

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA  
DE  
PÓS-GRADUAÇÃO  
I. B

Cristiane Lucía Rodríguez de la Hoz

ESTUDO DA DEGENERAÇÃO WALLERIANA  
EM CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS DAS LINHAGENS  
C57BL/6J E A/J

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Cristiane Lucía</u> <u>Rodríguez de la Hoz</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
---

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

Orientador: Prof.Dr. Francesco Langone

UNIDADE	BE
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	R618e
V	
TOMBO	48951
PROC.	16-837/02
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10/05/02
Nº CPD	

ii

CM00167280-9

IB ID 239955

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

~~H856e~~

R618e

Hoz, Cristiane Lucia Rodríguez de la  
Estudo da degeneração Walleriana em camundongos isogênicos das  
linhagens C57BL/6J e A/J / Cristiane Lucia Rodríguez de la Hoz. --  
Campinas, SP:[s.n.], 2002.

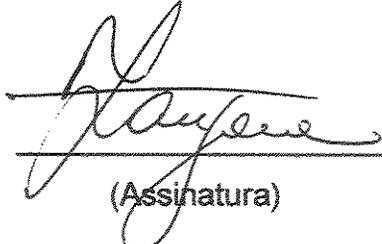
Orientador: Francesco Langone  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia

1. Degeneração. 2. Óxido nítrico. 3. Microscopia confocal.  
I. Langone, Francesco. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 11/01/2002

**Banca examinadora**

**Prof. Dr. Francesco Langone (Orientador)**



(Assinatura)

**Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari**



(Assinatura)

**Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos**



(Assinatura)

**Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz**

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

11/01/2002

---

## Boa Fortuna (Cavalos Corredores)

Era como se nada pudesse impedir  
aqueles lindos cavalos  
de atravessarem os  
campos  
selvagens e indomáveis  
como eles...

Na sua força  
tão grande quanto a natureza  
Na sua fragilidade  
tão grande quanto a natureza...

assim se fez  
o caminho da perseverança

e percorrendo dias e noites  
incansáveis como aqueles lindos cavalos  
nós  
também o trilhamos

No caminho da perseverança  
Somos fortes  
Somos frágeis  
como eles  
e toda a natureza...

Dedicado à toda minha família  
e ao meu marido.

---

## AGRADECIMENTOS

Ao meu grande professor e orientador Francesco, pela confiança, apoio e amizade nestes meus primeiros passos como pesquisadora.

Aos professores membros da banca examinadora pelas acertadas e valiosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento desta tese.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular e de outros departamentos por expandirem a minha visão sobre pesquisa em biologia.

À professora Iara e ao professor Hernandes pelo apoio e disposição em me ensinarem novas técnicas e metodologias, e por contribuírem com meu amadurecimento pessoal e profissional durante estes anos.

Ao Nori e ao Marquinhos do Departamento de Anatomia, pelo apoio incondicional desde o início da minha jornada como pesquisadora.

À Ana, Lurdes, Marlene e Silvia, pela amizade, companhia e pelas boas risadas.

Ao Sr. Carlos, pela sinceridade e proteção.

À Liliam e ao Sidnei pelo dom de tornar tudo mais fácil.

À Sra. Zefa por cuidar dos meus camundonginhos.

À Luciana Le Sueur, Luciana Lourenço e Elaine de Oliveira, pela disposição em ajudar-me quando precisei.

Aos amigos do curso de pós-graduação, Crô, Ká, Cris, Silvana, Silvane, Ju, Paty, Márcia, Sílvia, Helô, Júnior, Claudio, Ana, pelo companheirismo e cumplicidade.

Aos amigos do laboratório de Neurobiologia e do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Claudia, Vanessa, André, Aníbal, Ivana, Gi, Mércia e Fábio por estarem ao meu lado nos momentos alegres e difíceis.

Às amigas Marcinha, Dani, Celina, Pauletes, Rê, Parô, e todos da turma 94, simplesmente inesquecíveis.

Aos amigos Alexandre, Célia e Felipe, pelo grande apoio e pelos conselhos.

Aos amigos do Tai chi chuan por entrarem em minha vida.

Aos eternos amigos Sandy, Mari, Ká, Rê, Laura, Edu e Daniel, sempre dispostos a me ouvir e a me encorajar.

À Sra Arethusa, Adriana, Erik e Mildred, pelo carinho e apoio para seguir adiante.

Ao meu pai Jorge, minha mãe Lucía e minhas irmãs Carina y Monica, por me darem todo o apoio, amor e carinho que alguém pode querer.

Ao meu marido Ephraim, pelo seu amor, paciência e pelas sessões de acupuntura.

À UNICAMP pela minha formação na carreira acadêmica desde a graduação e por dar-me a oportunidade de conhecer tantas pessoas especiais.

À FAPESP pela concessão da bolsa de iniciação científica (onde tudo começou...)

À CAPES pela concessão da bolsa durante o curso de mestrado.

---

**SUMÁRIO**

<b>Resumo .....</b>	<b>viii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>x</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>03</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
<b>4. Artigo 1.....</b>	<b>19</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>21</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>22</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>24</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>27</b>
<b>Discussão e Conclusão.....</b>	<b>30</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>35</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>40</b>
<b>5. Artigo 2.....</b>	<b>48</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>50</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>51</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>52</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>55</b>
<b>Discussão e Conclusão.....</b>	<b>56</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>61</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>64</b>
<b>7. Conclusões gerais.....</b>	<b>71</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>72</b>

## RESUMO

A axotomia em um nervo periférico leva ao desencadeamento do processo degenerativo na porção distal à lesão, denominado degeneração Walleriana (DW). Macrófagos e células de Schwann fagocitam e removem os axônios e a mielina em degradação. Além disso, tais células também são responsáveis pela preparação do microambiente adequado à regeneração axonal, através da produção de moléculas com propriedades neurotróficas e neurotóxicas. Dentre essas moléculas destacam-se as citocinas, produzidas principalmente pelos macrófagos, os fatores neurotróficos e componentes da matriz extracelular, produzidos pelas células de Schwann. Recentemente, foram obtidas evidências de que o óxido nítrico (NO) estaria também envolvido no desenvolvimento da DW e, conseqüentemente, no processo de regeneração axonal. Contudo, pouco ainda se sabe sobre a participação dos macrófagos e células de Schwann na produção do NO no decurso da DW.

Alguns trabalhos relataram que camundongos adultos da linhagem C57BL/6J apresentam menor capacidade regenerativa axonal, após lesão do nervo ciático, quando comparados a outras linhagens isogênicas. O objetivo deste trabalho foi investigar possíveis diferenças no padrão temporal degenerativo das linhagens C57BL/6J e A/J, utilizando o modelo de seção do nervo ciático e impedindo-o de regenerar. Neste sentido, analisamos inicialmente o desaparecimento dos neurofilamentos axonais, a fragmentação e degradação da bainha de mielina e a atividade da NADPH-diaforase no coto distal do nervo após 1, 3, 5 e 7 dias da axotomia. A quantificação estereológica dos neurofilamentos marcados imunoistoquimicamente mostrou que a defosforilação e degradação são mais precoces na linhagem C57BL/6J do que na linhagem A/J. A histoquímica do *Sudan Black* não revelou diferenças temporais na fragmentação da bainha de mielina entre as linhagens. Porém, evidenciou a presença de um maior número de células envolvidas na degradação da mielina nos camundongos C57BL/6J, 3 e 5 dias após a lesão. Por sua vez, a técnica histoquímica para NADPH-diaforase, indicadora da produção de NO, revelou que células presentes no coto distal em degeneração expressaram atividade NADPH-diaforase do 1º ao 7º dia após axotomia, em ambas

as linhagens. Contudo, 5 dias após a lesão, as células NADPH-diaforase positivas na linhagem C57BL/6J apresentaram, predominantemente, uma marcação intensa e bem delimitada, ao passo que na linhagem A/J foram mais abundantes aquelas com marcação granular e dispersa.

Com o objetivo de melhor compreender a participação do NO na DW, utilizamos técnicas de imunofluorescência e microscopia confocal para identificar as células envolvidas na produção de NO e também analisar a expressão temporal e espacial da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) após a seção do nervo ciático. Observou-se que a imunoreatividade para iNOS foi intensa em macrófagos e menos evidente nas células de Schwann, estando presente em ambos tipos celulares desde o 1º ao 7º dia após a lesão, para ambas linhagens. Contudo, os macrófagos constituíram o mais abundante contingente celular expressando iNOS. Além disso, na linhagem C57BL/6J parece ter havido um ligeiro retardo para o início do recrutamento e ativação dos macrófagos quanto à expressão de iNOS no decorrer da DW, comparativamente à linhagem A/J.

Nossos resultados revelaram diferenças entre as linhagens A/J e C57BL/6J quanto a importantes eventos da DW e que parecem refletir diferentes propriedades intrínsecas dos axônios, bem como diferenças comportamentais em algumas células, talvez sob a ação de citocinas. Tais diferenças entre as linhagens devem ser consideradas em trabalhos de degeneração e regeneração nervosa periférica.

---

## **ABSTRACT**

Axotomy of a peripheral nerve leads to a degenerative process in the distal stump known as Wallerian degeneration (DW), in which macrophages and Schwann cells participate in phagocytosis of axon and myelin debris. Such cells are also responsible for preparing a favorable microenvironment to axonal regeneration through production of neurotrophic and neurotopic substances. Among these substances are cytokines produced mostly by macrophages and neurotrophic factors and components of extracellular matrix produced by Schwann cells. Recently, evidence emerged showing that nitric oxide (NO) would also be involved in DW and, consequently in the axonal regeneration process. However, participation of macrophages and Schwann cells in NO production during DW remains to be investigated.

It has been reported in the literature that adult C57BL/6J mice have a lower axonal regeneration potential after sciatic nerve lesion when compared to other isogenic strains. The aim of this work was to investigate possible differences in time course of some events in DW process between C57BL/6J and A/J strains, by using complete sciatic nerve transection model with prevented axonal regeneration. First, we studied the time course of neurofilament breakdown, fragmentation and clearance of myelin sheath and NADPH-diaphorase activity in the distal stump, 1, 3, 5, and 7 days after axotomy. The stereological analysis of immunoreactive neurofilaments showed that the dephosphorylation and degradation process of these elements in C57BL/6J strain is faster than in A/J strain. On the other hand, Sudan Black histochemistry did not show differences between strains as regards the time course of myelin sheath fragmentation. However, it was evident that a higher number of cells were involved in myelin degradation in C57BL/6J mice at 3 and 5 days post-surgery. NADPH-diaphorase histochemistry, a marker for NO production, showed positive-cells in the distal stump of both strains from the first to the seventh day after lesion. Positive-cells in C57BL/6J strain showed predominantly an intense and well defined labeling 5 days after transection, while in A/J strain granular and dispersed labeling were more abundant. With the goal of better understanding NO involvement in DW, immunofluorescence techniques and confocal microscopy were used to identify cells

related to NO production and to examine the spacial and temporal expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) after sciatic nerve transection. Immunoreactivity for iNOS was intense in macrophages and less evident in Schwann cells, but it was present in both cells from the first to the seventh day after transection in both strains. Macrophages were the main source of iNOS. We noted a delay in macrophage recruitment and activation of iNOS expression in the distal stump of C57BL/6J mice when compared to A/J mice.

These differences in DW between C57BL/6J and A/J mice may reflect intrinsic properties of axons and/or behavioral differences in some cells, probably due influence of cytokines. These differences between strains should be taken into account in studies of degeneration and regeneration of the peripheral nervous system.

## 1. INTRODUÇÃO

A seção de um nervo periférico produz alterações morfofuncionais observáveis proximal e distalmente à lesão. Na porção distal, essas alterações constituem o processo degenerativo denominado “degeneração Walleriana” (DW), inicialmente descrito por Waller em 1850, e que se caracteriza pela degradação dos axônios e das bainhas de mielina. Os neurofilamentos, principais componentes do citoesqueleto axonal, são degradados por proteases neutras ativadas por cálcio (calpaínas), resultando na segmentação do axolema (Schlaepfer, 1987; Griffin e Hoffman, 1993). Concomitantemente, o contato entre axônio e células de Schwann é perdido e ocorre a fragmentação e degeneração da bainha de mielina.

Durante estes eventos da DW, macrófagos são intensamente recrutados da circulação periférica para o coto distal, onde fagocitam e degradam os resíduos axonais e de mielina, além de produzir enzimas e citocinas (para revisão vide Brück, 1997). As células de Schwann também participam da degradação da mielina e interagem com os macrófagos, alterando a expressão e/ou liberação de citocinas e fatores neurotróficos importantes para a sobrevivência e regeneração neuronal (Stoll *et al.*, 1989, Fernandez-Valle, 1995, para revisão vide Terenghi, 1999). As células de Schwann entram em mitose, formam as bandas ou cordões de Büngner e aumentam a produção de componentes da matriz extracelular e a expressão de diferentes tipos de moléculas de adesão, capazes de estimular e orientar o crescimento dos neuritos em regeneração (Ide *et al.*, 1983; Fawcett e Keynes, 1990; De Vries, 1993; Griffin e Hoffman, 1993; Rutishauser, 1993; Müller e Stoll., 1998).

Alguns autores relataram uma deficiência regenerativa axonal na linhagem de camundongos C57BL/6J quando comparada a outras linhagens isogênicas, envolvendo neurônios sensitivos, porém ainda não existem dados conclusivos sobre as causas dessa diferença (Lu *et al.*, 1990; Lainetti *et al.*, 1995; Oliveira, 2001).

Dada a grande influência exercida pelo processo de DW no processo de regeneração nervosa periférica, a linhagem C57BL/6J torna-se um interessante modelo para estudo dos eventos degenerativos e regenerativos.

Dentro deste contexto, deve-se ter em conta também a participação do óxido nítrico (NO). Embora o envolvimento desta molécula nos processos degenerativos e regenerativos do sistema nervoso seja muito estudado, seu papel na DW e na regeneração de nervos periféricos ainda não está definido, gerando dados conflitantes (Verge *et al.*, 1992; Wu, 1996; Hindley *et al.*, 1997; Yu, 1997; Levy e Zochodne, 1998; González-Hernández e Rustioni, 1999, Levy *et al.*, 1999, Zochodne *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 2001). Trata-se de um radical-livre produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), capaz de formar espécies altamente reativas como, por exemplo, o peroxinitrito, e atuar na peroxidação lipídica, degradação de proteínas e de DNA (para revisão ver Lancaster e Stuehr, 1996; Dawson e Dawson, 1996). Por outro lado, alguns trabalhos têm também atribuído ao NO um envolvimento na sobrevivência neuronal através de sua interação com outras moléculas neurotróficas (Fiallos-Estrada *et al.* 1993; Farinelli *et al.*, 1996; White *et al.*, 1996; Thippeswamy e Morris, 1997).

Essas diferentes atuações do NO transpostas ao microambiente do nervo lesado devem ter importantes implicações no processo degenerativo e regenerativo, ainda pouco exploradas.

Considerando-se que o melhor entendimento da biologia dos processos degenerativos e regenerativos no sistema nervoso contribuirá para o desenvolvimento de terapêuticas das lesões nervosas periféricas, o presente trabalho teve como intuito comparar alguns eventos durante a DW entre as linhagens de camundongos isogênicos C57BL/6J e A/J, buscando uma possível correlação com a deficiência regenerativa axonal relatada para a linhagem C57BL/6J.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### **A fibra nervosa**

Denomina-se fibra nervosa à associação entre o axônio com o neurilema ou bainha de Schwann. As fibras podem ser mielínicas ou amielínicas, dependendo da presença ou não da bainha de mielina envolvendo o axônio, respectivamente. No sistema nervoso periférico, as células de Schwann (CS) são responsáveis pela mielinização dos axônios, sendo que cada célula associa-se a um único axônio. No caso de axônios amielínicos, uma CS envolve vários axônios com suas projeções citoplasmáticas e não forma a mielina.

### **A célula de Schwann, a bainha de mielina**

A bainha de mielina é uma especialização da membrana plasmática da CS. Esta se diferencia das outras membranas biológicas por sua alta proporção de lipídeos (70-80%) em relação às proteínas (20-30%) e por possuir proteínas específicas. Entre os componentes mais abundantes estão: glicoproteína Po, proteínas P1 e P2, lipídeos como colesterol, cerebrosídeos, sulfatídeos e plasmalogênio de etanolamina (Pierre Morell, 1984, Garbay *et al.*, 2000).

Durante o desenvolvimento fetal, quando a CS associa-se ao axônio, ela perde a sua motilidade, o núcleo torna-se ovóide, ela forma lâmina basal e deixa de proliferar. No processo de mielinização, a CS envolve o axônio, formando camadas concêntricas de citoplasma e membrana plasmática. A seguir, ocorre a compactação dessas camadas e a extrusão do citoplasma.

A bainha de mielina é responsável pela condução saltatória do impulso elétrico ao longo do axônio devido à sua descontinuidade. Ela é interrompida em intervalos regulares pelos *Nodos de Ranvier*. Nesta região, o axônio é envolvido pela lâmina basal e pequenos prolongamentos interdigitantes de CS. O segmento da fibra nervosa compreendida entre dois nodos é

denominado de *internodo*. Seu comprimento é proporcional ao diâmetro da fibra. Um internodo pode ser subdividido em 3 regiões: uma região internodal central estereotipada que compreende 95% de todo o comprimento do internodo, e as regiões adjacentes a ele em ambas extremidades, denominadas regiões paranodais, que correspondem de 2 a 3% do comprimento do internodo. As regiões paranodais do internodo são mais dilatadas, formando os bulbos paranodais. Em cortes longitudinais de nervo podem ser observadas fendas oblíquas interrompendo a bainha de mielina e unindo as margens citoplasmáticas adaxonal (mais interna) e abaxonal (mais externa) da célula de Schwann. São as *incisuras de Schmidt-Lantermann*, que correspondem a uma parte do citoplasma da CS, aprisionado durante a formação da bainha, com provável função de crescimento longitudinal e manutenção metabólica da mielina.

A célula de Schwann possui uma lâmina basal, composta predominantemente por colágeno do tipo IV e laminina. Estão presentes também a fibronectina e o heparan sulfato, particularmente na região dos nodos de Ranvier.

### **Bainhas conjuntivas**

As fibras nervosas mielínicas e amielínicas associam-se ao sistema vascular e às bainhas de tecido conjuntivo adjacentes, formando os nervos. O nervo possui 3 bainhas conjuntivas:

➤ **Endoneuro** → Consiste em uma trama delicada de tecido conjuntivo frouxo rico em colágeno do tipo III que envolve cada fibra nervosa. Observam-se fibroblastos endoneurais e capilares sangüíneos em íntimo contato com as fibras nervosas.

➤ **Perineuro** → O perineuro envolve os fascículos ou feixes de fibras nervosas. Compreende tecido conjuntivo denso ordenado composto de fibras de colágeno do tipo I e III, as quais se alteram em camadas concêntricas com as células perineurais de perfil poligonal e achatado. Estas células perineurais (derivadas de

fibroblastos) diferem das células presentes nas outras bainhas conjuntivas principalmente por possuírem lâmina basal. Outra característica é a sobreposição ou interdigitação de células perineurais contíguas, formando entre si junções de oclusão, relacionadas com as propriedades de barreira de difusão do perineuro. A presença de numerosas vesículas pinocíticas, outra característica proeminente das células perineurais, sugere a existência de um sistema de transporte. O perineuro é uma camada mais resistente e mais compacta que as outras. Estão presentes também fibras elásticas nas fendas localizadas entre as lamelas de células perineurais, associadas geralmente à lâmina basal. Vasos sanguíneos e alguns macrófagos também são encontrados no perineuro (Thomas *et al.*, 1993).

➤ **Epineuro** → O epineuro possui uma camada de tecido conjuntivo denso, rico em fibras de colágeno do tipo I dispostas longitudinalmente em relação ao nervo, mas também estão presentes colágeno do tipo I e fibras elásticas. Essa bainha envolve todo o nervo e emite septos para o seu interior, envolvendo os feixes. Um reforço estrutural é dado pela organização dos fibroblastos em camadas concêntricas separadas pelas fibras colágenas. Estes fibroblastos são células fusiformes, sem lâmina basal e com retículo endoplasmático rugoso desenvolvido. No epineuro é encontrada quantidade variável de gordura, principalmente em nervos calibrosos e cujo papel deve estar relacionado à proteção dos fascículos nervosos contra lesões por compressão. Vasos sanguíneos penetram pelo epineuro e se ramificam em vasos menores que se anastomosam e seguem pelo perineuro, até formarem uma rede de capilares no endoneuro. O epineuro também contém vasos linfáticos, que não são encontrados dentro dos fascículos (Peters *et al.*, 1976).

**Macrófagos residentes**

Próximo aos capilares sangüíneos e por entre o endoneuro e perineuro são ocasionalmente encontrados macrófagos. Eles correspondem de 2 a 9% da população celular do nervo periférico. Os macrófagos residentes apresentam-se como células alongadas com algumas pequenas ramificações nas suas extremidades (Monaco *et al.*, 1992; Griffin *et al.*, 1993). Apesar do termo residente, essa população de macrófagos endoneurais não é constante. Ela é permanentemente substituída por monócitos hematógenos derivados da medula óssea que, ao migrarem para o nervo, diferenciam-se em macrófagos sob a ação de diferentes citocinas (Brück, 1997; Créange *et al.*, 1998).

Atualmente, no nervo normal, a identificação desses macrófagos tem sido facilitada pelo uso de técnicas imunoistoquímicas que utilizam diferentes marcadores, como por exemplo ED2 em ratos, CD68 em humanos e F4/80 em camundongos. Os macrófagos residentes também expressam antígenos MHC I e II, CD4 e receptores de complemento (Griffin *et al.*, 1993; Monaco *et al.*, 1992).

Mastócitos provavelmente também estão presentes no nervo periférico, tanto no epineuro quanto no endoneuro, mas seu número varia muito dependendo da espécie.

**Resposta nervosa frente à lesão**

Quando um nervo periférico é lesado, por exemplo, através de seção transversal, ocorre uma série de alterações morfofuncionais tanto proximal como distalmente à lesão.

A região adjacente à lesão torna-se intumescida devido ao aumento da permeabilidade vascular endoneural e a invasão do local por células polimorfonucleares e monócitos (Mellick e Cavanaugh, 1968).

No pericário, variações osmóticas promovem o aumento do volume do corpo celular. O núcleo desloca-se para a periferia e aumenta de volume, assim como o nucléolo. Concomitantemente

ocorre o processo denominado cromatólise, onde há dispersão dos ribossomos do retículo endoplasmático e a dissolução da substância de Nissl. Estas alterações morfológicas refletem alterações metabólicas que incluem o aumento na síntese de RNAs e proteínas, assim como mudanças no padrão de expressão gênica, visando a regeneração dos neurônios afetados (Gillen, 1995). Dependendo do grau de maturidade e da dependência de fatores neurotróficos, os neurônios lesados sobrevivem à lesão axonal e são capazes de regenerar o axônio. Se a regeneração tiver êxito, as alterações mencionadas anteriormente são revertidas. Caso contrário, os neurônios podem morrer por apoptose.

### **Degeneração Walleriana**

Distalmente à lesão, as fibras nervosas, desconectadas de seu centro trófico, entram em processo degenerativo irreversível. Em 1850, Augustus Waller, trabalhando com sapos, descreveu pela primeira vez este fenômeno, posteriormente denominado degeneração Walleriana (DW). Trata-se de um processo que segue um padrão complexo porém estereotipado de reações histopatológicas. Após a seção de um nervo periférico, os axônios degeneram, as células de Schwann se separam da porção mielínica de suas membranas e entram em processo mitótico intenso, os fibroblastos proliferam, macrófagos são recrutados da circulação sanguínea e a mielina é fagocitada e degradada por macrófagos ativados e por células de Schwann. Durante todos esses eventos há participação de várias citocinas, provavelmente controlando o início e a progressão da DW. Assim sendo, esta pode ser vista, em parte, como uma resposta inflamatória à lesão, porém com características peculiares ao sistema nervoso.

As observações de Waller e a de outros pesquisadores da época, resultaram em uma das descobertas fundamentais da neurobiologia no século XIX: o princípio de que as fibras nervosas requerem a continuidade funcional com o corpo celular para

sobreviverem. Uma vez que há interrupção no transporte axoplasmático em uma fibra nervosa, seja através de eventos traumáticos (seção, esmagamento, compressão), tóxicos (acrilamida), inflamatórios (esclerose múltipla, Síndrome de Guillain-Barré), isquêmicos ou metabólicos (neuropatia diabética) é acionado distalmente à lesão o processo de degeneração axonal. A morfologia desta é muito similar em todas essas circunstâncias, sugerindo a existência de elementos comuns que ocorrem em cada um desses casos (George *et al.*, 1995). O mesmo não ocorre com o comportamento das células satélites, tanto de células de Schwann como macrófagos, que varia conforme os diferentes casos. O modelo clássico e mais simples de degeneração axonal refere-se à degeneração Walleriana decorrente da axotomia através da seção nervosa. Baseado nele, as alterações celulares que ocorrem durante o processo de DW podem ser agrupadas basicamente em: resposta axonal, reação das células de Schwann e dos macrófagos. Tais alterações ocorrem simultaneamente, havendo forte interação entre as células.

#### **Alterações axonais**

Imediatamente após a axotomia, ocorre no local da lesão extravasamento de material axoplasmático e aumento da concentração de cálcio intra-axonal, eventos rapidamente normalizados com a reestruturação e selamento do axolema. Os axônios afetados são capazes de manter a homeostasia interna por um período de tempo que, além de proporcional ao comprimento do segmento distal à lesão, varia também conforme a espécie. No caso de ratos e camundongos, esse período varia de 24 a 48 horas, enquanto que em humanos é de cerca de 7 dias (Xie e Barret, 1991, Ziv e Spira, 1993).

Após esse período de latência podem ser observadas as primeiras alterações morfológicas no nervo em degeneração, e que correspondem ao colapso do citoesqueleto axonal, composto

principalmente por neurofilamentos (NF) e microtúbulos. A desintegração granular dos elementos de citoesqueleto, principal característica da degradação axonal, resulta da ação de proteases ativadas por cálcio. O aumento significativo da concentração axoplásmica deste íon, capaz de promover a degeneração dos axônios, parece ocorrer principalmente através do axolema intacto, por um mecanismo de transporte mediado por canais iônicos específicos (George *et al.*, 1995). Martinez e Ribeiro (1998) observaram, 30 horas após axotomia de fibras nervosas periféricas, precipitados de cálcio associados ao citoesqueleto em degradação, reforçando sua participação nesses eventos. Dentre as proteases ativadas pelo cálcio estão as calpaínas, que constituem um grupo de proteases neutras capazes de degradar os neurofilamentos quando estes estão em seu estado defosforilado (Schlaepfer, 1987; Meller *et al.*, 1994; George *et al.*, 1995).

A degradação dos neurofilamentos e demais componentes do citoesqueleto é acompanhada pelo intumescimento dos axônios, e culmina com a fragmentação axonal em segmentos elipsóides.

Através da microscopia eletrônica, outras alterações axonais foram descritas durante o processo de DW, as quais referem-se à distribuição de organelas. No início da degeneração, as mitocôndrias acumulam-se no axoplasma da região dos nodos de Ranvier (Carpenter, 1988). Em seguida, observam-se agregados granulares vindos da região paranodal e do axoplasma internodal adjacente ao local da lesão em ambos lados, e que correspondem a mitocôndrias e corpos densos (Donat e Wisniewski, 1973). Posteriormente, ocorre rompimento de mitocôndrias.

#### Células de Schwann

Nos axônios mielinizados, é possível verificar aumento das incisuras de Schmidt-Lanterman, afrouxamento das lamelas de mielina e retração das bainhas de mielina em direção aos nodos de Ranvier. Dentro de 3 a 7 dias, a bainha de mielina e os axônios

estarão totalmente fragmentados em segmentos elipsóides (Griffin e Hoffman, 1993).

A perda do contato entre o axônio e as células de Schwann (CS) inibe a expressão de genes relacionados com a produção de proteínas da bainha de mielina e faz com que as CS se separem desta (Thomson *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1994). A seguir as CS entram em processo mitótico acelerado, estimuladas por produtos da degradação da mielina e por fatores mitogênicos produzidos pelos macrófagos que invadem o segmento do nervo em degeneração (Beuche *et al.*, 1984, De Vries, 1993; Brück, 1997). Carroll e colaboradores (1997) verificaram que a atividade mitótica das CS durante a DW é também estimulada pelo fator de crescimento glial e por receptores erbB2 e erbB3 expressos por essas mesmas células.

A medida que a DW progride, as CS passam a se organizar seqüencialmente no interior de tubos contínuos de lâmina basal, formando as chamadas bandas ou cordões de Büngner (Griffin e Hoffman, 1993). Neste ambiente, as CS aumentam a produção de componentes da matriz extracelular, tais como laminina e tenascina e a expressão de diferentes tipos de moléculas de adesão, como L1 e N-CAM, capazes de estimular e orientar o crescimento dos neuritos em regeneração entre a lâmina basal e a membrana plasmática das CS (Ide *et al.*, 1983; Fawcett e Keynes, 1990; Rutishauser, 1993; Son e Thompson, 1995; Agius e Cochard, 1998; Zuo *et al.*, 1998; Müller e Stoll., 1998). Além disso, durante a DW as CS desprovidas de contato com axônios alteram a expressão e/ou liberação de vários fatores neurotróficos e citocinas importantes para a sobrevivência e regeneração neuronais. Dentre estas moléculas destacam-se, por exemplo, o fator de crescimento do nervo (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina-3 (NT-3), o fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator

inibitório de leucemia (LIF) e a interleucina-6 (IL-6) (para revisão vide Terenghi, 1999).

### **Influxo de macrófagos**

Conforme mencionado, outra característica marcante da DW é a intensa migração e atividade de células macrofágicas no microambiente do nervo lesado (Stoll *et al.*, 1989 Griffin *et al.*, 1993; Taskinen e Roytta, 1997). O recrutamento de monócitos/macrófagos hematógenos para o nervo requer várias etapas:

- 1) Rolamento e conexões reversíveis entre os monócitos circulantes e o endotélio vascular, evento mediado por selectinas.
- 2) Estabelecimento de uma firme adesão entre os monócitos e as células endoteliais, mediada por integrinas e seus ligantes. Por exemplo, as células endoteliais expressam ICAM-1 (molécula-1 de adesão intercelular), que se liga ao receptor de complemento tipo 3, uma integrina expressa pelos macrófagos. (Brück, 1997).
- 3) Percepção de sinais quimiotáticos que guiam os monócitos em direção ao interior do nervo lesado. Entre esses sinais estão estruturas axonais e de mielina em degeneração e componentes de complemento, especificamente C5a (Springer, 1994). Além disso, algumas citocinas também apresentam importantes propriedades quimiotáticas, tais como a proteína 1 quimioatrativa para monócito (MCP-1), produzida por macrófagos e células de Schwann, e o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1). (Carroll e Frohnert, 1998).
- 4) Penetração dos monócitos através do endotélio e sua lâmina basal, o que requer a ação de proteases como por exemplo as metaloproteases de matriz (MMP). As MMP são produzidas pelos próprios macrófagos, células endoteliais e células de Schwann (La Fleur *et al.*, 1996).
- 5) Diferenciação dos monócitos em macrófagos dentro do tecido, onde passam a produzir uma série de citocinas, tais como: interleucina-1,

(IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e TGF- $\beta$ 1. (Lindholm *et al.*, 1987; Reichert *et al.*, 1996).

À medida que invadem o nervo em degeneração, os macrófagos realizam, conjuntamente com as CS, a fagocitose da bainha de mielina e a remoção dos fragmentos axonais resultantes da autólise destes (Beuche e Friede, 1984; Stoll *et al.*, 1989; Brück, 1997). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que, apesar das CS serem capazes de iniciar a remoção e degradação da mielina, o envolvimento dos macrófagos hematógenos é fundamental para acelerar esse processo (Stoll *et al.*, 1989; Fernandez-Valle *et al.*, 1995). Se o influxo desses macrófagos é impedido ou diminuído, o processo de degeneração Walleriana é retardado ou atenuado (Beuche e Friede, 1986; Perry *et al.*, 1995). Além de sua atividade fagocítica, os macrófagos também produzem citocinas (anteriormente mencionado), entre elas a IL-1, que estimula as CS a sintetizarem o NGF, promotor da sobrevivência de neurônios (Nathan, 1987; Da Silva e Langone, 1989; Rotshenker *et al.*, 1992; De Vries, 1993).

**NO e as  
isoformas da  
NOS**

Dentro do contexto degenerativo-regenerativo, deve-se ter em conta também a participação do óxido nítrico (NO).

O NO é um radical livre sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), em uma reação de conversão da L-arginina em L-citrulina. Nessa reação, a NOS requer a presença de O<sub>2</sub> e também da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como doador de elétrons. Por ser uma molécula gasosa, o NO se difunde facilmente do local onde é sintetizado. Experimentos de biologia molecular identificaram três genes codificando três isoformas diferentes da NOS, cada uma recebendo a denominação de acordo com o tecido a partir do qual os genes foram primeiramente clonados (para revisão ver Lancaster e Stuehr, 1996; Dawson e Dawson, 1996).

Isoformas	NOS I	NOS II	NOS III
<i>Denominação original</i>	Neuronal (nNOS) ou cerebral (bNOS)	Induzível ou imunológica (iNOS)	eNOS (endotelial)
<i>Localização</i>	Populações de neurônios bem definidas	Várias células quando estimuladas, incluindo hepatócitos, células musculares lisas, macrófagos, neutrófilos e células gliais	Endotélio vascular
<i>Ativação dependente de cálcio</i>	Sim	Não	Sim

O NO é uma molécula extremamente reativa, capaz de interagir com o oxigênio, metais de transição, grupos aminas, tióis e aromáticos de proteínas. A sua grande reatividade com o oxigênio está associada também à sua toxicidade. Quando o NO interage com produtos do sistema de redução do oxigênio, pode levar, por exemplo, à formação de peroxinitritos, envolvidos na oxidação de resíduos de aminoácidos, na peroxidação lipídica e na formação de espécies nitrantes (Koppenol *et al.*, 1992).

### **NO e o processo degenerativo-regenerativo**

Embora o envolvimento do NO nos processos degenerativos e regenerativos do sistema nervoso esteja bem estabelecido, seu papel na DW e na regeneração de nervos periféricos, além de pouco conhecida, gera controvérsias (Verge *et al.*, 1992; Wu, 1996; Hindley *et al.*, 1997; Yu, 1997; González-Hernández e Rustioni, 1999, Levy *et al.*, 1999).

González-Hernández e Rustioni (1999) e Levy *et al.* (1999) obtiveram evidências de que o NO, produzido por macrófagos e

células de Schwann, deve participar de maneira importante na DW. A expressão das isoformas da NOS durante a DW foi analisada por González-Hernández e Rustioni (1999) através de técnicas de histoquímica e imunoistoquímica, utilizando um modelo de constrição crônica por ligadura do nervo ciático de ratos, o qual permite a regeneração axonal. Neste trabalho detectaram aumento na expressão das três isoformas de NOS. Dois dias após a lesão, observaram células imunoreativas para iNOS na porção mais externa do perineuro, correspondendo provavelmente a macrófagos recrutados da circulação. Uma semana após, observaram significativo aumento da expressão da nNOS no segmento proximal, e após duas semanas, no segmento distal do nervo. Detectaram também nNOS nos gânglios das raízes dorsais, sugerindo que seria transportada anterogradamente e acumulada nos axônios em regeneração. A eNOS teve expressão maior nos *vasa nervorum* do coto distal e ao redor da ligadura. Os autores propuseram que, além dos macrófagos, outras células devem contribuir para a manutenção de altos níveis de NO após a lesão do nervo. A indução das isoformas de NOS e conseqüente produção de NO teria efeito benéfico sobre a regeneração axonal.

Levy *et al.* (1999) observaram que tanto as CS como macrófagos são capazes de expressar iNOS. Recentemente, Levy *et al.* (2001) utilizaram diferentes tipos de lesão nervosa periférica (seção, esmagamento e constrição crônica) em camundongos mutantes iNOS-KO, “nocauteados” para a isoforma iNOS. Nesses animais, ocorreu um retardo tanto na DW quanto na regeneração. A ausência da iNOS seria responsável pelo retardo na degradação dos lipídios da mielina, acarretando a inibição do crescimento de neuritos. Os autores atribuíram ao NO produzido pela iNOS e suas espécies relacionadas, como o peroxinitrito, participação fundamental na peroxidação lipídica durante a DW.

Peunova e Enikolopov (1995) verificaram *in vitro* que o NGF foi capaz de induzir diferentes formas de NOS em células da linhagem PC12 e propuseram que, através de um mecanismo não conhecido, o aumento na concentração de NO mediaría os efeitos citostáticos do NGF, inibindo a proliferação destas células e facilitando a formação de neuritos. Hindley *et al.* (1997), estudando a ação do NO em cultura de células PC12, sugeriram que o aumento intracelular de cGMP induzido pelo NO potencializaria o efeito estimulatório do NGF e de outros fatores neurotróficos sobre o crescimento de neuritos.

Assim, o NO pode estar envolvido na sobrevivência neuronal através de sua interação com outras moléculas neurotróficas (Fiallos-Estrada *et al.* 1993; Farinelli *et al.*, 1996; White *et al.*, 1996; Thippeswamy & Morris, 1997).

**Alguns  
fatores que  
influenciam a  
DW**

O padrão temporal da DW é influenciado por:

- diâmetro das fibras nervosas → a DW é mais rápida quanto menor o calibre axonal.
- distância da lesão em relação ao corpo celular → para fibras de mesmo calibre, quanto mais próxima do corpo celular do neurônio tenha ocorrido a lesão, mais lenta a DW (Lubinska, 1982).
- isolamento ou não do coto distal → fibras em um coto distal isolado degeneram mais lentamente do que fibras em continuidade com sua porção terminal.
- tipo de lesão (esmagamento, seção, ligadura, congelamento) → a desintegração dos neurofilamentos axonais é mais rápida em um nervo seccionado do que em um nervo esmagado, provavelmente devido à não continuidade funcional do coto distal com os axônios do coto proximal (Lunn *et al.*, 1990).

Embora a DW seja muito estudada, seus mecanismos imediatos permanecem desconhecidos. Uma hipótese refere-se à

ausência de substâncias tróficas na porção distal à lesão. A redistribuição dessas substâncias pelo transporte axoplasmático bidirecional explicaria os fatores que influenciam a DW. Esses fatores tróficos estariam presentes ao longo de todo o axônio e preveniriam a ativação das CS e a conseqüente degeneração da fibra. Por exemplo, quanto mais calibroso o axônio, maior a quantidade de fator trófico presente, mais lento o avanço da degeneração. Quando é feita uma seção próxima do corpo celular do neurônio, maior é o coto distal e assim, maior é a disponibilidade do fator trófico. No caso de um segmento de nervo isolado, o retardo na degeneração seria explicado pelo fluxo bidirecional do fator trófico. Já o coto distal que permanece em continuidade com sua porção terminal degeneraria antes do que o nervo isolado pois o fator trófico que mantém as CS quiescentes continua fluindo em direção anterógrada até a região terminal, desprovido desse fator a região mais próxima à lesão.

**A linhagem  
C57BL/Ola ou  
C57BL/Wld<sup>s</sup>**

O surgimento da sub-linhagem mutante de camundongo inicialmente denominada C57BL/Ola e posteriormente, C57BL/Wld<sup>s</sup>, modificou um pouco essa teoria. Esta sub-linhagem apresenta um grande retardo para o início da DW após lesão nervosa central e periférica, onde os axônios permanecem aparentemente intactos por mais de um mês após seção (Lunn *et al.*, 1989; Glass and Griffin, 1991). Esta sobrevivência prolongada demonstra que a depleção geral de materiais transportados pelos axônios não deve ser a causa da degeneração em axônios normais, que degeneram em poucos dias após a seção. Ao invés disso, um mecanismo específico deve estar presente em axônios normais, mas não em axônios dessa linhagem, e que deve iniciar a DW quando a continuidade com o pericário é perdida. (Brown *et al.*, 1994; Tsao *et al.*, 1994). Essa propriedade é intrínscica ao nervo periférico nos animais C57BL/Wld<sup>s</sup> e não está relacionada, por exemplo, a

defeitos na circulação de células mielomonocíticas (Perry *et al.*, 1990). O mapeamento gênico nessa linhagem revelou uma região de mutação no cromossomo 4, porém, ainda não se sabe com o que está relacionada (Lyon *et al.*, 1993). Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraram que os neurofilamentos são intensamente degradados na presença de altas concentrações de cálcio, e que não há alteração na capacidade de recrutamento de macrófagos nessa linhagem.

#### **Importância do estudo da DW**

Um maior conhecimento sobre a DW e seus eventos celulares e moleculares torna-se imprescindível para o tratamento adequado de lesões no sistema nervoso periférico. Além disso, o estudo de certas características da DW relevantes à autoimunidade do SNP pode fornecer importantes informações no que se refere às polineuropatias auto-imunes. A perda axonal e a DW ocorrem freqüentemente nestas doenças e na neurite auto-imune experimental (EAN), tanto primariamente nas formas axonais da Síndrome de Guillain-Barré, como secundariamente em decorrência de inflamação.

Dentro desse contexto, o NO tem ganho importância, e sua manipulação pode vir a tornar-se uma nova possibilidade de tratamento, tanto em lesões traumáticas como em doenças neurodegenerativas periféricas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Analisar a degeneração Walleriana nas linhagens isogênicas de camundongos C57BL/6J e A/J, após seção do nervo ciático, e investigar possível correlação de características desse processo com a diferente capacidade regenerativa axonal periférica observada nessas linhagens.

#### 3.2. Específicos

Analisar o processo de degeneração Walleriana no coto distal do nervo ciático, 1, 3, 5 e 7 dias após a axotomia, observando-se:

- o padrão temporal do desaparecimento de neurofilamentos fosforilados através de técnica imunoistoquímica;
- o padrão temporal da fragmentação da bainha de mielina através da histoquímica com *Sudan Black*;
- o número de células contendo resíduos de mielina, evidenciadas também pela histoquímica com *Sudan Black*;
- o padrão espacial e temporal da marcação de células pela técnica da NADPH-diaforase, indicadora da presença da óxido nítrico sintase (NOS);
- o padrão espacial e temporal das células expressando a isoforma induzível da NOS (iNOS), através de imunofluorescência e microscopia confocal;
- o número de macrófagos e a proporção destes expressando iNOS, através de imunofluorescência e microscopia confocal.

*Os experimentos realizados e os resultados obtidos são apresentados a seguir em formato de artigos, estando organizados em dois trabalhos que serão submetidos à publicação em revistas indexadas.*

## **4. ARTIGO 1**

**DIFERENÇAS EM EVENTOS DA DEGENERAÇÃO WALLERIANA ENTRE  
CAMUNDONGOS C57BL/6J e A/J**

Cristiane L. R. de la Hoz <sup>1</sup>; Alexandre L. R. Oliveira <sup>2</sup>; Iara M. S. De Luca<sup>3</sup>; Paulo P. Joazeiro<sup>3</sup>; Silvia P. Irazusta<sup>4</sup> e Francesco Langone<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Depto. Biologia Celular-IB, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Depto. Anatomia, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Depto. Histologia e Embriologia-IB, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Lab. Patologia Experimental-FCM, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

<sup>5</sup>Depto. Fisiologia e Biofísica-IB, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

### Resumo

Após a lesão de um nervo periférico, segue-se no coto distal a degeneração Walleriana (DW) que, além de promover a remoção da mielina e das fibras nervosas que entram em colapso funcional, é responsável por propiciar um ambiente favorável à regeneração axonal. Alguns trabalhos relataram que camundongos adultos da linhagem C57BL/6J apresentam menor capacidade regenerativa axonal após lesão do nervo ciático, quando comparados com outras linhagens isogênicas. Isto os torna um modelo interessante para estudo da DW. Através de procedimentos imunohistoquímicos para neurofilamentos (NF) e histoquímicos para fragmentação e remoção da bainha de mielina (BM) e para NADPH-diaforase, acompanhou-se a DW em nervos ciáticos seccionados de camundongos C57BL/6J e A/J. A densidade de volume de NF foi significativamente menor na linhagem C57BL/6J no início da DW, 1 e 3 dias após a lesão, e igualou-se à observada na linhagem A/J posteriormente. Quanto ao padrão de fragmentação da mielina, não foram observadas diferenças qualitativas entre as linhagens. No entanto, 3 e 5 dias após a lesão, a linhagem C57BL/6J apresentou um maior número de células contendo resíduos de mielina. Este maior número corresponde provavelmente a células de Schwann, uma vez que não há diferença entre ambas linhagens, para os mesmos períodos de tempo, no número de macrófagos presentes no nervo lesado (de la Hoz e Langone, 2001). A reação para NADPH-diaforase apresentou padrão semelhante de marcação em ambas linhagens nos períodos analisados. Contudo, tornou-se granular e dispersa mais precocemente na linhagem A/J. As diferenças no padrão temporal da DW encontradas entre as linhagens C57BL/6J e A/J sugerem que a degeneração dos axônios e da bainha de mielina, embora inicialmente interdependentes, evoluem de acordo com as características bioquímicas intrínsecas dos axônios e das células não-neurais envolvidas. Estas podem responder, pelo menos parcialmente, pela diferente capacidade regenerativa axonal observada nas linhagens estudadas.

## Introdução

Após lesão do nervo ciático, o processo de degeneração Walleriana que ocorre no coto distal, além de promover a remoção da mielina e das fibras nervosas, contribui para a regeneração axonal. Nesse processo participam principalmente células de Schwann e macrófagos, que interagem espacial e temporalmente, de maneira a propiciar um microambiente que estimule o brotamento axonal e sustente seu crescimento e maturação (Beuche e Friede, 1986; Griffin e Hoffman, 1993; Ide, 1996; Brück, 1997). A axotomia das fibras mielínicas induz as células de Schwann a se separarem da porção mielínica de sua membrana, os axônios entram em degeneração e os macrófagos são intensamente recrutados da circulação (Avellino *et al.*, 1995; Brück, 1997). Os macrófagos são responsáveis pela produção de citocinas tais como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , que participam na regulação da expressão de fatores neurotróficos e da atividade de outras células (Heumann *et al.*, 1987; Stoll *et al.*, 1989; Perry e Brown, 1992; Brück, 1997). A IL-1, por exemplo, é particularmente importante, pois induz a expressão do fator de crescimento do nervo (NGF) pelas células de Schwann, o qual está envolvido na sobrevivência e regeneração de neurônios sensitivos (Lindholm *et al.*, 1987; da Silva e Langone, 1989, Heumann *et al.*, 1987). As células de Schwann, por sua vez, são estimuladas a entrar em processo mitótico intenso, quando então passam a se organizar no interior de tubos contínuos de lâmina basal, formando os cordões de Büngner (Beuche *et al.*, 1984; De Vries, 1993; Griffin e Hoffman, 1993; Brück, 1997; Carroll *et al.*, 1997). Neste ambiente, elas aumentam sua produção de componentes da matriz extracelular e a expressão de diferentes tipos de moléculas de adesão, capazes de estimular e orientar o crescimento dos neuritos em regeneração (Ide *et al.*, 1996; Rutishauser, 1993; Son e Thompson, 1995; Zuo *et al.*, 1998; Müller e Stoll., 1998). Além disso, as células de Schwann sofrem alteração na expressão de vários fatores neurotróficos e citocinas importantes para a sobrevivência e regeneração neuronal, dentre elas: NGF, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e IL-6 (para revisão vide Terenghi, 1999). Há evidências de que tanto as

células de Schwann como macrófagos são capazes de expressar a enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela produção do óxido nítrico (NO) (Levy *et al.*, 1999; González-Hernandez e Rustioni, 1999). Contudo, a ação desta molécula dentro na degeneração e regeneração no nervo ainda é controversa, podendo estar envolvida na sobrevivência neuronal através de sua interação com outras moléculas neurotróficas (Fiallos-Estrada *et al.* 1993; Farinelli *et al.*, 1996; White *et al.*, 1996; Thippeswamy e Morris, 1997).

Estudos de regeneração nervosa periférica, após o esmagamento ou seção do nervo ciático, verificaram que a linhagem de camundongos C57BL/6J possui menor capacidade de regeneração axonal do que outras linhagens investigadas, tais como a linhagem A/J (Lu *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1994; Lainetti *et al.*, 1995). Recentemente, alguns autores atribuíram essa baixa capacidade de regeneração à particular susceptibilidade dos neurônios sensitivos dos animais C57BL/6J a axotomia (Lainetti *et al.*, 1995; Oliveira, 2001). Contudo, não pode ser descartada a hipótese de que essa maior susceptibilidade dos neurônios sensitivos seja decorrente de um descompasso entre as necessidades de fatores tróficos dessas células e a sua produção pelas células não neurais durante o processo degenerativo-regenerativo no nervo.

Neste trabalho estudamos a evolução temporal da desestruturação dos neurofilamentos, da fragmentação da bainha de mielina e da presença de células envolvidas na sua degradação, além de acompanhar o padrão de marcação da NADPH-diaforase durante a degeneração Walleriana nas linhagens de camundongos isogênicos C57BL/6J e A/J. O objetivo deste estudo foi comparar o curso desses eventos e investigar sua possível correlação com as diferentes capacidades regenerativas axonais observadas nessas linhagens.

## **Material e Métodos**

### **Animais e grupos experimentais**

Foram utilizados camundongos machos adultos com 8 semanas de idade, das linhagens isogênicas C57BL/6J (n=28) e A/J (n=28), adquiridos do Centro de Bioterismo da Unicamp. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em biotério sob condições controladas de luz e temperatura, recebendo ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp.

### **Procedimentos cirúrgicos**

Após anestesia profunda com uma mistura de quetamina (160 mg/kg) e cloridrato de xilazina (32mg/kg), (0,10g e 0,02g respectivamente, dissolvidos em 5 ml de água destilada, 0,2ml/25g peso corpóreo, *ip*), os animais tiveram o nervo ciático esquerdo exposto e seccionado na altura do forame obturador. O coto proximal foi ligado com fio de seda 4-0 (Ethicon) para impedir reinervação do coto distal, enquanto que este último foi deixado livre em seu leito. Concluída a cirurgia, a pele foi suturada e os animais retornaram ao biotério até a data do sacrifício.

### **Procedimentos imunoistoquímicos**

Para o estudo imunoistoquímico dos neurofilamentos 4 camundongos de cada linhagem, para cada tempo pós-cirúrgico, foram anestesiados com a mistura de quetamina e cloridrato de xilazina (*i.p.*) e perfundidos transcardiacamente com 80ml de solução salina tamponada e heparinizada. A fixação realizou-se pela subsequente perfusão com 150ml de formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4. Em seguida, o coto distal do nervo ciático esquerdo e o nervo ciático contralateral foram dissecados até a fossa poplíteia, removidos e deixados por 12 horas na mesma solução fixadora. Os espécimes foram lavados em água corrente por mais 12 horas, desidratados, diafanizados e incluídos em Paraplast<sup>®</sup>. A seguir, foram coletados de cada espécime 20 cortes seriados longitudinais (7,0µm), dispostos alternadamente em 5 lâminas silanizadas, de modo a se obter na mesma lâmina cortes representativos de 4 diferentes níveis. Foram destinadas duas lâminas (2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup>) de

cada nervo para coloração com hematoxilina e eosina (HE) e as demais para imunohistoquímica.

Após desparafinação e hidratação dos cortes, procedeu-se à reação de bloqueio da peroxidase endógena, incubando-se as lâminas em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) e metanol por 15 minutos. A seguir, os cortes foram lavados em PBS 0,1M e incubados com o anticorpo primário monoclonal anti-neurofilamento (1:200, Dako), permanecendo em câmara úmida a 4°C por 15 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em PBS 0,1M e incubadas por 45 minutos com o anticorpo secundário biotilado (Multi-Link, Dako). Em seguida, o material foi novamente lavado em PBS 0,1M e incubado com o complexo Strept-ABC (Dako) durante 30 minutos. A peroxidase foi detectada através da reação com 3-3'-diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Gill, desidratadas e montadas em Entelan (Merck).

#### **Processamento dos espécimes para as reações histoquímicas**

Três camundongos de cada linhagem estudada, para cada tempo pós-cirúrgico, foram anestesiados com a mistura de quetamina e cloridrato de xylazina (*i.p.*), sendo o coto distal esquerdo e o nervo ciático direito (não operado) dissecados até a fossa poplíteia, removidos e fixados em paraformaldeído 4% por 12 horas. Em seguida, foram lavados em PBS 0,1M e crioprotetidos em uma solução de sacarose 30% a 4°C. Os espécimes foram incluídos em meio "OCT" (Triangle Biomedical Science), rapidamente congelados e conservados a -70°C. Foram coletados cortes longitudinais seriados (8µm) em lâminas silanizadas, conforme descrição anterior, sendo estocados a -20°C até o seu processamento histoquímico.

#### **Histoquímica de Sudan Black**

Os cortes foram mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos, lavados com água destilada e transferidos para uma solução alcoólica 70%, saturada com *Sudan Black*, permanecendo por 40 minutos. Em seguida, os cortes foram contrastados com álcool 50%, lavados em água destilada e montados com gelatina glicerinada.

### Histoquímica para NADPH-diaforase

Os cortes foram deixados a temperatura ambiente por 30 minutos, lavados em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, e incubados por 45 minutos a 37°C, em uma solução contendo 0,1% de NADPH-d (forma reduzida, Sigma), 0,02% de tetrazólio nitroazul (NBT, Sigma) e 0,3% de Triton X-100 (TX-100; Sigma) em tampão fosfato 0,1M. Após três lavagens de 5 minutos cada, os cortes foram desidratados e montados com Entelan (Merck).

### Análise quantitativa dos neurofilamentos

A marcação imunoistoquímica dos neurofilamentos foi quantificada através de técnica estereológica, utilizando-se uma ocular com retículo de 100 pontos (KPL8x, Zeiss, Germany), em objetiva de 100x. Realizou-se a contagem dos pontos que se sobrepunham aos neurofilamentos imunoistoquimicamente marcados em 12 campos escolhidos ao acaso em cada corte. Regiões próximas às extremidades não foram utilizadas na quantificação. A partir desses dados calculou-se a densidade de volume de neurofilamentos ( $V_v$ ) para cada nervo, de acordo com a fórmula de Weibel (1970):

$$V_v = P \cdot P_t^{-1}$$

$V_v$  = densidade de volume de NF imunomarcados  
 $P$  = número total de pontos sobrepostos aos NF imunomarcados no nervo  
 $P_t$  = número total de pontos-teste sobre os campos amostrados no nervo

Os valores de densidade de volume registrados foram estatisticamente avaliados através da análise de variância seguida do teste de Neuman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

### Contagem de células evidenciadas pelo *Sudan Black*

Para a contagem das células com grânulos negros evidenciados pelo *Sudan Black* foram escolhidos ao acaso 4 campos de 0,031 mm<sup>2</sup> por corte, totalizando no mínimo 0,412 mm<sup>2</sup> de área analisada para cada animal e entre 1 e 2 mm<sup>2</sup> para cada grupo. Regiões próximas às extremidades não foram utilizadas na contagem.

## **Resultados**

### **Imunoistoquímica para NF**

O exame qualitativo dos cortes reagidos com anticorpo para NF ou corados com HE, um dia após a lesão do nervo ciático, não evidenciou diferenças morfológicas claras no progresso da degeneração Walleriana entre as linhagens (Figura 1A e 1B). Contudo, a Vv foi significativamente menor na linhagem C57BL/6J (40,10%) do que as computadas na linhagem A/J (45,04%) e nos nervos controles de ambas (A/J=45,31%; C57BL/6J=47,26%; Tabela 1).

A partir do terceiro dia após a lesão, em ambas linhagens, foram evidentes o aumento da celularidade, com a presença de células polimorfonucleares, e a fragmentação das fibras nervosas. Esta fragmentação deu lugar à formação de segmentos elipsóides contendo NF imunomarcados. Na linhagem C57BL/6J tais segmentos se apresentaram menos freqüentes. Além disso, nesses camundongos a imunomarcção mostrou-se menos intensa e com aspecto predominantemente mais granuloso que nos camundongos A/J (Figura 1C e 1D). Por sua vez, a análise estereológica revelou que a Vv na linhagem C57BL/6J (23,79%) foi significativamente menor que a computada na linhagem A/J (29,74%).

No quinto dia após a lesão, os segmentos elipsóides contendo imunomarcção para NF tornaram-se mais freqüentes em ambas linhagens, possuindo diferentes tamanhos. Na linhagem C57BL/6J foram mais freqüentes os segmentos elipsóides grandes, com granulações imunomarcadas normalmente restritas à periferia, enquanto que na linhagem A/J predominaram os segmentos pequenos, exibindo imunomarcção mais compacta (Figura 1E e 1F). Não houve diferença estatisticamente significativa no valor de Vv entre as linhagens (Tabela 1).

Sete dias após a lesão observou-se aumento da celularidade em ambas linhagens. Muitas dessas células possuíam perfil fusiforme e se dispunham enfileiradas, acompanhando os segmentos elipsóides. Apenas alguns destes continham poucas granulações imunomarcadas, formando aglomerados compactos que evidenciavam o adiantado grau de degeneração axonal. A avaliação quantitativa mostrou não haver diferença estatisticamente significativa da Vv entre os camundongos C57BL/6J e A/J (Tabela 1).

### **Fragmentação da bainha de mielina e contagem de células evidenciadas pelo *Sudan Black***

Não foram observadas diferenças no padrão de fragmentação da bainha de mielina entre as linhagens A/J e C57BL/6J. No entanto, o número de células contendo inclusões densamente coradas por *Sudan Black* (CSB), que correspondem provavelmente aos lipídios derivados da degradação da mielina, diferiu significativamente em alguns dos períodos analisados. Um dia após a lesão, ambas linhagens apresentaram nervos com morfologia discretamente diferente daquela observada nos nervos não lesados, havendo ligeiro intumescimento da fibra nervosa, sem alterações evidentes da bainha de mielina (Figura 2A e 2B). Três dias após a lesão, a fragmentação da bainha de mielina tornou-se notável em ambas linhagens com a formação dos segmentos elipsóides. Além disso, passaram a ser observadas as células CSB distribuídas ao longo do nervo (Figura 2C e 2D). O número destas foi significativamente maior na linhagem C57BL/6J (Tabela 2). Após 5 dias da lesão, o grau de fragmentação da bainha de mielina aumentou comparativamente ao observado após 3 dias e permaneceu semelhante em ambas linhagens (Figura 2E e 2F). O número de células em negro não sofreu alterações significativas em ambas linhagens, em relação ao tempo anterior, continuando a ser significativamente maior na linhagem C57BL/6J. Sete dias após a lesão o processo de fragmentação da mielina encontrava-se ainda mais avançado, com a presença de poucos ovóides contendo resíduos de mielina (Figura 2G e 2H). Ainda eram abundantes as células CSB e apresentaram-se em quantidades semelhantes nas duas linhagens. Contudo, estas células tenderam a aumentar em número na linhagem A/J e a diminuir na linhagem C57BL/6J (Tabela 2).

### Reação histoquímica para NADPH-diaforase

A reação histoquímica para NADPH-diaforase apresentou um padrão característico de marcação conforme o avanço do processo de DW. Primeiramente, um dia após a lesão, além da marcação de células endoteliais vasculares do epineuro e perineuro, evidenciadas também nos nervos normais, observou-se a marcação citoplasmática de células arredondadas com morfologia similar à de macrófagos. Delgadas porções de citoplasma pertencentes, provavelmente, a células de Schwann e fibroblastos, também foram evidenciadas (Figura 3A e 3B). A partir de 3 dias após a lesão, houve um significativo aumento no número de células reativas para a NADPH-diaforase correspondendo provavelmente a macrófagos recrutados da circulação sanguínea. Além disso, observou-se um padrão de marcação que lembrava citoplasma de células de Schwann envolvendo segmentos elipsóides (Figura 3C e 3D). Este tipo de marcação foi observado até o quinto dia após a lesão (Figura 3E e 3F), quando então surgiu outro tipo de marcação, mais disperso e granular, que predominou nos nervos com 7 dias da lesão e coincidiu com o avançado estado de degeneração do nervo. Tanto a linhagem C57BL/6J como a linhagem A/J exibiu os mesmos aspectos de marcação para a reação de NADPH-diaforase, conforme o progresso da DW. Contudo, observou-se uma diferença na evolução temporal desses eventos, que se manifestou no quinto dia após a lesão. Nesse tempo, na linhagem C57BL/6J verificou-se uma marcação predominantemente citoplasmática na CS envolvendo segmentos elipsóides, ao passo que na linhagem A/J na maior parte das células de Schwann a marcação havia evoluído para um aspecto mais granular e disperso (Figura 3G e 3H).

### Discussão e Conclusão

Nossos resultados mostram que as linhagens de camundongos C57BL/6J e A/J apresentam diferenças no processo de degeneração Walleriana no que diz respeito à evolução temporal da desorganização e desaparecimento dos NF, ao número de células degradando mielina e à presença de células positivas para NADPH-diaforase.

A mais rápida desorganização e desaparecimento dos NF na linhagem C57BL/6J, quando comparada à linhagem A/J, podem estar relacionados às características intrínsecas dos seus axônios. Após a seção de um nervo periférico há um período durante o qual não se observam alterações morfológicas que evidenciem degeneração axonal. Este período varia de 24 a 48 horas em ratos e camundongos, e tem sido interpretado como uma fase na qual mecanismos celulares levam à reorganização do axolema e à manutenção da homeostasia interna (Xie e Barrett, 1991; Chaudhry *et al.*, 1992; Ziv e Spira, 1993).

Tais mecanismos envolvem principalmente o controle das concentrações iônicas intra-axonais, especialmente do  $Ca^{2+}$ . O aumento da concentração intra-axonal desse íon pode ser agudo e intenso na região axotomizada. Contudo, este fenômeno não parece ser suficiente para o desencadeamento imediato da DW ao longo do restante do segmento axonal. Esta parece ser decorrente do colapso do metabolismo energético que leva à falência dos mecanismos de transporte ativo, responsáveis pelo bombeamento do cálcio proveniente do meio extracelular e liberado dos estoques intracelulares (Tsao *et al.*, 1999). O aumento da concentração do cálcio leva à ativação de proteases e lipases, que passam a degradar a membrana e o citoesqueleto dos axônios (Schlaepfer, 1987; Blomgren e Karlsson, 1990; Maxwell *et al.*, 1997). O período de latência para o início da DW depende, em grande parte, da eficiência dos mecanismos homeostáticos em antagonizar o aumento da concentração de cálcio. Nossos resultados mostraram que na linhagem C57BL/6J esse período de latência foi mais curto do que na linhagem A/J, sugerindo a presença de mecanismos homeostáticos menos eficazes no controle da concentração citosólica de cálcio. Essa menor eficácia poderia ser atribuída ao fato desses mecanismos terem sido desencadeados mais tardiamente e/ou terem sido

mantidos ativos por menos tempo, acarretando precocemente a etapa de degradação dos NF.

Corroborando esta hipótese, Tsao *et al.* (1999) verificaram que os neurônios dos camundongos da sub-linhagem mutante C57BL/Wlds, os quais desenvolvem a DW de forma extremamente lenta, são capazes de controlar muito mais eficazmente as concentrações intracelulares de cálcio, quando comparados com os da linhagem C57BL/6J.

Embora a ativação das calpaínas pelo cálcio seja um passo essencial para a degradação dos NF, a ação proteolítica dessas enzimas dependerá do estado de fosforilação dos resíduos de serina das subunidades H e M dos NF (Kamakura *et al.*, 1983; Pant, 1988; Elhanany *et al.*, 1994). Meller *et al.* (1994) mostraram que no decorrer da DW ocorre uma progressiva defosforilação dos NF, que parece anteceder a sua degradação. Isso poderia ser atribuído a um desequilíbrio entre as atividades de fosfatases e quinases específicas, ou à gradual diminuição de compostos ricos em energia (ATP, ADP) necessários para as reações catalisadas pelas quinases. É plausível supor que nossos resultados sejam decorrentes de fenômenos semelhantes aos propostos por Meller *et al.* (1994). Assim, as diferenças observadas na degradação dos NF entre as linhagens C57BL/6J e A/J podem ser atribuídas a diferenças no desencadeamento e/ou velocidade do processo de defosforilação dos NF causado pela axotomia.

A interação das células de Schwann com o axônio tem um importante papel na regulação do número e densidade de NF e, conseqüentemente no diâmetro axonal (para revisão vide Martini, 2001). Waegh *et al.* (1992) propuseram que essa regulação depende de proteínas localizadas na porção adaxonal da bainha de mielina, tais como a MAG, que interagem com receptores específicos no axolema. Essa comunicação entre axônio e célula de Schwann seria responsável pelo controle do sistema fosfatase-quinase no axônio que manteria elevado o estado de fosforilação dos NF. Em nosso estudo, não observamos diferenças na evolução temporal da fragmentação da bainha de mielina durante a DW entre as linhagens. Contudo, após 3 e 5 dias da axotomia registramos um número significativamente maior de células CSB nos animais C57BL/6J. Tais células correspondem a células de Schwann e macrófagos repletos de resíduos da mielina fagocitada. Considerando

o proposto por Waegh *et al.* (1992), o maior número de células CSB observado nos nervos da linhagem C57BL/6J nos permite supor que nestes animais os NF foram levados a um baixo estado de fosforilação mais rapidamente, acelerando assim sua degradação.

O maior número de células CSB na linhagem C57BL/6J pode sugerir que nesta última o influxo de macrófagos no nervo lesado seja mais intenso do que na linhagem A/J. No entanto, a avaliação quantitativa da presença de macrófagos, empregando-se imunistoquímica e microscopia confocal, mostrou que 1 dia após a lesão estas células eram mais abundantes nos animais A/J do que nos animais C57BL/6J. Além disso, não houve diferença entre o número dos macrófagos imunomarcados nos nervos lesados de animais C57BL/6J e A/J, 3 e 5 dias após a axotomia (de la Hoz e Langone, 2001). Portanto, podemos aceitar que na linhagem C57BL/6J a maioria das CSB observadas, 3 e 5 dias após a lesão, corresponda a células de Schwann. A ausência de células CSB em ambas linhagens 1 dia após a lesão não contrasta com a presença dos macrófagos, registrada nesse tempo por de la Hoz e Langone (2001), se considerarmos que estas células não haviam iniciado ainda a fagocitose da mielina. É interessante notar também que o número de células CSB tende a aumentar na linhagem A/J a partir do terceiro dia após a lesão, ao passo que na linhagem C57BL/6J tende a diminuir. Assim, é muito provável que na linhagem C57BL/6J as células de Schwann se separem mais precocemente da bainha de mielina no início do processo degenerativo. Fato este que corrobora nossa hipótese de que a perda de contato funcional entre a porção adaxonal da bainha de mielina e o axônio ocorra mais precocemente, resultando assim na degradação mais rápida dos NF.

Vários trabalhos têm evidenciado diferenças entre camundongos de linhagens isogênicas quanto à resistência ou susceptibilidade a vários patógenos, endotoxinas, tumores e doenças auto-imunes (Nakano *et al.*, 1995; O'Malley *et al.*, 1998; Whyte e Miller, 1998; Diez *et al.*, 2000). Essas características de cada linhagem têm sido associadas a diferenças na expressão de citocinas e de seus receptores pelas células envolvidas nos processos imunológicos e inflamatórios (Charles *et al.*, 1999). É muito provável que essas diferenças se manifestem também durante a DW, considerando-se que esta é um processo inflamatório durante o qual

várias citocinas e outras moléculas de sinalização intercelular são produzidas (Lindholm *et al.*, 1987; Reichert *et al.*, 1996; Wagner e Myers, 1996). Deste modo, as diferenças temporais observadas entre as linhagens C57BL/6J e A/J, quanto à participação de células de Schwann e macrófagos durante a DW, podem estar relacionadas a diferenças na expressão dessas moléculas.

Neste contexto, sabe-se que a iNOS pode ser induzida em células de Schwann e macrófagos através de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e outras citocinas (González-Hernandez e Rustioni, 1999; Levy *et al.*, 2001). Nossos resultados mostraram que a presença da iNOS, detectada indiretamente através da reação de NADPH-diaforase, se manifesta a partir do primeiro dia após a lesão nas células de Schwann e macrófagos em ambas linhagens. Contudo, o padrão de marcação na linhagem C57BL/6J manteve-se intenso no citoplasma de células Schwann até o quinto dia após a lesão, ao passo que na linhagem A/J esta evoluiu para um aspecto mais granular.

Embora a interpretação adequada deste achado dependa de uma investigação com métodos mais específicos, ele sugere que na linhagem C57BL/6J a produção de NO pelas células de Schwann seja mais intensa e persistente do que na linhagem A/J. Sendo assim, e considerando a crítica importância do NO e seus derivados para a degradação da mielina (van der Góes *et al.*, 1998; van der Veen *et al.*, 1999, Levy *et al.*, 2001), esse dado é concordante com a hipótese de que o maior número de células CSB observadas na linhagem C57BL/6J sejam células de Schwann.

O comportamento das células de Schwann durante a DW pode estar implicado com a baixa capacidade de regeneração observada na linhagem C57BL/6J quando comparada a outras linhagens de camundongos, entre elas a linhagem A/J (Lu *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1994; Lainetti *et al.*, 1995). Durante o processo regenerativo axonal as células de Schwann proliferam e alinham-se no interior de tubos de lâmina basal, de modo a formar as bandas de Büngner, expressando moléculas de adesão, componentes da matriz extracelular e fatores neurotróficos, que estimulam e orientam os axônios em regeneração (para revisão vide Ide, 1996). Experimentos *in vitro* mostraram que a maioria das células de Schwann mielinizantes entra em

processo mitótico após a mielina ser degradada em pequenos grânulos (Fernandez-Valle *et al.*, 1995). O maior número de células CSB contendo resíduos de mielina observado na linhagem C57BL/6J favorece a hipótese de retardo na citocinese das células de Schwann nesses animais. Conseqüentemente, a expressão de moléculas de adesão, de componentes da matriz extracelular e de fatores neurotróficos por estas células também pode ser afetada, comprometendo assim a sobrevivência neuronal e a regeneração axonal (Taira *et al.*, 1993). A partir do estudo de Lu *et al.* (1990) outros autores verificaram que a linhagem de camundongos C57BL/6J possui capacidade de regeneração axonal inferior à de linhagens, tais como a A/J (Lu *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1994; Lainetti *et al.*, 1995). Recentemente, alguns autores atribuíram essa baixa capacidade de regeneração à particular susceptibilidade dos neurônios sensitivos dos animais C57BL/6J a axotomia (Lainetti *et al.*, 1995; Oliveira, 2001). Contudo, não pode ser descartada a hipótese de que essa maior susceptibilidade dos neurônios sensitivos seja decorrente de um descompasso entre as necessidades de fatores tróficos dessas células e a sua produção pelas células não neurais durante o processo degenerativo-regenerativo no nervo. Nossos resultados mostraram diferenças quantitativas importantes entre as linhagens C57BL/6J e A/J durante a DW quanto à degradação dos NF e às células contendo mielina fagocitada, além de caracterizar pela primeira vez o padrão temporal da marcação da NADPH-diaforase nessas linhagens. Nossos dados também reforçam a hipótese de que a deficiência regenerativa da linhagem C57BL/6J pode ser resultante de uma dessincronização entre a produção de fatores neurotróficos pelas células de Schwann e a necessidade destas moléculas que os neurônios possuem durante o período crítico pós axotomia (Oliveira e Langone, 2000; Oliveira, 2001). Estudos em andamento, empregando técnicas de biologia molecular, deverão contribuir para esclarecer essas peculiaridades da DW observadas na linhagem C57BL/6J.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Prof<sup>a</sup> Glauce A. Pinto, ao Prof. José Vassallo (Laboratório de Patologia Experimental e Depto. de Anatomia Patológica, Unicamp) e ao Prof. Áureo Yamada (Laboratório de Imunoistoquímica e Depto. de Histologia e Embriologia, Unicamp) pelo suporte à técnica imunoistoquímica e também ao Sr. Marco Aurélio e Sr. Norivaldo Celestino pelo excelente suporte técnico. Este trabalho contou com o auxílio da FAPESP e da CAPES.

### Referências Bibliográficas

- AVELLINO, A.M.; HART, D.; DAILEY, A.T.; MACKINNON, M.; ELLEGALA, D.; KLIOT, M. Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during Wallerian degeneration of axons. *Exp. Neurol.*, **136(2)**:183-198, 1995.
- BEUCHE, W.; FRIEDE, R.L. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J. Neurocytol.*, **13**:767-796, 1984.
- BEUCHE, W.; FRIEDE, R.L. Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration depends on silica-sensitive, bg/bg-negative and Fc-positive monocytes. *Brain Res.*, **378**:97-106, 1986.
- BLOMGREN, K.; KARLSSON, J.O. Calpain and calpastatin activity in the optic pathway. *Neurosci. Lett.*, **112(2-3)**:179-183, 1990.
- BRÜCK, W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol.*, **7**:741-752, 1997.
- CARROLL, S.L.; MILLER, M.L.; FROHNERT, P.W.; KIM, S.S.; CORBETT, J.A. Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J. Neurosci.*, **17**:1642-1659, 1997.
- CARROLL, S.L., FROHNERT, P.W. Expression of JE (monocyte chemoattractant protein-1) is induced by sciatic axotomy in wild type rodents but not in C57BL/6J mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **57(10)**:915-30, 1998.
- CHARLES, P.C, WEBER, K.S, CIPRIANI, B.; BROSANAN, C.F. Cytokine, chemokine and chemokine receptor mRNA expression in different strains of normal mice: implications for establishment of a Th1/Th2 bias. *J. Neuroimmunol.*, **100(1/2)**:64-73, 1999.
- CHAUDHRY, V., GLASS, J.D.; GRIFFIN, J.W. Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. *Neurol. Clin.*, **10(3)**:613-627, 1992.
- DA SILVA, C.F.; LANGONE, F. Addition of nerve growth factor to the interior of a tubular prosthesis increases sensory neuron regeneration in vivo. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **22(6)**: 691-694, 1989.
- DE LA HOZ, C.L.R.; LANGONE, F. Expressão de iNOS durante a degeneração Walleriana em camundongos C57BL/6J e A/J, observada através de microscopia confocal. (2001) *In preparation.*

- DE VRIES, G.H. Schwann cell proliferation. In: **Peripheral Neuropathy**, Ed. P.J.Dyck, P.K.Thomas, J.W.Griffin, P.D.Low, J.Poduslo, Philadelphia, W.B.Saunders, 3<sup>ed.</sup>, 1993. p.290-298.
- DIEZ,E., YARAGHI,Z., MACKENZIE,A.; GROS,P. The neuronal apoptosis inhibitory protein (Naip) is expressed in macrophages and is modulated after phagocytosis and during intracellular infection with *Legionella pneumophila*. *J. Immunol.*,**164(3)**:1470-1477, 2000.
- ELHANANY, E., JAFFE, H., LINK, W.T., SHEELEY, D.M., GAINER, H.; PANT, H.C. Identification of endogenously phosphorylated KSP sites in the high-molecular-weight rat neurofilament protein. *J. Neurochem.*, **63(6)**:2324-2335, 1994.
- FERNANDEZ-VALLE, C.; BUNGE, R.P.; BUNGE, M.B. Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from *in vitro* studies of Wallerian degeneration. *J. Neurocytol.*, **24**: 667-679, 1995.
- FARINELLI, S.E.; PARK, D.S.; GREENE, L.A.Nitric oxide delays the death of trophic factor-deprived PC12cells and sympathetic neurons by a cGMP-mediated mechanism. *J. Neurosci.*, **16**:2325-2334, 1996.
- FIALLOS-ESTRADA, C.E.; KUMMER, W.; MAYER, B.; BRAVO, R.; ZIMMERMANN, M.; HERDEGEN, T. Long-lasting increase of nitric oxide synthase immunoreactivity NADPH-diaphorase reaction and c-JUN co-expression in rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection. *Neurosci. Lett.*, **150**:169-173, 1993.
- GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; RUSTIONI, A. Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration. *J. Neurosci. Res.*, **55(2)**:198-207, 1999.
- GRIFFIN, J.W ; HOFFMAN, P.N. Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. In: **Peripheral neuropathy**. Ed. P.J. Dyck, P.K. Thomas. Philadelphia, Saunders, v.1, p. 361-376, 1993.
- HEUMANN, R.; LINDHOLM, D.; BANDTLOW, C.; MEYER, M; RADEKE, M.J.; MISKO, T.P.; SHOOTER, E.; THOENEN, H. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration and regeneration: role of macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **84**:8735-8739, 1987.
- IDE, C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci. Res.*, **25(2)**: 101-121,1996.

- KAMAKURA, K., ISHIURA, S., SUGITA, H.; TOYOKURA, Y. Identification of Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease in the peripheral nerve and its effects on neurofilament degeneration. **J. Neurochem.**, **40(4)**:908-913, 1983.
- LAINETTI, R.D.; PEREIRA, F.C.; DA-SILVA, C.F. Reduced sensory neuron regeneration by C57BL/6J mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **28**: 781-785, 1995.
- LEVY, D.; HÖKE, A.; ZOCHODNE, D.W. Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. **Neurosci. Lett.**, **260**: 207-209, 1999.
- LEVY, D.; KUBES, P.; ZOCHODNE, D.W. Delayed peripheral nerve degeneration, regeneration, and pain in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **60(5)**:411-421, 2001.
- LINDHOLM, D.R.; HEUMANN, R.; MEYER, M. & THOENEN, H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. **Nature (Lond.)**, **330**: 658 - 659, 1987.
- LU, L.; RICHARDSON, P.M.; GERVAIS, F., SKAMENE, E. A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6J mice. **Brain Res.**, **510**:144-146, 1990.
- LU, X.; SKAMENE, E.; RICHARDSON, P.M. Studies of axonal regeneration in C57BL/6 and A/J mice. **Brain Res.**, **652**:174-176, 1994.
- LUBINSKA, L. Patterns of wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow of the trophic factor. **Brain Res.**, **233**: 227-240, 1982.
- MARTINI, R. The effect of myelinating Schwann cells on axons. **Muscle Nerve**, **24(4)**:456-466, 2001.
- MAXWELL, W.L., POVLISHOCK, J.T., GRAHAM, D.L. A mechanistic analysis of nondisruptive axonal injury: a review. **J Neurotrauma**, **14(7)**:419-440, 1997.
- MELLER, D., EYSEL, U.T.; SCHMIDT-KASTNER, R. Transient immunohistochemical labelling of rat retinal axons during Wallerian degeneration by a monoclonal antibody to neurofilaments. **Brain Res.**, **648**: 162-166, 1994.
- MÜLLER, H.W.; STOLL, G. Nerve injury and regeneration: basic insights and therapeutic interventions. **Curr. Opin. Neurol.**, **11**:557-562, 1998.

- NAKANO, A., KITA, E.; KASHIBA, S. Different sensitivity of complement to *Salmonella typhimurium* accounts for the difference in natural resistance to murine typhoid between A/J and C57BL/6 mice. **Microbiol. Immunol.**, **39(2)**: 95-103, 1995.
- OLIVEIRA, A. L. R. Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **34**:375-380, 2001.
- OLIVEIRA, A.L.R.; LANGONE, F. Non neuronal cells are not the limiting factor for the low axonal regeneration in C57BL/6J mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **33**:1467-1475,2000.
- O'MALLEY, J., MATESIC, L.E., ZINK, M.C., STRANDBERG, J.D., MOONEY, M.L., DE MAIO, A. and REEVES, R.H. Comparison of acute endotoxin-induced lesions in A/J and C57BL/6J mice. **J. Hered.**, **89(6)**:525-530, 1998.
- PANT, H.C. Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. **Biochem. J.**,**256(2)**:665-668, 1988.
- PERRY, V.H.; BROWN, M.C. Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair. **Bioassays**, **14**: 401 - 406, 1992.
- REICHERT, F; LEVITZKY, R.; ROTSHENKER, S. Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves. **Eur. J. Neurosci.**, **8**:530-535, 1996.
- RUTISHAUSER, U. Adhesion molecules of the nervous system. **Curr. Opin. Neurobiol.**, **3**:709-715, 1993.
- SCHLAEPFER, W.W. Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **46 (2)** : 117-129, 1987.
- SON, Y. ; THOMPSON, W. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. **Neuron**, **14**: 125-132, 1995.
- STOLL, G.; GRIFFIN, J.W.; LI, C.Y.; TRAPP, B.D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. **J. Neurocytol.**, **18**: 671-683, 1989.
- TAIRA, E.; TAKAHA, N.; MIKI, N. Extracellular matrix proteins with neurite promoting activity and their receptors. **Neurosc. Res.**, **17**:1-8, 1993.
- TERENGGHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J. Anat.**, **194**: 1-14, 1999.

- THIPPESWAMY T, MORRIS R. Nerve growth factor inhibits the expression of nitric oxide synthase in neurones in dissociated cultures of rat dorsal root ganglia. **Neurosci. Lett.**, **230(1)**:9-12, 1997.
- TSAO, J.W., PARAMANANTHAN, N., PARKES, H.G.; DUNN, J.F. Altered brain metabolism in the C57BL/6 mouse strain detected by magnetic resonance spectroscopy: association with delayed Wallerian degeneration? **J. Neurol Sci.**, **168(1)**:1-12, 1999.
- VAN DER GOES, A.; BROUWER, J.; HOEKSTRA, K.; ROOS, D.; VAN DEN BERG, T.K.; DIJKSTRA, C.D. Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. **J. Neuroimmunol.**, **92(1-2)**:67-75, 1998.
- VAN DER VEEN, R.C.; ROBERTS, L.J. Contrasting roles for nitric oxide and peroxynitrite in the peroxidation of myelin lipids. **J. Neuroimmunol.**, **95(1-2)**:1-7, 1999.
- XIE, X.Y.; BARRET, J.N. Membrane resealing in cultured rat septal neurons after neurite transection: evidence for enhancement by Ca<sup>2+</sup>-triggered protease activity and cytoskeletal disassembly. **J. Neurosci.**, **11(10)**: 3257-3267, 1991.
- WAEGH, S.M. de, LEE, V.M.Y.; BRADY, S.T. Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. **Cell**, **68**: 451-463, 1992.
- WAGNER, R.; MYERS, R.R. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. **Neuroscience**, **73(3)**:625-629, 1996.
- WHITE, F. A.; SILOS-SALIAGO, I.; MOLLIVER, D. C.; NISHIMURA, M.; PHILLIPS, H.; BARBACID, M.; SNIDER, W.D. Synchronous onset of NGF and trkA survival dependence in developing dorsal root ganglia. **J. Neurosci.**, **16**:4662-4672, 1996.
- WHYTE, A.L.; MILLER, S.C. Strain differences in natural killer cell-mediated immunity among mice: a possible mechanism for the low natural killer cell activity of A/J mice. **Immunobiol.**, **199(1)**: 23-38, 1998.
- ZIV, N.E. e SPIRA, M.E. Spatio temporal distribution of Ca<sup>2+</sup> following axotomy and throughout the recovery process of cultured *Aplysia* neurons. **Eur. J. Neurosci.**, **5(6)**: 657-668, 1993.
- ZUO, J.; HERNANDEZ, Y.J. e MUIR, D. Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite-inhibiting activity is up-regulated following peripheral nerve injury. **J. Neurobiol.**, **34(1)**: 41-54, 1998.

**TABELA 1- Densidade de volume da imunomarcção de NF nas linhagens A/J e C57BL/6J, nos grupos com 1, 3, 5 e 7 dias após lesão e no grupo controle (%).**

Linhagem	controle	T1	T3	T5	T7
A/J	45,31%	45,04% <sup>a</sup>	29,74% <sup>a</sup>	11,72%	8,11%
C57BL/6J	47,26%	40,10%	23,79%	11,25%	5,16%

<sup>a</sup> Estatisticamente significativo em relação à C57BL/6J ( $p < 0,05$ , teste de Neuman-Keuls)

**TABELA 2- Número de células coradas em negro pelo *Sudan Black*Imm<sup>2</sup>, em camundongos A/J e C57BL/6J, nos grupos com 3, 5 e 7 dias após lesão. (média±DP)**

Dias após a lesão	A/J	C57BL/6J
3 dias	54,9 ± 13,3	152,4 ± 10,9 <sup>a</sup>
5 dias	53,3 ± 10,7	131,5 ± 15,0 <sup>b</sup>
7 dias	114,0 ± 17,6	95,6 ± 13,7

<sup>a</sup> Estatisticamente significativo em relação à A/J ( $p < 0,001$ , teste de Neuman-Keuls)

<sup>b</sup> Estatisticamente significativo em relação à A/J ( $p < 0,01$ , teste de Neuman-Keuls)

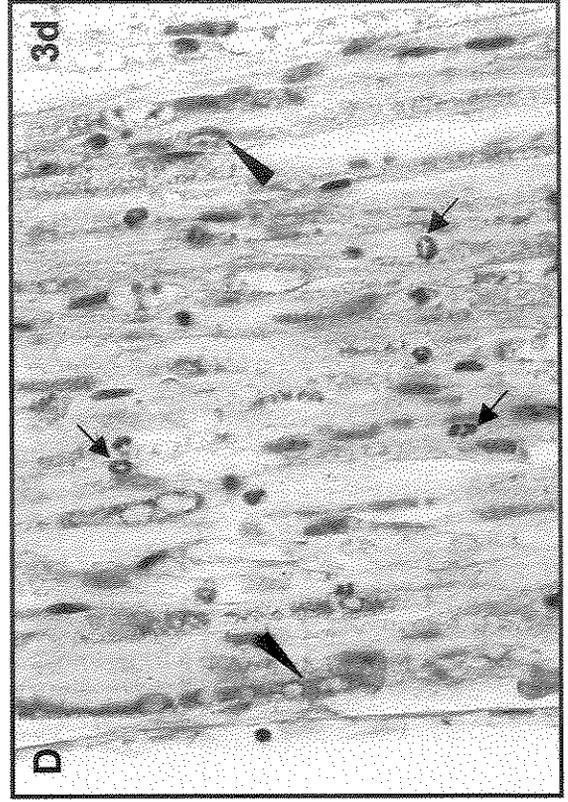
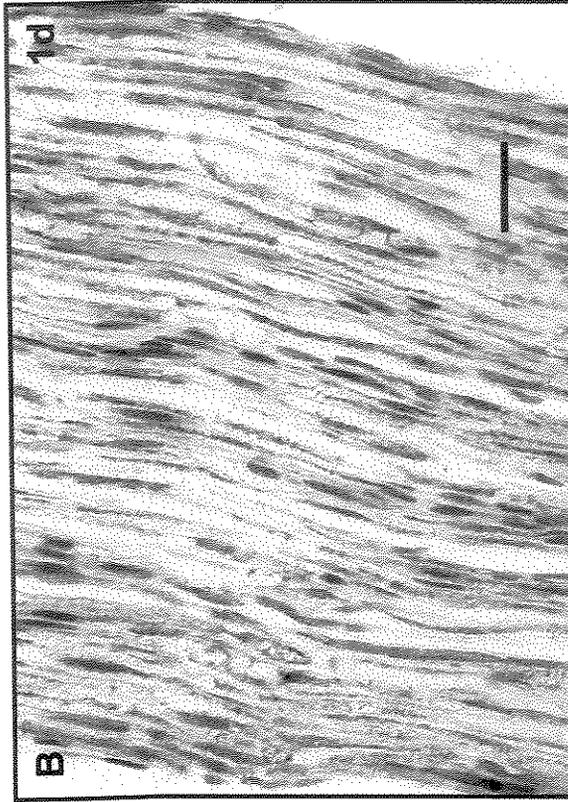
## TÍTULO DAS FIGURAS

**Figura 1** - Cortes longitudinais de nervos ciáticos de camundongos A/J e C57BL/6J sacrificados 1 (A e B), 3 (C e D), 5 (E e F) e 7 (G e H) dias após a lesão. (A e B): Um dia após a lesão, não é possível distinguir nenhuma alteração morfológica com relação aos nervos controles, estando os NF distribuídos ao longo de todo o axônio; (C e D): 3 dias após a lesão, a fragmentação dos NF é evidente, surgindo os segmentos elipsóides (cabeças de seta) e células polimorfonucleares (setas); (E e F): Os segmentos elipsóides já se encontram mais escassos; (G e H): A marcação para NF agora se restringe a pequenos aglomerados compactos e dispersos. Marcação imunistoquímica para NF (em castanho-claro). Barra = 20 $\mu$ m.

**Figura 2** - Cortes longitudinais de nervos ciáticos de camundongos A/J e C57BL/6J sacrificados 1 (A e B), 3 (C e D), 5 (E e F) e 7 (G e H) dias após a lesão. Embora não sejam observadas células coradas em negro (CSB) nos cortes de 1 dia pós-lesão (A e B), elas são numerosas nos tempos posteriores, principalmente na linhagem C57BL/6J, 3 e 5 dias após a lesão (D e F). Observa-se o aumento da fragmentação da mielina e dos axônios conforme o progresso da DW. Algumas células CSB podem ser vistas no perineuro (F). Sete dias após a seção do nervo, os axônios e a mielina encontram-se em avançado grau de degeneração (G e H). Histoquímica de *Sudan Black*. Barra = 20 $\mu$ m.

**Figura 3** - Cortes longitudinais de nervos ciáticos de camundongos A/J e C57BL/6J sacrificados 1 (A e B), 3 (C e D), 5 (E e F) e 7 (G e H) dias após a lesão. Um dia após a lesão há marcação de algumas células alongadas (A e B) e de forma mais arredondada (detalhe em A). São evidenciados vasos (D, no alto) e células de variadas formas (detalhes em C, D e E). A marcação evolui para um aspecto granular disperso (E - H), mas na linhagem C57BL/6J ainda predomina uma marcação homogênea pelo citoplasma de algumas células. Histoquímica para NADPH-diaforase. Barra = 20 $\mu$ m.

Linhagem C57BL/6J



Linhagem A/J

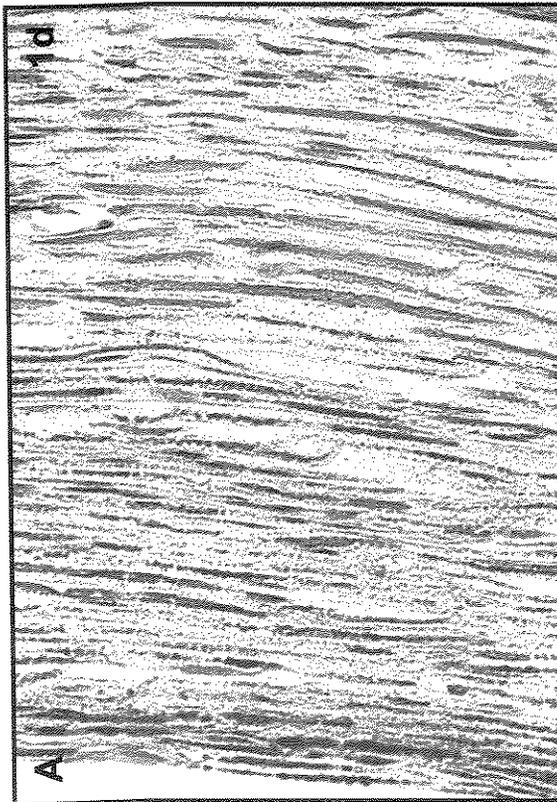
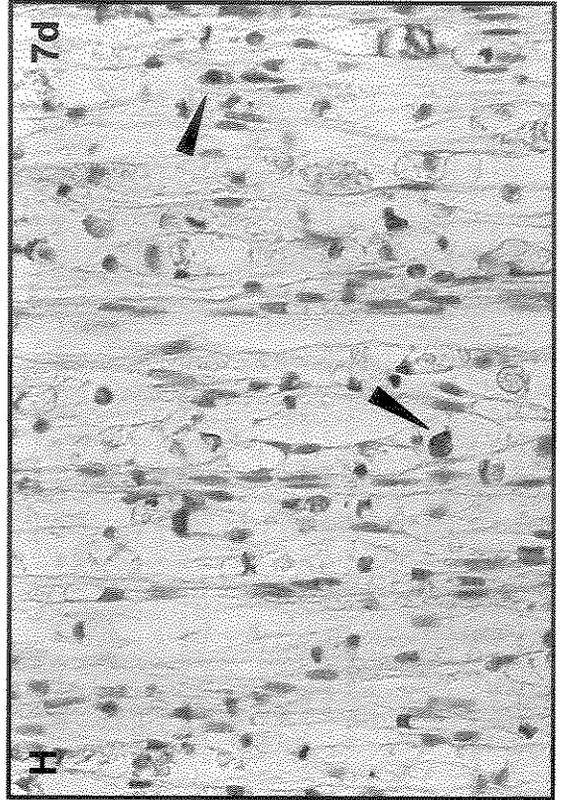
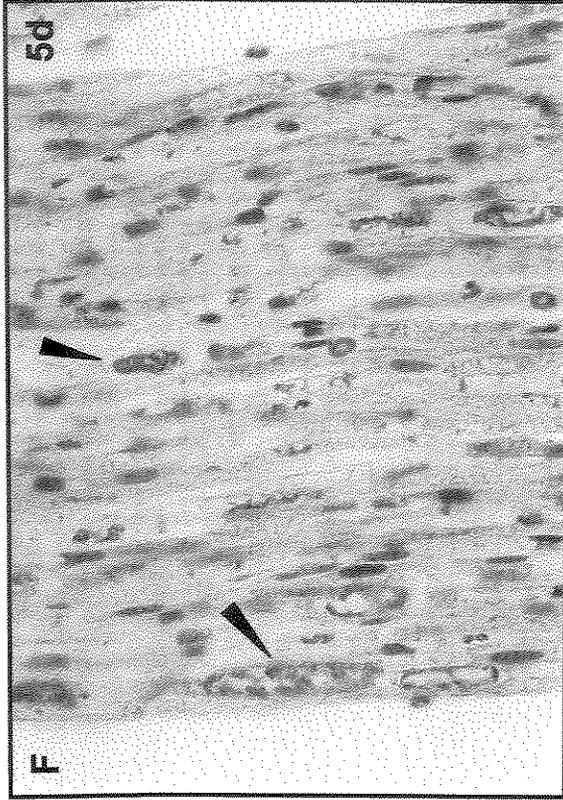


Figura 1

Linhagem C57BL/6J



Linhagem A/J

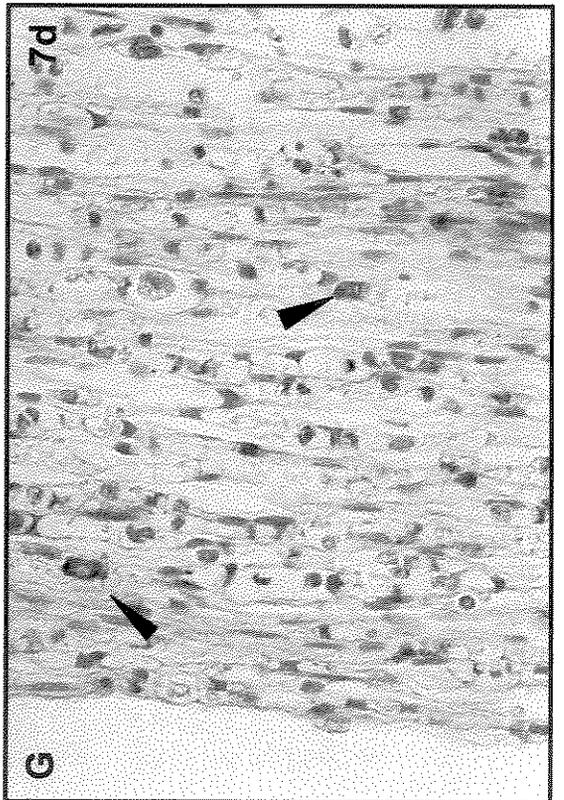
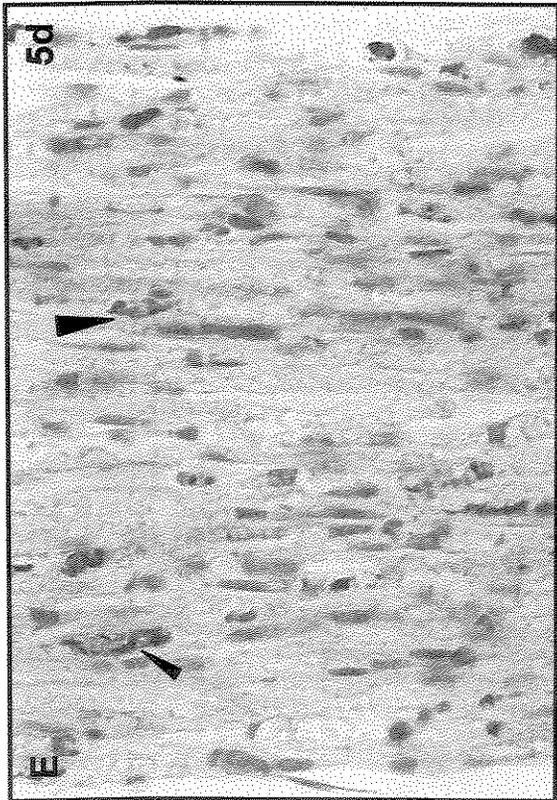


Figura 1 (Continuação)

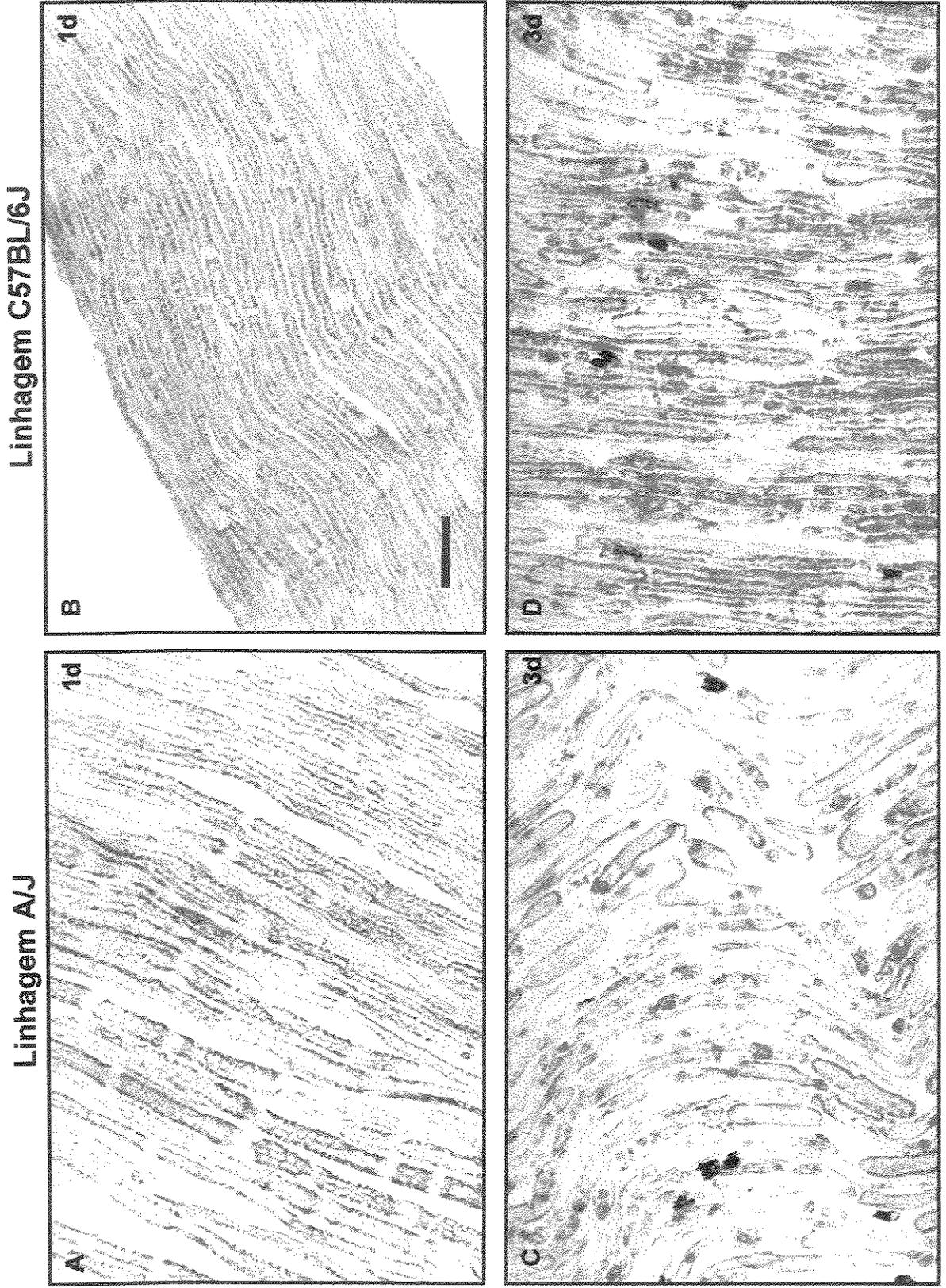
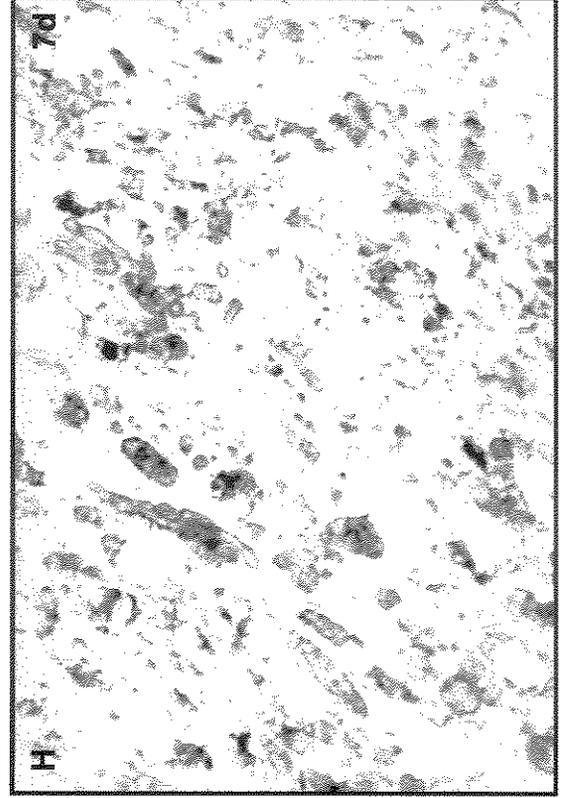
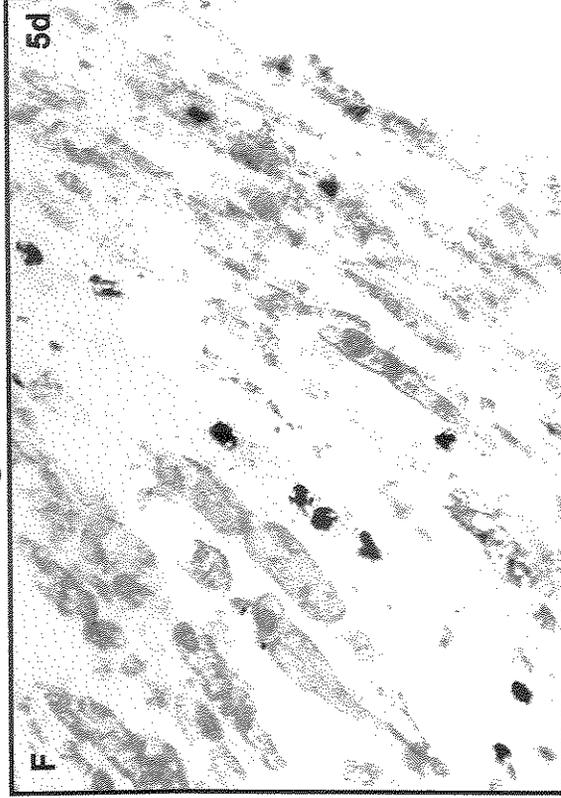


Figura 2

Linhagem C57BL/6J



Linhagem A/J

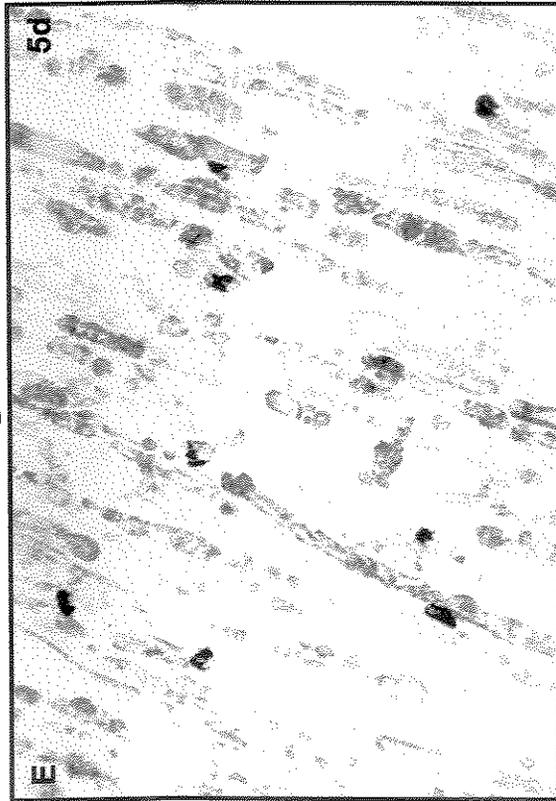


Figura 2 (Continuação)

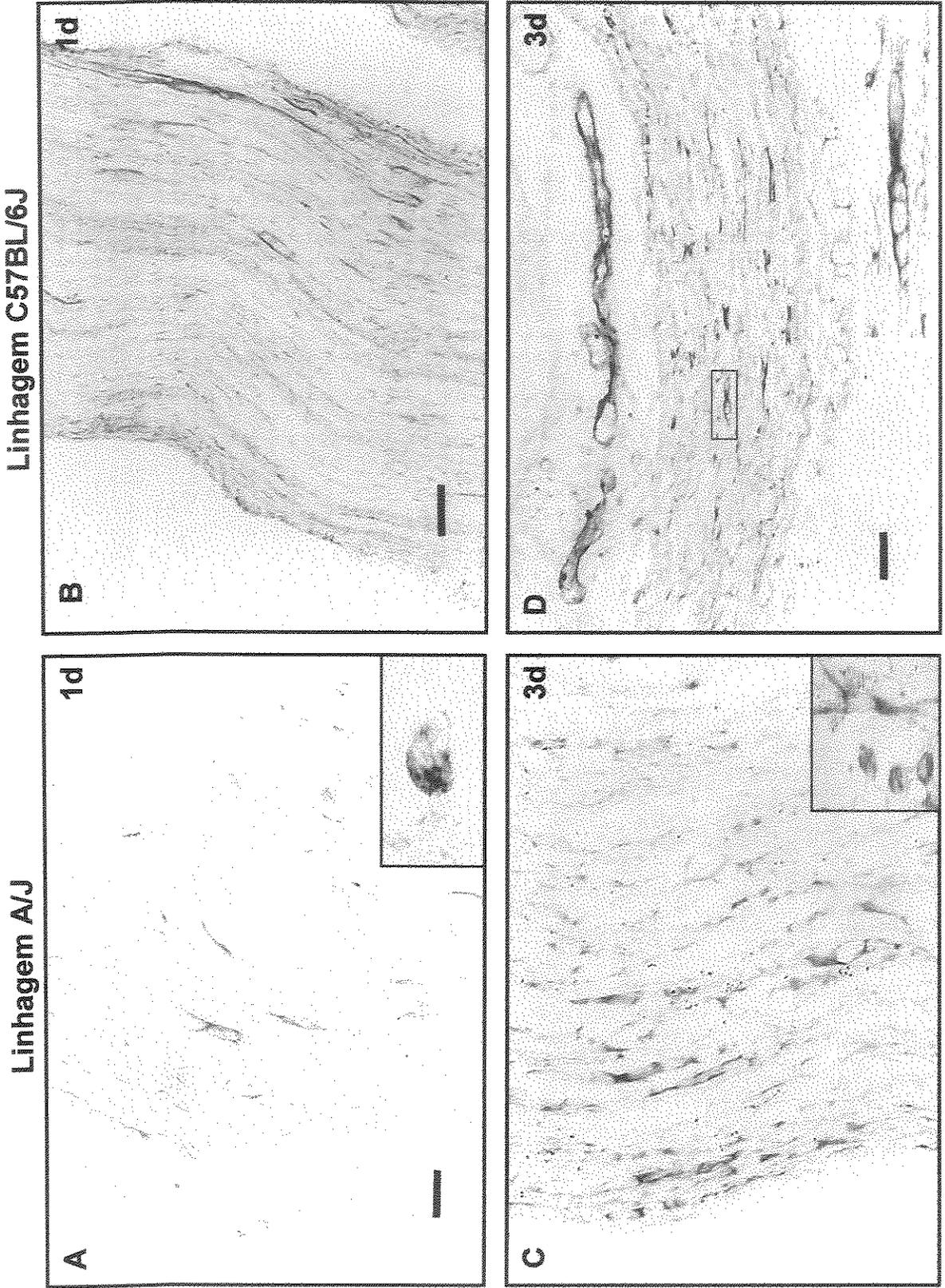


Figura 3

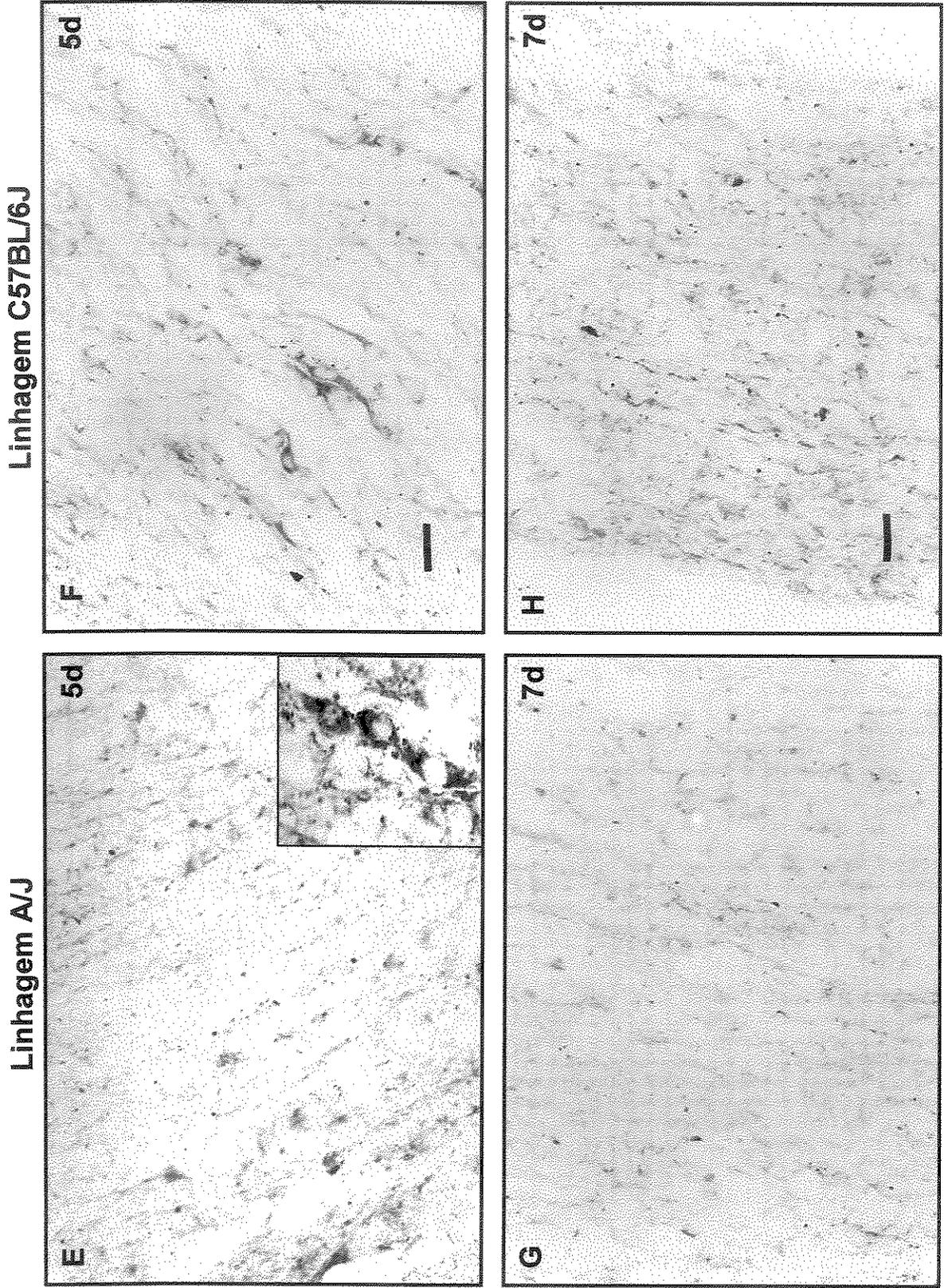


Figura 3 (Continuação)

## **5. ARTIGO 2**

**EXPRESSÃO DE iNOS DURANTE A DEGENERAÇÃO WALLERIANA EM CAMUNDONGOS C57BL/6J, OBSERVADA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL.**

Cristiane R. De La Hoz, (1) e Francesco Langone, (2).

(1) Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

(2) Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

### Resumo

O papel da enzima óxido nítrico sintase (NOS) nos processos de degeneração e regeneração de nervos periféricos ainda é um tema em discussão. Neste trabalho investigamos a localização e o padrão temporal da expressão da isoforma iNOS durante a degeneração Walleriana. Camundongos da linhagem C57BL/6 e AJJ tiveram o nervo ciático seccionado e o coto proximal impedido de regenerar. Após períodos de 1, 3, 5 e 7 dias, os cotos distais foram retirados e processados para reação imunistoquímica de F4/80 (macrófagos), iNOS (isoforma induzida da NOS) e S100 (células de Schwann). A imunofluorescência observada ao microscópio confocal evidenciou células de Schwann e macrófagos duplamente marcados para iNOS, desde o 1º até o 7º dia após a lesão, em ambas linhagens. Os macrófagos apresentaram uma intensa imunoreatividade, enquanto que nas células de Schwann esta foi pouco evidente. Constatou-se um retardo no recrutamento dos macrófagos para o coto distal na linhagem C57BL/6J, bem como um padrão temporal de expressão de iNOS distinto daquele observado para a linhagem AJJ.

## Introdução

A interrupção dos axônios, quer por esmagamento ou seção de um nervo periférico, produz alterações morfofuncionais distalmente à lesão que constituem o processo denominado degeneração Walleriana (DW). Durante este processo degenerativo, além da fragmentação e degradação dos axônios e da bainha de mielina, ocorre a produção de citocinas e outras moléculas importantes no desenvolvimento do processo degenerativo-regenerativo axonal. Macrófagos são intensamente recrutados da circulação sanguínea para o coto distal do nervo, onde juntamente com as células de Schwann, fagocitam resíduos axonais e de mielina. Além disso, os macrófagos são responsáveis pela produção de citocinas tais como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento tumoral-beta (TGF- $\beta$ ) e IL12 (para revisão vide Brück, 1997). As células de Schwann, por sua vez, entram em processo mitótico intenso e se organizam no interior de tubos de membrana basal, formando os cordões de Büngner. Além de aumentar a produção de componentes da matriz extracelular e a expressão de diferentes tipos de moléculas de adesão, as células de Schwann expressam vários fatores neurotróficos e citocinas importantes para a sobrevivência e regeneração neuronais, tais como: o fator de crescimento do nervo (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina-3 (NT-3), o fator neurotrófico ciliar (CNTF), o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e a IL-6. (De Vries, 1993, Müller e Stoll., 1998; Terenghi, 1999).

Alguns autores têm obtido evidências de que tanto macrófagos como células de Schwann são capazes de expressar a isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS). A NOS é responsável pela produção do óxido nítrico (NO) em uma reação de conversão da L-arginina em L-citrulina, na presença de O<sub>2</sub> e também da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como doador de elétrons (Dawson e Dawson, 1996; Levy *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 2001). Contudo, a atuação do NO dentro do contexto do processo degenerativo-regenerativo no nervo ainda é controversa, podendo estar envolvida na sobrevivência neuronal através de sua interação com outras moléculas neurotróficas (Fiallos-Estrada *et al.* 1993;

Farinelli *et al.*, 1996; White *et al.*, 1996; Thippeswamy e Morris, 1997) e/ou participando do processo de degradação das fibras nervosas (González-Hernandez e Rustioni, 1999; Levy *et al.*, 2001).

Alguns trabalhos relataram que a linhagem de camundongos isogênicos C57BL/6J apresenta deficiência na capacidade regenerativa axonal (Lu *et al.*, 1990; Lainetti *et al.*, 1995), grande perda de neurônios sensitivos por apoptose após seção nervosa (Oliveira, 2001) e diferenças na degradação de neurofilamentos e remoção da mielina em relação à linhagem A/J (de la Hoz e Langone, 2001). Neste trabalho observamos o padrão temporal e espacial da expressão de iNOS durante a DW em um nervo seccionado e impedido de regenerar, através de técnica imunistoquímica e microscopia confocal, comparando a linhagem C57BL/6J à linhagem A/J.

No modelo de seção nervosa, os macrófagos são capazes de expressar iNOS de forma muito mais evidente do que as células de Schwann, o que pode estar relacionado à sua intensa atividade fagocítica e degradativa durante a DW. Além disso, na linhagem C57BL/6J parece ter havido um retardo no início do recrutamento dos macrófagos, bem como um padrão temporal diferenciado de expressão da iNOS no decorrer da DW, comparativamente à linhagem A/J.

## **Material e Métodos**

### **Animais**

Foram utilizados camundongos machos adultos com 8 semanas de idade, das linhagens isogênicas C57BL/6J (n=12) e A/J (n=12), adquiridos do Centro de Bioterismo da Unicamp. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em biotério sob condições controladas de luz e temperatura, recebendo ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp.

### **Procedimentos cirúrgicos**

Após anestesia com uma mistura de quetamina (160mg/kg) e cloridrato de xilazina (32mg/kg), por via intraperitoneal, os animais tiveram o nervo ciático esquerdo exposto e seccionado na altura do forame obturado. O coto proximal foi ligado com fio de seda 4-0 (Ethicon) para impedir reinervação do coto distal, enquanto que este último foi deixado livre em seu leito. Concluída a cirurgia, a pele foi suturada e os animais retornaram ao biotério até a data do sacrifício.

### **Processamento dos espécimes**

Um, 3, 5 e 7 dias após a cirurgia, os animais foram anestesiados com quetamina e cloridrato de xylazina, sendo o coto distal esquerdo e o nervo ciático direito (não operado) dissecados até a fossa poplítea, removidos e fixados em paraformaldeído 4% por 12 horas. Em seguida, foram lavados em PBS 0,1M e crioprotetidos em uma solução de sacarose 30% a 4°C. Os espécimes foram incluídos em meio "OCT" (Tissue Freezing Medium, Triangle Biomedical Science), rapidamente congelados em isopentano resfriado em gelo seco e conservados a -70°C. Foram realizados cortes longitudinais seriados com 8µm de espessura, coletados alternadamente em lâminas silanizadas, de modo a se obter cortes representativos de 4 diferentes níveis do nervo em uma mesma lâmina. Os cortes foram estocados em "freezer" (-20°C) até o seu processamento imunohistoquímico ou coloração com hematoxilina e eosina.

### **Imunohistoquímica e microscopia confocal**

Para observação da presença da iNOS, bem como as células que estariam expressando esta enzima, foram utilizados anticorpos específicos para a isoforma iNOS, para a proteína S-100 (marcadora citoplasmática de células de Schwann) e para a glicoproteína F4/80 (um marcador de membrana celular de macrófagos).

Os cortes foram retirados do "freezer" e deixados por 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir foram lavados com PBS 0,1M, pH 7,4, e pré-incubados por 1 hora com uma solução 3% de BSA e 0,1% de Tween em PBS. Após

este procedimento, os cortes foram incubados em câmara úmida a 4°C, por 12 a 15 horas, com os anticorpos primários: policlonal de cabra anti-iNOS (1:200, Santa Cruz), monoclonal de rato anti-antígeno F4/80 (1:250, Serotec), e policlonal de coelho anti-S100 (1:250, Dako), diluídos em tampão PBS contendo 1% de BSA, 0,3% de Triton X-100 e 0,01% de azida sódica. Ao final do período de incubação, os cortes foram lavados com PBS e incubados por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de cabra, conjugado ao FITC (1:100, Santa Cruz). A seguir, foram incubados por 1 hora com os anticorpos secundários anti-IgG de rato e IgG de coelho, conjugados aos fluorocromos rodamina (1:100, Santa Cruz) e Cy5 (1:100, Amersham), respectivamente. Terminada esta incubação, os cortes foram lavados com PBS, reagidos com DAPI (Sigma) para evidenciação dos núcleos, e cobertos com lamínulas em glicerol/PBS (3:1) contendo 0,1% de  $\rho$ -fenilenodiamina (DABCO, Sigma) para proteção da imunofluorescência. Em cada série de reações foram empregados cortes controles nos quais se omitiu o anticorpo primário ou secundário.

A observação da marcação foi realizada em microscópio confocal (modelo MRC1024UV, BioRad), equipado com os lasers Ar-Kr e UV e acoplado a um microscópio invertido Axiovert 100 Zeiss. Os comprimentos de onda de 568nm, 488nm, 545nm e 351nm foram utilizados para excitar, respectivamente, rodamina, fluoresceína, Cy5 e DAPI. Através da objetiva de 40x 1,4 NA, com imersão a água, foram coletadas imagens da tripla marcação imunoistoquímica, separadamente nos canais RGB.

### **Contagem dos macrófagos e análise estatística**

A contagem dos macrófagos F4/80<sup>+</sup> e iNOS<sup>+</sup> foi realizada empregando-se campos amostrais de 0,09mm<sup>2</sup>, sendo um por corte e evitando-se as regiões próximas às extremidades do espécime. A área mínima amostrada por nervo foi de 0,21mm<sup>2</sup>. Considerou-se para a contagem, apenas as células F4/80<sup>+</sup> e as células duplamente marcadas para F4/80 e iNOS (F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>) cujo núcleo foi evidenciado com DAPI. Os resultados foram estatisticamente avaliados através da análise da variância (ANOVA), seguida pelo teste de Neuman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados**

Nos nervos controles de ambas linhagens foram observadas raras células F4/80<sup>+</sup>, com prolongamentos dispostos na vizinhança de vasos e por entre as fibras nervosas. Às vezes, algumas células F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> foram observadas dentro de vasos do perineuro. As células S100<sup>+</sup> apresentaram-se distribuídas contiguamente e ao longo das fibras nervosas (Figura 2A).

Nos cotos distais dos camundongos A/J observou-se significativo aumento no número de células F4/80<sup>+</sup>, 1 dia após a lesão (Figura 3A), a maioria destas apresentando formato arredondado e distribuídas principalmente no perineuro, no interior de vasos e algumas poucas no endoneuro. Ao contrário da linhagem A/J, nos camundongos C57BL/6J, o número de células F4/80<sup>+</sup> manteve-se praticamente estável (Figura 3A). No entanto, em ambas linhagens, a maior parte das células F4/80<sup>+</sup> apresentaram-se intensamente marcadas também para iNOS (Figuras 1A-B, 2B e 3B). As células S100<sup>+</sup> apresentaram morfologia semelhante à dos nervos controles, mas, diferentemente destes, puderam ser observadas algumas células S100<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>, com marcação para iNOS menos intensa do que as células F4/80 (Figura 2A e 2B).

No terceiro dia após a lesão houve um evidente aumento no número de células F4/80<sup>+</sup> e F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> ao longo do coto distal de ambas linhagens, que atingiu seu pico no quinto dia (Figura 3). Tais células foram localizadas dentro de vasos, no perineuro e no endoneuro (Figuras 1C-F e 2C-F). Ao contrário do observado no primeiro dia após a lesão, não houve diferença estatisticamente significativa entre as linhagens quanto ao número de células F4/80<sup>+</sup> no terceiro e no quinto dia (Figura 3A). No entanto, a linhagem C57BL/6J apresentou um número significativamente menor de células F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> do que a linhagem A/J, 3 dias após a seção do nervo (Figura 3B). Observou-se também que em ambas linhagens, no 3<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dia pós-lesão, as células S100<sup>+</sup> exibiram uma marcação com aspecto tipicamente segmentado de modo a formar segmentos elipsóides. As células S100<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>, apesar de menos freqüentes que as células F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>, apresentaram marcação menos intensa para iNOS em ambas linhagens de

camundongos. O aumento da celularidade no coto distal foi evidenciado pelo DAPI, correspondendo em parte, ao aumento no número de células F4/80<sup>+</sup> (Figuras 1D;F, 2D;F).

Sete dias após a lesão houve uma redução no número de células F4/80<sup>+</sup> em relação ao quinto dia para ambas as linhagens, sendo no entanto estatisticamente significativa somente na linhagem A/J (Figura 3A). Observou-se um grande número de células F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>, mas também foram observadas algumas células S100<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>, como nos tempos anteriores (Figura 3).

É interessante notar que a linhagem A/J apresenta um grande aumento (cerca de 361%) no número de células F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> do 1<sup>o</sup> ao 3<sup>o</sup> dia, mas permanece estável até o 7<sup>o</sup> dia após a lesão. Já a linhagem C57BL/6J apresenta um aumento no número dessas células de cerca de 490% , do 1<sup>o</sup> ao 3<sup>o</sup> dia pós-lesão,

### **Discussão e Conclusão**

Nossos resultados mostraram, pela primeira vez, o padrão temporal e a localização da expressão da iNOS durante a DW, causada pela seção completa do nervo ciático, em camundongos das linhagens C57BL/6J e A/J. Foi possível também analisar a expressão da iNOS pelos macrófagos e células de Schwann na ausência de axônios em regeneração. Nossos dados revelaram ainda, que o padrão temporal da expressão dessa enzima por essas células difere entre as duas linhagens estudadas.

A expressão de iNOS pelos macrófagos e células de Schwann nos camundongos C57BL/6J e A/J durante a DW confirmam as observações relatadas por outros autores empregando outros modelos experimentais (Levy *et al.*, 1999; González-Hernandez e Rustioni, 1999; Levy *et al.*, 2001). Contudo, pudemos verificar no modelo de seção completa do nervo que, em ambas linhagens e em todos os tempos pós axotomia analisados, a maioria dos macrófagos expressam iNOS, ao passo que apenas uma pequena parte das células de Schwann são iNOS<sup>+</sup>. Isto contrasta com as observações de autores que trabalharam com o modelo de lesão

por constrição crônica (CCI). Levy *et al.* (1999), por exemplo, observaram a expressão de iNOS a partir do quinto dia após a lesão do nervo ciático no modelo de CCI, tanto em macrófagos como em células de Schwann, enquanto que González-Hernández e Rustioni (1999) detectaram a presença de iNOS 2 dias após a ligadura, mas somente em macrófagos.

Nossos resultados sugerem que, no caso da seção completa do nervo periférico, as células de Schwann não são as principais células a expressarem a isoforma iNOS durante a DW e, conseqüentemente, não são grandes produtoras de NO. Esta função provavelmente é atribuída aos macrófagos, principais células envolvidas na intensa fagocitose e degradação da mielina no nervo em degeneração (Brück, 1997; González-Hernández e Rustioni, 1999). Recentemente, Levy *et al.* (2001) avaliaram a importância da iNOS e do NO no processo degenerativo-regenerativo, em camundongos mutantes “nocauteados” para iNOS (iNOS-KO), utilizando para isso, diferentes tipos de lesão nervosa periférica: esmagamento, seção completa e constrição crônica do nervo. Eles constataram que a ausência da iNOS nos animais iNOS-KO retarda tanto a DW quanto a regeneração axonal, nos diferentes tipos de lesão. O NO parece ser fundamental na peroxidação lipídica necessária para a degradação da bainha de mielina (van der Goes *et al.*, 1998; van der Veen e Roberts, 1999; Levy *et al.*, 2001). Isto parece justificar o retardo da DW em virtude da ausência da iNOS e, conseqüentemente, a inibição da formação e crescimento de neuritos. As células de Schwann, apesar de também participarem da fagocitose e remoção da mielina (Stoll *et al.*, 1989; Fernandez-Valle, *et al.*, 1995), provavelmente possuem outros mecanismos de degradação que não envolvam a ação do NO, como por exemplo, através de fosfolipases (Goodrum e Bouldin, 1996). Já foi demonstrado que no nervo em degeneração há uma grande atividade da fosfolipase A (Webster, 1993). Trabalhos utilizando acetato marcado com carbono 14 e glicerol marcado com trítio mostraram que o aumento na síntese de ésteres de colesterol e glicerolípídios neutros deve ser atribuído à quebra de fosfolípídios da mielina mediada por fosfolipases e a subsequente reutilização dos ácidos graxos liberados. Estas alterações refletem alterações no metabolismo das células de Schwann, uma vez que foram verificadas antes da infiltração pelos macrófagos.

(Goodrum e Bouldin, 1996). Outro ponto importante refere-se ao fato da indução da iNOS requerer a ativação apropriada de células de Schwann e macrófagos por meio de endotoxinas,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  e outras citocinas como a IL-1, muitas destas presentes no nervo lesado e secretadas em parte por macrófagos (Nathan, 1992; Creange *et al.*, 1998). Nossos resultados mostram que tanto em camundongos C57BL/6J como nos A/J, além das células de Schwann serem capazes de expressar iNOS 24 horas após a lesão, elas mantêm a expressão dessa enzima no nervo em degeneração ao longo de 7 dias. Em modelos onde a regeneração axonal é permitida, tem sido relatada a ocorrência de uma expressão transitória de iNOS nas células de Schwann, principalmente no início do processo degenerativo-regenerativo, quando predominam fibras em degeneração (Levy *et al.*, 1999). Sugerimos então que a expressão de iNOS pelas células de Schwann esteja sendo regulada pela presença dos axônios. Neste sentido, vale ressaltar que nos nervos intactos não observamos células de Schwann iNOS<sup>+</sup>.

Em nosso trabalho verificamos que nos animais A/J o número de macrófagos presentes no coto distal aumentou significativamente 1 dia após a lesão, ao passo que na linhagem C57BL/6J isto ocorreu apenas no terceiro dia. Este retardo na migração dos macrófagos poderia supostamente implicar, para a linhagem C57BL/6J, em um retardo na fragmentação e degradação da bainha de mielina e degeneração dos axônios. Contudo, observações realizadas recentemente em nosso laboratório mostraram que, além da remoção da mielina não se apresentar retardada na linhagem C57BL/6J, a degradação dos neurofilamentos ocorre mais rapidamente (de la Hoz *et al.*, 2001). Na realidade, o retardo no recrutamento de macrófagos hematógenos na linhagem C57BL/6J parece ter sido compensado por uma intensa migração dessas células para o coto distal a partir do terceiro dia após a lesão. No entanto, verificamos que 3 dias após a lesão, apesar de não haver diferença significativa no número de macrófagos em ambas linhagens, o número de macrófagos iNOS<sup>+</sup> foi significativamente menor na linhagem C57BL/6J em relação à linhagem A/J. Analisando todos os intervalos de tempo estudados, pudemos verificar padrões distintos quanto à presença de macrófagos expressando iNOS entre ambas linhagens. Nos animais A/J, o número destas células aumentou até o terceiro dia

após a lesão, permanecendo relativamente estável posteriormente. Nos camundongos C57BL/6J, porém, o número de macrófagos iNOS<sup>+</sup> aumenta até o quinto dia após a lesão. É provável que o retardo no início do recrutamento de macrófagos para o coto distal nos animais C57BL/6J esteja relacionado com o retardo na indução da iNOS por essas células, eventos que devem envolver a ação de diversas citocinas. Os mecanismos e os sinais envolvidos na quimiotaxia e migração de macrófagos para o nervo durante a DW não estão ainda bem esclarecidos. Entre os fatores quimiotáticos estão algumas moléculas de adesão (selectinas), o componente 3 do complemento sérico (C3), o receptor de complemento tipo 3 (CR3), a mielina em degradação e algumas quimiocinas tais como MCP-1 (proteína quimiotática monocítica 1) e seu receptor CCR2 (Brück, 1997; Kiefer *et al.*, 2001). Diferenças temporais na liberação destes sinais quimiotáticos durante a DW podem ser responsáveis pela diferença observada entre as linhagens C57BL/6J e A/J quanto ao recrutamento de macrófagos para o coto distal em degeneração. Da mesma forma, pode haver diferenças temporais na produção de liberação de citocinas envolvidas na indução da NOS, já citadas anteriormente.

Estes dados referentes à dinâmica dos macrófagos e à sua expressão de iNOS durante a DW em camundongos C57BL/6J são importantes no contexto do processo degenerativo-regenerativo, por tratar-se de uma linhagem que apresenta capacidade de regeneração axonal inferior à de outras linhagens isogênicas, entre elas, a A/J (Lu *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1994; Lainetti *et al.*, 1995). Apesar do relato de diferenças entre linhagens isogênicas de camundongos quanto à resistência ou susceptibilidade a patógenos, endotoxinas, tumores e doenças auto-imunes (Nakano *et al.*, 1995; O'Malley *et al.*, 1998; Whyte e Miller, 1998; Diez *et al.*, 2000), não foi possível estabelecer uma correlação direta destas diferenças à deficiência regenerativa axonal observada nos animais C57BL/6J. Na realidade, este fenômeno característico da linhagem C57BL/6J parece ser resultado de um conjunto de fatores relacionados às características intrínsecas dos axônios e das células envolvidas no processo de DW e regeneração axonal (Lu *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1994; Oliveira e Langone, 2000; Oliveira, 2001; de la Hoz *et al.*, 2001). Nesse sentido, surge a hipótese de que haveria uma dessincronização entre as necessidades tróficas dos

neurônios e o oferecimento dessas condições pelas células não-neurais. Nossos resultados reforçam essa hipótese, sugerindo alterações temporais na produção e liberação de citocinas no microambiente do nervo lesado. Uma vez que a interação destas com as diferentes células no nervo é fundamental para a condução adequada do processo de DW e a formação de um ambiente favorável à regeneração, seria interessante investigar o padrão temporal da expressão de algumas citocinas na linhagem C57BL/6J.

Após seção do nervo ciático, a linhagem C57BL/6J apresenta um retardo no recrutamento de macrófagos para o coto distal, quando comparada aos camundongos A/J, e um padrão temporal diferente para a expressão da iNOS. Enquanto que a maioria dos macrófagos expressa conspicuamente essa enzima, as células de Schwann o fazem menos intensamente. Isso pode estar relacionado a diferentes mecanismos de degradação presentes nas diferentes células. As diferenças observadas entre estas linhagens podem servir para outras análises dos processos degenerativo e regenerativo no sistema nervoso periférico em trabalhos futuros.

### **Agradecimentos**

Os autores são imensamente gratos ao Prof. Dr. Hernandes F. de Carvalho pela sua valiosa orientação quanto à técnica de imunofluorescência e pela sua colaboração na aquisição de imagens ao microscópio confocal. Este trabalho recebeu auxílio financeiro da CAPES.

### **Referências Bibliográficas**

- BRÜCK, W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. **Brain Pathol.**, 7:741-752, 1997.
- CRÉANGE, A; LEFAUCHEUR, J. P.; AUTHIER, F. J.; GHERARDI, R. K. Cytokines et neuropathies périphériques. **Ver. Neurol.**,154(3): 208-216, 1998.
- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide in neuronal degeneration. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 211:33-40, 1996.
- DE LA HOZ, C.L.R.; OLIVEIRA, A.L.R.; DE LUCA, I.M.; JOAZEIRO, P.P.; IRAZUSTA, S.P.; LANGONE, F. Diferenças em eventos da degeneração Walleriana entre camundongos C57BL/6J e A/J. (2001) **In preparation.**
- DE VRIES, G.H. Schwann cell proliferation. In: **Peripheral Neuropathy**, Ed. P.J.Dyck, P.K.Thomas, J.W.Griffin, P.D.Low, J.Poduslo, Philadelphia, W.B.Saunders, 3ªed., 1993. p.290-298.
- DIEZ, E., YARAGHI,Z., MACKENZIE,A.; GROS,P. The neuronal apoptosis inhibitory protein (Naip) is expressed in macrophages and is modulated after phagocytosis and during intracellular infection with *Legionella pneumophila*. **J.Immunol.**,164(3):1470-1477, 2000.
- FARINELLI, S.E.; PARK, D.S.; GREENE, L.A.Nitric oxide delays the death of trophic factor-deprived PC12cells and sympathetic neurons by a cGMP-mediated mechanism. **J. Neurosci.**, 16:2325-2334, 1996.
- FERNANDEZ-VALLE, C.; BUNGE, R.P.; BUNGE, M.B. Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from *in vitro* studies of Wallerian degeneration. **J. Neurocytol.**, 24: 667-679, 1995.
- FIALLOS-ESTRADA, C.E.; KUMMER, W.; MAYER, B.; BRAVO, R.; ZIMMERMANN, M.; HERDEGEN, T. Long-lasting increase of nitric oxide synthase immunoreactivity NADPH-diaphorase reaction and c-JUN co-expression in rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection. **Neurosci. Lett.**, 150:169-173, 1993.
- GOODRUM, J.F.; BOULDIN, T.W. The cell biology of myelin degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 55(9): 943-953, 1996.

- GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; RUSTIONI, A. Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration. **J. Neurosci. Research**, **55**:198-207, 1999.
- KIEFER, R.; KIESEIER, B.C.; STOLL, G.; HARTUNG, H.P. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. **Progress in Neurobiology**, **64**:109-127, 2001.
- LAINETTI, R.D.; PEREIRA, F.C.; DA SILVA, C.F. Reduced sensory neuron regeneration by C57BL/6 mice. **Braz. J. Med. Biol. Research**, **28**: 781-785, 1995.
- LEVY D, ZOCHODNE DW. Local nitric oxide synthase activity in a model of neuropathic pain. **Eur. J. Neurosci.**, **10**:1846-1855, 1998.
- LEVY, D.; HÖKE, A.; ZOCHODNE, D.W. Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. **Neurosci. Lett.**, **260**: 207-209, 1999.
- LEVY, D.; KUBES, P.; ZOCHODNE, D.W. Delayed peripheral nerve degeneration, regeneration, and pain in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **60**(5):411-421, 2001.
- LU, X.; RICHARDSON, P.M.; GERVAIS, F.; SKAMENE, E. A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6 mice. **Brain Research** , **510**:144-146, 1990.
- LU, X.; SKAMENE, E.; RICHARDSON, P.M. Studies of axonal regeneration in C57BL/6 and A/J mice. **Brain Research**, **652**:174-176, 1994.
- OLIVEIRA, A. L. R. Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice. **Braz. J. Med. Biol. Research**, **34**:375-380, 2001.
- MÜLLER, H.W.; STOLL, G. Nerve injury and regeneration: basic insights and therapeutic interventions. **Curr. Opin. Neurol.**, **11**:557-562, 1998.
- NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, **79**:319-326, 1992.
- NAKANO low axonal regeneration in C57BL/6J mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **33**:1467-1475,1995.
- OLIVEIRA, A.L.R.; LANGONE, F. Non neuronal cells are not the limiting factor for the low axonal regeneration in C57BL/6J mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **33**:1467-1475,2000.
- OLIVEIRA, A. L. R. Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **34**:375-380, 2001.

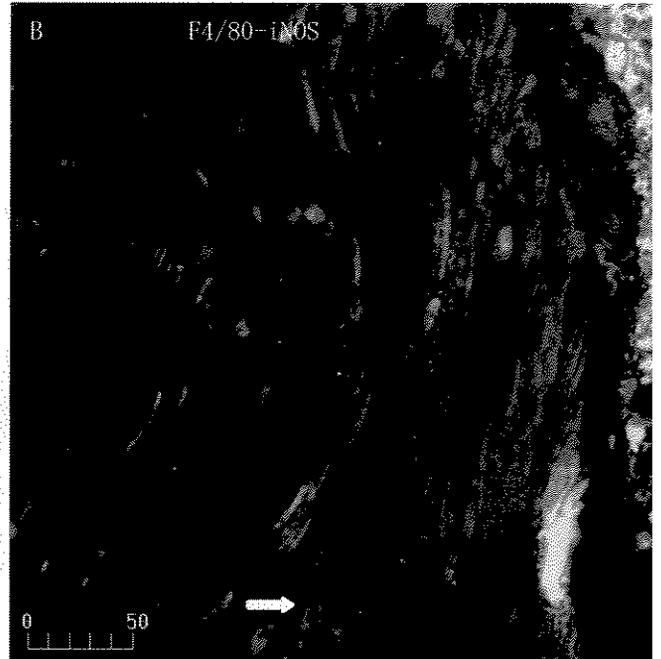
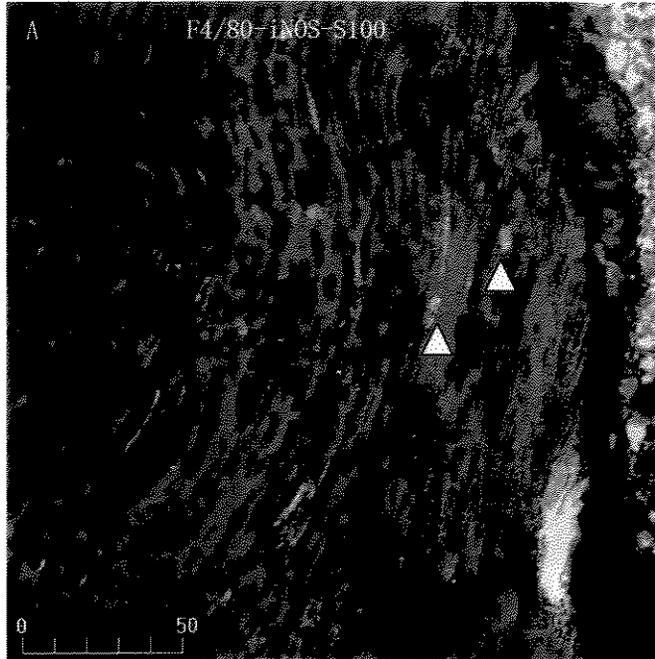
- O'MALLEY, J., MATESIC, L.E., ZINK, M.C., STRANDBERG, J.D., MOONEY, M.L., DE MAIO, A. and REEVES, R.H. Comparison of acute endotoxin-induced lesions in A/J and C57BL/6J mice. *J Hered.*, **89(6)**:525-530, 1998.
- STOLL, G.; GRIFFIN, J.W.; LI, C.Y.; TRAPP, B.D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J. Neurocytol.*, **18**: 671-683, 1989.
- TERENGI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J. Anat.*, **194**:1-14, 1999.
- THIPPESWAMY T, MORRIS R. Nerve growth factor inhibits the expression of nitric oxide synthase in neurones in dissociated cultures of rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett.*, **230(1)**:9-12, 1997.
- VAN DER GOES, A.; BROUWER, J.; HOEKSTRA, K.; ROOS, D.; VAN DEN BERG, T.K.; DIJKSTRA, C.D. Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. *J. Neuroimmunol.*, **92(1-2)**:67-75, 1998.
- VAN DER VEEN, R.C.; ROBERTS, L.J. Contrasting roles for nitric oxide and peroxynitrite in the peroxidation of myelin lipids. *J. Neuroimmunol.*, **95(1-2)**:1-7, 1999.
- WEBSTER, G.R. Phospholipase A activities in normal and sectioned rat sciatic nerve. *J. Neurochem.*, **21**:873-876, 1993.
- WHITE, F. A.; SILOS-SALIAGO, I.; MOLLIVER, D. C.; NISHIMURA, M.; PHILLIPS, H.; BARBACID, M.; SNIDER, W.D. Synchronous onset of NGF and trkA survival dependence in developing dorsal root ganglia. *J. Neurosci.*, **16**:4662-4672, 1996.
- WHYTE, A.L.; MILLER, S.C. Strain differences in natural killer cell-mediated immunity among mice: a possible mechanism for the low natural killer cell activity of A/J mice. *Immunobiol.*, **199(1)**: 23-38, 1998.

## TÍTULOS DAS FIGURAS

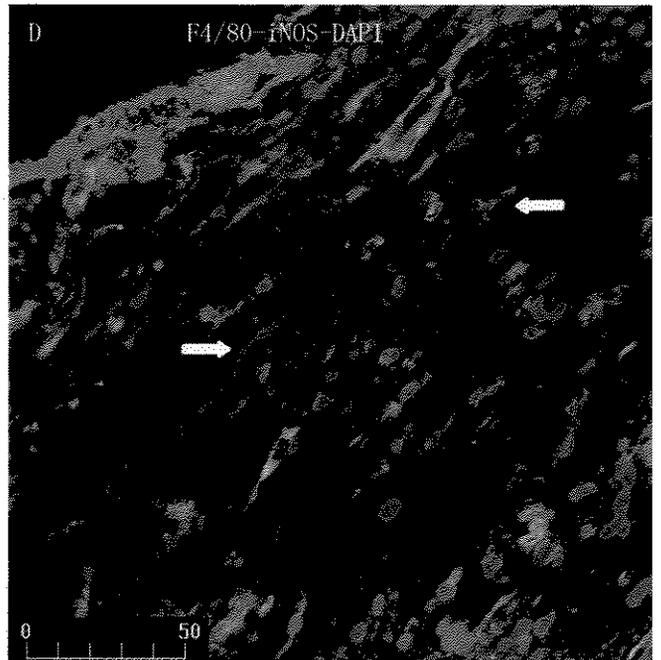
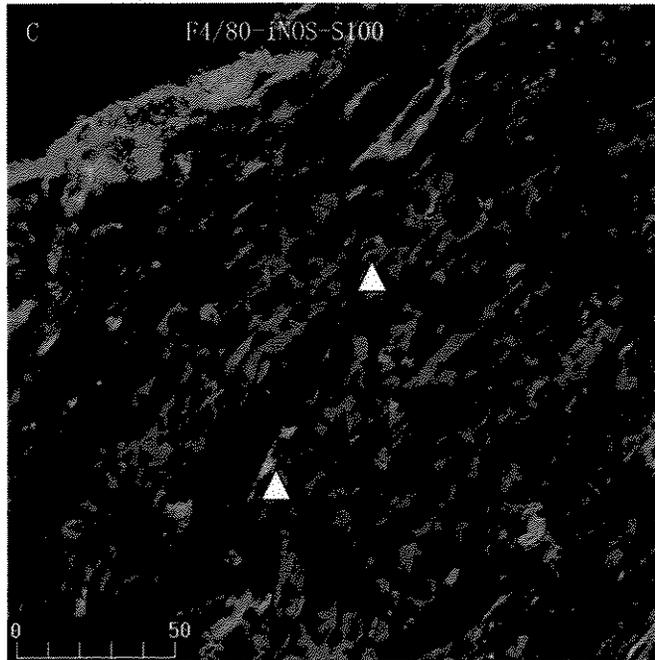
**Figura 1 – (A, C, E, G)** Imagens pseudocoloridas da marcação imunoistoquímica para F4/80 (macrófagos, em vermelho), iNOS (em verde) e S100 (células de Schwann, em azul), em cortes longitudinais de nervos ciáticos de camundongos A/J e sacrificados 1 **(B)**, 3 **(C e D)**, 5 **(E-F)** e 7 **(G-H)** dias após a seção. **(A)** Um dia após a lesão, células F4/80<sup>+</sup> (vermelho) podem ser observadas por entre as fibras nervosas. Observe também a continuidade da marcação citoplasmática das células S100<sup>+</sup> (em azul). **(B)** Estão presentes células F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>, em amarelo/alaranjado. **(C-D)** 3 dias após a lesão ocorre aumento no número tanto de células F4/80<sup>+</sup> (em vermelho) como F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> (em alaranjado). **(C)** As células S100<sup>+</sup> (em azul) exibem o aspecto tipicamente segmentado, característico das células de Schwann envolvendo ovóides de mielina e resíduos axonais. **(D)** Observa-se também células S100<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>, contudo menos freqüentes que as células F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> e com marcação menos intensa para iNOS (em verde, setas). A marcação com DAPI (em azul) evidencia o grande número de núcleos. **(E-F)** No 5º dia após a lesão há muitas células F4/80<sup>+</sup> (em vermelho) e F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> (em alaranjado). **(E)** As células S100<sup>+</sup> (em azul) apresentam marcação mais segmentada que nos tempos anteriores. **(F)** Observa-se também células S100<sup>+</sup> imunomarcadas para iNOS (setas) e os núcleos marcados com DAPI (em azul). **(G-H)** Nervo ciático, 7 dias após a lesão. Estão presentes células F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> (em alaranjado/amarelado, pontas de seta) e algumas células F4/80<sup>+</sup> (em vermelho). **(G)** Células S100<sup>+</sup> (em azul) apresentam marcação segmentada. **(H)** Algumas células S100<sup>+</sup> são também iNOS<sup>+</sup> (setas) Barra=50µm.

Linhagem A/J

1 dia

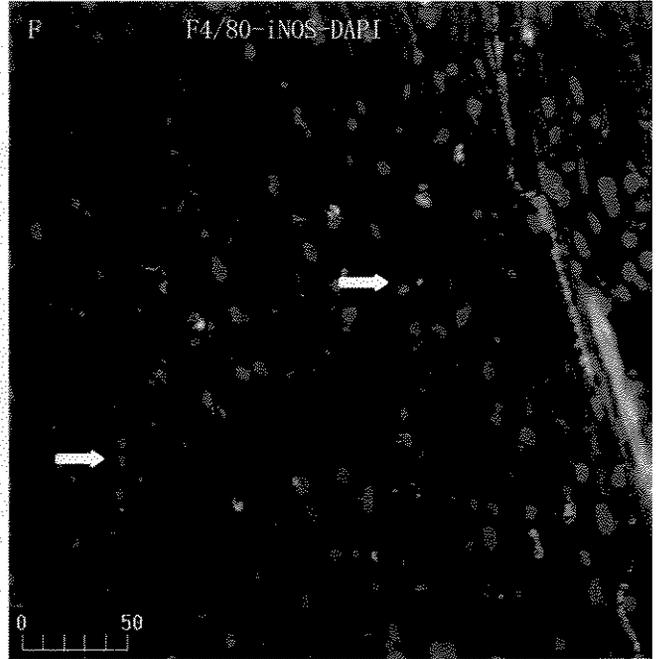
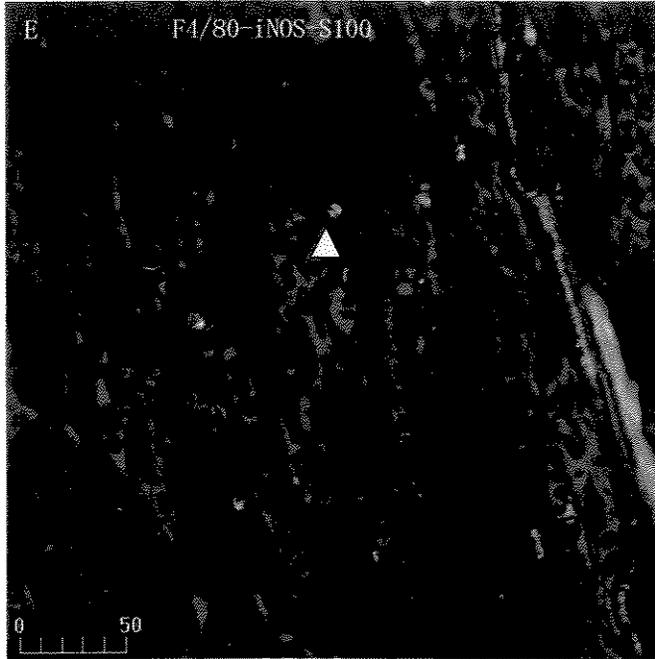


3 dias

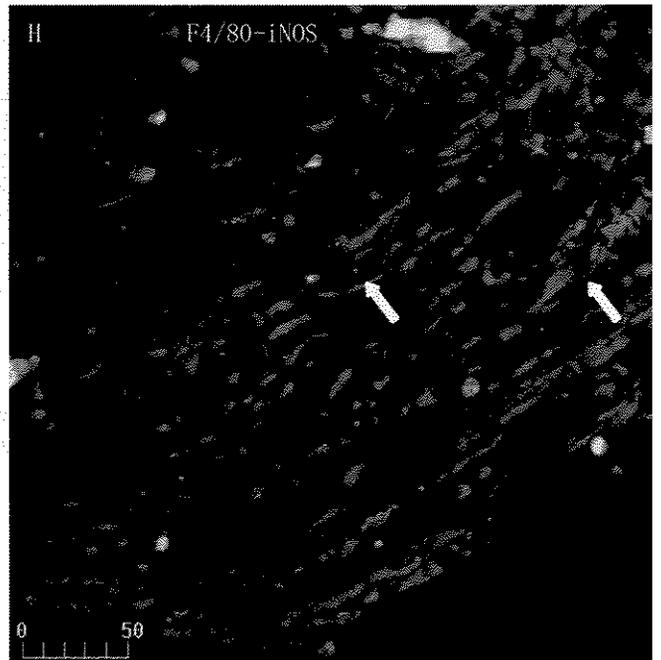
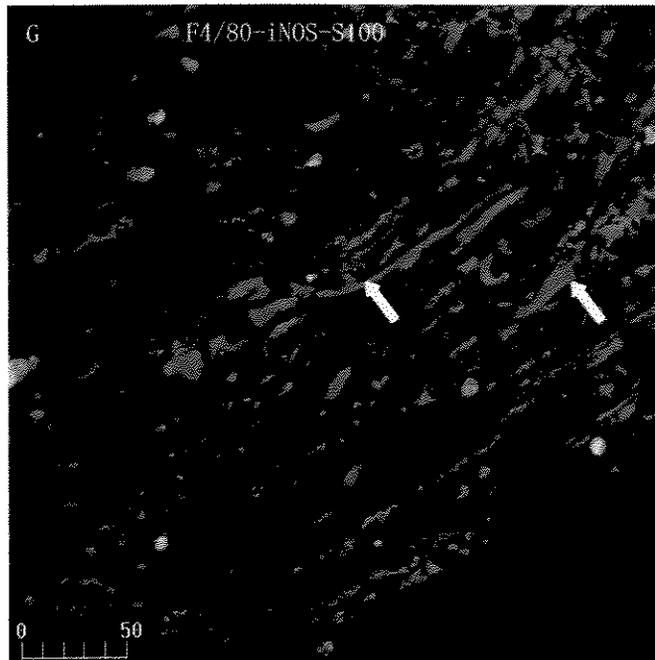


Linhagem A/J

5 dias



7 dias

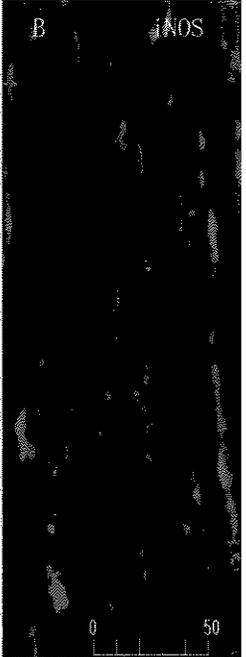
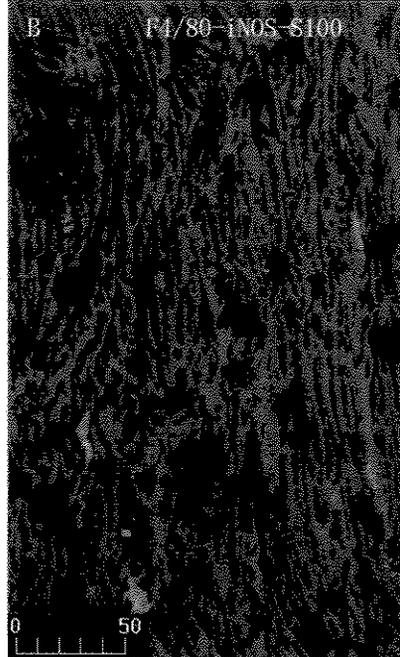


**Figura 2 – (A-C, E, G)** Imagens pseudocoloridas da marcação imunoistoquímica para F4/80 (macrófagos, em vermelho), iNOS (em verde) e S100 (células de Schwann, em azul), em cortes longitudinais de nervos ciáticos de camundongos C57BL/6J e sacrificados 1 **(B)**, 3 **(C e D)**, 5 **(E-F)** e 7 **(G-H)** dias após a seção. **(A)** Em nervos controles, raras células F4/80<sup>+</sup> (em vermelho) podem ser encontradas entre as fibras nervosas. No entanto são observadas dentro de vasos, sendo inclusive algumas iNOS<sup>+</sup> (em alaranjado). As células S100<sup>+</sup> (em azul) apresentam marcação contínua e estão distribuídas ao longo das fibras nervosas. Observe os núcleos, evidenciados pelo DAPI (em branco). **(B)** Coto distal, 1 dia após a lesão. À esquerda, em amarelo/alaranjado estão as células F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>, correspondendo a macrófagos expressando iNOS. Células S100<sup>+</sup> (em azul) apresentam marcação contínua como no nervo controle. À direita, área parcial da imagem à esquerda mostrando somente a marcação para iNOS correspondente à co-localização com S100. **(C-D)** 3 dias após a lesão ocorre aumento no número tanto de células F4/80<sup>+</sup> (em vermelho) como F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> (em alaranjado). Ambas puderam ser localizadas dentro de vasos e por entre as fibras nervosas. **(C)** As células S100<sup>+</sup> (em azul) exibem o aspecto tipicamente segmentado, característico das células de Schwann envolvendo ovóides de mielina e resíduos axonais. **(D)** Observa-se também células S100<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>, contudo menos frequentes que as células F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> e com marcação menos intensa para iNOS (em verde, setas). A marcação com DAPI (em azul) evidencia a celularidade. **(E-F)** No 5º dia após a lesão, a presença de células F4/80<sup>+</sup> (em vermelho) e F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> (em alaranjado) é abundante. **(E)** As células S100<sup>+</sup> (em azul) apresentam marcação mais segmentada que nos tempos anteriores. **(F)** Observa-se também células S100<sup>+</sup> imunomarcadas para iNOS (setas) e o grande número de núcleos marcados com DAPI (em azul). Escala=50µm. **(G-H)** Nervo ciático, 7 dias após a lesão. Estão presentes muitas células F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> (em alaranjado/amarelado, pontas de seta) e algumas células F4/80<sup>+</sup> (em vermelho). **(G)** Células S100<sup>+</sup> (em azul) apresentam marcação segmentada. **(H)** Algumas células S100<sup>+</sup> são também iNOS<sup>+</sup> (setas) Barra=50µm.

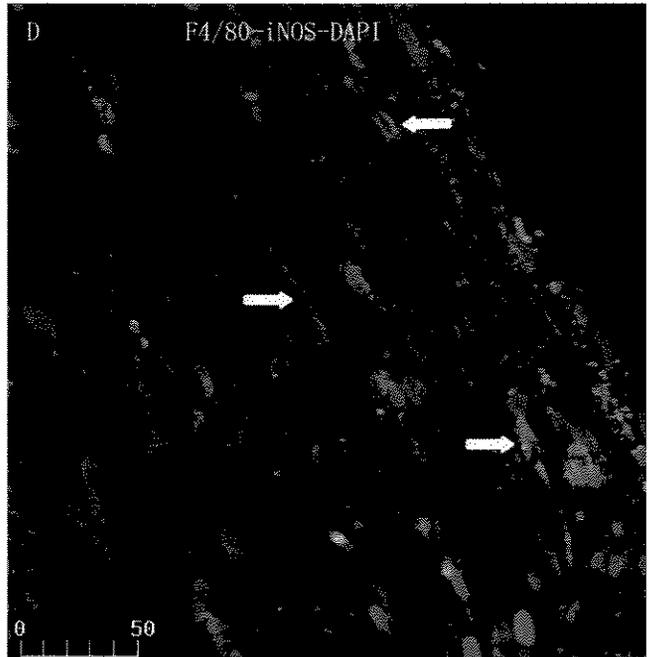
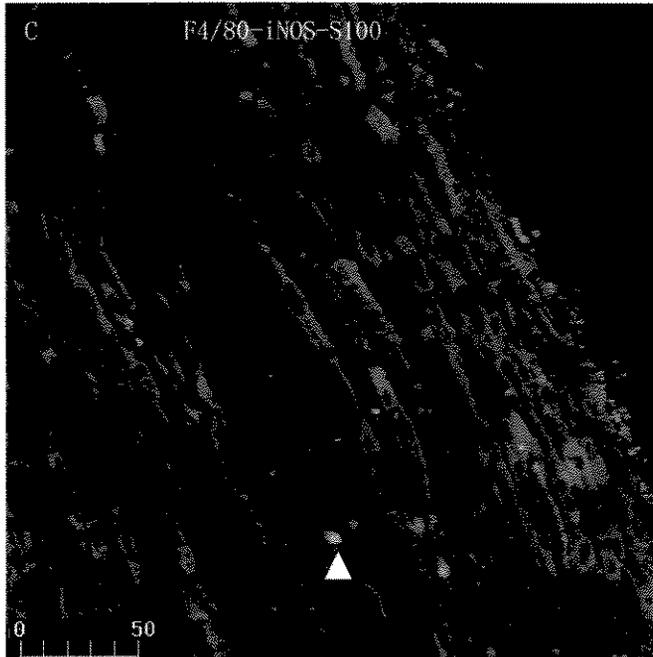
Linhagem C57BL/6J

controle

1 dia

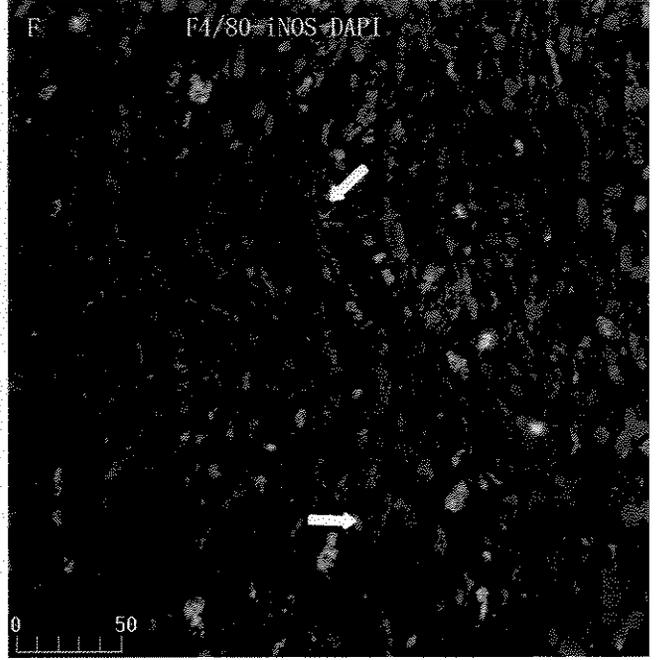
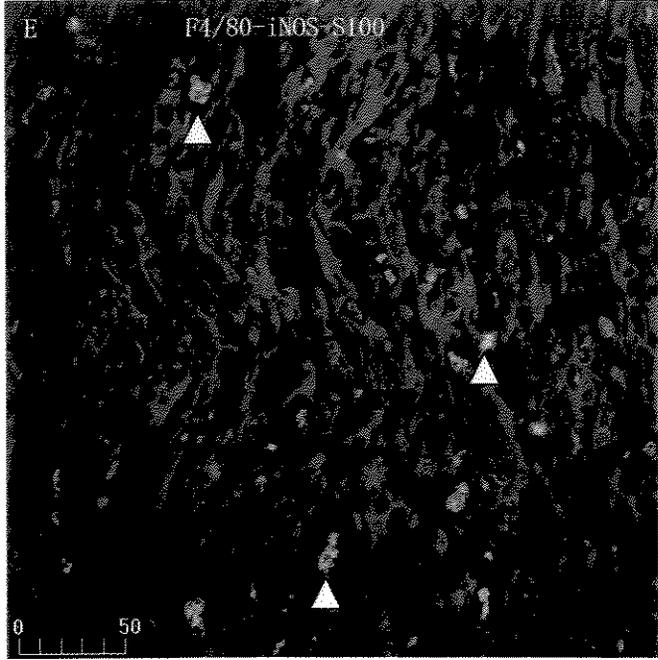


3 dias

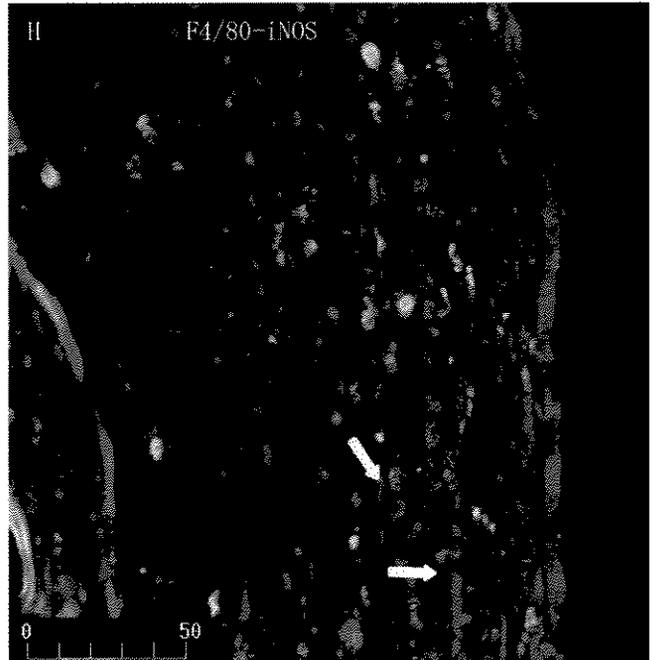
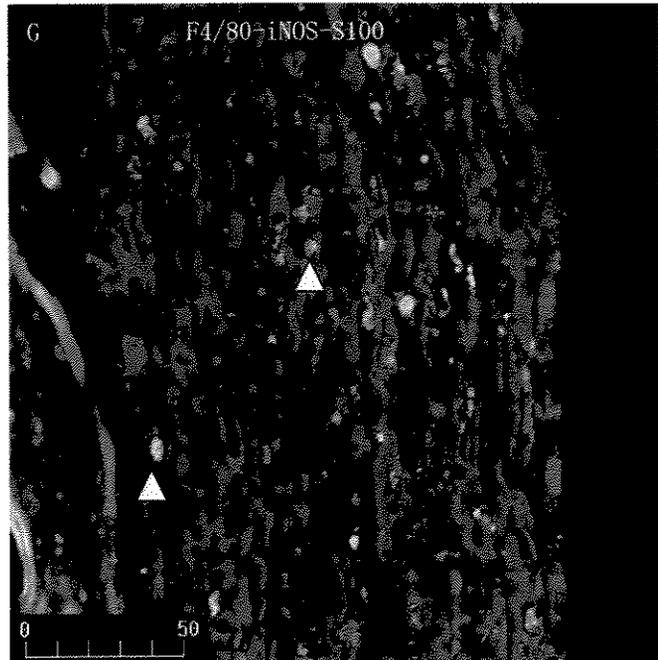


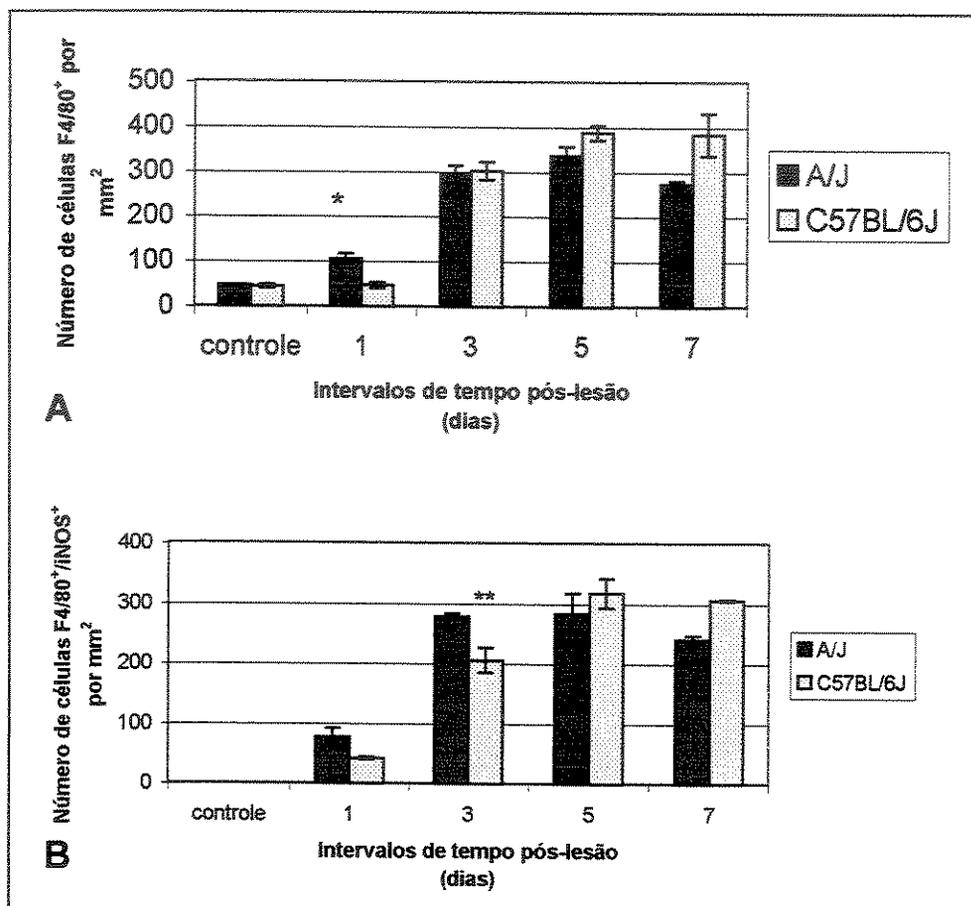
Linhagem C57BL/6J

5 dias



7 dias





**Figura 3 - (A)** Número de células F4/80-positivas por mm<sup>2</sup> (média e desvio padrão médio). Um dia após a lesão houve um aumento significativo no número de células F4/80<sup>+</sup> do coto distal em relação ao grupo controle, na linhagem A/J ( \* = p<0,005, teste de Neuman-Keuls). **(B)** Número de células F4/80 e iNOS-positivas por mm<sup>2</sup> (média e desvio padrão médio) Três dias após a lesão, a linhagem C57BL/6J apresenta um menor número de células F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> no coto distal em relação à linhagem A/J ( \*\* = p<0,05, teste de Neuman-Keuls).

**7. Conclusões Gerais**

- As linhagens de camundongos isogênicos C57BL/6J e A/J apresentam diferenças significativas em importantes eventos que ocorrem durante a degeneração Walleriana em um nervo periférico, após sua seção completa e impedimento da regeneração;
- Na linhagem C57BL/6J, os neurofilamentos fosforilados desaparecem mais rapidamente do que na linhagem A/J, 1 e 3 dias após a seção do nervo ciático;
- A fragmentação da bainha de mielina apresenta aspectos semelhantes em ambas linhagens;
- A linhagem C57BL/6J apresenta um maior número de células contendo resíduos de mielina, 3 e 5 dias após a lesão, provavelmente correspondendo a células de Schwann e indicando a remoção mais rápida da mielina durante a DW nesses animais;
- Em ambas linhagens, a atividade de NADPH-diaforase foi observada em células de vasos sanguíneos e em células semelhantes a macrófagos e a células de Schwann;
- Na linhagem C57BL/6J predomina uma marcação pela NADPH-diaforase mais intensa e homogênea em células semelhantes a células de Schwann, no quinto dia após a lesão, enquanto que na linhagem A/J o padrão da marcação já evoluiu para um aspecto mais granular e disperso;
- Durante o período analisado para a DW (1 a 7 dias após a lesão do nervo), em ambas linhagens de camundongos, os macrófagos expressam iNOS de modo muito mais evidente do que as células de Schwann;
- A linhagem C57BL/6J apresenta um retardo no recrutamento de monócitos/macrófagos hematógenos comparada à linhagem A/J;
- O número de macrófagos iNOS-positivos é significativamente menor na linhagem C57BL/6J do que na A/J, no 3º dia após a lesão;
- As linhagens C57BL/6J e A/J apresentam padrões temporais para expressão de iNOS diferentes.

**8. Referências Bibliográficas**

- AGIUS, E.; COCHARD, P. Comparison of neurite outgrowth induced by intact and injured sciatic nerves: a confocal and functional analysis. **J. Neurosci.**, **18**:328-338, 1998.
- BEUCHE, W.; FRIEDE, R.L. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. **J. Neurocytol.**, **13**:767-796, 1984.
- BEUCHE, W.; FRIEDE, R.L. Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration depends on silica-sensitive, bg/bg-negative and Fc-positive monocytes. **Brain Res.**, **378**:97-106, 1986.
- BLOMGREN, K.; KARLSSON, J.O. Calpain and calpastatin activity in the optic pathway. **Neurosci Lett.**, **112(2-3)**:179-183, 1990.
- BROWN M.C.; PERRY, V.H.; HUNT, S.P., LAPPER, S.R. Further studies on motor and sensory nerve regeneration in mice with delayed Wallerian degeneration. **European Journal of Neuroscience**, **6**:420-428, 1994.
- BRÜCK, W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. **Brain Pathol.**, **7**:741-752, 1997.
- CARPENTER, M. B. Human Neuroanatomy, Interamericana, 7a edição, 1988. 700p.
- CARROLL, S.L.; MILLER, M.L.; FROHNERT, P.W.; KIM, S.S.; CORBETT, J.A. Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. **J. Neurosci.**, **17**:1642-1659, 1997.
- CRÉANGE, A; LEFAUCHEUR, J. P.; AUTHIER, F. J.; GHERARDI, R. K. Cytokines et neuropathies périphériques. **Ver. Neurol.**, **154(3)**: 208-216, 1998.
- DA SILVA, C.F.; LANGONE, F. Addition of nerve growth factor to the interior of a tubular prosthesis increases sensory neuron regeneration in vivo. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **22(6)**: 691-694, 1989.
- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide in neuronal degeneration. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **211**:33-40, 1996.
- DE VRIES, G.H. Schwann cell proliferation. In: **Peripheral Neuropathy**, Ed. P.J.Dyck, P.K.Thomas, J.W.Griffin, P.D.Low, J.Poduslo, Philadelphia, W.B.Saunders, 3ªed., 1993, p.290-298.
- DYCK, P.J.; THOMAS, P.K. **Peripheral neuropathy**. W.B. Saunders, 3a edição, 1993.

- DONAT, J. R. e WISNIEWSKI, H. M. The spatio temporal pattern of Wallerian degeneration in mammalian peripheral nerves. **Brain res.**, **53**: 41-53, 1973.
- FAWCETT, J.W.; KEYNES, R.J. Peripheral nerve regeneration. **Annu. Rev. Neurosci.** **13**: 43-60, 1990.
- FERNANDEZ-VALLE, C.; BUNGE, R.P.; BUNGE, M.B. Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from *in vitro* studies of Wallerian degeneration. **J. Neurocytol.**, **24**: 667-679, 1995.
- FARINELLI, S.E.; PARK, D.S.; GREENE, L.A. Nitric oxide delays the death of trophic factor-deprived PC12 cells and sympathetic neurons by a cGMP-mediated mechanism. **J. Neurosci.**, **16**: 2325-2334, 1996.
- FIALLOS-ESTRADA, C.E.; KUMMER, W.; MAYER, B.; BRAVO, R.; ZIMMERMANN, M.; HERDEGEN, T. Long-lasting increase of nitric oxide synthase immunoreactivity NADPH-diaphorase reaction and c-JUN co-expression in rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection. **Neurosci. Lett.**, **150**: 169-173, 1993.
- GARBAY, B.; HEAPE, A. M.; SARGUEIL, F.; CASSAGNE, C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. **Progress in Neurobiology**, **61**: 267-304, 2000.
- GEORGE, E.B., GLASS, J.D.; GRIFFIN, J.W. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. **J. Neurosci.**, **15**: 6445-6452, 1995.
- GILLEN, C.; GLEICHMANN, M. SPREYER, P.; MÜLLER, H.W. Differentially expressed genes after peripheral nerve injury. **J. Neurosci.**, **42**: 159-171, 1995.
- GLASS, J.D.; GRIFFIN, J.W. Neurofilament redistribution in transected nerves: evidence for bidirectional transport of neurofilaments. **The Journal of Neuroscience**, **11**: 3146-3154, 1991.
- GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; RUSTIONI, A. Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration. **J. Neurosci. Res.**, **55**(2): 198-207, 1999.
- GOODRUM, J.F.; BOULDIN, T.W. The cell biology of myelin degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **55**(9): 943-953, 1996.
- GRIFFIN, J.W ; HOFFMAN, P.N. Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. In: **Peripheral neuropathy**. Ed. P.J. Dyck, P.K. Thomas. Philadelphia, Saunders. 1993. v.1, p. 361-376.

- GRIFFIN, J.W.; GEORGE, R.; HO, T. Macrophage systems in peripheral nerves. A Review. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **52(6)**:553-560, 1993.
- HINDLEY, S.; JUURLINK, B.H.; GYSBERS, J.W.; MIDDLEMISS, P.J.; HERMAN, M.A.; RATHBONE, M.P. Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism. **J. Neurosci. Research**, **47**:427-439, 1997.
- IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neurosci. Res.**, **25(2)**: 101-121, 1996.
- KAMAKURA, K., ISHIURA, S., SUGITA, H.; TOYOKURA, Y. Identification of Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease in the peripheral nerve and its effects on neurofilament degeneration. **J. Neurochem.**, **40(4)**:908-913, 1983.
- KOPPENOL W.H.; MORENO, J. J.; PRYOR, W. A.; ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J. S. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. **Chem. Res. Toxicol.**, **5**: 834-842.
- LA FLEUR, M., UNDERWOOD, J.L., RAPPOLEE, D.A. & WERB, Z. Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. **Journal Exp. Med.**, **184**:2311-2326, 1996.
- LAINETTI, R.D.; PEREIRA, F.C.; DA-SILVA, C.F. Reduced sensory neuron regeneration by C57BL/6J mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **28**: 781-785, 1995.
- LANCASTER, J.Jr.; STUEHR, D.J. The intracellular reactions of nitric oxide in the immune system and its enzymatic synthesis. Ed. J.Jr. Lancaster. San Diego, Academic Press, 1996. p.139-175.
- LEVY, D.; ZOCHODNE, D.W. Local nitric oxide synthase activity in a model of neuropathic pain. **Eur. J. Neurosci.**, **10**:1846-1855, 1998.
- LEVY, D.; HÖKE, A.; ZOCHODNE, D.W. Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. **Neurosci. Lett.**, **260**: 207-209, 1999.
- LEVY, D.; KUBES, P.; ZOCHODNE, D.W. Delayed peripheral nerve degeneration, regeneration, and pain in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **60(5)**:411-421, 2001.

- LINDHOLM, D.R.; HEUMANN, R.; MEYER, M. & THOENEN, H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. **Nature (Lond.)**; **330**: 658 - 659, 1987.
- LU, L.; RICHARDSON, P.M.; GERVAIS, F., SKAMENE, E. A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6J mice. **Brain Res.**, **510**:144-146, 1990.
- LUNN, E.R.; PERRY, V.H.; BROWN, M.C. ROSEN, H.; GORDON, S. Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. **Eur. J. Neurosci.**, **1**:27-33, 1989.
- LYON, M. F.; OGUNKOLADE, B. W.; BROWN, M. C.; ATHERTON, D. J.; PERRY, V. H. A gene affecting Wallerian nerve degeneration maps distally on mouse chromosome 4. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **90**:9717-9720, 1993.
- MARTINEZ, A. M.; RIBEIRO, L. C. Ultrastructural localization of calcium in peripheral nerve fibres undergoing Wallerian degeneration: an oxalate-pyroantimonate and X-ray microanalysis study. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, **30(3)**:451-458, 1998.
- MELLER, D., EYSEL, U.T.; SCHMIDT-KASTNER, R. Transient immunohistochemical labelling of rat retinal axons during Wallerian degeneration by a monoclonal antibody to neurofilaments. **Brain Res.**, **648**: 162-166, 1994.
- MELLICK, R.S. & CAVANAUGH, J. B. Changes in blood vessel permeability during degeneration in peripheral nerves. **Brain**, **91**:141-160, 1968.
- MONACO, S.; GEHRMANN, J.; RAIVICH, G.; KREUTZBERG, G. W. MHC-positive, ramified macrophages in the normal and injured rat peripheral nervous system. **J. Neurocytol.**, **21**:623-634, 1992.
- MÜLLER, H.W.; STOLL, G. Nerve injury and regeneration: basic insights and therapeutic interventions. **Curr. Opin. Neurol.**, **11**:557-562, 1998.
- NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, **79**:319-326, 1987.
- OLIVEIRA, A. L. R. Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **34**:375-380, 2001.
- PERRY, V.H.; BROWN, M.C.; LUNN, E.R.; TREE, P.; GORDON, S. **Eur. J. Neurosci.**, **2**:802-808, 1990.

- PERRY, V.H., TSAO, J.W., FEARN, S., BROWN, M.C. Radiation-induced reductions in macrophage recruitment have only slight effects on myelin degeneration in sectioned peripheral nerves of mice. **Eur. J. Neurosci.**, **7(2)**: 271-80, 1995.
- PEUNOVA, N.; ENIKOLOPOV, G. Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. **Nature**, **375**:68-73, 1995.
- REICHERT, F; LEVITZKY, R.; ROTSHENKER, S. Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves. **Eur. J. Neurosci.**, **8**:530-535, 1996.
- ROTSHENKER, S.; AAMAR, S.; BARAK, V.A. Interleukin-1 activity in lesioned peripheral nerve. **J. Neuroimmunol.**, **39(1-2)**:75-80, 1992.
- RUTISHAUSER, U. Adhesion molecules of the nervous system. **Curr. Opin. Neurobiol.**, **3**:709-715, 1993.
- SCHLAEPFER, W.W. Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **46 (2)** : 117-129, 1987.
- SON, Y.; THOMPSON, W. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. **Neuron**, **14**: 125-132, 1995.
- STOLL, G.; GRIFFIN, J.W.; LI, C.Y.; TRAPP, B.D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. **J. Neurocytol.**, **18**: 671-683, 1989.
- TASKINEN, H. S.; RÖYTTÄ, M. The dynamics of macrophage recruitment after nerve transection. **Acta Neuropathol.**, **93**:252-259, 1997.
- TERENGGHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J. Anat.**, **194**: 1-14, 1999.
- THIPPESWAMY T, MORRIS R. Nerve growth factor inhibits the expression of nitric oxide synthase in neurones in dissociated cultures of rat dorsal root ganglia. **Neurosci Lett.**, **230(1)**::9-12, 1997.
- THOMAS, P.K., BERTHOLD, C.H.; OCHOA, J. Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. In: *Peripheral neuropathy*. Ed. P.J. Dyck, P.K. Thomas. Philadelphia, Saunders. 1993. v.1.
- THOMSON, C.E.; GRIFFITHS, I.R.; McCULLOCH, M.C.; KYRIAKIDES, E.; BARRIE, J.A.; MONTAGUE, P. In vitro studies of axonally-regulated Schwann cell genes during Wallerian degeneration. **J. Neurocytol.**, **22(8)**: 590-602, 1993.

- TSAO, J.W.; BROWN, M.C.; CARDEN, M.J.; McLEAN, W.G.; PERRY, V.H. Loss of the compound action potential: an electrophysiological, biochemical and morphological study of early events in axonal degeneration in the C57BL/Ola mouse. *European J. Neurosci.*, **6**:516-524, 1994.
- VERGE, V.M.K.; XU, Z.; XU, X.J.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; HÖKFELT, T. Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: *In situ* hybridization and functional studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 11617-11621, 1992.
- XIE, X.Y.; BARRET, J.N. Membrane resealing in cultured rat septal neurons after neurite transection: evidence for enhancement by  $Ca^{2+}$ -triggered protease activity and cytoskeletal disassembly. *J Neurosci.*, **11**(10): 3257-3267, 1991.
- WHITE, F. A.; SILOS-SALIAGO, I.; MOLLIVER, D. C.; NISHIMURA, M.; PHILLIPS, H.; BARBACID, M.; SNIDER, W.D. Synchronous onset of NGF and trkA survival dependence in developing dorsal root ganglia. *J. Neurosci.*, **16**:4662-4672, 1996.
- WU, W. Potential roles of gene expression change in adult rat spinal motoneurons following axonal injury: a comparison among c-jun, off- affinity nerve growth factor receptor (LNGFR), and nitric oxide synthase (NOS). *Exp. Neurol.*, **141**:190-200, 1996.
- WU, W.; TOMA, J.G.; CHAN, H.; SMITH, R.; MILLER, F.D. Disruption of fast axonal transport in vivo leads to alterations in Schwann cell gene expression. *Dev. Biol.*, **163**(2): 423-439, 1994.
- YU, W-H. A. Regulation os Nitric Oxide Synthase expression in motoneurons following nerve injury. *Develop. Neurosci.*, **19**: 247-254, 1997.
- ZIV, N.E. e SPIRA, M.E. Spatio temporal distribution of  $Ca^{2+}$  following axotomy and throughout the recovery process of cultured *Aplysia* neurons. *Eur J Neurosci.*, **5**(6): 657-668, 1993.
- ZOCHODNE, D. W.; LEVY, D.; ZWIERS, H.; SUN, H.; RUBIN, I.; CHENG, C.; LAURITZEN, M. Evidence for nitric oxide and nitric oxide synthase activity in proximal stumps of transected peripheral nerves. *Neurosci.*, **91**(4): 1515-1527, 1999.
- ZUO, J.; HERNANDEZ, Y.J. e MUIR, D. Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite-inhibiting activity is up-regulated following peripheral nerve injury. *J. Neurobiol.*, **34**(1): 41-54, 1998.