau menor de eliminação sináptica dos terminais em contato com os motoneurônios lesionados, em comparação aos animais controle. Uma semana após a lesão, os motoneurônios medulares foram identificados e os terminais sinápticos em contato com o corpo celular foram analisados em nível ultraestrutural, calculando-se assim a cobertura sináptica remanescente.

Com o emprego de técnicas ultraestruturais, foi possível classificar tais terminais de acordo com o tipo de aminoácido presente em suas vesículas. De forma interessante, os resultados obtidos no mesmo trabalho indicaram que os animais “knock out” apresentaram uma maior eliminação sináptica, principalmente de terminais inibitórios, em comparação com os animais controle, indicando que, em animais adultos e após uma lesão nervosa, o MHC classe I desempenha um papel fundamental na estabilização de certas sinapses, contribuindo para que o processo de retração ocorra de forma específica (Oliveira et al., 2004). Essas alterações podem ter implicações funcionais tais como aumento da porcentagem da morte neuronal e/ou diminuição do potencial regenerativo dos neurônios lesionados (Oliveira et al., 2004).

Estudos sobre a regeneração nervosa periférica em algumas linhagens de camundongos isogênicos neurologicamente normais são particularmente interessantes (Lu et al. 1990). Verificou-se que após o esmagamento do nervo fibular, o potencial regenerativo variava entre eles, sendo mais baixo nos animais da linhagem C57BL/6J. Estes dados foram confirmados por Da-Silva et al. (1991) e Lainetti et al. (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 et al. (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. Contudo, os resultados obtidos não permitiram confirmá-la. Subseqüentemente, os mesmos autores (Lu et al., 1994) propuseram que a deficiência regenerativa axonal da linhagem C57BL/6J poderia estar relacionada a fatores genéticos, associados principalmente aos neurônios sensitivos. 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. Ainda, através da utilização da técnica do TUNEL, capaz de detectar a fragmentação do DNA, demonstrou-se que uma grande porcentagem da morte neuronal ocorre por apoptose (Oliveira, 2001).

Ainda, outro estudo envolvendo 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 consequência 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 modelo interessante para o estudo da importância relativa dos componentes neurais, gliais e mesmo de elementos da matriz extracelular no processo da regeneração nervosa.

É interessante ressaltar que as linhagens de camundongos acima descritas apresentam diferenças estruturais fundamentais no MHC classe I. Assim, a linhagem C57BL/6J possui um haplótipo H-2 do tipo “b”, enquanto que as linhagens BALB/c e A/J apresentam haplótipo do tipo “d” e do tipo “a”, respectivamente. Lidman et al. (2002) demonstraram diferenças importantes na expressão do MHC classe I entre as linhagens C57BL/6J, Balb/cJ e 129/SvJ.

Tendo-se em vista o acima descrito, é possível estabelecer-se uma conexão entre os resultados obtidos previamente, onde a ausência da expressão do MHC classe I resultou num maior grau de retração sináptica após axotomia e os resultados descritos por Lidman et al. (2002), os quais observaram diferenças significativas na expressão do MHC classe I em diferentes linhagens de camundongos isogênicos.

1.3 Células gliais e a plasticidade sináptica

Os astrócitos são células gliais presentes na substância cinzenta (Shao e McCarthy, 1994) que exibem inúmeras funções no Sistema Nervoso Central (SNC). Estas células apresentam projeções citoplasmáticas que representam de 70 a 80% de sua membrana, sendo particularmente abundantes ao redor das terminações nervosas (Wolff, 1970; Spacek, 1985), onde formam processos perisinápticos (Derouiche e Frotsher, 2001). Tais processos são extremamente delicados, não contêm organelas citoplasmáticas e, normalmente, apresentam espessura limitada a até 50 nm. Os processos astrocitários têm a capacidade de alterarem rapidamente seu volume, regulando, desta forma, o ambiente perisináptico (Hanson, 1994; Hanson e Rönnbäck, 1995), bem como limitando a difusão de íons e neurotransmissores (Vandenbranden et al., 1996; Vernadakis, 1996; Rusakov e Kullmann, 1998; Chvatal e Sykova, 2000; Verkhratsky e Steinhäuser, 2000). 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; Groshe et al., 1999, Araque e Perea, 2004), conferindo a estas células um alto grau de sensibilidade a mudanças no micro-ambiente do neurópilo (Castonguay, 2001).

Os astrócitos também provêm o ácido quinurênico, o qual se comporta como antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Roberts et al., 1992); apresentam canais de cálcio (principalmente dos grupos L e T) que atuam na modulação da inibição sináptica (Bormann, 1988) e, particularmente localizam-se nas adjacências de terminações glutamatérgicas, transportadores de glutamato (Rothstein et al., 1994; Derouiche e Rauen, 1995) e glutamina sintase (Norenberg

e Martinez-Hernandez, 1979; Derouiche e Frotsher, 1991), atuando no metabolismo do glutamato na fenda sináptica (Oliet et al., 2001).

Além disso, a presença de canais de cloro nos astrócitos está associada ao controle do pH extracelular e à regulação do volume celular (Deitmer e Rose, 1996); os vários tipos de canais de potássio regulam o ambiente iônico celular (Newman e Reichenbach, 1996) e, os canais de sódio estão envolvidos no controle das atividades de vários transportadores, particularmente do Na^+/K^+ ATPase e do transportador $\text{Na}^+/\text{glutamato}$ (Verkhratsky e Steinhäuser, 2000). Receptores para neurotransmissores são encontrados nas células gliais. Assim, receptores ionotrópico e os metabotrópicos (mGluR3 e mGluR5) para o glutamato (Schools e Kimelberg, 1999), receptores GABAérgicos, adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e receptores para vários peptídeos incluindo-se a substância P e o neuropeptídeo Y têm sido descritos (Castonguay, 2001).

Tendo-se em vista o acima descrito, acredita-se que os astrócitos através de suas amplas funções e através da plasticidade de suas projeções citoplasmáticas, sejam elementos fundamentais nos processos de eliminação e retração de terminações sinápticas após uma lesão (Aldskogius et al., 1999). Tal processo pode estar, inclusive relacionado à expressão do MHC I (Oliveira et al., 2004).

Um modelo clássico para se induzir respostas retrógradas tanto dos componentes neuronais quanto gliais é a transecção (Hurley e Coleman, 2003) ou esmagamento dos axônios de motoneurônios medulares. Tais lesões resultam em modificações moleculares e estruturais no corpo celular dos neurônios axotomizados, que em conjunto são denominadas cromatólise. Essas alterações

têm sido interpretadas como modificações do estado funcional dos neurônios lesionados, passando de um modo de transmissão sináptica, para um modo regenerativo. Assim, a expressão de proteínas relacionadas à transmissão sináptica diminui significativamente, ao passo em que a expressão de proteínas estruturais, tais como CGRP (*calcitonin gene-related protein*) e GAP-43 (*growth associated protein*), aumentam (Linda et al., 1992; Piehl et al., 1993; Piehl et al., 1998).

Paralelamente às alterações observadas nos motoneurônios axotomizados, os astrócitos também apresentam uma série de alterações metabólicas características, em conjunto denominada astrogliose, gliose reativa ou astrogliose reativa (McCall et al., 1996; Giménez et al., 2001; McGraw et al., 2001; Pekny, 2001), que inclui principalmente o aumento da expressão de GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), proteína constituinte da rede de filamentos intermediários dos astrócitos e de outros tipos de células da glia como as células de Schwann, concomitantemente ao aumento de RNAm desta proteína (Tetzlaff et al., 1988). Subseqüentemente, ocorre um aumento da expressão de apolipoproteína J (Svenson et al., 1995), PDGF (*platelet derived growth factor*) (Hermansson et al., 1995), do receptor NMDA (Popratiloff et al., 1996), e da proteína GAP-43 (Rohlmann et al., 1994), que indicam um aumento da comunicação inter-astrocitária. Também ocorre um aumento da expressão de receptores de endotelina (ET_AR e ET_BR), que promovem um maior nível intracelular de íons Ca⁺⁺ (MacCumber et al., 1990), induzem o efluxo de glutamato (Sazaki et al., 1997), estimulam a síntese de mediadores inflamatórios (Koyama et al., 1999) e

promovem a organização do citoesqueleto de actina (Koyama e Baba, 1999), regulando a hipertrofia e hiperplasia astrocitária no SNC lesado (Rogers et al., 2003).

A astrogliose reativa tem sido indicada como o principal obstáculo para a regeneração axonal no SNC (Stensaas et al., 1987; Reier et al., 1989). Em contraste, astrócitos reativos produzem substâncias neurotróficas que parecem estimular o crescimento axonal (Baba, 1998; Davies et al., 1999).

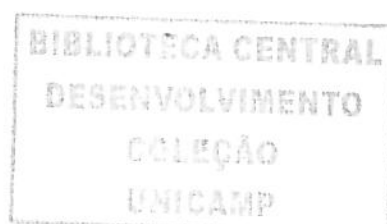
Como a expressão da proteína GFAP é caracteristicamente aumentada em astrócitos próximos de motoneurônios lesionados (Graeber e Kreutzberg, 1986; McCall et al., 1996; Fawcett, 1997; Norton, 1999), esta se constitui num eficiente marcador de seus processos citoplasmáticos (Pekny, 2001). Contudo, os processos celulares mais delgados, os quais podem ser identificados interpostos entre os terminais pré-sinápticos retraídos e a membrana do motoneurônio parecem não conter GFAP e sim, um conjunto de proteínas denominadas “*actin-binding ERM proteins*”, onde E indica ezrin, R indica radixin e M indica moesin (Derouiche e Frotsher, 2001; Derouiche et al., 2002). Localizados imediatamente abaixo da membrana plasmática (Louvet-Vallé, 2000), as proteínas ERM conectam proteínas da membrana celular com o citoesqueleto de actina, ligando-se à membrana plasmática através dos receptores transmembrana ERMBMPs (*ERM binding membrane proteins*), (Yonemura e Tsukita, 1999; Derouiche e Frotsher, 2001; Faure et al., 2004; Batchelor, et al., 2004), entre elas a proteína CD44, CD43 e moléculas ICAM-1 e ICAM-2, em diferentes linhagens de células (Yonemura et al., 1993; Tsukita et al., 1994; Tsukita et al., 1997; Derouiche et al., 2002). Através de elegantes estudos ultra-estruturais, comprovou-se que ezrin e

radixin estão presentes nos prolongamentos astrocitários lamelares mais finos (Derouiche e Frotsher, 2001; Derouiche et al., 2002).

Estes processos finos através de sua motilidade, respondem com rápidas alterações estruturais a mudanças de atividade das sinapses próximas (Derouiche e Frotsher, 2001), se interpondo entre a membrana do motoneurônio lesado e seus terminais sinápticos retraídos (Brännström e Kellerth, 1998; Aldskogius et al., 1999). Portanto, a identificação dessas proteínas também pode ser tida como indicativo da reatividade dos astrócitos, além de mostrar a relação entre a retração do terminal sináptico e a interposição dos processos astrocitários na fenda sináptica.

Apesar dos mecanismos intrínsecos do processo de eliminação e retração sináptica no SNC serem virtualmente desconhecidos, a hipótese envolvendo a expressão do complexo de histocompatibilidade principal é bastante interessante e a possibilidade de relacioná-la à reatividade glial pode auxiliar no melhor entendimento da biologia da regeneração do SNC (Lampson e Hickey, 1986; Ljunggren e Kärre, 1990; Joly et al., 1991; Mucke e Oldstone, 1992; Rall et al., 1994).

2. OBJETIVOS



Objetivos Gerais

Investigar a correlação entre as variações na capacidade regenerativa, observadas entre diferentes linhagens de camundongos isogênicos e suas diferenças no que diz respeito à expressão do MHC classe I e a plasticidade sináptica, 1 e 3 semanas após a transecção do nervo ciático.

Objetivos Específicos

- Estudo imunohistoquímico da expressão de MHC classe I e sinaptofisina nas linhagens C57BL/6J, A/J e Balb/cJ, 1 e 3 semanas após a transecção do nervo ciático.
- Análise morfológica da ultra-estrutura sináptica das 3 linhagens isogênicas de camundongos, 1 e 3 semanas após a transecção do nervo ciático, incluindo estudo da cobertura sináptica total, cobertura sináptica dos terminais F, S e C, e número dos terminais F, S e C dos referidos motoneurônios alfa.
- Análise da expressão gênica para $\beta 2$ -m nas 3 linhagens isogênicas de camundongos, 1 semana após a transecção do nervo ciático.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA), Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob o protocolo nº 833-1 (junho de 2005).

3.1 Procedimentos cirúrgicos e preparação dos espécimens

Para este estudo, foram utilizados, em cada técnica, cinco camundongos adultos machos (6 a 8 semanas) pertencentes às linhagens C57BL/6J, A/J e Balb/cJ, os quais foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de ketamina, *Kensol* (50 mg/ml), e cloridrato de xylazina, *Vetaset* (2g/100 ml). A mistura foi administrada intraperitonealmente na quantidade de 0.2 ml a cada 25 gramas de peso corpóreo. Os camundongos foram então submetidos à transecção do nervo ciático esquerdo na altura do forame isquiático maior. Para a transecção do nervo ciático, um segmento de 2 mm do coto distal do nervo foi removido no intuito de se evitar regeneração. Animais *sham* operados (procedimentos cirúrgicos idênticos, porém sem a transecção do nervo ciático) e não operados das mesmas linhagens foram utilizados como controle. Todos os camundongos (animais operados, após 1 e 3 semanas) foram sacrificados por overdose de anestésico e perfundidos transcardiacamente com uma solução salina tamponada (PB, 0,1 M; pH 7.4). Os tempos de sobrevida levaram em conta, os períodos de máxima retração sináptica após axotomia periférica (TC1s) e recuperação das aferências (TC3s). As etapas

seguintes foram dependentes da técnica a ser empregada, ou seja, imunohistoquímica de fluorescência, microscopia eletrônica de transmissão, ou hibridização *in situ*.

3.2 Imunohistoquímica (IH)

Após os períodos de sobrevivência pré determinados, ou seja, uma e três semanas após a transecção, os animais foram sacrificados e, seguindo-se a perfusão de salina tamponada, foi perfundida uma solução fixadora tamponada contendo formaldeído 10%. Posteriormente à fixação, os espécimes foram dissecados e mantidos em fixador por 12 horas, a uma temperatura de 4°C. Passado este período, as medulas foram congeladas e incluídas em Tissue-Tek (Miles Inc., USA). Cortes histológicos com 12 µm de espessura foram obtidos em criostato. As secções foram então 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 0,01 M, sendo posteriormente incubadas em câmara úmida com 150 µl de solução de soro de macaco 5% em PBS por 30 minutos. A seguir as secções foram lavadas em PBS 0,01 M e os anticorpos primários foram aplicados, sendo o período de incubação variando de 18 a 24 horas. Os anticorpos primários a serem empregados foram: coelho anti-sinaptofisina (Dako, cód. A0010-1) e rato anti-MHC classe I (Peninsula, cat. no. T-2105).

Em seqüência à primeira incubação, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01 M e incubadas com os anticorpos secundários macaco anti-coelho-CY-2 e/ou macaco anti-cabra ou anti-rato-CY-3 (Jackson Lab., USA) por 45 minutos. Os espécimes foram lavados em PBS 0,01 M e montados em glicerol/PBS 0,01 M (3:1), sendo observados em microscópio de fluorescência utilizando-se os filtros para fluoresceína (CY-2) e rodamina (CY-3).

3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Camundongos axotomizados (n=5 em cada grupo), foram perfundidos transcardiacamente com 40 ml de fixador contendo glutaraldeído 2.5% e paraformaldeído 1,0% em PB 0,1 M, pH 7.4, em seqüência à solução salina tamponada. A região lombar das medulas foi dissecada e armazenada no mesmo fixador a 4°C. Os espécimes foram então reduzidos e pós-fixados com tetróxido de ósmio, desidratados e incluídos em Durcupan (Fluka, cód. 44610). Secções semi-finas foram obtidas e analisadas após coloração com azul de toluidina. Secções ultra-finas do segmento lesionado foram coletadas em grids de cobre revestidos com formvar, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados sob um microscópio eletrônico Leo 906.

3.3.1 Análise ultraestrutural da retração sináptica

Previamente à reconstrução, apenas motoneurônios que preenchem certos critérios foram selecionados. Estes critérios foram a presença de núcleo, sendo que este deveria estar deslocado para a periferia, dissolução da substância de Nissl, diâmetro superior a 35 μm e presença de pelo menos um terminal colinérgico (tipo C), encontrado apenas em motoneurônios alfa (Figura 1) (Conradi, 1969; Aldskogius e Svenson, 1993). Os neurônios foram identificados como axotomizados tendo-se em vista a ocorrência de modificações cromatolíticas no corpo celular. Após a reconstrução dos motoneurônios, os terminais sinápticos, em aposição ao corpo celular, foram identificados, contados e classificados. A identificação dos tipos de terminais baseou-se na forma das vesículas sinápticas, o que tem correlação direta com o aminoácido contido em seu interior. Assim, terminais contendo apenas vesículas achatadas foram classificados como tipo F (flat) e contêm glicina. Aqueles contendo apenas vesículas esféricas foram tipados como S (spherical) e contêm glutamato. Contudo, terminais contendo vesículas esféricas bem como uma estrutura sub-sináptica característica, contêm acetilcolina e foram denominados tipo C (cholinergic). Os três tipos de terminais são ilustrados na Figura 1 (Conradi, 1969). A superfície das células foi então digitalizada em um aumento de 10000 $\times$ e montada seqüencialmente (Figura 2). Os terminais sinápticos em contato com o corpo celular dos motoneurônios foram identificados (F, S e C) e quantificados por 100 μm de membrana e a cobertura da membrana foi calculada em porcentagem de terminais por comprimento de membrana.

3.4 Hibridização *in situ*

Paralelamente à imunohistoquímica, realizamos experimentos de hibridização *in situ*, com vistas a quantificar a expressão do mRNA para a proteína microglobulina beta 2 ($\beta 2$ -m), uma co-subunidade do MHC I. No sentido de nos certificarmos que os neurônios analisados haviam sido axotomizados, realizamos paralelamente, uma análise da expressão de GAP 43, proteína estrutural que aumenta significativamente após a transecção do axônio dos motoneurônios. A Figura 3, traz exemplos representativos dessa marcação.

Após sacrifício com cloridrato de ketamina, *Kensol* (50 mg/ml), e cloridrato de xylazina, *Vetaset* (200 mg/ml), os segmentos medulares L4 a S1 foram dissecados e congelados em gelo seco. Secções transversais (14 μ m) foram obtidas em um criostato (Microm, Heidelberg, Germany), colhidas em lâminas de vidro silanizadas e estocadas a -40°C até a utilização.

As sondas sintetizadas (MWG, Biotech Inc.- USA), utilizadas neste estudos foram complementares ao mRNA das seguintes proteínas: GAP-43 (growth associated protein – 43, nucleotídeos 70-117, número de acesso Genebank M16228) e microglobulina beta 2 (nucleotídeos 304-351, número de acesso X01838).

Estas sondas foram marcadas em sua terminação 3' com ^{35}S (Amersham; atividade específica de $7\text{-}10 \times 10^8$ cpm/ μ g) utilizando-se a enzima terminal deoxinucleotidil transferase (TdT). Após a marcação, as sondas foram purificadas por filtração em uma coluna de sílica (GenEluteTM PCR DNA purification kit, Sigma) e hibridizadas às secções por 16 a 18 horas a 42°C. A mistura de

hibridização continha: formamida 50% (G.T. Baker Chemicals B W, Deventer, The Netherlands), SSC 4X (SSC 1X = NaCl 0,15 M e citrato de sódio 0,015 M), solução de Denhardt 1X, N-laurosylosarcosina 1%, tampão fosfato 0,02 M (pH 7,0), sulfato de dextran 10% (Pharmacia), 500 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado por aquecimento (Sigma) e ditioneitol 200 mM (DTT; LKB, Bromma, Sweden). Após a hibridização, as secções foram lavadas várias vezes em SSC 1X a 60°C, desidratadas em etanol e mergulhadas em emulsão fotográfica (NTB2; Kodak, Rochester, NY). Após 6 semanas, as secções foram reveladas com revelador D-19 (Kodak) e montadas com lamínula. Nas secções controle, uma quantidade vinte vezes superior da sonda fria (sem incorporação do enxofre radioativo) foi adicionada à mistura de hibridização.

A análise dos resultados foi semi-quantitativa. Desta forma, imagens representativas das áreas marcadas foram digitalizadas utilizando-se uma video câmera e uma placa de aquisição de imagem (Figura 3). A escala de cinza do campo escuro foi ajustada e as marcações segmentadas utilizando-se o software NIH Image (versão 1.55, NIH, Bethesda, MD) de forma a que os grãos de cinza sobre os motoneurônios pudessem ser analisados. As células cuja marcação fosse cinco vezes superior ao fundo foram consideradas positivas. Neste sentido, seis secções derivadas de pelo menos três animais foram analisadas.

3.5 Análise estatística

Os dados foram analisados, através do método ANOVA, seguido dos testes “t de student” , para análise paramétrica e “Mann Whitney” para análise não paramétrica. Assim, assumiu-se $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), utilizando-se as funções estatísticas do programa BioEstat.

Todos os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão.

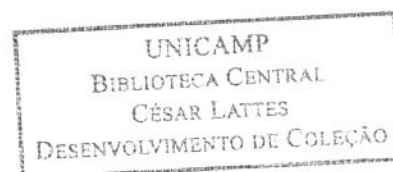
4. RESULTADOS

4.1 Imunohistoquímica (IH)

4.1.1 Expressão de MHC classe I

Inicialmente analisamos, através de imunohistoquímica, a expressão de MHC classe I nas três linhagens estudadas, uma e três semanas após axotomia unilateral do nervo ciático (Figuras 4 e 5, respectivamente). Os resultados, apresentados em densidade integrada de pixels, revelaram um aumento, em graus variáveis, da expressão dessa molécula nas três linhagens. Os camundongos A/J ($13,48 \pm 1,99$), cuja capacidade regenerativa axonal foi demonstrada como superior às outras duas linhagens, C57BL/6J ($6,33 \pm 0,99$) e Balb/cJ ($5,64 \pm 0,99$) apresentou um aumento significativo da expressão do MHC I, uma semana após a lesão (Figura 6). Contudo, essa expressão tornou-se estatisticamente igual a das demais linhagens estudadas, na terceira semana após axotomia, (Figura 6), sendo A/J ($10,47 \pm 1,12$), C57BL/6J ($17,42 \pm 2,53$) e Balb/cJ ($14,64 \pm 2,20$).

Tendo-se em vista o possível papel do MHC I na sinalização entre os terminais pré-sinápticos e os neurônios motores, bem como na comunicação destes com a glia, nossos resultados demonstram que esses eventos podem variar em função das características de cada linhagem. Dessa forma, camundongos A/J apresentam uma resposta mais rápida à axotomia, sendo que os neurônios motores lesionados são capazes de sinalizar rapidamente para seus "inputs" bem como para a glia circunjacente. Tais diferenças podem contribuir para uma



resposta mais eficiente à lesão, contribuindo para explicar a maior capacidade regenerativa nessa linhagem.

4.1.2 Expressão de sinaptofisina

A quantificação, em pixels da imunohistoquímica para sinaptofisina revelou uma diferença significativa, em termos de retração dos terminais pré-sinápticos, dos camundongos A/J ($0,48 \pm 0,06$; média $\pm$ erro padrão), uma semana após a transecção do nervo ciático, comparativamente aos C57BL/6J ($0,72 \pm 0,05$; $p < 0,05$), sendo a resposta dos animais Balb/cJ ($0,40 \pm 0,09$) semelhante à da linhagem A/J (Figura 7).

Tendo-se em vista que o potencial regenerativo dos camundongos A/J é bastante superior ao dos C57BL/6J, concentramos nossos interesses nessas duas linhagens, apesar de terem sido realizados os experimentos programados com a linhagem Balb/cJ. Desta forma, apresentamos imagens representativas da imunomarcação para sinaptofisina, uma semana após a transecção unilateral do nervo ciático (Figura 8). Os motoneurônios alfa axotomizados estão destacados, sendo possível observar uma redução mais intensa da marcação para sinaptofisina nos animais da linhagem A/J.

A importância da precocidade dos eventos acima descritos também se baseia no fato de não existirem diferenças significativas na cobertura sináptica, três semanas após a lesão (Figura 7), sendo A/J ($0,62 \pm 0,07$), Balb/cJ ($0,60 \pm 0,08$) e C57BL6J ($0,59 \pm 0,05$). As imagens representativas da imunomarcação para

sinaptofisina, três semanas após a transecção unilateral do nervo ciático estão representadas na Figura 9.

Estas observações reforçaram nosso interesse em investigar eventuais diferenças na dinâmica das sinapses, tanto em nível de imunohistoquímica quanto em nível ultraestrutural. A partir das mesmas, buscamos melhor entender o impacto dessas diferenças na dinâmica das sinapses, após a transecção do nervo ciático.

4.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

No sentido de melhor compreender os achados de imunohistoquímica para sinaptofisina, realizamos um estudo ultraestrutural detalhado das sinapses em aposição com os neurônios lesionados, nas três linhagens isogênicas. A Figura 2, citada previamente, representa um motoneurônio alfa reconstruído a partir de imagens ultraestruturais sequenciais, utilizadas como base para a análise da cobertura sináptica.

A comparação da retração dos terminais sinápticos após axotomia revelou diferenças significativas entre as linhagens estudadas. Assim, em cada uma dessas linhagens, foram analisados estatisticamente, os seguintes itens: cobertura sináptica total, cobertura sináptica dos terminais F, S e C, e número de terminais /100 μ m de membrana, após 1 e 3 semanas da transecção do nervo ciático. Os resultados da MET, estão apresentados em micrômetros (μ m).

4.2.1 Cobertura sináptica total

A cobertura sináptica total apresentou diferenças significativas em seu valor percentual, principalmente 1 semana após a transecção do nervo ciático (Figura 10). A linhagem C57 BL/6J ($31,63 \pm 0,57$; média $\pm$ erro padrão), apresentou um valor significativamente superior quando comparada à linhagem A/J ($26,99 \pm 0,71$; $p < 0,05$) e à linhagem Balb/cJ ($29,05 \pm 0,84$; $p < 0,05$). As duas últimas não apresentaram diferenças significativas. O lado não lesado (direito), não apresentou diferença significativa entre as 3 linhagens, sendo C57 BL/6J ($52,43 \pm 0,74$), A/J ($51,54 \pm 0,42$) e Balb/cJ ($50,97 \pm 1,67$).

Após 3 semanas da transecção do nervo ciático, as linhagens A/J ($41,66 \pm 0,44$) e Balb/cJ ($42,10 \pm 0,33$), apresentaram uma maior cobertura sináptica (Figura 10), quando comparadas à linhagem C57 BL/6J ($32,54 \pm 0,83$).

4.2.2 Cobertura sináptica dos terminais F, S e C

A mensuração da cobertura sináptica dos terminais F, S e C, do lado direito (não lesado), não apresentou diferenças significativas entre as três linhagens (Figura 11), sendo C57BL/6J ($32,93 \pm 2,03$), A/J ($34,20 \pm 0,71$) e Balb/cJ ($32,81 \pm 1,13$) para o número de terminais F; C57BL/6J ($15,34 \pm 1,70$), A/J ($12,87 \pm 0,78$) e Balb/cJ ($13,53 \pm 1,36$) para o número de terminais S; C57BL/6J

($4,16 \pm 1,17$), A/J ($4,46 \pm 0,58$) e Balb/cJ ($4,63 \pm 0,99$) para o número de terminais C. Após 1 semana da transecção do nervo ciático, nota-se uma diminuição estatística da cobertura sináptica dos terminais F (inibitórios), na linhagem A/J ($16,76 \pm 0,39$; $p < 0,05$), comparativamente às demais linhagens (Figura 12), sendo C57BL/6J ($20,79 \pm 1,11$) e Balb/cJ ($18,65 \pm 0,86$), enquanto o valor dos demais terminais não diferem entre si.

Após 3 semanas da transecção do nervo ciático, a cobertura sináptica dos terminais F (inibitórios), mostrou-se significativamente inferior na linhagem C57BL/6J ($20,37 \pm 0,78$), comparativamente à linhagem A/J ($25,36 \pm 1,52$; $p < 0,05$) e Balb/cJ ($27,74 \pm 0,77$; $p < 0,005$), vide Figura 13. Quanto aos terminais S, a linhagem C57BL/6J ($9,12 \pm 0,37$), apresentou cobertura sináptica estatisticamente inferior, comparativamente a Balb/cJ ($11,79 \pm 0,69$; $p < 0,05$), sendo que esta última não apresenta diferença significativa comparada a A/J ($11,12 \pm 1,34$). Quanto aos terminais C, a linhagem A/J ($5,19 \pm 0,85$) apresentou cobertura sináptica superior comparativamente às demais ($p < 0,05$), sendo C57BL/6J ($3,04 \pm 0,34$) e Balb/cJ ($2,87 \pm 0,17$), vide Figura 13.

Observou-se ainda que, principalmente nas linhagens A/J e Balb/cJ do grupo TC3s, houve um aumento da cobertura sináptica dos terminais sinápticos F, comparativamente ao grupo TC1s. Esta observação sugere uma recuperação do número de terminais F e plasticidade sináptica, nessas linhagens em relação à C57BL/6J, após 3 semanas da transecção do nervo ciático.

4.2.3 Número dos terminais sinápticos F, S e C

A mensuração do número de terminais sinápticos F, S e C/ 100 μ m de membrana, foi realizada em relação aos motoneurônios alfa, de forma que foram considerados apenas aqueles em aposição à membrana celular dos mesmos.

Do lado direito (não lesado) a mensuração do número de terminais não apresentou diferenças significativas entre as três linhagens (Figura 14), sendo C57BL/6J ($23,81 \pm 3,61$), A/J ($22,15 \pm 2,65$) e Balb/cJ ($24,92 \pm 1,68$), para o número de terminais F; C57BL/6J ($10,63 \pm 0,98$), A/J ($9,88 \pm 1,52$) e Balb/cJ ($11,10 \pm 0,98$), para o número de terminais S; e C57BL/6J ($1,66 \pm 0,30$), A/J ($1,46 \pm 0,15$) e Balb/cJ ($1,44 \pm 0,19$), para o número de terminais C.

Após 1 semana da transecção do nervo ciático, notou-se entre as linhagens uma diminuição estatística do número dos terminais sinápticos, tanto do tipo F (inibitórios), quanto dos tipos S (excitatórios) e C (colinérgicos) na linhagem A/J ($p < 0,05$), comparativamente às demais linhagens (Figura 15). Seus respectivos valores, são: número de terminais do tipo F: A/J ($9,54 \pm 0,74$), C57BL/6J ($15,13 \pm 1,18$) e Balb/cJ ($17,42 \pm 2,32$); número de terminais do tipo S: A/J ($4,04 \pm 0,51$), C57BL/6J ($6,27 \pm 0,62$) e Balb/cJ ($7,38 \pm 0,82$); número de terminais do tipo C: A/J ($1,05 \pm 0,07$), C57BL/6J ($1,18 \pm 0,17$) e Balb/cJ ($1,70 \pm 0,18$).

Após 3 semanas da transecção do nervo ciático, constatou-se entre as linhagens, uma diminuição estatística do número dos terminais sinápticos do tipo F (inibitórios), na linhagem A/J ($p < 0,05$), comparativamente às demais linhagens (Figura 16), enquanto os terminais sinápticos dos tipos S (excitatórios) e C (colinérgicos) não apresentam diferenças significativas entre si. Os respectivos valores nas 3 linhagens, são: número de terminais do tipo F: A/J ($17,46 \pm 1,06$), C57BL/6J ($21,32 \pm 1,02$) e Balb/cJ ($23,78 \pm 1,79$); número de terminais do tipo S: A/J

($9,49 \pm 1,17$), C57BL/6J ($11,24 \pm 0,37$) e Balb/cJ ($11,17 \pm 0,59$); número de terminais do tipo C: A/J ($1,47 \pm 0,23$), C57BL/6J ($0,91 \pm 0,11$) e Balb/cJ ($1,03 \pm 0,08$).

Observou-se ainda que, nas 3 linhagens isogênicas do grupo TC3s, houve um aumento do número de terminais sinápticos, principalmente nos terminais F e S, comparativamente ao grupo TC1s. O maior aumento ocorreu na linhagem A/J (terminais F) em relação às demais, representando a recuperação da cobertura sináptica desta linhagem após 3 semanas da transecção do nervo ciático.

Ainda em MET, foram mensurados os intervalos entre os terminais sinápticos, após 3 semanas da transecção do nervo ciático em C57BL/6J, A/J e Balb/cJ. A análise destes terminais é fundamental na avaliação da qualidade da plasticidade sináptica e retração dos terminais sinápticos de cada uma das linhagens de camundongo. Observou-se que, a maioria dos terminais remanescentes permaneceram separados por pequenos intervalos (1 a 2 μm), caracterizando que a retração sináptica ocorreu de forma específica (Figura 17).

4.3 Hibridização *in situ*

4.3.1 Expressão de microglobulina beta 2 ($\beta 2\text{-m}$)

Os resultados de expressão de microglobulina beta 2, apresentados nas Figuras 18 e 19, apontam para uma maior expressão do mRNA nos camundongos da linhagem C57BL/6J ($283 \pm 6,61$), apresentando diferenças significativas quando comparada a A/J ($52,7 \pm 1,45$; $p < 0,05$) e Balb/cJ ($76,3 \pm 2,44$; $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Historicamente, pouca importância tem sido dada à expressão do MHC I no tecido nervoso, visto que este sempre foi considerado imunoprivilegiado (Lampson e Hickey, 1986; Ljunggren e Kärre, 1990; Joly et al., 1991; Mucke e Oldstone, 1992; Rall et al., 1994). Sua presença, bem como modificações nos níveis de mRNA e proteína, foram descritos previamente. Porém, a interpretação desses eventos não era clara. Interessantemente, Huh et al. (2000) descreveram que camundongos incapazes de expressar o MHC I, apresentavam deficiência no processo de segregação das aferências originárias da retina para o núcleo geniculado lateral, durante o desenvolvimento do sistema visual. Este fato possibilitou a hipótese de que o MHC I desempenha importante papel na eliminação sináptica. Recentemente, através da análise das modificações ultraestruturais dos circuitos medulares ocorridas após lesão nervosa (Blinzinger e Kreutzberg, 1968; Sumner, 1975; Chen et al., 1977; Barron, 1983; Delgado-Garcia et al., 1988; Lindå et al., 1992; Aldskogius e Svensson, 1993; Tseng e Hu, 1996; Brännström e Kellerth, 1998; Lindå et al., 2000), foi possível relacionar a expressão do MHC I com o fenômeno da plasticidade sináptica. Assim, Oliveira et al. (2004) demonstraram que, no adulto, o MHC desempenha papel fundamental na estabilização e retração seletiva de terminais sinápticos. A ausência da expressão do MHC I leva a uma perda de seletividade no processo de retração, afetando principalmente os terminais inibitórios que contém glicina e GABA como neurotransmissor (Oliveira et al., 2004).

O presente estudo buscou traçar paralelos entre diferentes eventos que ocorrem posteriormente a axotomia periférica. Assim, buscamos associar a expressão do MHC classe I, recentemente descrita como de fundamental

importância para os eventos de plasticidade subseqüentes a uma lesão ao SNC (Huh et al., 2001; Oliveira et al., 2004), com as diferentes capacidades regenerativas apresentadas pelas linhagens A/J, C57BL/6J e Balb/cJ.

Os resultados imunohistoquímicos mostram uma correlação interessante entre a reatividade glial subseqüente a axotomia e o processo de retração sináptica que ocorre ao nível da medula espinhal (Emirandetti et al., 2006). É interessante ressaltar que a lesão empregada em nosso estudo é periférica, sendo afetados unicamente os motoneurônios. Dessa maneira, todas as alterações no microambiente medular são necessariamente induzidas por esses neurônios, havendo fortes indícios que isso ocorra através da expressão diferencial do MHC I. Neste sentido, acreditamos que o padrão temporal bem como a intensidade da resposta glial, assim como dos processos de plasticidade sináptica após uma lesão, sejam fatores determinantes do sucesso regenerativo, como também do retorno das funções perdidas após a lesão. Levando-se em conta que os animais da linhagem A/J apresentam uma taxa de regeneração axonal superior às demais (Da-Silva et al., 1991; Lainetti et al., 1995), é provável que esses eventos sejam benéficos para a regeneração nervosa subsequente. Essa hipótese é reforçada por nossos recentes achados *in vitro* (Emirandetti et al., 2006).

Na linhagem A/J observou-se intensa resposta glial e imunomarcção para sinaptofisina nos primeiros sete dias após a transecção do nervo ciático (Emirandetti et al., 2006). Tal resposta, provavelmente, contribui para uma aceleração do processo de retração das aferências (terminais pré-sinápticos), comparativamente aos animais C57BL/6J. É importante ressaltar que essa maior retração sináptica mostrou-se transitória, uma vez que não se observou diferença

significativa na imunomarcção para sinaptofisina, três semanas após a lesão. Dessa forma, nossos resultados indicam que uma resposta mais precoce à axotomia, no que diz respeito a eventos de plasticidade sináptica, colabora para um maior sucesso regenerativo posterior.

Acreditamos haver uma correlação entre os resultados obtidos sobre a expressão do MHC I e a retração sináptica observada pela imunomarcção com sinaptofisina, ou seja, uma maior e mais prematura expressão de MHC I promove eventos de plasticidade sináptica logo após a lesão, permitindo que os neurônios, por exemplo, concentrem seu metabolismo na regeneração axonal, uma vez que ocorre uma redução significativa dos "inputs" pré-sinápticos. Ainda, é possível que essa desconexão prematura dos circuitos medulares, minimize a excitotoxicidade advinda dos terminais glutamatérgicos, como sugerido por Lindå et al. (2000).

Experimentos *in vivo*, foram realizados em ensaios *in vitro*, empregando culturas primárias de astrócitos e neurônios medulares. Foram observadas diferenças significativas na reatividade glial dos astrócitos provenientes das linhagens A/J e C57BL/6J, sendo aqueles derivados de A/J marcados mais intensamente com os anticorpos anti-GFAP e anti-ezrina, (proteínas gliais que aumentam sua expressão após uma lesão nervosa), utilizadas para analisar a reatividade astrogliar entre essas duas linhagens. Esta diferença de reatividade, que foi semelhante ao observado *in vivo*, teve um impacto direto na sinaptogênese *in vitro*. Tal fato foi comprovado pela quantificação do número de sinapses reativas para sinaptofisina, que foi estatisticamente superior nas co-culturas de astrócitos derivados da linhagem C57BL/6J e neurônios medulares (Emirandetti et al., 2006).

Esses resultados reforçam a hipótese de que a glia reativa está diretamente relacionada com os fenômenos de plasticidade sináptica, sendo o melhor entendimento de sua biologia, de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias visando a recuperação do SNC após lesões.

A análise ultraestrutural demonstrou que, semelhantemente à imunomarcação para sinaptofisina, a axotomia promoveu uma redução significativa da cobertura sináptica na linhagem A/J, reforçada por nossos achados recentes (Emirandetti et al., 2006).

Além da análise geral de cobertura sináptica e número total de terminais nervosos, foi possível constatar-se que a diminuição da cobertura sináptica na linhagem A/J foi devida a uma retração significativamente maior de terminais inibitórios, do tipo F. Não houve, portanto, diferenças na dinâmica das sinapses excitatórias, do tipo S.

A maior retração de terminais inibitórios foi descrita em um trabalho recente, onde camundongos transgênicos, incapazes de expressar MHC I (KO para MHC I) foram utilizados. Esses camundongos apresentaram uma redução na capacidade regenerativa, pois a retração sináptica desses animais, ocorre de maneira inespecífica e aleatória (Oliveira et al., 2004). Os terminais das 3 linhagens isogênicas em ambos os grupos após axotomia (TC1S e TC3S), apresentaram retração sináptica específica, ou seja, sob controle do motoneurônio, onde a maior parte dos terminais sinápticos permaneceu separados por pequenos intervalos (Emirandetti, 2006). Isso sugere que o MHC I é de fundamental importância para que os circuitos medulares sejam reorganizados adequadamente após uma lesão

nervosa, como previamente observado em outros estudos (Huh et al., 2000; Oliveira et al., 2004).

Ultra-estruturalmente, observou-se que o número de terminais sinápticos retraídos, principalmente os do tipo F (inibitórios), são recuperados 3 semanas após axotomia (TC3S) nas linhagens A/J e Balb/cJ. O mesmo não ocorre com a linhagem C57BL/6J, a qual apresenta cobertura sináptica total significativamente inferior em relação às demais. De forma interessante, em IH os dados estatísticos confirmam nossas observações da MET em TC1S, contudo em TC3S não houve diferenças significativas. Tal discrepância, provavelmente está relacionada aos terminais em aposição com o corpo dos motoneurônios, apenas visíveis com a técnica de MET. Em IH, portanto, não é possível identificar precisamente os terminais em aposição com os motoneurônios alfa, constituindo-se em um método quantitativo inicial que, necessariamente necessita da análise ultraestrutural para ser validado.

No que diz respeito a hibridização *in situ*, interessantemente a expressão de microglobulina beta 2 ($\beta 2$ -m), apresentou-se superior na linhagem C57BL/6J, comparativamente às demais após uma semana da transecção do nervo ciático. Tal fato indica que, apesar de haver um aumento da quantidade de mRNA nesses neurônios, este, por algum motivo, não é traduzido na mesma proporção, resultando em pouca expressão de MHC I funcional, nos camundongos C57BL/6J.

É importante ressaltar ainda que, as moléculas do sistema imunológico podem apresentar funções antagônicas, dependendo da situação e dos receptores para MHC I + peptídeo sinal. Assim, reforça a necessidade de um maior

aprofundamento dos conhecimentos da biologia do MHC I no sistema nervoso e sua relação com eventos de plasticidade sináptica.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que o aumento do MHC I está relacionado com uma maior retração e plasticidade sináptica. Acreditamos que essas observações possam contribuir para o melhor entendimento das diferenças de capacidade regenerativa existentes entre diferentes linhagens isogênicas.

- Após 1 semana da transecção do nervo ciático (TC1S), a retração sináptica ocorre em maior proporção quando comparada à TC3S, nas 3 linhagens isogênicas, tanto em IH (expressão de MHC I e sinaptofisina), como em MET.
- A linhagem A/J apresentou maior retração sináptica em TC1s e maior recuperação de suas aferências em TC3s, seguida pela linhagem Balb/cJ.
- Nossos resultados em MET (cobertura sináptica total e número de terminais sinápticos) em TC1S e TC3S, nas 3 linhagens isogênicas, sugerem maior plasticidade sináptica nas linhagens A/J e Balb/cJ, quando comparadas à C57BL/6J.
- A linhagem C57BL/6J, apesar de apresentar maior expressão de RNA mensageiro para $\beta 2$ -m, comparativamente às demais linhagens, a mesma não é traduzida integralmente em MHC I funcional nesta linhagem.

7. FIGURAS E TABELAS

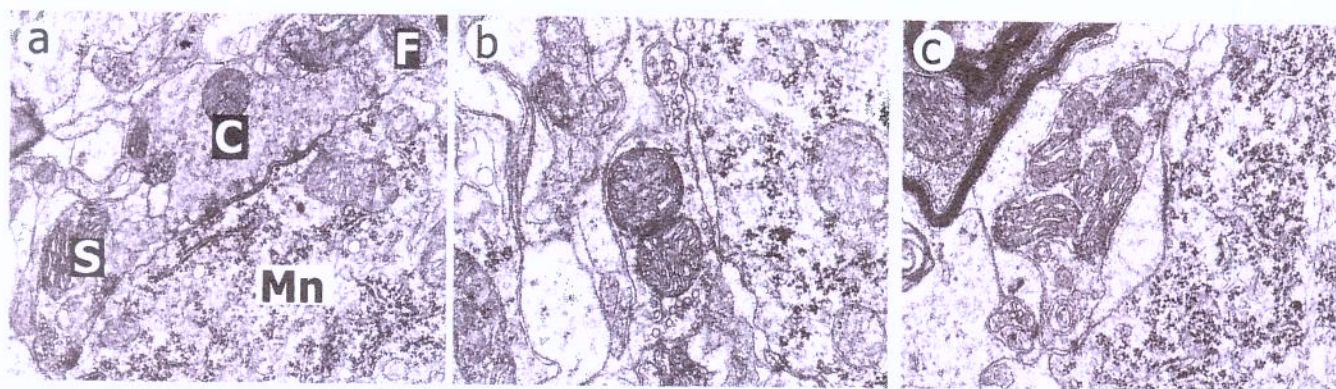


Figura 1 – **A.** Fotomicrografia eletrônica ao nível da superfície de um motoneurônio alfa de camundongo C57BL/6J controle. É possível identificar-se terminais sinápticos dos tipos S, C e F. **B. e C.** Fotomicrografias eletrônicas da superfície de um motoneurônio, uma semana após axotomia. Observe-se a perda de contato de regiões significativas dos botões sinápticos.

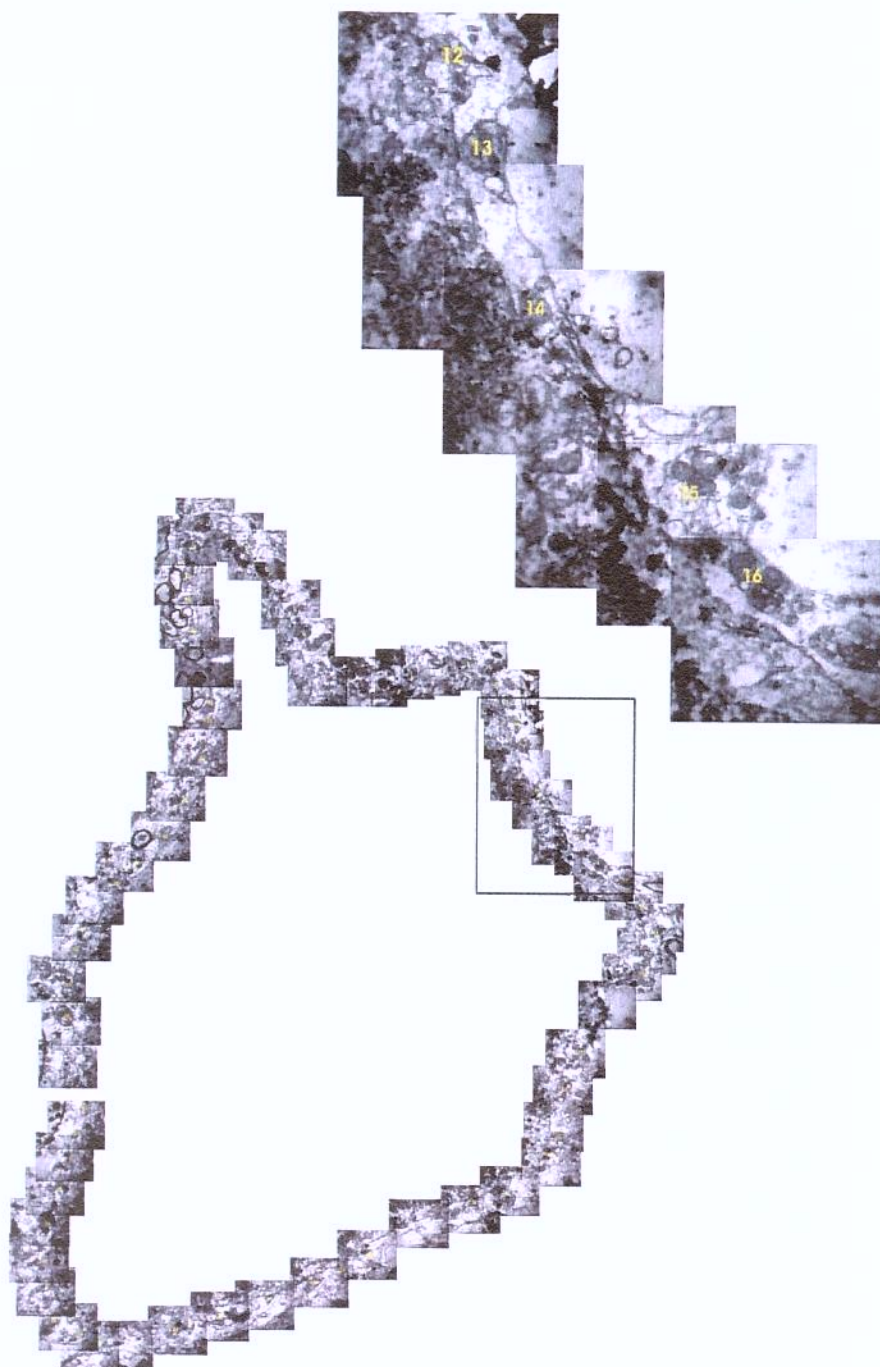


Figura 2 – Seqüência de fotomicrografias eletrônicas utilizadas para a reconstrução de um motoneurônio alfa. Na ampliação é possível observar-se terminais sinápticos retraídos, numerados seqüencialmente. Aumento =10.000 X.

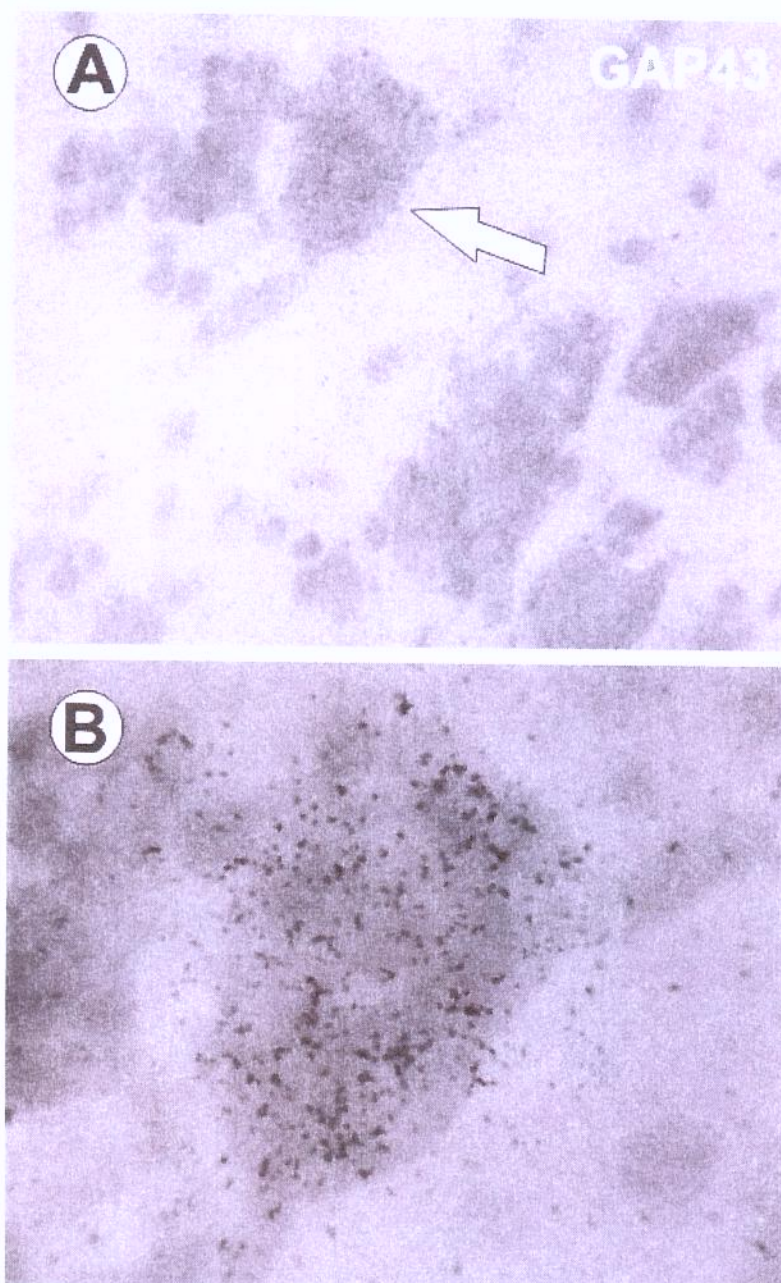


Figura 3 – Expressão de mRNA da proteína GAP-43 em um motoneurônio alfa axotomizado, uma semana após a transecção do nervo ciático ipsilateral. Aumento em A= 200 X; em B= 400 X.

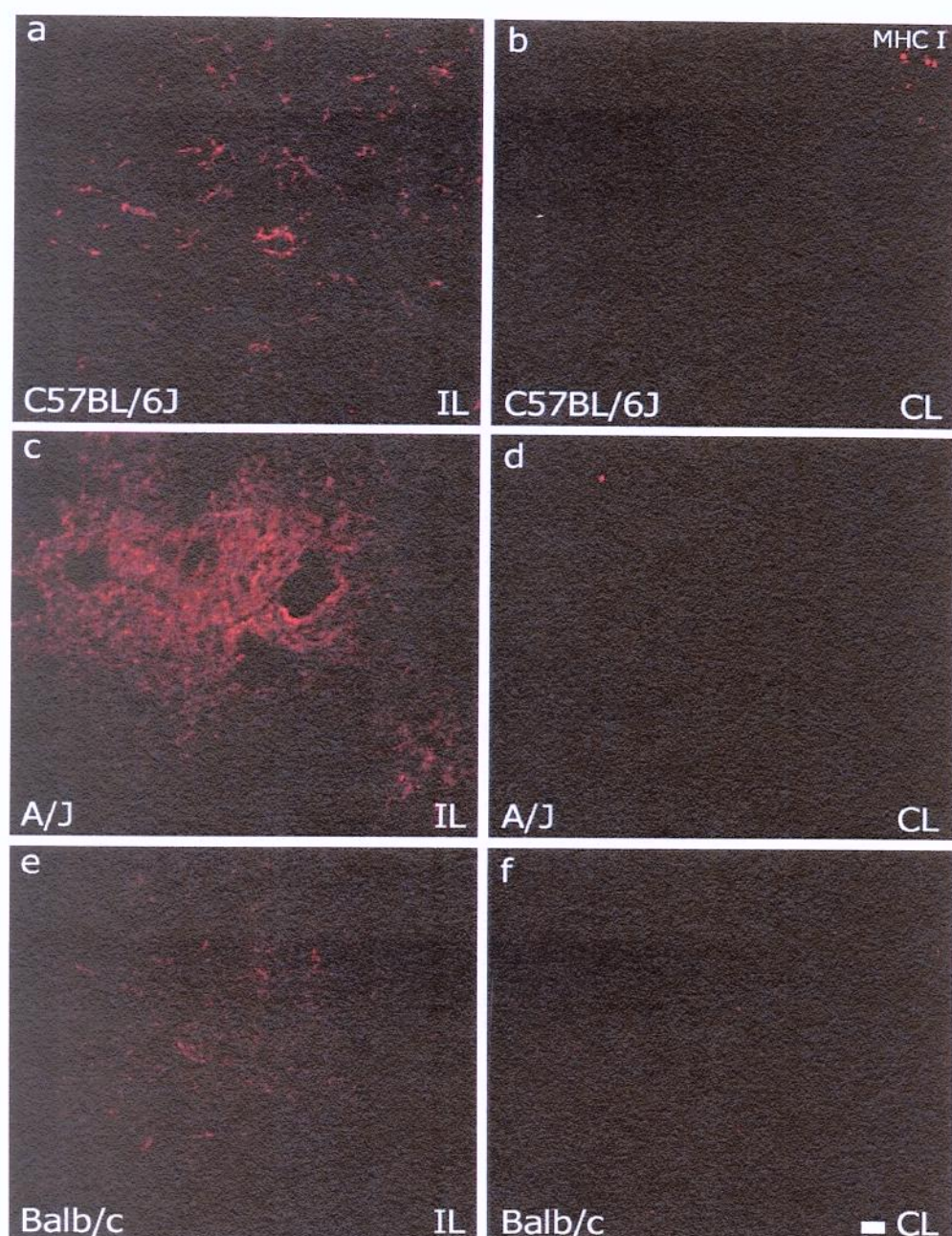


Figura 4 – Imunomarcacão para MHC classe I, uma semana após a transecção do nervo ciático em camundongos C57BL/6J, A/J e Balb/cJ. IL – ipsilateral, CL – contralateral. Escala= 50 μ m.

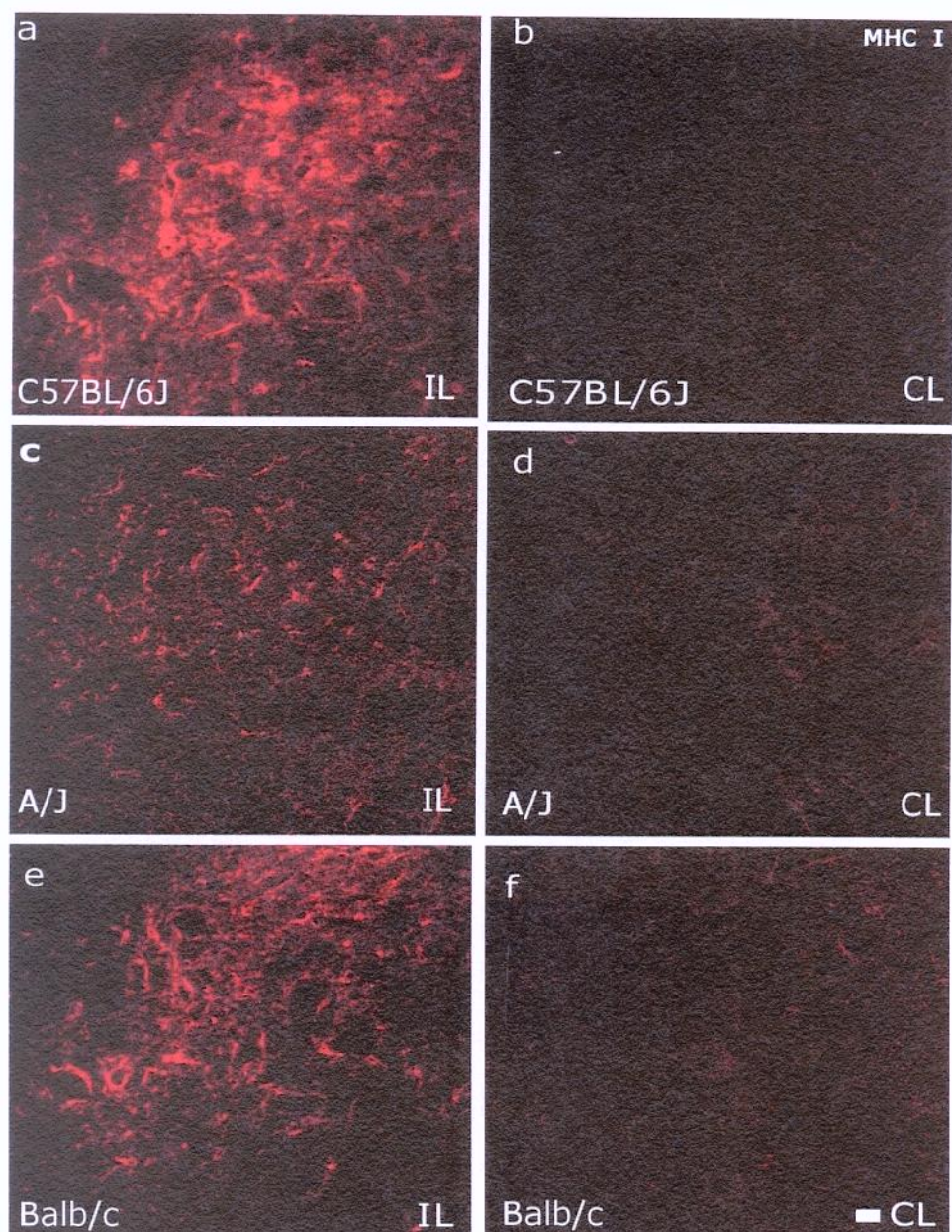


Figura 5 – Imunomarcacão para MHC classe I, três semanas após a transecção do nervo ciático em camundongos C57BL/6J, A/J e Balb/cJ. IL – ipsilateral, CL – contralateral. Escala = 50 μ m.

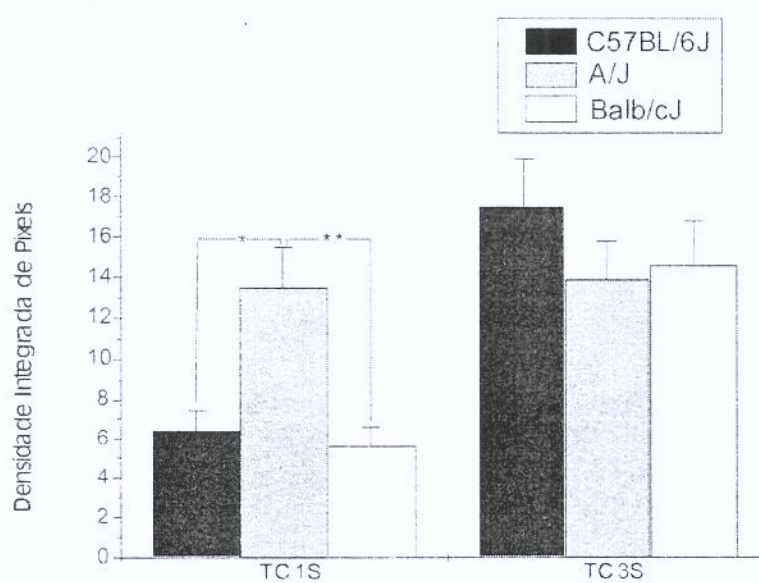


Figura 6 – Quantificação da imunomarcção para MHC classe I, uma (TC1S) e três semanas (TC3S), após a transecção do nervo ciático em camundongos C57BL/6J, A/J e Balb/cJ.

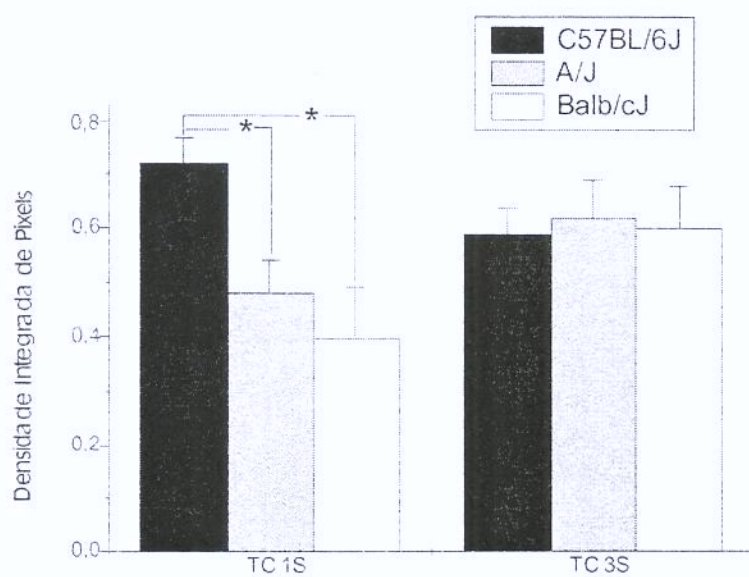


Figura 7 – Quantificação da imunomarcagem para Sinaptofisina, uma (TC1S) e três semanas (TC3S), após a transecção do nervo ciático em camundongos C57BL/6J, A/J e Balb/cJ.

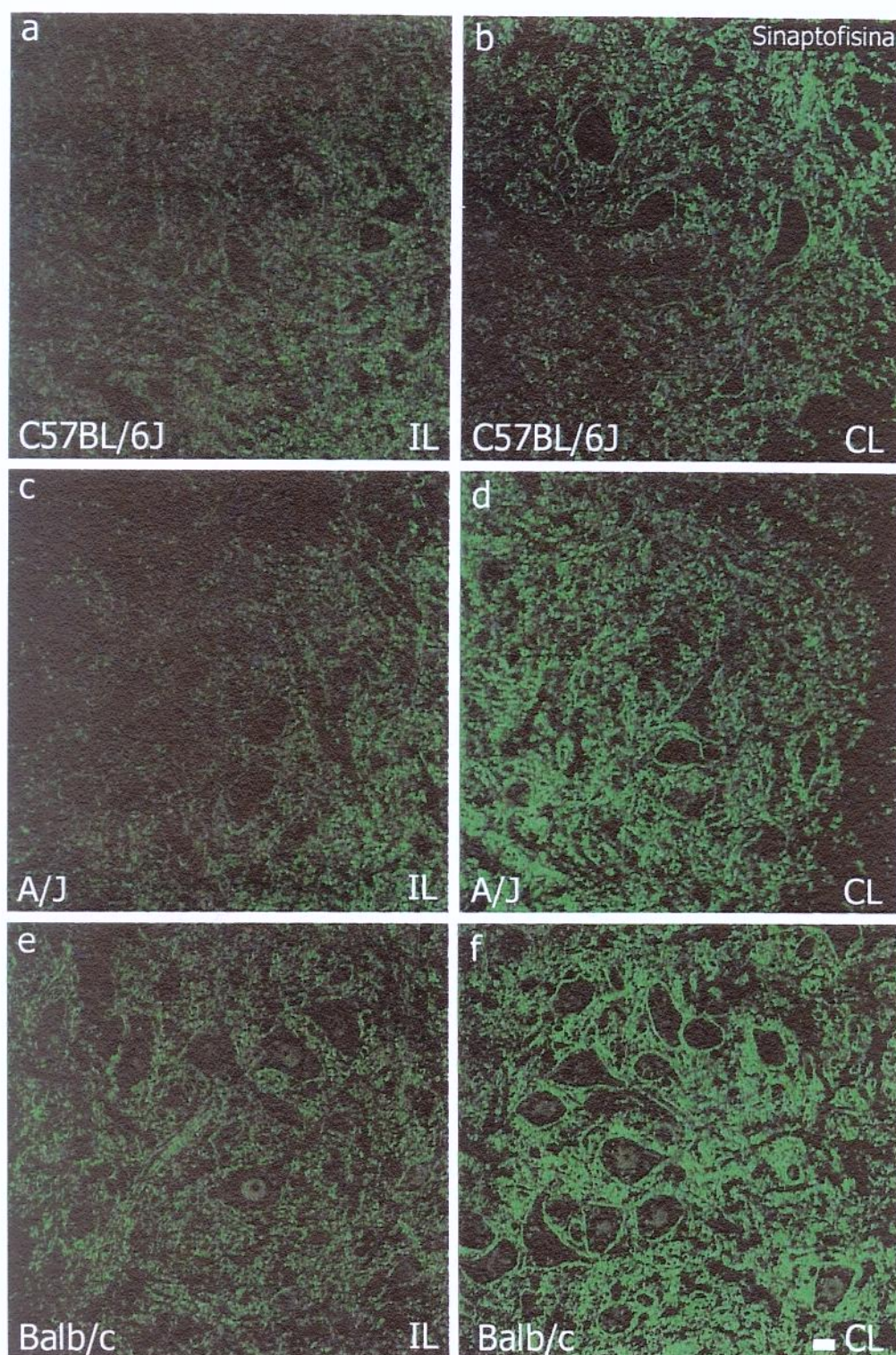


Figura 8 - Imunomarcacão para sinaptofisina, uma semana após a transecção do nervo ciático em camundongos C57BL/6J, A/J e Balb/c. IL – ipsilateral, CL – contralateral. Escala = 50 μ m.

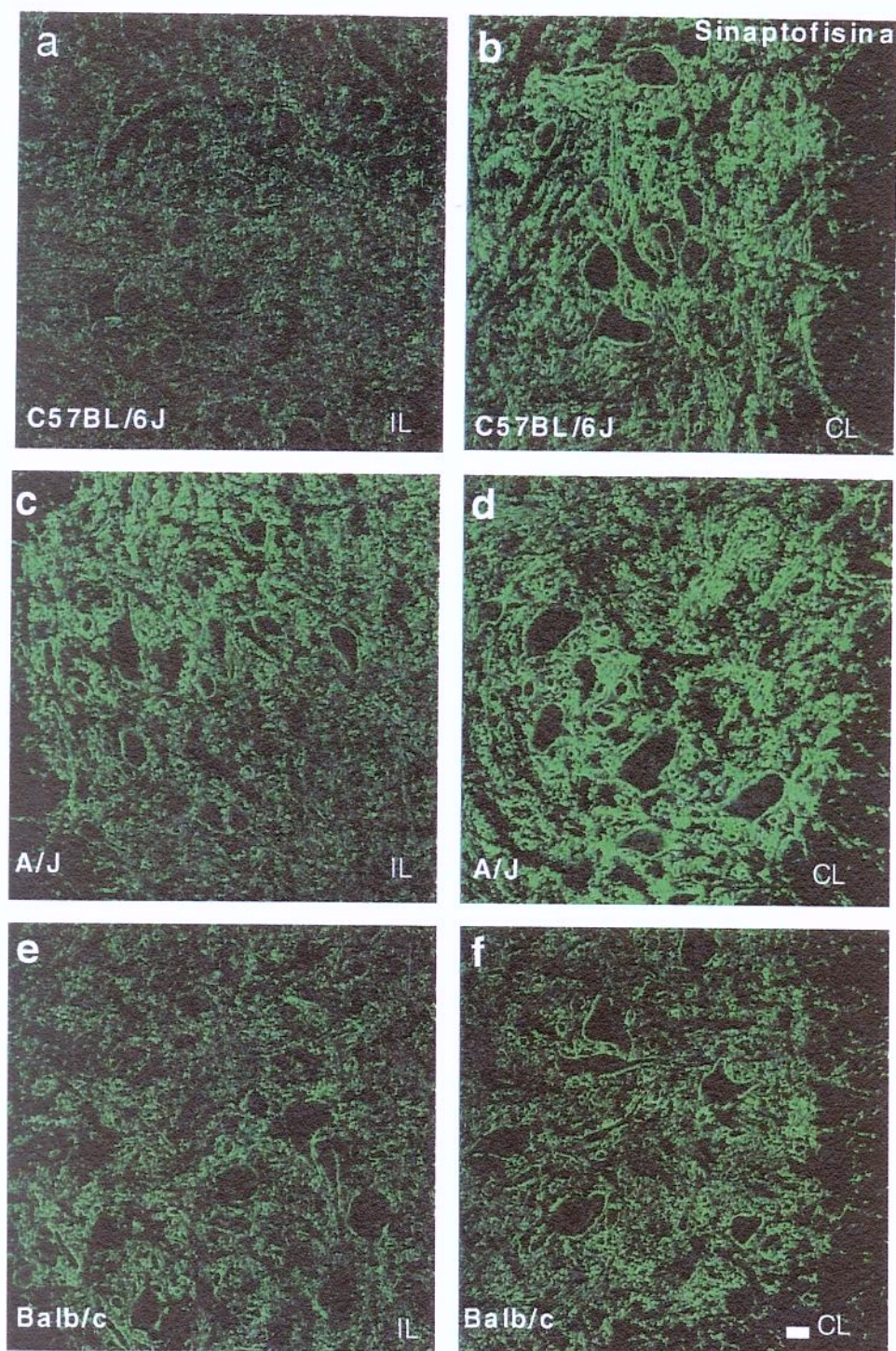


Figura 9 – Imunomarcacão para sinaptofisina, três semanas após a transecção do nervo ciático em camundongos C57BL/6J, A/J e Balb/cJ. IL – ipsilateral, CL – contralateral. Escala = 50 μ m.

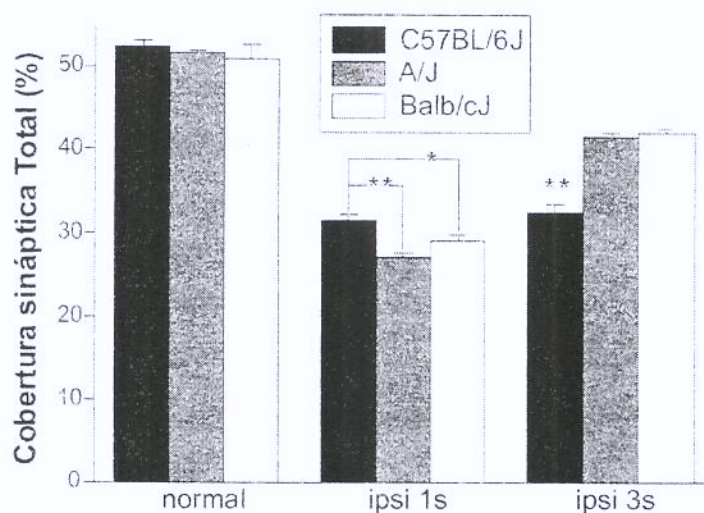


Figura 10 – Cobertura sináptica total nas linhagens C57BL/6J, A/J e Balb/cJ, em animais normais (normal/ não lesado), uma e três semana após axotomia unilateral do nervo ciático. O asterisco duplo (**) em Ipsi 1s, representa uma cobertura sináptica estatisticamente superior nos camundongos C57BL/6J, comparativamente à linhagem A/J ($p < 0,01$), e a linhagem Balb/cJ (asterisco (*); $p < 0,05$). Em Ipsi 3s, o asterisco duplo (**), representa cobertura sináptica estatisticamente inferior na linhagem C57BL/6J, quando comparada às demais linhagens ($p < 0,01$).

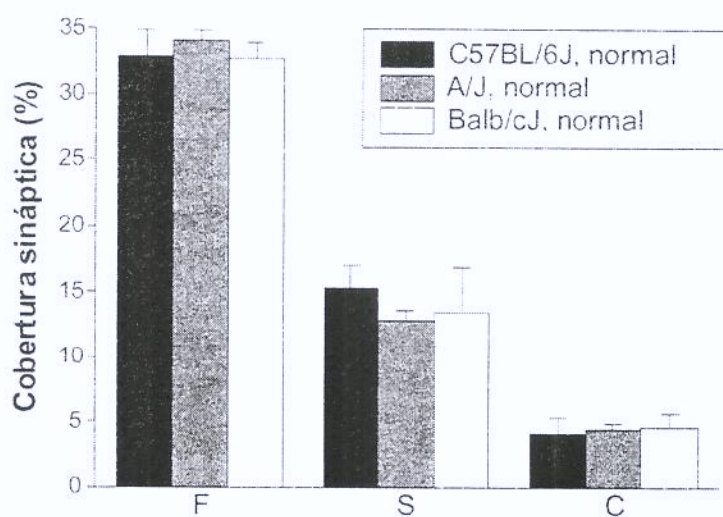


Figura 11 – Cobertura sináptica dos terminais F, S e C de animais normais (não lesados) das linhagens C57BL/6J, A/J e Balb/cJ. Observa-se que não existe diferença significativa entre os terminais sinápticos dos mesmos.

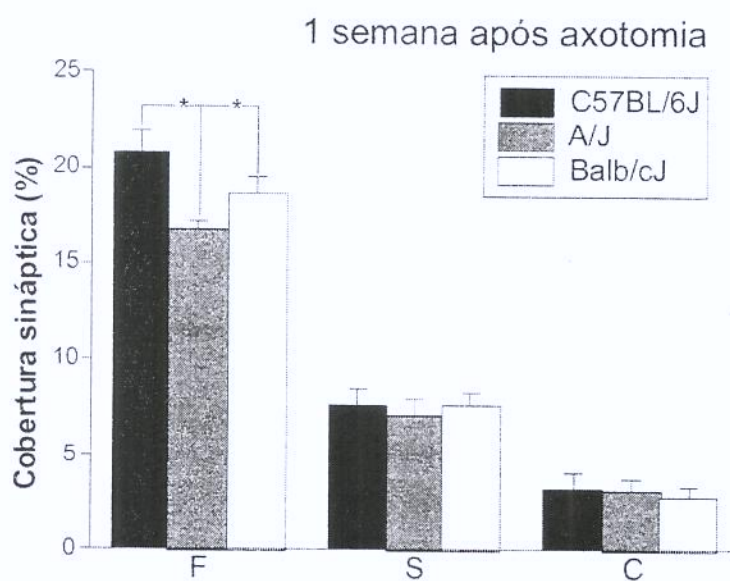


Figura 12 – Cobertura sináptica de terminais F, S e C nas linhagens C57BL/6J, A/J e Balb/cJ, 1 semana após axotomia unilateral do nervo ciático. O asterisco (*), representa cobertura sináptica dos terminais F (inibitórios) significativamente inferior na linhagem A/J, comparativamente às demais linhagens.

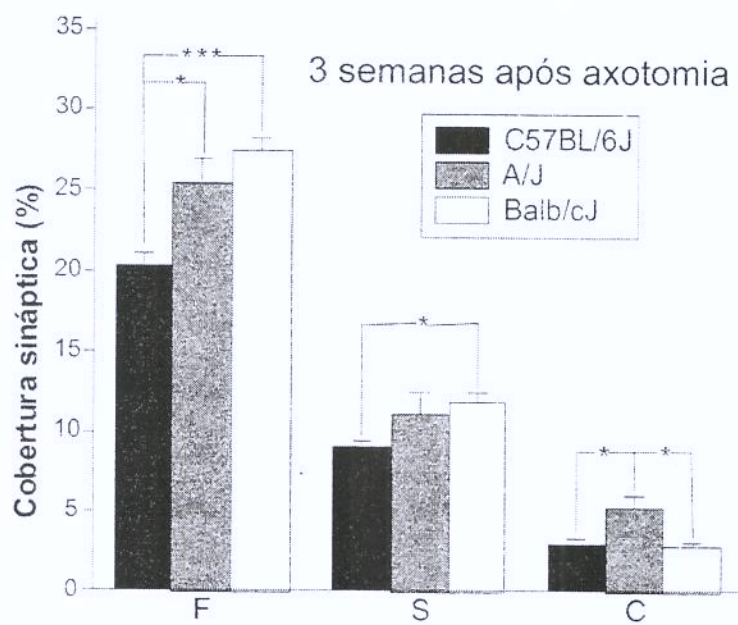


Figura 13 – Cobertura sináptica de terminais F, S e C nas linhagens C57BL/6J, A/J e Balb/cJ, 3 semanas após axotomia unilateral do nervo ciático. O asterisco triplo (***), representa cobertura sináptica dos terminais F (inibitórios) significativamente inferior na linhagem C57BL/6J, comparativamente à linhagem Balb/cJ ($p < 0,001$) e A/J(*), $p < 0,05$. Quanto aos terminais S, a linhagem C57BL/6J, apresentou cobertura sináptica estatisticamente inferior, comparativamente a linhagem Balb/cJ ($p < 0,05$), enquanto nos terminais C, a linhagem A/J apresentou cobertura sináptica superior comparativamente às demais ($p < 0,05$).

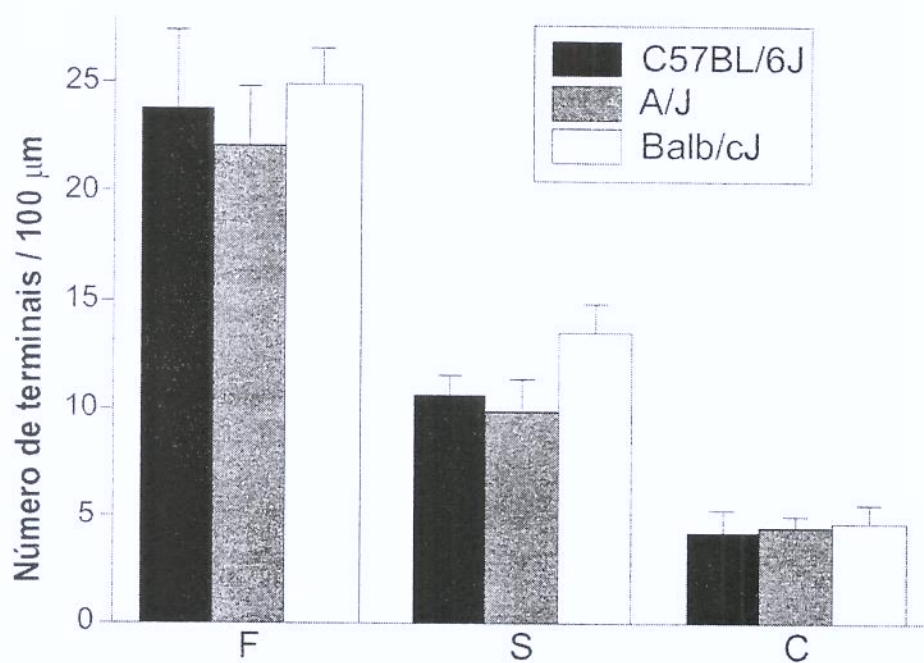


Figura 14 – Número de terminais sinápticos F, S e C/100μm de membrana em animais normais (não lesados) das linhagens C57BL/6J, A/J e Balb/cJ. Observa-se que não existe diferença significativa entre os terminais sinápticos dos mesmos.

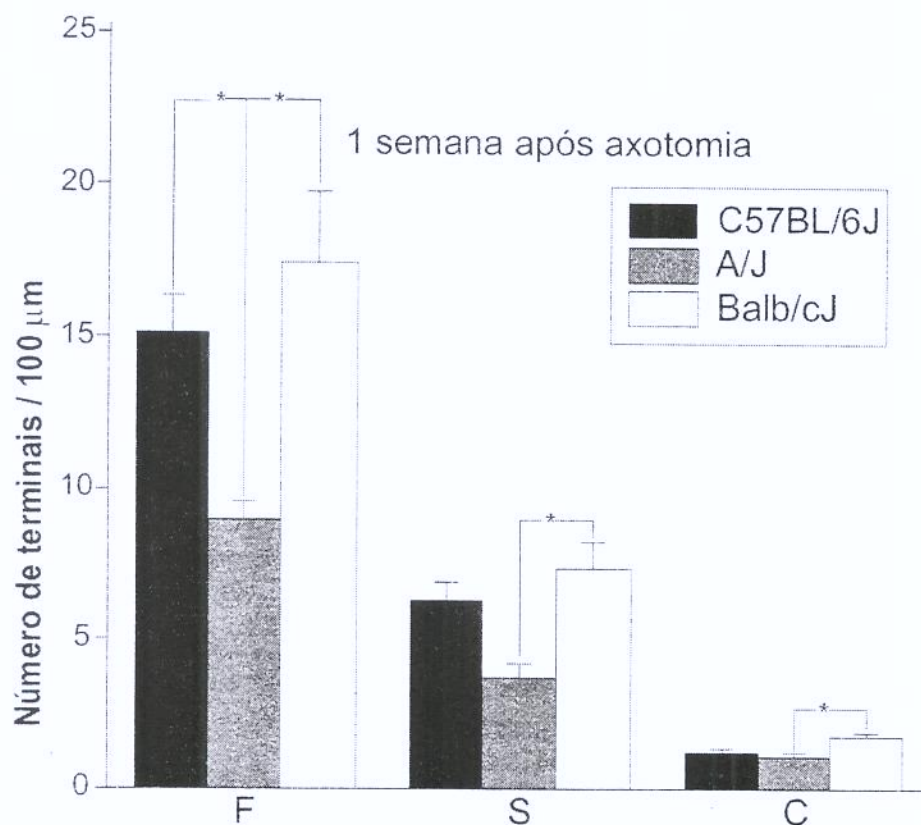


Figura 15 – Número de terminais sinápticos F, S e C/ 100 μ m de membrana, 1 semana após axotomia unilateral do nervo ciático. O asterisco (*), representa o número de terminais sinápticos dos tipos F (inibitórios), S (excitatórios) e C (colinérgicos) significativamente inferiores na linhagem A/J, comparativamente às demais linhagens.

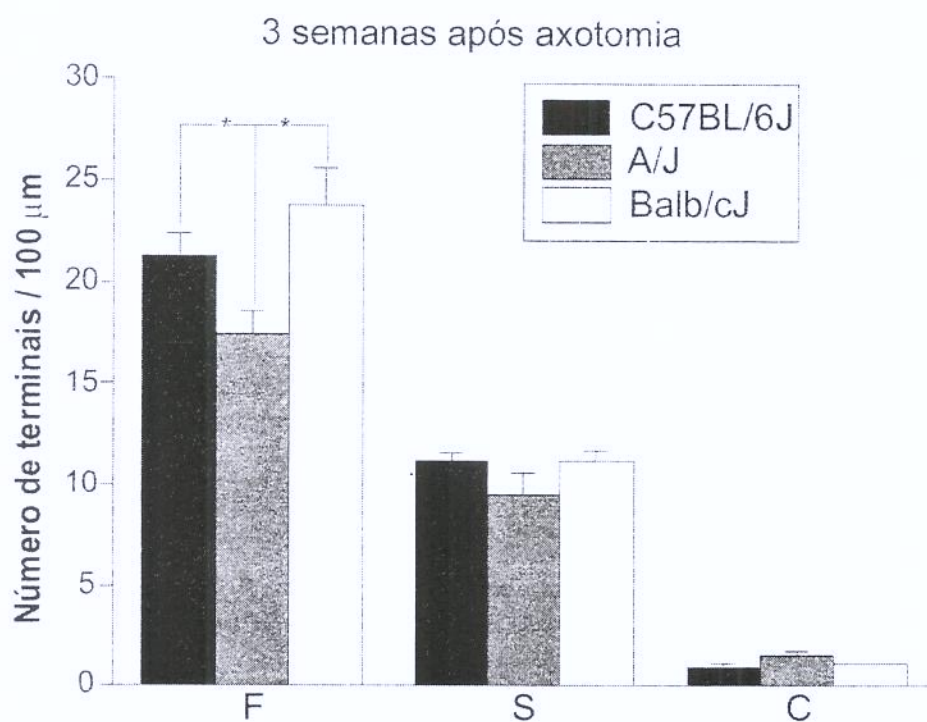


Figura 16 – Número de terminais sinápticos F, S e C/ 100μm de membrana, 3 semanas após axotomia unilateral do nervo ciático. O asterisco (*), representa o número de terminais sinápticos do tipo F (inibitórios), significativamente inferiores na linhagem A/J, comparativamente às demais linhagens.

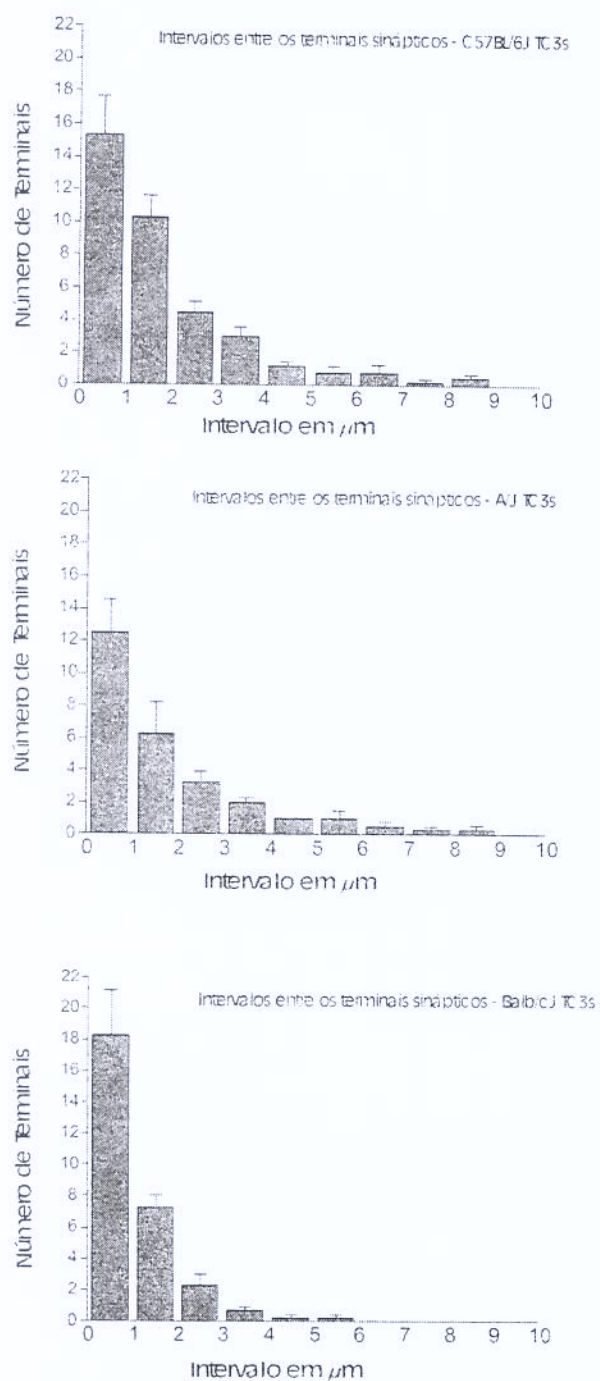


Figura 17 – Intervalos entre os terminais sinápticos das três linhagens isogênicas, após 3 semanas da transecção do nervo ciático.

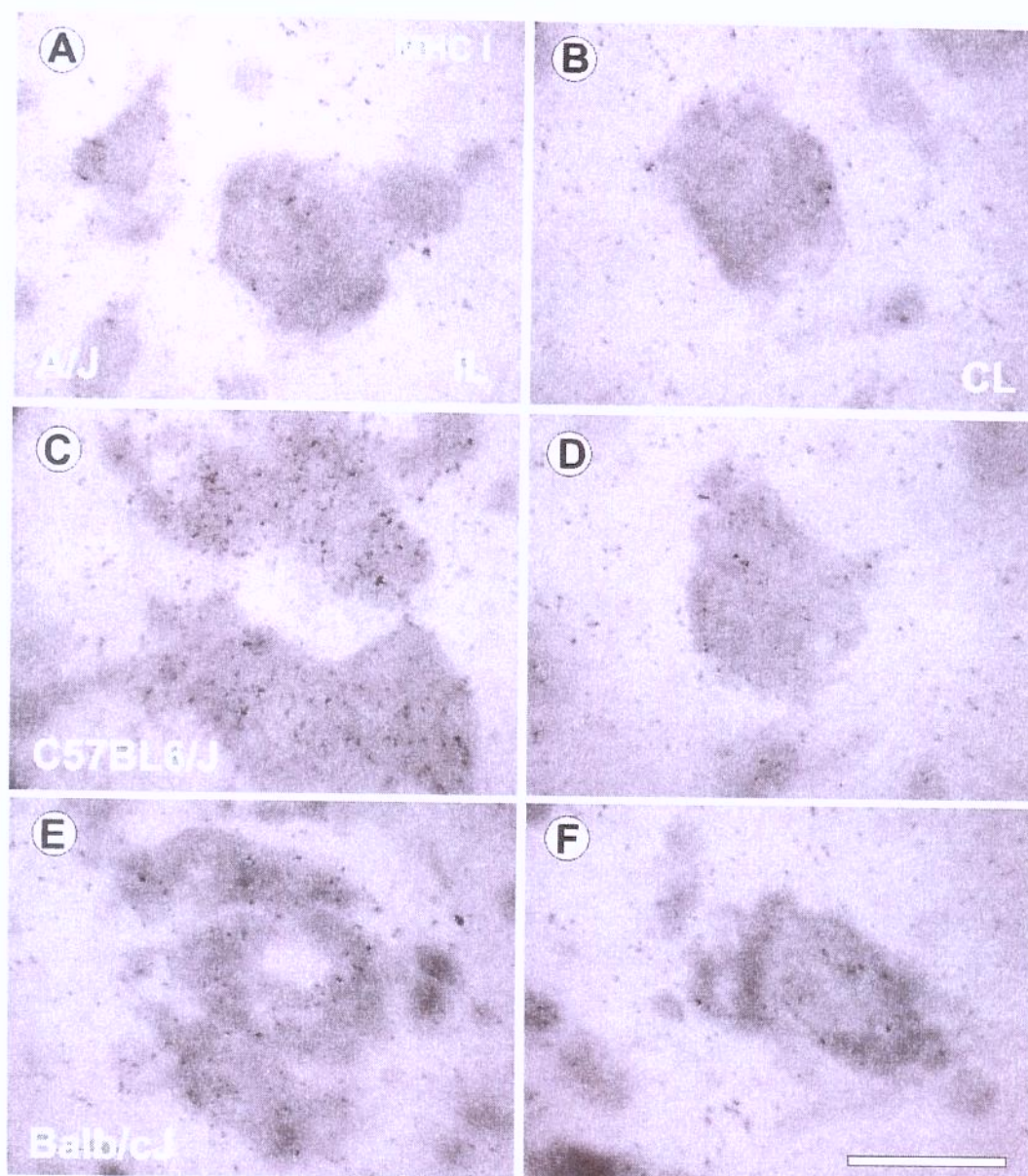


Figura 18 – Expressão de mRNA da proteína microglobulina beta 2, uma co-subunidade do MHC I, uma semana após a transecção do nervo ciático em camundongos C57BL/6J, A/J e Balb/cJ. IL – ipsilateral, CL – contralateral. Escala = 25 μ m.

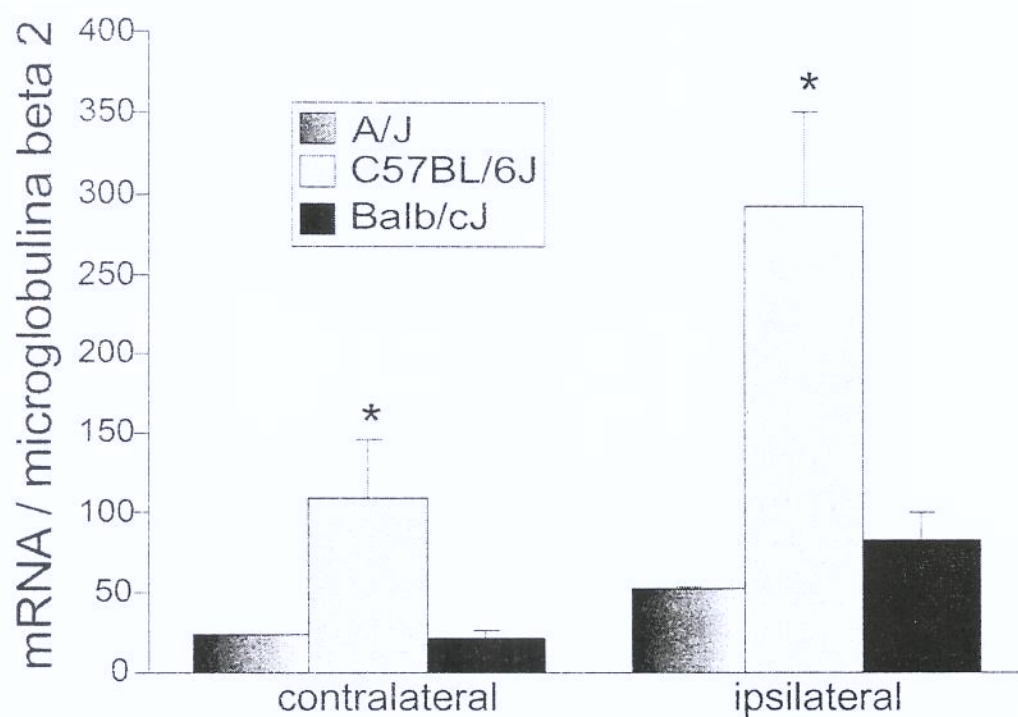


Figura 19 – Expressão de mRNA da proteína microglobulina beta 2, uma co-subunidade do MHC I, uma semana após a transecção do nervo ciático em camundongos C57BL/6J, A/J e Balb/cJ. IL – ipsilateral, CL – contralateral.

8. ANEXO



ELSEVIER

available at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

www.elsevier.com/locate/brainresBRAIN
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

Available online 22 May 2006

Keywords:

Spinal cord

Synapse elimination

Motoneuron

Glia

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 (Björnstrom and Kellerth, 1998; Lindé 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 (Deroche and Frocher, 2001; Deroche et al., 2002).

Interestingly, the role of glial cells may be dual. On one hand they become activated and phagocytose degenerating terminals (Bachmann 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 Kretzberg, 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 (Ladman 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: alr@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, spinal 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 ± 0.08 mean $\pm$ SEM, C57BL/6J, 2.36 ± 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 ± 0.28 mean $\pm$ SEM; C57BL/6J, 2.70 ± 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

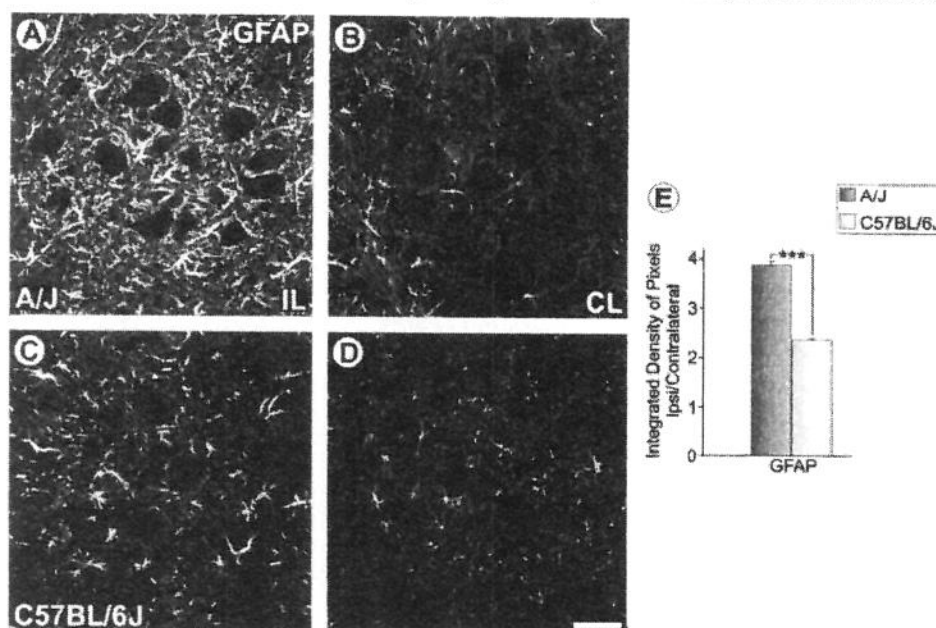


Fig. 1 - The in vivo expression of GFAP in astrocytes of the spinal cord from A/J and C57BL/6J mice. (A and C) Ipsilateral (IL, injured) side of the spinal cord 1 week after sciatic nerve transection; (B and D) Contralateral (CL, non-injured) side. The labeling of A/J astrocytes is especially intense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

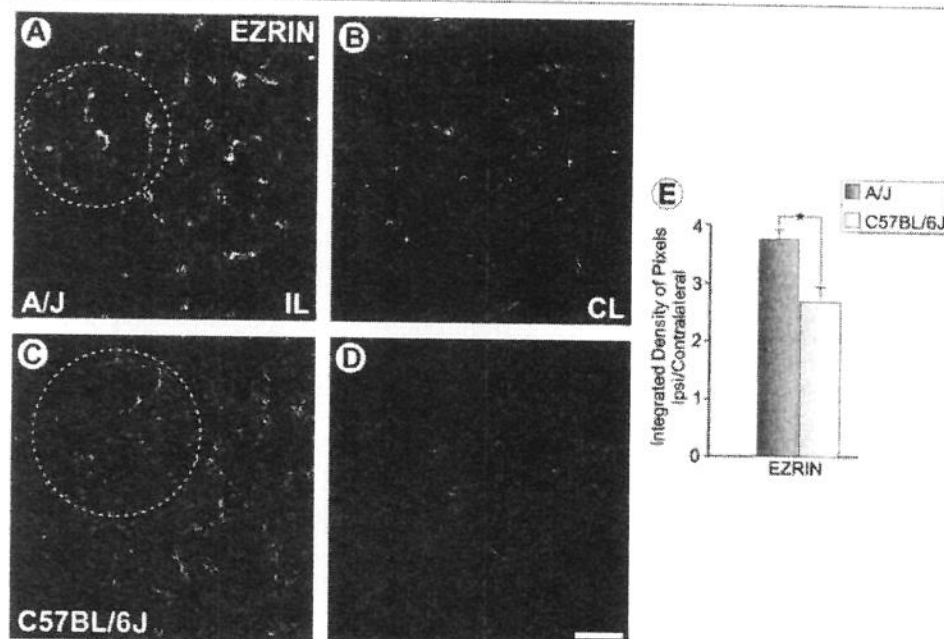


Fig. 2 - The *in vivo* expression of ezrin in anterior horn of the spinal cord from A/J and C57BL/6J mice. (A and C) Ipsilateral (IL, injured) side of the spinal cord 1 week after sciatic nerve transection; (B and D) Contralateral (CL, non-injured) side. Note that the ezrin labeling in A/J sciatic nucleus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

antibodies (Figs. 3D, E, G and I). 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 ± 1.63 mean $\pm$ SEM; C57BL/6J, 13.22 ± 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 ± 1.31 mean $\pm$ SEM; C57BL/6J, 13.95 ± 1.16 ; Student's *t* test, $P < 0.05$; Fig. 3I).

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

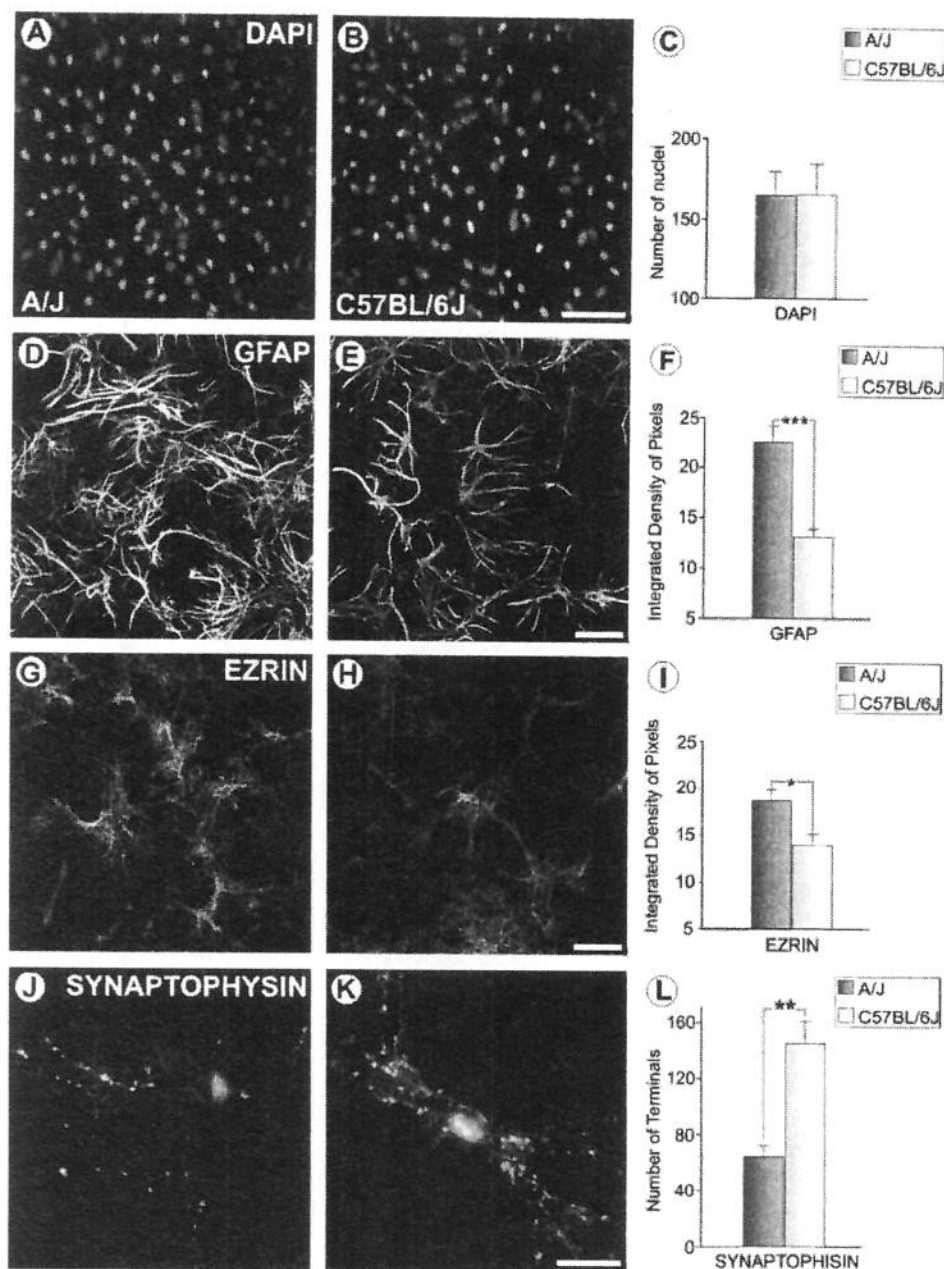
In order to assess the relationship between astrocyte reactivity and the synaptic elimination process after peripheral axotomy, quantitative measurements of the immunoreactivity of the synaptic protein synaptophysin were performed in the spinal cord motor nuclei of A/J and C57BL/6J mice. The

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 ± 0.06 mean $\pm$ SEM; C57BL/6J, 0.72 ± 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 ± 9.27 mean $\pm$ SEM; C57BL/6J, 145.61 ± 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/glial 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 (Amara and Fera, 2004; Shio and McCarthy, 1994; Walz, 1999), limiting the diffusion of different ions and neurotransmitters, and modulating neuronal excitability (Castonguay et al., 2001; Walz, 1999).

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 (Strömström and Kellerth, 1996; Aldskogius et al., 1999). These events have been related to 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 (Pier, et al., 1999). 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 (Sabo, 1999; Dong and Dennerlein, 2001; Spector and Prineas, 2001). Conversely, reactive gliosis may hinder the rewiring of lost connections and serve as scar tissue blocking axonal growth (Reier et al., 1999; Fewster and Asher, 1999).

In the present study, it was shown that the glial reaction may vary amongst mice strains, monitoring the data from the literature (Lundberg et al., 2001). 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 FERM (ezrin, radixin and moesin) proteins (Lopez Valle, 2003) found in the thinnest astrocytic processes (Detorche and Frouin, 2001). Such cell lamellar processes are of pivotal importance during the synapse elimination process. By electron microscopy, they have been shown to interdigitate between the retracted pre-synaptic terminal and the post-synaptic membrane (Gervais and Frouin, 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, *in vitro* 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 innervated 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 (± 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/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 (xylazine, Kening, 10 mg/kg) and Vetaser (ketamine, 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 μm .

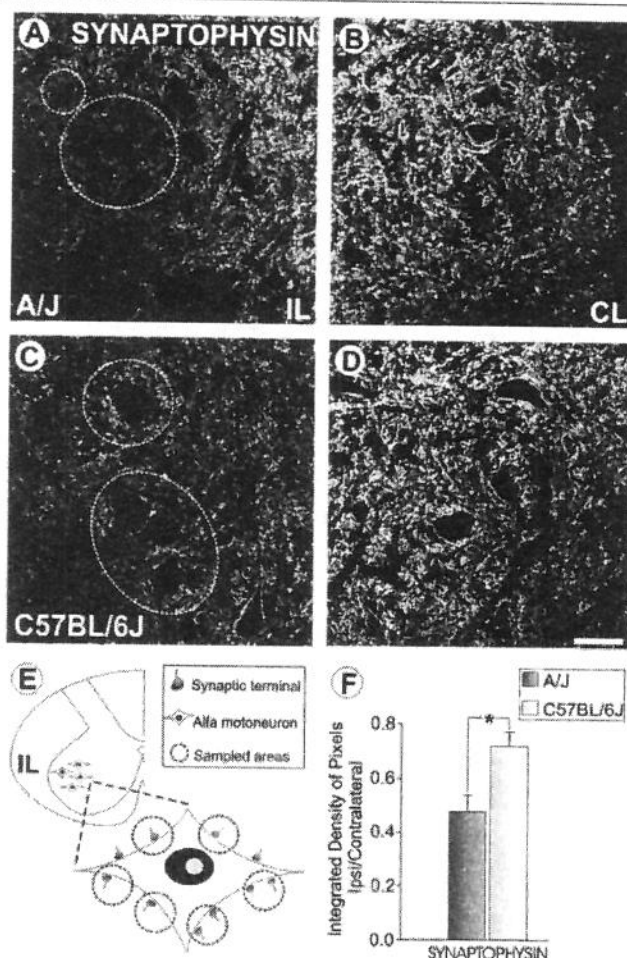


Fig. 4 – The in vivo expression of synaptophysin in the anterior horn of the spinal cord from A/J and C57BL/6J mice. (A and C) Ipsilateral (IP, injured) side of the spinal cord 1 week after transection of the sciatic nerve; (B and D) Contralateral (CL, non-injured) side. Observe the decrease in labeling 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 μ 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°C for cryostat sectioning (12 μ 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°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 1.33a, 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 cerebellar nodules of 1 to 2 day old (C57BL/6J and A/J mice, according to the method used by McCarthy and de Vellis (1987)). The animals were obtained from CEMEX/Intactop. Briefly, cortical hemispheres from neonatal mice were dissected out and, after removal of the meninges and blood vessels, were chopped and incubated in 0.25% 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 μ l/ml, Nutricell), nerve growth factor (NGF, 0.25 μ l/ml, Sigma), glucose (15 μ l/ml, Nutricell), insulin (1 μ l/ml, Sigma) and seeded in cell culture flasks (25 cm²). The resulting astrocyte primary cultures were kept in an incubator at 37 °C under an atmosphere of 5% CO₂ 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 (E14) 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-actin (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 actin 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 μ 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's *t* test for parametric data or with a two-tailed Mann-Whitney *U* test for non-parametric data or $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (**) and $P < 0.0001$ (***)

Acknowledgments

This work received a grant from FAPESP (proc. 03/08960-5), R.G. Zanon and A. Simandoni were supported by PhD scholarships from CAPES and CNPq/Brazil.

REFERENCES

- Andersson, H., Liu, L., Svensson, M., 1999. Glial responses to synaptic damage and plasticity. *J. Neurosci. Res.* 55, 33-41.
- Arque, A., Pera, G., 2004. Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia* 47, 241-249.
- Baba, A., 1995. Role of endothelin B receptor signals in reactive astrocytes. *Life* 60, 171-176.
- Beckmann, J., 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.
- Brannstrom, T., Koberle, J., 1996. Changes in synaptology of adult spinal motoneurons after axotomy. *Exp. Brain Res.* 173, 1-17.
- Castonguay, A., Levesque, S., Robitaille, R., 2001. Glial cells as active partners in synaptic functions. *Prog. Brain Res.* 132, 227-240.
- Derolache, A., Frotscher, M., 2001. Peripheral astrocyte processes: monitoring by selective immunostaining for the actin-binding F-actin proteins. *Glia* 36, 230-241.
- Derolache, A., Anlauf, E., Altmann, G., Muhlradt, B., Lavielle, M., 2002. Anatomical aspects of glia-synapse interaction: the perisynaptic glial sheath consists of specialized astrocyte compartment. *J. Physiol.* 540, 177-192.
- Deng, Y., Benveniste, E.M., 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180-190.
- Engel, A.K., Kreutzberg, G.W., 1983. 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., Ascher, P.A., 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* 46 (6), 377-391.
- Udman, O., Fradakis, M., Lycke, N., Olson, L., Olsson, T., Pien, F., 2002. Facial nerve lesion response: strain differences but no involvement of JNK-1, STAT3 or STAT6. *NeuroReport* 13 (13), 1539-1541.
- Urdahl, H., Pehl, Y., Dagerblad, A., Vergo, V.M., Arvidsson, U., Cullheim, S., Risling, M., Ulfhake, 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, 264-299.
- Louvet-Vallee, S., 2000. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Stem Cell* 18, 306-316.
- Lundberg, C., Lidman, O., Holmdahl, R., Olsson, T., Pien, F., 2001. Neurodegeneration and glia activation patterns after mechanical nerve injury are differentially regulated by MHC genes in congenic inbred rat strains. *J. Comp. Neurol.* 431, 39-57.
- McCarthy, K.D., de Vellis, J., 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 35 (2), 509-502.
- Obvesta, A.R., Trams, S., Lidman, O., Pien, F., Hökfelt, T., Korte, K., Lind, 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.
- Pien, F., Hammarberg, B., Hökfelt, T., Cullheim, S., 1993. 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., Ing, L.F., Jakeman, L., 1989. Reactive astrocyte and axonal outgrowth in the injured CNS: is glia really an impediment to regeneration? *Neural Reg. Transpl.* 6, 193-206.
- Ribotta, M.G., Privat, V.M., 2001. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. *Prog. Brain Res.* 152, 53-60.
- Song, Y., McCarthy, K.D., 1998. Plasticity of astrocytes. *Glia* 11 (2), 147-151.
- Watt, W., 1991. Role of cells in the regulation of the brain for environment. *Prog. Neurobiol.* 35, 309-350.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aldskogius H, Svensson M (1993). Neuronal and glial cell responses to axon injury. *Adv Struct Biol* 2:191-223.
2. Aldskogius H, Liu L, Svensson M (1999). Glial responses to synaptic damage and plasticity. *J Neurosci Res* 58:33-41.
3. Araque A, Perea G (2004). Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia* 47:241-248.
4. Baba A (1998). Role of endothelin B receptor in reactive astrocytes. *Life Sci* 62(17-18):1711-1715.
5. Barron KD (1983). Comparative observations on the cytologic reactions of central and peripheral nerve cells to axotomy. In: *Spinal cord reconstruction* (Kao CC, Bunge RP, Reier PJ, eds), pp7-39. New York: Raven Press.
6. Batchelor CL, Woodward AM, Crouch DH (2004). Nuclear ERM (ezrin, radixin, moesin) proteins: by cell density and nuclear import. *Exp. Cell Res* 296 (2): 208-222.
7. Blinzinger K, Kreutzberg G (1968). Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch* 85:145-157.
8. Bormann J (1988). Patch-clamp analysis of GABA- and glycine-gated chloride channels. *Adv Biochem Psychopharmacol* 45:47-60.
9. Brännström T, Kellerth JO (1998). Changes in synaptology of adult cat spinal alpha-motoneurons after axotomy. *Exp Brain Res* 118:1-13.
10. Castonguay A, Lévesque S, Robitaille R (2001). Glial cells as active partners in synaptic functions. *Prog Brain Res.*, 132: 227-240.
11. Chen DH, Chambers WW, Liu CN (1977). Synaptic displacement in intracranial neurons of Clarke's nucleus following axotomy in the cat. *Exp Neurol* 57:1026-1041.
12. Chvatal A, Sykova E (2000). Glial influence on neuronal signaling. *Prog Brain Res* 125: 199-216.
13. Conradi S (1969). Ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in the lumbosacral spinal cord of the adult cat. *Acta Physiol Scand Suppl* 332:5-48.

14. Corriveau RA, Huh GS, Shatz CJ (1998). Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron* 21(3):505-20.
15. Da-Silva CF, Pereira FC (1991). Differences in axon regeneration among strains of mice after nerve transection and entubulization repair. Third IBRO World Congress of Neuroscience, Montreal, Abstract, pág. 27.
16. Davies SJ, Goucher DR, Doller CSJ (1999). Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 19: 5810-5822.
17. Deitmer JW, Rose CR (1996). pH regulation and proton signalling by glial cells. *Pro Neurobiol* 48: 73-103.
18. Delgado-Garcia JM, Del Pozo F, Spencer RF, Baker R (1988). Behaviour of neurons in the abducens nucleus of the alert cat. III. Axotomized motoneurons. *Neuroscience* 24:143-160.
19. Derouiche A, Frotsher M (1991). Astroglial processes around identified glutamatergic synapses contain glutamine synthetase: evidence for transmitter degradation. *Brain Res* 552: 346-350.
20. 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.
21. Derouiche A, Frotsher M (2001). Preripheral astrocyte processes: Monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. *Glia* 36: 330-341.
22. 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.
23. Emirandetti A (2006). Atividade astrocitária e sua relação com as alterações sinaptológicas em camundongos de diferentes linhagens isogênicas após a transecção do nervo isquiático. Tese (Mestrado) – Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

- 24.Emirandetti A, Zannon RG, Sabha Jr M, Oliveira ALR (2006). Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. *Brain Research* 4: 35486-93.
- 25.Engel AK, Kreutzberg GW (1988). Neuronal surface changes in the dorsal motor nucleus of the guinea pig in response to axotomy. *J Comp Neurol* 275:181-200.
- 26.Faure S, Salazar-Fontana LI, Semichon M, Tybulewics VLJ, Bismuth G, Trautmann A, Germain RN, Delon J (2004). ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immun* 5 (3): 272-279.
- 27.Fawcett JW (1997). Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system. *Cell Tissue Res* 290: 371-377.
- 28.Giménez M e Ribotta, Menet V, Privat A (2001). The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. *Prog Brain Res* 132: 587-610.
- 29.Graeber MB, Kreutzberg GW (1986). Astrocytes increase in glial fibrillary acidic protein during retrograde changes of facial motor neurons. *J Neurocytol* 15: 363-373.
- 30.Grosche J, Matyasch V, Möller T, Verkhatsky A, Reichenbach A, Kattenmann H (1999). Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergman glial cells. *Nature Neurosci* 2: 139-143.
- 31.Hammaberg H (2000). Spinal motoneurons and molecules related to neurotrophic function after axon injury. Ph.D thesis, 83pp.
- 32.Hanson E (1994). Metabotropic glutamate receptor activation induces astroglial swelling. *J Biol Chem* 269: 21955-21961.
- 33.Hanson E, Rönnbäck L (1995). Astrocytes in glutamate neurotransmission. *FASEB J* 9: 343-350.

34. Hermansson M, Olson T, Westermark B, Funa K (1995). PDGF and its receptors following facial nerve axotomy in rats: expression in neurons and surrounding glia. *Exp Brain Res* 102: 415-422.
35. Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ (2000). Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290:2155-2158.
36. Hurley SD, Coleman PD (2003). Facial nerve axotomy in aged and young adult rats: analysis of the glial responses. *Neurobiol Aging* 24: 511-518.
37. Jarosinski KW, Massa PT (2002). Interferon regulatory factor-1 is required for interferon- γ -induced MHC class I genes in astrocytes. *J Neuroimmunol* 122:74-84.
38. Joly E, Mucke L, Oldstone MBA (1991). Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science* 253:1283-1285.
39. Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neurosci* 1: 683-692.
40. Koyama Y, Baba A (1999). Endothelin-induced protein tyrosine phosphorylation of cultured astrocytes: its relationship to cytoskeletal actin organization. *Glia* 26: 324-332.
41. Koyama Y, Takemura M, Fujiki K, Ishikawa N, Shigenaga Y, Baba A (1999). BQ788, an endothelin ET(B) receptor antagonist, attenuates stab wound injury-induced reactive astrocytes in rat brain. *Glia* 26(3):268-71.
42. Lainetti RD, Pereira FC, Da-Silva CF (1995). Reduced sensory neuron regeneration by C57BL/6J mice. *Br J Med Biol Res* 28: 781-785.
43. Lampson LA, Hickey WF (1986). Monoclonal antibody analysis of MHC expression in human brain biopsies; tissue ranging from histologically normal to that showing different levels of glial tumor involvement. *J Immunol* 136:4054-4062.

44. Lidman O, Olsson T, Piehl F (1999). Expression of nonclassical MHC class I (RT1-U) in certain neuronal populations of the central nervous system. *Eur J Neurosci* 11(12): 4468-4472.
45. Lidman O, Fraidakis M, Lycke N, Olson L, Olsson T, Pehl F (2002). Facial nerve lesion response; strain differences but no improvement of IFN- γ , STAT4 or STAT6. *Neuroreport* 13(13): 1589-1593.
46. Lindå H, Cullheim S, Risling M (1992). A light and electron microscopic study of intracellularly HRP-labelled lumbar motoneurons after intramedullary axotomy in the adult cat. *J Comp Neurol* 318:188-208.
47. Linda H, Hammarberg H, Cullheim S, Levinovitz A, Khademi M, Olsson T (1998). Expression of MHC class I and beta2-microglobulin in rat spinal motoneurons: regulatory influences by IFN-gamma and axotomy. *Exp Neurol* 150(2):282-95.
48. Linda H, Hammarberg H, Piehl F, Khademi M, Olsson T (1999). Expression of MHC class I heavy chain and beta2-microglobulin in rat brainstem motoneurons and nigral dopaminergic neurons. *J Neuroimmunol.* 101(1):76-86.
49. Lindå H, Shupliakov O, Örnung G, Ottersen OP, 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* 425:10-23.
50. Ljunggren HG, Kärre K (1990). In search for the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237-241.
51. Louvett-Vallée S (2000). ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol Cell* 92: 305-316.
52. Lu L, Richardson PM, Gervais F, Skamene E (1990). A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6J mice. *Brain Res* 510:144-146.
53. Lu X, Skamene E, Richardson PM (1994). Studies of axonal regeneration in C57BL/6J and A/J mice. *Brain Res* 652: 174-176.

54. MacCumber MW, Ross CA, Snyder SH (1990). Endothelin in brain: Receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2359-2363.
55. Maehlen J, Olsson T, Zachau A, Klareskog L, Kristensson K. Local enhancement of major histocompatibility complex (MHC) class I and expression and cell infiltration in experimental allergic encephalomyelitis around axotomized motor neurons. *J Neuroimmunol* 1989 Jul; 23(2):125-32.
56. McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, Zhang CL, Pearce RA, Chiu SY, Messing A (1996). Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (*Gfap*) alters neuronal physiology. *Neurobiol* 93: 6361-6366.
57. McCarthy KD, de Vellis J (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85(3):890-902.
58. McGraw J, Hiebert GW, Steeves JD (2001). Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J Neurosci Res* 63: 109-115.
59. Mucke L, Oldstone MBA (1992). The expression of major histocompatibility complex (MHC) class I antigens in the brain differs markedly in acute and persistent infections with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *J Neuroimmunol* 36:193-198.
60. Newman EA, Reichenbach A (1996). The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19: 307-312.
61. Noremborg MD, Martinez-Hernandez A (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161: 303-310.
62. Norton WT (1999). Cell reactions following acute brain injury: a review. *Neurochem Res* 24: 213-218.
63. Olié SH, Piet R, Poulain DA (2001). Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292: 923-926.
64. Oliveira ALR, 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.

65. Oliveira ALR (2001). Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice. *Braz J Med Biol Res* 34: 375-380.
66. Oliveira ALR, Thams S, Lidman O, Piehl F, Hökfelt T, Kärre K, Lindå H, Cullheim S (2004). A role for MHC class I in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(51): 17843-17848.
67. Pekny M (2001). Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin Knock-out mice. *Prog Brain Res* 132: 23-30.
68. Piehl F, Arvidsson U, Johnson H, Cullheim S, Dagerlind A, Ulfhake B, Cao Y, Elde R, Pettersson RF, 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.
69. 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.
70. Popratilof A, Kharazia VN, Weinberg RJ, Laonipon B, Rustioni A (1996). Glutamate receptors in spinal cord motoneurons after sciatic nerve transection. *Neuroscience* 74: 953-958.
71. Rall GF, Mucke L, Nerenberg M, Oldstone MBA (1994). A transgenic mouse model to assess the interaction of cytotoxic T lymphocytes with virally infected, class I MHC-expressing astrocytes. *J Neuroimmunol* 52:61-68.
72. Reier PJ, Eng LF, 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.
73. Roberts RC, Du, F, McCarhy KE, 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.
74. Rogers SD, Christopher MP, James DP, Hiromi H, Joseph RG, Patrick WM (2003). Endothelin B receptors are expressed by astrocytes and regulate astrocyte hypertrophy in the normal and injured CNS. *Glia* 41: 180-190.
75. Rohlmann A, Laskawi R, Hofer A, Dermietzel R, Wolff JR (1994). Astrocytes as rapid sensors of peripheral axotomy in the facial nucleus in rats. *Neuroreport* 5: 409-412.

76. Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncel RW (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-725.
77. Rusakov DA, Kullmann DM (1998). Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *J Neurosci* 18: 3158-3170.
78. Sazaki Y, Takimoto M, Oda K, Fruh T, Takai M, Okada T, Hori S (1997). Endothelin evokes efflux of glutamate in cultures of rat astrocytes. *J Neurochem* 68: 2194-2200.
79. Schools GP, Kimelberg HK (1999). mGluR3 and mGluR5 are the predominant metabotropic glutamate receptor mRNAs expressed in hippocampal astrocytes acutely isolated from young rats. *J Neurosci Res* 58: 533-543.
80. Shao Y, McCarthy KD (1994). Plasticity of astrocytes. *Glia* 11:147-155.
81. Spacek J (1985). Three-dimensional analysis of dendritic spines. III. Glial sheets. *Anat Embryol* 171: 245-252.
82. Stensaas LJ, Partlow LM, Burgees PR, Horch KW (1987). Inhibition of regeneration: the ultrastructure of reactive astrocytes and abortive axon terminals in the transition zone of the dorsal root. *Reg Prog Brain Res* 71: 457-468.
83. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1989). Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 21(2-3):117-23.
84. Svenson M, Liu L, Mattsson P, Morgan BP, Aldskogius H (1995). Evidence for activation of the terminal pathway of complement and upregulation of sulfated glycoprotein (SGP)-2 in the hypoglossal nucleus following peripheral nerve injury. *Mol Chem Neuropathol* 24: 53-68.
85. Sumner BEH (1975). A quantitative analysis of the response of presynaptic boutons to postsynaptic motor neuron axotomy. *Exp Neurol* 49:406-417.
86. Tetzlaff W, Graeber MB, Bisby MA, Kreutzberg GW (1988). Increased glial fibrillary acidic protein synthesis in astrocytes during retrograde reaction of the rat facial nucleus. *Glia* 1: 90-95.
87. Tseng GF, Hu ME (1996). Axotomy induces retraction of the dendritic arbor of adult rat rubrospinal neurons. *Acta Anat* 155:184-193.

88. 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.
89. 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.
90. Vandenbranden CAV, Verweij J, Kamermans M, Müller LJJM, Ruijter JM, Vrensen GFJM, Spekrijse H (1996). Clearance of neurotransmitter from the cone synaptic cleft in goldfish retina. *Visual Res* 36: 3859-3874.
91. Verkhratsky A, Steinhauser, C (2000). Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev* 32: 380-412.
92. Vernadakis A (1996). Glia-Neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 49: 185-214.
93. Wekerle H (2005). Planting and pruning in the brain: MHC antigens involved in synaptic plasticity? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(1): 3-4.
94. Wolff JR (1970). Quantitative aspects of astroglia. In: *Proceedings of the sixth international congress of neuropathology*. Paris: Masson; p. 327-352.
95. Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1999). Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins. *J Cell Biol* 145 (7): 1497-509.