

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

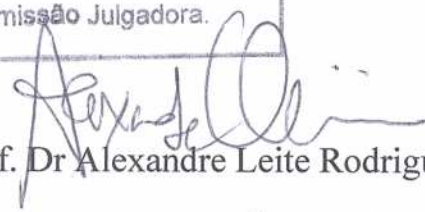


SHEILA CRISTINA DA SILVA VICTÓRIO

“Impacto da ausência do interferon gama na plasticidade sináptica após
lesão do nervo isquiático”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Sheila Cristina
da Silva Victório
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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


Orientador: Prof. Dr Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Campinas, 2011

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

V666i

Victorio, Sheila Cristina da Silva
Impacto da ausência do interferon gama na plasticidade sináptica após lesão do nervo isquiático / Sheila Cristina da Silva Victorio. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

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

1. Interferon gama. 2. Genes classe I do complexo de histocompatibilidade (MHC). 3. Axotomia. 4. Neurônios. 5. Neurodegeneração. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Interferon gamma impact in the synaptic plasticity after sciatic nerve lesion.

Palavras-chave em inglês: Interferon-gamma; MHC class I genes; Axotomy; Neurons; Neurodegeneration.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Valéria Paula Sassoli Fazan, Rui Seabra Ferreira Junior, Antonio de Castro Rodrigues, Maria Alice da Cruz Hofling.

Data da defesa: 28/01/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 28 de janeiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

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


Assinatura

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling


Assinatura

Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan


Assinatura

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues


Assinatura

Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior


Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Assinatura

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Assinatura

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força que me dá todos os dias e por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho.

Ao professor Alexandre pela orientação e por acreditar no meu trabalho.

Aos meus pais e irmãos pelo carinho, apoio e pela paciência que tiveram comigo durante todo o doutorado.

Ao meu querido André por me incentivar e por estar ao meu lado em mais uma conquista.

Ao professor Leif Havton da UCLA por ter me recebido de forma cordial e por ter permitido que eu realizasse parte do meu doutorado em seu laboratório.

Aos colegas Birgitta, Mahanz, June, Mike, Lisa, pelo suporte técnico e pela atenção que me deram enquanto estive na UCLA.

Aos amigos Aziz, Ahmed, Nisa e Chris, pelo suporte emocional e pelos momentos felizes que me proporcionaram em Los Angeles.

Aos colegas do laboratório de Regeneração Nervosa, em especial à Camila e Roberta, pelas nossas conversas, cafézinhos, conselhos ... Renata, Luciana, Gabriel, Gustavo, Rodrigo, Aline, Suzana, Rafaela e Amauri, pelo apoio e auxílio dado ao longo deste trabalho.

Aos amigos Tatiana, Juliana, Marcos, Fabricia pelos momentos de descontração indispensáveis durante estes anos.

Aos funcionários do Depto. de Anatomia pela amizade e pela ajuda técnica.

À Liliam Panagio pela disponibilidade em me auxiliar quando necessário.

Aos Professores Rui Seabra, Valéria Fazan, Maria Alice Höfling, Antônio de Castro por contribuírem com sugestões importantes para a qualidade deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela formação profissional e pessoal ao longo destes anos de estudo.

À FAPESP e CAPES/PROEX pela bolsa e auxílio financeiro concedidos.

Muito obrigada a todos!!

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	esclerose lateral amiotrófica
BSA	albumina do soro bovino
CD3 ζ	subunidade do receptor de célula T
CGRP	proteína relacionada ao gene da calcitonina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EDTA	ácido etienodiamino tetracético
EGTA	ácido tetraacético de etilenoglicol
GABA	ácido gama aminobutírico
GAP-43	proteína 43 associada ao crescimento
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
HRP	peroxidase de rábano
Iba-1	proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado
IFN γ	interferon gama
IFN $\gamma^{-/-}$	ausência do interferon gama
IL-1	interleucina 1
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MHC I	complexo de histocompatibilidade principal I
MHC II	complexo de histocompatibilidade principal II
NK	células natural killer
p75NGFR	receptor para fator de crescimento de nervo
PBS	tampão fosfato

PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PMSF	inibidor de protease
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
SDS-PAGE	gél de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
STAT	sinal transdutor e ativador de transcrição
TBS-T	tampão tris com tween
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
WB	Western blotting

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1	Organização espacial/citoarquitetônica da medula espinal.....	6
Figura. 2	Eletromicrografia do microambiente sináptico.....	8
Figura. 3	Impressão plantar de um camundongo normal.....	26
Figura. 4	Imunomarcção anti-GFAP, uma semana após transecção do nervo isquiático.....	29
Figura. 5	Gráfico da expressão de GFAP detectada por WB, uma semana após transecção do nervo isquiático.....	30
Figura. 6	Imunomarcção anti-Iba, uma semana após transecção do nervo isquiático.....	31
Figura. 7	Imunomarcção anti-MHC I, uma semana após transecção do nervo isquiático.....	33
Figura. 8	Gráfico da expressão de MHC I detectada por WB, uma semana após transecção do nervo isquiático.....	34
Figura. 9	Imunomarcção, anti-sinaptofisina uma semana após transecção do nervo isquiático.....	36
Figura. 10	Gráfico da expressão de Sinaptofisina detectada por WB, uma semana após transecção do nervo isquiático.....	37
Figura. 11	Análise ultraestrutural qualitativa e quantitativa das sinapses presentes na superfície do corpo do motoneurônio- α , uma semana após a axotomia do nervo isquiático.....	38

Figura. 12	Gráficos da distribuição de frequência do comprimento dos espaços entre os terminais em aposição ao corpo do neurônio nos animais em estudo.....	40
Figura. 13	Gráficos de frequência representando o diâmetro dos neurônios presentes no corno ventral da medula espinal, uma semana após transecção do nervo isquiático.....	41
Figura. 14	Cortes corados com azul de toluidina mostrando neurônios degenerados presentes no corno ventral da medula espinal, uma semana após transecção do nervo isquiático.....	43
Figura. 15	Micrografias eletrônicas de motoneurônios presentes na medula espinal de camundongos C57BL/6J, uma semana após transecção do nervo isquiático.....	45
Figura. 16	Micrografias eletrônicas de motoneurônios presentes na medula espinal de camundongos IFN $\gamma^{-/-}$, uma semana após transecção do nervo isquiático.....	46
Figura. 17	Micrografias eletrônicas de neurônios degenerados encontrados no corno anterior da medula espinal dos animais IFN $\gamma^{-/-}$, uma semana após transecção do nervo isquiático.....	47
Figura. 18	Micrografias eletrônicas mostrando dois prováveis momentos de morte neuronal	48
Figura. 19	Microscopia de luz de cortes de medula, corados com cresil violeta, para contagem de sobrevivência neuronal em animais sem lesão periférica.....	49
Figura. 20	Marcação de TUNEL e caspase-3 em motoneurônios da medula espinal de camundongos IFN $\gamma^{-/-}$ sem lesão periférica.....	50
Figura. 21	Imunomarcação para neurofilamento e p75NGFR em cortes de nervo, duas semanas após esmagamento do nervo isquiático.....	51

Figura.22	Micrografias eletrônicas e análise quantitativa do número de axônios regenerados, duas semanas após esmagamento do nervo isquiático.....	52
Figura. 23	Gráfico representando a recuperação motora dos animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático.....	53
Figura. 24	Gráfico representando a intensidade da impressão plantar dos animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático.....	54
Figura. 25	Imunomarcção anti-GFAP em cultura purificada de astrócitos.....	55
Figura. 26	Imunomarcção anti-MHC I em cultura purificada de astrócitos.....	56
Figura. 27	Gráficos e imunomarcção PCNA/DAPI representando a taxa mitótica dos astrócitos em cultura.....	57

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
Organização e composição do Sistema Nervoso	5
Motoneurônios medulares	7
Resposta neural após lesão.....	8
Células da glia e sinapses neurais	10
O papel do complexo de histocompatibilidade principal na plasticidade neural	11
O envolvimento do IFN gama na sobrevivência e plasticidade sináptica neuronal	13
2. OBJETIVO GERAL	16
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Animais e procedimento cirúrgico	17
4.2. Eutanasia dos animais.....	18
4.3. Preparo das amostras para eletroforese em gel de poli-acrilamida na presença de SDS	18
4.4. Western blotting	18
4.5. Imunohistoquímica	19
4.6. Análise quantitativa dos resultados.....	20
4.7. Contagem de sobrevivência neuronal	21
4.8. Marcação de neurônios apoptóticos	21
4.9. Preparo das amostras para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão	22
4.10. Microscopia de luz e análise quantitativa.....	22
4.11. Microscopia eletrônica de transmissão	23
4.12. Análise quantitativa dos motoneurônios alfa medulares	23
4.13. Contagem das fibras nervosas	24
4.14. Avaliação motora da recuperação funcional do nervo isquiático.....	25
4.15. Cultura primária de astrócitos	26
4.16. Imunocitoquímica	27
5. RESULTADOS	28
5.1. Astrogliose e reatividade microglial em animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-}	28
5.2. Reduzida expressão de MHC I em animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-} após axotomia	32
5.3. Reatividade e expressão de sinaptofisina nos animais deficientes em IFN γ	34
5.4. Modificações na ultraestrutura dos motoneurônios dos animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-} uma semana após axotomia do nervo isquiático	37
5.5. Alterações morfométricas na ausência do IFN γ	41
5.6. Dano neuronal em camundongos deficientes em IFN γ	42
5.7. Degeneração neuronal na ausência de IFN γ	44
5.8. Caracterização de morte neuronal em camundongos deficientes em IFN γ	48
5.9. Efeito da ausência do IFN γ na resposta das células de Schwann após esmagamento do nervo	50
5.10. Efeito da ausência do IFN γ no número de axônios após esmagamento	51
5.11. Recuperação da função motora dos animais IFN γ ^{-/-}	52
5.12. Efeitos <i>in vitro</i> da ausência do IFN γ sobre cultura primária de astrócito	54
5.13. Taxa mitótica dos astrócitos em cultura na ausência de IFN γ	56
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÕES.....	64
8. REFERÊNCIAS	65
9. ANEXO.....	75

RESUMO

Na medula espinal, o estabelecimento das sinapses é, provavelmente, coordenado pelos próprios neurônios. Contudo, as células da glia circunjacentes e o microambiente formado entre neurônios/glia, desempenham papel importante na modulação da excitabilidade neural, influenciando na transmissão e plasticidade sináptica. Em situações de injúria ou inflamação, há um aumento da reatividade glial e mudança do estado funcional dos neurônios, levando a uma consequente cascata de eventos visando a homeostase do tecido. Neste sentido, o IFN γ está envolvido na regulação da expressão do MHC I, o qual tem recentemente mostrado exercer um papel importante nos processos de plasticidade sináptica após axotomia. Além disso, existem evidências de que o IFN γ pode interferir na diferenciação e sobrevivência das células neurais. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da ausência do IFN γ nos neurônios espinais após lesão. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os fenômenos de plasticidade sináptica e da reatividade glial em camundongos mutantes para IFN γ , a fim de analisar a dinâmica das sinapses na medula após a lesão do nervo isquiático em animais incapazes de regular a expressão de MHC I pela produção de IFN γ . Para isso, camundongos mutantes para IFN γ e do tipo selvagem C57BL/6J foram submetidos à transecção ou esmagamento unilateral do nervo isquiático (5animais/grupo/experimento) e o material foi processado para imunohistoquímica, Western blotting, microscopia de luz e de transmissão (MET). Além disso, a avaliação motora dos animais também foi investigada por meio do índice funcional do nervo isquiático. Secções da medula espinal de camundongos sem lesão foram também utilizados para análise de sobrevivência neuronal e presença de apoptose por TUNEL e imunomarcagem para caspase 3. Camundongos neonatos foram utilizados para os experimentos com cultura primária de astrócitos. A ausência do IFN γ nos animais mutantes levou à redução da expressão de MHC I após uma semana de lesão. Os motoneurônios encontrados no corno ventral destes animais exibiram menor tamanho do soma e maior número de células degeneradas comparado aos animais selvagens. A perda neuronal não foi agravada pela axotomia do nervo isquiático nos animais mutantes. A morte por apoptose foi sugerida baseado nos resultados positivos para TUNEL e caspase 3. A análise ultraestrutural mostrou menor retração de terminais sinápticos nos animais mutantes uma semana após lesão

periférica. Além disso, a ausência do IFN γ não prejudicou a recuperação motora dos animais mutantes. Em cultura, os astrócitos dos animais mutantes mostraram um atraso na taxa de proliferação provavelmente em razão da ausência do IFN γ . Com base nestes resultados, sugerimos que o IFN γ pode exercer um papel neuroprotetor e que sua ausência resulta na morte neuronal, a qual não é agravada pela lesão periférica.

ABSTRACT

In the spinal cord, the establishment of synapses is probably coordinated by the neurons. However, the glial cells and surrounding microenvironment formed between neurons/glia play an important role in modulating neural excitability, influencing the transmission and synaptic plasticity. In situations of injury or inflammation, there is an increase in glial reactivity and changes in functional status of neurons, with a consequent cascade of events aimed at restoration of homeostasis. In this regard, IFN γ is involved in regulating the expression of MHC I, which has recently been shown to play an important role in the synaptic plasticity processes following axotomy. Also, there is evidence that IFN γ absence on spinal cord neurons after injury. The aim of this study was to investigate the phenomena of synaptic plasticity and glial reactivity in mice mutant for IFN γ in order to analyze the dynamics of spinal synapses after injury of the sciatic nerve in animals unable to regulate the expression of MHC I due the absence of IFN γ . In this sense, mutant mice for IFN γ and wild type C57BL/6J were subjected to unilateral transection or crushing of the sciatic nerve (5animals/group/experiment), and the specimens were processed for immunohistochemistry, Western blotting, light and transmission electron microscopy (TEM). In addition, the motor evaluation of the mice was investigated by the sciatic functional index. Spinal cord sections from non-lesioned animals were also used to investigate neuronal survival and the presence of apoptosis with TUNEL and caspase 3 immunostaining. Astrocytes from mutant and wild type newborn mice were also investigated in primary cell culture. The absence of IFN γ in the mutant animals produced reduced expression of MHC I after one week from injury. Motoneurons in the lower lumbar ventral horn exhibited a smaller soma size and increased number of degenerated cells when compared to wild type mice. Sciatic nerve axotomy did not further aggravate the neuronal loss in the mutant mice. Apoptotic death is suggested on TUNEL and caspase 3 positive immunostaining. The electron microscopy showed a smaller retraction of pre-synaptic terminals apposing to motoneurons in mutant mice one week after lesion. The absence of IFN γ did not impair motor recovery of the mutant animals. In culture, astrocytes from mutant animals showed a delay in the rate of proliferation probably due to the

absence of IFN γ . Altogether, these results suggest that IFN γ may be neuroprotective and its absence results in neuronal death, which is not further increased by peripheral axotomy.

1. INTRODUÇÃO

Organização e composição do Sistema Nervoso

O Sistema Nervoso (SN) acha-se distribuído pelo organismo formando uma interligada rede que coordena a homeostase corpórea, sendo responsável pelo processamento de estímulos externos e geração de uma resposta motora e comportamental. Anatomicamente, o SN encontra-se dividido em Sistema Nervoso Central (SNC), composto por encéfalo e medula espinal, e Sistema Nervoso Periférico (SNP) formado por nervos espinais e cranianos, gânglios e terminações nervosas.

O SNC está organizado morfológicamente em duas porções distintas denominadas substância branca, composta por células da glia e axônios mielínicos de neurônios, e substância cinzenta formada principalmente por corpos de neurônios, células da glia e alguns axônios de neurônios.

A medula espinal está localizada no interior do canal vertebral, e apresenta duas importantes regiões chamadas intumescências cervical e lombar, de onde se originam os nervos espinais que compõem o plexo braquial e lombossacral, responsáveis pela inervação dos membros superiores e inferiores, respectivamente. Em corte histológico transversal, a medula espinal apresenta a substância cinzenta em forma de H, podendo ser identificadas duas colunas ou cornos de cada lado da linha mediana. Estas se encontram interligadas por uma zona intermediária, que nas regiões torácica e sacral apresentam uma continuidade com as colunas laterais, que contém os motoneurônios responsáveis por parte da inervação das vísceras. A coluna posterior, mais estreita, contém neurônios internunciais responsáveis por receber impulsos aferentes advindos das raízes dorsais. A coluna anterior, mais robusta, contém neurônios motores inferiores e medulares, responsáveis pela inervação da musculatura estriada esquelética (Burt, 1993; Kandel *et al.*, 2000).

Tendo-se em vista distribuição espacial dos neurônios na substância cinzenta medular, Rexed (1952) propôs um mapa citoarquitetônico obtido a partir da correlação entre as conexões sinápticas e dados eletrofisiológicos. Sendo assim, a substância cinzenta foi subdividida em dez lâminas: as lâminas I-VI correspondem ao corno posterior da medula, a lâmina VII à zona intermediária e as lâminas VIII e IX compreendem o corno anterior, sendo

os locais que contém interneurônios que contribuem na regulação da excitabilidade dos motoneurônios gama e alfa, que inervam a musculatura estriada esquelética. A lâmina IX, portanto, contém os núcleos motores que possuem diferentes dimensões de acordo com o seguimento medular considerado, caracterizando assim a intumescência cervical e intumescência lombar ao longo da medula espinal (Rexed, 1952; 1954 apud Kandel *et al.*, 2000).

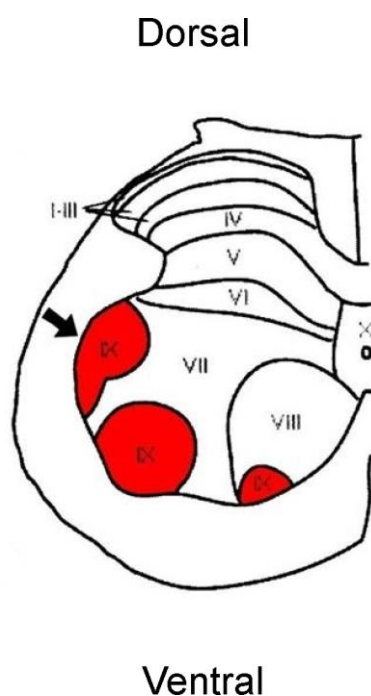


Fig. 1 Organização espacial/citoarquitetônica de uma hemimedula espinal. A imagem ilustra uma corte transversal de medula nos segmentos medulares L4-L5. A lâmina IX está destacada em vermelho. A seta indica o grupo de motoneurônios alfa, em posição ventro-lateral, que inervam os músculos da região posterior da coxa, perna e pé.

A distribuição espacial dos diferentes neurônios nos núcleos motores obedece normalmente a critérios anatômicos e funcionais. Sendo assim, os motoneurônios que inervam músculos proximais localizam-se dorsoventralmente e aqueles que inervam músculos distais estão localizados dorsolateralmente. Os núcleos motores dos músculos axiais formam um grupo medial distinto no corno ventral ao longo da medula espinal. Nos segmentos cervical e

lombo sacral existe um maior agrupamento de motoneurônios dispostos na porção lateral do corno ventral. Motoneurônios presentes nestes núcleos inervam os músculos presentes no cingulo dos membros superiores e inferiores (ombro e quadril) e dispõem-se medialmente, enquanto os que inervam os músculos distais são laterais. Funcionalmente, os núcleos são divididos em porção ventral, contendo motoneurônios que inervam músculos extensores e porção dorsal contendo motoneurônios que inervam músculos flexores (Kandel *et al.*, 2000).

Motoneurônios medulares

Os motoneurônios constituem um grupo de neurônios colinérgicos do SNC, podendo ser classificados em motoneurônios alfa e gama. Os tipos de motoneurônios diferenciam-se de acordo com a sua morfologia e funcionalidade. Conradi (1969) descreveu a ultraestrutura dos motoneurônios medulares de gatos em situação de normalidade e após lesão de raízes dorsais da medula. Este autor observou que os motoneurônios alfa possuem um grande corpo celular circular ou ovóide com diâmetro entre 30-60 μm ; já em camundongos, a média do diâmetro do corpo celular dos motoneurônios alfa é de 35 μm (Oliveira *et al.*, 2004). Os dois tipos de motoneurônios podem ser encontrados na lâmina IX, segundo a organização citoarquitetônica proposta por Burke *et al.* (1997).

Os terminais nervosos em aposição à membrana do motoneurônio constituem as sinapses e apresentam o seu interior preenchido por vesículas. Esses terminais podem ser divididos em três tipos morfológicos: do tipo S, que possuem vesículas esféricas contendo o aminoácido excitatório glutamato; do tipo F, que possuem apenas vesículas achatadas contendo glicina, ou achatadas e esféricas (GABA), sendo inibitórios; e do tipo C, os quais são excitatórios e colinérgicos. A ausência de terminações do tipo C não deve ser usada como uma indicação de um motoneurônio gama, mas a presença deste terminal sugere sua classificação como um motoneurônio alfa (Ichiyama *et al.*, 2006).

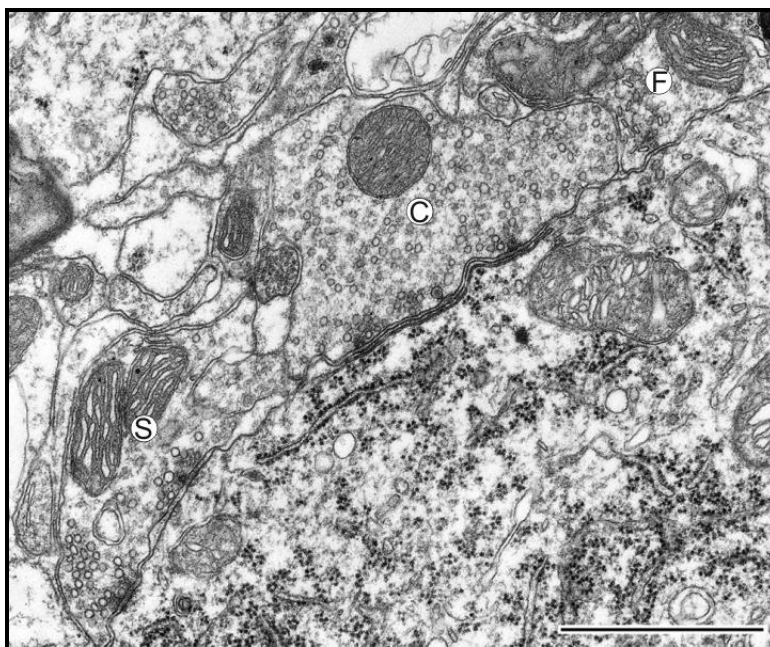


Fig. 2 Micrografia eletrônica mostrando os terminais sinápticos F , S e C em aposição ao corpo de um motoneurônio- α encontrado na coluna ventral do segmento lombar da medula espinal. Barra de escala: 2 μ m (Fonte:Sabha *et al.*, 2008).

Resposta neural após lesão

Na medula espinal, a interação entre os motoneurônios e o microambiente medular desempenha um papel crucial para a sobrevivência, regulação do estado funcional e conectividade sináptica dos mesmos (Hamburguer, 1958; Oppenheim, 1991; Huh, *et al.*, 2000; Hammarberg *et al.*, 2000; Oliveira, *et al.*, 2001). A axotomia de um nervo periférico causa uma reação retrógrada visível no corpo celular dos neurônios lesionados. Dentre as alterações observadas estão o edema do corpo celular, deslocamento do núcleo para a periferia e dissolução da substância de Nissl, modificações estas denominadas cromatólise. Além disso, após uma lesão que resulte na interrupção do contato entre motoneurônios e as fibras musculares, uma significativa modificação é a retração de botões pré-sinápticos presentes na superfície do corpo celular e dendritos da célula axotomizada (Purves e Lichtman, 1978; Brännström e Kellerth, 1998) sendo os excitatórios, do tipo glutamatérgico, os mais afetados (Lindå *et al.*, 2000). Numerosos genes também passam a ser expressos incluindo fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão celular (Moran e Graeber, 2004). Dessa forma, a

expressão de proteínas estruturais como CGRP (calcitonin gene-related protein) e GAP-43 (growth-associated protein 43) é aumentada (Lindå *et al.*, 1992; Piehl *et al.*, 1993, Piehl *et al.*, 1998). Todas estas alterações refletem uma reorganização do tecido nervoso em resposta à lesão, gerando alterações metabólicas de um estado de transmissão sináptica para um estado de recuperação dos axônios comprometidos pela lesão (Lindå *et al.*, 1992, 1997; Piehl *et al.*, 1993, 1998).

No sítio da lesão, as fibras nervosas do coto distal sofrem a degeneração Walleriana, que inclui fragmentação do citoesqueleto, fragmentação axonal e recrutamento de monócitos dos vasos sanguíneos. Como o endoneuro é mantido, novos axônios começam a se estender a partir do coto proximal em direção à região distal a fim de reinervar o órgão alvo. O crescimento orientado e a sobrevivência de motoneurônios após a injúria parecem ser altamente dependentes da possibilidade de estabelecer novas interações com células alvo e de receber estímulos tróficos necessários durante o processo de regeneração (Hammarberg *et al.*, 2000). O crescimento axonal também é dependente da presença de moléculas da matriz extracelular com propriedades adesivas tais como laminina, tenascina, vários tipos de colágeno, imunoglobulinas e caderinas, os quais são expressos de forma sincronizada ao longo do processo regenerativo (Cullheim *et al.*, 1999; Hammarberg *et al.*, 2000).

A resposta do animal à lesão nervosa pode diferir de acordo com a espécie, o fenótipo neuronal, a idade, o tipo e a distância da lesão ao corpo neuronal. Li *et al.* (1998), em seus estudos empregando distintos tipos de lesão em animais de diferentes idades, observaram que a axotomia em neonatos levou ao aumento da degeneração de motoneurônios e à atrofia das células que sobreviveram à lesão. Já a avulsão feita em animais adultos levou a alterações morfológicas no corpo dos neurônios diferentes das observadas em animais recém nascidos. Tais alterações celulares mostraram variar entre padrões apoptóticos e necróticos.

Estudos empregando diferentes linhagens de camundongos mostraram variações na capacidade regenerativa após esmagamento ou axotomia do nervo isquiático (Lu *et al.*, 1990 e 1994; Oliveira e Langone, 2000; Oliveira, 2001; Pierucci e Oliveira, 2006). Lu *et al.* (1990) investigaram uma possível relação entre as diferenças no potencial regenerativo observado entre as linhagens C57BL/6J e A/J e o baixo recrutamento de macrófagos. Através dos estudos, a reduzida regeneração axonal observada nos animais C57BL/6J não pode ser atribuída à

baixa eficiência dos macrófagos. Já em um segundo trabalho, o mesmo grupo (Lu *et al.*, 1994) mostrou que esta deficiência estaria relacionada a fatores genéticos, envolvendo múltiplos loci gênicos, sendo os neurônios sensoriais os mais afetados. Pierucci e Oliveira (2006) observaram que os animais C57BL/6J realmente apresentavam uma maior perda de neurônios sensoriais quando comparados com outras linhagens isogênicas tal como A/J. Estes achados reforçam a idéia de que as características genéticas de cada linhagem desencadeiam diferentes respostas à lesão, sendo estas fundamentais para o processo de degeneração e regeneração neural.

Células da glia e sinapses neurais

No SNC, a glia é composta por vários tipos celulares que estão em íntimo contato com os neurônios, sendo elas: astrócitos, micróglia, oligodendrócitos e células endoteliais. As células gliais ocupam metade do volume do tecido nervoso, na proporção de dez células para cada neurônio (Kettenmann, 1995).

Os astrócitos são o tipo celular predominante no SNC (Araque e Perea, 2004), e exercem função predominante na regulação da homeostase do SNC pelo balanceamento das concentrações extracelulares de íons e de neurotransmissores, através de mecanismos de transporte de membrana e dissipação intercelular, regulando a excitabilidade neural (Hinkerohe *et al.*, 2005). A presença de receptores de membrana como o glutamato, faz com que os astrócitos sejam um dos principais reguladores da concentração extracelular deste neurotransmissor excitatório (Rothstein *et al.*, 1994), envolvido no aparecimento de várias doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica (ALS) (Rao *et al.*, 2003).

Além de responderem a neurotransmissores liberados nos sítios sinápticos, os astrócitos são facilmente excitáveis às variações iônicas, como por exemplo, de íons Ca^{2+} . Estudos envolvendo co-cultura de neurônios e células da glia, mostraram que o aumento de Ca^{2+} resultou na modulação da atividade neural (Araque *et al.*, 1999; Araque e Perea 2004). Os astrócitos não são apenas capazes de responder ao aumento de cálcio circulante, mas também de transmitir este sinal para outras células vizinhas (Scenes e Giaume, 2006) modulando a excitabilidade neural e transmissão sináptica (Slezak *et al.*, 2006; Perea e Araque, 2006), o que demonstra que este íon representa um crucial elemento de comunicação entre

neurônios e astrócitos (Perea e Araque, 2006). Por outro lado, Emirandetti *et al.* (2006) demonstraram que a reatividade glial mais intensa pode reduzir a sinaptogênese, influenciando na plasticidade do SNC.

A capacidade de regular a atividade neural e a transmissão sináptica permitiu classificar os processos finos dos astrócitos como um “terceiro elemento” das sinapses (Araque *et al.*, 1999). Os astrócitos estendem finos prolongamentos citoplasmáticos (“pés lamelares”) em torno das sinapses, podendo com isso modular a função sináptica ou mediar a comunicação glial-neuronal (Derouiche e Frotscher, 2001) através do controle da concentração extracelular de substâncias neuroativas como íons e neurotransmissores que se acumulam no local (Vandenbranden *et al.*, 1996; Chvatal e Sykova, 2000; Piet *et al.*, 2004). Portanto, o número de sinapses que um neurônio pode formar não é somente determinado por propriedades intrínsecas do neurônio, mas pode ser fortemente influenciado por sinais extracelulares e células gliais circunjacentes.

O papel do complexo de histocompatibilidade principal na plasticidade neural

O desenvolvimento de sinapses precisas no SNC é criticamente dependente da atividade neural, direcionado a eliminar conexões supranumerárias, estabilizando apenas as mais apropriadas. A coordenação da conectividade sináptica é algo pouco conhecido sendo sua compreensão fundamental para o desenvolvimento de estratégias voltadas à regeneração do SNC após lesão ou durante o curso de doenças neurodegenerativas.

Com o intuito de identificar moléculas envolvidas nesse processo, Huh *et al.* (2000), realizaram uma busca sistemática dos RNAm seletivamente aumentados após uma lesão. Embora muitos genes normalmente expressos por células nervosas não tenham tido seus níveis alterados, surpreendentemente, membros da família do MHC I mostraram-se estimulados e significativamente regulados positivamente pela resposta neural. Neste sentido, o MHC I neuronal tem sido descrito em determinadas regiões do SNC durante os períodos de maior plasticidade sináptica em neurônios e regulados espontaneamente pela atividade neural (Corriveau *et al.*, 1998).

Adicionalmente, a regulação positiva do RNAm para a molécula CD3 ζ , uma subunidade do receptor de MHC I, também expresso em neurônios, reforça a possibilidade de

interação com MHC I no SNC e sua relação durante o remodelamento e plasticidade atividade-dependente (Huh *et al.*, 2000). Sendo assim, é possível que o MHC I atue diretamente nas sinapses para promover a eliminação de conexões não apropriadas, pelo mecanismo já caracterizado para o Sistema Imune, possivelmente pela fosforilação de CD3 ζ pela zyn (uma cinase que atua na plasticidade hipocampal) (Boulanger *et al.*, 2001).

A axotomia do nervo periférico causa uma reação retrógrada visível no corpo celular dos neurônios lesionados. Concomitantemente, ocorre retração seletiva de terminais nervosos, previamente em contato com esses neurônios. É possível que essas alterações metabólicas no corpo da célula nervosa axotomizada estimulem o aumento da reatividade da glia circundante. Neste sentido, acredita-se que o aumento da expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I), semelhante a uma situação de inflamação clássica, seja a via de comunicação entre neurônios e glia (Lidman *et al.*, 2002). Ainda, como demonstrado por Oliveira *et al.* (2004), a ausência da expressão de MHC de classe I (MHC I) influencia diretamente o processo de plasticidade sináptica, resultando na retração exacerbada dos contatos sinápticos no corpo dos motoneurônios medulares após axotomia.

Sendo assim, acredita-se que o MHC I neuronal tenha uma função no desenvolvimento e na organização das redes neurais (Boulanger e Shatz, 2004). Além disso, essa molécula foi estudada e relacionada com a estabilidade sináptica no SNC adulto (Oliveira *et al.*, 2004). Os efeitos da interrupção sináptica foram descritos pela primeira vez por Blizinger e Kreutzberg (1968). Neste sentido, observaram que a retração sináptica degenerativa e a regeneração de neurônios faciais, causadas pela transecção do nervo periférico, envolvem significativas perdas sinápticas nos corpos neuronais afetados, presumivelmente pela ação da micróglia e astrócitos. Semelhantemente, a transecção do nervo isquiático, leva à redução significativa das sinapses, sendo esta exacerbada em camundongos deficientes em MHC I (Oliveira *et al.*, 2004).

De acordo com Oliveira *et al.*, 2004, a molécula de MHC I está envolvida na regulação sináptica de neurônios medulares após lesão axonal. Portanto, sabe-se atualmente que o MHC I é necessário no SNC, porém desempenha importante papel além do classicamente descrito para o sistema imunológico.

Acredita-se que a expressão de MHC I no sistema nervoso seja regulada pelos neurônios. Assim, neurônios ativos na transmissão sináptica expressam, em baixas quantidades, os genes do MHC I. Porém, com a perda de contato com a estrutura alvo, segue-se à indução da expressão do MHC I através de sinais pró-inflamatórios (Wekerle, 2005). Tais alterações repercutem diretamente no microambiente glial, aumentando a reatividade das células gliais.

A questão do processo inflamatório no SNC após a lesão periférica tem sido bastante discutida. Há evidências que esse processo seja um fator complicador e potencialmente causador de danos secundários, acarretando um processo patológico. Segundo Olsson *et al.* (2005), a cinética da lesão resume-se principalmente aos dias iniciais que se seguem à mesma, sendo uma primeira fase, a ativação da micróglia. Após aproximadamente uma semana, se inicia uma segunda fase em que células ativadas passam a expressar MHC classe II, juntamente com uma intensa ativação astrogliar e infiltração de linfócitos. Essa lesão é descrita como neurodegenerativa. Exemplo disso é a esclerose múltipla, em que o grau do dano no SNC depende do tipo e da intensidade da reação autoimune e avulsão das raízes motoras na superfície da medula espinal.

Tendo-se em vista os conceitos acima expostos e apesar dos sinais moleculares que atuam na ativação da glia e na expressão do MHC I após a lesão no nervo não terem sido ainda plenamente definidos, é possível que a modulação deste, após uma lesão, possa interferir positivamente na resposta regenerativa neuronal. Neste sentido, o IFN γ , por se constituir um potente indutor da expressão de MHC I, é um candidato a estar envolvido na resposta neurônio-glial após axotomia. Ressalte-se que o aumento do nível de RNAm para IFN γ tem sido demonstrado após a lesão nervosa periférica, que coincide com o desencadeamento do processo inflamatório, além de ser o mediador chave da propagação do processo inflamatório no SNC (Benveniste and Benos, 1995, Wang and Zhou, 2005).

O envolvimento do IFN gama na sobrevivência e plasticidade sináptica neuronal

A resposta imune que ocorre após lesão no sistema nervoso pode levar a um dano no tecido, mas também pode exercer um papel neuroprotetor e reparador (Correale and Villa, 2004). O IFN γ é a citocina pró-inflamatória cuja presença no sistema nervoso está fortemente

relacionada à resposta imune durante infecções virais, bacterianas, doenças autoimunes como a esclerose múltipla e também doenças neurodegenerativas. Além do papel chave em condições patológicas, trabalhos mostraram o envolvimento temporal da citocina IFN γ na proteção do neurônio (Baron *et al.*, 2008). Embora sua expressão seja baixa ou quase nula sob condições normais, esta citocina tem mostrado sua importância durante o desenvolvimento e na sobrevivência neuronal após injúria. O IFN γ é produzido e liberado pelos linfócitos T e NK durante a vida embrionária de camundongos e durante a oitava semana de desenvolvimento em humanos (Fadel e Sarzzotti, 2000). Em experimentos utilizando cultura de embriões humanos foi observada a expressão temporal de RNAm de citocinas anti e pró-inflamatórias (Mousa *et al.*, 1999) e seu aumento de acordo com a idade do animal. A expressão em períodos restritos do desenvolvimento pode fortemente sugerir um papel importante das citocinas durante o desenvolvimento embrionário (Mousa *et al.*, 1999). Outras observações feitas *in vitro* mostraram que a exposição de neurônios do hipocampo de camundongos ao IFN γ causou um desbalanço entre terminais inibitórios e excitatórios, sugerindo que a exposição a citocinas em tempos específicos durante o desenvolvimento *in vivo* pode gerar alterações na atividade sináptica e consequentemente nos circuitos do cérebro (Brask *et al.*, 2004), podendo futuramente desencadear o surgimento de patologias no indivíduo adulto. Por outro lado, a exposição contínua a esta citocina promove, a longo prazo, uma perda na atividade sináptica, aumento nos níveis extra e intracelular de cálcio e altera a distribuição do receptor de glutamato (Vikman *et al.*, 2001). Além da sua importância durante o desenvolvimento, o IFN γ promove a diferenciação neuronal de células tronco neurais de animais adultos em cultura, favorece o crescimento de neuritos e ao mesmo tempo interfere na diferenciação de astrócitos (Wong *et al.*, 2004; Yong *et al.*, 1991).

Mediadores solúveis que agem no sistema imunológico podem entrar no tecido nervoso atravessando a barreira hemato-encefálica ou serem liberados por células imunes periféricas que migram para o sistema nervoso visando reestabelecer a homeostase do tecido. IFN γ exerce um papel efetivo na comunicação entre células T e da glia, podendo induzir a produção de fatores neurotróficos. Embora os linfócitos T e as células NK ativadas sejam as maiores fontes conhecidas de IFN γ , estudos demonstram que a sua produção não está restrita a

estes tipos celulares. No tecido nervoso, as células da glia (Hanisch, 2002) e certos neurônios (Neumann *et al.*, 2008) além de produzirem, também apresentam receptores para esta citocina, o que sugere uma ação autócrina e parácrina do IFN γ nas células locais. Neste sentido, estudos feitos com neurônios sensoriais em cultura, mostraram que a neutralização do IFN γ com anticorpos levou à redução quase completa da expressão de MHC class I na membrana destes neurônios e a inibição parcial da fosforilação e translocação nuclear do fator de transcrição STAT 1 (Neumann *et al.*, 2008). *In vivo*, o aumento da expressão do IFN γ e de seu receptor no hipocampo tornou os neurônios resistentes ao estresse causado pela baixa disponibilidade de energia, sugerindo um possível papel neuroprotetor da citocina em condições adversas relacionadas ao envelhecimento como o estresse oxidativo e metabólico (Lee *et al.*, 2006).

Os mecanismos precisos que envolvem a plasticidade sináptica não são claramente conhecidos, embora se saiba do envolvimento de certas moléculas neste processo. Portanto, os fatos sugerem que o IFN γ pode ser importante para função do neurônio sob condições normais e mesmo após injúria.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a importância da expressão do IFN γ na plasticidade sináptica, através da regulação do MHC classe I, após axotomia em camundongos *knockout* para IFN γ .

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar os níveis de expressão de MHC classe I por imunohistoquímica e Western blotting em cortes congelados de medula espinal dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$, uma semana após transecção do nervo isquiático;
- II. Analisar, por imunocitoquímica, a expressão de MHC classe I e GFAP (marcador de astrócitos) e a proliferação dos astrócitos isolados do córtex de animais neonatos C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$;
- III. Avaliar a reatividade glial e a expressão de Iba-1 (marcador microglial) e sinaptofisina por imunohistoquímica e Western blotting, em cortes congelados de medula espinal dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ uma semana após transecção do nervo isquiático;
- IV. Analisar as alterações sinápticas, induzidas pela axotomia e pela ausência de IFN γ , em cortes de medula espinal utilizando microscopia eletrônica de transmissão ;
- V. Análise quantitativa e morfométrica por microscopia de luz de células degeneradas encontradas em cortes da medula espinal dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ não lesionados,
- VI. Comparar o potencial regenerativo axonal dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ pela técnicas de imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão, utilizando o nervo isquiático dos animais com 2 semanas após esmagamento nervo;
- VII. Avaliar comparativamente a recuperação motora dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ durante 21 dias, utilizando os parâmetros: índice funcional do isquiático e pressão plantar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Experimentos *in vivo*

4.1. Animais e procedimento cirúrgico

Para a realização dos nossos experimentos, foram utilizados camundongos machos adultos (6 a 8 semanas) pertencentes às linhagens C57BL/6J (selvagem) e C57BL/6J IFN γ ^{-/-} (mutante), obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos em biotério do Departamento de Anatomia, acomodados em caixas plásticas padrão, sob condições ambientais controladas e de livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA-IB-UNICAMP, 1172-1 e a utilização dos animais transgênicos pela Comissão Interna de Biossegurança – CIBio/IB – Unicamp, 2006/07.

No presente estudo foram utilizados 3 grupos experimentais: animais que sofreram lesão por esmagamento ou por axotomia, e animais sem nenhum tipo de lesão. Nos grupos com lesão, os animais foram submetidos à axotomia ou esmagamento unilateral do nervo isquiático da pata esquerda. Os camundongos foram anestesiados em condições de assepsia com uma mistura de 1:1 de Vetaset® (cetamina, Fort Dodge, 50mg/kg) e Kensol® (xilazina, Körning, 10 mg/kg), na quantidade de 0,001 mL/25 g de peso corpóreo. Após a tricotomia da face posterior da coxa esquerda, foi realizada a incisão da pele (aproximadamente 1,5 cm de comprimento) na região média da coxa, utilizando-se um bisturi. A pele e a musculatura da coxa foram cuidadosamente afastadas, expondo-se o nervo isquiático. A axotomia foi realizada com uma microtesoura, sendo um segmento de 2 mm do coto distal do nervo removidos, no intuito de evitar o contato entre os cotos proximal e distal. Para o esmagamento do nervo isquiático, utilizou-se uma pinça n.4, aplicando-se uma pressão constante e padronizada para todos os animais durante 10 segundos (Xin *et al*, 1990). Posteriormente, fez-se um nó cirúrgico no tecido muscular adjacente ao local do esmagamento, marcando assim a

região a ser removida para futura análise. Por fim, a musculatura foi reposicionada e a pele suturada. Os camundongos foram mantidos em biotério até a realização dos experimentos.

4.2. Eutanasia dos animais

Os animais sem lesão, uma semana após transecção e duas semanas após o esmagamento do nervo isquiático foram anestesiados e submetidos à toracotomia seguida de perfusão transcardíaca com auxílio de bomba perfusora do tipo peristáltica. Inicialmente, visando a lavagem total dos vasos e órgãos, os animais foram perfundidos com 20 ml de uma solução salina tamponada e heparinizada (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio - PBS, pH 7,4). Os próximos passos respeitaram o tipo de técnica empregada na sequência.

4.3. Preparo das amostras para eletroforese em gel de poli-acrilamida na presença de SDS

Após a perfusão com solução salina tamponada, a intumescência lombar dos camundongos axotomizados (n=5/grupo) foi retirada e dissecada, sendo os lados ipsilateral e contralateral da medula separados. Aproximadamente 3mm da intumescência foram utilizadas para fazer o extrato protéico. Estas amostras foram homogeneizadas por 1 minuto no sonicador em uma solução 80mL contendo 150mM NaCl, 1% Triton X100, 10mM Tris (pH 7,4), 1mM EGTA, 1 mg EDTA/mL, 1mM Hepes (pH 7,6), 0.1mM PMSF e 10µL/mL do coquetel inibidor de proteases (Sigma cat.no. P-8340). Em seguida, foram submetidas a uma centrifugação de 10.000g por 10 minutos a 4⁰C. O sobrenadante coletado de cada amostra teve sua quantidade de proteína dosada utilizando-se o método de Bradford (Bio-Rad protein assay). O extrato protéico foi misturado com tampão de amostra na proporção 1:1 e aquecido a 100⁰C por 5 minutos sendo logo em seguida aplicado no gel poliacrilamida.

4.4. Western blotting

Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham) sob corrente constante de 400mA em cuba refrigerada. A qualidade da transferência de proteínas foi analisada pela coloração das membranas com Ponceau S 0,5% em ácido acético 1%. As membranas foram bloqueadas com

leite desnatado a 1% em TBS-T por uma hora sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida foram incubadas com leite desnatado a 0,1% em TBS-T contendo o anticorpo anti-sinaptofisina (Dako, CA, USA), na diluição de 1:500, anti-GFAP (Dako, CA, USA) na diluição de 1:1500 e anti-MHC I (Península, CA, USA), na diluição de 1:500. A seguir, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (H+ L) conjugado à HRP (Zymed Laboratories, South San Francisco, USA), coelho anti-IgG de cabra (H+L) (Zymed Laboratories, South San Francisco, USA) coelho anti-IgG de rato (H+ L) conjugado à HRP (Zymed Laboratories, South San Francisco, USA) na diluição de 1:2500. Após nova série de lavagens, a atividade peroxidásica foi revelada através de quimiluminescência (PerkinElmer Biotechnology) expondo a membrana ao filme X-Omat (Kodak) por no máximo 3 minutos. A intensidade de marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria das bandas, utilizando o programa Image J (versão padrão 1.33u, National Institutes of Health).

A partir dos valores obtidos por densitometria, foi feita a razão dos lados ipsilateral/contralateral para cada animal e, em seguida, calculadas a média das razões e os resultados foram expressos com a média $\pm$ erro padrão (ER), sendo a significância estatística determinada pelo teste t de Student assumindo-se $p \leq 0,05$ (*).

4.5. Imunohistoquímica

Após perfusão com salina, fez-se a perfusão com solução fixadora tamponada contendo formaldeído 10% em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,4). O nervo isquiático dos animais que sofreram esmagamento, e a intumescência lombar dos animais axotomizados e dos animais sem lesão periférica foram dissecados. O material permaneceu no mesmo fixador por 12 horas, a uma temperatura de 4°C. Após este período, o material foi lavado em PB (0,1M; pH 7,4) e transferido para uma solução de sacarose 20%, a 4°C por 12 horas. Nervos e as medulas espinais foram incluídos em Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e congelados a -40°C em n-Hexano em recipiente contendo nitrogênio líquido. Cortes histológicos com 12µm de espessura foram obtidos em criostato e estocados a -20°C até o momento de uso.

As secções transversais da medula espinal e as secções longitudinais dos nervos foram inicialmente climatizados, lavados com TBS-T e tratados com BSA (albumina de soro bovino)

3% no mesmo tampão por 1 hora. Os cortes de medula foram incubados *overnight* com os anticorpos anti-sinaptofisina (Dako, CA, USA), ou anti-GFAP (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA) ambos na diluição de 1:50, anti-MHC I (Península, CA, USA) diluído 1:100, anti-Iba1 (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA) diluído 1:700 e anti-caspase 3 (Cell Signaling Technology, Danvers, Ma, USA) diluído 1:400. Já os cortes de nervo foram incubados *overnight* com os anticorpos anti-p75 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-neurofilamento (Chemicon, Temecula, CA, USA) ambos na diluição de 1:200. As incubações foram feitas em BSA 1%, e mantidos em câmara úmida a 4°C. Após lavagens com TBS-T (3x 5 minutos), foram adicionados os anticorpos anti-coelho CY2, anti-cabra CY3 ou anti-rato CY3 (Jackson ImmunoResearch, Bar Harbor, ME, USA) na proporção de 1:250 diluído em BSA 1% em TBS-T por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas em TBS-T, montadas em glicerol/PBS 0,01 M (1:3) sendo posteriormente analisadas.

4.6. Análise quantitativa dos resultados

As lâminas imunomarcadas foram observadas em microscópio de fluorescência (Eclipse TS 100, Nikon, Tokio, Japão) utilizando-se os filtros de rodamina (CY3) e fluoriceína (CY2). Foram capturadas três imagens representativas de cada lado (ipsi e contralateral) da coluna ventral da medula espinal para cada animal, utilizando-se uma câmera de alta sensibilidade (Nikon, DXM 1200F).

Para cada imagem, quantificou-se a densidade integrada de pixels em seis áreas representativas do núcleo motor lateral da medula espinal utilizando-se o software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institute of Health, USA). Foi calculada a média aritmética para essas seis medidas e, a partir da média da densidade integrada de pixels em cada lado da medula, foi feita a razão ipsilateral/contralateral para cada secção medular analisada. Calculou-se, então, a média aritmética das razões sendo os resultados apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP). Para os dados classificados como paramétricos, sua comparação foi feita pelo teste t de Student, e para os dados classificados como não paramétricos utilizou-se o teste Mann-Whitney, assumindo-se $p \leq 0,05$ (*), utilizando-se para isso o programa BioEstat.

As imunomarcações feitas nas secções de nervo não foram quantificadas, mas sim comparadas visualmente.

4.7. Contagem de sobrevivência neuronal

As secções congeladas de medula foram coradas com cresil violeta por 5 min sob uma temperatura de 50°C. O tecido foi desidratado e em seguida as lâminas foram montadas em enthelan. Os neurônios localizados no corno ventral da medula espinal foram contados em intervalos de 4 secções. Somente as células com núcleo e nucléolo aparentes foram consideradas na contagem. Como os animais não tinham nenhum tipo de lesão, a contagem foi feita ao longo da intumescência lombar, mas somente um lado foi adotado para o cálculo de sobrevivência. O número absoluto por secção foi utilizado para calcular a média de neurônios sobreviventes em cada linhagem. Para corrigir uma possível dupla contagem de neurônios, foi aplicada a fórmula de Abercrombie e Johnson (1946):

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

onde N é o número de neurônios contados corrigido, n é o número de neurônios contados, t é a espessura do corte e d é a média do diâmetro dos neurônios. Como a diferença no tamanho afeta significativamente a contagem celular, o valor d foi calculado para cada grupo experimental. Sendo assim, foram medidos aleatoriamente 15 neurônios de cada grupo com o uso do programa Image Tool (Versão 3.0, The University of Texas Health Center in Santo Antonio, TX, USA) e as médias calculadas. A significância estatística foi determinada pelo teste não paramétrico U de Mann-Whitney assumindo-se $p \leq 0,05$ (*).

4.8. Marcação de neurônios apoptóticos

As secções congeladas da medula espinal dos animais sem lesão periférica foram pós-fixadas em etanol/ácido acético (2:1) à -20°C por 5 min e posteriormente lavadas duas vezes de 5 min em PBS. As lâminas foram transferidas para uma câmara úmida, o tecido foi lavado com solução tampão de equilíbrio (Oncor, s7110-1) e incubado por 5 min à temperatura ambiente. O tampão de equilíbrio foi retirado e o tecido foi incubado com a enzima TdT (Oncor, s7110-2 e 3) por 1h à 37°C. A reação foi parada com solução *stop* (Oncor, s7110-4)

por 30 min à 37°C. Após lavagem em PBS por 10 min, as secções foram incubadas com solução fluoriceína (Oncor, s7110-5 -6) por 30 min. As lâminas foram lavadas em PBS e montadas com glicerol/PBS 0,01 M (1:3). As imagens foram obtidas com o uso do microscópio de fluorescência (Eclipse TS 100, Nikon, Tokio, Japão) equipado com uma câmera de alta sensibilidade (Nikon, DXM 1200F).

4.9. Preparo das amostras para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão

Camundongos que sofreram axotomia (C57BL/6J n=5 e C57BL/6J IFN γ ^{-/-} n=8) ou esmagamento do nervo isquiático (5animais/grupo) foram perfundidos com 20 mL de fixador contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em PBS (0,1 M; pH 7,4), através de ventrículo esquerdo, após perfusão com salina tamponada. As medulas e os nervos foram extraídos, dissecados, sendo os fragmentos pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1% por duas horas. Os fragmentos foram lavados em água destilada e desidratados em séries crescentes de álcool e acetona, sendo incluídos em resina (Durcupan, Fluka). Secções transversais semi-finas (500 nm) dos segmentos L4-L6 da medula espinal e dos segmentos distal e proximal do nervo esmagado foram obtidas utilizando-se um ultramicrotomo PowerTome X (RMC Products, Boeckeler Instruments, Tucson, AZ) e analisadas após coloração com azul de toluidina.

4.10. Microscopia de luz e análise quantitativa

As secções de medula coradas com azul de toluidina foram utilizadas para a análise morfométrica dos neurônios. Para isso, duas secções de cada lado do corno ventral da medula espinal de animais axotomizados foram fotografadas com a câmera digital Micropublisher, de 5 megapixel (Q Imaging, Burnaby, BC), acoplada a um microscópio Nikon E600 e somente os cortes no plano nuclear foram incluídos para na análise. A média do diâmetro da soma foi calculada com o uso do software C-Imaging software (Compix Inc., Sewickley, PA), utilizando-se a média entre o maior diâmetro do corpo celular e o maior diâmetro perpendicular. Estas medidas foram utilizadas para acessar o padrão de distribuição por

tamanho dos motoneurônios encontrados na lâmina IX da medula espinal dos animais estudados.

Para analisar a resposta dos animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-} à axotomia, somente as células na lâmina IX, seccionadas no plano nuclear, foram contadas e classificadas com respeito à morfologia celular. Foi obtida, em cada secção, a porcentagem dos neurônios identificados mostrando, por microscopia de luz, indícios de degeneração.

Os dados quantitativos foram apresentados com média $\pm$ erro padrão, e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor do $p \leq 0,05$ (*). A análise estatística foi feita pela análise de variância (ANOVA) com o método Holm-Sidak (Sigmastat 3.1, programa Systat, Inc., Point Richmond, CA).

4.11. Microscopia eletrônica de transmissão

A área do corno ventral, contendo os neurônios do núcleo motor, foi desbastada e as secções ultra-finas, com 50-60 nm de espessura (ultramicrotomo PowerTome X), foram coletadas em telas de cobre revestidas com formvar, contrastadas com acetato de uranila 4% durante 30 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos e analisadas ao microscópio eletrônico Tecnai G2 Spirit Twin (FEI, Hillsboro, OR), operando a 80 kV. Os neurônios foram fotografados com uma câmera de alta resolução em diferentes aumentos e as imagens foram utilizadas para a análise ultraestrutural qualitativa.

O mesmo procedimento foi realizado com o nervo isquiático dos animais que sofreram esmagamento. As imagens fotografadas foram utilizadas para a contagem das fibras nervosas encontradas nas duas linhagens de camundongos em estudo.

4.12. Análise quantitativa dos motoneurônios alfa medulares

Os motoneurônios alfa do corno ventral da medula foram localizados e fotografados no aumento de 15.000 $\times$ com o uso do mesmo microscópio eletrônico descrito acima. Os motoneurônios contendo terminações sinápticas do tipo C e com características cromatolíticas foram incluídos na análise. A superfície das células foi fotografada e as imagens foram montadas sequencialmente usando um programa vetorial.

Os terminais sinápticos, em contato com o corpo celular dos motoneurônios, foram classificados (F, S ou C, segundo Conradi, 1969) e quantificados por 100 μ m de membrana (normalização) e pela porcentagem de cobertura. Além disso, a distância entre os terminais consecutivos em aposição à membrana neuronal foi mensurada. Todos os dados foram obtidos utilizando-se o programa Image Tool (Versão 3.0, National Institutes of Health, USA). Um total de 40 motoneurônios alfa (2 por animal em 4 grupos de 5 animais: C57BL/6J ipsilateral e contralateral, e IFN $\gamma^{-/-}$ ipsilateral e contralateral) foram analisados.

Os dados foram apresentados com média $\pm$ erro padrão, e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor do $p \leq 0,05$ (*). Para a análise estatística utilizou-se os testes U de Mann-Whitney, para os dados não paramétricos, e t de Student para dados paramétricos.

4.13. Contagem das fibras nervosas

Com o objetivo de avaliar o dano axonal, duas semanas após o esmagamento do nervo isquiático dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ (5 animais/grupo), a ultraestrutura do coto distal (2 mm do sítio de lesão) foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. O nervo da pata direita foi utilizado como referência para as comparações.

O número de fibras mielínicas, degeneradas e axônios amielínicos por nervo foram contados manualmente nas micrografias eletrônicas. Pelo menos 4 micrografias aleatórias do nervo por animal de cada linhagens foram utilizadas para as quantificações. As fibras mielínicas foram consideradas como degeneradas quando a mielina mostrou-se desarranjada, com as lamelas descompactadas.

Os dados foram apresentados com média $\pm$ erro padrão, e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor do $p \leq 0,05$ (*). Para a análise estatística aplicou-se o teste não paramétrico U de Mann-Whitney, utilizando-se para isso o programa BioEstat.

4.14. Avaliação motora da recuperação funcional do nervo isquiático

A recuperação motora dos animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático (5 animais/grupo) foi analisada com a utilização do método CatWalk. Esta técnica fornece um maior número de informações de como o animal posiciona as patas durante a locomoção em comparação com o método descrito por DeMedinaceli *et al.*, (1982) e modificado por Inserra *et al.*, (1998). Todos os camundongos foram avaliados antes e após o esmagamento do nervo. Os animais analisados foram colocados para andar ao longo de uma plataforma de vidro iluminada onde as imagens das impressões plantares foram obtidas e capturadas somente quando o animal tocava na plataforma. As primeiras impressões plantares foram obtidas no terceiro, quinto e sétimo dias após o procedimento cirúrgico e depois em dias alternados, até o final da terceira semana. As medições foram feitas de acordo com dois parâmetros: a distância entre o primeiro e o quinto dedo (toe spread, TS) e a distância entre o terceiro dedo e a impressão calcâneo (print length, PL). Estes parâmetros foram utilizados para a medição das pegadas das patas posterior esquerda (lesionada) e posterior direita (normal) e os valores foram plotados na seguinte fórmula descrita por Inserra *et al.*, (1998): $SFI = 118.9 \left(\frac{ETS-NTS}{NTS} \right) - 51.2 \left(\frac{ELP-NLP}{NLP} \right) - 7.5$ (E= lado lesionado, N=lado normal). Além disso, fez-se a análise da pressão exercida pelo animal na plataforma enquanto ele andava. Para isso, utilizou-se os valores da média das razões dos lados ipsi/contralateral das impressões plantares dos animais durante as três semanas de treino.

Os dados foram apresentados com média $\pm$ erro padrão, e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor do $p \leq 0,05$ (*). Para a análise estatística utilizou-se os testes U de Mann-Whitney, para os dados não paramétricos, e t de Student para dados paramétricos.

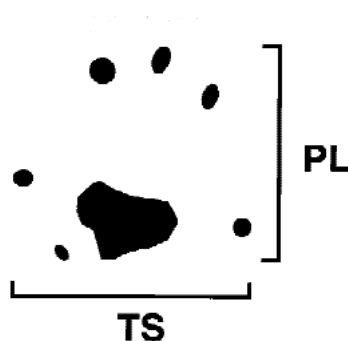


Fig. 3 Imagem representativa de impressão plantar de camundongo sem lesão, com as duas medidas utilizadas no cálculo do índice funcional do isquiático: toe spread (TS), print length (PL). (Fonte: Inserra *et al.*, 1998).

Experimentos *in vitro*

4.15. Cultura primária de astrócitos

Culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir de células extraídas do córtex cerebral de camundongos C57BL/6J e C57BL/6J $\text{INF}\gamma^{-/-}$ (1 a 2 dias de vida), de acordo com o método utilizado por McCarthy e de Vellis (1980). Os camundongos foram mantidos sob hipotermia profunda, sendo os hemisférios corticais dissecados, livres de meninges e de vasos sanguíneos e fragmentados. Os fragmentos foram lavados em PBS (3x) sem Ca^{2+} nem Mg^{+} e suspensos em meio DMEM (Dulbecco's Eagle's Medium). Em seguida, os fragmentos foram incubados em tripsina 0.05% em PBS 0.9% (0,1M e pH 7,4) por 10 minutos sob temperatura de 37°C. Após este período, foi feito o bloqueio com soro fetal bovino (pH 7,5, Nutricell, Brasil) e a suspensão resultante foi submetida a centrifugação (1300 rpm) por 10 minutos em soro albumina bovina (BSA) 4% em meio DMEM. O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspensionado em DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% (FCS), penicilina e estreptomicina (1 $\mu\text{L/mL}$), e semeado em garrafas de cultura celular (25 cm^2). As culturas primárias resultantes foram então incubadas a 37°C, 5% CO_2 e atmosfera umidificada. Atingida a confluência, as células foram novamente tripsinizadas e centrifugadas (1100 rpm) em coxim de BSA 4%, na intenção de separar os diferentes tipos celulares. Logo em seguida, células foram semeadas em placas de 24 poços.

4.16. Imunocitoquímica

Após uma semana de experimento, os astrócitos foram fixados com paraformaldeído 4% em DMEM, e em seguida lavadas com PB sem cálcio e magnésio (0,1M; pH 7,4; Nutricell, Brasil). Em seguida elas foram lavadas com TBS-T e tratadas com BSA (albumina de soro bovino) 3% no mesmo tampão por 1 hora. Em seguida, as culturas foram incubadas por duas horas com os anticorpos, anti-GFAP (cod.Z0334, Dako), anti-MHC I (T-2105, ER-HR52, Península), ambos diluídos 1:100, e anti-PCNA diluído 1:200, todos em BSA 1%. Após lavagens com TBS-T (3x 5 minutos), foram adicionados os anticorpos anti-coelho CY2, ou anti-rat CY3 (Jackson Lab., USA) na proporção de 1:250 diluído em BSA 1% em TBS-T por uma hora à temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados com TBS-T, e as células incubadas por 10 minutos com DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol). Posteriormente, as células foram mantidas em glicerol/PBS 0,10 (1:3).

As células imunomarcadas foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse TS 100) utilizando-se os filtros de rodamina (CY3) e fluoresceína (CY2). A quantificação foi realizada de maneira semelhante ao procedimento *in vivo*, utilizando-se o software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institute of Health, USA). Para as marcações do GFAP, seis regiões representativas de cada poço foram documentadas para a quantificação por densidade integrada de pixels. Uma média aritmética foi calculada para cada cultura e, através da análise desses valores, fizeram-se as comparações entre os grupos. Já para as marcações de MHC I, foi medida a densidade integrada de pixels da imagem total sendo este valor dividido pelo número de núcleos contados, sendo a média final do grupo normalizada para uma área de 100.000 μm^2 .

Para os experimentos visando o acompanhamento do crescimento dos astrócitos, $2,5 \times 10^4$ células foram plaqueadas e mantidas por 24 horas para sua total aderência. Após este período, os poços foram fixados a cada 24 horas de cultivo, seguindo os passos acima citados.

Para a quantificação de núcleos marcados, foram documentadas quinze regiões duplamente marcadas PCNA/DAPI e, para a sua contagem, utilizou-se o software Image Tool. A média aritmética das razões PCNA/DAPI foi calculada e, com os valores obtidos, foram feitas as comparações entre os grupos.

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

5. RESULTADOS

5.1. Astrogliose e reatividade microglial em animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-}

Os resultados da imunomarcção mostraram os efeitos da axotomia na reatividade glial dos animais C57BL/6J (selvagem) e C57BL/6J IFN γ ^{-/-} (mutante) , uma semana após transecção do nervo isquiático. As imagens mostraram um aumento da reatividade astrocitária com a lesão (**Fig. 4A e 4C**) e uma reatividade basal semelhante no lado não lesionado das duas linhagens (**Fig. 4B e 4D**). A análise quantitativa, feita através da medição da densidade integrada de pixels ao redor dos motoneurônios, mostra que a ausência do IFN γ não alterou a resposta dos astrócitos em comparação aos animais selvagens e que, portanto, não houve diferenças significativas na imunomarcção da proteína GFAP entre os animais em estudo (C57BL/6J $2,33 \pm 0,13$; C57BL/6J IFN γ ^{-/-} $2,27 \pm 0,24$; $p > 0,05$).

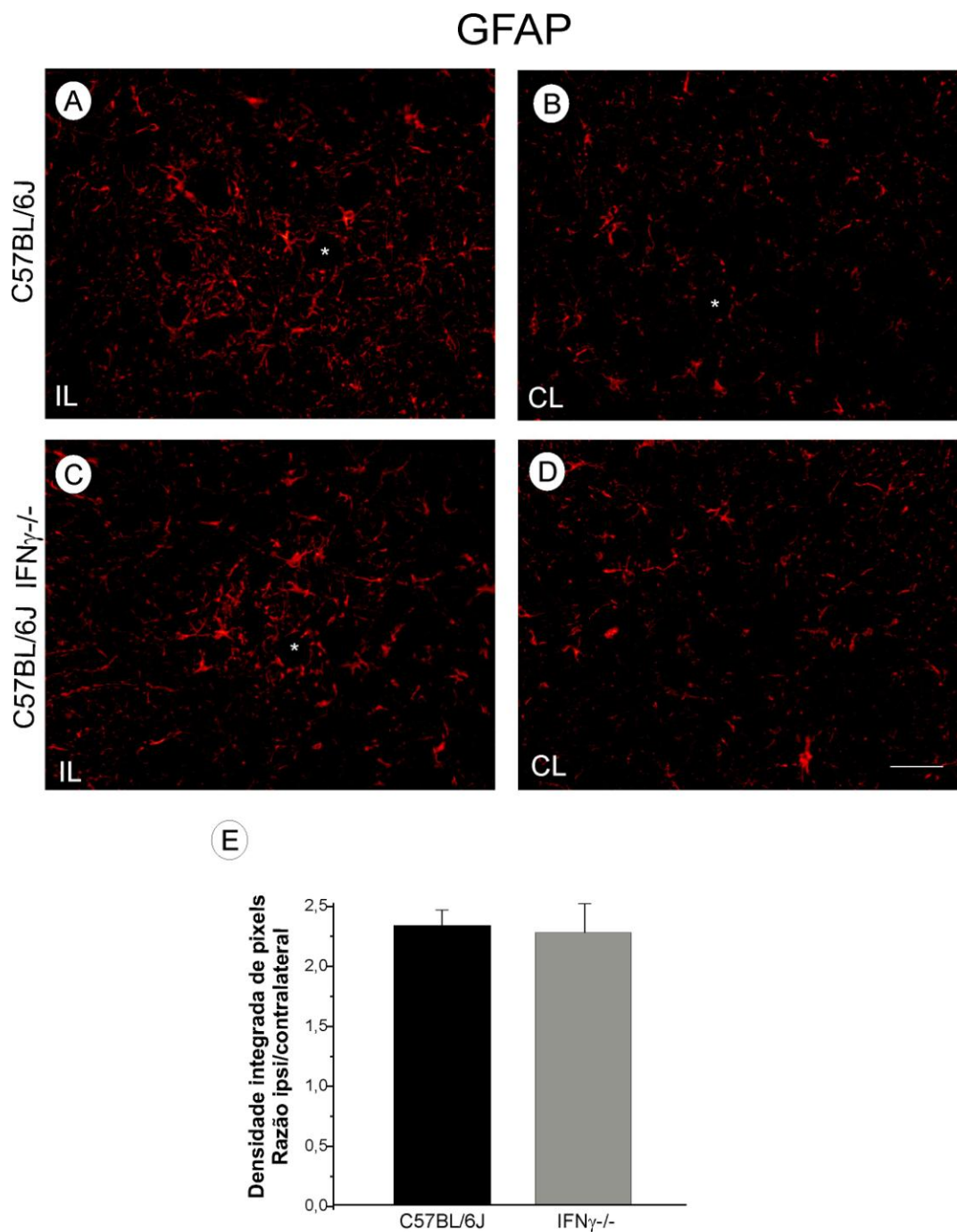


Fig. 4 Imunomarcacão para GFAP após a axotomia do nervo isquiático. As imagens correspondem a região dorsolateral do corno anterior da medula espinal. (A e C) lado ipsilateral (lesionado) dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$, respectivamente. (B e D) lado contralateral (não lesionado). (E) Gráfico representando a expressão de GFAP baseado em valores fornecidos pela média das razões (IL/CL) da densidade integrada de pixels para os dois camundongos em estudo. Os asteriscos indicam do corpo o motoneurônio alfa. Escala: 50 μ m.

A fim de reforçar os resultados obtidos por imunohistoquímica, fez-se uma análise da expressão da proteína GFAP por Western blot. A análise por densitometria de bandas (**Fig. 5A**) não detectou diferenças significativas com relação à expressão da proteína entre as linhagens, uma semana após axotomia (C57BL/6J $1,06 \pm 0,02$; C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ $1,07 \pm 0,01$, respectivamente; $p > 0,05$; **Fig. 5B**).

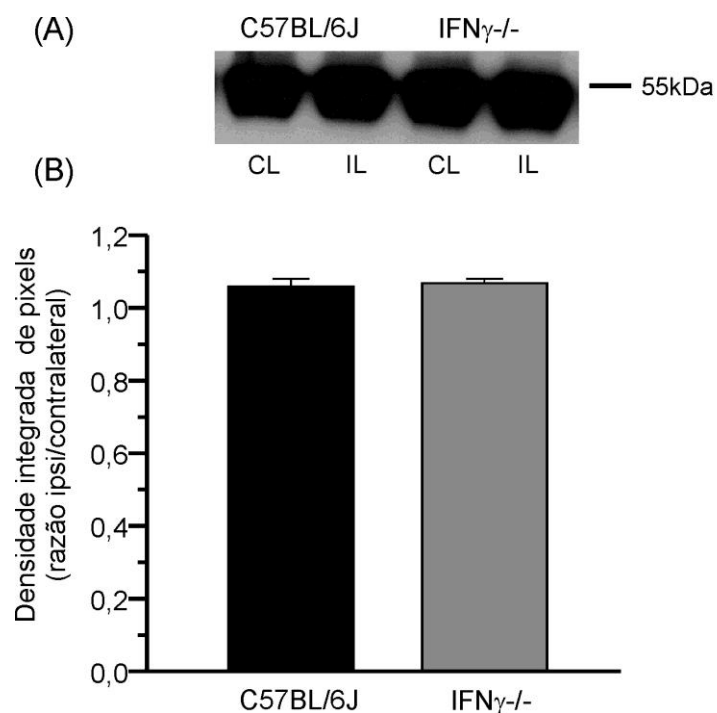


Fig. 5 (A) Western blotting para GFAP mostrando o padrão de bandas obtido a partir de extratos protéicos de medulas dos animais submetidos à axotomia. (B) Gráfico construído a partir da média das razões (IL/CL à lesão) da densitometria de bandas. Os resultados mostram que não houve diferença significativa na expressão da proteína entre as linhagens estudadas ($p > 0,05$).

A reatividade da microglia, avaliada por imunohistoquímica, mostrou um aumento da imunomarcção para anti Iba-1 no lado lesionado das duas linhagens estudadas. As **Fig. 6A** e **6C** mostram as células microgлияis reativas em íntimo contato com os motoneurônios axotomizados. Nos animais mutantes, a microglia aparece também reativa em torno de neurônios não lesionados. A análise estatística (**Fig. 6E**) não revelou diferenças entre os animais em estudo (C57BL/6J $2,7 \pm 0,26$ e C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ $3,0 \pm 0,3$; $p > 0,05$).

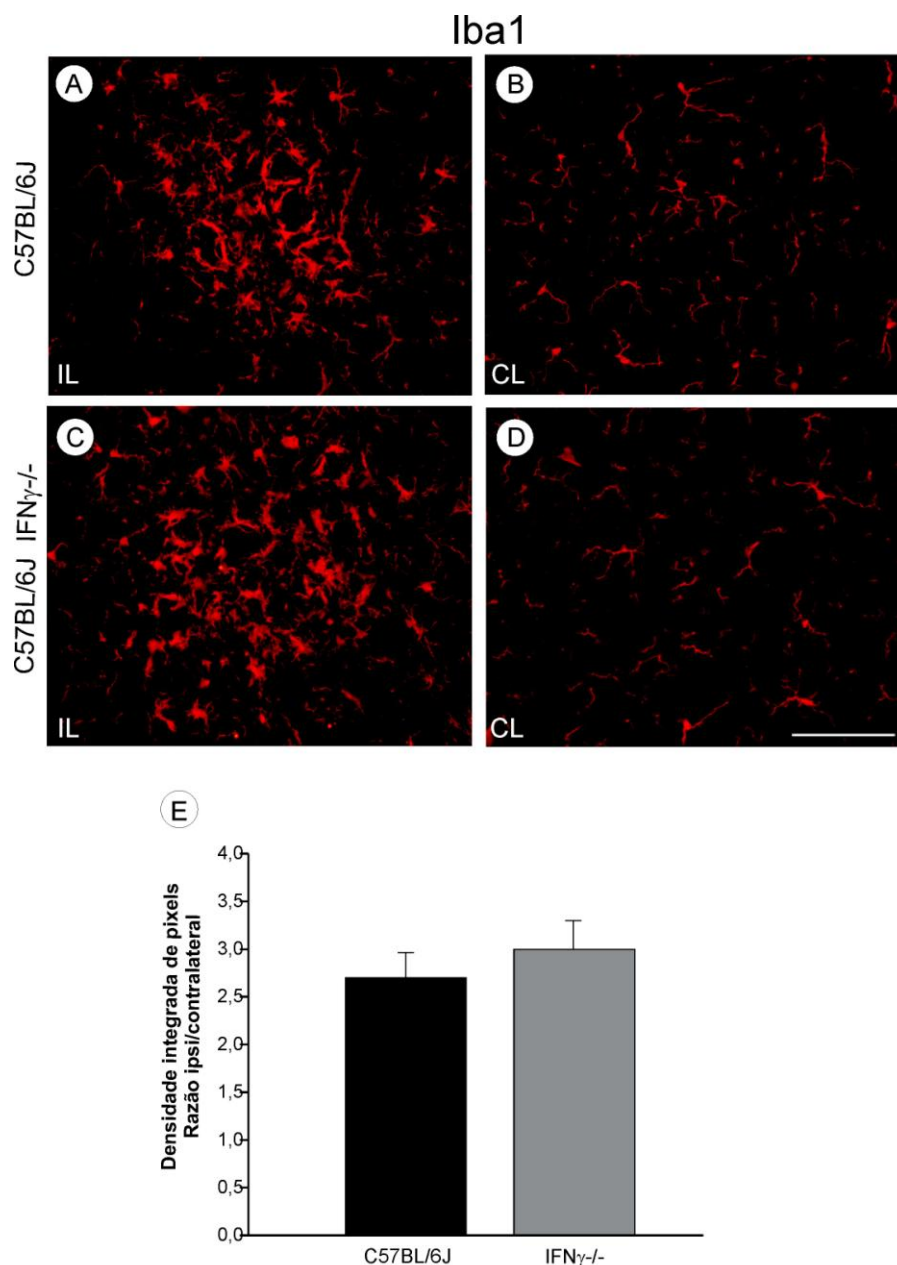


Fig. 6 Imunomarcacão anti-Iba1 uma semana após a transecção do nervo isquiático. (A e C) vista do lado ipsilateral (lesionado) dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$, respectivamente. (B e D) lado contralateral (não lesionado). (E) Gráfico representando a expressão de Iba1 baseado em valores fornecidos pela média das razões (IL/CL) da densidade integrada de pixels para os dois camundongos em estudo. Escala: 100 μ m.

5.2. Reduzida expressão de MHC I em animais C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ após axotomia

A fim de avaliar os efeitos da transecção do nervo isquiático na expressão de MHC I nos animais deficientes em $\text{IFN}\gamma$, foram feitas análises por imunohistoquímica e Western blotting.

A imunomarcção mostrou que a lesão não levou ao aumento da expressão de MHC I no lado contralateral nos animais mutantes, semelhante ao que foi visto nos animais selvagens (**Fig. 7B e 7D**). Já no lado da lesão, é possível observar um aumento da expressão desta proteína restrita a região dos motoneurônios axotomizados, sendo a marcação mais intensa nos animais C57BL/6J (**Fig. 7A e 7C**). Estes resultados sugerem que a expressão de MHC I nos animais mutantes foi induzida pela axotomia, mas ao mesmo tempo foi alterada pela ausência do $\text{IFN}\gamma$ nestes animais. A análise quantitativa ilustrada na **Fig. 7E** mostra uma expressão reduzida no lado lesionado dos animais deficientes em $\text{IFN}\gamma$ em comparação aos animais selvagens (C57BL/6J $5,21 \pm 0,48$; C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ $2,72 \pm 0,53$; $p < 0,05$). Neste caso, foi quantificado apenas o lado ipsilateral, uma vez que no lado contralateral a expressão de MHC I foi praticamente nula ao redor dos motoneurônios medulares.

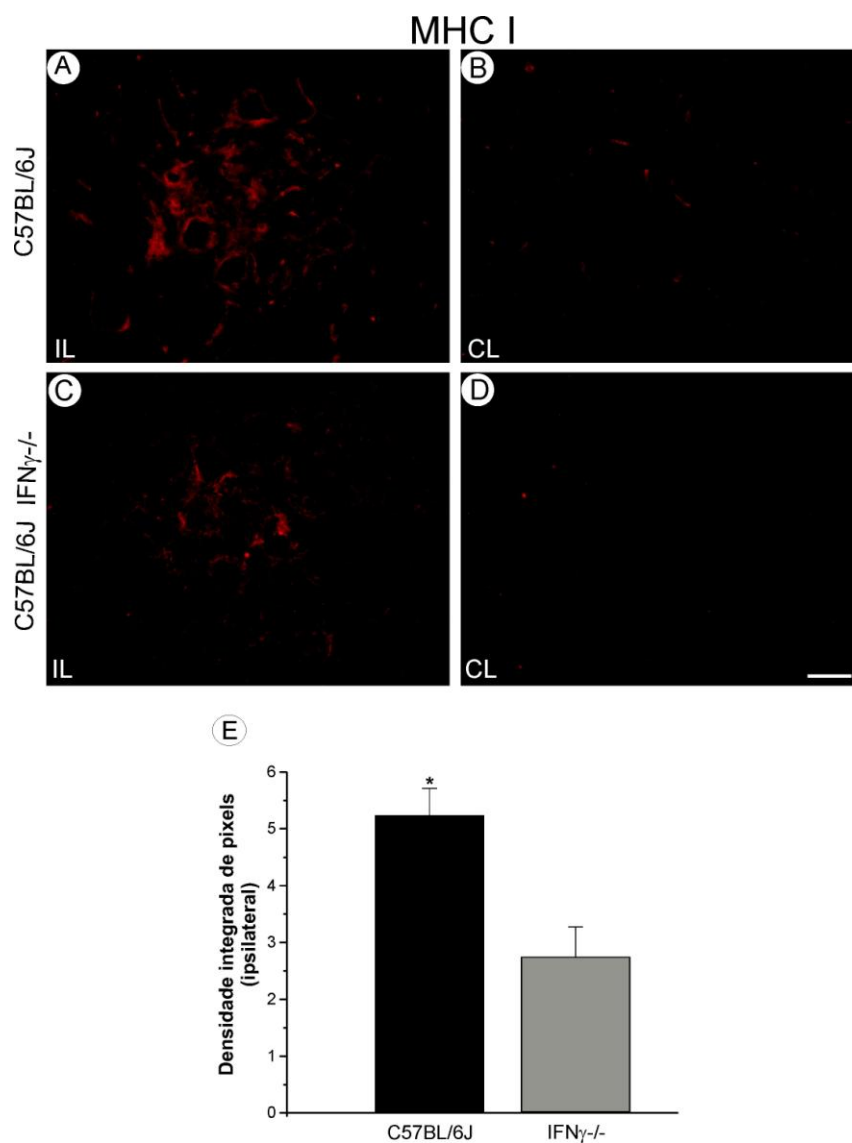


Fig. 7 (A-D) Imunomarcacão para MHC I após a axotomia do nervo isquiático. (A e C) lado ipsilateral da medula espinal dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$, respectivamente. (B e D) lado contralateral. (E) Gráfico representando a expressão de MHC I baseado em valores da densidade integrada de pixels do lado ipsilateral dos animais em estudo. Escala=50 μ m.

A avalia o dos níveis de expressão de MHC I feita por Western blotting, uma semana após transec o do nervo isquiático, pode ser vista na **Fig. 8A**. Observa-se que a amostra referente ao lado ipsilateral (lesionado) do camundongo C57BL/6J apresenta uma expressão maior de MHC I do que o observado nos animais C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$. Embora as quantifica es

mostrem uma tendência a uma menor expressão da proteína nos animais mutantes, a análise estatística não mostrou diferenças significativas entre as linhagens estudadas (C57BL/6J $1,18 \pm 0,12$; C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ $0,94 \pm 0,10$; $p > 0,05$, **Fig. 8B**). Como já foi visto por imunohistoquímica, o aumento da expressão de MHC I está localizado ao redor dos motoneurônios axotomizados, o que torna difícil a visualização das diferenças pela técnica de Western blotting.

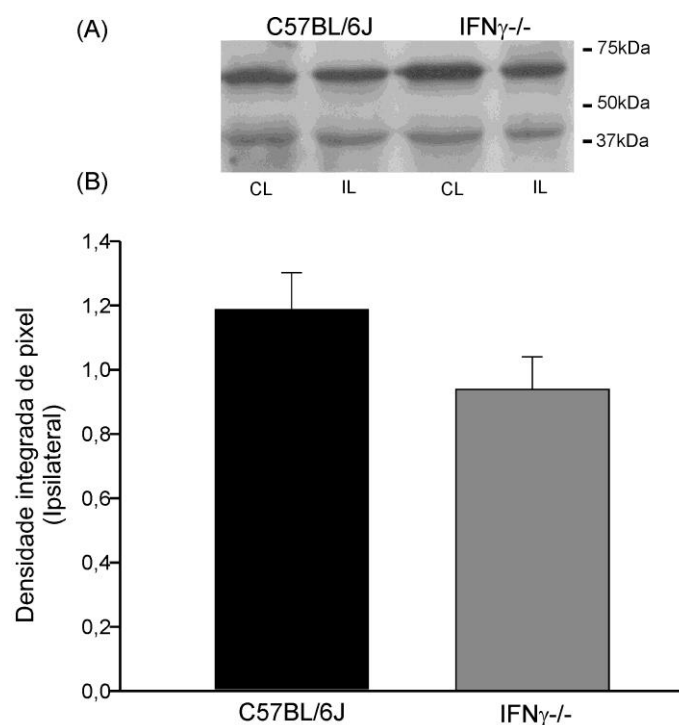


Fig. 8 (A) Imagem representativa dos resultados obtidos pela técnica de Western blotting mostrando a expressão da proteína MHC I nos extratos protéico de medula dos animais axotomizados. **(B)** Gráfico construído com os valores da média das razões (IL/CL à lesão) da densitometria de banda.

5.3. Reatividade e expressão de sinaptofisina nos animais deficientes em $\text{IFN}\gamma$

Para analisar as possíveis alterações na atividade sináptica dos motoneurônios- α afetados pela axotomia periférica, a expressão da proteína foi quantificada no núcleo motor do nervo isquiático dos animais selvagem e mutante. O lado ipsilateral mostrou uma redução da

cobertura sináptica em função da axotomia do nervo (**Fig. 9A e 9C**), sendo mais acentuada ao redor dos motoneurônios axotomizados dos animais C57BL/6J. A redução da imunomarcagem para sinaptofisina também pôde ser vista nos animais mutantes, mas foi bastante discreta em comparação ao lado sem lesão do mesmo animal. No lado contralateral (sem lesão) já foi possível notar uma maior expressão de sinaptofisina nos animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-} em comparação aos animais C57BL/6J (**Fig. 9B e 9D**). A análise quantitativa mostrou que houve diferença significativa entre os lados lesionado e não lesionado dos animais em estudo (C57BL/6J contralateral 3,77 $\pm$ 0,46, ipsilateral 2,54 $\pm$ 0,23; C57BL/6J IFN γ ^{-/-} contralateral 6,51 $\pm$ 0,47, ipsilateral 4,41 $\pm$ 0,6). Já as comparações feitas utilizando as razões ipsi/contralateral não mostraram diferenças entre os grupos (C57BL/6J 0,71 $\pm$ 0,08; C57BL/6J IFN γ ^{-/-} 0,71 $\pm$ 0,09, $p > 0,05$).

A expressão de sinaptofisina foi também avaliada pela técnica de Western blotting. Os resultados da imunomarcagem mostraram um padrão de bandas bastante semelhante entre as linhagens, e que se repetiu em experimentos independentes (**Fig. 10A**). Por esta técnica não foi possível evidenciar alterações na expressão da sinaptofisina nos animais, mesmo uma semana após axotomia do nervo (C57BL/6J 0,95 $\pm$ 0,02; C57BL/6J IFN γ ^{-/-} 0,98 $\pm$ 0,02; **Fig. 10B**).

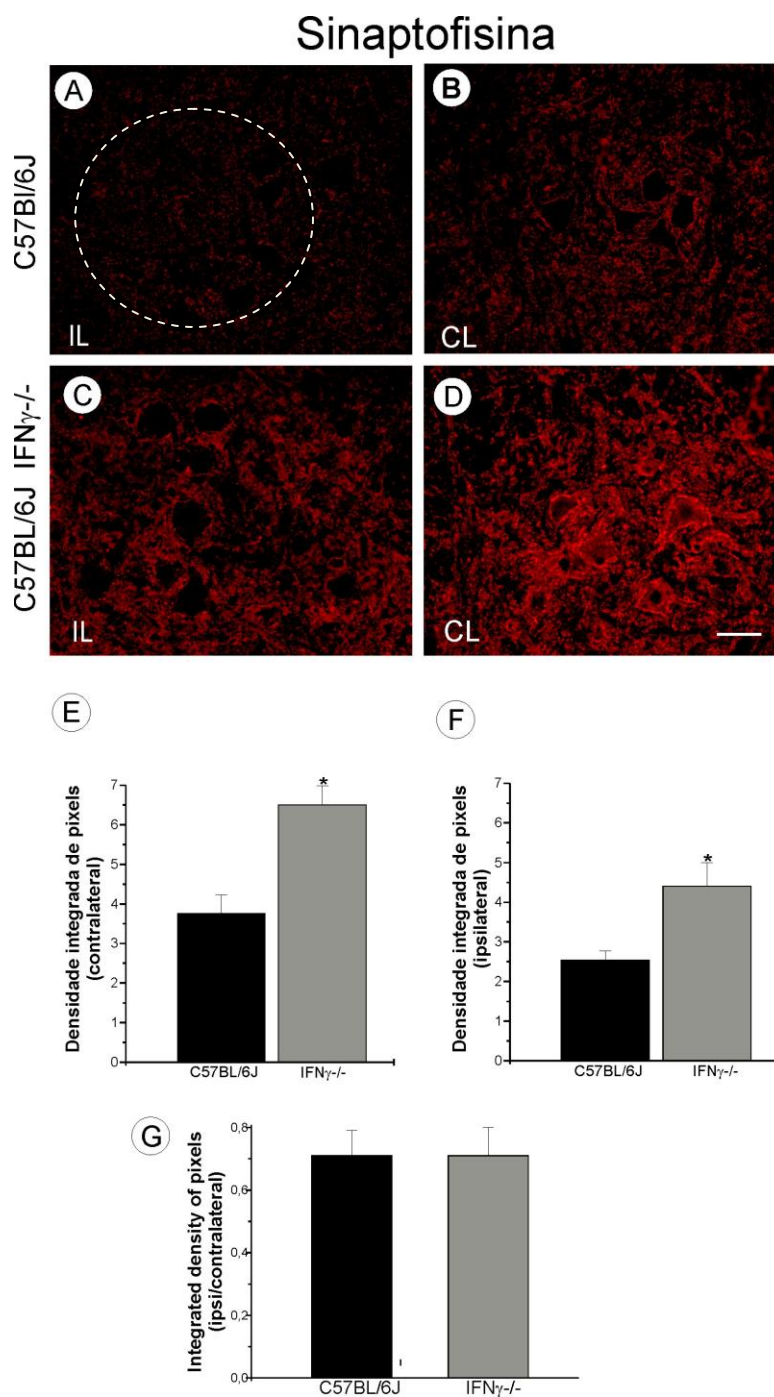


Fig. 9 (A-D) Imunomarcacão anti-sinaptofisina uma semana após a transeco do nervo isquiático. (A e C) lado ipsilateral dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$, respectivamente. (B e D) lado contralateral. (E, F e G) Gráficos representando a quantificao da expressão de sinaptofisina baseada na densidade integrada de pixels para os animais em estudo. O círculo tracejado indica a diminuo da cobertura sináptica ao redor dos motoneurônios axotomizados. Escala: 50 μ m.

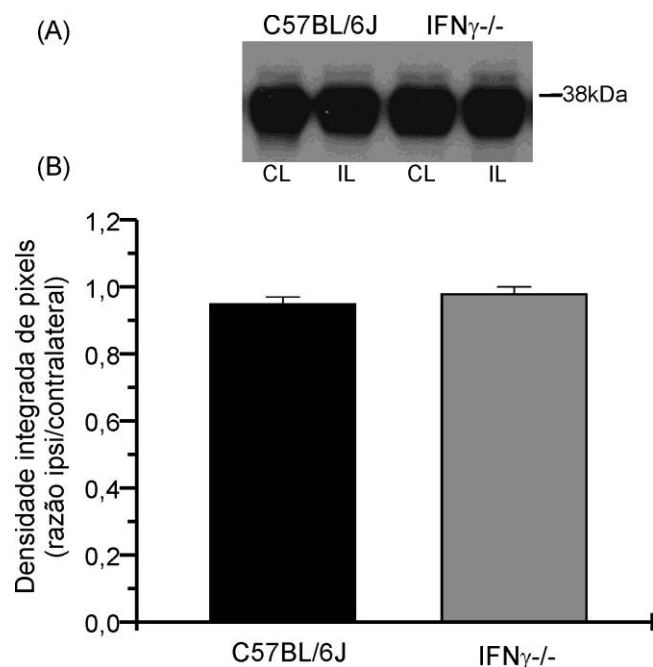


Fig. 10 (A) Western blotting para sinaptofisina mostrando o padrão de bandas sinaptofisina obtido a partir de extratos protéicos de medula dos animais submetidos à axotomia. (B) Gráfico construído a partir da média das razões (IL/CL à lesão) da densitometria de bandas.

5.4. Modificações na ultraestrutura dos motoneurônios dos animais C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ uma semana após axotomia do nervo isquiático

O estudo ultraestrutural dos motoneurônios revelou diferenças na sinaptologia entre as linhagens mutante e selvagem (**Fig. 11**). A análise quantitativa mostrou um reduzido número de terminais pré-sinápticos nos animais IFN $\gamma^{-/-}$, independente de lesão periférica (não lesionado $44,00 \pm 3,04$; lesionado $39,23 \pm 3,26/100$ μm de membrana), comparado com o lado sem lesão dos animais selvagens ($52,42 \pm 1,76/100$ μm de membrana, $p < 0,05$; **Fig. 11F**). O lado não lesionado dos animais C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ apresentou uma diminuição do número de terminais sinápticos em aposição à membrana dos motoneurônios, o que não foi adicionalmente reduzido com a axotomia. Embora os animais mutantes tenham mostrado um menor número de terminais, não foi aferida diferença estatística entre as linhagens estudadas com respeito à cobertura sináptica ($p > 0,05$; **Fig. 11E**).

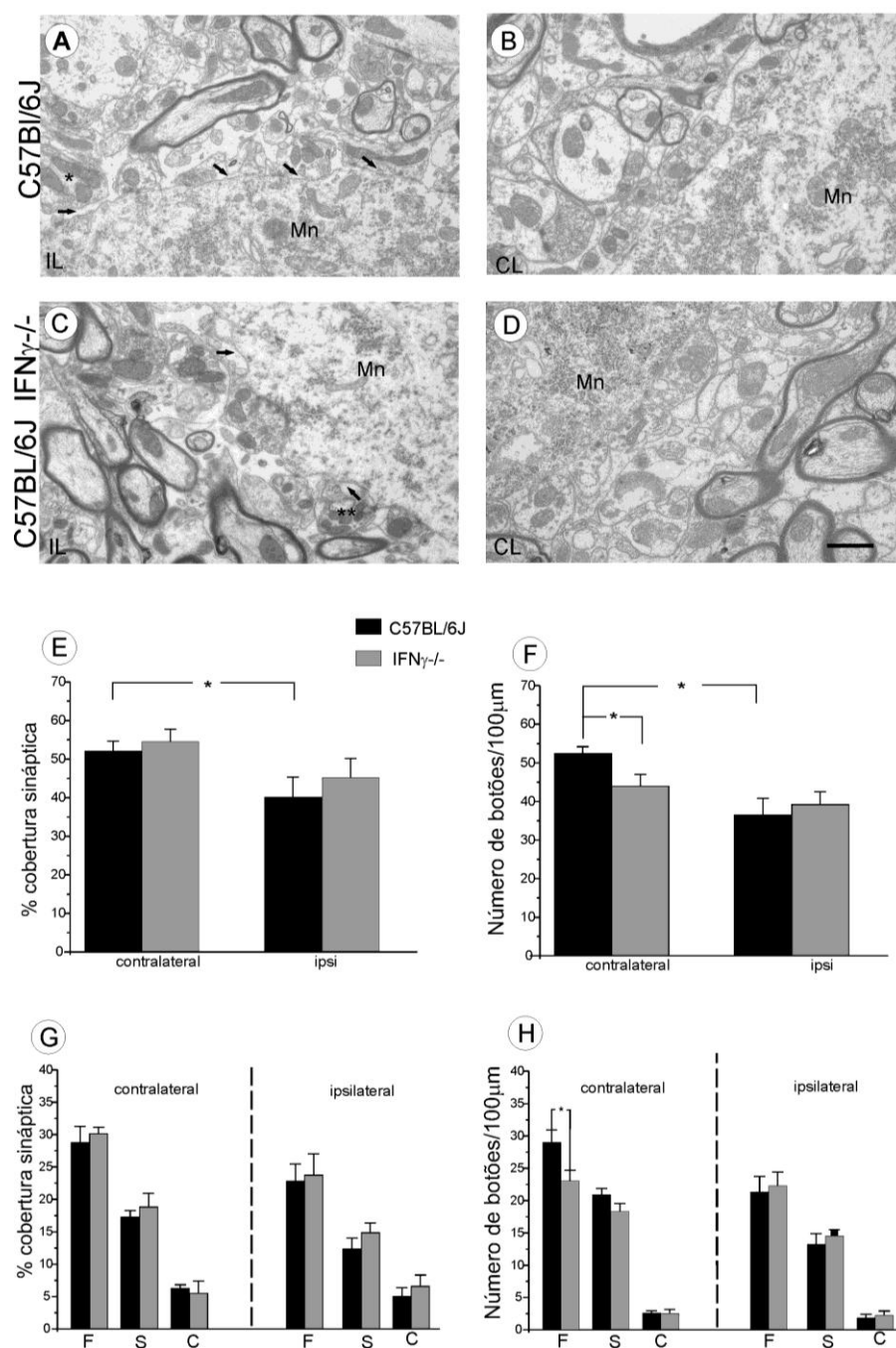


Fig. 11 Análise ultraestrutural qualitativa e quantitativa das sinapses presentes na superfície do corpo do motoneurônio- α uma semana após a axotomia do nervo isquiático. (A) Retração sináptica no lado ipsilateral (lesionado) dos animais C57BL/6J. As setas indicam a retração sináptica dos terminais nervosos na superfície do motoneurônio. (B) Terminais pré-sinápticos em aposição à membrana do motoneurônio (Mn) no lado contralateral (sem lesão) dos animais C57BL/6J. (C) Eliminação sináptica após axotomia no lado ipsilateral dos animais C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$. * terminal totalmente retraído, ** terminal parcialmente retraído. (D) Análise

detalhada da cobertura e do número de botões sinápticos no lado contralateral dos animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-}. Estes animais mostraram uma menor retração sináptica dos terminais (E) e um número significativamente menor de terminais em aposição (F) independente da lesão. (G) Porcentagem da cobertura sináptica dos terminais F, S e C nos lados ipsilateral e contralateral. (H) Gráfico representando o número de terminais/100 μ m da membrana do motoneurônio. Note uma maior perda de terminais do tipo F nos animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-} ($p < 0,05$). Escala: 1 μ m.

O reduzido número de terminais pré-sinápticos nos animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-} pode ser atribuído ao baixo número de terminais F (botões contendo vesículas achatadas com GABA ou glicina/GABA) nestes animais. Os animais mutantes mostraram um número significativamente menor de botões do tipo F em aposição aos neurônios do corno ventral do lado não lesionado comparado aos correspondentes neurônios nos animais C57BL/6J ($23,07 \pm 1,61$; $28,02 \pm 1,68$ respectivamente, $p < 0,05$; Fig. 11H). O número de terminais F no lado lesionado dos animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-} permaneceu inalterado mesmo com a lesão do nervo.

A análise do número de terminais do tipo S (botões contendo vesículas esféricas com glutamato) em aposição aos motoneurônios do lado não lesionado não mostrou diferenças significativas entre os grupos (IFN γ ^{-/-} $18,32 \pm 1,21$; C57BL/6J $21,75 \pm 0,89$). Com relação ao lado lesionado, o número de botões S em aposição ao motoneurônio foi similar nas duas linhagens (IFN γ ^{-/-} $14,55 \pm 0,94$; C57BL/6J $13,27 \pm 1,61$).

Com o objetivo de analisar o padrão de distribuição de terminais na superfície dos motoneurônios, fez-se a medição da frequência de espaços entre os grupos de botões em aposição ao corpo do motoneurônio em cada grupo experimental (Fig. 12). Um menor número de espaços e uma maior frequência de intervalos pequenos foram observados entre os terminais do lado não lesionado do grupo C57BL/6J IFN γ ^{-/-}, em comparação ao mesmo lado dos animais C57BL/6J (Fig. 12C). Mesmo com a lesão do nervo (Fig. 12D), o padrão de distribuição de espaços foi mantido e os terminais sinápticos permaneceram agrupados em aposição ao soma do motoneurônio.

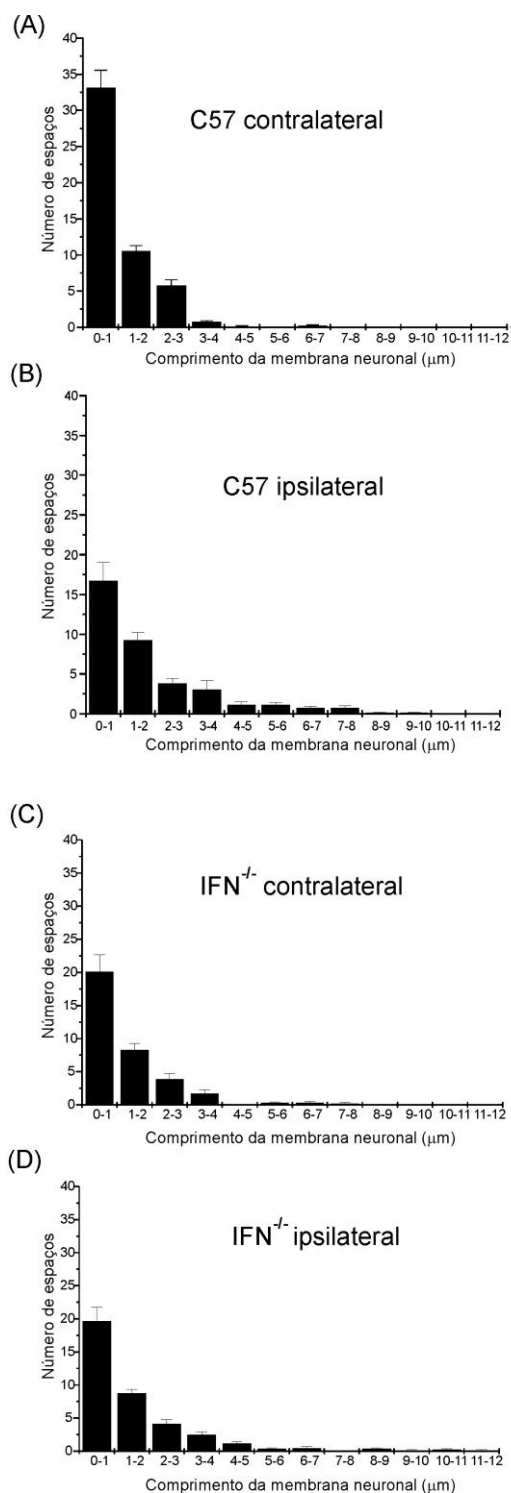


Fig. 12 Gráfico representando a distribuição de frequência (em micrômetros) dos espaços entre os terminais ao longo da membrana dos motoneurônios- α . (A e B) Distribuição de frequência normal no lado contralateral (sem lesão) dos animais C57BL/6J. (B) No lado ipsilateral (lesionado), os espaços entre os grupos de botões

aumentaram devido à seletiva retração dos terminais. (C e D) Os animais C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ mostraram uma menor retração de terminais com a lesão.

5.5. Alterações morfométricas na ausência do $\text{IFN}\gamma$

Foi comparado o efeito da axotomia no padrão do tamanho dos neurônios localizados na lâmina IX da medula espinal dos animais C57BL/6J e C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ (Fig. 13). A medições mostraram células com o diâmetro do corpo celular variando de 0,6 μm até 60 μm . No lado contralateral dos animais C57BL/6J foram observadas duas populações distintas de neurônios. Isto é mostrado pela forma bimodal do gráfico construído a partir da distribuição de frequência da média do tamanho do soma, que variou de 18 μm e 36 μm . Já o gráfico construído com as medidas do lado axotomizado mostrou um único pico, refletindo uma possível variação no tamanho dos neurônios e crescimento desta população no lado da lesão.

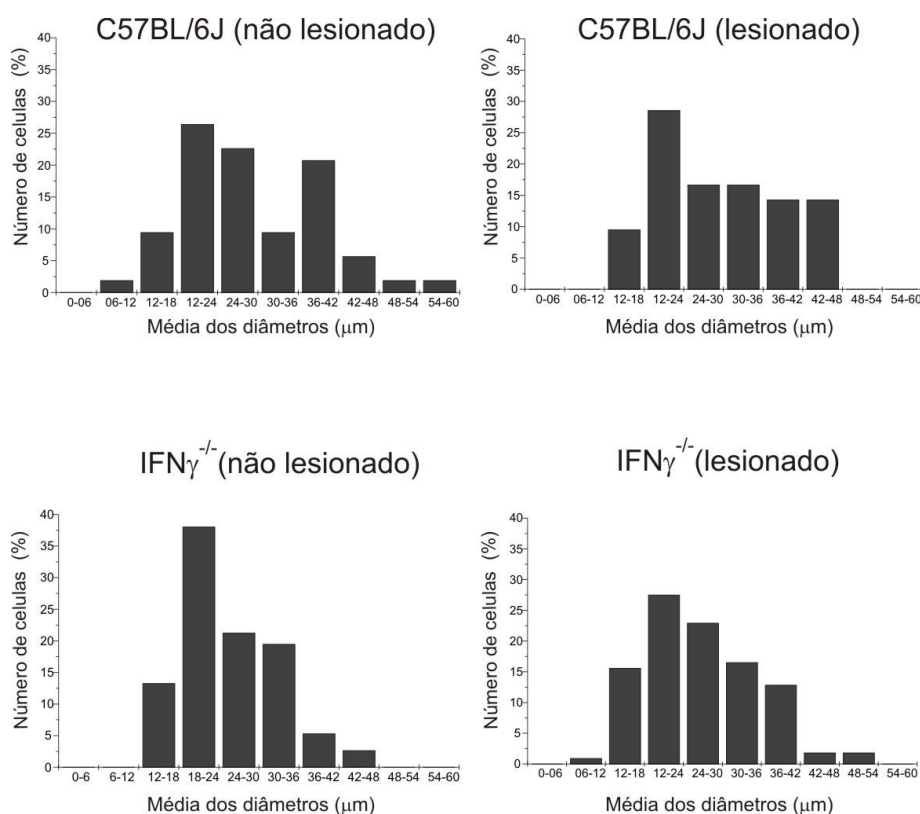


Fig. 13. Distribuição de frequência da média dos diâmetros dos neurônios presentes no corno ventral da medula espinal dos animais C57BL/6J e $\text{IFN}\gamma^{-/-}$, uma semana após axotomia do nervo isquiático. (A) Distribuição

bimodal no lado contralateral (sem lesão) dos animais selvagens, com um visível intervalo em 30-36 μm . **(B)** Lado ipsilateral (lesionado), onde se observa um aumento da população de neurônios com menor diâmetro celular. **(C)** Distribuição por tamanho do soma dos neurônios presentes no lado contralateral dos animais $\text{IFN}\gamma^{-/-}$, onde o diâmetro celular esta especialmente concentrado entre 18-24 μm . **(D)** Lado ipsilateral dos animais $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ mostrando o aparecimento de neurônios com corpo celular de maior diâmetro.

Nos animais $\text{IFN}\gamma^{-/-}$, houve predominância de células de menor diâmetro mesmo no lado sem lesão, sendo que a maior parte dos neurônios apresentou corpo celular entre 18 - 24 μm . No lado lesionado foi encontrado número reduzido de células com diâmetro superior à 48 μm . A análise quantitativa mostrou que a variação no diâmetro dos neurônios medidos foi estatisticamente influenciada pela mutação gênica ($p < 0,05$) nos animais C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$, e que estas modificações não foram agravadas com a axotomia do nervo isquiático ($p > 0,05$).

5.6. Dano neuronal em camundongos deficientes em $\text{IFN}\gamma$

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações na morfologia dos motoneurônios, secções semi-finas da medula espinal dos animais selvagens e mutantes foram analisadas primeiramente por microscopia de luz. Nos animais mutantes foi encontrado um alto número de neurônios hipercromáticos comparado as contagens feitas nos animais selvagens (**Fig. 14A e 14B**) e, em alguns casos, o núcleo também apareceu fortemente corado. Além disso, foram observadas mudanças hipercromáticas no citoplasma e células com forma bastante irregular. Também, com respeito ao tamanho, uma evidente redução devido à retração celular foi observada no grupo mutante (**Fig. 14C**). No lado contralateral, foi possível identificar células com núcleo e citoplasma hipercromáticos ao lado de neurônios normais (**Fig. 14D**).

As análises quantitativas não mostraram diferenças significativas no tamanho do soma causadas pela axotomia em ambos os grupos experimentais. No entanto, os animais $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ mostraram número superior de células degeneradas quando comparados com os animais selvagens (C57BL/6J ipsi $13,94 \pm 8,55\%$; contralateral $13,00 \pm 5,84\%$; C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ ipsi $37,64 \pm 5,95\%$; contralateral $29,28 \pm 10,73\%$; $p < 0,05$) (**Fig. 14E**). Os valores são expressos com as porcentagens do número total de neurônios amostrados em cada núcleo motor.

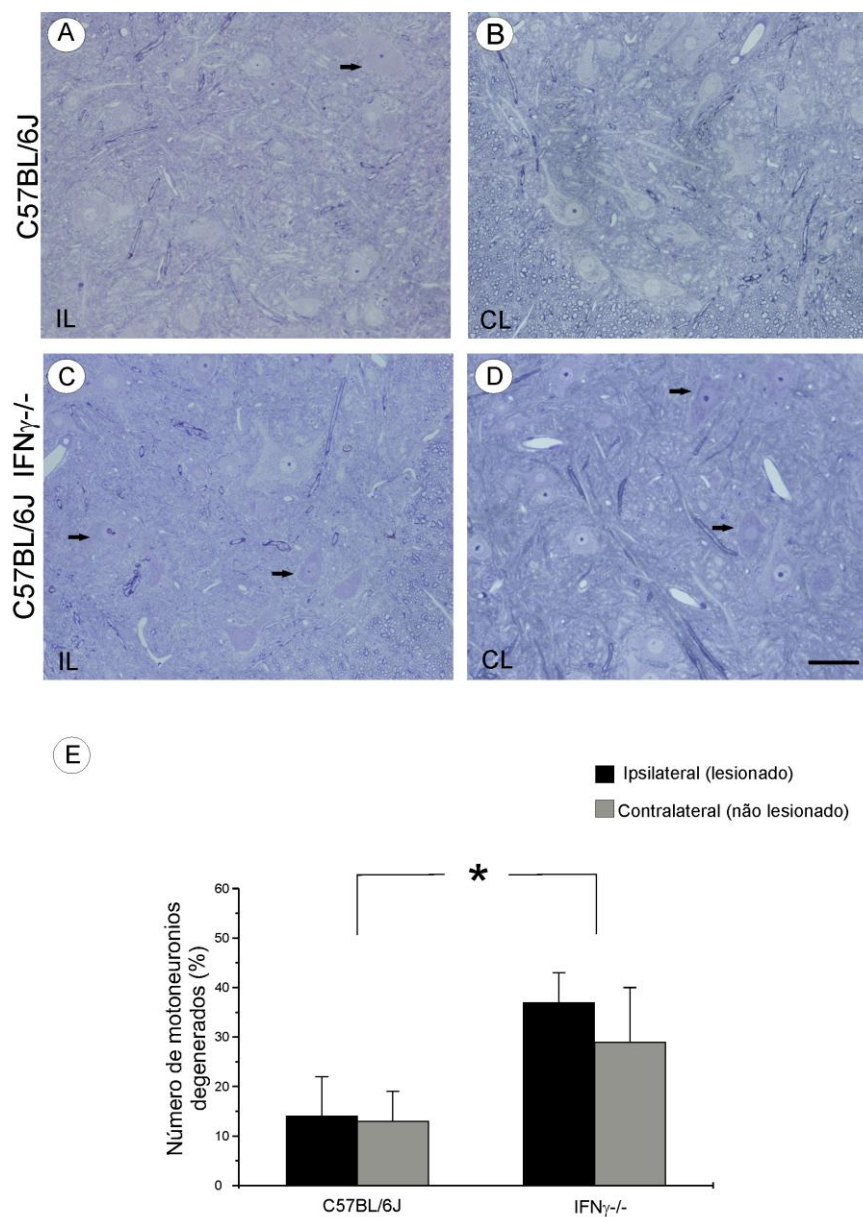


Fig. 14 Secções semi-finas do corno ventral da medula espinal de camundongos C57BL/6J e IFN $\gamma^{-/-}$ coradas com azul de toluidina. (A e C) Lado ipsilateral (lesionado) mostra alguns motoneurônios com contorno irregular e modificações hipercromáticas no citoplasma e no núcleo (seta). (C e D) Lado contralateral (não lesionado). Nos animais mutantes (D) é possível notar motoneurônios hipercromáticos ao lado de células normais (setas). (E) Gráfico da contagem de células degeneradas nas linhagens estudadas. Escala: 25 μ m.

5.7. Degeneração neuronal na ausência de IFN γ

Os motoneurônios axotomizados encontrados nos animais C57BL/6J não apresentaram, em sua maioria, alterações degenerativas visíveis. Neste sentido, a maioria das células mostrou membrana celular e nuclear intactas, cromatina uniformemente distribuída, e citoplasma sem alterações. Os motoneurônios encontrados no lado axotomizado mostraram mudanças clássicas associadas com a lesão (**Fig. 15A**). Foram observados terminais parcialmente ou totalmente retraídos além de alterações características de cromatólise (**Fig. 15B**). A ultraestrutura também mostrou organelas citoplasmáticas intactas nos motoneurônios de ambos os lados lesionado e não lesionado (**Fig. 15C**). Foi possível observar no interior de grandes neurônios um retículo endoplasmático bem desenvolvido com rosetas de poliribossomos, complexo de Golgi bem organizado, e mitocôndrias exibindo eletrondensidade e morfologia normal (**Fig. 15D**).

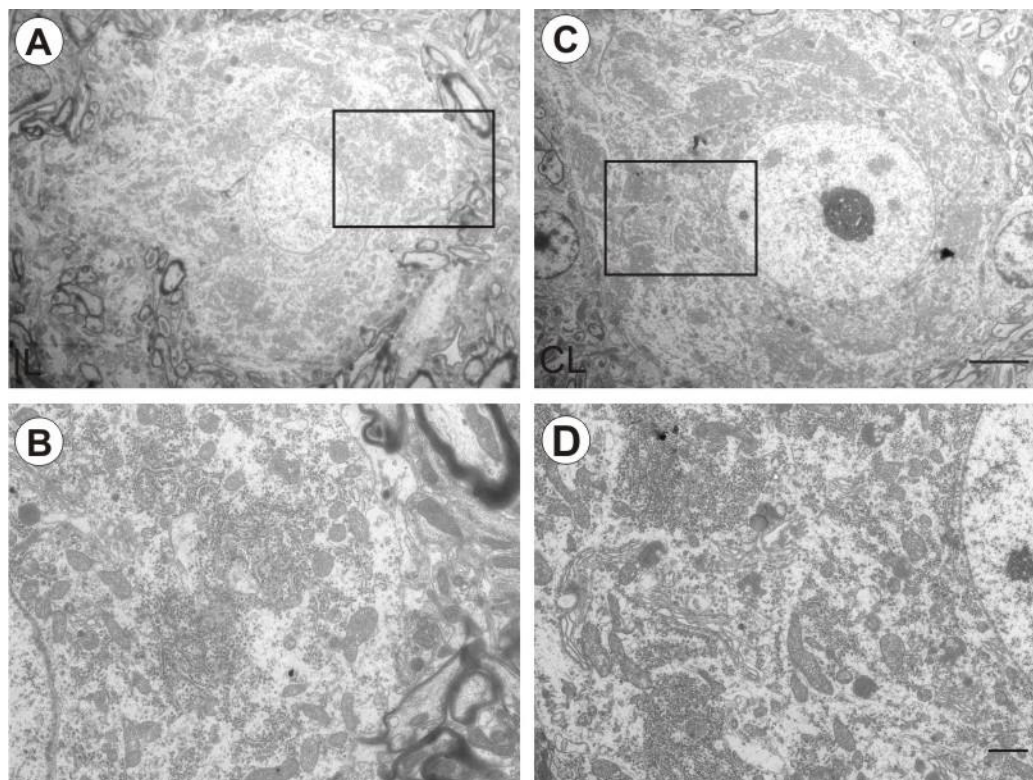


Fig. 15 Fotomicrografias eletrônicas de motoneurônios presentes na medula espinal de camundongos C57BL/6J. (A) motoneurônio alfa encontrado no lado ipsilateral (lesionado). A área em destaque na figura é mostrada em maior aumento em (B). Alguns terminais sinápticos estão retraídos; o citoplasma e o núcleo aparecem sem alterações. (C) motoneurônio alfa presente no lado contralateral (sem lesão). (D) Em maior aumento, as organelas citoplasmáticas estão visíveis além de um bem organizado retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e mitocôndria. Escala: 5µm (A e C), 1µm (B e D).

Em contraste, a análise ultraestrutural revelou que os animais $IFN\gamma^{-/-}$, mesmo no lado sem lesão, apresentaram uma frequência alta de neurônios com alterações morfológicas severas, sendo algumas delas inicialmente observadas por microscopia de luz. Os motoneurônios do corno ventral mostraram características de degeneração e morte celular, incluindo aumento de eletrondensidade no núcleo, citoplasma e organelas citoplasmáticas. Os motoneurônios do lado lesionado apresentaram uma redução na cobertura sináptica (**Fig. 16A**). Como resultado das modificações no núcleo e citoplasma, tais células se tornam eletrondensas e internamente desorganizadas. Em certos neurônios, a cromatina se mostrou agrupada em alguns locais do núcleo. Em maior aumento (**Fig. 16B**) foram observadas

invaginações na membrana nuclear, sugerindo retração do núcleo. Algumas mitocôndrias foram identificadas como hipercrômicas e dilatadas. Foi possível observar edema das cisternas do retículo endoplasmático, e ribossomos dispersos no citoplasma.

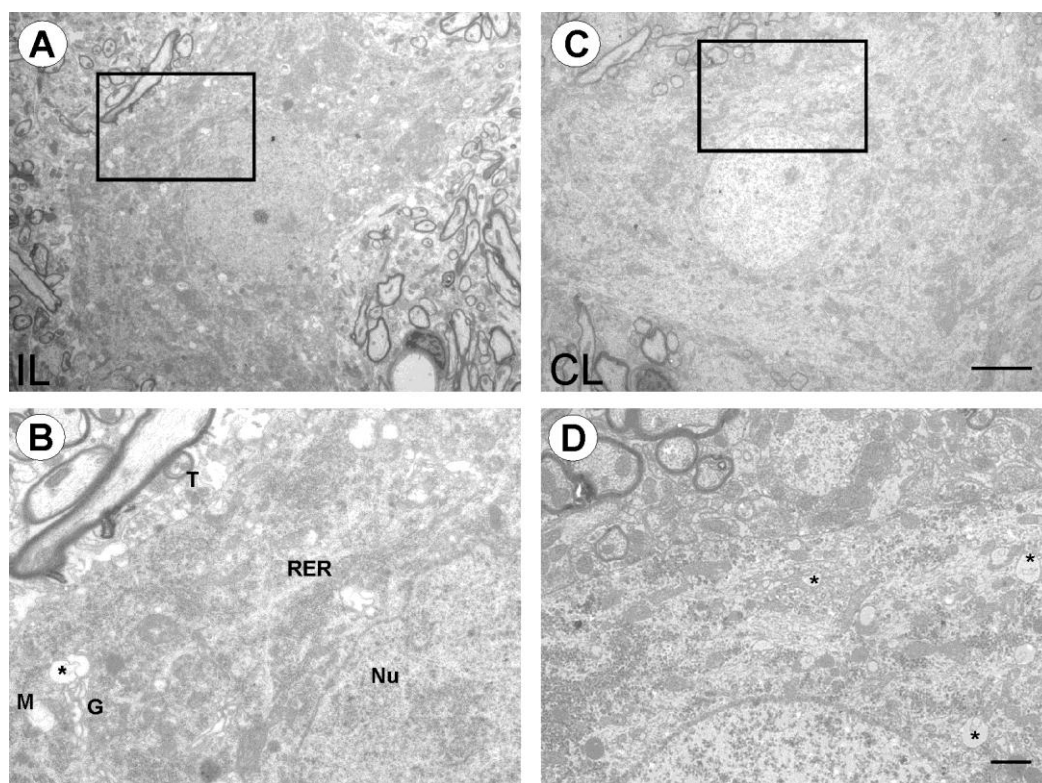


Fig. 16 Fotomicrografias eletrônicas de motoneurônios alfa presentes na medula espinal dos animais $IFN\gamma^{-/-}$. (A) motoneurônio encontrado no lado ipsilateral (lesionado). A área em destaque é mostrada em maior aumento em (B). O citoplasma e o núcleo estão eletrondensos e as organelas citoplasmáticas aparecem desorganizadas. Note a presença de numerosos vacúolos no pericário (asterisco) e o irregular contorno da membrana nuclear. (C) motoneurônio no lado contralateral (sem lesão). (D) Em maior aumento, o motoneurônio apresenta alguns vacúolos distribuídos no citoplasma. T, terminal sináptico; M, mitocôndria; RER, retículo endoplasmático rugoso; G, complexo de Golgi; N, núcleo. Escala: 5 μ m (A e C), 1 μ m (B e D).

Foram encontrados no corno anterior do lado não lesionado motoneurônios sem alterações morfológicas visíveis (**Fig. 16C**), que apresentaram terminais em aposição e também algumas retrações. Estes mostraram uma eletrodensidade compatível com descrições

prévias da literatura. No entanto, em um maior aumento (**Fig. 16D**) pode-se notar a presença de certos vacúolos no citoplasma e cristas mitocondriais dilatadas.

Nas adjacências de neurônios com morfologia alterada, foram também identificadas células com aparência normal (**Fig. 17A**). A descontinuidade da membrana plasmática e nuclear também foi observada em certos neurônios alterados (**Fig. 17B**). Em células com citoplasma hipercromático e núcleo com cromatina condensada, o envelope nuclear se mostrou indistinguível. Observou-se no citoplasma RER esparço, CG dilatado e presença de muitos vacúolos (**Fig. 17C**). Pode-se notar a presença de células da glia em íntimo contato com o corpo de neurônios em degeneração (**Fig. 17D**).

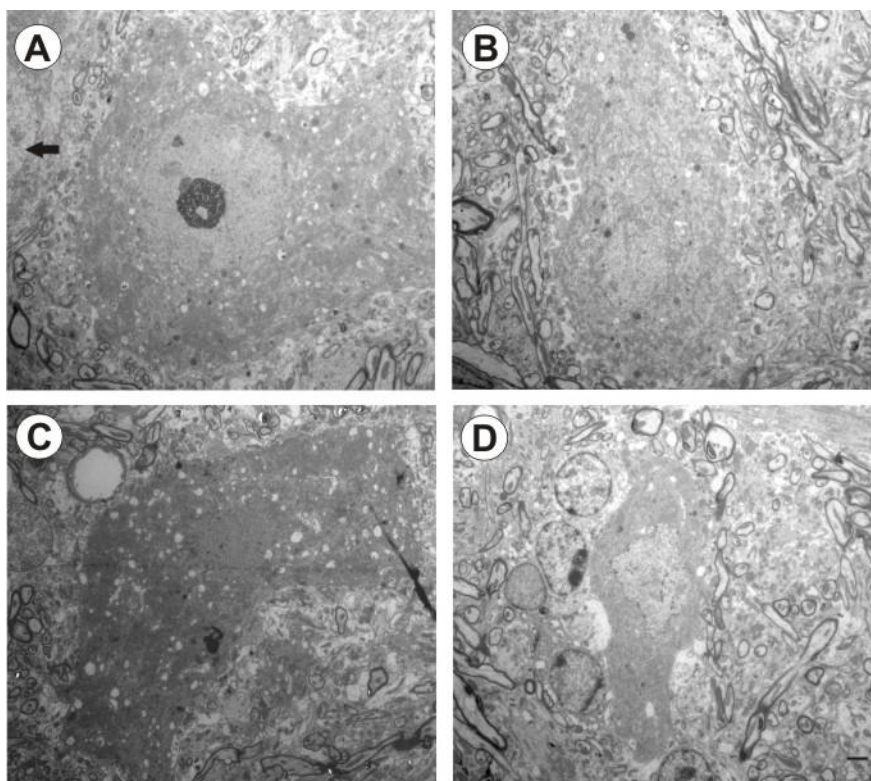


Fig. 17 Micrografias eletrônicas de neurônios degenerados em camundongos $\text{IFN}\gamma^{-/-}$. (A) Motoneurônio alterado encontrado ao lado de uma célula normal (seta). Citoplasma e núcleo eletrondensos, aparecimento de invaginações na membrana nuclear e presença de muitos vacúolos no citoplasma. (B) O corpo celular se mostra retraído e o envelope nuclear fragmentado. (C) Cromatina nuclear condensada, e organelas indistinguíveis. (D) Células da glia estão em íntimo contato com neurônio em degeneração. Escala: 2 μm .

Foram encontrados fragmentos celulares em certas regiões no corno anterior da medula espinal, além da presença de células gliais reativas com restos de material celular em seu interior, denotando uma atividade fagocitária no local (**Fig. 18A e 18B**).

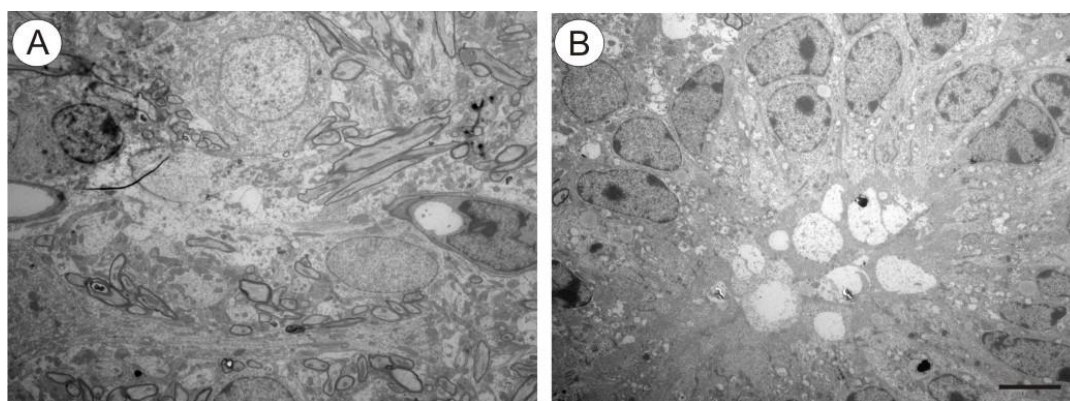


Fig. 18 Micrografias eletrônicas mostrando dois prováveis momentos de morte neuronal. (A) Presença de células da glia em íntimo contato com fragmentos celulares. (B) Células da microglia fagocitando restos de um possível neurônio em degeneração. Escala: 5 μ m.

5.8. Caracterização de morte neuronal em camundongos deficientes em IFN γ

Previamente mostramos que a ausência do IFN γ em animais submetidos à axotomia resultou em uma série de mudanças morfológicas e também no tamanho dos neurônios. A fim de avaliar se o dano neuronal foi mediado pela ausência dessa citocina, fez-se a contagem do número de neurônios, através da coloração de Nissl, presentes no corno ventral da medula espinal de animais sem lesão (**Fig. 19B e 19C**). Como pode ser observado na **Fig. 19D**, os animais IFN $\gamma^{-/-}$ mostraram número menor de neurônios no núcleo motor (lâmina IX) comparados aos animais selvagens (C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ 89% $\pm$ 11; C57BL/6J 124% $\pm$ 11; $p < 0,05$).

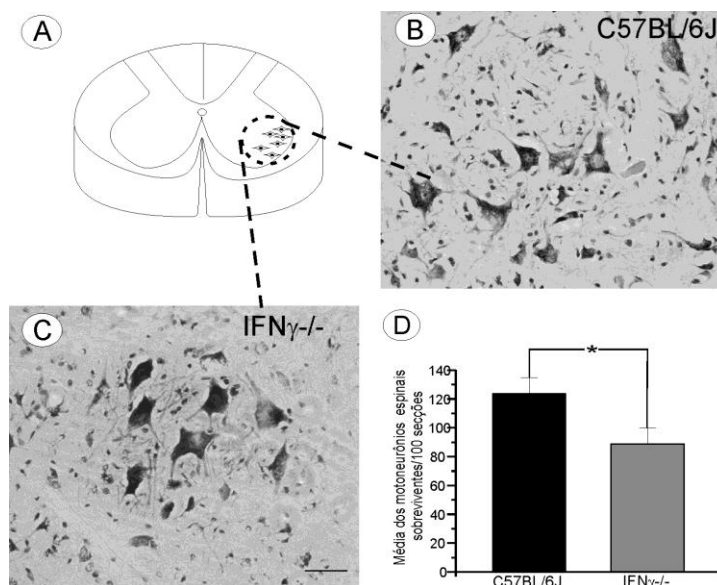


Fig. 19 (A) Desenho esquemático da região lombar da medula espinal ilustrando o pool de neurônios do isquiático. (B e C) Imagens representativas mostrando o corpo celular dos motoneurônios dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN γ ^{-/-}. (D) Representação gráfica dos motoneurônios espinais sobreviventes. Note a redução significativa do número de neurônios nos animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-}. Escala: 50 μ m.

Para identificação de morte neuronal, cortes congelados da medula espinal de animais sem lesão foram utilizados para reação de TUNEL e caspase 3. As imagens mostraram uma marcação positiva exclusivamente nas secções dos animais mutantes (**Fig. 20A e 20B**). A imunomarcação para caspase 3 nos animais IFN γ ^{-/-} reforça a presença de mecanismos apoptóticos envolvidos na morte de motoneurônios como mencionado anteriormente (**Fig. 20B**).

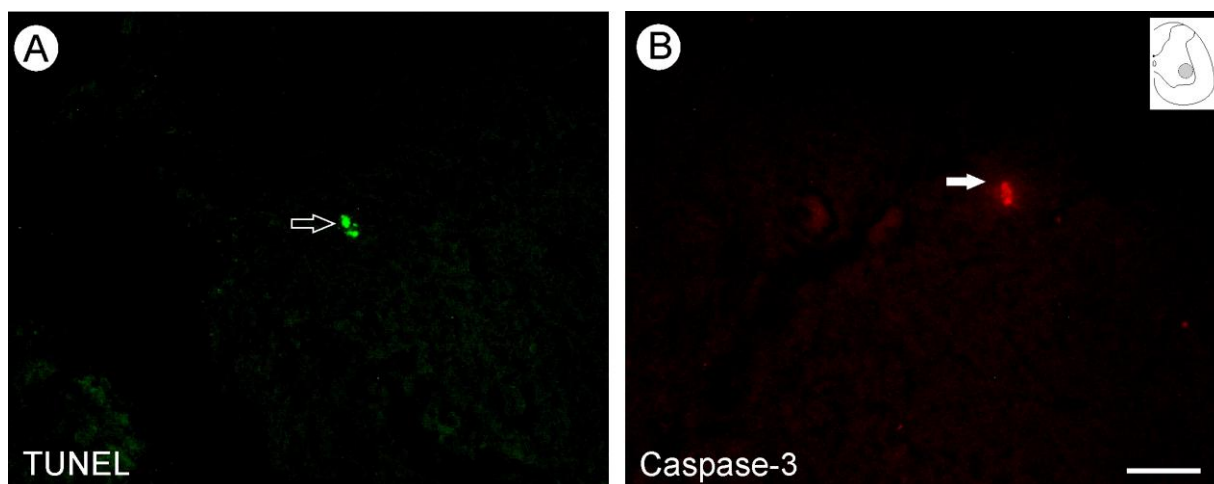


Fig. 20 (A) Neurônio TUNEL marcado (seta) no núcleo motor da medula espinal. (B) Imagem representativa de imunofluorescência mostrando motoneurônio positivo para Caspase 3 em animais $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ sem lesão periférica. Escala: 50 μm .

5.9. Efeito da ausência do $\text{IFN}\gamma$ na resposta das células de Schwann após esmagamento do nervo

Os cortes longitudinais do nervo isquiático foram imunomarcados com anti-neurofilamento, permitindo a visualização do citoesqueleto do axônio e anti-p75NGFR, o receptor de baixa afinidade para neurotrofinas. As imagens do segmento distal mostram que os animais C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ apresentaram maior marcação para neurofilamento duas semanas após o esmagamento do nervo isquiático (**Fig. 21A-C**). A imunohistoquímica para p75NGFR também se mostrou mais reativa nos animais mutantes (**Fig. 21D-F**) no lado da lesão, o que pode indicar uma maior capacidade de brotamento axonal nestes animais. No tecido sem lesão, os grupos experimentais apresentaram expressão basal semelhante para p75NGFR.

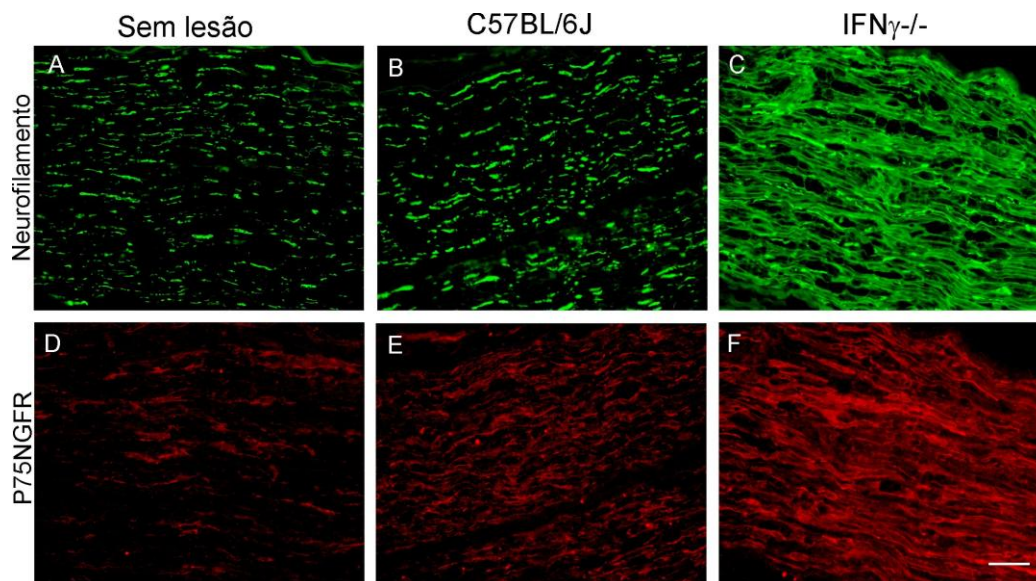


Fig. 21 Microscopia de luz de cortes longitudinais do segmento distal à região do esmagamento do nervo isquiático com imunomarcagem para neurofilamento e p75NGFR no lado contralateral (sem lesão) (A e D), e ipsilateral (lesionado) dos grupos experimentais (B, C, E e F). Note que com a lesão ocorreu aumento da expressão do receptor principalmente no lado ipsilateral dos animais C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$. O mesmo se aplica para a expressão de neurofilamento. Escala: 50 μm .

5.10. Efeito da ausência do $\text{IFN}\gamma$ no número de axônios após esmagamento

A análise do nervo duas semanas após o esmagamento mostrou a presença de axônios amielínicos, um pequeno número de mielínicos e algumas fibras em processo de degeneração (**Fig. 22**). Embora os animais C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ apresentem uma tendência para maior número de axônios não mielínicos, indicando um aumento no brotamento axonal, esta diferença não pôde ser observada pela análise estatística (C57BL/6J $24,76 \pm 2,94$; C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ $30,46 \pm 5,79$). O número de axônios mielínicos (C57BL/6J $17,94 \pm 2,16$; C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ $14,69 \pm 0,98$) e fibras em degeneração (C57BL/6J $7,41 \pm 1,18$; C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ $8,92 \pm 2,34$) foi similar nas duas linhagens estudadas.

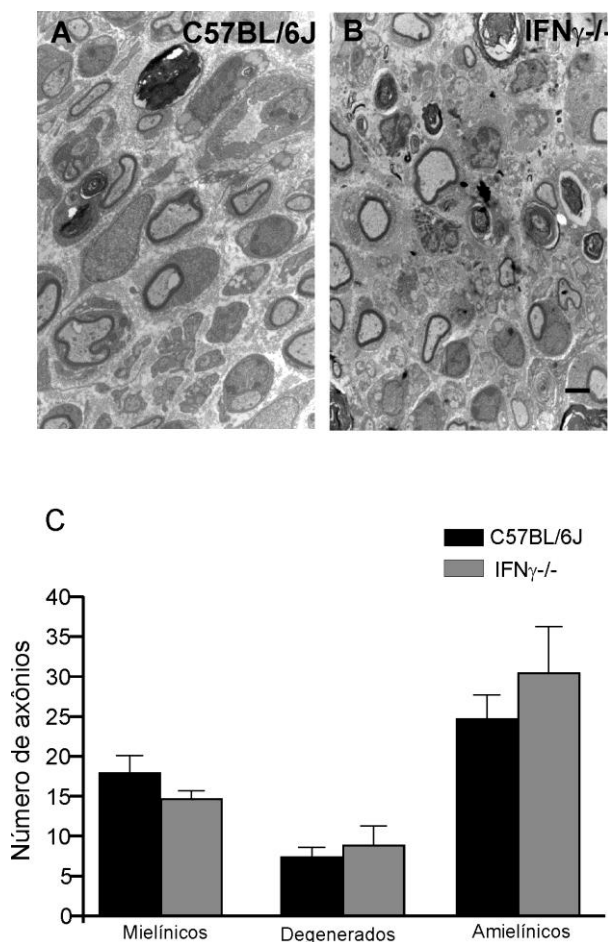


Fig. 22 (A e B) Micrografias eletrônicas de cortes transversais da região distal ao esmagamento do nervo isquiático dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN γ ^{-/-}. (C) Após duas semanas de esmagamento, pode-se notar um número maior de axônios amielínicos nos animais mutantes. Escala: 1 μ m.

5.11. Recuperação da função motora dos animais IFN γ ^{-/-}

Foi investigada a recuperação motora dos grupos experimentais utilizando-se o aparelho CatWalk. Para o cálculo do índice funcional do nervo isquiático (**Fig. 23**) utilizamos dois parâmetros: a distância entre o primeiro e o quinto dedo, e a distância entre o terceiro dedo e o calcanhar. A recuperação dos animais foi acompanhada durante três semanas. Logo após a cirurgia, observou-se total perda de função motora em ambas as linhagens. Uma semana pós-lesão, os animais C57BL/6J apresentaram uma melhora de 26% e os animais mutantes de 40%. Com duas semanas, o grupo selvagem teve uma melhora funcional de 61% e o grupo mutante de 51%. Embora a recuperação dos animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-} tenha sido

mais lenta nos primeiros testes realizados, esta foi progressivamente aumentando, alcançando 95% ao final da terceira semana de observação. Já os animais selvagens tiveram uma recuperação de 74% ao final do experimento. A análise estatística não mostrou diferença significante na recuperação das linhagens avaliadas.

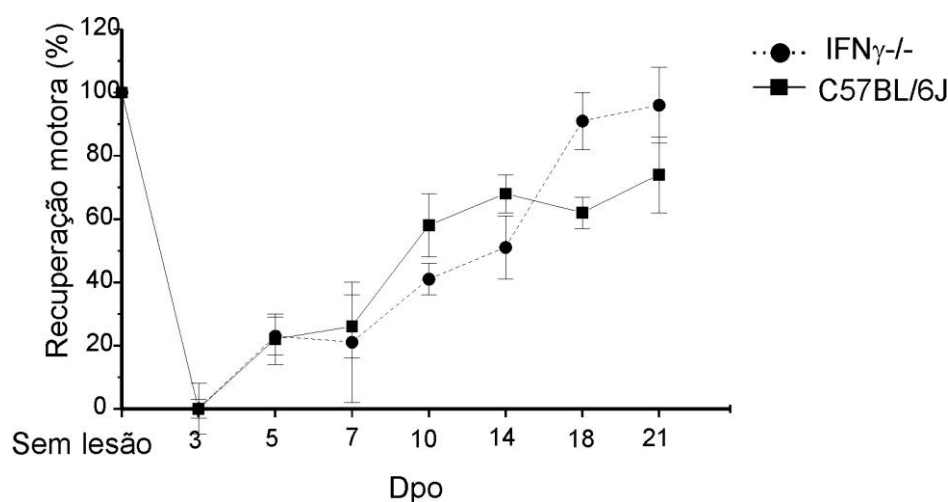


Fig. 23 Recuperação motora dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ após esmagamento do nervo isquiático. Gráficos contruídos com valores do índice funcional do isquiático durante o período de 21 dias pós-operatório (Dpo).

A análise da pressão está representada pela razão entre os lados ipsi/contralateral e expressa em porcentagem (**Fig. 24**). Os resultados mostraram que os animais C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ conseguem suportar mais o peso do corpo sobre a pata lesionada em um tempo mais curto. Três semanas após cirurgia, os animais mutantes recuperam 99% da força da pata lesionada e os animais selvagens 88%. Contudo, não foram observadas diferenças nas pressões plantares entre as linhagens estudadas, ao longo do período avaliado.

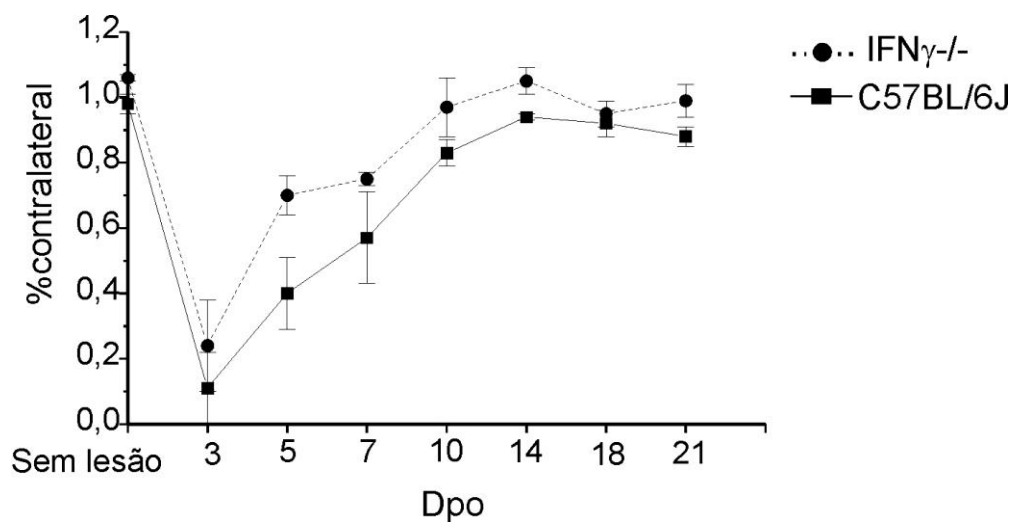


Fig. 24 Gráfico de intensidade da pressão plantar do lado ipsilateral mostrado como porcentagem da pata contralateral dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ durante 21 dias.

5.12. Efeitos *in vitro* da ausência do IFN γ sobre cultura primária de astrócito

Os astrócitos dos animais C57BL/6J e C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ foram isolados do córtex cerebral de neonatos, a fim de se observar e comparar o comportamento destas células em cultura. A reatividade glial, vista em cultura, não mostrou diferenças na imunomarcagem para GFAP entre as linhagens (C57BL/6J $14,76 \pm 1,08$; C57BL/6J IFN $\gamma^{-/-}$ $13,22 \pm 0,50$; **Fig. 25**). No entanto, observou-se uma maior proliferação de astrócitos na cultura dos animais selvagens.

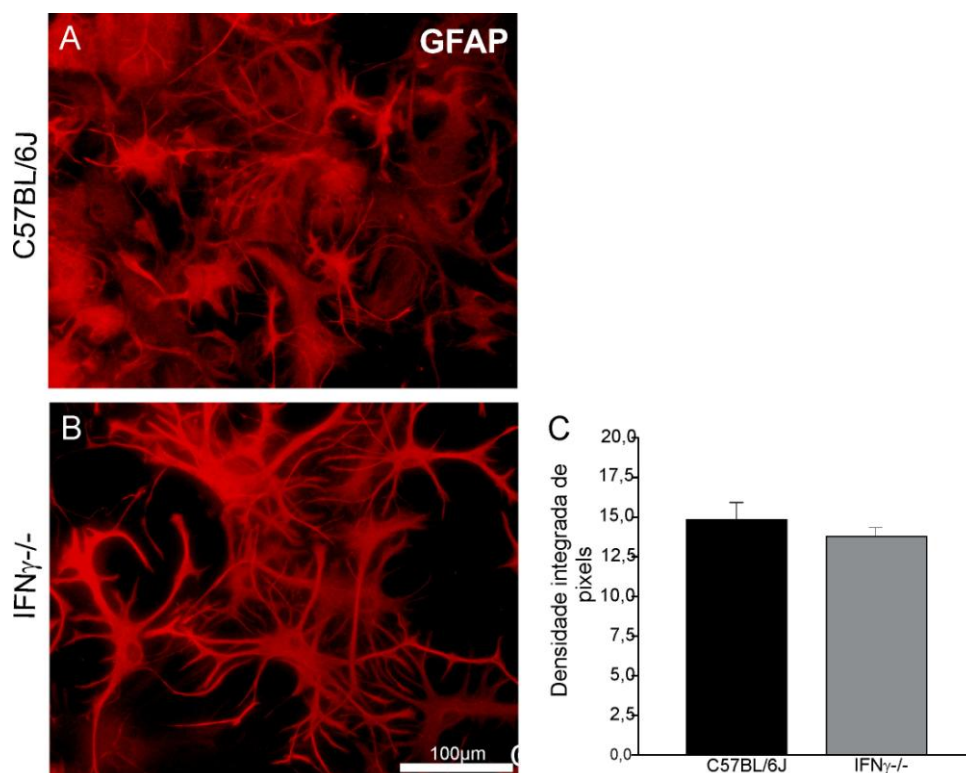


Fig. 25 (A e B) Imunomarcação anti-GFAP em cultura purificada de astrócitos após uma semana de cultivo. (C) Gráfico representando a quantificação baseada na densidade integrada de pixel. Escala: 100 μ m.

Além da expressão de GFAP, os níveis de expressão de MHC I em cultura também foram avaliados. Diferentemente do que foi visto *in vivo*, a análise quantitativa não mostrou diferenças significativas na imunomarcação para MHC I nos astrócitos dos grupos estudados (C57BL/6J $6,00 \pm 1,67$; C57BL/6J IFN γ ^{-/-} $5,62 \pm 1,37$; **Fig. 26**).

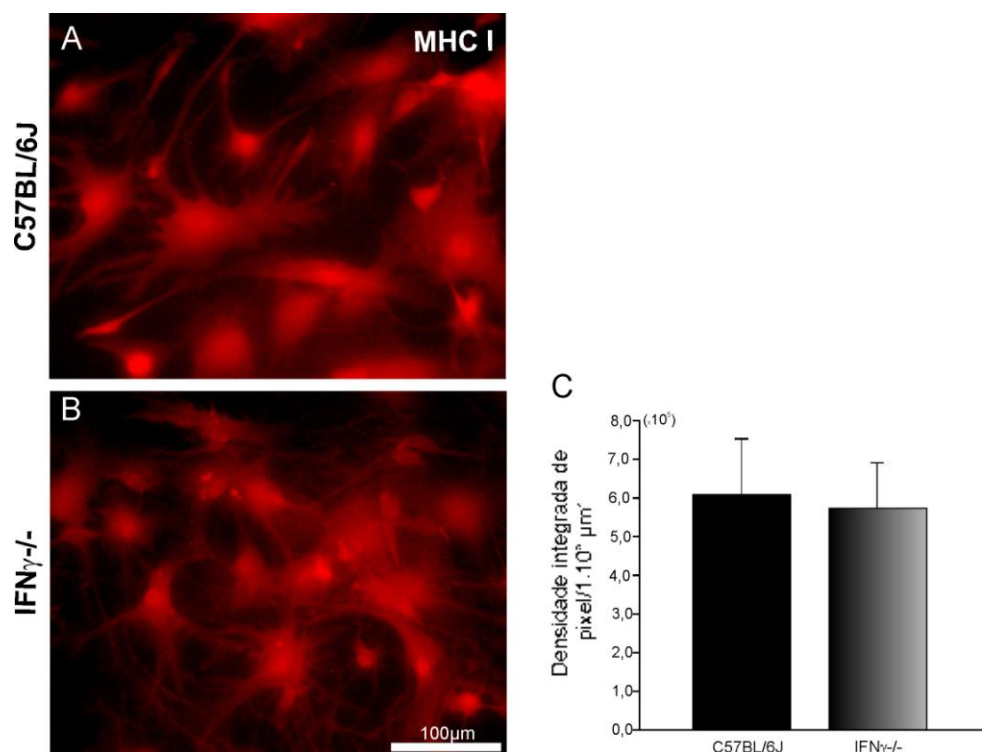


Fig. 26 (A e B) Imunomarcção anti-MHC I em cultura purificada de astrócitos após uma semana de cultivo. (C) Gráfico representando a quantificação baseada na densidade integrada de pixel. Escala:100 μ m.

5.13. Taxa mitótica dos astrócitos em cultura na ausência de IFN γ

O acompanhamento do crescimento dos astrócitos em cultura permitiu observar as diferenças na taxa de proliferação destas células entre as culturas dos grupos experimentais. Poucos dias após o plaqueamento, as duas culturas apresentaram uma taxa de crescimento semelhante mas, a partir do quarto dia, os astrócitos dos animais C57BL/6J passaram a proliferar mais rapidamente. Neste mesmo período, os astrócitos dos animais C57BL/6J IFN γ ^{-/-} atingiram um ponto onde a taxa de crescimento se estabilizou (**Fig. 27A**). Ao final de uma semana de cultivo, o número de astrócitos em cultura dos animais selvagens foi superior ao observado nos animais mutantes (C57BL/6J $29,65 \pm 3,8$; C57BL/6J IFN γ ^{-/-} $18,84 \pm 2,0$).

Para reforçar o resultado anterior, utilizou-se o marcador de proliferação celular PCNA que permitiu avaliar melhor as diferenças na taxa de crescimento das duas culturas. O gráfico e as imagens de dupla marcação PCNA/DAPI, demonstram que os animais selvagens apresentaram um número superior de células marcadas com PCNA no decorrer dos dias

analizados. Já nos animais C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ houve um baixo crescimento no segundo dia, mas ao final do experimento o número de células em divisão diminuiu significativamente ($p < 0,01$) (Fig. 27B e 27C).

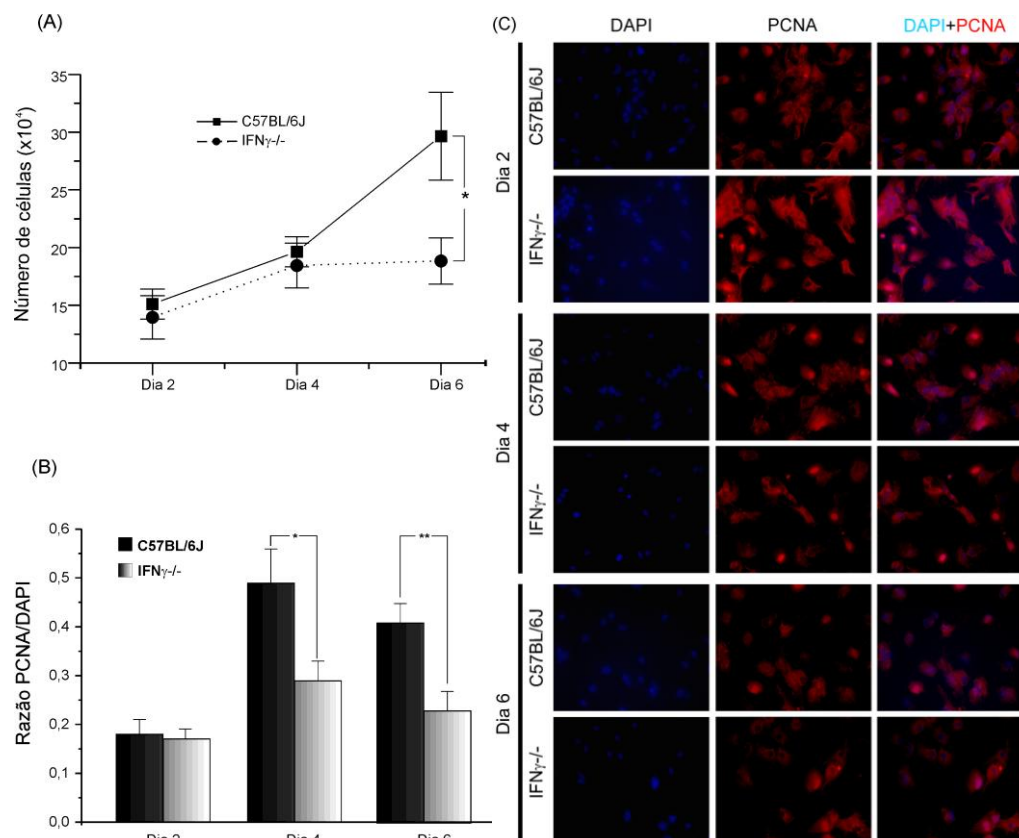


Fig. 27 (A) Gráfico baseado na contagem do número de astrócitos derivados das linhagens C57BL/6J e C57BL/6J $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ durante uma semana de cultivo. (B) Análise quantitativa do número de células positivas para PCNA, em relação ao número total de células marcadas com DAPI. Note que os astrócitos dos animais selvagens apresentam uma taxa de crescimento celular superior ao observado em cultura dos animais mutantes. (C) Imunomarcagem PCNA/DAPI em cultura purificada de astrócitos durante uma semana de cultivo. A imagem indica os dias de cultivo em que foram feitas as contagens. Escala: 50 μm .

6. DISCUSSÃO

A interação dos sistemas imune e nervoso é controlada pela presença da barreira hemato-encefálica. As células imunocompetentes mostram-se prontas para responder a um estímulo seja ele desencadeado por situações de desordem imunológica, infecções ou trauma. O MHC I é um exemplo de molécula que apresenta funções distintas nos sistemas imune e nervoso. Os neurônios têm sido considerados imunoprivilegiados e expressam níveis variáveis do complexo de histocompatibilidade principal do tipo I (MHC I). Assim, a possibilidade de moléculas originalmente envolvidas na resposta imunológica atuarem em eventos de plasticidade sináptica e durante períodos do desenvolvimento do sistema nervoso tem sido um novo alvo de investigação. A expressão do MHC I, por neurônios, durante o desenvolvimento do SNC demonstra sua participação no refinamento e na plasticidade sináptica (Huh *et al.*, 2000). É interessante ressaltar que a expressão de MHC I pode ser modulada por diferentes moléculas, incluindo-se o $\text{IFN}\gamma$, que exerce um importante papel na comunicação neurônio-glia, influenciando na resposta do tecido frente a uma lesão periférica, afetando diretamente a plasticidade sináptica (Oliveira *et al.*, 2004) e a reatividade glial (Lidman *et al.*, 2002; Emirandetti *et al.*, 2006).

A transecção periférica de nervos espinais é um modelo amplamente utilizado no estudo de respostas envolvidas na sobrevivência e reparo neuronal pós-trauma, induzido em animais imaturos e adultos, respectivamente. Este tipo de lesão acarreta em uma série de modificações no microambiente neuronal, levando a alterações sinápticas e no comportamento das células da glia como astrócitos e microglia (Aldskogius *et al.*, 1999). Aliado a isso, ocorre o desencadeamento de uma inflamação local, regulada por moléculas sinal como as citocinas, que participam do processo de recuperação do trauma nervoso (Taskinen *et al.*, 2000). Sendo assim, neste trabalho nós investigamos os efeitos da ausência do $\text{IFN}\gamma$ na resposta à lesão nervosa em camundongos *knockout* para essa molécula. Apresentamos evidências do envolvimento desta citocina no processo de eliminação sináptica e seu papel neuroprotetor em animais adultos.

Estudos mostraram que as células da glia possuem a capacidade de atuar efetivamente durante os eventos de transmissão e plasticidade sináptica (Araque *et al.*, 1999, Araque e

Perea, 2004, Ullian *et al.*, 2004), sendo que, diante de danos sinápticos ou no microambiente neural, estas células respondem tornando-se mais reativas buscando, assim, a homeostase do tecido (Kreutzberg, 1996). Nossos experimentos mostraram que os astrócitos tiveram a sua reatividade aumentada no microambiente próximo aos grandes motoneurônios que projetam seus axônios para o nervo isquiático uma semana após axotomia, mas não houve diferenças significativas entre as linhagens em estudo. Assim como os resultados obtidos por imunohistoquímica, as análises feitas por Western blotting também não mostraram diferenças entre os animais C57BL/6J (selvagem) e IFN γ ^{-/-} (mutante). Mesmo que a ausência do IFN γ não tenha aparentemente alterado a reatividade dos astrócitos, a lesão, além de favorecer a ativação da glia, também induz a entrada de células inflamatórias no SNC, possibilitando um *cross-talk* entre elas, influenciando na plasticidade sináptica nos animais adultos (Ziv *et al.*, 2006). Além disso, como a baixa expressão de MHC I vista nos animais IFN γ ^{-/-} levou a uma menor retração de terminais sinápticos, é possível que os astrócitos ativados auxiliem no processo de eliminação sináptica, modulando a atividade e impedindo a degeneração neural. As observações feitas *in vitro* demonstraram a reatividade dos astrócitos, sendo que o diferencial foi a taxa de proliferação vista nas culturas de astrócitos das duas linhagens. Sabe-se que o IFN γ tem a capacidade de autoregular sua expressão nas células gliais (De Simone *et al.*, 1998) e que é um importante agente mitogênico para astrócitos (Young *et al.*, 1991). Nossos experimentos em cultura mostraram que os astrócitos isolados dos animais mutantes apresentaram um atraso na taxa de proliferação, provavelmente em função da ausência do IFN γ .

Durante os primeiros estágios da lesão, a microglia é o tipo celular que responde mais rapidamente, passando a produzir moléculas neurotróficas como o TGF β (Kreutzberg, 1996; Culheim e Thams, 2007), que exerce um papel importante no início do desenvolvimento do SNC e está envolvido na plasticidade neural de organismos adultos (Chin *et al.*, 2006). Em um segundo momento, a microglia apresenta características fagocíticas importantes para o reparo tecidual (Kreutzberg, 1996). Em nosso estudo, os animais mutantes apresentaram microglia reativa uma semana após axotomia do nervo. Embora as observações qualitativas tenham apontado um maior número de células imuno-marcadas, as comparações feitas quantitativamente não mostraram diferenças significativas na reatividade microglial entre os

grupos estudados. Já as observações ultraestruturais evidenciaram uma marcada presença de células da microglia ao redor de neurônios degenerados encontrados nos animais mutantes, sugerindo uma ação remodeladora destas células no tecido nervoso central destes animais.

A expressão do IFN γ no sistema nervoso central é classicamente associada com a resposta inflamatória após injúria (Taskinen *et al.*, 2000). Neste sentido, esta citocina faz parte da resposta fisiológica do tecido frente um dano tecidual ou trauma. Nestas situações, várias citocinas são produzidas e liberadas pelo infiltrado de células imunes. As células T ativadas podem atravessar a barreira hemato-encefálica e interagir com as células residentes no SNC (Piehl e Lidman, 2001; Kerschensteiner *et al.*, 2009) pela síntese de fatores solúveis, tais como o IFN γ e induzir as células gliais a produzirem moléculas de superfície e mediadores requeridos para a interação entre células imunes e do SN. As células T CD4+, CD8+ e NK são as maiores produtoras de IFN γ (Hanisch, 2002), mas existem evidências de que esta citocina também é produzida no SNC por certos neurônios e células gliais, na ausência da infiltração de células imunes (Hanisch, 2002; Neumann *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). Levando em consideração que neurônios e glia expressam o receptor para IFN γ (Lindå *et al.*, 1988; Neumann *et al.*, 2008), a ação autócrina/parácrina pode ser importante para a resposta à injúria. A capacidade do IFN γ de autoregular sua expressão nos astrócitos e microglia (De Simone *et al.*, 1998) pode contribuir para um aumento da reatividade destas células induzindo a um aumento de expressão da molécula de MHC I (Piehl e Lidman, 2001). Huh e colaboradores (2000) mostraram o envolvimento da expressão de MHC pelos neurônios no refinamento e na plasticidade de conexões no SNC em desenvolvimento e no animal adulto. Em nosso trabalho, as análises feitas por imunohistoquímica *in vivo* mostraram uma expressão reduzida de MHC I nos animais deficientes em IFN γ , em relação aos animais selvagens, que tiveram os níveis de MHC I aumentados em função da lesão. A reduzida expressão de MHC I nos animais mutantes levou a uma diminuição da eliminação dos terminais sinápticos no lado lesionado. A expressão de sinaptofisina mostrou-se superior nos animais mutantes mesmo no lado não lesionado. Como resultado da lesão, houve uma redução da imunomarcagem para sinaptofisina, sendo esta mais acentuada nos animais selvagens. Estes resultados estão de acordo com que foi observado por Huh *et al.* (2000) durante o desenvolvimento do sistema visual de gatos, onde os animais *knockout* para MHC I tiveram uma diminuição da eliminação das sinapses.

Nossos achados sugerem que a mutação gênica foi o fator que interferiu no processo de eliminação sináptica após axotomia nos animais mutantes, reforçando o importante papel do IFN γ durante o desenvolvimento embrionário (Mousa *et al.*, 1999) e ao longo da vida (Lee *et al.*, 2006).

Estudos mostraram que após axotomia, em animais adultos, a morte neuronal é baixa ou mesmo nula, ao passo que a axotomia feita em neonatos leva a morte neuronal e, ao mesmo tempo, a atrofia dos MNs sobreviventes (Li *et al.*, 1998). Sendo assim, buscamos observar se ausência do IFN γ em animais adultos submetidos à axotomia periférica levaria a alterações nos corpos dos neurônios localizados na lâmina IX da medula espinal lombar. Interessantemente, foram encontrados neurônios com morfologia alterada mesmo no lado não lesionado dos animais mutantes e a axotomia, por si só, não piorou o processo degenerativo. Estes achados sugerem que a expressão do IFN γ é necessária para a sobrevivência dos neurônios presentes no corno ventral da medula espinal. Além disso, a observação de alterações nos circuitos sinápticos dos neurônios analisados pode indicar a necessidade da presença desta citocina durante o desenvolvimento e manutenção da homeostase sináptica no núcleo motor. É possível que o IFN γ estimule, de forma parácrina, a expressão do MHC I pelos neurônios (Olsson *et al.*, 1989; Neumann *et al.*, 1997; Neumann *et al.*, 2008), influenciando assim, um contínuo refinamento e ajustes das sinapses que ocorrem nos circuitos medulares ao longo da vida.

Neste trabalho também analisamos a degeneração neural a partir da microscopia de luz e análise ultraestrutural. Os motoneurônios encontrados no corno ventral da medula espinal exibiram um menor tamanho de corpo celular nos animais mutantes, mesmo no lado sem lesão. Além disso, os animais mutantes demonstraram uma maior proporção de neurônios em degeneração no corno ventral comparado aos animais selvagens. As análises mostraram que a morte neuronal pode ser fortemente atribuída à ausência da expressão do gene do IFN γ , uma vez que o número de células degeneradas não aumentou com a axotomia.

Estudos prévios demonstraram que mediadores solúveis, tais como certas citocinas, podem exercer um papel protetor no sistema nervoso após lesão (Correale e Villa, 2004; Kerschensteiner *et al.*, 2009). Neste sentido, recentes estudos tem mostrado evidências da função protetora do IFN γ nas células neurais após infecções virais (Richter *et al.*, 2009), e sua

ação neuroprotetora contra excitotoxicidade (Lee *et al.*, 2006). Em animais adultos, o IFN γ já foi associado com a melhora da performance cognitiva (Baron *et al.*, 2008).

A análise ultraestrutural mostrou um menor número de terminais em contato com membrana dos motoneurônios dos animais mutantes, mas, ao mesmo tempo, não foram observadas diferenças estatísticas na cobertura sináptica entre os animais mutantes e selvagens. Estes dados sugerem que a ausência do IFN γ levou à manutenção dos contatos sinápticos entre os terminais e a membrana dos motoneurônios mesmo após lesão. Outras mudanças ultraestruturais foram observadas nos neurônios localizados no corno ventral da medula espinal dos camundongos mutantes. O aparecimento de vacúolos no citoplasma, fragmentação nuclear e um encolhimento celular evidenciam a morte de alguns neurônios por apoptose. Além disso, observou-se um reduzido número de neurônios que apresentaram características de degeneração por necrose. Ao redor destas células em degeneração, foram encontradas células gliais, na maioria microglia e no seu interior pôde-se notar a presença de vacúolos com material celular. É importante enfatizar a possibilidade do aparecimento de células com formas morfológicas intermediárias variando entre padrões apoptóticos e necróticos (Portera-Cailliau *et al.*, 1997a e b; Li *et al.*, 1998; Zeng e Xu, 2000), o que mostra que ambos os caminhos podem coexistir após injúria ou durante a degeneração celular.

A lesão periférica resulta em uma série de alterações locais, nos cotos proximal e distal, promovendo o recrutamento de macrófagos durante a evolução do processo da degeneração Walleriana. O trauma leva a uma resposta inflamatória, regulada por diferentes moléculas, como as citocinas. Taskinen *et al.*, (2000) analisando nervo de animais submetidos à transecção do nervo isquiático, observaram a presença de RNAm para IL-10, TNF α , bem como para IFN γ , em diferentes tempos após a lesão. O que ainda não se sabe é qual o papel efetivo destas citocinas durante o processo de regeneração nervosa. Em nosso estudo, a contagem do número de fibras encontradas nas linhagens não mostrou alterações significativas entre os grupos analisados. Por outro lado, pôde-se notar uma aumentada expressão de p75NGFR pelas células de Schwann que são responsáveis, juntamente com os macrófagos, pela fagocitose de resíduos axonais e mielínicos. Aliado a isso, a maior reatividade para neurofilamentos no seguimento distal do nervo dos animais mutantes sugere uma mais rápida e melhor qualidade da regeneração após esmagamento, influenciando positivamente na

recuperação funcional do animal. A avaliação motora mostrou uma melhora mais eficiente da inervação axonal nos animais mutantes, embora esses animais tenham demonstrado suportar o peso do corpo sobre a pata lesionada da mesma forma que os animais selvagens. Nossos resultados demonstraram que a ausência do IFN γ não prejudicou a recuperação motora dos animais mutantes após esmagamento do nervo. Possivelmente outros caminhos inflamatórios possam ter sido ativados durante a degeneração Walleriana, compensando assim a ausência do IFN γ nestes animais.

Como mostrado em nossos resultados, a ausência do IFN γ teve maior impacto no SNC, possivelmente porque o SNP possui capacidade regenerativa superior em comparação ao SNC. Tal fato pode estar relacionado a reduzida capacidade de resposta no microambiente do tecido injuriado do SNC, o que resulta em uma resposta inflamatória insuficiente para a recuperação eficaz do tecido (Correale e Villa, 2004).

No presente estudo, reforçamos a idéia de um adicional papel da expressão do IFN γ , participando da homeostase dos circuitos sinápticos durante o decorrer da vida (Vikman et al., 2000; Brask et al., 2004). Isto pode estar ligado ao envolvimento de moléculas imunes nos processos de plasticidade sináptica como, por exemplo, o MHC I (Piehl e Lidman, 2001). A regulação destas moléculas, incluindo-se o IFN γ , parece afetar a arquitetura do sistema nervoso. A ausência destes elementos pode levar a degeneração neural ou mesmo a perda da função. Outros estudos serão necessários para um melhor entendimento dos mecanismos acima descritos, buscando novas estratégias para o tratamento de lesões e degeneração no sistema nervoso.

7. CONCLUSÕES

- I. A reatividade glial não foi afetada nos animais mutantes, embora células microgliais reativas tenham sido visualizadas através do estudo ultraestrutural, denotando uma elevada atividade fagocítica ao redor de neurônios degenerados na ausência do IFN γ ;
- II. A ausência do IFN γ reduziu a taxa de proliferação de astrócitos *in vitro*, o que indica sua importância para a homeostase desse tipo celular;
- III. A reduzida expressão de MHC I nos animais mutantes levou a diminuição da eliminação de terminais sinápticos ao redor dos motoneurônios lesionados. Tal fato reforça o papel do IFN γ como modulador da expressão de MHC I e sua importância nos processos de remodelamento sináptico durante o desenvolvimento e ao longo da vida;
- IV. Os animais mutantes apresentaram um elevado número de neurônios atrofiados e com alterações características de apoptose, sugerindo um papel neuroprotetor do IFN γ ;
- V. A ausência do IFN γ não prejudicou a recuperação funcional dos animais mutantes em comparação aos animais selvagens, após esmagamento do nervo isquiático;
- VI. Os microambientes do SNC e do SNP responderam de forma diferente na ausência de IFN γ .

8. REFERÊNCIAS

- Abercrombie, M., Johnson, M. L. (1946). Quantitative histology of Wallerian degeneration: Nuclear population in rabbit sciatic nerve. *J. Anat.* 80: 37-50.
- Aldskogius, H., Liu, L., Svensson, M. (1999). Glial responses to synaptic damage and plasticity. *J. Neurosci. Res.*, 58: 33-41.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.*, 22: 208-215.
- Araque, A., Perea, G. 2004. Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia*, 47: 241-248.
- Baron, R., Nemirovsky, A., Harpaz, I., Cohen, H., Owens, T., Monsonego, A. (2008). IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*, 22(8): 2843-52.
- Benveniste, E.N., Benos, D.J. (1995). TNF alpha and IFN gamma-mediated signal transduction pathways: effects on glial cell gene expression and function. *FASEB J*, 9(15): 1577-1584. Review.
- Blinzinger, K., Kreutzberg, G. (1968). Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z. Zellforsch Mikrosk Anat.*, 85(2): 145-57.
- Boulanger, L.M., Huh, G. S., Shatz, C. J. (2001). Neuronal plasticity and cellular immunity: shared molecular mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11(5): 568-78.
- Boulanger, L.M., Shatz, C.J. (2004). Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci.*, 5(7): 521-31.

Brännström, T., Kellerth, J. O. (1998). Changes in synaptology of adult cat spinal alpha-motoneurons after axotomy. *Exp. Brain Res.*, 118: 1-13.

Brask, J., Kristensson, K., Hill, R.H. (2004). Exposure to interferon-gamma during synaptogenesis increases inhibitory activity after a latent period in cultured rat hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 19(12): 3193-201.

Burke, R.E., Strick, P.L., Kanda, K., Kim, C.C., Walmsley, B. (1997). Anatomy of medialgastrocnemius and soleus motor nuclei in cat spinal cord. *J. Neurophysiol.*, 40: 667-680.

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

Chin, J., Liu, R.Y., Cleary, L.J., Eskin, A., Byrne, J.H. (2006). TGF-beta1-induced long-term changes in neuronal excitability in aplysia sensory neurons depend on MAPK. *J. Neurophysiol.* 95(5): 3286-3290.

Chvatal, A., Sykova, E. (2000). Glial influence on neuronal signaling. *Prog. Brain Res.*, 125: 199-216.

Conradi, S. (1969). Ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in the lumbosacral spinal cord of the adult cat. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 332: 5-48.

Correale, J., Villa, A. (2004). The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J. Neurol.*, 251: 1304-1306.

Corriveau, R.A., Huh, G.S., Shatz, C.J. (1998). Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron*, 21(3): 505-520.

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

Cullheim, S., Thams, S. (2007). The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Res. Rev.*, 8: 1-8.

De Medinaceli, L., Freed, W. Wyatt, R. (1982). An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.*, 77: 634-643.

De Simone, R., Levi, G., Aloisi, F. (1998). Interferon- γ gene expression in rat central nervous system glial cells. *Glia*, 10(6): 418-422.

Derouiche, A., Frotsher, M. (2001). Peripheral astrocyte processes: monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. *Glia*, 36: 330-341.

Emirandetti, A., Zanon, R.G., Sabha, M., Oliveira, A.L.R, (2006). Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. *Brain Research*, 1095(1): 35-42.

Fadel, S., Sarzotti, M. (2000). Cellular immune responses in neonates. *Int. Rev. Immunol.*, 19(2-3): 173-93. Review.

Hamburger, V. (1958). Regression versus peripheral control of differentiation on motor hypoplasia. *Am. J. Anat.*, 102: 365-409.

Hammarberg, H., Wallquist, W., Piehl, F., Risling, M., Cullheim, S. (2000). Regulation of laminin-associated integrin subunit mRNAs in rat spinal motoneurons during postnatal development and after axonal injury. *J. Comp. Neurol.*, 428: 294-304.

Hanisch, U.K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40(2): 140-55. Review.

Hinkerohe, D., Smikalla, D., Haghikia, A., Heupel, K., Haase, C. G., Dermietzel, R., Faustmann, P. (2005). Effects of cytokines on microglial fenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model. *Glia*, 52: 85–97.

Huh, G.S., Boulanger, L.M., Du, H., Riquelme, P.A., Brotz, T.M., Shatz, C.J. (2000). Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science*, 290(5499): 2155-2159.

Ichiyama, R.M., Broman, J., Edgerton, V. R., Havton, L. A. (2006). Ultrastrutural synaptic features differ between α - and γ - motoneurons innervation the tibialis anterior muscle in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 499: 306-315.

Inserra, M. M., Bloch, D. A., Terris, D. J. (1998). Functional indices for sciatic, peroneal, posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery*, 18: 119-124.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T. M. (2000). *Principles of Neural Science*, 4th Edition: McGraw-Hill.

Kerschensteiner, M., Meinel, E., Hohlfeld, R. (2009). Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience*, 158(3): 1122-1132.

Kettenmann, H., Ransom, B.R. (1995). *Neuroglia* Oxford Univ. Press, Oxford, UK.

Kreutzberg, W.G. (1996). Microglia: sensor for pathological events in the SNC. *Trends Neurosci.*, 19: 312-318.

Lee, J., Kim, S.J., Son, G.T., Chan, S. L., Mattson, M. P. (2006). Interferon- γ is up-regulated in the hippocampus in response to intermittent fasting and protects hippocampal neurons against excitotoxicity. *J. Neurosci. Res.*, 83: 1552-1557.

Li, L., Houenou, L. J., Wu, W., Lei, M., Prevette, D. M., Oppenheim, R. W. (1998). Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral injury in neonatal and adult mice. *J. Comp. Neurol.*, 396: 158-168.

Li, L., Walker, T. L., Zhang, Y., Mackay, E.W., Bartlett, P. F. (2010). Endogenous interferon directly regulates neural precursors in the non-inflammatory brain. *J. Neurosci.*, 30(27): 9038–9050

Lidman, O., Fraidakis, M., Lycke, N., Olson, L., Olsson, T., Piehl, F. (2002). Facial nerve lesion response; strain differences but no involvement of IFN-gamma, STAT4 or STAT6. *Neuroreport*, 13(13): 1589-1593.

Linda, H., Hammarberg, H., Cullheim, S., Levinovitz, A., Khademi, M., Olsson, T. (1997). Expression of MHC class I and β -microglobulin in rat spinal motoneurons: regulatory influences by INF-gamma and axotomy. *Exp. Neurol.*, 150: 282-295.

Lindå, H., Piehl, F., Dagerlind, A., Verge, V.M., Arvidsson, U., Cullheim, S., Risling, M., Ufhake, B., Hokfelt, Y. (1992). Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different type o lesions, with special reference to motoneurons. *Exp. Brain. Res.*, 91: 284-295.

Lindå, H., Shupliakov, O., Ornung, G., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., Risling, M., Cullheim, S. (2000). Ultrastructural evidence for a preferential elimination of glutamate-immunoreactive synaptic terminals from spinal motoneurons sfter intramedullary axotomy. *J. Comp. Neurol.*, 425(1): 10-23.

Lu, L., Richardson, P.M., Gervais, Skamene, E. (1990). A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6J mice. *Brain Res.*, 510: 144-146.

Lu, X., Skamene, E., Richardson, P.M. (1994). Studies of axonal regeneration in C57BL/6J mice. *Brain Res.*, 652: 174-176.

Moran, L. B., Graeber, M.B. (2004). The facial nerve axotomy model. *Brain Res. Rev.*, 44 (2-3): 154-78. Review.

Mousa, A., Seiger, A., Kjaeldgaard, A., Bakhtiet, M. (1999). Human first trimester forebrain cells express genes for inflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Cytokine*, 11(1): 55-60.

Neumann, H (1997). Control of glial immune functions by neurons. *Glia*, 36: 191-199.

Neumann, H., Schmidt, H., Wilharm, E., Behrens, L., Wekerle, H. (2008). Interferon gamma gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. *J. Exp. Med.*, 186(12): 2023-2031.

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

Oliveira, A. L. R., Risling, M., Negro, A., Langone, F., Cullheim, S. (2001). Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by NGF and CNTF. *J. Comp. Neurol.*, 447: 381-393.

Oliveira, A.L.R., Thams, S., Lidman, O., Piehl, F., Hokfelt, T., Karre, K., Linda, H., Culheim, S. (2004). A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *PNAS*, 101 (51): 17843-17848.

Olsson, T., Piehl, F., Swanberg, M., Lidman, O. (2005). Genetic dissection of neurodegeneration and CNS inflammation. *J. Neurol. Sci.*, 233(1-2):99-108.

Olsson, T., Kristensson, K., Ljungdahl, Å., Maehlen, J., Holmdahl, R., Klareskog, L. (1989). Gamma-interferon-like immunoreactivity in axotomized rat motor neuron. *J. Neurosci.*, 9(11): 3070-3875.

Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during the development of the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.*, 14: 453-501.

Perea, G., Araque, A. (2006). Synaptic information processing by astrocytes. *J. Physiol. Paris*, 99(2-3): 92-97. Review.

Piehl, F., Arvidsson, U., Johnson, H., Cullheim, S., Dagerling, A., Ulfhake, B., Cao, Y., Elde, R., Pettersson, R.F., Terenius, L. (1993). GAP-43, aFGF, CCK and alpha-and beta-CGRP in rat spinal motoneurons subjected to axotomy and/or dorsal root severance. *Eur. J. Neurosci.*, 5: 1321-1333.

Piehl, F., Hammarberg, H., Tabar, G., Hokfelt, T., Cullheim, S. (1998). Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat motoneurons depends on age and type of injury. *Exp. Brain Res.*, 119: 191-204.

Piehl, F., Lidman, O. (2001). Neuroinflammation in the rat- CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. *Immunol. Reviews*, 181: 212-225.

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

Piet, R., Vargová, L., Syková, E. Poulain, D.A., Oliet, S.H. (2004). Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101(7): 2151-5.

Portera-Cailliau, C., Price, D.L., Martin, L.J. (1997a). Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J. Comp. Neurol.*, 378: 70-87.

Portera-Cailliau, C., Price, D.L., Martin, L.J. (1997b). Non-NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: Further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J. Comp. Neurol.*, 378: 88-104.

Purves, D., Lichtman, J. W. (1978). Formation and maintenance of synaptic connections in autonomic ganglia. *Physiol. Rev.*, 58(4): 821-862. Review

Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 96: 415-496.

Richter, K., Hausmann, J., Staeheli, P. (2009). Interferon- γ prevents death of bystander neurons during CD8 T cell responses in the brain. *Am. J. Pathol.*, 174(5): 1799-807.

Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncel, R.W. (1994). Localization of neural and glial glutamate transporters. *Neuron*, 13(3): 713-725.

Rao, S.D., Yin, H.Z., Weiss, J.H. (2003). Disruption of Glial Glutamate Transport by Reactive Oxygen Species Produced in Motor Neurons. *J. Neurosci.*, 23(7): 2627–2633.

Sabha, M.Jr., Emirandetti, A., Cullheim, S., Oliveira, A.L.R. (2008). MHC I expression synaptic plasticity in different mice strains after axotomy. *Synapse*, 62: 137-148.

Scemes, E., Giaume, C. (2006). Astrocyte calcium waves: What they are and what they do. *Glia*, 54(7): 716-725.

Slezak, M., Pfrieder, F.W., Soltys Z. (2006). Synaptic plasticity, astrocytes and morphological homeostasis. *J. Physiol. Paris*, 99(2-3): 84-91.

Taskinen, H.S., Olson, T., Bucht, A., Khademi, M., Svelander, L., R  ytt  , M. (2000). Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN-  , IL-10 and TNF-   mRNA. *J Neuroimmunol.*, 102: 17-25.

Ullian, E., Christopherson, K., Barres, B. (2004). Role of glia in synaptogenesis. *Glia*, 47: 209-216.

Vandenbranden, C.A.V., Verweij, J., Kamermans, M., M  ller, L.J.J.M., Ruijter, J.M., Vrensen, G.F.J.M., Spekrijse, H. (1996). Clearance of neurotransmitter from the cone synaptic cleft in goldfish retina. *Visual Res.*, 36: 3859-3874.

Vikman, K. S., Owe-Larsson., B., Brask, J., Kristensson, K.S., Hill, R. (2001). Interferon-  -induced changes in synaptic activity and AMPA receptor clustering in hippocampal cultures. *Brain Res.*, 896: 18-29.

Wang, Y., Zhou, C.F., (2005). Involvement of interferon-gamma and its receptor in the activation of astrocytes in the mouse hippocampus following entorhinal deafferentation. *Glia*, 50(1): 56-65.

Wekerle, H. (2005). Immune pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurol Sci.*, 26 Suppl 1:S1-S2.

Wong, G., Goldshmit, Y., Turnley, A.M. (2004). Interferon- γ but not TNF α promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells. *Exp. Neurol.*, 187: 171-177.

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

Young, V. W., Moumdjian, R., Yong, F. P, Ruijs, T. C.G., Freedman, M. S., Cashman, N., Antely, J. P. (1991). γ - Interferon promotes proliferation of adult human astrocytes *in vitro* and reactive glioses in the adult mouse brain *in vivo*. *Neurobiology*, 88: 7016-7020.

Zanon, R.G., Oliveira, A.L.R. (2006). MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord nerve sciatic nerve transection. *Exp. Neurol.*, 200(2):521-531.

Zeng, Y-S., Xu, Z.C. (2000). Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neurosci. Res.* 37: 113-125.

Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J., Schwartz, M. (2006). Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nature Neurosci.*, 9 (2): 268-275.

9. ANEXO

Artigo: **“Absence of IFN γ expression induces neural degeneration in the spinal cord of adult mice”**, publicado na revista *Journal of Neuroinflammation*.

RESEARCH

Open Access

Absence of IFN γ expression induces neuronal degeneration in the spinal cord of adult mice

Sheila CS Victório¹, Leif A Havton², Alexandre LR Oliveira^{1*}

Abstract

Background: Interferon gamma (IFN γ) is a pro-inflammatory cytokine, which may be up-regulated after trauma to the peripheral or central nervous system. Such changes include reactive gliosis and synaptic plasticity that are considered important responses to the proper regenerative response after injury. Also, IFN γ is involved in the upregulation of the major histocompatibility complex class I (MHC class I), which has recently been shown to play an important role in the synaptic plasticity process following axotomy. There is also evidence that IFN γ may interfere in the differentiation and survival of neuronal cells. However, little is known about the effects of IFN γ absence on spinal cord neurons after injury.

Methods: We performed a unilateral sciatic nerve transection injury in C57BL/6J (wild type) and IFN γ -KO (mutant) mice and studied motoneuron morphology using light and electron microscopy. One week after the lesion, mice from both strains were sacrificed and had their lumbar spinal cords processed for histochemistry (n = 5 each group) and transmission electron microscopy (TEM, n = 5 each group). Spinal cord sections from non-lesioned animals were also used to investigate neuronal survival and the presence of apoptosis with TUNEL and immunohistochemistry.

Results: We find that presumed motoneurons in the lower lumbar ventral horn exhibited a smaller soma size in the IFN γ -KO series, regardless of nerve lesion. In plastic embedded sections stained with toluidine blue, the IFN γ -KO mice demonstrated a greater proportion of degenerating neurons in the ventral horn when compared to the control series (p < 0.05). Apoptotic death is suggested based on TUNEL and caspase 3 immunostaining. A sciatic nerve axotomy did not further aggravate the neuronal loss. The cellular changes were supported by electron microscopy, which demonstrated ventral horn neurons exhibiting intracellular vacuoles as well as degenerating nuclei and cytoplasm in the IFN γ -KO mice. Adjacent glial cells showed features suggestive of phagocytosis. Additional ultrastructural studies showed a decreased number of pre-synaptic terminals apposing to motoneurons in mutant mice. Nevertheless, no statistical difference regarding the input covering could be detected among the studied strains.

Conclusion: Altogether, these results suggest that IFN γ may be neuroprotective and its absence results in neuronal death, which is not further increased by peripheral axotomy.

Background

Transection of a peripheral nerve results in a complex retrograde reaction in the spinal cord, involving motoneurons, glia and immune cells. Lesioned nerve cells signal to pre-synaptic terminals leading to an intense rearrangement of synapses. The precise mechanisms

behind such synaptic plasticity are not clearly understood, although certain molecules certainly influence the process. One of these molecules is the major histocompatibility complex of class I (MHC I), that is vigorously upregulated in spinal motoneurons in the acute phase following peripheral axotomy. Importantly, interferon gamma (IFN γ), a pro-inflammatory cytokine, is the most potent inducer of MHC I expression and is upregulated in the CNS after injury [1,2]. It is also present at elevated levels during the course of autoimmune diseases,

* Correspondence: alroliv@unicamp.br

¹Department of Anatomy, Cell Biology, Physiology and Biophysics, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

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

such as the multiple sclerosis, and in chronic neurodegenerative diseases [3,4].

CD4⁺, CD8⁺ T and natural killer (NK) cells are the major source of IFN γ [5], but there is evidence [5] that this cytokine is produced within the nervous system by neurons and glial cells, in the absence of infiltrating immune cells. Taking into account that the IFN γ receptor is detected in neurons and glial cells [2,6], auto/paracrine roles may be of relevance to the response to injury.

The rearrangement of synaptic inputs to motoneurons following peripheral axotomy has been investigated for several years. It has been proposed that the initial loss of synapses, observed within the first week post lesion, may represent a neuronal strategy to survive the transection of the axon as well as to avoid excitotoxicity by glutamate. Also, it is possible that such partial disconnection from the spinal network may facilitate the regenerative process, since cytoskeleton proteins, such as protein-43 (GAP43) and neurofilaments, are actively synthesized. In this regard, we have demonstrated that the increase of synaptic retraction in spinal motoneurons by exogenous treatment with interferon beta correlates to a faster and more effective axonal regeneration in C57BL/6J mice [7]. The enhancement of synaptic plasticity after IFN beta treatment was linked to an increased astroglial reaction, as seen both *in vivo* and *in vitro* and with an upregulation of MHC I by motoneurons and astrocytes [8]. It is possible, in this way, that the absence or interference in the level of certain molecules, such as cytokines and neurotrophic factors, may directly alter the neuronal response to injury and ultimately influence the survival and regeneration process [9].

Although pro-inflammatory cytokines function as a mediator in the pathogenesis of the inflammatory lesion or work cooperatively to promote neuronal death [10], some evidence for beneficial properties of IFN γ has recently emerged. Temporal expression of IFN γ may suggest an important function during the development [6] and also to be needed during regenerative events after trauma [11]. IFN γ has been shown to control phosphorylation and the nuclear translocation of STAT 1, to regulate MHC class I gene expression [6,12], and to influence neuronal excitability by inducing the expression of the peripheral nerve-type sodium channel gene PN1 [13]. Moreover, the absence of IFN γ in deficient mice induced the death of hippocampal CA1 neurons after virus infection, suggesting a neuroprotective role of IFN γ in the brain [14].

Nevertheless, little is known about the effects of the absence of IFN γ on spinal cord neurons and spinal circuits in neurologically intact subjects and after nerve injury. Here, we studied the effects of a sciatic nerve transection injury on spinal motoneuron morphology in IFN γ -KO mice using light and transmission electron microscopy.

We show herein that presumed motoneurons in the lower lumbar ventral horn exhibited a smaller soma size in the IFN γ series, regardless of nerve lesion. Also, the IFN γ mice demonstrated a greater proportion of degenerating neurons in the ventral horn when compared to the control series.

Methods

Animals

Adult male C57BL/6J (wild type - wt) and C57BL/6J IFN γ -KO (mutant) mice (n = 15 each strain), 6-8 weeks old, were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigation (CEMIB/Unicamp) and housed under a 12-h light/dark cycle with free access to food and water. The Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation approved the study (CEEA/IB/Unicamp, proc. 1172-1), and the experiments were carried out in accordance with the guidelines of Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). In the present study, mice from both strains (n = 10 each) were subjected to unilateral sciatic nerve transection and kept alive for one week. The distribution of motoneurons in lamina IX was analyzed based on the frequency distribution of soma size. Also, we investigated a series of morphological changes present in motoneurons from IFN γ -KO mice. In all cases, the contralateral side of the spinal cord was used as control. In order to assess if the absence of IFN γ affects the surviving motoneurons, a group of unlesioned animals was also used (n = 5 for each strain).

Surgical procedures and tissue preparation

The mice were anesthetized with a mixture of Kensol (xylasin, Köning, 10 mg/kg) and Vetaset (Cetamin, Fort Dogde, 50 mg/kg, 1:1, 0.12 mL/25 g, i.p.) and were subjected to a left sciatic nerve transection at the level of the obturator tendon. A 2 mm-long segment of the distal stump was removed to avoid regeneration. The muscular and the skin planes were sutured, and the animals were kept in the animal housing facility for one week. All the animals were then sacrificed with an overdose of anesthetic and subjected to trans-cardiac perfusion with 0.1 M PBS (20 mL, pH 7.4) and fixed with 10% formaldehyde in PBS for Nissl staining, immunohistochemistry and TUNEL analysis (animals without surgery) or with Karnovsky solution (2.5% glutaraldehyde and 0.5% paraformaldehyde in phosphate buffer pH 7.4) for electron microscopy (animals with surgery). The lumbar portion of the spinal cord was removed and frozen or embedded in resin.

Cell count procedures

The lumbar spinal cord from unlesioned mice was frozen in liquid nitrogen at -40°C for cryostat sectioning (12 μ m). The sections were transferred to gelatine-coated

slides, which were stained for 5 min in an aqueous 1% cresyl fast violet at 50°C. The tissue was dehydrated and mounted in entellan. Neurons localized in the ventral horn (lamina IX) were counted in every fourth section (20 sections/animal in each group). Only cells with a visible nucleus and nucleolus were counted. Bilateral counts were made in sections from the lumbar intumescence in each animal. The absolute and relative number of ventral horn degenerating neurons per section in each group were used to calculate the mean number of surviving cells per experimental group. To correct for any variation in neuronal size between groups, the Abercrombie's formula [15] was used:

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

Where N is the corrected number of counted neurons, n is the counted number of cells, t is the thickness of the section (12 µm) and d is the average diameter of the cells. Since neuronal size significantly affects cell counts, the value of d was calculated specifically for each experimental group. For this purpose, the diameter of 15 randomly picked neurons from each group was measured using Image Tool software (Version 3.0, The University of Texas Health Center in Santo Antonio, TX, USA) and the mean value calculated.

Immunohistochemistry

Spinal cord sections were obtained and incubated in TBS-T with 3% BSA at room temperature for 30 minutes. In sequence, the specimens were incubated overnight, at 4°C in a moist chamber, with a rabbit anti-cleaved caspase-3 antibody (1:400; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). After that, the slides were washed 3 times in Tris buffer plus 0.2% Tween (TBS-T), and blocked in TBS-T with 3% BSA at room temperature. The sections were then incubated with a CY3-conjugated secondary antibody (1:250) from Jackson ImmunoResearch (Bar Harbor, ME, USA) for 1 h in a moist chamber at room temperature. The slides were then rinsed in TBS-T, mounted in a mix of glycerol/PBS (3:1), observed and documented under a fluorescence microscope (Eclipse TS100, Nikon, Tokio, Japan) equipped with a digital camera (DXM1200F, Nikon, Tokio, Japan).

Staining of apoptotic cells (TUNEL)

Frozen spinal cord sections from unlesioned animals were post-fixed in ethanol/acetic acid (2:1) for 5 min at -20°C and rinsed twice for 5 min in PBS. The slides were transferred to a humidified chamber and the equilibration buffer solution was applied (Oncor, s7110-1) and incubated for 5 min at room temperature (RT). The equilibration buffer was shaken off and the TdT enzyme

solution (Oncor, s7110-2 and 3) was applied for 60 min at 37°C. The reaction was stopped with the stop/wash solution (Oncor, s7110-4) for 30 min at 37°C. After washing in PBS for 10 min, the sections were incubated with the fluorescein solution (Oncor, s7110-5 and 6) for 30 min. The slides were rinsed in PBS and mounted with glass coverslips in a mix of glycerol/PBS (3:1) solution. Images were obtained using a fluorescence microscope (Eclipse TS100, Nikon, Tokio, Japan) equipped with a digital camera (DXM1200F, Nikon, Tokio, Japan).

Morphometric analysis

The lumbar spinal cords were dissected out and stored overnight in fixative at 4°C. The specimens were then osmicated, dehydrated and embedded in Durcupan (Fluka). Serial transverse sections (55-60 nm) from L4-L6 segments were obtained by using a PowerTome X ultramicrotome (RMC Products, Boeckeler Instruments, Tucson, AZ). Ultrathin sections were collected and stained with toluidine blue. For morphometric analysis, bilateral ventral horns of two sections from each lumbar spinal cord were photographed with Micropublisher 5 megapixel digital camera (Q Imaging, Burnaby, BC) attached to a Nikon E600 microscope and only the motoneurons present in lamina IX and cut at the nuclear plane were included in the analysis. The mean soma diameter was calculated with the C-Imaging software (Compix Inc., Sewickley, PA) as the average between the longest soma diameter and the longest perpendicular diameter. These measurements were used to assess the size distribution pattern for spinal motoneurons in the animals studied.

To analyze the response of IFN γ -KO neurons to axotomy, only those cells in lamina IX, sectioned at the nuclear plane, were counted and classified with regards to cellular morphology. Neurons darkly stained, which exhibited shrinkage of cytoplasm and signs of vacuolization, were classified as degenerating cells. The number and percentage of presumed motoneurons showing light microscopic features of degeneration in each section was obtained.

Electron microscopy

The ventral horn area containing motoneurons in lamina IX was trimmed and ultrathin sections from L4-L6 segments were collected on formvar-coated copper grids, counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and examined in a Tecnai G2 Spirit Twin (FEI, Hillsboro, OR) transmission electron microscope operated at 80 kV. Neurons were photographed using an attached, side mounted, Gatan Orius SC1000B digital camera (Gatan, Inc, Pleasanton, CA) under different magnifications, and the digital images were used for ultrastructural analysis. Neurons with a large cell body

($\geq 35 \mu\text{m}$ in diameter) found in the sciatic motoneuron pool and cut at the nuclear plane, were identified as alpha motoneurons by the presence of C-type boutons. For qualitative classification of bouton types, serial images of the entire soma membrane length were mounted sequentially using the Adobe Photoshop software. Boutons were classified into three different synaptic types [16]: F-type (with flattened synaptic vesicles), S-type (with spherical synaptic vesicles) and C-type (with subsynaptic cistern). For each neuron, we calculated the number of synaptic terminals per 100 μm of cell membrane and the percent of membrane length covered by terminals using the measurement tool of the Image Tool software. The distance between consecutive nerve terminals covering the neurons was also determined. A total of 40 alpha-motoneurons (2 neurons per animal in two groups of five animals: C57BL/6J unlesioned/lesioned side, IFN γ -KO unlesioned/lesioned side) were analyzed.

Statistical analysis

All quantitative data are presented as mean $\pm$ SEM, and differences between groups were considered significant when the P-value was < 0.05 (*). Statistical analysis was performed by using analysis of variance (ANOVA) with Holm-Sidak method (Sigmapstat 3.1, Systat software, Inc., Point Richmond, CA) for parametric data or Mann-Whitney U test for non-parametric data.

Results

In the present study, we analyzed the size distribution and morphological characteristics of neurons localized in lamina IX of the lumbar spinal cord from adult C57BL/6J (wild type) and IFN γ -KO (mutant) mice subjected to left sciatic nerve transection. Histochemical processing allowed for initial light microscopic analysis of sections depicting neurons within the ventrolateral horn. The light microscopy sections containing such presumed motoneurons were subsequently processed for ultrastructural analysis.

Morphometric changes in the absence of IFN γ

The quantitative data of the analyzed cells are shown in Figure 1. The mean diameter of neuronal somata ranged from 10.94 μm to 55.78 μm . The neurons demonstrated a bimodal size distribution in the wild type unlesioned side, with the mean cell body diameter exhibiting a trough at 30–35 μm and modes at 18 μm and 36 μm . On the lesioned side, the shape of the size distribution was altered and appeared as a non-bimodal distribution. Both the lesioned and unlesioned sides of the mutant mice showed the presence of only one peak with a mean soma diameter at 18 μm . The neuronal soma size in the mutant animals was smaller than corresponding

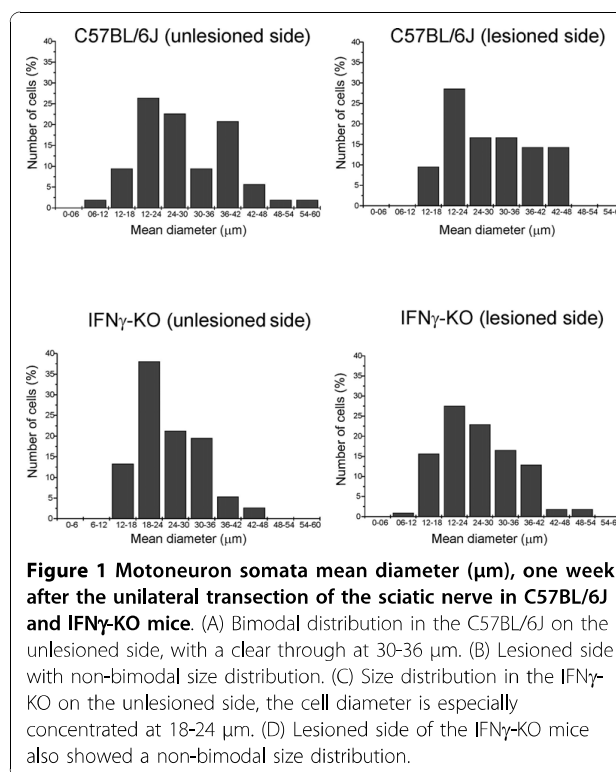


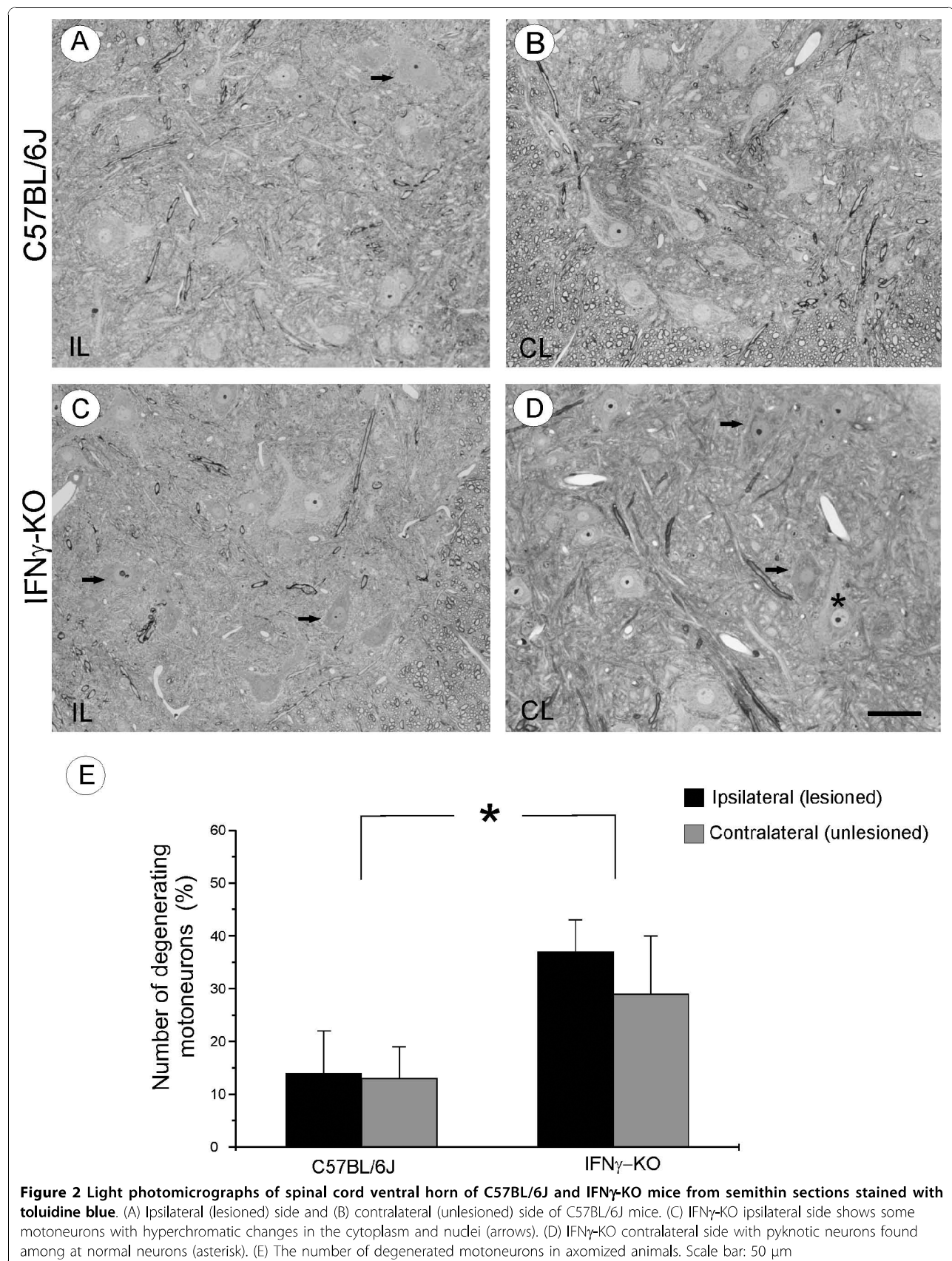
Figure 1 Motoneuron somata mean diameter (μm), one week after the unilateral transection of the sciatic nerve in C57BL/6J and IFN γ -KO mice. (A) Bimodal distribution in the C57BL/6J on the unlesioned side, with a clear trough at 30–36 μm . (B) Lesioned side with non-bimodal size distribution. (C) Size distribution in the IFN γ -KO on the unlesioned side, the cell diameter is especially concentrated at 18–24 μm . (D) Lesioned side of the IFN γ -KO mice also showed a non-bimodal size distribution.

measurements in the wild type. The statistical analysis thus showed that the differences in cell diameter values were significantly influenced by the gene mutation ($p < 0.05$), but it was not further altered by the peripheral lesion in mutant mice.

Neuronal damage in IFN γ deficient mice

In order to assess changes in cell morphology, semithin sections of wild type and mutant mice spinal cords were observed by light microscopy. In mutant mice a higher number of pyknotic neurons were found compared to corresponding counts in wild type animals (Figure 2A and 2B) and, in some cases, the nuclei also appeared darkly stained. Additionally, hyperchromatic changes in the cytoplasm and irregularly shaped cells were seen. Also, regarding size, a clear decrease due to shrinkage was encountered in the mutant series (Figure 2C). On the control side, it was also possible to identify some cells with pyknotic nuclei and cytoplasm intermingled with normal appearing neurons (Figure 2D).

Mutant animals showed a greater proportion of degenerating cells per section analyzed when compared to wild type mice (mutant lesioned side, 3.62 ± 0.99 ; mutant unlesioned side 2.43 ± 1.14 ; wild type lesioned side, 0.8 ± 0.69 ; wild type unlesioned side, 0.7 ± 0.42 ; $p < 0.05$). The values are expressed as the mean number of sampled degenerating neurons present in the motor nucleus in unlesioned mice. Additionally, the proportion



of dying neurons in mutant mice was also statistically greater than in wild type mice. (ipsilateral IFN γ -KO, $37.64 \pm 5.95\%$; contralateral IFN γ -KO, $29.28 \pm 10.73\%$; ipsilateral C57BL/6J, $13.94 \pm 8.55\%$; contralateral C57BL/6J, $13.00 \pm 5.84\%$; $p < 0.05$) (Figure 2E).

Neuronal degeneration in the absence of IFN γ

Following sciatic nerve axotomy in wild type mice, degenerating neurons were rarely found. In this sense, the majority of cells showed intact nuclear and cell membranes, a nucleus with evenly distributed chromatin, and no cytoplasmic alterations. The motoneurons from the lesioned side showed the classical changes associated with the axotomy. For instance, motoneurons showed signs of synaptic terminal retractions (Figure 3A), and somata presented features of chromatolysis. Sections from wild type operated side (Figure 3B) revealed several nerve terminals partially or totally

displaced from the motoneuron cell body membrane. The ultrastructure also showed intact cytoplasmic organelles in presumed motoneurons on both the axotomized and unlesioned sides (Figure 3C). For instance, a well developed rough endoplasmic reticulum (RER) with rosettes of polyribosomes, Golgi apparatus (GA) containing parallel stacks of empty cisterns, and mitochondria exhibiting normal electron density and morphology were readily identified in the large ventral horn neurons of wild type mice (Figure 3D).

In contrast, qualitative ultrastructural observations revealed in the mutant animals, even on the non-operated side, a higher number of neurons with severe morphological changes. Some of these alterations were also evident under light microscopy. Ventral horn neurons showed distinct morphology related to degeneration and cell death, including hyperchromatic changes in the nucleus, cytoplasm, and cytoplasmic organelles.

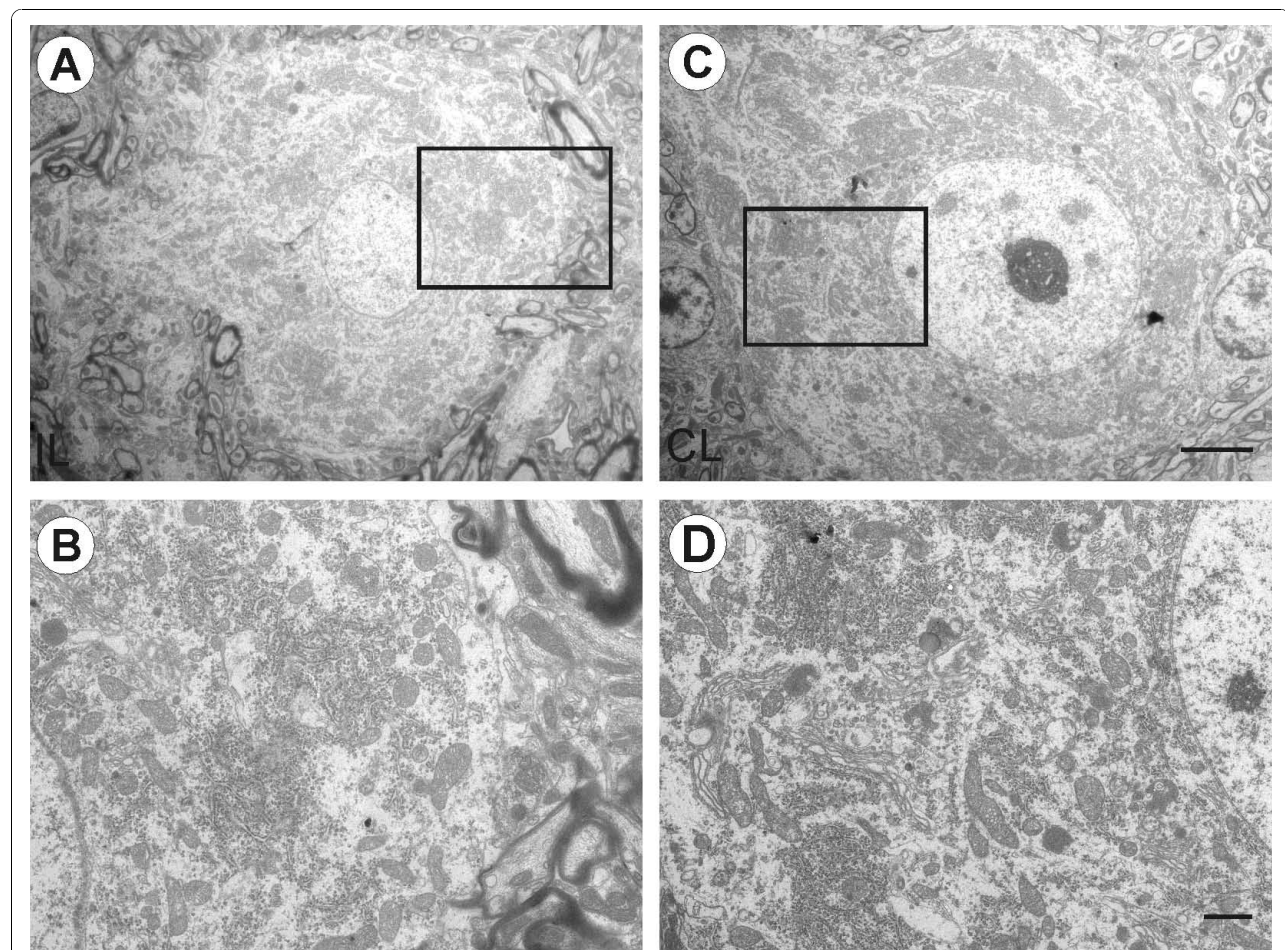


Figure 3 Electron photomicrographs of spinal cord motoneurons of C57BL/6J mice. (A) One α -motoneuron found on the ipsilateral side. The boxed area is shown at higher magnification in (B). Some synaptic terminals are retracted; the cytoplasm and nuclei have a normal appearance. (C) contralateral α -motoneuron. (D) Higher magnification shows cytoplasmic organelles visible and well organized rough endoplasmic reticulum (RER), Golgi apparatus (GA) and mitochondria. Scale bar: 5 μ m (A and C), 1 μ m (B-D).

Motoneurons on the lesioned side showed a decrease in their synaptic covering (Figure 4A). As a result of the modifications in the nucleus and cytoplasm, such cells became intensely electron dense and internally disorganized. Additionally, vacuoles of various sizes were found in the cytoplasm. In some neurons it was possible to see the nuclear chromatin aggregated into several clumps. Electron micrographs of higher magnification (Figure 4B) showed invaginations of nucleolemma indicating the shrinkage of the nucleus. Mitochondria were darkly stained and dilated, cisternae of rough endoplasmic reticulum were swollen and ribosomes appeared free in the cytoplasm.

Healthy motoneurons from the unlesioned side in mutant mice showed synaptic terminals in apposition to the post-synaptic membrane, but also some retractions (Figure 4C). Although the cells on this side appeared less electron dense and the nucleus was detectable,

subcellular alterations were seen. Under high magnification, many vacuoles in the cytoplasm were encountered, and dilation of mitochondrial cristae were identified (Figure 4D). Abnormal neurons were found adjacent to normal appearing cells in the same tissue section (Figure 5A). Discontinuity of plasma membranes and nucleolemma was also observed in some neurons (Figure 5B). In cells with hyperchromatic cytoplasm and nucleus with condensed chromatin, the nuclear envelope became indistinguishable. In the cytoplasm, RER was very sparse, GA appeared dilated and many vacuoles were observed (Figure 5C). Some glial cells were visible close to the neuronal cell body, and microglial cells showed vacuoles containing ingested material in the cytoplasm (Figure 5D). Neuronal lysis with surrounding glial cells was also detected in the anterior horn of the spinal cord (Figure 6A and 6B) suggesting high phagocytic activity.

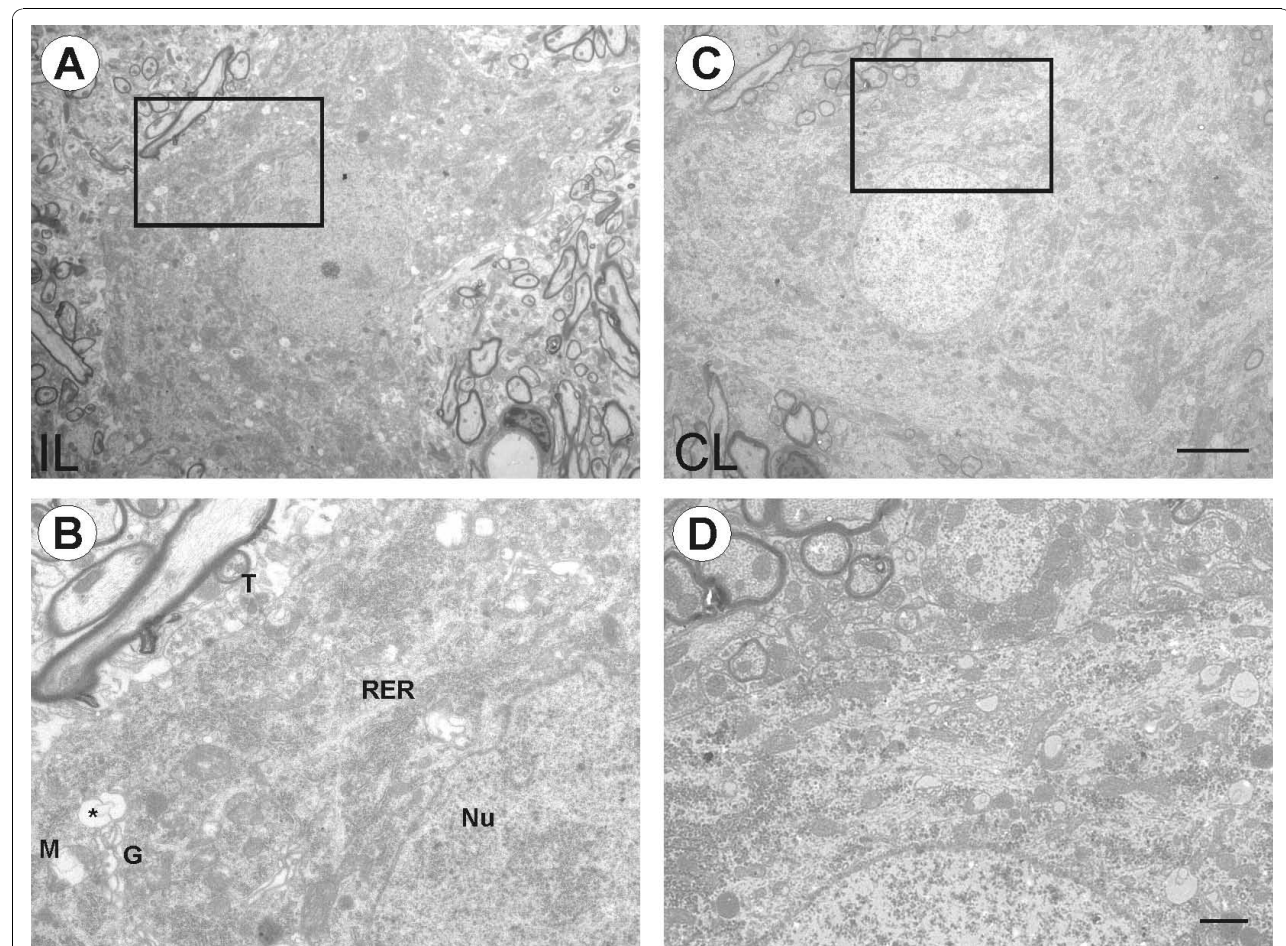


Figure 4 Electron photomicrographs of spinal cord motoneurons of IFN γ -KO mice. (A) α -motoneurons in the lesioned side. Boxed area is shown at higher magnification in (B). The cytoplasm and nuclei are more electron dense and cytoplasmic organelles are disorganized. Note the presence of numerous vacuoles in the perikaryon (asterisk) and the irregular contour of nuclear membrane. (C) α -motoneurons in the contralateral side. (D) Higher magnification shows the cell less electron dense and with some vacuoles in the cytoplasm. T, synaptic terminal; M, mitochondria; RER, rough endoplasmic reticulum; Nu, nucleus; G, golgi apparatus. Scale bar: 5 μ m (A and C), 1 μ m (B-D).

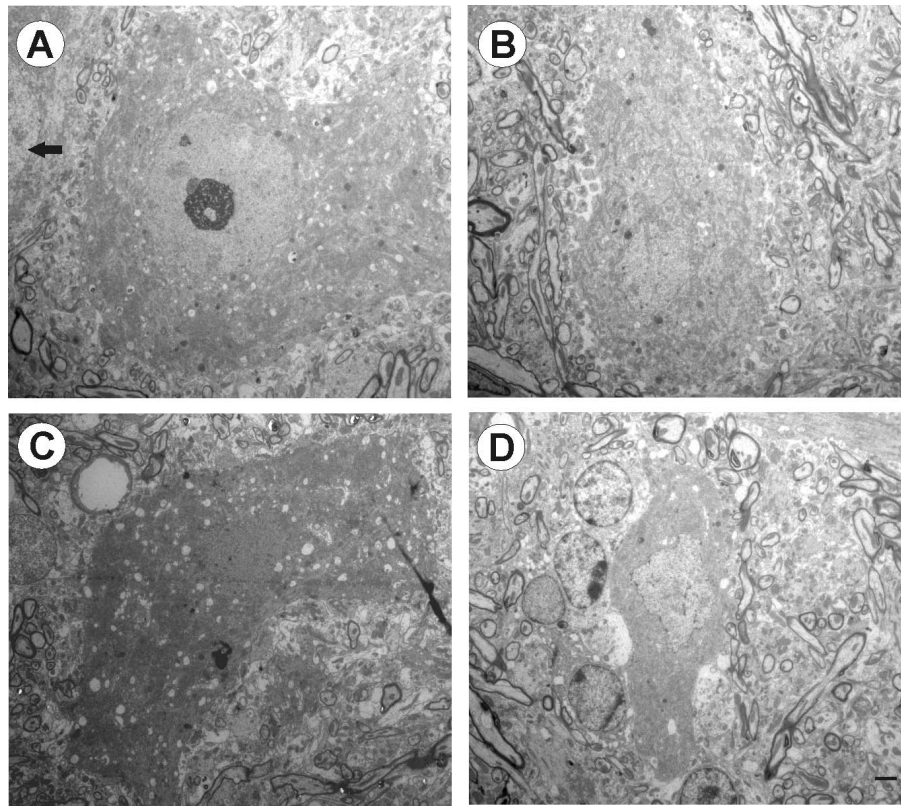


Figure 5 Electron photomicrographs showing degenerated neurons in IFN γ -KO mice. (A) One abnormal motoneuron amongst of normal cell (arrow). Cytoplasm and nuclei are electron dense; there are invaginations in the nuclear and cytoplasmic membranes and presence of many vacuoles in the cytoplasm. (B) The cell body appears shrunken and the nuclear envelope fragmented. (C) Darkly stained cytoplasm, condensed nuclear chromatin, and some organelles are hardly visible. (D) Glial cells are in close contact with a degenerating neuron. Note phagocytes of ingested material in the cytoplasm of microglial cells. Scale bar: 2 μ m.

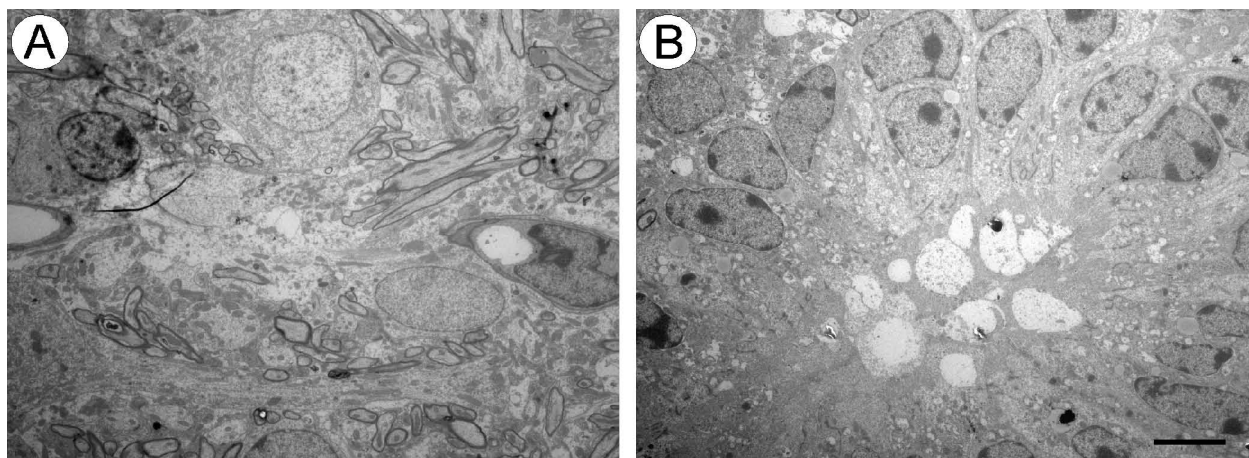


Figure 6 Electron micrograph showing two representative dying neurons in layer IX of spinal cord ventral horn of IFN γ -KO mice. (A) Dying neuron and the presence of glial cells in close contact with cell debris. (B) Many microglial cells ingesting a degenerating neuron. Scale bar: 5 μ m.

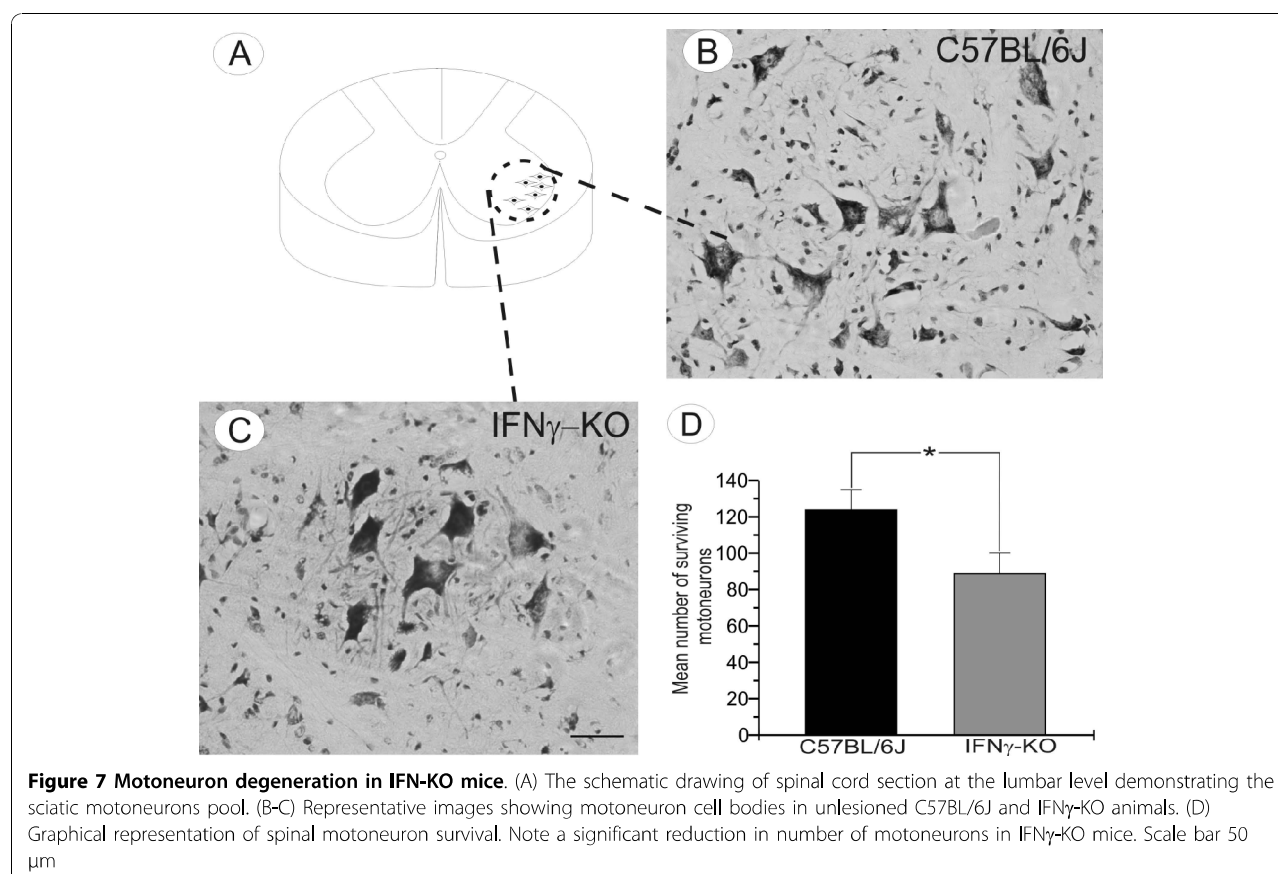
Characterization of neuronal death in IFN γ deficient adult mice

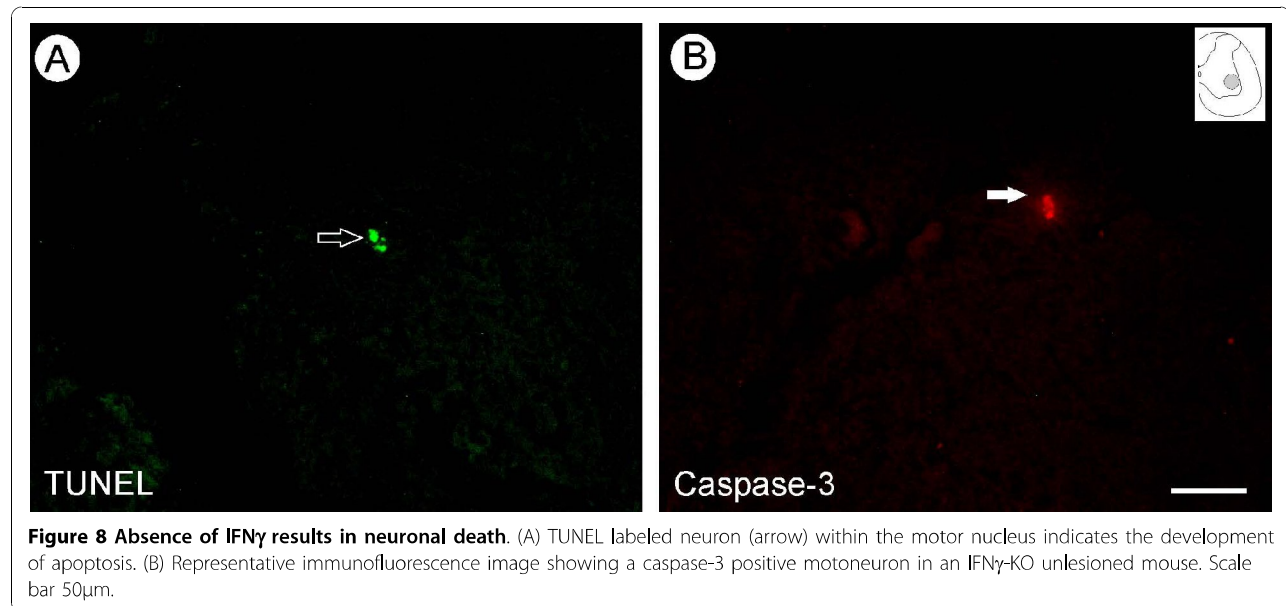
We have previously shown that IFN γ absence in adult mice subjected to axotomy resulted in several neuronal morphologic and morphometric changes. To evaluate whether the neuronal damage was mediated by the lack of IFN γ itself, the number of ventral horn neurons was quantified following Nissl-staining in unoperated animals. The mutant mice showed a lower number of surviving neurons in the lamina IX when compared to the wild type animals (89.00 ± 11.53 and 124.27 ± 11.15 per 100 alternate sections analyzed, respectively; $p < 0.05$, Figure 7). For identification of cell death, TUNEL and caspase-3 staining were performed in unoperated animals. Positive staining was found exclusively in mutant mice sections and is illustrated in Figure 8. The detection of caspase-3 immunolabeling in mutant mice reinforce the presence of apoptotic mechanisms involved in the motoneuron death described herein (Figure 8B). Therefore, we conclude that the reduction in the number of presumed motoneurons was attributable to the cellular degeneration and caused by the lack of IFN γ in those animals.

Ultrastructural changes in the spinal cord of IFN γ -KO animals

Additional ultrastructural studies of the motoneurons revealed synaptic differences between the mutant and wild type strains (Figure 9). The quantitative analysis showed a reduced number of presynaptic terminals in mutant mice, regardless of the nerve lesion (unlesioned side 44.00 ± 3.04 ; lesioned side $39.23 \pm 3.26/100 \mu\text{m}$ of membrane), compared with the unlesioned side of control animals ($52.42 \pm 1.76/100 \mu\text{m}$ of membrane, $p < 0.05$). The unlesioned side of the mutant mice presented a decreased number of terminals in apposition to the membrane of presumed motoneurons, which were not significantly further reduced following axotomy. Although mutant mice have shown a decreased number of terminals, no statistical differences could be observed among the studied strains regarding the synaptic input covering ($p > 0.05$).

An overall reduced number of presynaptic terminals in mutant mice may be attributed to a low number of F terminals (boutons containing flattened vesicles with glycine and/or GABA) in those animals. The mutant animals showed a significantly lower number of F-type boutons in apposition with ventral horn neurons on the





unlesioned side compared to the corresponding neurons in the wild type mice (23.07 ± 1.61 ; 28.02 ± 1.68 respectively, $p < 0.05$). The number of F-type terminals on the lesioned side of the mutant mice did not change from the sciatic nerve lesion.

The analysis of the number of presynaptic S-type terminals (boutons containing spherical vesicles with glutamate) in apposition with ventral horn neurons showed no significant difference between the groups (mutant unlesioned side, 18.32 ± 1.21 ; wild type unlesioned side, 21.75 ± 0.89). The number of S-type boutons in apposition with presumed motoneurons on the lesioned side was similar in both samples (mutant, 14.55 ± 0.94 ; wild type, 13.27 ± 1.61).

In order to analyze the pattern of terminal distribution along the motoneurons surface, the frequency of the gaps between clusters of boutons in apposition with the motoneurons somata was measured in each group (Figure 10). A lower number of gaps and a higher frequency of shorter intervals were observed between synaptic terminals in the mutant unlesioned side, than in the wild type mice (Figure 10C). Even with the sciatic nerve lesion (Figure 10D), the pattern of gap distribution was maintained and synaptic terminals remained clustered in apposition with the motoneuron somata.

Discussion

The overlap between the immune and the nervous system pathways has become an intriguing subject over the last few years. The possibility that molecules originally seen as solely related to the immune response may have particular effects on synaptic plasticity and nervous system development has opened a new field of investigation.

MHC I expression in the CNS development is an interesting example, since the same molecule that is used in the immune system to allow for intracellular infection surveillance is strongly related to the refinement of inputs in the visual system [17,18]. In this sense, IFN γ is the most potent inducer of major histocompatibility class I complex (MHC class I), which plays an important role in neuronal-glial communication, influencing the response to peripheral axotomy, directly affecting the synaptic plasticity process [19] and glial reactivity [20,21].

In the present study we have investigated the effects of the absence of IFN γ on the response to injury in mutant mice. Surprisingly, neuronal damage and cell shrinkage was depicted already in unlesioned mutant mice, and the axotomy itself did not worsen the degenerative process. These findings indicate that IFN γ expression is necessary to the survival of large cells present within the ventral horn of the spinal cord. Also, the observation that the synaptic circuits of sampled motoneurons were altered indicates that IFN γ is necessary for the proper development and maintenance of the synaptic homeostasis in the motor column. It is possible that IFN γ functions in a paracrine way, stimulating the MHC I expression by neurons [2,6,12], and thereby influence the continuous refinement and adjustments of synapses that take place in the spinal circuits throughout life.

The absence of IFN γ has been previously studied in the CNS after facial nerve transection. Under such circumstances, no significant changes could be depicted in the brain stem one week after lesion, both regarding glial reactions and MHC I expression [21]. However, synapse immuno-reactivity and ultrastructural analysis were not carried out at that time. In this sense, it is

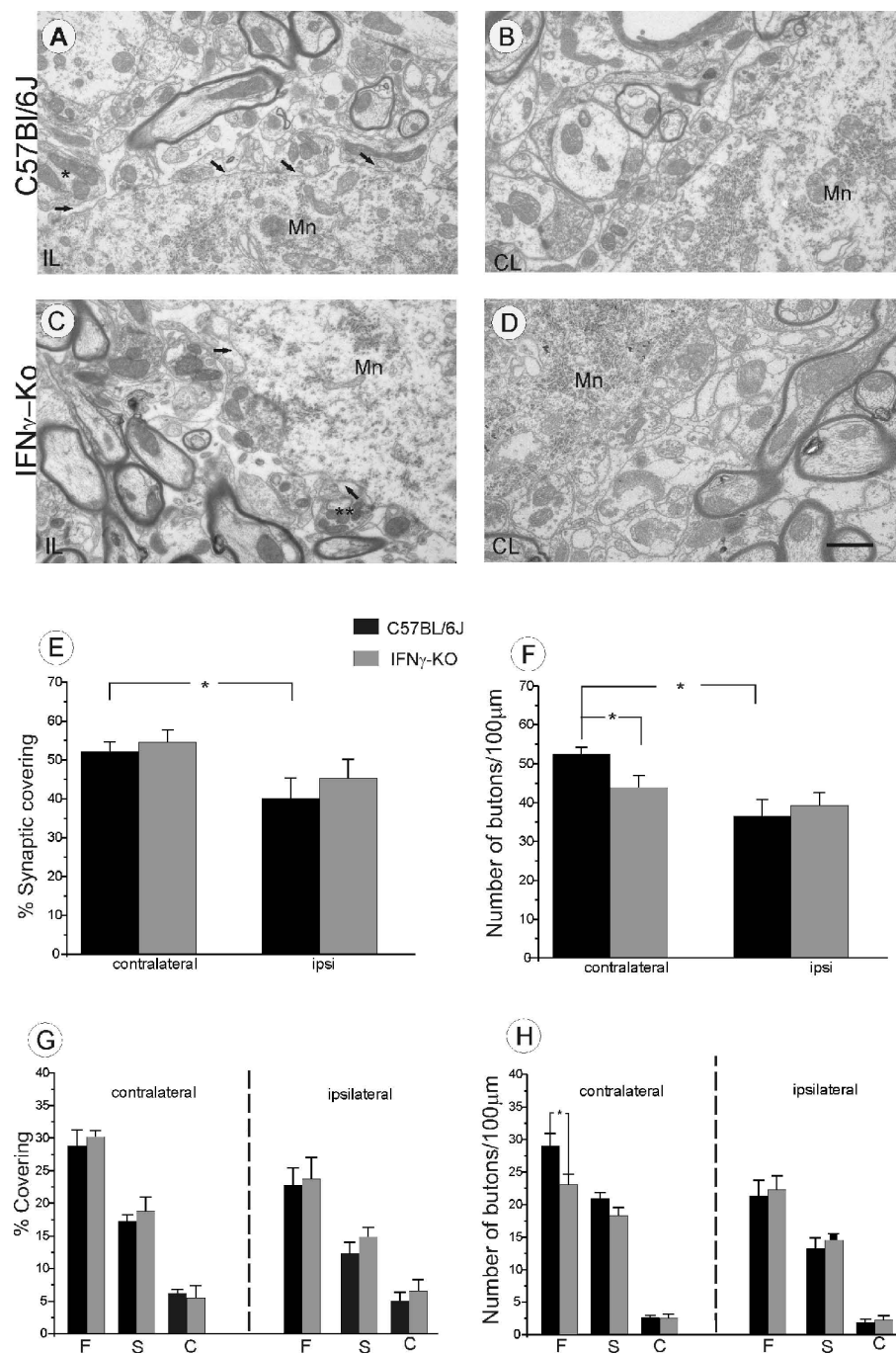


Figure 9 Qualitative and quantitative ultrastructural analysis of every input to the surface of α -motoneurons one week after sciatic nerve axotomy. (A) Synaptic retraction following axotomy in the C57BL/6J lesioned (ipsilateral) side. The arrows indicate the retraction of the nerve terminal from the surface of motoneurons. (B) Presynaptic terminals in apposition to motoneuron (Mn) membrane of C57BL/6J contralateral side. (C) Synaptic elimination following axotomy in IFN γ -KO lesioned side. *terminal totally retracted, ** terminal partially retracted. (D) Synaptic covering in the IFN γ -KO contralateral side. (E) Detailed analysis of the covering and number of synaptic boutons in IFN γ -KO mice. Those animals showed a lower detachment of synaptic terminals and a significant reduced number of synaptic terminals in apposition (F), regardless the nerve lesion. (G) Percentage of synaptic covering of F, S and C-terminals on unlesioned and lesioned sides. (H) Graphs of terminal numbers/100 μ m of motoneurons membrane. Note a greater loss of F-type of terminals in IFN γ -KO mice. $p < 0.05$ (*). Scale bar 1 μ m.

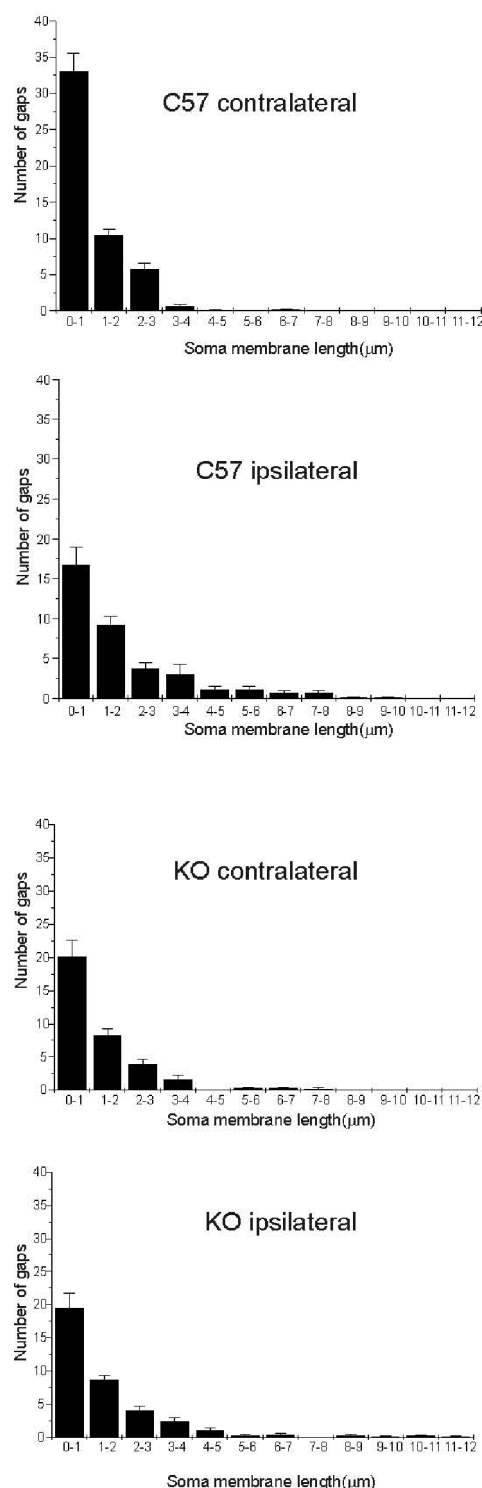


Figure 10 Graphs showing the frequency distribution (in micrometers) of gaps between the terminals along the cell soma membrane of α -motoneurons. (A-B) C57BL/6J animals showed a higher synaptic elimination one week after lesion. The gaps between clusters of boutons are possibly increased due to selective retractions of inputs. (C and D) IFN γ -KO mice showed a lower retraction of terminals after nerve lesion.

possible that more subtle modifications could have been overseen. Also, the spinal cord microenvironment may be considered as containing a more complex network of inputs to alpha motoneurons that are estimated to receive up to 100,000 synapses. The ability to respond to and integrate such a large number of pre-synaptic terminals may be a critical issue, possibly dependent on MHC I expression and regulation, that is linked to IFN expression. In the present work, a careful analysis of neuronal degeneration was carried out at light and ultra-structural levels. We show that presumed motoneurons in the lower lumbar ventral horn exhibited a smaller soma size in the mutant mice, regardless of nerve lesion. Also, the mutant mice demonstrated a greater proportion of degenerating neurons in the ventral horn as compared to the wild type. Motoneuron counts revealed a large number of degenerating cells in mutant mice in comparison to the wild type strain. Neuronal death was mostly due to the IFN γ gene knock out itself, since it could not be enhanced by peripheral axotomy, as seen after sciatic nerve transection. In addition, the mutant animals without lesion showed a reduced number surviving motoneurons compared with wild type. The presence of TUNEL positive cells in these animals confirm that apoptotic mechanisms are related to the observed motoneuron death. Nevertheless, necrotic death cannot be excluded based on the ultrastructural observations. The findings reported herein reveal the importance of IFN γ for neuronal survival throughout the normal adult life span.

The results described herein are in line with previous studies demonstrating that soluble mediators, such as certain cytokines, may have a protective role in the injured nervous system [4,9]. In this regard, recent studies have provided evidence for the protective function of IFN γ in neuronal cells after viral infections [14] and excitotoxicity [22]. In the adult brain of mice, the IFN γ was also associated with an improved spatial cognitive performance [23].

No statistical difference regarding the input covering could be observed between mutant and control mice. However, an interesting feature of other ultrastructural motoneuron changes in mutant mice is the possible occurrence of apoptosis and cell death, although a small subset of neurons appeared to die via necrosis. This is supported by TEM observations that include the classical features of apoptosis, such as cell bubbling, nuclear fragmentation and cell shrinkage.

Such morphological alterations were present in the spinal cord ventral horn, and the degenerating cells were surrounded by glial elements, mostly microglial cells. Since several pre-synaptic terminals could be seen retracted close to the degenerating elements, such cells most possibly were motoneurons. It is important to

emphasize, however, that cells may show intermediate morphological forms which range from apoptosis to necrosis [24-27], so that both pathways may coexist after injury or during degeneration.

Interferon gamma expression within the nervous system is classically associated with an inflammatory response after injury [11]. In this way, it is normally involved as a part of the physiological response to tissue damage and trauma. Under these circumstances, various cytokines are produced and released by infiltrating immune cells. Activated T-cells may cross the blood-brain barrier and interact with resident cells of the central nervous system (CNS) [4,28] by synthesizing factors, such as IFN γ , and to induce glial cells to produce cell surface molecules and mediators required for crosstalk between immune and brain cells. The present study, however, indicates an additional role to IFN γ expression in the CNS. Specifically, IFN γ may participate in the homeostasis of the synaptic circuitry during the normal life span [29,30]. This is possibly linked with unveiled mechanisms involving immune molecules as important players for synaptic plasticity. The MHC I expression is a recent example of such overlap between CNS and immune system mechanisms [28]. Regulation of these molecules, including IFN γ , seems to affect the stability of the architecture of the nervous system [6,31]. The absence of these elements may in turn lead to neural degeneration and loss of function.

Further studies will be necessary to better understand the above mechanisms, and identify novel targets for new efficient strategies to treat lesions and degeneration of the nervous system.

Conclusions

Altogether, the present results suggest that IFN γ may be neuroprotective and its absence results in neuronal death, which is mostly associated with morphological signs of apoptosis. Also, the lack of IFN γ alters the synaptic elimination process that follows a peripheral nerve lesion.

List of abbreviations

CNS: central nervous system; GA: golgi apparatus; IFN γ -KO: interferon gamma knock out; MHC I: major histocompatibility complex of class I; NK: natural killer; RER: rough endoplasmic reticulum; TEM: Transmission electron microscopy.

Acknowledgements

We thank Ms. Birgitta Sjöstrand for the excellent technical assistance with tissue processing for electron microscopy. This work was supported by Fapesp (2006/06673-3 and 2010/18156-9). Victório, SCS received a scholarship from FAPESP (Brazil). Oliveira, A.L.R. receives a fellowship from CNPq (Brazil). LAH was supported by the Dr. Miriam and Sheldon G. Adelson Medical Research Foundation.

Author details

¹Department of Anatomy, Cell Biology, Physiology and Biophysics, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. ²Department of Neurology, University of California, Los Angeles.

Authors' contributions

ALRO and LAH provided the study concept, design and supervision. SCSV participated on the experimental design and acquisition of data. All authors provided analysis and interpretation and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 23 August 2010 Accepted: 12 November 2010

Published: 12 November 2010

References

- Olsson T, Kristensson K, Ljungdahl Å, Maehlen J, Holmdahl R, Kläreskog L: Gamma-interferon-like immunoreactivity in axotomized rat motor neurons. *J Neurosci* 1989, **9**:3870-3875.
- Lindå H, Hammaberg H, Cullheim S, Levinovitz , Khademi M, Olsson T: Expression of MHC class I and β -microglobulin in rat spinal motoneurons: regulatory influences by IFN-gamma and axotomy. *Exp Neurol* 1998, **150**:282-95.
- Renno T, Taupin V, Bourbonnière L, Verge G, Tran E, De Simone R, Krakowski M, Rodriguez M, Peterson A, Owens T: Interferon-gamma in progression to chronic demyelination and neurological deficit following acute EAE. *Mol Cell Neurosci* 1998, **12**:376-89.
- Kerschensteiner M, Meinl E, Hohlfeld R: Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience* 2009, **158**:1122-32.
- Hanisch UK: Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 2002, **40**:140-55.
- Neumann H, Schmidt H, Wilharm E, Behrens L, Wekerle H: Interferon gamma gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. *J Exp Med* 2008, **186**:2023-31.
- Zanon RG, Cartarozzi LP, Victório SC, Moraes JC, Morais J, Velloso LA, Oliveira AL: IFN beta treatment induces MHC class I expression in the spinal cord and enhances axonal growth and motor function recovery following sciatic nerve crush in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2010, **36**(6):515-34.
- Zanon RG, Oliveira AL: MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transection. *Exp Neurol* 2006, **200**:521-31.
- Correale J, Villa A: The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol* 2004, **251**:1304-16.
- Mir M, Asensio VJ, Tolosa L, Gou-Fabregas M, Soler RM, Lladó J, Olmos G: Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma cooperatively induce oxidative stress and motoneuron death in rat spinal cord embryonic explants. *Neuroscience* 2009, **162**:959-71.
- Taskinen HS, Olsson T, Bucht A, Khademi M, Svelander L, Röttä M: Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN- γ , IL-10 and TNF- α mRNA. *J Neuroimmunol* 2000, **102**:17-25.
- Neumann H, Schmidt H, Cavalié A, Jenne D, Wekerle H: Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Gene Expression in Single Neurons of the Central Nervous System: Differential Regulation by Interferon (IFN)- γ and Tumor Necrosis Factor (TNF)- α . *J Exp Med* 1997, **185**:305-16.
- Toledo-Aral JJ, Brehm P, Halegoua S, Mandel G: A single pulse of nerve growth factor triggers long-term neuronal excitability through sodium channel gene induction. *Neuron* 1995, **14**:607-611.
- Richter K, Hausmann J, Staeheli P: Interferon-gamma prevents death of bystander neurons during CD8 T cell responses in the brain. *Am J Pathol* 2009, **174**:1799-807.
- Abercrombie M, Johnson ML: Quantitative histology of wallerian degeneration: Nuclear population in rabbit sciatic nerve. *J Anat* 1946, **80**:37-50.

16. Conradi S: **Ultrastructure and distribution of neural and glial elements on the lumbosacral spinal cord of the adult cat.** *Acta Physiol Scand Suppl* 1969, **332**:25-48.
17. Corriveau RA, Huh GS, Shatz CJ: **Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity.** *Neuron* 1998, **21**:505-20.
18. Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ: **Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity.** *Science* 2000, **290**:2155-9.
19. Oliveira AL, Thams S, Lidman O, Piehl F, Hökfelt T, Kärre K, Lindå H, Cullheim S: **A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy.** *Proc Nat Acad Sci USA* 2004, **101**:17843-8.
20. Emirandetti A, Graciele Zanon R, Sabha M Jr, de Oliveira ALR: **Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy.** *Brain Res* 2006, **1095**:35-42.
21. Lidman O, Fraidakis M, Lycke N, Olson L, Olsson T, Piehl F: **Facial nerve lesion response; strain differences but no involvement of IFN-gamma, STAT4 or STAT6.** *Neuroreport* 2002, **3**:1589-93.
22. Lee J, Kim SJ, Son TG, Chan SL, Mattson MP: **Interferon-gamma is up-regulated in the hippocampus in response to intermittent fasting and protects hippocampal neurons against excitotoxicity.** *J Neurosci Res* 2006, **83**:1552-7.
23. Baron R, Nemirovsky A, Harpaz I, Cohen H, Owens T, Monsonogo A: **IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease.** *FASEB J* 2008, **22**:2843-52.
24. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ: **Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum.** *J Comp Neurol* 1997, **378**:70-87.
25. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ: **Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum.** *J Comp Neurol* 1997, **378**:88-104.
26. Li L, Houenou LJ, Wu W, Lei M, Prevette DM, Oppenheim RW: **Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice.** *J Comp Neurol* 1998, **396**:158-68.
27. Zeng YS, Xu ZC: **Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia.** *Neurosci Res* 2000, **37**:113-25.
28. Piehl F, Lidman O: **Neuroinflammation in the rat-CNS cells and their role in the regulation of immune reactions.** *Immunol Rev* 2001, **184**:212-25.
29. Vikman KS, Owe-Larsson B, Brask J, Kristensson KS, Hill RH: **Interferon-gamma-induced changes in synaptic activity and AMPA receptor clustering in hippocampal cultures.** *Brain Res* 2001, **896**:18-29.
30. Brask J, Kristensson K, Hill RH: **Exposure to interferon-gamma during synaptogenesis increases inhibitory activity after a latent period in cultured rat hippocampal neurons.** *Eur J Neurosci* 2004, **19**:3193-201.
31. Boulanger LM, Shatz CJ: **Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease.** *Nat Rev Neurosci* 2004, **5**:521-31.

doi:10.1186/1742-2094-7-77

Cite this article as: Victório et al.: Absence of IFN γ expression induces neuronal degeneration in the spinal cord of adult mice. *Journal of Neuroinflammation* 2010 **7**:77.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

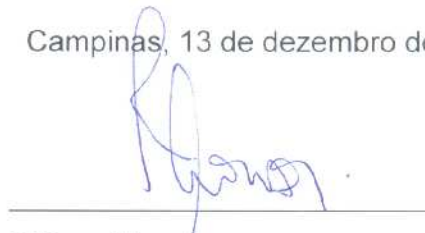
Certificamos que o Protocolo nº 1172-1, sobre "Plasticidade sináptica e reatividade glial após lesão do nervo ciático em comundongos knock out para interferon gama" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira / Sheila Cristina da Silva Victório está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 13 de dezembro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1172-1, entitled "Synaptic plasticity and glial reactivity after sciatic nerve transection in knock out for interferon gama", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 13, 2006.

Campinas, 13 de dezembro de 2006.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva