

GUSTAVO FERREIRA SIMÕES

**“Plasticidade sináptica em motoneurônios alfa medulares
de camundongos MDX tratados com fator estimulador de
colônias granulocitárias (G-CSF)”**

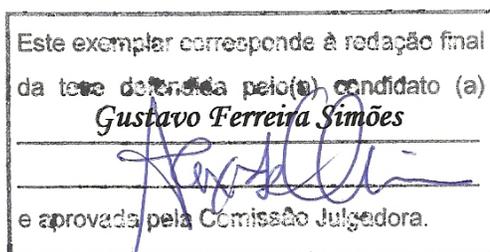
CAMPINAS, 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GUSTAVO FERREIRA SIMÕES

**“Plasticidade sináptica em motoneurônios alfa medulares de
camundongos MDX tratados com fator estimulador de
colônias granulocitárias (G-CSF)”**



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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Si45p	<p>Simões, Gustavo Ferreira, 1978- Plasticidade sináptica em motoneurônios alfa medulares de camundongos mdx tratados com fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) / Gustavo Ferreira Simões. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Camundongo <i>mdx</i>. 2. Sinapse. 3. Gene MHC-I. 4. Fator estimulador de colônias de granulócitos. 5. Distrofia muscular de Duchenne. 6. Sistema nervoso central. 7. Sistema nervoso periférico. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Synaptic plasticity in alpha motoneurons in mdx mice treated with granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)

Palavras-chave em Inglês:

Mdx mice

Synapse

MHC-I gene

Granulocyte colony-stimulating factor

Duchenne muscular dystrophy

Central nervous system

Peripheral nervous system

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira [Orientador]

Benedito Barraviera

Fausto Viterbo de Oliveira Neto

Valéria Paula Sassoli Fazan

Rosália Mendez Otero

Data da defesa: 30-11-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 30 de novembro de 2012

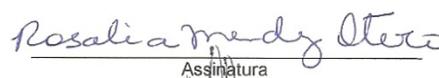
BANCA EXAMINADORA

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



Assinatura

Profa. Dra. Rosalia Mendez Otero



Assinatura

Prof. Dr. Benedito Barraviera



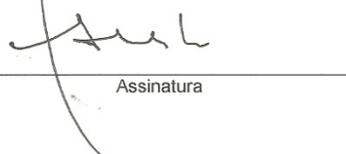
Assinatura

Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan



Assinatura

Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto



Assinatura

Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Assinatura

Prof. Dr. André Luis Bombeiro

Assinatura

DEDICATÓRIA

“Dedico esta conquista aos meus pais Edmo e Terezinha por terem se dedicado e abdicado de muitas coisas ao longo de suas vidas para poderem educar seus três filhos. Minha eterna gratidão! Dedico também à minha esposa e companheira Taize, que está sempre ao meu lado, nos momentos bons e naqueles de alguma dificuldade, sempre me dando amor e carinho.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, orientador e amigo, agradeço mais uma vez por ter me recebido em seu laboratório, por sempre me orientar para alcançar a perfeição dentro da pesquisa. Também agradeço professor, pelos prazerosos momentos em que tivemos em San Diego/Califórnia.

À minha esposa Taize que sempre esteve ao meu lado, pela ajuda em vários momentos da minha vida. Pela companhia, carinho e amor

Ao professor Dr. Edson Rosa Pimentel, pela amizade e também pelas discussões de trabalhos e idéias ao longo do meu doutorado.

Ao professor Dr. Carlos Musso, agradeço pelos ensinamentos didáticos em Anatomia Humana, os quais me ajudaram muito para conseguir passar no concurso público para professor adjunto de Anatomia na Universidade Federal de Goiás.

Aos professores do departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, professores Humberto, Maria Julia, Elaine e Valéria. Agradeço pelos prazerosos momentos de conversa sobre assuntos de anatomia e pesquisa.

Aos técnicos de laboratório e amigos Marquinhos e Nori pelos auxílios nos serviços de rotina para a realização de experimentos diários.

À coordenação da pós-graduação do Instituto de Biologia, em especial à Lilian pela atenção e cuidados com as documentações exigidas ao longo desses três anos.

Ao pessoal do laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, Adriane, Stela e Ana, pela amizade e ajuda com as técnicas de microscopia ao longo do doutorado.

Aos meus pais Edmo e Terezinha que sempre apoiam e torcem para o sucesso dos seus três filhos. Pelo incentivo na busca de conquistas pessoais e profissionais, independentemente de entenderem ou não os rumos. Muito obrigado, amo vocês dois!

Aos meus irmãos Mateus e Laura por todo tipo de ajuda que me deram e por terem me entendido em momentos críticos pelos quais passei na vida.

Aos meus tios Carlos e Eliana, e seus filhos Daniel e Camila, pela amizade e ajuda incondicional que me deram para que eu alcançasse meus objetivos. Meu sincero agradecimento.

Aos meus queridos tios Pedrinho e Bia, pela amizade, convívio e conselhos que me deram ao longo da minha vida. Meu sincero agradecimento.

Aos técnicos do departamento de anatomia do IB, Valter, Toni, Paulo e Marlene pela amizade e pelos vários momentos de conversas agradáveis.

Aos amigos Amauri e Gabriel pela convivência agradável no laboratório de Regeneração Nervosa.

Aos colegas do Laboratório de Regeneração Nervosa e de outros laboratórios do departamento de Anatomia do IB, pelo convívio diário.

À professora Dra Renata Zanon, pela amizade e as longas discussões de idéias que ajudaram no direcionamento do meu doutorado.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma participaram desta conquista, meu muito obrigado. Todos, por algum motivo, estiveram presentes no momento certo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O Sistema Nervoso.....	1
1.2 Motoneurônios Medulares.....	3
1.3 Alterações neuronais após lesão nervosa periférica.....	5
1.4 Astrócitos e a astrogliose reativa.....	7
1.5 Complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I) no Sistema Nervoso Central.....	10
1.6 Distrofia Muscular de Duchenne.....	13
1.7 Fator Estimulador de Celulas Granulócitas (G-CSF).....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivos Gerais.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Experimentos “ <i>in vivo</i> ”.....	22
3.1.1 Lesão do nervo isquiático.....	24
3.1.2 Eutanásia dos camundongos e processamento para imunohistoquímica.....	26
3.1.3 Eutanásia dos camundongos e processamento dos espécimes para microscopia eletrônica.....	27
3.1.4 Análise das secções ultrafinas.....	30
3.1.5 Avaliação Motora e Recuperação Funcional do Nervo Isquiático.....	31
3.1.6. Análise morfológica das fibras musculares do músculo sóleo.....	36
3.2 Análise estatística dos resultados.....	36
3.3 Experimentos “ <i>in vitro</i> ”.....	37
3.3.1 Cultura purificada de astrócitos.....	37
3.3.2 Curva de crescimento celular.....	38
3.3.3 Imunocitoquímica.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1 Expressão de MHC I em camundongos sem lesão e submetidos à axotomia do nervo isquiático com e sem tratamento com G-CSF.....	40

4.2 Imunorreatividade para sinaptofisina em camundongos sem lesão e submetidos à axotomia do nervo isquiático com e sem tratamento com G-CSF.....	45
4.3 Astrogliose reativa em camundongos sem lesão e submetidos à axotomia do nervo isquiático com e sem tratamento com G-CSF.....	51
4.4 Imunorreatividade para IBA-I em camundongos sem lesão e submetidos à axotomia do nervo isquiático com e sem tratamento com G-CSF.....	57
4.5. Alterações ultraestruturais na medula espinhal em camundongos sem lesão e submetidos à axotomia do nervo isquiático com e sem tratamento com G-CSF.....	62
4.5.1. Cobertura sináptica total.....	69
4.5.2. Porcentagem da cobertura sináptica de terminais F.....	73
4.5.3. Porcentagem da cobertura sináptica de terminais S.....	74
4.5.4. Porcentagem da cobertura sináptica de terminais C.....	75
4.5.5. Número de terminais pré-sinápticos/100 μm em aposição com a membrana neuronal.....	76
4.5.6. Número de terminais pré-sinápticos F/100 μm de membrana neuronal.....	78
4.5.7 Número de terminais pré-sinápticos S/100 μm de membrana neuronal.....	79
4.5.8 Número de terminais pré-sinápticos C/100 μm de membrana neuronal.....	81
4.5.9. Espaços de membrana neuronal entre terminais pré-sinápticos.....	84
4.6 Análise estrutural após esmagamento do nervo isquiático.....	87
4.7 Parâmetros Morfométricos.....	90
4.7.1 Diâmetro das Fibras Mielínicas.....	90

4.7.2 Diâmetro dos Axônios Mielínicos.....	95
4.7.3 Espessura da Bainha de Mielina e Razão “g”.....	100
4.8 Número total de axônios mielínicos.....	107
4.9 Número de fibras degeneradas durante análise morfológica do nervo isquiático.....	109
4.10 Análise da função motora após esmagamento do nervo isquiático.....	111
4.11 Imunorreatividade para neurofilamento nos nervos lesionados não tratados e tratados com G-CSF.....	115
4.12 Imunorreatividade para p75NTR nos nervos lesionados não tratados e tratados com G-CSF.....	121
4.13 Análise morfológica do músculo sóleo em camundongos MDX tratados com G-CSF.....	127
4.14 Efeitos <i>in vitro</i> do tratamento G-CSF em culturas primárias de astrócitos.....	129
5. DISCUSSÃO.....	160
6. CONCLUSÕES.....	176
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	178
Anexo 1.....	188
Anexo 2.....	190

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	corante azul de toluidina
CL	contralateral
CO ₂	dióxido de carbono
CY-2	anticorpo com corante cianina tipo 2
CY-3	anticorpo com corante cianina tipo 3
BSA	albumina de soro bovino
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DMD	distrofia muscular de <i>Duchenne</i>
DFM	diâmetro das fibras mielínicas
DAM	diâmetro dos axônios mielínicos
EBM	espessura da bainha de mielina
GABA	ácido gama-aminobutírico
G-CSF	fator estimulador de colônias granulocitárias
G-CSFR	receptor de G-CSF
GFAP	proteína fibrilar ácida glial
H&E	corante hematoxilina e eosina
IFN- γ	interferon gama
IL	ipsilateral
MDX	distrofia muscular ligada ao cromossomo X
MELD	músculo extensor longo dos dedos
MHC-I	complexo principal de histocompatibilidade – I
MN	motoneurônio
MPL	músculo plantar longo
MS	músculo sóleo
MTA	músculo tibial anterior
PB	tampão fosfato
PBS	salina tamponada em tampão fosfato
p75NTR	receptor de baixa afinidade para neurotrofinas
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro

RZG	razão “g”
SN	sistema nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimento esquematizado da axotomia e esmagamento em camundongo MDX.....	25
Figura 2. Secções transversais semi-finas de medula espinhal coradas com Azul de Toluidina (AT), em aumento de 20X.....	29
Figura 3. Esquema ilustrativo do sistema ‘‘CatWalk’’.....	33
Figura 4. Imunomarcção anti-MHC I em animais não submetidos à axotomia.....	42
Figura 5. Imunomarcção anti-MHC I uma semana após a axotomia do nervo isquiático.....	43
Figura 6. Imunomarcção anti-Sinaptofisina em animais não submetidos à axotomia.....	48
Figura 7. Imunomarcção anti-sinaptofisina uma semana após axotomia do nervo isquiático.....	49
Figura 8. Imunomarcção anti-GFAP em animais não submetidos à axotomia.....	54
Figura 9. Imunomarcção anti-GFAP uma semana após axotomia do nervo isquiático.....	55
Figura 10. Imunomarcção anti-IBA1 em animais não submetidos à axotomia.....	59
Figura 11. Imunomarcção anti-IBA1 uma semana após axotomia do nervo isquiático.....	60
Figura 12. Sequência de fotomicrografias eletrônicas utilizadas para a reconstrução de um motoneurônio alfa medular.....	62
Figura 13. Ultraestrutura da superfície de motoneurônios alfa medulares sem lesão.....	64
Figura 14. Ultraestrutura da superfície de motoneurônios alfa medulares uma semana após a axotomia do nervo isquiático.....	66
Figura 15. Análise quantitativa da ultraestrutura das sinapses e do número de terminais pré-sinápticos em aposição em 100 μ m membrana neuronal.....	71
Figura 16. Análise quantitativa da porcentagem de cobertura sináptica dos terminais F, S e C e da análise ultraestrutural quantitativa do número de	

terminais F, S e C em aposição/100µm.....	82
Figura 17. Gráficos mostrando a distribuição de frequência (em micrômetros) dos espaços entre os terminais sinápticos retraídos ao longo da membrana do corpo dos motoneurônios.....	85
Figura 18. Fotomicrografias eletrônicas representativas do nervo Isquiático pré e pós lesão nas duas linhagens estudadas.....	88
Figura 19: Distribuição da frequência do diâmetro das fibras mielínicas (DFM) em nervos lesionados e não lesionados (contralateral), 21 dias após a lesão.....	93
Figura 20: Distribuição da frequência do diâmetro dos axônios mielínicos (DAM) em nervos lesionados e não lesionados (contralateral), 21 dias após a lesão.....	98
Figura 21: Distribuição da frequência da espessura da bainha de mielina (EBM) em nervos lesionados e não lesionados (contralateral), 21 dias após a lesão.....	103
Figura 22: Distribuição da frequência da razão “g” (RZG) em nervos lesionados e não lesionados (contralateral), 21 dias após a lesão.....	105
Figura 23: Análise quantitativa do número total de axônios mielínicos.....	108
Figura 24: Análise quantitativa do número de fibras degeneradas.....	110
Figura 25. Gráfico mostrando a recuperação da função motora entre as linhagens C57BL710 e MDX.....	113
Figura 26: Imunomarcção anti-neurofilamento dez dias após esmagamento do nervo isquiático.....	116
Figura 27: Imunomarcção anti-neurofilamento três semanas após esmagamento do nervo isquiático.....	119
Figura 28: Imunomarcção anti-p75NTR (receptor de baixa afinidade para neurotrofinas) dez dias após esmagamento do nervo isquiático.....	122
Figura 29: Imunomarcção anti-p75NTR (receptor de baixa afinidade para neurotrofinas) três semanas após o esmagamento do nervo isquiático.....	125

Figura 30: Coloração por H&E do músculo sóleo tratado e não tratado com G-CSF.....	128
Figura 31. Prancha mostrando as curvas de crescimento ao longo de sete dias de tratamento com doses diferentes com G-CSF.....	130
Figura 32. Imunomarcção para GFAP em culturas tratadas com G-CSF durante três dias consecutivos.....	134
Figura 33. Imunomarcção para GFAP em culturas tratadas com G-CSF durante cinco dias consecutivos.....	137
Figura 34. Imunomarcção para GFAP em culturas tratadas com G-CSF durante sete dias consecutivos.....	140
Figura 35. Imunomarcção para receptor de G-CSF em culturas tratadas com G-CSF durante três dias consecutivos.....	143
Figura 36. Imunomarcção para receptor de G-CSF em culturas tratadas com G-CSF durante cinco dias consecutivos.....	146
Figura 37. Imunomarcção para receptor de G-CSF em culturas tratadas com G-CSF durante sete dias consecutivos.....	149
Figura 38. Imunomarcção para MHC-I em culturas tratadas com G-CSF durante três dias consecutivos.....	152
Figura 39. Imunomarcção para MHC-I em culturas tratadas com G-CSF durante cinco dias consecutivos.....	155
Figura 40. Imunomarcção para MHC-I em culturas tratadas com G-CSF durante sete dias consecutivos.....	158

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos grupos e técnicas utilizadas nos camundongos submetidos à axotomia do nervo isquiático.....	23
Tabela 2: Resumo dos grupos e técnicas utilizadas nos camundongos submetidos à compressão do nervo isquiático.....	23

RESUMO

Atualmente, muito se sabe sobre o acometimento muscular na DMD, mas poucos estudos estão voltados para os efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC), mais especificamente no microambiente do motoneurônio medular. Sabe-se que durante a evolução da doença, o terminal axonal, na junção neuromuscular, entra em um ciclo de denervação (retração) e reinervação (brotamento). A possibilidade de modulação do MHC I se apresenta como uma nova estratégia de influenciar positivamente o processo de plasticidade sináptica após lesões do Sistema Nervoso Periférico (SNP) e SNC. Tal modulação pode ser realizada através da utilização ou desenvolvimento de drogas específicas. O fator estimulador de colônias glanulocitárias (G-CSF) é uma glicoproteína que foi descrita há mais de vinte anos, possui aprovação do ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e é comumente utilizada para tratar neutropenia, ou para transplantes de medula óssea. O G-CSF possui um efeito neuroprotetor aparentemente multimodal, incluindo-se a atividade anti-apoptótica em neurônios, regeneração da vascularização, efeito antiinflamatório e estimulação de neurogênese endógena, sendo capaz de atuar efetivamente no processo de regeneração do sistema nervoso. No presente trabalho, foram utilizados camundongos MDX. Os camundongos foram distribuídos em 4 grupos (axotomia + G-CSF; Axotomia; Controle + G-CSF e Controle), com n=10. Incluiu-se para imunoistoquímica o grupo placebo, onde os animais receberam uma dose diária de 200µm, via subcutânea, de glicose a 25%. Nossos resultados indicam que redução de sinapses nos motoneurônios alfa-medulares e aumento da astrogliose circunjacente aos neurônios alfa-medulares, seja decorrente da desconexão parcial entre o órgão alvo e o corpo neuronal durante o período de ciclos de degeneração/regeneração muscular que ocorrem a partir das primeiras semanas de vida nos camundongos MDX. Estes ciclos podem repercutir retrogradamente nos corpos celulares dos motoneurônios alfa-medulares, provocando uma série de alterações denominadas cromatólise. A axotomia do nervo isquiático resulta num aumento significativo da expressão de MHC I nas duas linhagens estudadas. Contudo, nos animais MDX, este aumento é menor, comparativamente à linhagem C57BL/10. Quando tratados com G-CSF a expressão de MCH I ficou maior em relação aos grupos não tratados e, isso pode indicar um papel ativo da droga no potencial regenerativo após a lesão. Também podemos sugerir que, apesar dos animais MDX apresentarem uma menor função motora em relação aos animais controle, os resultados indicam que o tratamento com G-CSF é capaz de reduzir os efeitos inflamatórios e atuar positivamente no processo de regeneração nervosa periférica após esmagamento do nervo isquiático.

ABSTRACT

Currently, much is known about the muscular involvement in DMD, but few studies have focused on the effects on the central nervous system (CNS), specifically in the microenvironment of spinal motor neurons. It is known that during the course of the disease, the axon terminal at the neuromuscular junction, enters a cycle of denervation (retraction) and reinnervation (sprouting). The possibility of modulation of MHC I presents itself as a new strategy to positively influence the process of synaptic plasticity after injury Peripheral Nervous System (PNS) and CNS. Such modulation may be accomplished through the use or development of special drugs. The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is a glycoprotein which was first described more than twenty years, has approval from ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) and is commonly used to treat neutropenia, or bone marrow transplants. The G-CSF has a multimodal neuroprotective effect, including the anti-apoptotic activity in neurons, regeneration of vascularization, anti-inflammatory effect and stimulation of endogenous neurogenesis, being able to act effectively in the process of regeneration of the nervous system. In this study, we used MDX mice. The mice were divided into 4 groups (axotomy + G-CSF; axotomy, Control + G-CSF and Control), with n = 10. Included immunohistochemistry to the placebo group, where the animals received a daily dose of 200µm, subcutaneously, glucose 25%. Our results indicate that reduction of synapses in the alpha motoneuron and increased astrogliosis, either due to partial disconnection between the target organ and the neuronal body during the cycles of degeneration /regeneration muscle that occur from first weeks of life in MDX mice. These cycles can pass retrogradely in alpha motoneurons cell bodies, causing a series of changes called chromatolysis. The sciatic nerve axotomy results in a significant increase of MHC I expression in both strains studied. However, in MDX strain, this increase is smaller, compared to C57BL/10. After treatment with G-CSF the expression of MHC I got bigger compared to untreated groups, and this may indicate an active role in the regenerative potential of the drug after injury. Also we suggest that while the animals present MDX a smaller motor function compared to control animals, the results indicate that treatment with G-CSF is capable of reducing the inflammatory effects and act positively on peripheral nerve regeneration process after nerve crush sciatic. Also our results indicate that treatment with G-CSF is able to reduce the inflammatory effects and act positively on peripheral nerve regeneration process after nerve crush sciatic.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Sistema Nervoso

Anatomicamente, o Sistema Nervoso (SN) pode ser dividido em duas partes: uma localizada dentro da cavidade craniana e canal vertebral, denominada de Sistema Nervoso Central (SNC); e a outra parte, denominada de Sistema Nervoso Periférico (SNP), localizada fora dos condutos citados acima (TESTUT & LATARJET, 1986).

O desenvolvimento embrionário do SNC se dá por um complexo processo iniciado pela formação da placa neural, que é constituída por um espessamento do folheto embrionário ectoderma. A placa neural cresce progressivamente até formar um sulco longitudinal denominado de sulco neural, o qual se aprofunda para formar a goteira neural. Os lábios da goteira neural se fundem para formar o tubo neural. Após a formação do tubo neural, o ectoderma que não se diferenciou envolve o tubo neural, isolando-o, assim, do meio externo. A partir do ponto em que o ectoderma não diferenciado encontra os lábios da goteira neural forma-se de cada lado a crista neural, que se encontra dorso-lateralmente em relação ao tubo neural. O tubo neural dá origem aos elementos do sistema nervoso central, enquanto a crista neural dá origem aos elementos do sistema nervoso periférico (MACHADO, 2000).

Desde o seu início, o tubo neural apresenta calibre não uniforme. A parte cranial, que dá origem ao encéfalo, apresenta um maior calibre em relação à parte caudal, que apresenta com calibre uniforme e que constitui a medula espinal (MACHADO, 200).

O SNC pode ainda ser dividido, morfológicamente, em substância branca e substância cinzenta. A substância branca está constituída por células da glia (astrócitos, oligodendrócitos e microglia), células endimárias e fibras nervosas mielinizadas. Já a substância cinzenta está constituída por corpos celulares de neurônios, fibras amielínicas, células da glia (astrócitos e microglia) e células endimárias. (MACHADO, 2000). No sistema nervoso suprasegmentar a substância branca está localizada centralmente, em relação à substância cinzenta, a qual forma o córtex cerebral. Já no SN segmentar, uma divisão metamérica do SNC, que inclui a medula espinal, a substância branca está localizada na periferia e a substância cinzenta, numa posição central. Assim, num corte transversal da medula espinal, nota-se que a substância cinzenta apresenta a forma aproximada de um “H”, podendo ser identificadas duas colunas (anterior e posterior) de cada lado do plano sagital mediano. A coluna posterior possui neurônios responsáveis por receber estímulos sensitivos advindos das raízes dorsais dos nervos espinhais. A coluna anterior possui motoneurônios responsáveis pela inervação dos músculos estriados esqueléticos. Essas duas colunas encontram-se interligadas por uma zona intermediária, que nos segmentos torácicos e nos segmentos lombares altos apresentam-se em continuidade com as colunas laterais, as quais contêm neurônios motores pré-ganglionares responsáveis pela inervação simpática das vísceras (KANDEL *et al.*, 2000).

1.2 Motoneurônios Medulares

Os motoneurônios constituem-se em um proeminente grupo de neurônios colinérgicos do SNC (WENDELL-SMITH *et al.*, 1966). Os neurônios motores medulares podem ser classificados em dois tipos: motoneurônios-alfa, que possuem grande corpo celular, com diâmetro aproximado de 35 μ m no camundongo e inervam as fibras musculares extra-fusais; e motoneurônios-gama, que são menores, possuem axônios mais finos e inervam as fibras musculares intra-fusais (KANDEL *et al.*, 2000). Os motoneurônios alfa e gama estão circundados por dendritos e terminais sinápticos (WENDELL-SMITH *et al.*, 1966). Os motoneurônios-alfa apresentam uma árvore dendrítica que pode receber até 100.000 terminações sinápticas (ULFHAKE & CULLHEIM, 1988). Na região da intumescência lombar da medula espinal há um íntimo contato entre dendritos e motoneurônios adjacentes com terminais sinápticos (CONRADI, 1969). O complexo sináptico é definido, assim, como uma junção especializada entre duas partes neuronais: a membrana do terminal pré-sináptico (que contém vesículas sinápticas) e a membrana pós-sináptica, que contém uma quantidade variável de material eletrondenso (GRAY & GUILLERY, 1966).

Os terminais pré-sinápticos dos motoneurônios localizados na medula espinal podem ser classificados em vários tipos, de acordo com a morfologia e tamanho de suas vesículas sinápticas (CONRADI, 1969). Os terminais sinápticos do tipo C, excitatórios e colinérgicos, estão localizados na superfície do corpo celular e região proximal dos dendritos, possuindo entre 3 e 7 μ m de comprimento. São os maiores terminais em aposição à superfície dos motoneurônios e apresentam grande número de vesículas esféricas com 35 e 50nm de diâmetro. Apresentam,

também, uma cisterna localizada sob a membrana pós-sináptica denominada de cisterna sub-sináptica, estando esta, em continuidade com o retículo endoplasmático granular (característica que difere estes terminais sinápticos dos demais). Os terminais C não são observados em todos os motoneurônios. Por isso, a sua presença é suficiente para classificar uma célula nervosa como sendo um motoneurônio alfa (BODIAN, 1964; GRAY & GUILLERY, 1966; CONRADI, 1969). Mais quatro tipos de terminais sinápticos podem ser encontrados: S, T, F e M. Os terminais do tipo M (*mono synaptic*) são encontrados exclusivamente na porção proximal dos dendritos (CONRADI, 1969). Os terminais do tipo S (*Spherical*) contêm vesículas esféricas com diâmetro entre 35-50nm. Os terminais do tipo T (*Taxi*) possuem as mesmas características, porém a fenda sináptica (espaço de 20-30nm que separa as duas membranas em oposição) apresenta-se mais espessa. O neurotransmissor encontrado nas vesículas sinápticas dos terminais S é o aminoácido excitatório glutamato. Os terminais do tipo F (*Flattened*) apresentam vesículas achatadas, sendo o neurotransmissor predominante a glicina e/ou GABA. Os terminais M possuem vesículas esféricas de 35 à 50nm de diâmetro, tendo como neurotransmissor o glutamato. (CONRADI, 1969; BRÄNNSTRÖM & KELLERTH, 1998).

1.3 Alterações neuronais após lesão nervosa periférica

O Sistema Nervoso Central (SNC) é sensível a agressões e sua capacidade regenerativa é limitada. Após uma lesão, na maioria dos casos, o tecido nervoso não se regenera. Quando há um processo reparativo, este ocorre de forma incompleta, deixando danos irreversíveis (MORAN & GRAEBER, 2004).

A estabilização e a manutenção dos circuitos neuronais do SNC constituem-se num processo complexo e pouco conhecido, o qual envolve milhares de neurônios interconectados precisamente por meio de sinapses (HUH *et al.*, 2000; BOULANGER *et al.*, 2001). A plasticidade no SNC está relacionada com a atividade neuronal e esta desempenha a função de estabilizar ou eliminar as conexões quando necessário. Isso parece ser uma propriedade fundamental do SN. Dessa forma, após uma agressão, a plasticidade que ocorre no SNC promove uma remodelação estrutural e funcional de seus circuitos. Uma das modificações mais significativas após uma agressão que resulte na interrupção do contato entre o motoneurônio e as fibras musculares é a retração dos terminais pré-sinápticos da célula axotomizada (PURVES & LICHTAM, 1978; BRÄNNSTRÖM & KELLERTH, 1998). Imediatamente após a lesão, os neurônios axotomizados apresentam uma perda significativa de *inputs*, diminuindo, ou até mesmo, cessando temporariamente a transmissão sináptica (TAKATA & NAGAHAMA, 1983). Ultraestruturalmente observa-se uma redução do número de contatos sinápticos no corpo dos motoneurônios alfa e na região proximal de seus dendritos, sendo os terminais excitatórios do tipo glutamatérgico os mais afetados (LINDÅ *et al.*, 2000). A eliminação preferencial de terminais glutamatérgicos pode ser interpretada como uma forma de se evitar a excitotoxicidade

mediada por este neurotransmissor. (LINDÅ *et al.*, 2000; CULLHEIM *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2004). Nesta condição, o motoneurônio lesionado apresenta um domínio de *inputs* inibitórios. As alterações sinápticas observadas refletem uma reorganização ativa destas em resposta a lesão, o que leva a uma mudança metabólica de um estado de transmissão sináptica para um estado de recuperação dos axônios comprometidos pela lesão (LINDÅ *et al.*, 1992; PIEHL *et al.*, 1993; PIEHL *et al.*, 1998; LINDÅ *et al.*, 2000).

Com isso, a retração sináptica está relacionada a uma ação reparadora do motoneurônio a fim de bloquear a excitotoxicidade causada por terminais glutamatérgicos após lesões (LINDÅ *et al.*; 2000).

1.4 Astrócitos e a astrogliose reativa

A glia, presente no microambiente medular, merece destaque durante os processos de plasticidade sináptica. Até pouco tempo, as células gliais eram consideradas apenas como elementos estruturais passivos, desempenhando papel pouco relevante na homeostasia do SN. Porém, novos estudos indicam que estas células são capazes de atuar efetivamente durante os eventos de transmissão e plasticidade sináptica (DEROUICHE *et al.*, 2002; ARAQUE & PEREA, 2004). A ativação das células gliais é uma característica subsequente a lesões no SNC e no SNP. A proliferação de astrócitos e microglia, decorrentes de processos degenerativos no SNC, tem como objetivo fagocitar fragmentos axonais e reestabelecer a homeostasia do tecido nervoso. Notadamente, há evidências de que as mesmas condições que ativam a microglia, também são responsáveis pela ativação dos astrócitos (ECHEVERRY *et al.*, 2007). Esta resposta pode ser reconhecida pela hipertrofia da macroglia e aumento da expressão de GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Funcionalmente, essa ativação é caracterizada pelo aumento de fatores tróficos e uma variedade de citocinas (ECHEVERRY *et al.*, 2007). A liberação desses fatores pode contribuir para a formação de tecido cicatricial no SNC (ALDSKOGIUS & KOZLOVA, 1998).

Os astrócitos apresentam projeções citoplasmáticas que representam de 70 a 80% de sua superfície de membrana, sendo particularmente abundantes ao redor das terminações nervosas (WOLF, 1970), onde formam processos perissinápticos (DEROUICHE & FROTHER, 2001). As projeções citoplasmáticas astrocitárias têm a capacidade de alterarem rapidamente os seus volumes, regulando, assim, o ambiente perissináptico (HANSON & RÖNNBÄCK, 1995).

Assim, há evidências de que tais projeções astrocitárias sejam de grande importância na modulação da excitabilidade neuronal e, conseqüentemente, na transmissão nervosa (KANG *et al.*, 1998; GROSCHE *et al.*, 1999; ARAQUE & PEREA, 2004), conferindo a essas células um alto grau de sensibilidade a mudanças no microambiente do neurópilo (CASTONGUAY *et al.*, 2001). Ou seja, os astrócitos possuem uma influência direta na estabilização e manutenção de contatos sinápticos, fornecendo, assim, um microambiente favorável ao processo de regeneração dos neurônios lesionados (EMIRANDETTI *et al.*, 2006).

Acredita-se que os astrócitos, através de suas amplas funções, bem como da plasticidade (reestruturação) de suas projeções citoplasmáticas, sejam elementos fundamentais nos processos de plasticidade sináptica após uma lesão nervosa (ALDSKOGIUS *et al.*, 1999). Paralelamente às alterações observadas nos motoneurônios axotomizados, os astrócitos também apresentam alterações morfológicas e funcionais características, que em conjunto, são denominadas de astrogliose, gliose reativa ou astrogliose reativa (McGRAW *et al.*, 2001; PEKNY, 2001). Entre as mudanças celulares está o aumento da expressão de GFAP (ECHEVERRY *et al.*, 2007), constituinte da rede de filamentos intermediários dos astrócitos concomitantemente ao aumento do RNAm dessa proteína (TETZLAFF *et al.*, 1988).

Em resposta à lesão nervosa, os astrócitos também aumentam a expressão de moléculas de MHC I, de maneira semelhante aos neurônios axotomizados, o que parece ter importante função no processo de eliminação sináptica. A importância deste fenômeno foi verificado por OLIVEIRA *et al.* (2004), onde descreveram que camundongos deficientes para a expressão de MHC I apresentavam uma astrogliose reativa mais intensa após a axotomia do nervo isquiático.

Dessa forma, pode-se inferir que a expressão de moléculas de MHC I é capaz de influenciar o nível de resposta astrogliar após a lesão, interferindo, portanto, no processo de plasticidade e regeneração sináptica (REIER *et al.*, 1989).

Como a expressão da proteína GFAP é aumentada, caracteristicamente, em astrócitos próximos de motoneurônios lesionados (GRAEBER & KREUTZBERG, 1986; NORTON, 1999), esta se constitui num eficiente marcador de seus processos citoplasmáticos (PEKNY, 2001).

1.5 Complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I) no Sistema Nervoso Central

O complexo MHC I é um heterodímero formado por uma cadeia polipeptídica alfa e outra cadeia beta, além de uma subunidade, a microglobulina beta 2 (THORSBY, 1999). Estas moléculas são proteínas transmembrana polimórficas encontradas na superfície de quase todas as células nucleadas (PLOEGH *et al.*, 1981). BABBIT *et al.* (1985) propuseram que no SNC intacto, a expressão do MHC I é variável, sendo normalmente baixa. Em contraposição, HUH *et al.* (2000) observaram a expressão de moléculas MHC I em várias populações neuronais e, em seu estudo, apesar dos mecanismos intrínsecos do processo de plasticidade do SNC serem ainda virtualmente desconhecidos, propuseram um mecanismo envolvendo a expressão de MHC I. Esses autores demonstraram que camundongos transgênicos, incapazes de expressar MHC I, apresentavam uma falha no processo de segregação das aferências provenientes da retina para o corpo geniculado lateral, durante o desenvolvimento do sistema visual. Com esta observação os autores chegaram à conclusão de que o sinal proveniente do MHC I, produzido tanto pelos neurônios quanto pela glia circunjacente, é de fundamental importância para a remoção de conexões sinápticas extranumerárias durante o desenvolvimento do sistema visual.

Alguns estudos mostram que o trofismo do tecido nervoso também pode estar relacionado com a interação entre os neurônios e os linfócitos (HAMMARBERG *et al.*, 2000). O reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos T é mediado por moléculas de MHC I. Os genes de MHC classe I são induzíveis em células gliais e neurônios durante infecções virais, inflamação, tumores e exposição à citocinas, como por exemplo, interferon-beta (IFN- β)

(ZANON & OLIVEIRA, 2006). Esses mesmos autores demonstraram que o tratamento com IFN- β em camundongos C57BL/6J não interfere no nível basal de MHC I e não levou a qualquer efeito colateral que pudesse ser detectado em termos de mudanças comportamentais e morfológicas. Por outro lado, após uma axotomia do nervo isquiático, esses camundongos apresentavam uma elevação de 40% da expressão de MHC I em relação aos camundongos não tratados com IFN- β .

OLIVEIRA *et al.* (2004) investigaram a hipótese de que a eliminação sináptica após a axotomia do nervo isquiático fosse, pelo menos em parte, dependente da presença do MHC I. Para isso, realizaram a transecção do nervo isquiático em camundongos deficientes para a expressão da proteína microglobulina beta-2, uma subunidade do complexo de MHC I. Uma semana após a lesão, os motoneurônios foram identificados e os terminais sinápticos em contato com o corpo celular analisados em nível ultraestrutural, calculando-se assim, a cobertura sináptica remanescente. Os resultados obtidos indicaram que os camundongos deficientes para a microglobulina beta-2 apresentaram uma maior eliminação sináptica, principalmente de terminais inibitórios, em comparação com os camundongos controle, indicando que em camundongos adultos, após uma lesão nervosa, o MHC I desempenha um papel fundamental na estabilização seletiva das sinapses inibitórias, contribuindo para que o processo de retração sináptica ocorra de forma específica. Tais alterações podem ter implicações funcionais, como por exemplo, o aumento de morte neuronal e/ou diminuição da capacidade regenerativa dos neurônios lesionados (OLIVEIRA *et al.*, 2004). SABHA *et al.* (2008) propuseram que a expressão precoce de MHC I promove eventos de plasticidade sináptica logo após a lesão, permitindo que os neurônios concentrem seu metabolismo na regeneração axonal, uma vez que

ocorre uma redução significativa dos “*inputs*” pré-sinápticos. Esses mecanismos podem ter grande importância para a determinação da capacidade regenerativa axonal do neurônio axotomizado entre as linhagens MDX e C57BL/10.

1.6 Distrofia Muscular de Duchenne

As distrofias musculares fazem parte de um grupo de doenças degenerativas do sistema muscular, as quais são caracterizadas por degeneração muscular e alterações estruturais na junção neuromuscular. A forma mais comum é a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) (WHITEHEAD *et al.*, 2006), que atinge aproximadamente 1 em cada 3500 nascidos vivos (BALABAN *et al.*, 2005; JUDGE *et al.*, 2005; WITHEHEAD *et al.*, 2006; RADLEY *et al.*, 2007). É uma doença determinada geneticamente onde o cromossomo X apresenta mutações na região Xp21 que codifica o gene responsável pela produção da distrofina (PEARCE, 2005).

A distrofina é uma proteína que está localizada adjacente ao sarcolema dos miócitos (ARAHATA *et al.*, 1988; CHELLY *et al.*, 1988; CARRETTA *et al.*, 2001). Junto com o complexo glicoproteína-distrofina, tem as funções de manter as ligações entre o citoesqueleto e a matriz extracelular, manter a integridade da membrana celular, distribuição de forças laterais entre as fibras musculares e comunicar o meio intra e extracelular (LOWE *et al.*, 2006). A sua ausência é caracterizada por degeneração progressiva e fraqueza da musculatura esquelética, e uma inabilidade de reparação adequada do tecido muscular, sendo que este vai sendo substituído gradualmente por tecido adiposo e conectivo (WHITEHEAD *et al.*, 2006).

A DMD é normalmente diagnosticada entre 2 e 5 anos de idade (BALABAN *et al.*, 2005) é inexoravelmente fatal e geralmente os pacientes morrem por volta da segunda década de vida, devido ao comprometimento do músculo cardíaco e/ou do diafragma (JUDGE *et al.*, 2005; WHITEHEAD *et al.*, 2006).

A distrofia muscular de Duchenne é caracterizada, em camundongos MDX (sigla em inglês para distrofia muscular com mutação no cromossomo X), por um conjunto de degeneração de fibras musculares com intenso infiltrado inflamatório (NONAKA, 1998). A mionecrose nos camundongos MDX, frequentemente é precedida por um colapso e desprendimento do sarcolema da lâmina basal e subsequente degeneração da fibra muscular associada com extenso processo inflamatório. Macrófagos, linfócitos T CD4+ e T CD8+ representam os principais constituintes da população de células inflamatórias que cercam o processo de degeneração das miofibras (McDOWALL *et al.*, 1990; SPENCER *et al.*, 2001). Nesse aspecto, LAGROTA-CANDIDO *et al.* (2002) demonstraram que, durante o processo de degeneração muscular, há um acúmulo de células T CD4+ e T CD8+ nos músculos esqueléticos de camundongos MDX com 4 semanas de vida. Além disso, durante o período de regeneração muscular, há proliferação de linfócitos B e produção de IFN- β pelos linfócitos.

Atualmente, muito se sabe sobre o acometimento muscular ao longo do curso da DMD, mas poucos estudos estão voltados para os efeitos no SNC, mais especificamente no microambiente do motoneurônio medular. Sabe-se que durante a evolução da doença, os terminais axonais entram num ciclo de denervação (retração) e reinervação (brotamento). Este ciclo pode repercutir de forma retrógrada nos corpos celulares dos motoneurônios alfa-medulares, ou seja, após uma lesão que resulte na interrupção do contato entre o motoneurônio com suas fibras musculares alvo, uma série de alterações ocorre no corpo celular do neurônio (como por exemplo, presença de edema no corpo celular, deslocamento do núcleo para a periferia do corpo celular e a diminuição da eletrondensidade juntamente com a dissolução dos

corpúsculos de Nissl), sendo, em conjunto, denominadas cromatólise (ROMANES, 1946; LIEBERMAN, 1971; ALDSKOGIUS & SVENSSON, 1993).

PASTORET & SEBILLE (1995) demonstraram que, em camundongos MDX, a partir da segunda semana de vida algumas alterações nas fibras musculares são detectadas, como por exemplo, núcleo central (indicativo de regeneração da fibra muscular após uma degeneração) e infiltrados celulares. Isso ocorre, provavelmente, devido ao primeiro ciclo de degeneração/regeneração muscular. Na terceira semana de vida, essas alterações são disseminadas na maioria dos músculos. Esses mesmos autores mostraram que na sexta semana de vida os músculos dos membros posteriores possuem por volta de 50% das suas fibras musculares com núcleos centrais.

No SNC de humanos e de outros primatas a expressão da distrofina foi demonstrada por HUARD *et al.* (1992) no cerebelo, no córtex cerebral, no hipocampo e na medula espinal. No entanto, LIDOV *et al.* (1993) demonstraram que nos camundongos a distrofina é expressa quase que exclusivamente nas células piramidais e nos demais neurônios do córtex cerebral e nas células de Purkinje. SBRICCOLI *et al.* (1995) sugeriram que a distrofina localizada no SNC tem uma importante função no desenvolvimento e manutenção nas propriedades estruturais e funcionais nas interligações entre os neurônios. Uma evidência de conexões anormais em cérebro de camundongos MDX adultos foi demonstrada, primeiramente, por CARRETTA *et al.* (2001).

SBRICCOLI *et al.* (1995) demonstraram que em camundongos MDX há uma diminuição do número de axônios do tracto córtico-espinal. Essa alteração no tracto córtico-espinal pode ser justificada através do papel desempenhado pela distrofina no córtex cerebral e pela completa perda da sua expressão no cérebro dos camundongos MDX. Ou seja, ela desempenha um importante papel na migração e maturação das células neuronais no córtex cerebral.

1.7 Fator Estimulador de Celulas Granulócitas (G-CSF).

O fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) é uma glicoproteína com 19,6 kilodaltons e membro da família de citocinas de fatores de crescimento, descrita há mais de vinte anos, inicialmente como uma indutora da diferenciação da célula leucêmica monocitária WEHI-3B (BEGLEY et al., 1986 e BURGESS & METCALF, 1980). Possui aprovação da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e é comumente utilizada para tratar neutropenia, (BURGESS & METCALF, 1980) ou para transplantes de medula óssea (WELTE et al., 1985; BEGLEY et al. 1986). Incluem-se como fontes de G-CSF os monócitos, células mesoteliais, fibroblastos e células endoteliais. O G-CSF estimula o crescimento de precursores de neutrófilos e regula crucialmente a sobrevivência de neutrófilos maduros, pós-mitóticos, através da inibição de apoptose (WELTE et al., 1985; BEGLEY et al. 1986; HU & YASUI, 1997). A administração de G-CSF mobiliza células-tronco e progenitoras da medula óssea para o sistema circulatório, que por sua vez atravessam a barreira hemato-encefálica e se dirigem à área acometida no SNC. Além disso, possui um efeito neuroprotetor aparentemente multimodal, incluindo-se a atividade anti-apoptótica em neurônios, regeneração da vascularização (LEE et al., 2005), efeito antiinflamatório (HARTUNG, 1998 e PIAO et al., 2009) e estimulação de neurogênese endógena (PIAO et al., 2009) .

Desde o início desta década, alguns trabalhos têm demonstrado a atividade do G-CSF no sistema nervoso central (SNC). LEE et al. (2005) analisaram os efeitos do G-CSF sobre a angiogênese e a recuperação neurológica após isquemia cerebral em ratos tratados. Seus resultados demonstraram que, após a lesão, o G-CSF aumentou a produção de células endoteliais

e o comprimento vascular na área isquêmica. Concomitantemente, houve uma recuperação neurológica funcional induzida pelo G-CSF. Além disso, esses autores chegaram à conclusão que o G-CSF exerce um efeito neuroprotetor, o qual reduz a extensão do infarto e o infiltrado inflamatório. Em outro estudo ZAVALA et al. (2002) demonstraram redução dos sinais clínicos da esclerose múltipla em camundongos induzidos à EAE (encefalomielite autoimune experimental) tratados com G-CSF antes e durante o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença. Entre os efeitos promovidos pelo G-CSF está a integridade da bainha de mielina de axônios localizados no cerebelo, redução no recrutamento de células T para o SNC, discretos sinais de processos inflamatórios e também limitação na produção de citocina TNF- α , a qual está associada a infiltrados e déficits neurológicos precoces.

BALDO et al., (2008) demonstraram que o pré-tratamento de G-CSF em ratos infartados diminuiu a extensão da lesão no músculo cardíaco, promovendo sua reestruturação e recuperação em relação aos camundongos não tratados. Além disso, esses mesmo autores demonstraram que em camundongos pré-tratados com G-CSF houve um aumento mais intenso dos níveis de Cx43 (proteína de junção *gap*) na musculatura ventricular, quando comparados aos camundongos controle, promovendo dessa forma, um aumento da estabilidade elétrica no miocárdio isquêmico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Investigar, através de técnicas de imunohistoquímica, microscopia eletrônica de transmissão, cultura primária e imunocitoquímica, as possíveis alterações sinápticas dos motoneurônios alfa-medulares e a resposta astrocitária no microambiente medular em camundongos MDX tratados com G-CSF e submetidos à axotomia do nervo isquiático após o primeiro ciclo de degeneração/regeneração muscular.

- Estudar a regeneração nervosa periférica após esmagamento do nervo isquiático associada ao tratamento com G-CSF.

- Analisar as possíveis alterações histológicas no músculo sóleo em camundongos MDX tratados com G-CSF e compará-los com camundongos não tratados após o primeiro ciclo de degeneração/regeneração muscular.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a possível retração sináptica nas linhagens C57BL/10 e MDX após o primeiro ciclo de degeneração/regeneração muscular, subsequente à axotomia do nervo isquiático e tratamento com G-CSF;
- Analisar a modulação da expressão de GFAP, G-CSFR e MHC I em culturas primárias (tratadas e não tratadas com G-CSF) de astrócitos oriundos das linhagens C57BL/10 e MDX;
- Analisar a disposição e comportamento dos *inputs* dos motoneurônios alfa medulares na intumescência lombar, através da microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliar o número e parâmetros morfométricos referentes aos axônios em regeneração de camundongos MDX, após lesão de nervo periférico e tratamento com G-CSF;
- Estudar e comparar ultraestruturalmente os nervos (tratados e não tratados com G-CSF) submetidos à lesão por esmagamento;
- Analisar a recuperação funcional do nervo isquiático comparativamente entre o grupo tratado e o grupo não tratado com G-CSF;

- Realizar a contagem de fibras musculares degeneradas e regeneradas de camundongos MDX tratados e não tratados com G-CSF após o primeiro ciclo de degeneração/regeneração muscular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimentos “*in vivo*”

Foram utilizados camundongos C57BL/10 e MDX, machos com 6 semanas (Tabela 1 e 2), obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os camundongos foram agrupados em gaiolas plásticas, com livre acesso à ração e água *ad libitum*, com controle de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) e à temperatura de 21°C. Os experimentos foram conduzidos seguindo-se as normas de ética na experimentação animal, de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto n° 1776-1.

Os camundongos foram divididos em 4 grupos (axotomia tratado, axotomia/sem tratamento, sem lesão/tratado e sem lesão/sem tratamento), totalizando 220 camundongos – tabela 1 e 2. Nos grupos tratados foram administrados, por via subcutânea, 200 µg/kg/dia de G-CSF durante sete dias antes e sete dias após a axotomia do nervo isquiático.

Grupo	Experimentos	Técnica (n)			
		<i>Imunoistoquímica</i>		<i>Microscopia Eletrônica</i>	
		C57BL/10	MDX	C57BL/10	MDX
1	Axotomia + G-CSF (6 semanas)	5	5	5	5
2	Axotomia + Placebo (6 semanas)	5	5	—	—
3	Axotomia (6 semanas)	5	5	5	5
4	Controle + G-CSF (6 semanas)	5	5	5	5
5	Controle (6 semanas)	5	5	5	5

Tabela 1: Resumo dos grupos e técnicas utilizadas nos camundongos submetidos à axotomia do nervo isquiático

Grupo	Experimentos	Técnica (n)					
		<i>Imunoistoquímica</i>		<i>Microscopia Eletrônica</i>		<i>Função Motora</i>	
		C57BL/10	MDX	C57BL/10	MDX	C57BL/10	MDX
1	Esmagamento + G-CSF (6 semanas)	5	5	5	5	5	5
2	Esmagamento + Placebo (6 semanas)	5	5	5	5	5	5
3	Esmagamento (6 semanas)	5	5	5	5	5	5
4	Controle + G-CSF (6 semanas)	5	5	5	5	—	—
5	Controle (6 semanas)	5	5	5	5	—	—

Tabela 2: Resumo dos grupos e técnicas utilizadas nos camundongos submetidos ao esmagamento do nervo isquiático

3.1.1 Lesão do nervo isquiático

Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente em condições de assepsia com mistura de Vetaset (cetamina, Fort Dodge, 50mg/kg) e Kensol (xilazina, Körnig, 10mg/kg), na quantidade de 0,12 ml/25g de peso corpóreo. Após a tricotomia da face posterior da coxa esquerda, foi realizada a incisão da pele (aproximadamente 1,5cm de comprimento) na região média da coxa, utilizando-se um bisturi. A pele e a musculatura da coxa foram cuidadosamente afastadas, expondo-se o nervo isquiático para realização da lesão ao nível do forame obturado (Figura 1).

A transecção do nervo isquiático foi realizada com uma microtesoura, sendo um segmento de 3mm do coto distal do nervo removido e o coto distal desviado de sua direção natural no intuito de evitar-se um realinhamento entre os cotos (Figura 1C).

O esmagamento do nervo esquerdo foi realizada ao nível do forame obturado com o auxílio de uma pinça nº 4 com pressão constante e padronizada para todos os camundongos durante 10 segundos (XIN et al., 1990). Um nó cirúrgico no tecido muscular adjacente ao local da lesão foi realizado para marcação do local onde o nervo foi esmagado (Figura 1D).

Ao final de cada experimento a musculatura foi reposicionada e a pele suturada. Após a cirurgia os camundongos foram mantidos no biotério do Laboratório de Regeneração Nervosa do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp até o momento da eutanásia.

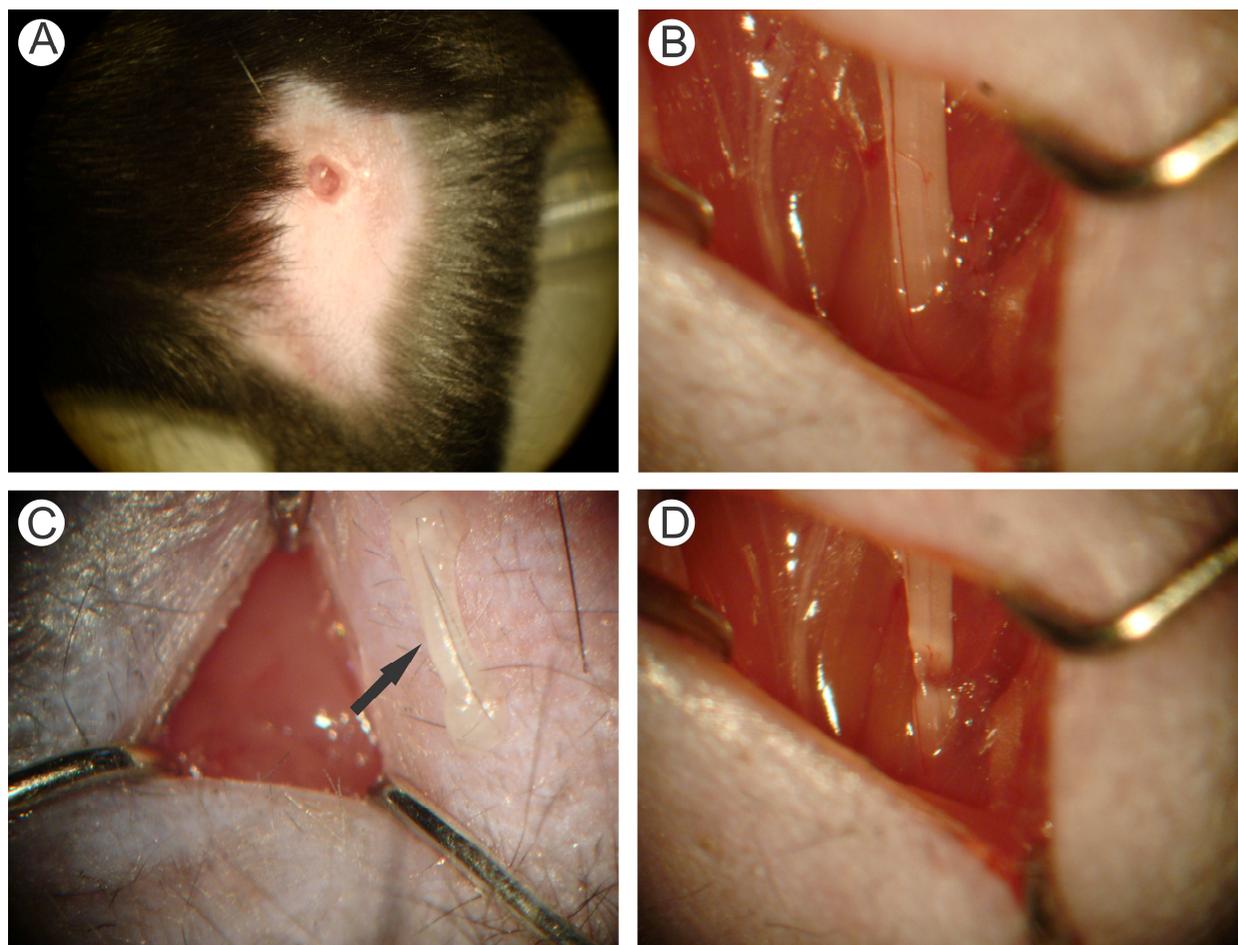


Figura 1 – Figura A – Tricotomia na região da face posterior da coxa esquerda e realização de uma incisão na pele na região média da coxa, paralela e posteriormente ao fêmur, utilizando-se um bisturi. Figura B – A pele e a musculatura da coxa foram cuidadosamente afastadas, expondo-se o nervo isquiático para a realização das lesões ao nível do forame obturado. Figura C – Figura mostrando o nervo isquiático transecionado. Observe a seta indicando o segmento do nervo isquiático transecionado. Figura D – Figura mostrando o nervo isquiático após ser esmagado com pinça n° 4.

3.1.2 Eutanásia dos camundongos e processamento para imunohistoquímica

Após os períodos de sobrevivência pré-determinados, os camundongos foram submetidos a eutanásia. Para isso, estes foram primeiramente anestesiados com uma mistura de Vetaset (cetamina, Fort Dodge, 50mg/kg) e Kensol (xilazina, Körnig, 10mg/kg), na quantidade de 0,12 ml/25g de peso corpóreo e, em seguida, submetidos à toracotomia. Visando a lavagem total dos vasos e órgãos, os camundongos foram perfundidos transcardiacamente com auxílio de uma bomba de infusão contendo 20 ml de solução de salina (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,38). Para a fixação foi realizada a perfusão de 20 ml de uma solução de formalina (10%) em tampão fosfato de sódio, pH 7,38.

Posteriormente à fixação, os espécimes foram dissecados e mantidos em fixador por 12 horas a uma temperatura de 4°C. Passado este período, as medulas e nervos isquiáticos direito e esquerdo foram congelados e incluídos em *Tissue-Tek* (Miles Inc., USA). Cortes histológicos com 12 µm de espessura foram obtidos em criostato. Para a medula espinal, foram obtidos cortes transversais e cortes longitudinais foram obtidos dos nervos isquiáticos. As secções foram então transferidas para lâminas e estocadas a -20°C até a realização das imunomarcações.

Para a realização da imunohistoquímica, as lâminas foram inicialmente climatizadas e imersas em PBS 0,01M + Triton X100 (3%), sendo posteriormente incubadas em câmara úmida com 150 µl de solução contendo BSA 5% em PBS por 30 minutos. A seguir as secções foram lavadas em PBS 0,01M e os anticorpos primários foram aplicados, sendo o período de incubação de 18 horas. Foram empregados os seguintes anticorpos primários para a medula espinal: cabra

anti-GFAP (1:100, Santa Cruz), coelho anti-Sinaptofisina (1:100, Dako), coelho anti-Iba-1 (1:600, Wako) e rato anti-MHC I, (1:100, Serotec). Para os nervos isquiáticos foram usados: camundongo anti-Neurofilamento (1:100, Chemicon) e cabra anti-p75NTR (1:200, Santa Cruz) . Em seqüência à primeira incubação, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01M e incubadas com os anticorpos secundários CY-2 e/ou CY-3 (Jackson Lab., USA) por 45 minutos. Os espécimes foram lavados em PBS 0,01M e montados em glicerol/PBS 0,01M (3:1), sendo observados em microscópio de fluorescência utilizando-se os filtros para fluoresceína (CY-2) e rodamina (CY-3).

3.1.3 Eutanásia dos camundongos e processamento dos espécimes para microscopia eletrônica

Após anestesia com a mistura de Vetaset (cetamina, Fort Dodge, 50mg/kg) e Kensol (xilazina, Körnig, 10mg/kg), na quantidade de 0,12 ml/25g de peso corpóreo, os camundongos foram submetidos à toracotomia e a seguir perfundidos transcárdiacamente com auxílio de uma bomba de infusão. Inicialmente, visando a lavagem total dos vasos e órgãos, os camundongos foram perfundidos com 20 ml de uma solução salina tamponada e heparinizada (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,38). A fixação foi realizada pela subsequente perfusão de 20 ml de uma solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em tampão fosfato de sódio, pH 7,38.

Após fixação, o conjunto contendo a intumescência lombar e raízes nervosas e os nervos isquiáticos foram dissecados e imersos na mesma solução fixadora por 12 horas, mantidas a uma

temperatura de 4°C. Passado esse período, os elementos do referido conjunto foram lavados em tampão fosfato 0,01M e dissecados sob lupa, sendo a medula espinal reduzida de forma a serem obtidos fragmentos correspondentes à região ipsilateral e contralateral. O nervo isquiático esquerdo foi dividido em quatro fragmentos (proximal 1 e 2; distal 1 e 2) e o direito foi dissecado integralmente. Os fragmentos foram colocados individualmente em frascos contendo tampão fosfato de sódio, pH 7,38. Foram então pós-fixados por um período de 2 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão fosfato de sódio, pH 7,38. Seguindo-se à pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e contrastados com acetato de uranila a 0,5% em solução aquosa de sacarose, por 12 horas. Após a passagem pelo acetato de uranila, os fragmentos foram desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina (Durcupan Fluka). Os blocos foram desbastados e secções semifinas (1 μ m) obtidas e coradas com azul de toluidina 0,25% (Figura 1) para a observação ao microscópio de luz. A seguir, algumas regiões foram selecionadas e os blocos desbastados novamente para serem realizados os cortes ultrafinos (500Å; ultramicrótopo LKB, Bromma 8800) os quais foram coletados em telas de cobre. Após contraste com acetato de uranila e citrato de chumbo, os espécimes foram observados ao microscópio eletrônico Tecnai G² Spirit Bio Tvoen (FEI Company, Holanda), operando a 120KV.

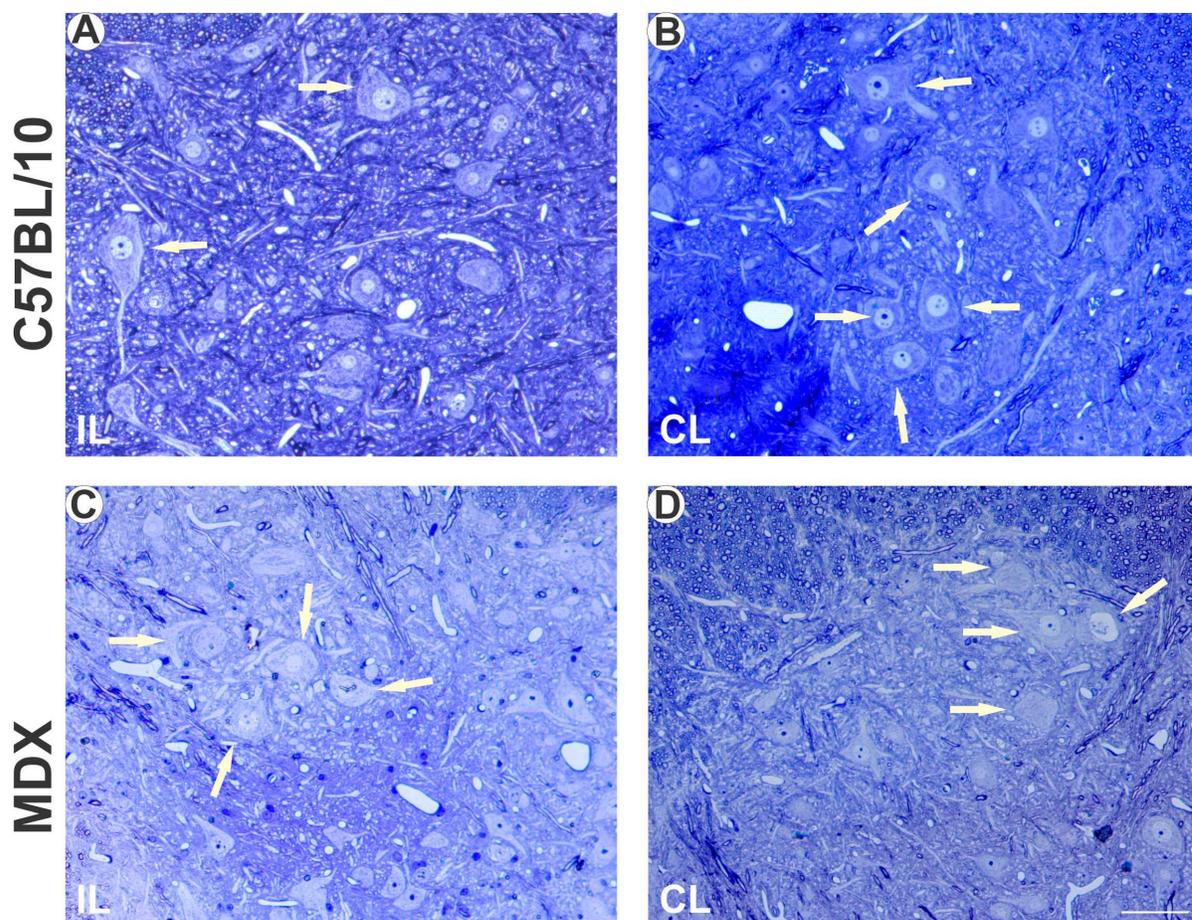


Figura 2 – Fotomicrografias de secções semi-finas coradas com Azul de Toluidina (AT), em aumento de 20X. Motoneurônios alfa-medulares ipsilaterais (IL) da coluna ventral da medula espinal (Figuras A e C) e contralaterais (CL) à axotomia do nervo isquiático (Figuras B e D) são evidenciados. As setas indicam os corpos celulares dos motoneurônios alfa-medulares. Escala = 50 μ m.

3.1.4 Análise das secções ultrafinas

Na medula espinal neurônios com grandes corpos celulares (>25 μm em diâmetro), encontrados no grupo dorso-lateral da coluna anterior da medula e seccionados ao nível do plano nuclear foram identificados como α -motoneurônios pela presença de terminais nervosos do tipo C. Os neurônios foram identificados como axotomizados baseado na ocorrência de modificações cromatolíticas no corpo celular. A superfície das células foi então digitalizada em um aumento de 11000X empregando-se uma vídeo-câmera Eagle 2K (FEI Company, Holanda) conectada a um sistema computadorizado. As imagens foram montadas seqüencialmente num software vetorial e os terminais sinápticos em contato com o corpo celular dos motoneurônios foram identificados (F, S e C) e quantificados por 100 μm de membrana. Adicionalmente, a porcentagem de cobertura da membrana e pelo número de terminais pré-sinápticos parcialmente retraídos foram obtidos. Também foram medidas as distâncias, na superfície do corpo neuronal, entre terminais nervosos consecutivos.

Para os nervos isquiáticos foi utilizada a magnificação de 1200X e foram considerados os seguintes parâmetros: número de axônios mielínicos nos nervos normais, número de axônios mielínicos em regeneração, número de axônios mielínicos em degeneração, diâmetro das fibras mielínicas [DFM], diâmetro dos axônios mielínicos [DAM], espessura da bainha de mielina [EBM] e razão "g" [RZG] ($RZG = DAM/DFM$).

As medidas do diâmetro das fibras e dos axônios mielínicos foram obtidas a partir dos valores dos respectivos perímetros (P), aplicando-se a fórmula $D=P/\pi$. A diferença entre o diâmetro das fibras mielínicas [DFM] e o diâmetro dos axônios mielínicos [DAM] forneceu a

espessura da bainha de mielina [EBM] (MAYHEW & SHARMA, 1984). A RZG corresponde ao quociente entre DAM e DFM, e é um parâmetro morfométrico que expressa a regeneração funcional do nervo (Smith e Koles, 1970). Para os procedimentos morfométricos será utilizado o software Image Tool versão 3.0 (UTHSCSA, USA).

3.1.5 Avaliação Motora e Recuperação Funcional do Nervo Isquiático

Inicialmente foi realizada uma avaliação funcional através do “*Walking Track Test*” (*CatWalk*), (<http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/catwalk>), com os camundongos normais para obter um padrão normal da marcha do animal. Os camundongos foram submetidos à avaliações funcionais, sendo realizadas diariamente nos primeiros 10 dias após a lesão e, posteriormente, em dias intercalados até o 21º dia após o esmagamento do nervo isquiático.

O “*Walking Track Test*” consta de uma passarela com assoalho de vidro (100cm comprimento x 15cm largura x 0,6cm espessura) instalado em uma sala escura onde os camundongos foram habituados a andar ao longo do percurso (Figura 3). Uma lâmpada fluorescente marcou somente onde houve pressão das patas dos camundongos caminhando. O assoalho desse corredor é monitorado por uma câmera Pulnix TM-765E CCD equipada com uma objetiva (Cosimar 8,5 mm) que detecta a média de intensidade em pixels. A intensidade do sinal variou de acordo com a pressão aplicada pela pata do animal. Os sinais adquiridos foram digitalizados pelo PCImage-SG quadro à quadro (Matrix vision GmH, Oppenheimer,.

Alemanha). O programa *CatWalk* adquiriu, armazenou e posteriormente analisou os vídeos dos camundongos caminhando, fornecendo parâmetros para posterior quantificação e análise em planilhas específicas.

Figura 3: Sistema "CatWalk"(Walking Track Test), Figura A - Imagem do equipamento com a câmera de alta resolução em destaque no interior do círculo. Figura B - Plataforma onde os camundongos realizaram as corridas. Figuras D e E - Sistema em funcionamento. Destaque para as impressões plantares. Figuras F e G - Tela do software enquanto o teste está ocorrendo. Destaque para os graficos 3D e os resultados estatísticos fornecidos pelo sistema ao final do teste.

Fonte: <http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/catwalk>

As medições foram feitas de acordo com o seguinte parâmetro:

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

3.1.6. Análise morfológica das fibras musculares do músculo sóleo

Após a perfusão e fixação em formalina 4% em PBS, os músculos foram dissecados e processados para inclusão em paraplast. Secções de 5 µm foram obtidos em micrótomo rotativo, desparafinizados como de rotina e corados em hematoxilina e eosina (H&E) para análises morfológicas. As fibras foram identificadas como íntegras ou sem lesão, fibras em processo de degeneração e fibras regeneradas. As fibras musculares íntegras ou sem lesão foram identificadas como aquelas em que não há presença de turgescência celular e presença de um ou mais núcleos localizados na região periférica da célula muscular (PASTORET & SEBILLE, 1995). As fibras musculares, em processo de degeneração, foram identificadas como aquelas com presença de infiltrado e turgescência celular. As fibras musculares regeneradas foram identificadas pela presença de núcleo não periférico (PASTORET & SEBILLE, 1995).

3.2 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. A análise de eventuais diferenças entre os grupos foi realizada pela Anova, seguido pelo teste t -Student. Em todas as análises foram consideradas uma significância mínima de $p < 0,05$.

3.3 Experimentos “*in vitro*”

3.3.1 Cultura purificada de astrócitos

Culturas purificadas de astrócitos foram estabelecidas através da dissociação do córtex cerebral (McCARTY & De VELLIS, 1980) de camundongos C57BL/10 e MDX neonatos (primeiro ou segundo dia pós-natal) obtidos no CEMIB/UNICAMP. O procedimento foi realizado com material cirúrgico estéril. Desta forma, procedeu-se a dissecação e fragmentação do tecido, o qual foi lavado em PB (0,1M, pH 7,4, Nutricell, Brasil) e imerso em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) sem cálcio e magnésio (pH 7,7, Nutricell, Brasil). Em seguida foi realizada a tripsinização (70 µl de tripsina em 4 ml de PB por três minutos) e posterior adição de soro fetal bovino para bloqueio da ação enzimática. A solução resultante foi colocada sobre um coxim de BSA (*bovine serum albumin*, albumina bovina 4% em DMEM) e submetida à centrifugação (1.300 RPM por 10 minutos). O precipitado foi ressuscitado em meio de cultura para células gliais, previamente preparado e aquecido à 37°C. As células foram aplicadas em placa para cultura (Costar, USA) contendo 96 poços (100 µl em cada poço). As placas com as culturas de astrócitos foram mantidas em incubadora sob temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 horas, deu-se início ao tratamento com G-CSF nas dosagens de 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml e 1000 µg/ml durante sete dias consecutivos (ABARCA-HEIDEMANN et al., 2002). Culturas não tratadas foram utilizadas como controle. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.2 Curva de crescimento celular

Após a terceira passagem as células foram semeadas, em triplicata, em placas de 96 wells (Costar, USA). Cada placa foi dividida para que fossem incluídos todos os grupos tratados (controle, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml e 1000 µg/ml). Para cada grupo foram semeados três poços, onde cada poço recebeu uma quantidade inicial de dez mil células e, após 24 horas do plaqueamento, foi iniciado o tratamento com G-CSF. As placas com as culturas de astrócitos foram mantidas em incubadora sob temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. As culturas foram fixadas três, cinco e sete dias após o início do tratamento. Após a fixação, os núcleos celulares foram corados com DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol – Sigma), que identifica o núcleo celular ligando-se às moléculas de DNA, durante dez minutos, e digitalizados utilizando microscópio de fluorescência (Nikon TS100) com filtro para luz ultravioleta. Após serem digitalizadas, as fotos contendo os núcleos corados com DAPI foram analisadas no programa Photoshop CS5 para contabilizar o número total de núcleos contidos em cada foto. Foram quantificadas dez fotos para cada grupo.

3.3.3 Imunocitoquímica

Finalizado o período de tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em DMEM. Após a fixação, as células foram lavadas em PB sem cálcio e magnésio (0,1M, pH 7,4, Nutricell, Brasil) e incubadas durante duas horas com anticorpo primário cabra anti-GFAP (1:100, Santa Cruz), coelho anti-G-CSF *receptor* (1:200, Santa Cruz) e rato anti-MHC I, (1:100, Serotec). Foram, então, novamente lavadas em PB estéril e incubadas durante 45 minutos com anticorpos secundários anti-cabra, anti-coelho e anti-rato, respectivamente, conjugados com CY-3 ou CY-2 (Jackson Lab., USA). Concluído o tempo de incubação, as células foram lavadas e foi realizada citoquímica com DAPI. Desse modo foi possível a quantificação do número de células bem como do acompanhamento do crescimento celular. Após finalização da técnica, as culturas foram mantidas em glicerol/PB 0,01M (3:1) para análise em microscópio de fluorescência.

Para cada grupo (controles e dosagens experimentais) três culturas de células foram incubadas com cada anticorpo, num total de doze poços por grupo. A quantificação foi realizada de maneira similar ao procedimento *in vivo*, utilizando-se o software IMAGEJ (versão 1.33u, *National Institutes of Health*, USA). Assim, seis áreas representativas de cada cultura foram documentadas para quantificação da densidade integrada de pixels. Uma média aritmética foi calculada para cada cultura e, através da análise desses valores, foram realizadas as comparações entre os grupos.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão de MHC I em camundongos sem lesão e submetidos à axotomia do nervo isquiático com e sem tratamento com G-CSF.

A expressão de MHC I foi mensurada em camundongos sem lesão do nervo isquiático e sete dias após serem submetidos à axotomia do nervo isquiático. Os camundongos que não foram submetidos à axotomia do nervo isquiático foram divididos em dois grupos: sem lesão/sem tratamento e sem lesão + G-CSF (Fig.4) Os camundongos submetidos à axotomia do nervo isquiático foram divididos em três grupos: axotomia sem tratamento; axotomia + placebo e axotomia + G-CSF (Fig.5). Na Figura 5 observou-se a imunorreatividade na região do núcleo motor lateral na coluna ventral da medula espinal. A linhagem C57BL/10 demonstrou uma acentuada reatividade na expressão de MHC I em todos os grupos, em relação à linhagem MDX. Os grupos lesionados sem tratamento apresentaram similaridade de expressão de MHC I com o grupo lesionado + placebo (C57BL/10 axotomia sem tratamento, $24,46 \pm 0,26$; C57BL/10 axotomia + placebo, $23,46 \pm 0,25$, $p > 0,05$ – MDX axotomia sem tratamento, $17,45 \pm 0,25$; MDX axotomia + placebo, $16,46 \pm 0,26$, $p > 0,05$, média \pm erro padrão). Quando comparamos os resultados entre as linhagens pudemos constatar uma acentuada redução da expressão nos camundongos MDX ($p < 0,001$ para o grupo sem tratamento e $p < 0,001$ no grupo placebo). Após tratamento com G-CSF pudemos observar um aumento mais intenso da expressão de MHC I nas duas linhagens, sendo que nos camundongos MDX houve um aumento de 24% em relação ao grupo MDX + placebo. A linhagem C57BL/10 apresentou um aumento de 14% em relação ao grupo C57BL/10 + placebo. Pudemos observar, também, um aumento mais intenso na expressão

de MHCI no grupo C57BL/10 tratado em relação ao grupo MDX tratado (MDX lesionado + G-CSF, $21,67 \pm 0,21$; C57BL/10, $27,16 \pm 0,23$, $p < 0,001$). Também foi possível observar que a expressão basal de MHC I no grupos estudados é baixa (contralateral à lesão) e, geralmente, está restrita às regiões perivasculares (Figuras 4A e 4B).

MHC-I

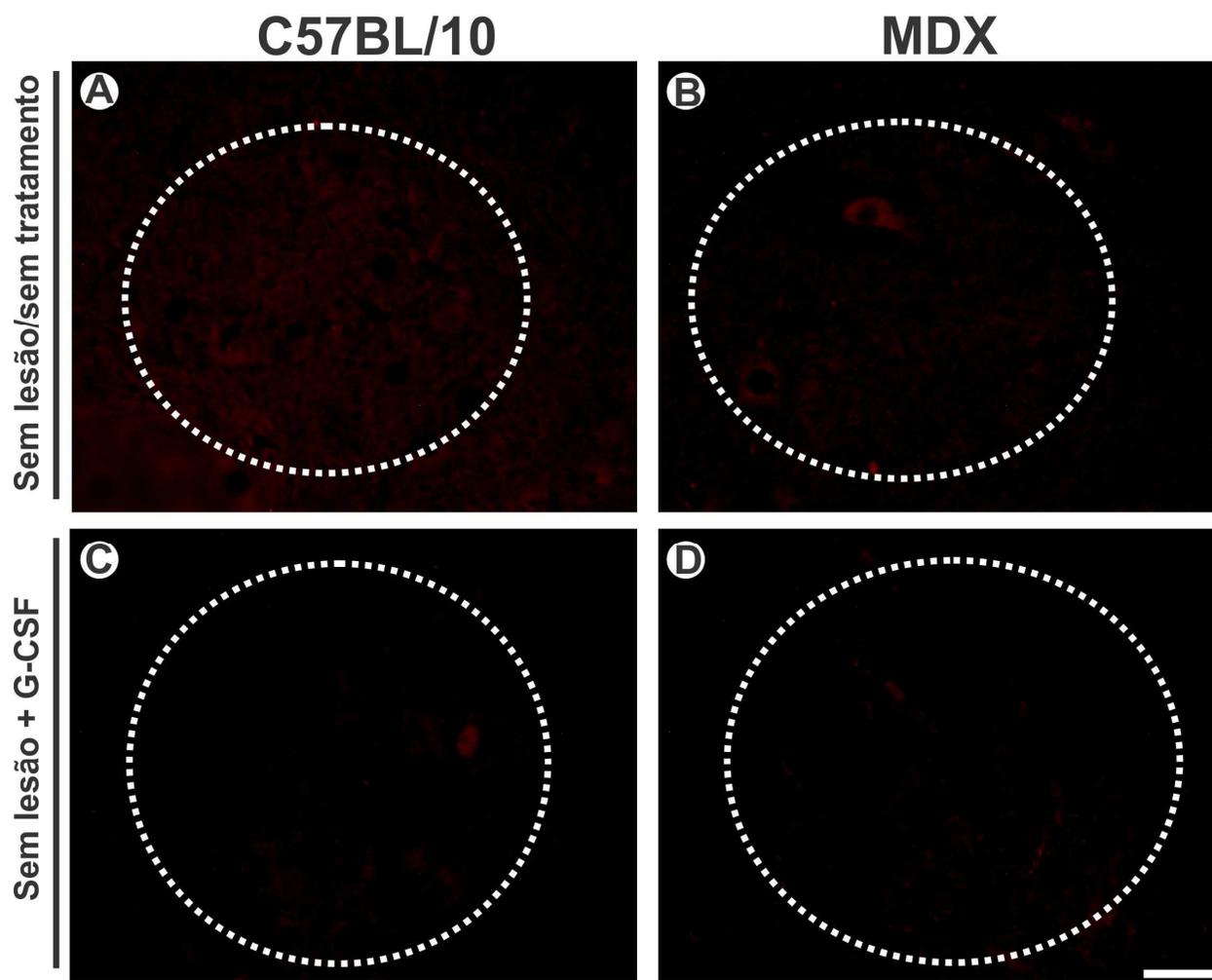


Figura 4 – Imunomarcção anti-MHC I em camundongos não submetidos à axotomia do nervo isquiático. Figuras A e B, mostrando camundongos sem lesão/sem tratamento (C57BL/10 e MDX, respectivamente) e figuras C e D camundongos sem lesão tratados com G-CSF. As áreas circuladas demonstram o núcleo motor do nervo isquiático e os neurônios alfa-medulares de cada linhagem. Escala: 50 μ m.

MHC I

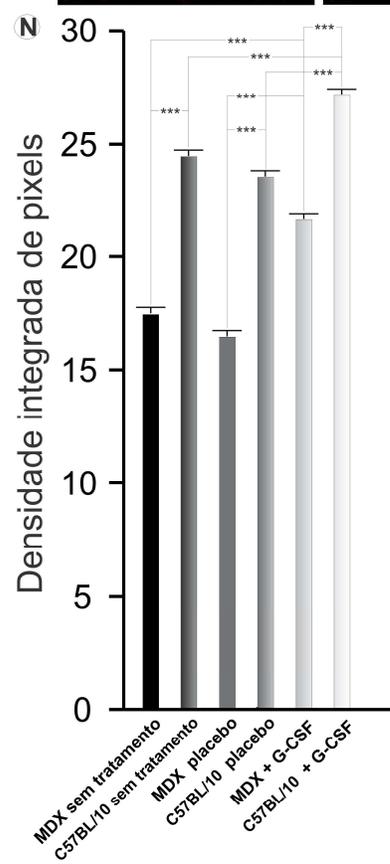
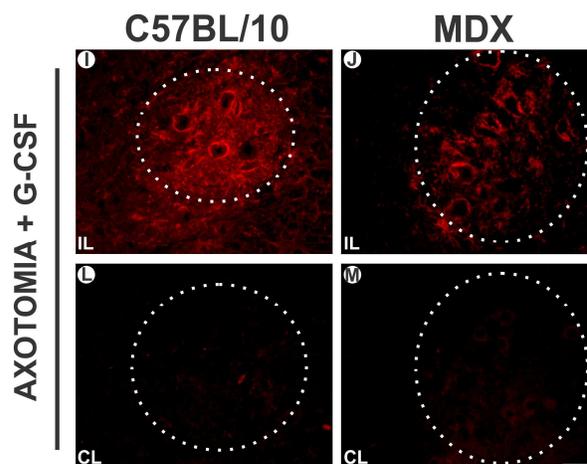
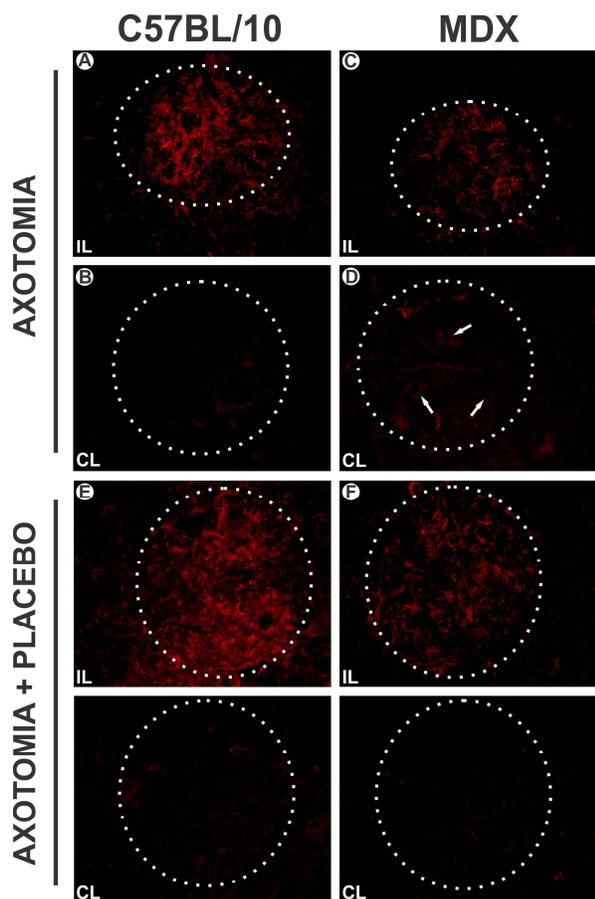


Figura 5 – Imunomarcção anti-MHC I uma semana após axotomia do nervo isquiático. Figuras A e C, mostrando a região ipsilateral (IL) e contralateral da coluna ventral da medula espinal da linhagem C57BL/10 sete dias após a axotomia do nervo isquiático; Figuras B e D, mostrando ipsilateral e contralateral da linhagem MDX sete dias após à axotomia do nervo isquiático; Figuras E e G, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo C57BL/10 axotomia + placebo sete dias após a axotomia do nervo isquiático; Figuras F e H, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo MDX axotomia + placebo sete dias após a axotomia do nervo isquiático; Figuras I e L, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo C57BL/10 axotomia + G-CSF sete dias após à axotomia do nervo isquiático; Figuras J e M, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo MDX axotomia + G-CSF sete dias após a axotomia do nervo isquiático. Repare que há aumento da expressão de MHC I no lado lesionado nas duas linhagens estudadas (áreas demarcadas com um círculo nas figuras A e B). A linhagem C57BL/10 apresentou uma marcação mais intensa de MHC I em relação à linhagem MDX. As setas nas figuras C e D indicam os corpos celulares dos motoneurônios. As áreas circuladas demonstram o núcleo motor do nervo isquiático e os neurônios alfa-medulares de cada linhagem. Figura N, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os lados esquerdos dos grupos estudados. Escala = 50µm.

4.2 Imunorreatividade para sinaptofisina em camundongos sem lesão e submetidos à axotomia do nervo isquiático com e sem tratamento com G-CSF.

A imunorreatividade da proteína sinaptofisina no núcleo motor lateral da coluna ventral da medula espinal, nos camundongos que não foram submetidos à axotomia e sete dias após a axotomia do nervo isquiático, estão demonstradas nas Figura 6 e 7, respectivamente. Na Figura 6A destaca-se a marcação adjacente ao corpo celular dos grandes motoneurônios, onde foi possível observar uma densa reatividade a qual é atribuída ao grande número de sinapses com outros neurônios do SNC. Entretanto, nenhuma distinção da natureza dessas sinapses é possível nesse nível, uma vez que todo terminal pré-sináptico ativo apresenta em seu interior vesículas contendo sinaptofisina. Porém, foi possível a realização de uma estimativa da cobertura sináptica em relação à membrana do motoneurônio baseando-se no nível da imunomarcação para sinaptofisina, como foi descrito por OLIVEIRA *et al.* (2004).

Os grupos sem lesão/sem tratamento e sem lesão + G-CSF estão representados na figura 6 A-B e 6 C-D, respectivamente. A linhagem MDX apresentou uma perda significativa da expressão de sinaptofisina, aproximadamente 25%, em relação à linhagem C57BL/10 (MDX sem tratamento, $7,25 \pm 0,23$; C57BL/10, $9,11 \pm 0,18$, $p < 0,01$). Após o tratamento com G-CSF os camundongos MDX apresentaram um aumento da expressão de sinaptofisina, aproximadamente 80%, em relação aos camundongos MDX sem tratamento ($p < 0,01$ – Figura 6 E). O mesmo pode ser observado com a linhagem C57BL/10, sendo que houve um aumento mais intenso da expressão de sinaptofisina, aproximadamente 53%, após o tratamento ($p < 0,01$). Mesmo com o aumento da expressão de sinaptofisina após tratamento com G-CSF os camundongos MDX

apresentaram uma perda significativa da expressão de sinaptofisina, aproximadamente 7%, em relação aos camundongos C57BL/10 (MDX + G-CSF, $13,05 \pm 0,04$; C57BL/10, $13,95 \pm 0,08$, $p < 0,01$, Figura 6C – D, respectivamente).

A análise contralateral após a axotomia do nervo isquiático demonstrou uma perda significativa da expressão de sinaptofisina nos camundongos MDX em relação aos camundongos C57BL/10 (MDX sem tratamento, $6,78 \pm 0,08$; C57BL/10, $9,91 \pm 0,10$, $p < 0,001$, Figura 7C – D, respectivamente: MDX + placebo, $6,98 \pm 0,07$; C57BL/10, $9,50 \pm 0,05$, $p < 0,01$, Figura 7G – H, respectivamente: MDX + G-CSF, $12,20 \pm 0,21$; C57BL/10, $14,30 \pm 0,10$, $p < 0,01$, Figura 7L – M, respectivamente). Ao comparar o grupo tratado com os grupos sem tratamento e placebo, pudemos observar um aumento da expressão de sinaptofisina nas duas linhagens, sendo que esse aumento foi mais evidente na linhagem MDX (aproximadamente 80% em relação ao grupo sem tratamento e de 79% em relação ao grupo placebo). Na linhagem C57BL/10 pudemos notar um aumento aproximadamente de 45% em relação ao grupo sem tratamento e 50% em relação ao grupo placebo.

A análise ipsilateral notamos uma menor imunorreatividade de sinaptofisina nos camundongos MDX (MDX sem tratamento, $4,80 \pm 0,05$; C57BL/10, $6,67 \pm 0,14$, $p < 0,01$, Figura 7A – B, respectivamente: MDX + placebo, $4,89 \pm 0,08$; C57BL/10, $6,77 \pm 0,11$, $p < 0,001$, Figura 7E – F: MDX + G-CSF, $9,21 \pm 0,37$; C57BL/10, $10,50 \pm 0,10$, $p < 0,01$, Figura 7L – M, respectivamente). A análise entre o grupo tratado e os grupos sem tratamento e placebo demonstrou um aumento mais intenso na linhagem MDX (aproximadamente 92% em relação ao grupo sem tratamento e 89% em relação ao grupo placebo). Na linhagem C57BL/10 pudemos

notar um aumento aproximado de 57% em relação ao grupo sem tratamento e 55% em relação ao grupo placebo.

Ao analisarmos a razão ipsi/contralateral pudemos constatar que não houve diferença entre os grupos e linhagens estudadas (MDX sem tratamento, $0,71 \pm 0,01$; C57BL/10, $0,70 \pm 0,01$, $p > 0,05$, Figura 7N: MDX + placebo, $0,70 \pm 0,01$; C57BL/10, $0,72 \pm 0,01$, $p > 0,05$, Figura 7N: MDX + G-CSF, $0,74 \pm 0,01$; C57BL/10, $0,73 \pm 0,01$, $p > 0,05$, Figura 7N).

Sinaptofisina

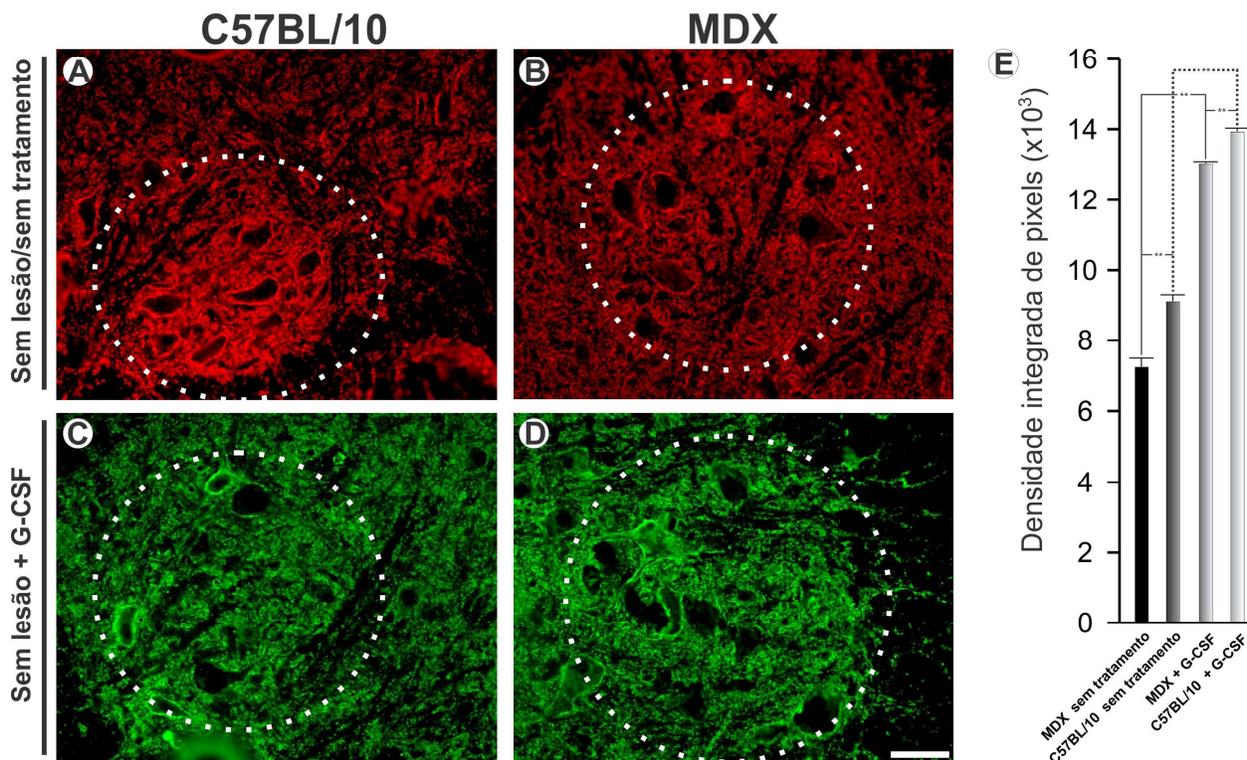


Figura 6 – Imagens qualitativas para imunomarcção anti-Sinaptofisina em camundongos não submetidos à axotomia do nervo isquiático. Figuras A e B, mostrando camundongos sem lesão/sem tratamento (C57BL/10 e MDX, respectivamente). Nessas imagens foi utilizado anticorpo secundário conjugado com CY3. Figuras C e D camundongos sem lesão + G-CSF. Nessas imagens foi utilizado anticorpo secundário conjunto CY2. As áreas circuladas demonstram o núcleo motor do nervo isquiático e os neurônios alfa-medulares de cada linhagem. Figura E, análise quantitativa da densidade integrada de pixels. Escala = 50µm.

Sinaptofisina

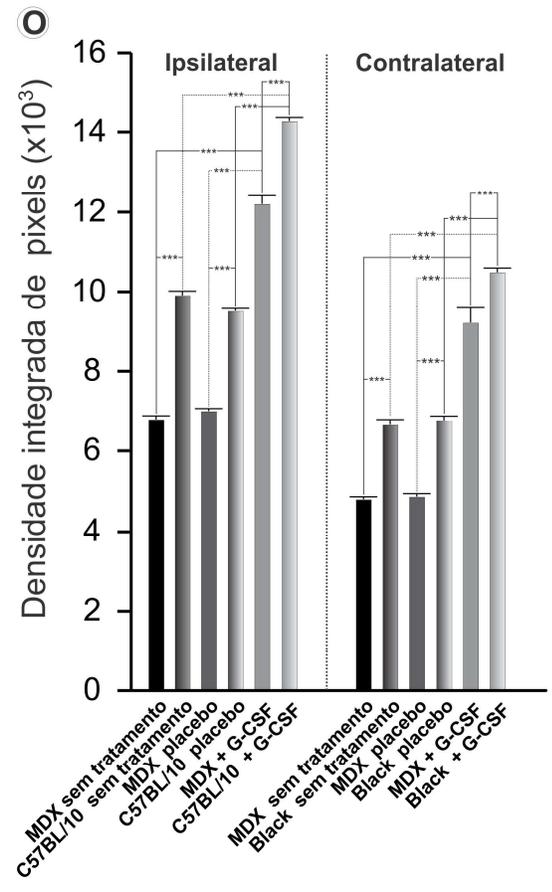
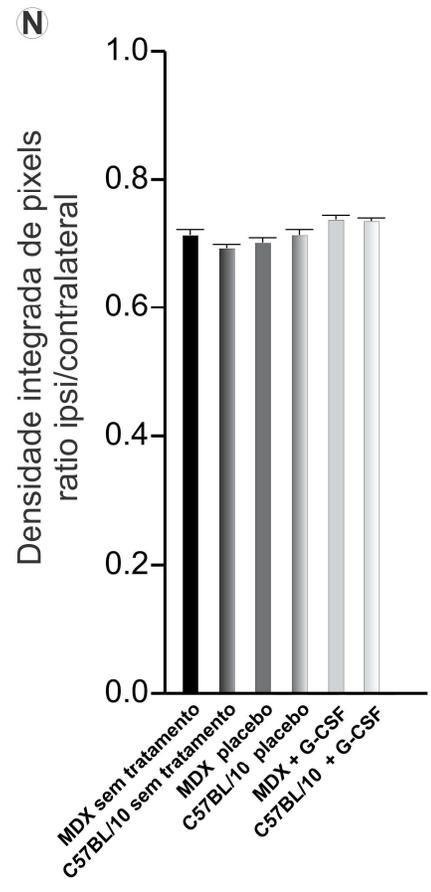
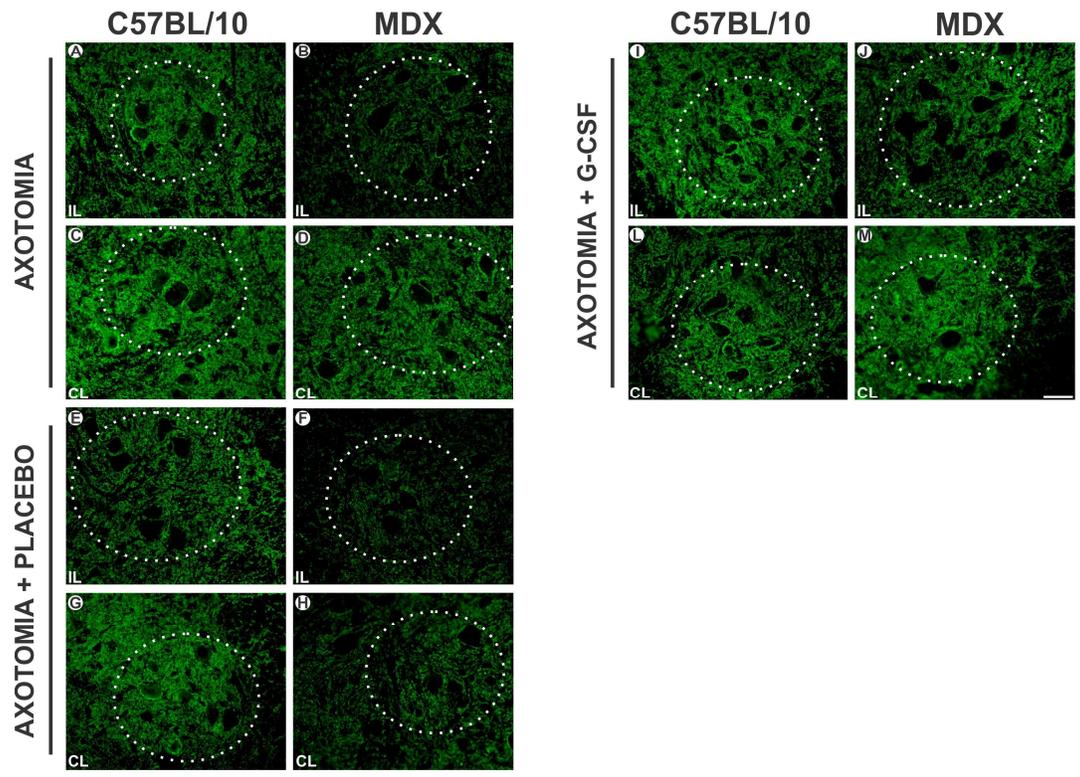


Figura 7 – Imunomarcção anti-sinaptofisina uma semana após axotomia do nervo isquiático. Figuras A e C, mostrando ipsilateral (IL) e contralateral (CL) da coluna ventral da medula espinal da linhagem C57BL/10 sete dias após à axotomia do nervo isquiático; Figuras B e D, mostrando ipsilateral e contralateral da linhagem MDX sete dias após à axotomia do nervo isquiático; Figuras E e G, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo C57BL/10 axotomia + placebo sete dias após à axotomia do nervo isquiático; Figuras F e H, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo MDX axotomia + placebo sete dias após à axotomia do nervo isquiático; Figuras I e L, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo C57BL/10 axotomia + G-CSF sete dias após à axotomia do nervo isquiático; Figuras J e M, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo MDX axotomia + G-CSF sete dias após à axotomia do nervo isquiático. Note que há uma menor cobertura sináptica na linhagem MDX em relação à linhagem C57BL/10 em todos os grupos. Porém, no grupo tratado com G-CSF houve um aumento da imunomarcção de sinaptofisina tanto CL e IL. Figuras N e O, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre razão ipsi/contralateral e os lados direito e esquerdo, respectivamente. As áreas circuladas demonstram o núcleo motor do nervo isquiático e os neurônios alfa-medulares de cada linhagem. Escala = 50µm.

4.3 Astroglíose reativa em camundongos sem lesão e submetidos à axotomia do nervo isquiático com e sem tratamento com G-CSF.

As Figuras 8 e 9 mostram a imunorreatividade das linhagens estudadas para GFAP. As imunomarcações foram utilizadas para analisar o grau de astroglíose reativa ao nível do núcleo motor lateral da coluna ventral da medula espinal após axotomia do nervo isquiático.

Nos grupos sem lesão (Figura 8), pudemos observar um aumento da imunorreatividade para GFAP nos camundongos MDX sem lesão/sem tratamento, em relação aos camundongos C57BL/10 do mesmo grupo (MDX sem tratamento, $7,10 \pm 0,35$; C57BL/10, $4,74 \pm 0,22$, $p < 0,001$, Figura 8A-B). Quando tratados com G-CSF a imunomarcação apresentou-se aumentada nas duas linhagens, sendo que os camundongos MDX continuaram com maior expressão em relação aos camundongos C57BL/10 (MDX + G-CSF $15,64 \pm 0,04$; C57BL/10, $9,53 \pm 0,25$, $p < 0,001$, Figura 8C-D). Na análise entre os dois grupos, pudemos notar um aumento mais intenso nos camundongos tratados com G-CSF, especialmente os da linhagem MDX (aproximadamente 120% em relação ao grupo sem tratamento). Na linhagem C57BL/10 notamos um aumento aproximadamente de 100% em relação ao grupo sem tratamento.

Nos grupos axotomizados (Figura 9) houve uma menor ocorrência de imunorreatividade contralateral em relação ao lado axotomizado, que demonstra elevada imunomarcação para GFAP, demonstrada pela presença de prolongamentos astrocitários GFAP-positivos no microambiente próximo aos grandes motoneurônios do nervo isquiático. Contralateral à lesão, a linhagem MDX apresentou um aumento mais intenso, em torno de 31%, em relação à linhagem

C57BL/10 (MDX sem tratamento, $11,45 \pm 0,39$; C57BL/10, $8,58 \pm 0,10$, $p < 0,05$, Figura 9C-D). No grupo placebo esse aumento foi de 30% em relação aos camundongos C57BL/10 (MDX + placebo, $10,64 \pm 0,16$; C57BL/10, $8,21 \pm 0,11$, $p > 0,001$, Figura 9G-H), e no grupo tratado com G-CSF pudemos observar um aumento aproximado de 24% em relação à linhagem C57BL/10 (MDX + G-CSF $16,34 \pm 0,36$; C57BL/10, $13,25 \pm 0,37$, $p < 0,01$, Figura 9L-M).

Ao compararmos o grupo tratado com os grupos sem tratamento e placebo, pudemos observar que houve um aumento da expressão de GFAP nas duas linhagens, sendo que nos camundongos MDX esse aumento foi de, aproximadamente, 43% em relação ao grupo sem tratamento e de 53% em relação ao grupo placebo. Na linhagem C57BL/10 notamos um aumento aproximado de 45% em relação ao grupo sem tratamento e 54% em relação ao grupo placebo.

Ipsilateral, observamos um aumento mais intenso na expressão de GFAP em todos os grupos estudados da linhagem MDX. No grupo sem tratamento encontramos um aumento aproximado de 30% (MDX sem tratamento, $19,91 \pm 0,22$; C57BL/10, $15,41 \pm 0,42$, $p < 0,001$, Figura 9A-B). No grupo placebo houve um aumento aproximado de 32% (MDX + placebo, $18,02 \pm 0,32$; C57BL/10, $13,73 \pm 0,31$, $p > 0,001$, Figura 9E-F), e no grupo tratado com G-CSF encontramos um aumento de 31% (MDX + G-CSF $28,65 \pm 0,26$; C57BL/10, $21,95 \pm 0,10$, $p < 0,001$, Figura 9I-J). Ao compararmos o grupo tratado com os grupos sem tratamento e placebo, notamos um aumento da expressão de GFAP nas duas linhagens, sendo que nos camundongos MDX esse aumento foi, aproximadamente, de 44% em relação ao grupo sem tratamento e de 59% em relação ao grupo placebo. Na linhagem C57BL/10 notamos um aumento aproximado de 43% em relação ao grupo sem tratamento e 60% em relação ao grupo placebo.

Ao analisarmos a razão ipsi/contralateral pudemos constatar que não houve diferença entre os grupos e linhagens estudadas (MDX sem tratamento, $1,74 \pm 0,05$; C57BL/10, $1,77 \pm 0,04$, $p > 0,05$, Figura 9N: MDX + placebo, $1,68 \pm 0,04$; C57BL/10, $1,68 \pm 0,02$, $p > 0,05$, Figura 9N: MDX + G-CSF, $1,76 \pm 0,03$; C57BL/10, $1,66 \pm 0,05$, $p > 0,05$, Figura 9N).

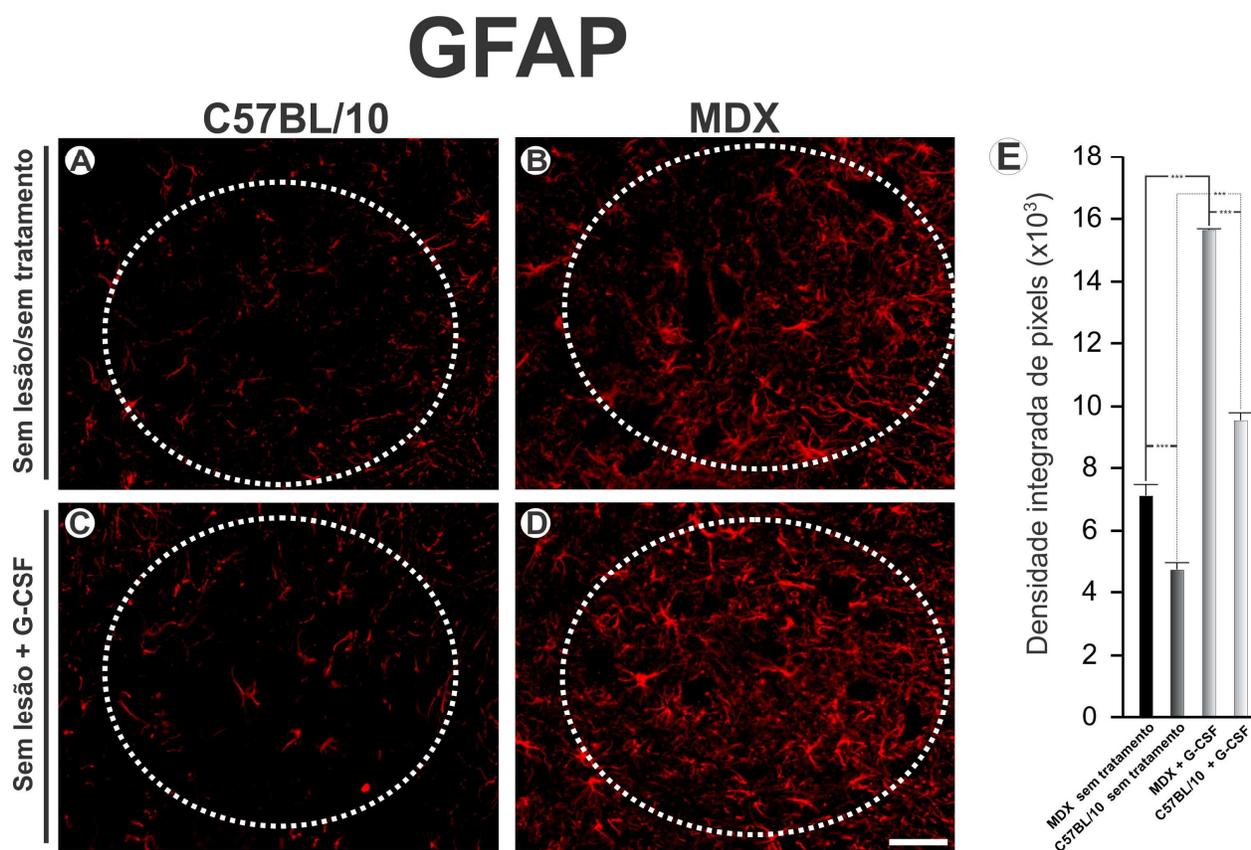


Figura 8 – Imunomarcção anti-GFAP em camundongos não submetidos à axotomia do nervo isquiático. Figuras A e B, mostrando camundongos sem lesão/sem tratamento (C57BL/10 e MDX, respectivamente). Repare que a linhagem MDX apresenta uma maior reatividade astrocitária, demonstrada pela imunomarcção de GFAP. Figuras C e D camundongos sem lesão + G-CSF. Repare que há um aumento da reatividade astrocitária na linhagem MDX após o tratamento em relação à mesma linhagem no grupo sem lesão sem tratamento. As áreas circuladas demonstram o núcleo motor do nervo isquiático e os neurônios alfa-medulares de cada linhagem. Figura E, análise quantitativa da densidade integrada de pixels Escala = 50 μ m.

GFAP

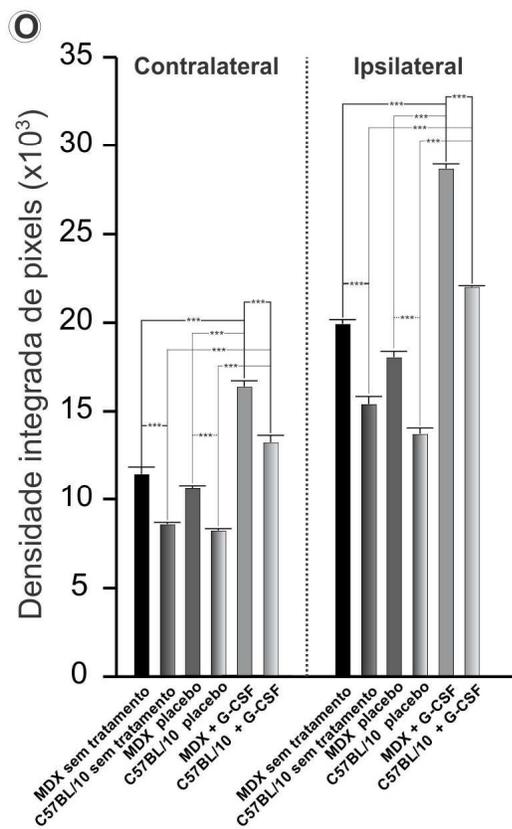
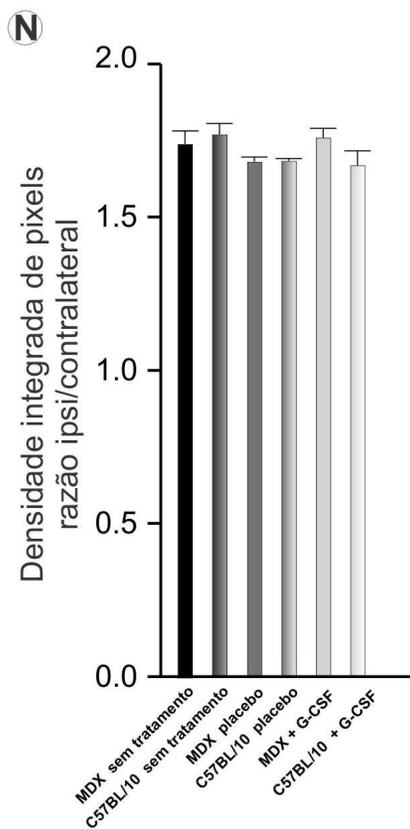
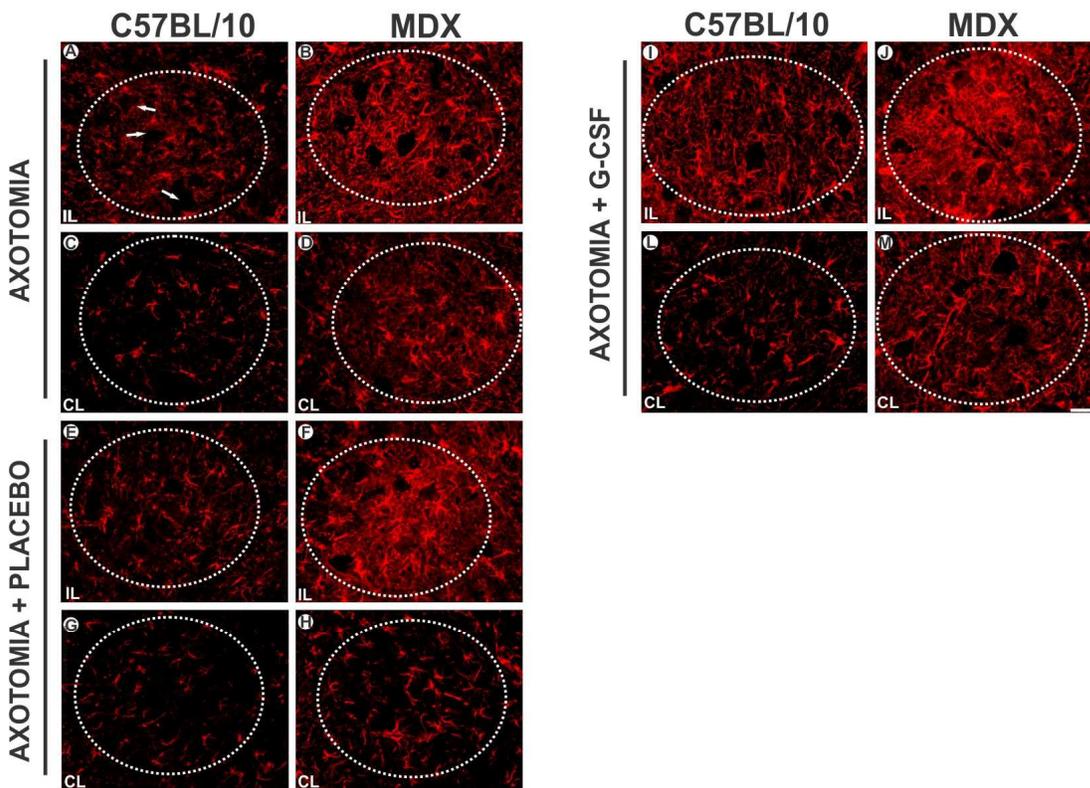


Figura 9 – Imunomarcacão anti-GFAP uma semana após axotomia do nervo isquiático. Figuras A e C, mostrando ipsilateral (IL) e contralateral da coluna ventral da medula espinal da linhagem C57BL/10 sete dias após axotomia do nervo isquiático; Figuras B e D, mostrando ipsilateral e contralateral da linhagem MDX sete dias após axotomia do nervo isquiático; Figuras E e G, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo C57BL/10 axotomia + placebo sete dias após axotomia do nervo isquiático; Figuras F e H, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo MDX axotomia + placebo sete dias após axotomia do nervo isquiático; Figuras I e L, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo C57BL/10 axotomia + G-CSF sete dias após axotomia do nervo isquiático; Figuras 9J e 9M, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo MDX axotomia + G-CSF sete dias após axotomia do nervo isquiático. Note que há uma maior expressão de GFAP ipsi e contralateral na linhagem MDX em relação à linhagem C57BL/10 em todos os grupos. Além disso, o grupo tratado com G-CSF apresentou marcação mais intensa. As áreas circuladas demonstram o núcleo motor do nervo isquiático e os neurônios alfa-medulares de cada linhagem. Figuras N e O, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre razão ipsi/contralateral e os lados direito e esquerdo, respectivamente. Escala = 50 μ m

4.4. Imunorreatividade para IBA-I em camundongos sem lesão e submetidos à axotomia do nervo isquiático com e sem tratamento com G-CSF.

Ao analisarmos a imunorreatividade para IBA-I pudemos observar que sua expressão manteve-se basal nos grupos sem lesão/sem tratamento e sem lesão + G-CSF (MDX sem lesão/sem tratamento, $5,48 \pm 0,02$; C57BL/10, $5,36 \pm 0,02$, $p > 0,05$, Figura 10A-B: MDX sem lesão + G-CSF, $4,85 \pm 0,07$; C57BL/10, $4,80 \pm 0,03$, $p > 0,05$, Figura 10C-D).

Após a axotomia do nervo isquiático, ao analisarmos contralateral à lesão pudemos observar que a imunorreatividade dos grupos sem tratamento e placebo estão similares ao do grupo sem lesão/sem tratamento (MDX sem tratamento, $4,59 \pm 0,05$; C57BL/10, $4,25 \pm 0,03$, $p > 0,05$, Figura 11C-D: MDX + placebo, $4,61 \pm 0,06$; C57BL/10, $4,00 \pm 0,05$, $p > 0,05$, Figura 11G-H). No grupo tratado com G-CSF não houve diferença significativa entre as linhagens (MDX + G-CSF, $5,51 \pm 0,17$; C57BL/10, $5,23 \pm 0,32$, $p > 0,05$, Figura 11L-M), porém quando a linhagem MDX foi comparada com os grupos sem tratamento e placebo pudemos observar um aumento mais intenso da imunorreatividade de microglia (21% em relação ao grupo sem tratamento e 20% em relação ao grupo placebo).

Ipsilateralmente pudemos observar um aumento mais intenso na expressão de IBA-I em todos os grupos estudados da linhagem MDX e C57BL/10 (MDX sem tratamento, $18,36 \pm 0,20$; C57BL/10, $16,84 \pm 0,14$, $p < 0,001$, Figura 11A-B: MDX + placebo, $18,63 \pm 0,11$; C57BL/10, $17,32 \pm 0,10$, $p > 0,05$, Figura 11E-F: MDX + G-CSF $20,94 \pm 0,17$; C57BL/10, $19,69 \pm 0,11$, $p < 0,01$, Figura 11I-J). Ao compararmos o grupo tratado com os grupos sem tratamento e

placebo, observamos que houve um aumento da expressão de IBA-I nas duas linhagens, sendo que nos camundongos MDX esse aumento foi de, aproximadamente, 14% em relação ao grupo sem tratamento e de 13% em relação ao grupo placebo. Na linhagem C57BL/10 notamos um aumento aproximado de 17% em relação ao grupo sem tratamento e 14% em relação ao grupo placebo.

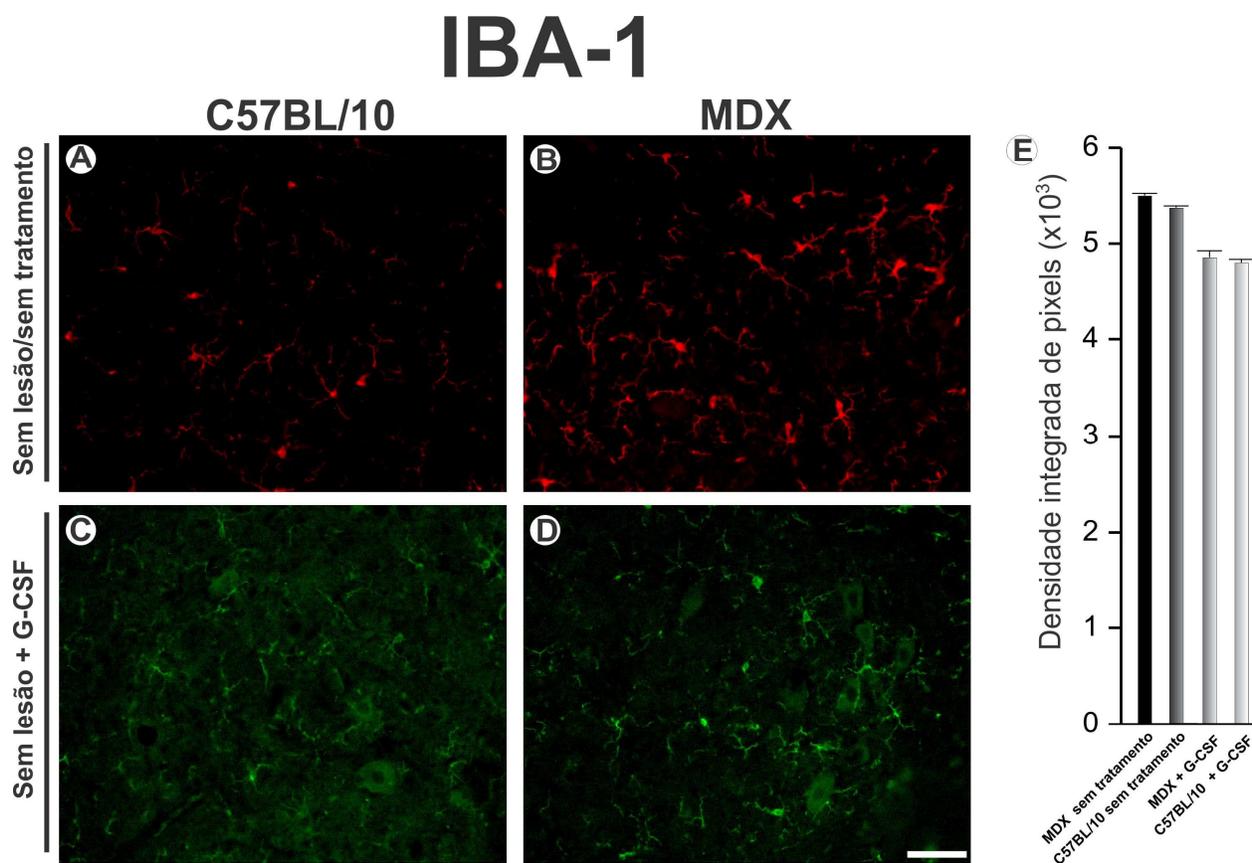


Figura 10 – Imunomarcção anti-IBA1 em camundongos não submetidos à axotomia do nervo isquiático. Figuras A e B, mostrando camundongos sem lesão/sem tratamento (C57BL/10 e MDX, respectivamente). Nessas imagens foi utilizado anticorpo secundário conjugado com CY3. Figuras C e D camundongos sem lesão + G-CSF. Nessas imagens foi utilizado anticorpo secundário conjugado com CY2. As áreas circuladas demonstram o núcleo motor do nervo isquiático e os neurônios alfa-medulares de cada linhagem. Figura E, análise quantitativa da densidade integrada de pixels Escala = 50 μ m

IBA-1

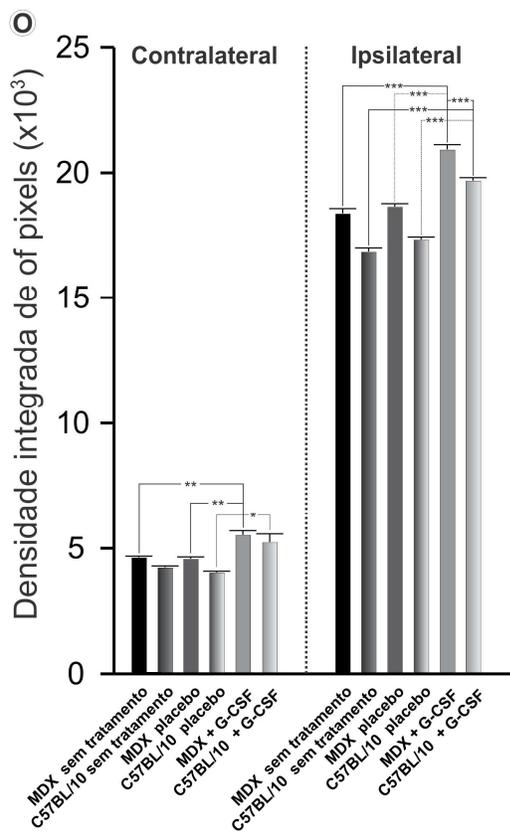
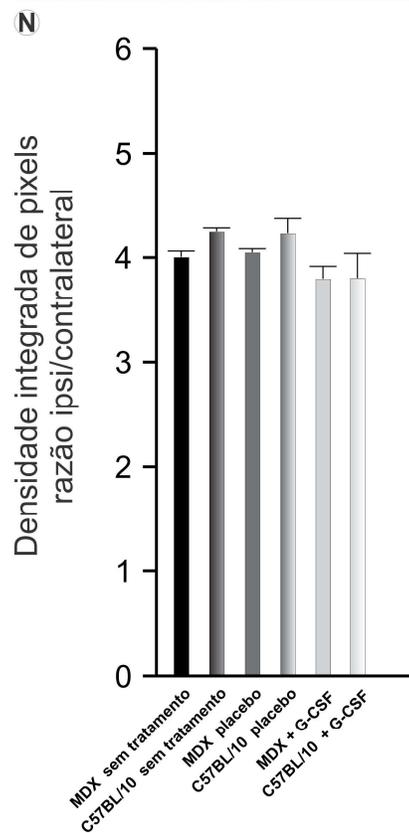
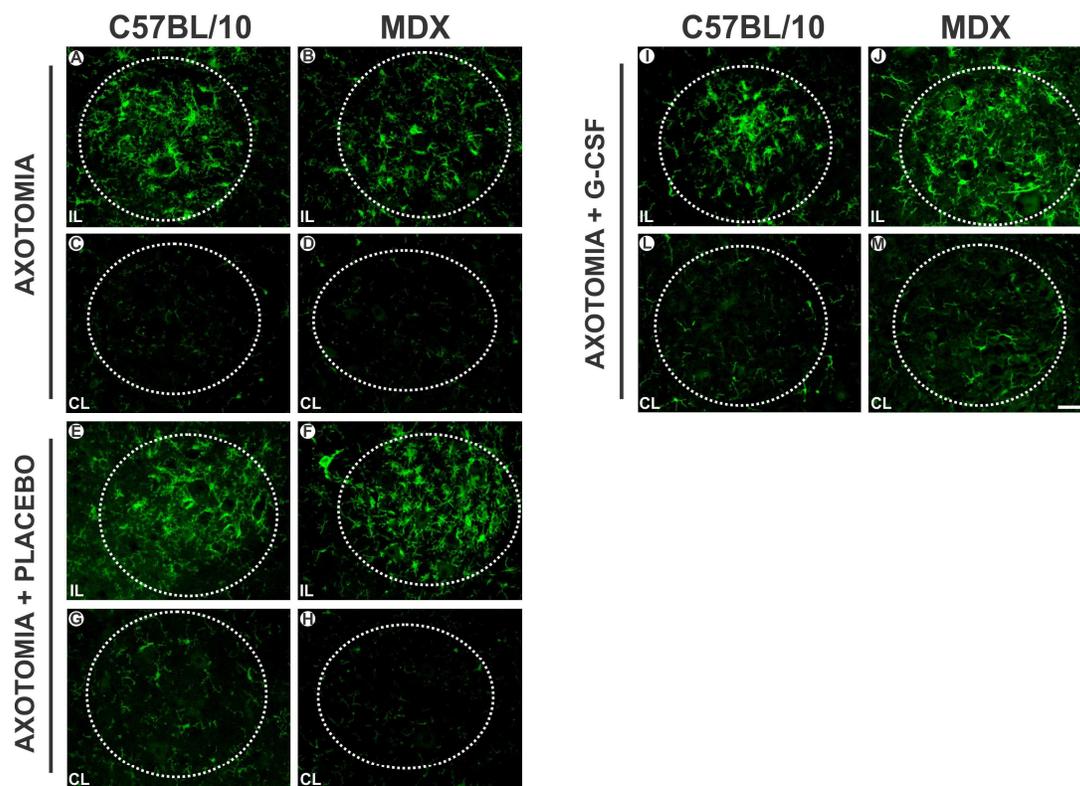


Figura 11 – Imunomarcção anti-IBA1 uma semana após axotomia do nervo isquiático. Figuras A e C, mostrando ipsilateral (IL) e contralateral da coluna ventral da medula espinal da linhagem C57BL/10 sete dias após axotomia do nervo isquiático; Figuras B e D, mostrando ipsilateral e contralateral da linhagem MDX sete dias após axotomia do nervo isquiático; Figuras E e G, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo C57BL/10 axotomia + placebo sete dias após axotomia do nervo isquiático; Figuras F e H, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo MDX axotomia + placebo sete dias após axotomia do nervo isquiático; Figuras I e L, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo C57BL/10 axotomia + G-CSF sete dias após axotomia do nervo isquiático; Figuras J e M, mostrando ipsilateral e contralateral no grupo MDX axotomia + G-CSF sete dias após axotomia do nervo isquiático. As áreas circuladas demonstram o núcleo motor do nervo isquiático e os neurônios alfa-medulares de cada linhagem. Figuras N e O, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre razão ipsi/contralateral e os lados direito e esquerdo, respectivamente. Escala = 50µm

4.5. Alterações ultraestruturais na medula espinal em camundongos sem lesão e submetidos à axotomia do nervo isquiático com e sem tratamento com G-CSF.

As imagens ultraestruturais foram montadas seqüencialmente conforme mostra a Figura 12. Após a reconstrução dos motoneurônios, os seus terminais pré-sinápticos foram classificados em botões do tipo F, S ou C.

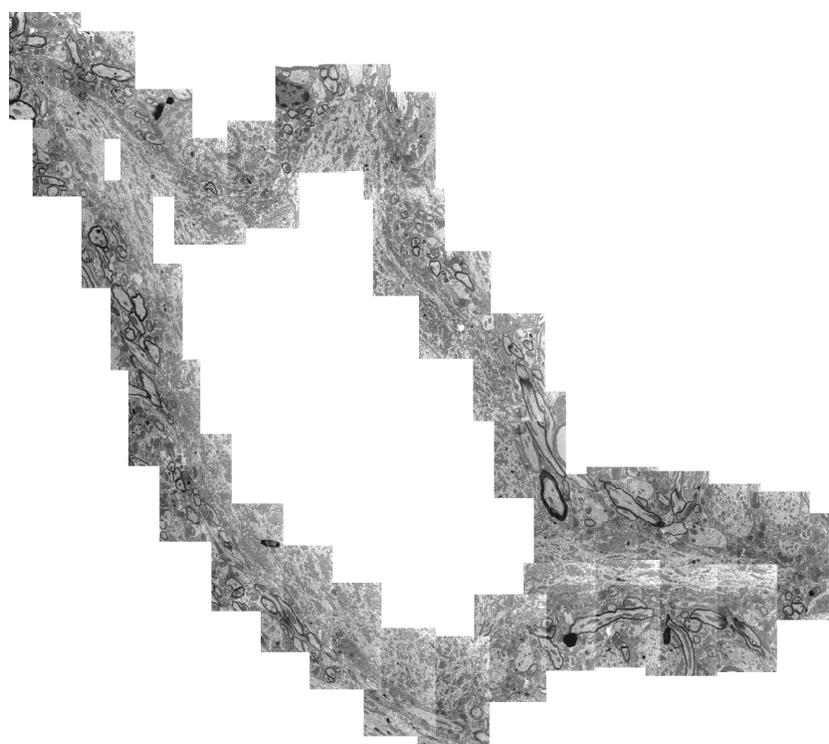
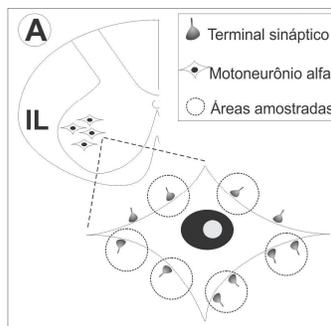


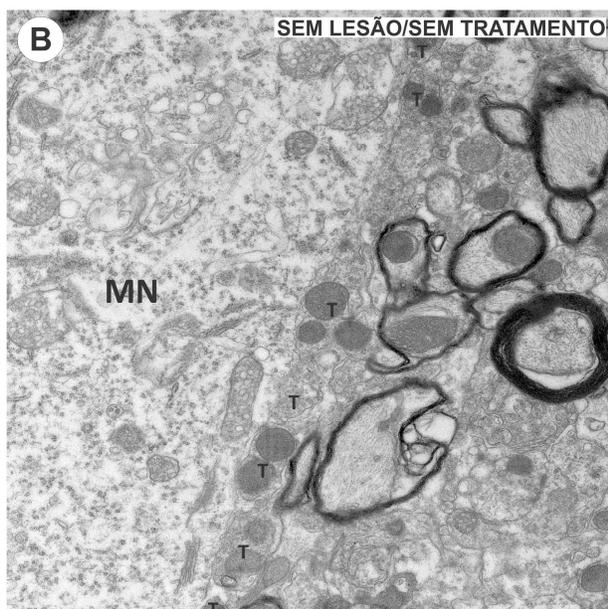
Figura 12: Sequência de fotomicrografias eletrônicas utilizadas para a reconstrução de um motoneurônio alfa medular.

Foram considerados para o estudo, apenas os motoneurônios identificados como alfa pela presença de pelos menos um terminal pré-sináptico colinérgico (tipo C) em aposição à superfície da membrana neuronal.

A localização dos neurônios estudados na medula espinal e as diferenças ultraestruturais entre os grupos sem lesão, contralateral e ipsilateral estão demonstradas nas Figuras 13 e 14.



C57BL/10



MDX

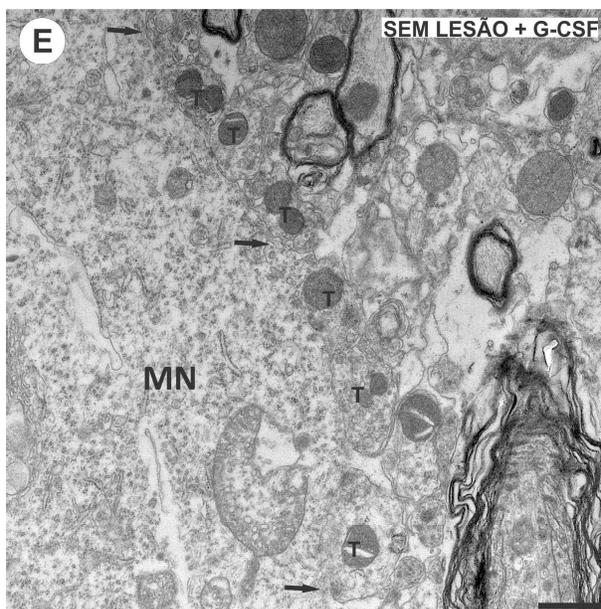
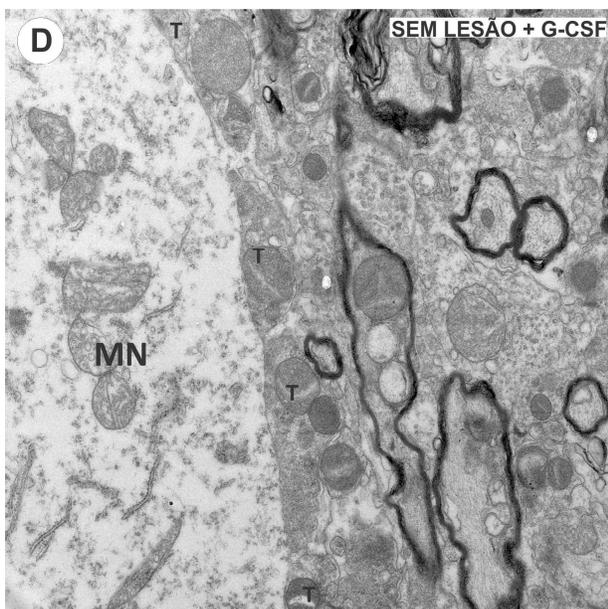
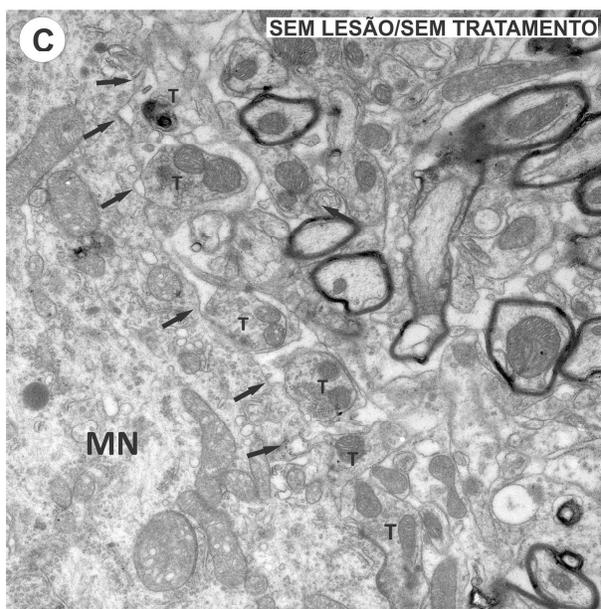
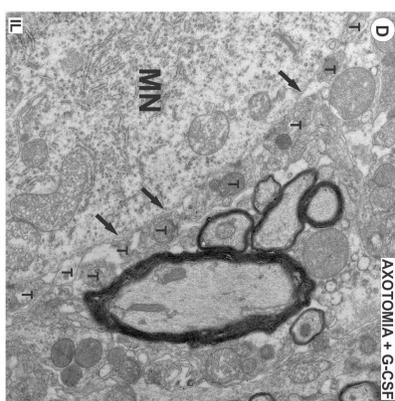
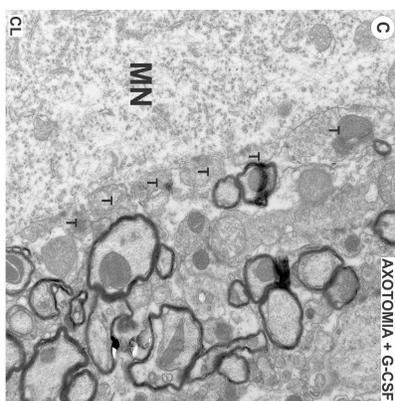
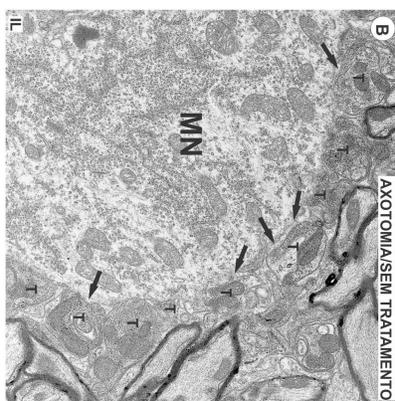
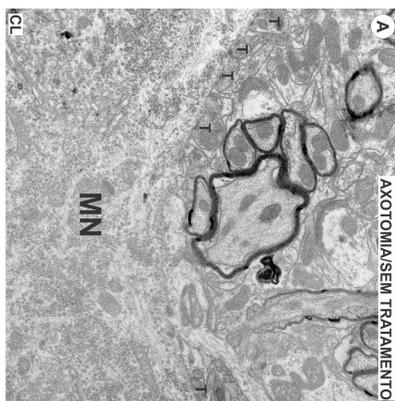


Figura 13: Ultraestrutura da superfície de motoneurônios alfa medulares. Figura A – desenho esquemático de um segmento lombar da medula espinal demonstrando o núcleo motor lateral onde se encontram os motoneurônios que fazem parte da constituição do nervo isquiático. Em detalhe, um motoneurônio (Mn) com terminais pré-sinápticos (T) em aposição à membrana neuronal. Figura B – cobertura de um neurônio não lesionado/sem tratamento da linhagem C57BL/10. Figura C – cobertura sináptica de um neurônio não lesionado/sem tratamento da linhagem MDX. Figura D - cobertura de um neurônio não lesionado + G-CSF da linhagem C57BL/10. Figura E - cobertura de um neurônio não lesionado + G-CSF da linhagem MDX. Note algumas retrações e projeções astrocítárias (setas) entre os terminais e a membrana do neurônio na figura C. Aumento: 11000X. Escala: 2µm

C57BL/10



MDX

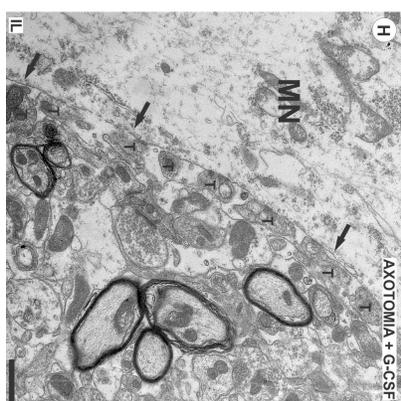
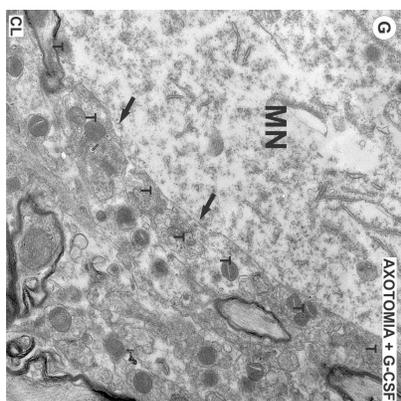
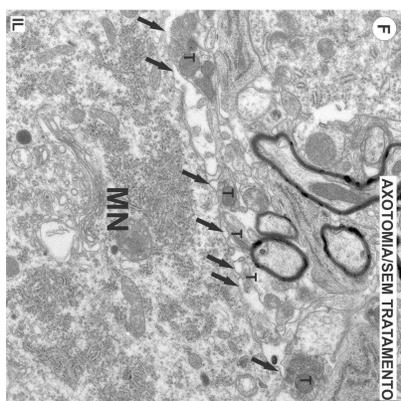
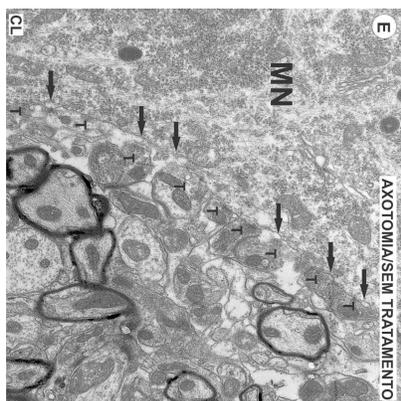


Figura 14: Ultraestrutura da superfície de motoneurônios alfa medulares uma semana após axotomia do nervo isquiático. Figura A – cobertura sináptica de um neurônio do grupo C57BL/10 contralateral à lesão sem tratamento. Figura B – cobertura sináptica de um neurônio do grupo C57BL/10 axotomia sem tratamento. As retrações e projeções astrocitárias nesse grupo expressam um aumento mais intenso em relação ao lado contralateral da mesma linhagem uma semana após a lesão. Figura C – cobertura sináptica de um neurônio do grupo C57BL/10 contralateral à lesão + G-CSF. Figura D – cobertura sináptica de um neurônio do grupo C57BL/10 axotomia + G-CSF. Figura E – cobertura sináptica de um neurônio do grupo MDX contralateral à lesão sem tratamento. Figura F – cobertura sináptica de um neurônio axotomizado da linhagem MDX sem tratamento. Figura G – cobertura sináptica de um neurônio do grupo MDX contralateral à lesão + G-CSF. Figura H – cobertura sináptica de um neurônio axotomizado da linhagem MDX + G-CSF. Note os processos de retração e gliose exacerbados nos grupos sem tratamento. Nos grupos tratados com G-CSF os processos de retração e apresentam-se reduzidos. Aumento: 11000X. Escala 2µm

A análise ultraestrutural de tecidos provenientes de camundongos não lesionados revelou uma ampla cobertura sináptica da membrana neuronal (Figuras 13B-E). Porém, nos camundongos MDX sem tratamento foram observadas algumas alterações ultraestruturais ao redor dos motoneurônios alfa medulares (Figura 13C). Em contrapartida, nos camundongos MDX tratados com G-CSF essas alterações ultraestruturais foram encontradas com menor frequência em relação aos camundongos sem tratamento (Figura 13E).

Evidentes alterações ultraestruturais foram observadas no microambiente adjacente aos motoneurônios alfa-medulares nos camundongos MDX que passaram pelo primeiro ciclo de degeneração/regeneração nervosa e nos camundongos que foram submetidos à axotomia do nervo isquiático. Além disso, os neurônios afetados pela lesão apresentaram alterações que indicavam cromatólise, como por exemplo, o deslocamento do núcleo para a periferia do corpo neuronal e diminuição da eletrondensidade do citoplasma, compatível com a dissolução dos corpúsculos de Nissl. Ainda pudemos observar que muitos terminais pré-sinápticos estavam parcialmente ou totalmente retraídos. Projeções gliais delgadas também foram frequentemente identificadas em contato com a membrana pós-sináptica, preenchendo o espaço entre os terminais sinápticos e a membrana pós-sináptica. Essas estruturas foram identificadas como astrócitos devido a sua baixa eletrodensidade.

Já a análise ultraestrutural no microambiente medular nos camundongos que foram submetidos ao tratamento com G-CSF mostrou uma neuroproteção após a transecção do nervo isquiático, como por exemplo, uma maior porcentagem de cobertura sináptica e maior número de terminais pré-sinápticos em aposição com a membrana neuronal.

4.5.1. Cobertura sináptica total

A análise quantitativa nos grupos sem tratamento mostrou uma redução da cobertura sináptica nos camundongos MDX em relação aos C57BL/10. As diferenças foram mais expressivas para o grupo ipsilateral sem tratamento (MDX ipsilateral sem tratamento, $33,62 \pm 2,09$, C57BL/10, $40,84 \pm 0,47$, $p < 0,01$), resultando, portanto, em uma redução de 21% na cobertura sináptica na linhagem MDX. Nos grupos sem lesão/sem tratamento e contralateral sem tratamento, a linhagem MDX apresentou cobertura sináptica significativamente menor em relação à linhagem C57BL/10 (MDX sem lesão/sem tratamento, $39,94 \pm 1,55$; C57BL/10, $52,79 \pm 1,43$, $p < 0,001$ e MDX contralateral sem tratamento, $39,95 \pm 1,10$; C57BL/10, $53,82 \pm 0,75$, $p < 0,001$, Figura 15 A). Ainda no estudo comparativo, ao se analisar os grupos MDX sem lesão/sem tratamento e MDX contralateral sem tratamento os mesmos não apresentaram diferença estatística (Figura 15A). Porém, quando esses grupos foram comparados ao grupo MDX ipsilateral sem tratamento os resultados mostraram uma significativa redução de cobertura sináptica nos camundongos lesionados (MDX sem lesão/sem tratamento, $39,94 \pm 1,55$; MDX ipsilateral sem tratamento, $33,62 \pm 2,09$, $p < 0,01$ e MDX contralateral sem tratamento, $39,95 \pm 1,10$; MDX ipsilateral sem tratamento, $33,62 \pm 2,09$, $p < 0,01$). Na linhagem C57/BL10 foi observado resultado estatístico semelhante ao encontrado na linhagem MDX, quando comparados os grupos sem lesão/sem tratamento e contralateral sem tratamento (Figura 15A). Ao se analisar as comparações entre os grupos ipsilateral sem tratamento e sem lesão/sem tratamento, e ipsilateral sem tratamento e contralateral sem tratamento, pudemos constatar menor cobertura sináptica com diferença significativa ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Porém, após análise com os camundongos tratados com G-CSF, notamos preservação da porcentagem da cobertura sináptica total uma semana após a transecção do nervo isquiático (MDX ipsilateral + G-CSF, $47,34 \pm 2,07$; MDX ipsilateral sem tratamento, $33,62 \pm 2,09$, $p < 0,01$: MDX ipsilateral + G-CSF, $47,34 \pm 2,07$; C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $52,89 \pm 0,71$, $p > 0,05$: C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $52,89 \pm 0,71$, C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $40,84 \pm 0,47$, $p < 0,01$).

Ainda pudemos observar um aumento mais intenso da cobertura sináptica nos camundongos MDX sem lesão e contralateral à lesão, quando tratados com G-CSF (MDX sem lesão + G-CSF, $49,49 \pm 1,77$; MDX sem lesão/sem tratamento, $39,94 \pm 1,55$, $p < 0,001$: MDX contralateral + G-CSF, $54,94 \pm 1,87$; MDX contralateral sem tratamento, $39,95 \pm 1,10$, $p < 0,001$). O mesmo pôde ser observado na linhagem C57BL/10 (C57BL/10 sem lesão + G-CSF, $60,37 \pm 1,82$; C57BL/10 sem lesão/sem tratamento, $52,79 \pm 1,43$, $p < 0,01$: C57BL/10 contralateral + G-CSF, $62,47 \pm 1,82$; C57BL/10 contralateral sem tratamento, $53,82 \pm 0,75$, $p < 0,001$).

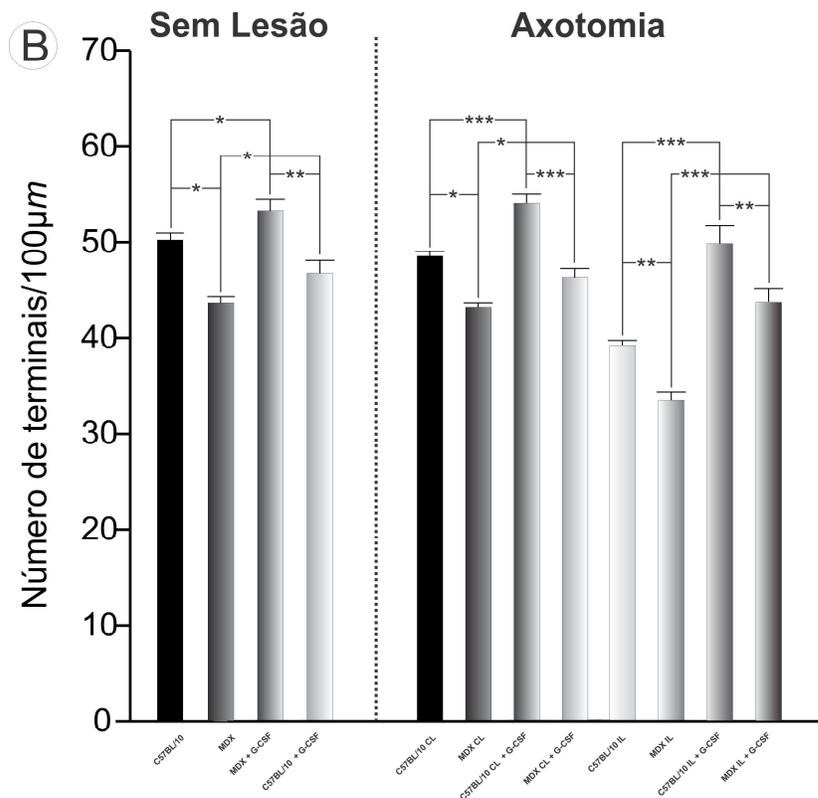
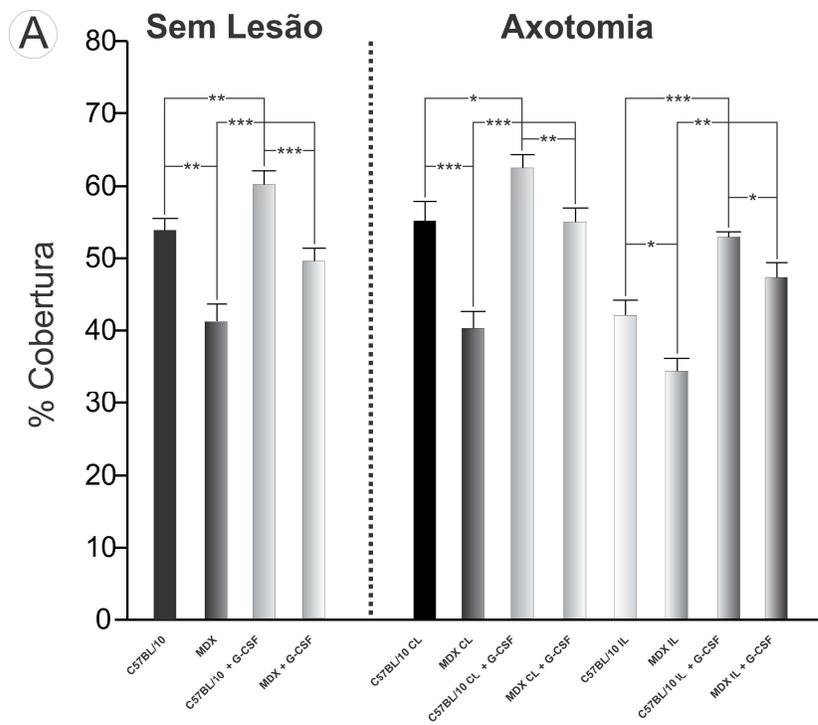


Figura 15: A – Análise quantitativa da ultraestrutura das sinapses. Mostra em porcentagem a cobertura sináptica nos grupos sem lesão, contralateral e ipsilateral, sem tratamento e tratado com G-CSF. **B:** Análise quantitativa da ultraestrutura do número de terminais pré-sinápticos em aposição em $100\mu m$ membrana neuronal entre os grupos sem lesão, contralateral e ipsilateral, sem tratamento e tratados com G-CSF.

4.5.2. Porcentagem da cobertura sináptica de terminais F

A análise quantitativa da porcentagem da cobertura sináptica de terminais F foi significativamente menor nas duas linhagens após a axotomia do nervo isquiático, sendo mais acentuada na linhagem MDX em relação à linhagem C57/BL10. (MDX sem lesão sem tratamento, $25,05 \pm 0,85$; C57/BL10, $31,44 \pm 0,97$, $p < 0,01$: MDX contralateral sem tratamento, $24,45 \pm 1,24$; C57/BL10, $33,11 \pm 1,18$, $p < 0,001$: MDX ipsilateral sem tratamento, $20,60 \pm 0,86$; C57/BL10, $25,00 \pm 0,85$, $p > 0,05$, Figura 16A). A análise entre os grupos sem lesão e contralateral sem tratamento nas duas linhagens estudadas não mostrou diferença significativa de terminais F (Figura 16A). Porém, as análises entre os grupos lesado e sem lesão, e os grupos lesado e controle mostraram redução acentuada de terminais F ($p < 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente), Figura 16A.

Por outro lado, os camundongos MDX tratados com G-CSF apresentaram um maior número de terminais pré-sinápticos do tipo F após a axotomia do nervo isquiático em relação aos camundongos não tratados. (MDX sem lesão sem tratamento, $25,05 \pm 0,85$; MDX sem lesão + G-CSF, $37,73 \pm 1,45$, $p < 0,001$: MDX contralateral sem tratamento, $24,45 \pm 1,24$; MDX contralateral + G-CSF, $42,92 \pm 1,77$, $p < 0,001$; MDX ipsilateral sem tratamento, $20,60 \pm 0,86$; MDX ipsilateral + G-CSF, $34,63 \pm 1,45$, $p < 0,001$). O aumento da cobertura dos terminais F após o tratamento com G-CSF também foi observado na linhagem C57BL/10 (C57/BL10 sem lesão sem tratamento, $31,44 \pm 0,97$; C57/BL10 sem lesão + G-CSF, $47,79 \pm 1,14$, $p < 0,001$; C57/BL10 contralateral sem tratamento, $33,11 \pm 1,18$; C57/BL10 contralateral + G-CSF, $48,68 \pm$

1,79, $p < 0,001$: C57/BL10 ipsilateral sem tratamento, $25,00 \pm 0,85$; C57/BL10 ipsilateral + G-CSF, $40,74 \pm 1,05$, $p < 0,001$).

4.5.3. Porcentagem da cobertura sináptica de terminais S

A análise da porcentagem de cobertura sináptica de terminais do tipo S nas linhagens estudadas demonstrou diferença significativa entre os grupos estudados, sendo menor nos camundongos MDX (MDX sem lesão/sem tratamento, $13,44 \pm 0,86$; C57BL/10, $17,29 \pm 0,42$, $p < 0,01$; MDX contralateral sem tratamento, $14,59 \pm 0,63$; C57BL/10, $16,89 \pm 0,57$, $p < 0,05$ e MDX ipsilateral sem tratamento, $8,46 \pm 0,76$; C57BL/10, $14,45 \pm 0,51$, $p < 0,001$, Figura 16B). A análise entre os grupos sem lesão/sem tratamento e contralateral sem tratamento nas duas linhagens estudadas não demonstrou diferença estatística. Porém, quando foram analisados os grupos ipsilateral sem tratamento e sem lesão/sem tratamento, e ipsilateral sem tratamento e contralateral sem tratamento, as reduções da porcentagem de terminal S foram significativas (C57BL/10 – $p < 0,01$ e MDX – $p < 0,001$, respectivamente, Figura 16B). A mesma situação ficou evidenciada ao se analisar os grupos ipsilateral sem tratamento e sem lesão sem tratamento, e ipsilateral sem tratamento e contralateral sem tratamento na linhagem C57/BL10 ($p < 0,01$ respectivamente, Figura 16B).

Por outro lado, o tratamento com G-CSF promoveu uma redução mais acentuada na porcentagem de terminais S em aposição com a membrana neuronal nas duas linhagens (MDX sem lesão/sem tratamento, $13,44 \pm 0,86$; MDX sem lesão + G-CSF, $8,04 \pm 0,55$, $p < 0,001$; MDX

contralateral sem tratamento, $14,59 \pm 0,63$; MDX contralateral + G-CSF, $7,33 \pm 0,50$, $p < 0,001$: MDX ipsilateral sem tratamento, $8,46 \pm 0,76$; MDX ipsilateral + G-CSF, $6,82 \pm 0,61$, $p < 0,5$: C57BL/10 sem lesão/sem tratamento, $17,29 \pm 0,42$; C57BL/10 sem lesão + G-CSF, $11,99 \pm 1,27$, $p < 0,05$: C57BL/10 contralateral sem tratamento, $16,89 \pm 0,57$; C57BL/10 contralateral + G-CSF, $10,12 \pm 0,81$, $p < 0,001$: C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $14,45 \pm 0,51$; C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $6,97 \pm 0,48$, $p < 0,001$, Figura 16B).

4.5.4. Porcentagem da cobertura sináptica de terminais C

A análise da porcentagem de cobertura sináptica de terminais do tipo C nas linhagens estudadas demonstrou diferença estatística entre MDX contralateral sem tratamento e C57/BL10 contralateral sem tratamento (MDX, $3,20 \pm 0,42$; C57/BL10, $5,87 \pm 0,26$, $p < 0,05$, Figura 9C), bem como entre os grupos sem lesão/sem tratamento e contralateral sem tratamento da linhagem C57/BL10 (C57/BL10 sem lesão/sem lesão, $3,81 \pm 0,65$; C57/BL10 contralateral sem tratamento, $5,87 \pm 0,26$, $p < 0,05$, Figura 16C). Nos demais casos não houve diferença estatística significativa (Figura 16C).

Após o tratamento com G-CSF, a cobertura de terminal C demonstrou um ligeiro aumento, não sendo significativo na maioria dos grupos estudados. Porém, houve um aumento mais intenso da cobertura de terminais C nos grupos contralateral e ipsilateral na linhagem MDX (MDX contralateral sem tratamento, $3,20 \pm 0,42$; MDX contralateral + G-CSF, $4,68 \pm 0,69$, $p < 0,05$: MDX ipsilateral sem tratamento, $3,42 \pm 0,25$; MDX ipsilateral + G-CSF, $5,19 \pm 1,17$, $p < 0,05$, Figura 16C).

4.5.5. Número de terminais pré-sinápticos/100 μ m em aposição com a membrana neuronal

O número de terminais pré-sinápticos/100 μ m em aposição com a membrana neuronal no grupo MDX axotomia/sem tratamento foi significativamente menor em relação ao grupo C57BL/10 axotomia/sem tratamento (MDX ipsilateral sem tratamento, $32,21 \pm 2,94$ terminais/100 μ m de membrana neuronal; C57BL/10, $39,56 \pm 0,55$, $p < 0,001$ Figura 15B). Porém, os camundongos tratados com G-CSF apresentaram uma menor perda de contato sináptico uma semana após a lesão (MDX ipsilateral + G-CSF, $43,73 \pm 1,36$; C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $49,88 \pm 1,88$, $p > 0,01$). Essa preservação de terminais pré-sinápticos nos camundongos tratados com G-CSF ficou mais evidente quando comparados com os camundongos sem tratamento (MDX ipsilateral sem tratamento, $32,21 \pm 2,94$; MDX ipsilateral + G-CSF, $43,73 \pm 1,36$, $p < 0,001$). Logo, pudemos constatar que nos camundongos MDX sem tratamento apresentaram uma perda de, aproximadamente, 35% maior que os camundongos tratados com G-CSF.

Já na linhagem C57BL/10, os camundongos sem tratamento apresentaram uma perda de, aproximadamente, 25% maior que os camundongos tratados com G-CSF (C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $39,56 \pm 0,55$; C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $49,88 \pm 1,88$, $p < 0,001$). Nos grupos sem lesão/sem tratamento, contralateral sem tratamento e contralateral + G-CSF, a linhagem MDX apresentou acentuada redução de terminais em aposição com a membrana neuronal em relação à linhagem C57BL/10 (MDX sem lesão/sem tratamento, $42,37 \pm 2,05$; C57BL/10 sem lesão/sem tratamento, $50,76 \pm 0,84$, $p < 0,001$: MDX contralateral sem tratamento, $45,61 \pm 0,73$; C57BL/10 contralateral sem tratamento, $49,51 \pm 0,42$, $p < 0,001$ e MDX

contralateral + G-CSF, $46,32 \pm 0,91$; C57BL/10 contralateral + G-CSF, $54,06 \pm 0,93$, $p < 0,001$, Figura 15B).

Ao analisarmos os grupos MDX sem lesão/sem tratamento e MDX contralateral sem tratamento os mesmos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$). No entanto, quando estes foram comparados com o grupo MDX ipsilateral sem tratamento os resultados mostraram uma acentuada redução de terminais pré-sinápticos nos camundongos lesionados (MDX sem lesão/sem tratamento, $42,37 \pm 2,05$; MDX ipsilateral sem tratamento, $32,21 \pm 2,94$, $p < 0,001$ e MDX contralateral sem tratamento, $45,61 \pm 0,73$; MDX ipsilateral sem tratamento, $32,21 \pm 2,94$, $p < 0,001$, Figura 15B). Quando comparados com o grupo ipsilateral + tratamento pudemos constatar uma menor perda de terminais pré-sinápticos nos camundongos tratados com G-CSF (MDX ipsilateral sem tratamento, $32,21 \pm 2,94$; MDX ipsilateral + G-CSF, $43,73 \pm 1,36$, $p < 0,001$; C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $39,56 \pm 0,55$; C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $49,88 \pm 1,88$, $p < 0,001$).

Na comparação entre os grupos sem lesão/sem tratamento e controle sem tratamento com o grupo lesão sem tratamento, na linhagem C57BL/10, pudemos constatar diferenças significativas com menor número de terminais pré-sinápticos no grupo axotomizado sem tratamento (C57BL/10 sem lesão/sem tratamento, $50,76 \pm 0,84$, C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $39,56 \pm 0,55$, $p < 0,001$ e C57BL/10 contralateral sem tratamento, $49,51 \pm 0,42$, C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $39,56 \pm 0,55$, $p < 0,001$).

4.5.6. Número de terminais pré-sinápticos F/100 μm de membrana neuronal

A análise do número de terminais pré-sinápticos do tipo F em aposição em 100 μm de membrana neuronal mostrou uma diferença significativa entre os grupos sem lesão/sem tratamento e contralateral sem tratamento nas linhagens estudadas, sendo menor nos camundongos MDX (MDX sem lesão/sem tratamento, $26,36 \pm 0,51$; C57/BL10, $31,78 \pm 0,63$, $p < 0,01$ e MDX contralateral sem tratamento, $26,24 \pm 0,47$; C57/BL10, $29,52 \pm 0,40$, $p < 0,01$, Figura 16D). Porém, a análise não demonstrou diferença estatística entre os grupos MDX ipsilateral sem tratamento e C57/BL10 ipsilateral sem tratamento (MDX, $21,19 \pm 0,43$; C57/BL10, $24,69 \pm 0,61$, $p > 0,05$, Figura 16D). A análise entre os grupos sem lesão/sem tratamento e contralateral sem tratamento na linhagem MDX demonstrou diferença estatística com $p < 0,05$. O grupo MDX ipsilateral sem tratamento, quando comparado com o grupo MDX sem lesão/sem tratamento, apresentou uma redução acentuada de terminais F pré-sinápticos em aposição em 100 μm de membrana neuronal ($p < 0,001$, Figura 16D). O mesmo pôde ser evidenciado, porém com menor significância estatística, entre os grupos MDX ipsilateral sem tratamento e o grupo MDX contralateral sem tratamento ($p < 0,01$, Figura 16D).

Já na linhagem C57/BL10 houve redução acentuada de terminais F pré-sinápticos em aposição em 100 μm de membrana neuronal entre os grupos sem lesão/sem tratamento e contralateral sem tratamento ($p < 0,01$, Figura 16D) e, ainda, entre os grupos ipsilateral sem tratamento e sem lesão/sem tratamento ($p < 0,001$), e entre os grupos ipsilateral sem tratamento e contralateral sem tratamento ($p < 0,001$, Figura 16D).

Após o tratamento com G-CSF, pudemos observar uma menor quantidade de retração de terminais após a axotomia do nervo isquiático, sendo os terminais F menos afetados. Consequentemente, observamos um aumento mais intenso na quantidade de terminais F em aposição por $100\mu\text{m}$ de membrana neuronal em relação aos grupos não tratados (MDX sem lesão/sem tratamento, $26,36 \pm 0,51$; MDX sem lesão + G-CSF, $36,09 \pm 1,02$, $p < 0,001$: MDX contralateral sem tratamento, $26,24 \pm 0,47$; MDX contralateral + G-CSF, $36,92 \pm 1,01$, $p < 0,001$: MDX ipsilateral sem tratamento, $21,19 \pm 0,43$; MDX ipsilateral + G-CSF, $35,53 \pm 1,80$, $p < 0,001$: C57/BL10 sem lesão/sem tratamento, $31,78 \pm 0,63$; C57/BL10 sem lesão + G-CSF, $40,96 \pm 1,11$, $p < 0,001$: C57/BL10 contralateral sem tratamento, $29,52 \pm 0,40$; C57/BL10 contralateral + G-CSF, $42,84 \pm 1,22$, $p < 0,001$: C57/BL10 ipsilateral sem tratamento, $24,69 \pm 0,61$; C57/BL10 ipsilateral + G-CSF, $38,30 \pm 2,19$, $p < 0,001$). Ainda pudemos observar que, ipsilateral, após a axotomia do nervo isquiático não houve diferença estatística entre a linhagem MDX e C57BL/10 (MDX ipsilateral + G-CSF, $35,53 \pm 1,80$; C57/BL10, $38,30 \pm 2,19$, $p > 0,05$, Figura 16D).

4.5.7 Número de terminais pré-sinápticos S/100 μm de membrana neuronal

A análise do número de terminais pré-sinápticos do tipo S em aposição em $100\mu\text{m}$ de membrana neuronal mostrou redução significativa entre os grupos estudados (MDX sem lesão/sem tratamento, $14,68 \pm 0,31$; C57/BL10, $16,92 \pm 0,85$, $p < 0,01$: MDX contralateral sem tratamento, $15,69 \pm 0,48$; C57/BL10, $17,14 \pm 0,53$, $p < 0,05$ e MDX ipsilateral sem tratamento, $10,21 \pm 0,30$; C57/BL10, $14,47 \pm 0,41$, $p < 0,001$, Figura 16E). A análise entre os grupos sem

lesão e controle na linhagem MDX não apresentou diferença estatística (Figura 16E). Porém, a análise entre os grupos MDX lesado e MDX sem lesão, apresentou uma acentuada redução de terminais S pré-sinápticos em aposição em $100\mu\text{m}$ de membrana neuronal ($p < 0,001$, Figura 16E). O mesmo pôde ser evidenciado entre os grupos MDX lesado e MDX controle ($p < 0,001$, Figura 16E). Já na linhagem C57/BL10 a análise entre os grupos sem lesão e controle não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) e, a análise entre os grupos lesados e sem lesão, e entre os grupos lesado e controle, mostrou reduções mais intensas de terminais S em aposição ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente, Figura 16E).

Após o tratamento com G-CSF, pudemos observar um menor número de terminais do tipo S em aposição com $100\mu\text{m}$ de membrana neuronal em relação aos grupos não tratados (MDX sem lesão/sem tratamento, $14,68 \pm 0,31$; MDX sem lesão + G-CSF, $8,48 \pm 0,56$, $p < 0,001$; MDX contralateral sem tratamento, $15,69 \pm 0,48$; MDX contralateral + G-CSF, $8,16 \pm 0,52$, $p < 0,001$; MDX ipsilateral sem tratamento, $10,21 \pm 0,30$; MDX ipsilateral + G-CSF, $7,57 \pm 0,67$, $p < 0,01$; C57/BL10 sem lesão/sem tratamento, $16,92 \pm 0,85$; C57/BL10 sem lesão + G-CSF, $10,61 \pm 1,10$, $p < 0,001$; C57/BL10 contralateral sem tratamento, $17,14 \pm 0,53$; C57/BL10 contralateral + G-CSF, $9,37 \pm 0,55$, $p < 0,001$ e C57/BL10 ipsilateral sem tratamento, $14,47 \pm 0,41$; C57/BL10 ipsilateral + G-CSF, $8,10 \pm 0,69$, $p < 0,001$, Figura 16E).

4.5.8 Número de terminais pré-sinápticos C/100 μm de membrana neuronal

Durante análise do número de terminais pré-sinápticos do tipo C em aposição em 100 μm de membrana neuronal nos grupos sem tratamento, pudemos constatar diferença estatística entre os grupos MDX contralateral sem tratamento e C57/BL10 contralateral sem tratamento (MDX, $1,51 \pm 0,24$; C57/BL10, $2,34 \pm 0,27$, $p < 0,05$, Figura 16F). Nos demais casos não houve diferença estatística significativa (Figura 16F).

A mesma situação foi observada durante a análise dos grupos tratados com G-CSF, onde somente houve aumento mais intenso no grupo MDX ipsilateral + G-CSF em relação ao grupo MDX ipsilateral sem tratamento (MDX ipsilateral sem tratamento e MDX ipsilateral + G-CSF (MDX ipsilateral sem tratamento, $1,83 \pm 0,31$; MDX ipsilateral + G-CSF, $2,44 \pm 0,50$, $p < 0,05$, Figura 16F). Nos demais casos, as diferenças não foram estatisticamente significantes (Figura 16F).

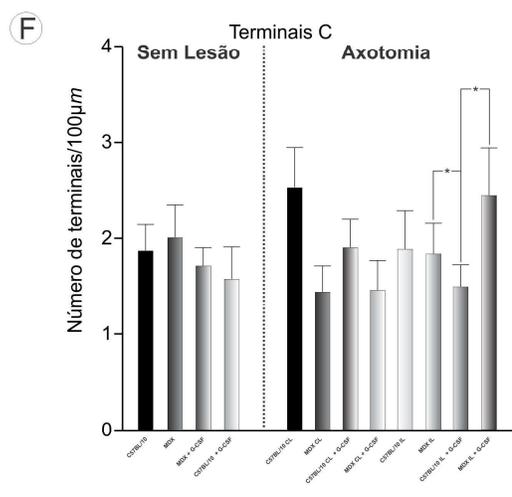
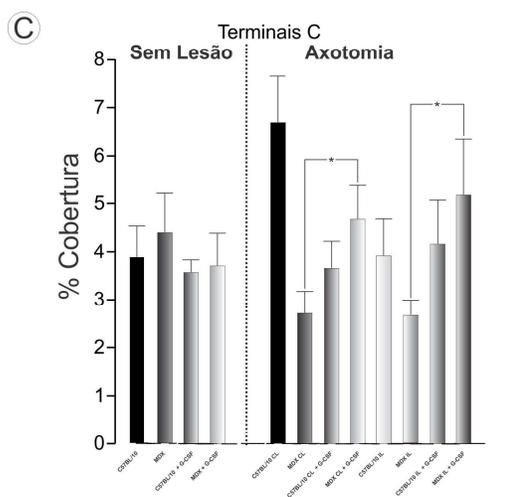
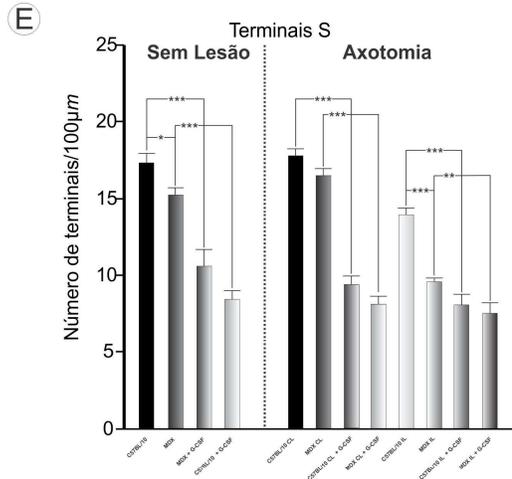
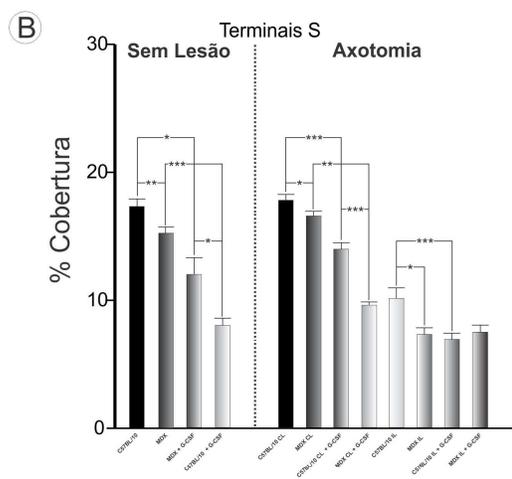
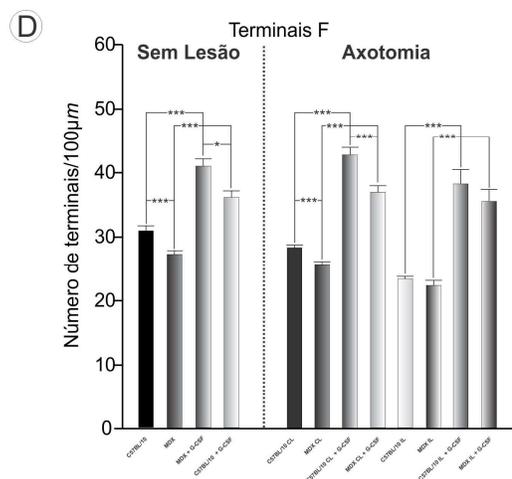
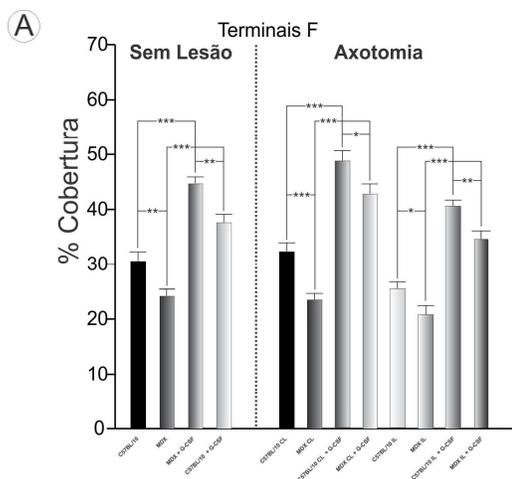


Figura 16: Representação da análise ultraestrutural quantitativa da porcentagem de cobertura sináptica dos terminais F, S e C e da análise ultraestrutural quantitativa do número de terminais F, S e C em aposição/100 μ m. Figuras A, B e C – mostram em porcentagem, a cobertura dos terminal F, S e C, respectivamente, nos grupos sem tratamento e tratados com G-CSF nas duas linhagens estudadas. Figuras D, E e F – mostram o número de terminais pré-sinápticos F, S e C, respectivamente, em aposição em 100 μ m de membrana neuronal entre os grupos sem tratamento e tratados com G-CSF nas duas linhagens estudadas.

4.5.9. Espaços de membrana neuronal entre terminais pré-sinápticos

Os espaços entre os terminais pré-sinápticos que se mantiveram em aposição à membrana pré-sináptica foram medidos, calculando-se a sua distribuição de frequência em intervalos de 1,0 μ m. Esses intervalos foram identificados na avaliação ultraestrutural como sendo projeções citoplasmáticas dos astrócitos. Por meio desta análise observou-se que, nos grupos sem lesão/sem tratamento e contralateral sem tratamento da linhagem MDX, apresentaram um aumento da frequência de espaços maior tamanho entre os terminais sinápticos em relação ao grupo C57Bl/10 sem tratamento. Tal fato ficou mais evidente no grupo MDX ipsilateral sem tratamento (Figura 17J) devido à maior retração sináptica ocorrida.

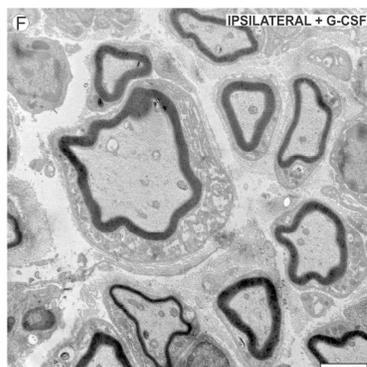
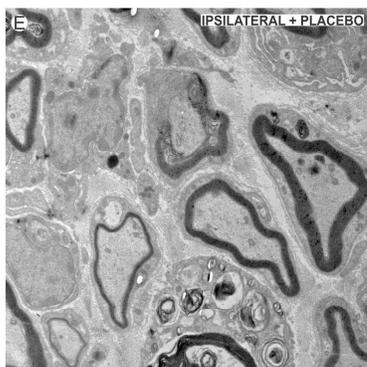
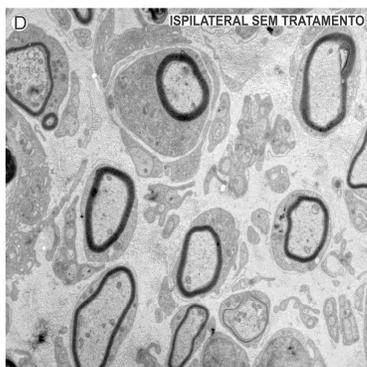
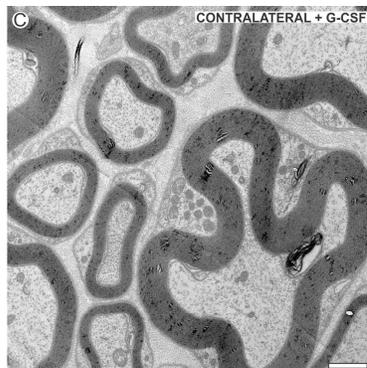
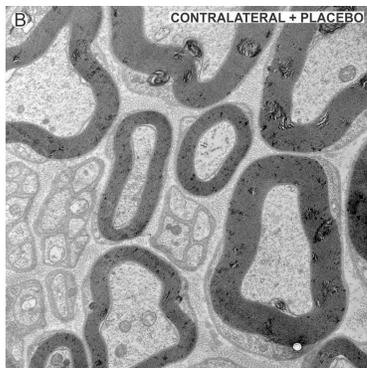
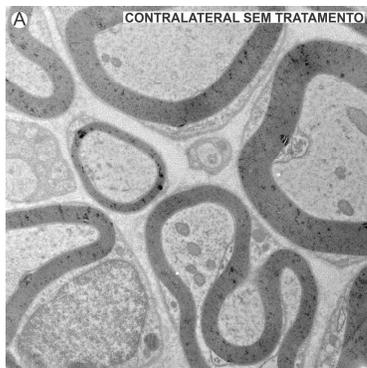
Nos grupos tratados com G-CSF, notamos um aumento no número de espaços entre os terminais pré-sinápticos de menor tamanho e uma redução no número de espaços entre os terminais pré-sinápticos de maior tamanho nas duas linhagens estudadas, sendo mais evidente nos camundongos MDX (Figuras 17 D, H e M).

Figura 17: Gráficos mostrando a distribuição de frequência (em micrômetros) dos espaços entre os terminais sinápticos retraídos ao longo da membrana do corpo dos motoneurônios. Figura A – C57Bl/10 sem lesão/sem tratamento. Figura B – MDX sem lesão/sem tratamento. C – C57Bl/10 sem lesão + G-CSF. D – MDX sem lesão + G-CSF. Figura E – C57Bl/10 contralateral sem lesão. Figura F – MDX contralateral sem lesão. Figura G – C57Bl/10 contralateral + G-CSF. Figura H – MDX contralateral + G-CSF. Figura I – C57Bl/10 ipsilateral sem lesão. Figura J – MDX ipsilateral sem lesão. Figura L – C57Bl/10 ipsilateral + G-CSF. Figura M – MDX ipsilateral + G-CSF.

4.6 Análise estrutural após esmagamento do nervo isquiático.

Após duas semanas do esmagamento unilateral dos nervos isquiáticos os camundongos C57BL/10 e MDX, do grupo sem tratamento, foram sacrificados e os nervos isquiáticos processados para microscopia eletrônica de transmissão (MET) e posterior análise morfométrica e contagem dos axônios regenerados. Durante análise ultraestrutural pudemos observar um aumento do número total de axônios em camundongos MDX após o tratamento com G-CSF (MDX sem tratamento - $2295,77 \pm 280,52$, MDX + G-CSF - $3668,80 \pm 398,15$, $p < 0,05$), embora o perímetro axonal tenha diminuído nos camundongos tratados com G-CSF (MDX sem tratamento - $4,37 \pm 0,08$, MDX + G-CSF - $3,65 \pm 0,04$, $p < 0,001$ e C57BL/10 sem tratamento - $4,02 \pm 0,04$, C57BL/10 + G-CSF - $3,81 \pm 0,05$; $p < 0,001$). As duas linhagens apresentaram uma redução do razão "g" após o tratamento com G-CSF (MDX sem tratamento - $0,81 \pm 0,01$, MDX + G-CSF - $0,78 \pm 0,01$, $p < 0,001$ e C57BL/10 sem tratamento - $0,80 \pm 0,01$, C57BL/10 + G-CSF - $0,76 \pm 0,01$, $p < 0,001$).

C57BL/10



MDX

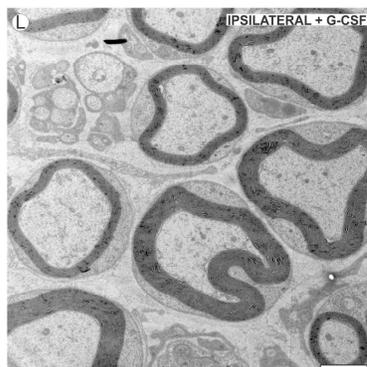
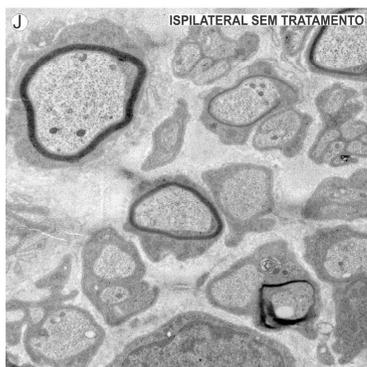
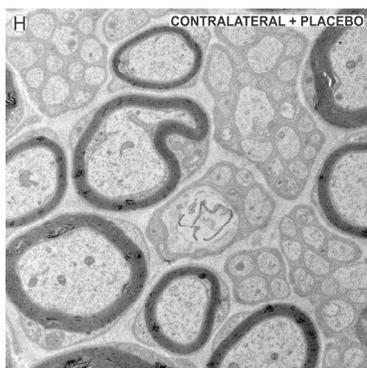


Figura 18: Fotomicrografias eletrônicas representativas do nervo isquiático pré e pós lesão nas duas linhagens estudadas. Figuras A-C: nervos sem lesão (contralateral) de camundongos C57BL/10. Figuras D-F: nervos lesionados (ipsilateral) de camundongos C57BL/10. Figuras G-I: nervos sem lesão de camundongos MDX. Figuras J-M: nervos lesionados de camundongos MDX. Escala: 1 μm (Figuras A-C e G-I) e 2 μm (Figuras D-F e J-M).

4.7 Parâmetros Morfométricos

Para o estudo morfométrico dos nervos foram considerados: Diâmetro das Fibras Mielínicas (DFM), o qual corresponde ao diâmetro contendo o axônio e sua bainha de mielina; Diâmetro dos Axônios Mielínicos (DAM), correspondendo ao diâmetro do axônio sem sua bainha de mielina; Espessura da Bainha de Mielina (EBM) e Razão “g” (RZG), a qual foi obtida a partir do quociente DAM/DFM.

4.7.1 Diâmetro das Fibras Mielínicas

A figura 19 mostra a quantificação total das fibras mielínicas de nervos submetidos ao esmagamento sem tratamento e tratados com G-CSF. Quando analisamos contralateral à lesão em camundongos MDX que não foram submetidos ao tratamento com G-CSF, observamos fibras mielínicas com diâmetro variando de 2,16 a 22,44 μm . As maiores percentagens de fibras foram observadas nos intervalos de 5,5 a 10,5 μm , correspondendo a 72,16% do total de fibras. As demais fibras mielínicas, 27,83%, estavam distribuídas nas demais classes. Já nos camundongos C57BL/10, observamos fibras mielínicas com diâmetro variando entre 1,36 e 19,44 μm . As maiores percentagens de fibras foram encontradas nos intervalos de 3,5 a 8,5 μm , correspondendo a 76,87% do total de fibras. As demais fibras mielínicas, 23,13%, estavam distribuídas nas demais classes. A análise ipsilateral à lesão, em camundongos MDX que não foram submetidos ao tratamento com G-CSF, observamos fibras mielínicas com diâmetro variando de 1,13 a 13,18 μm . As maiores percentagens de fibras foram encontradas nos

intervalos de 3,5 a 7,5 μm , correspondendo a 83,7% do total de fibras. As demais fibras mielínicas, 16,3%, estavam distribuídas nas demais classes. Nos camundongos C57BL/10 observamos fibras mielínicas com diâmetro variando entre 1,93 e 10,47 μm . As maiores porcentagens de fibras foram encontradas nos intervalos de 3,5 e 6,5 μm , correspondendo a 85,57% do total de fibras. As demais fibras mielínicas, 14,42%, estavam distribuídas nas demais classes.

Ao analisarmos o grupo MDX contralateral + placebo, foram observadas fibras mielínicas com diâmetro variando de 2,16 e 20,66 μm . As maiores porcentagens de fibras foram encontradas nos intervalos de 4,5 a 10,5 μm , correspondendo a 75,13% do total de fibras. As demais fibras mielínicas, 24,86%, estavam distribuídas nas demais classes. Nos camundongos C57BL/10 observamos fibras mielínicas com diâmetro variando entre 2,06 e 18,61 μm . As maiores porcentagens de fibras foram encontradas nos intervalos de 5,5 e 10,5 μm , correspondendo a 67,54% do total de fibras. As demais fibras mielínicas, 32,45%, estavam distribuídas nas demais classes. Durante a análise no grupo de camundongos MDX ipsilateral + placebo, encontramos fibras mielínicas com diâmetro variando de 2,13 e 12,55 μm . As maiores porcentagens de fibras foram encontradas nos intervalos de 4,5 a 7,5 μm , correspondendo a 73,77% do total de fibras. As demais fibras mielínicas, 26,23%, estavam distribuídas nas demais classes. Nos camundongos C57BL/10 observamos fibras mielínicas com diâmetro variando entre 2,12 e 12,39 μm . As maiores porcentagens de fibras foram encontradas nos intervalos de 4,5 e 7,5 μm , correspondendo a 71,12% do total de fibras. As demais fibras mielínicas, 28,87%, estavam distribuídas nas demais classes.

Após o tratamento com G-CSF em camundongos MDX, a análise contralateral à lesão, mostrou fibras mielínicas com diâmetro variando de 2,38 e 17,74 μm . As maiores porcentagens de fibras foram encontradas nos intervalos de 4,5 a 10,5, correspondendo a 74,41% do total de fibras. As demais fibras mielínicas, 25,58%, estavam distribuídas nas demais classes. Nos camundongos C57BL/10 observamos fibras mielínicas com diâmetro variando entre 1,43 e 19,27 μm . As maiores porcentagens de fibras foram encontradas nos intervalos de 4,5 e 10,5 μm , correspondendo a 78,25% do total de fibras. As demais fibras mielínicas, 21,74%, estavam distribuídas nas demais classes.

A análise em camundongos MDX ipsilateral + G-CSF mostrou fibras mielínicas com diâmetro variando de 1,66 e 12,55 μm . As maiores porcentagens de fibras foram encontradas nos intervalos de 3,5 a 6,5 μm , correspondendo a 80,94% do total de fibras. As demais fibras mielínicas, 19,05%, estavam distribuídas nas demais classes. Nos camundongos C57BL/10 observamos fibras mielínicas com diâmetro variando entre 1,77 e 10,80 μm . As maiores porcentagens de fibras foram encontradas nos intervalos de 3,5 e 6,5 μm , correspondendo a 89,18% do total de fibras. As demais fibras mielínicas, 10,81%, estavam distribuídas nas demais classes.

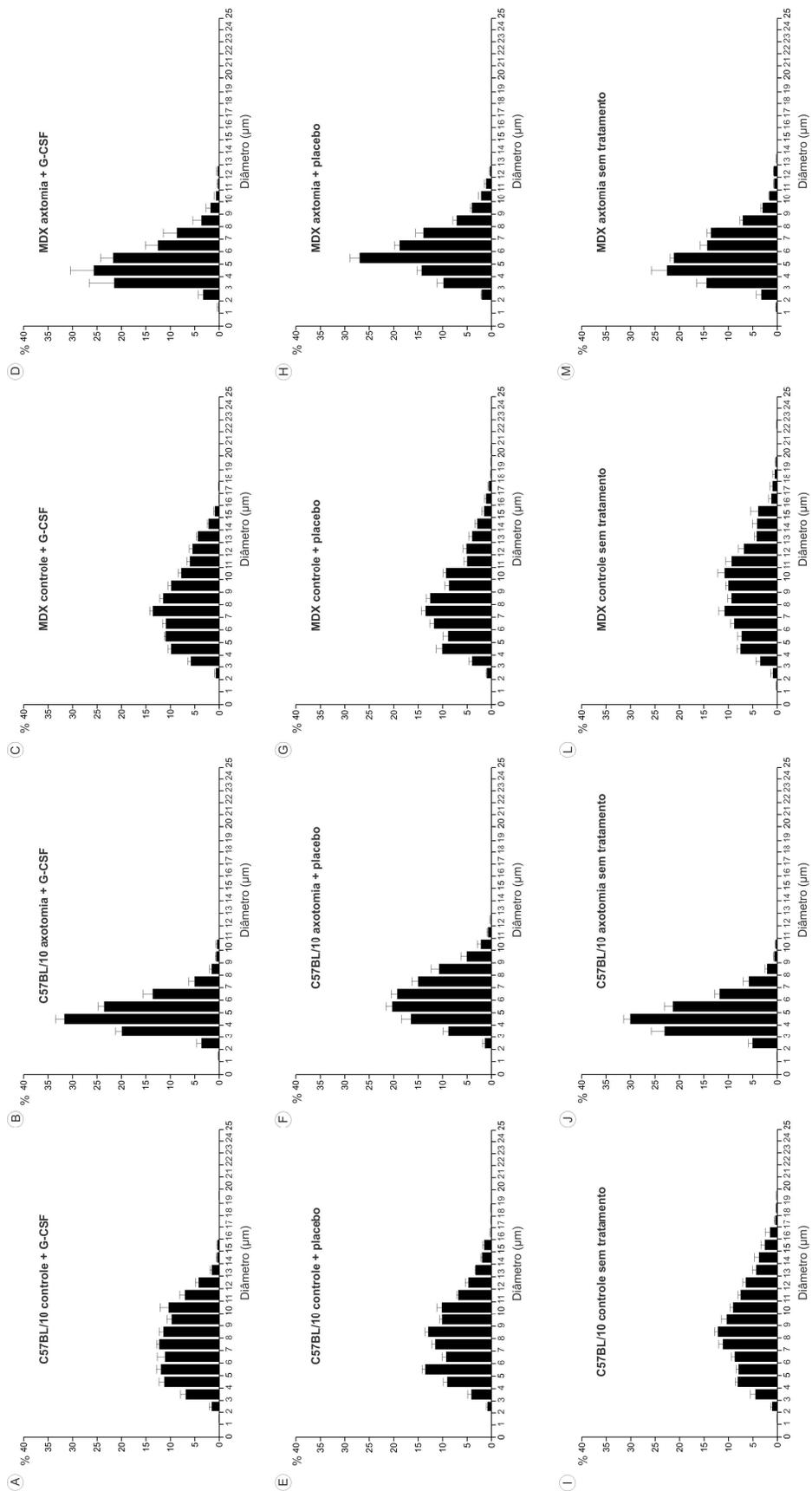


Figura 19: Distribuição da frequência do diâmetro das fibras mielínicas (DFM) em nervos lesionados e não lesionados (contralateral), 21 dias após a lesão. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão.

4.7.2 Diâmetro dos Axônios Mielínicos

A análise morfométrica do diâmetro dos axônios mostrou uma redução mais acentuada em camundongos MDX tratados com G-CSF em relação ao grupo MDX não tratado. Porém, não observamos diferenças entre os grupos tratados e não tratados nos camundongos C57BL/10.

A figura 20 mostra a quantificação total dos axônios mielínicos de nervos submetidos ao esmagamento sem tratamento e tratados com G-CSF. Na análise do grupo de camundongos MDX contralateral sem tratamento, observamos axônios com diâmetro variando de 1,11 a 15,64 μm . As maiores porcentagens de axônios foram observadas nos intervalos de 4,5 a 9,5 μm , correspondendo a 71,24% do total de fibras. Os demais axônios, 28,76%, estavam distribuídos nas demais classes. Já nos camundongos C57BL/10, pudemos observar axônios com diâmetro variando entre 1,28 e 14,83 μm . As maiores porcentagens de fibras axonais foram encontradas nos intervalos de 3,5 a 8,5 μm , correspondendo a 81,73% do total de axônios. Os demais axônios, 18,26%, estavam distribuídos nas demais classes. Na análise do grupo camundongos MDX ipsilateral sem tratamento, pudemos observar axônios com diâmetro variando de 1,13 a 11,26 μm . As maiores porcentagens de axônios foram encontradas nos intervalos de 2,5 a 6,5 μm , correspondendo a 90,36% do total de axônios. Os demais axônios, 9,64%, estavam distribuídos nas demais classes. Nos camundongos C57BL/10 pudemos observar axônios com diâmetro variando entre 1,01 e 9,31 μm . As maiores porcentagens de axônios foram encontradas nos intervalos de 2,5 e 5,5 μm , correspondendo a 90,77% do total de fibras axonais. Os demais axônios, 9,23%, estavam distribuídos nas demais classes.

Ao analisarmos o grupo MDX contralateral + placebo, pudemos observar axônios com diâmetro variando de 1,10 e 14,24 μm . As maiores porcentagens de axônios foram encontradas nos intervalos de 2,5 a 8,5 μm , correspondendo a 91,23% do total de fibras axonais. Os demais axônios, 8,76%, estavam distribuídos nas demais classes. Nos camundongos C57BL/10 pudemos observar axônios com diâmetro variando entre 1,25 e 13,09 μm . As maiores porcentagens de axônios foram encontradas nos intervalos de 2,5 e 7,5 μm , correspondendo a 87,79% do total de axônios. Os demais axônios, 12,21%, estavam distribuídos nas demais classes. Durante a análise ipsilateral à lesão nos camundongos MDX + placebo, pudemos observar axônios com diâmetro variando de 1,00 e 10,07 μm . As maiores porcentagens de axônio foram encontradas nos intervalos de 2,5 a 5,5 μm , correspondendo 81,29% do total de fibras axonais. Os demais axônios, 18,71%, estavam distribuídos nas demais classes. Nos camundongos C57BL/10 pudemos observar axônios com diâmetro variando entre 1,14 e 10,87 μm . As maiores porcentagens de fibras axonais foram encontradas nos intervalos de 2,5 e 6,5 μm , correspondendo a 89,32% do total de axônios. Os demais axônios, 10,68%, estavam distribuídos nas demais classes.

Após o tratamento com G-CSF em camundongos MDX, a análise contralateral à lesão, mostrou axônios com diâmetro variando de 1,29 e 14,49 μm . As maiores porcentagens de fibras axonais foram encontradas nos intervalos de 2,5 a 7,5 μm , correspondendo a 87,76% do total de fibras axonais. Os demais axônios, 12,24%, estavam distribuídos nas demais classes. Nos camundongos C57BL/10 pudemos observar axônios com diâmetro variando entre 1,13 e 13,65 μm . As maiores porcentagens de axônios foram encontradas nos intervalos de 2,5 e 7,5 μm , correspondendo a 92,91% do total de fibras axonais. As demais fibras axonais, 7,09%, estavam

distribuídas nas demais classes. Ipsilateral, a análise em camundongos MDX tratados com G-CSF mostrou axônios com diâmetro variando de 1,10 e 10,07 μm . As maiores porcentagens de axônios foram encontradas nos intervalos de 2,5 a 4,5 μm , correspondendo a 76,29% do total de axônios. As demais fibras axonais, 23,71%, estavam distribuídas nas demais classes. Nos camundongos C57BL/10 pudemos observar axônios com diâmetro variando entre 1,08 e 29,28 μm . As maiores porcentagens de axônios foram encontradas nos intervalos de 2,5 e 4,5 μm , correspondendo a 84,9% do total de fibras axonais. Os demais axônios, 15,1%, estavam distribuídos nas demais classes.

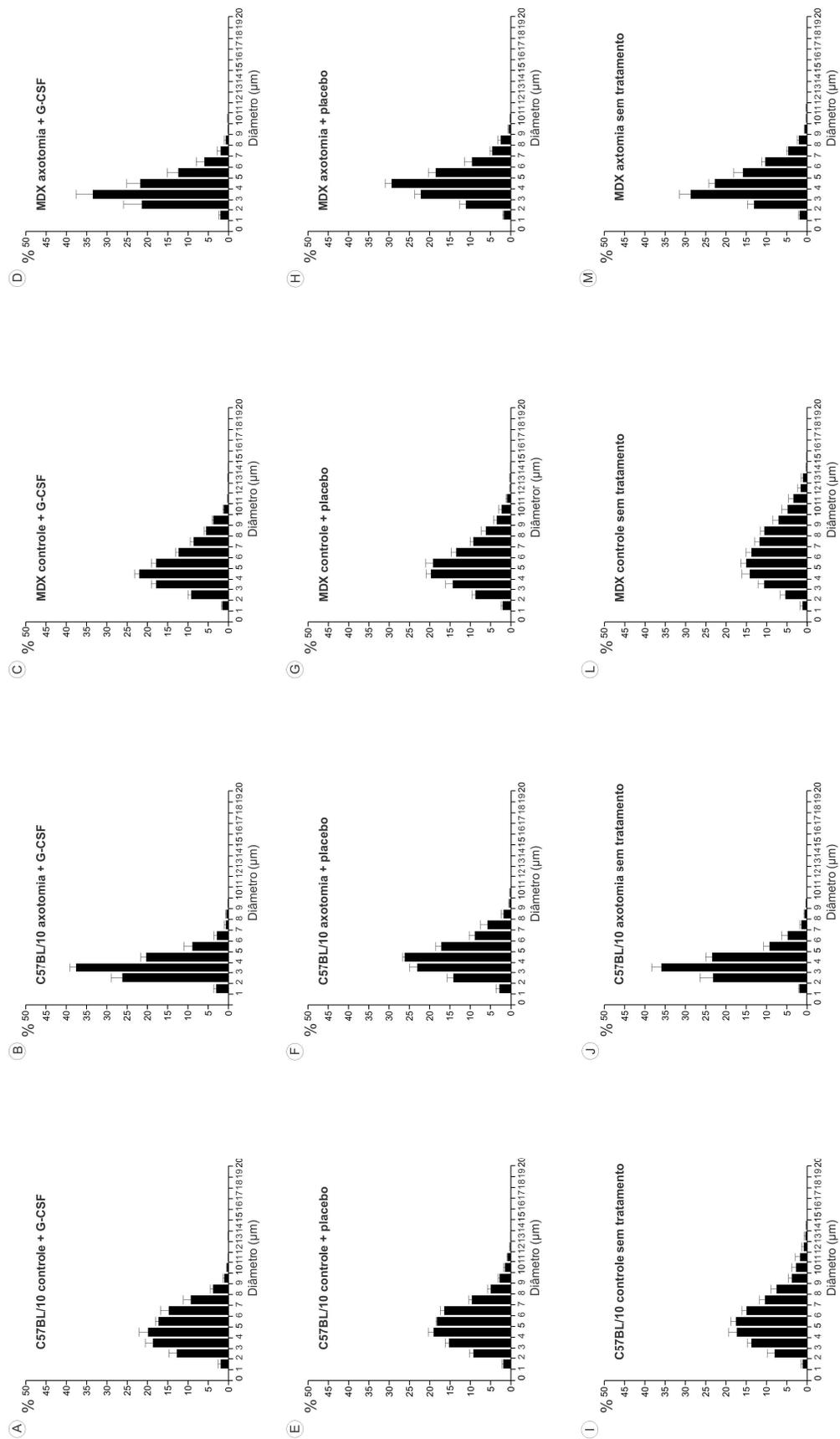


Figura 20: Distribuição da frequência do diâmetro dos axônios miélinizados (DAM) em nervos lesionados e não lesionados (contralateral), 21 dias após a lesão. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão.

4.7.3 Espessura da Bainha de Mielina e Razão “g”

A análise morfométrica da espessura da bainha de mielina (EBM) mostrou uma redução nas duas linhagens tratadas com G-CSF em relação aos grupos não tratados.

A figura 21 e 22 mostram as quantificações totais da espessura da bainha de mielina e da razão “g”, respectivamente, de nervos submetidos à lesão sem tratamento e tratados com G-CSF. A análise contralateral à lesão nos camundongos MDX que não foram submetidos ao tratamento com G-CSF, pudemos observar a frequência da EBM variando de 0,37 a 6,1 μm . As maiores porcentagens foram observadas nos intervalos de 1,7 a 2,7 μm , correspondendo a 44,79%. As demais frequências, 55,21%, estavam distribuídas nas demais classes. A razão “g” nesse grupo apresentou valores entre 0,43 e 0,92. Já nos camundongos C57BL/10, pudemos observar a frequência da EBM variando entre 0,44 e 8,8 μm . As maiores porcentagens de frequências de EBM foram encontradas nos intervalos de 1,9 a 3,3 μm , correspondendo a 44,51% do total de axônios. As demais frequências, 55,49%, estavam distribuídas nas demais classes. A razão “g” nesse grupo apresentou valores entre 0,16 e 0,92.

Durante análise ipsilateral à lesão nos camundongos MDX que não foram submetidos ao tratamento com G-CSF, pudemos observar que a frequência da EBM apresentou variação entre 0,12 a 3,87 μm . As maiores porcentagens de frequências de EBM foram encontradas nos intervalos de 0,5 a 1,3 μm , correspondendo a 76% do total de axônios. As demais frequências, 24% estavam distribuídas nas demais classes. A razão “g” nesse grupo apresentou valores entre 0,50 e 0,99. Nos camundongos C57BL/10 a frequência da EBM variou de 0,14 a 2,63 μm . As

maiores porcentagens de frequências de EBM foram encontradas nos intervalos de 0,5 a 1,3 μm , correspondendo a 87,44% do total de axônios. As demais frequências, 12,56%, estavam distribuídas nas demais classes. A razão “g” nesse grupo apresentou valores entre 0,41 e 0,99.

Durante a análise do grupo MDX + placebo, contralateral à lesão, pudemos observar a frequência da EBM variando de 0,43 a 5,03 μm . As maiores porcentagens foram observadas nos intervalos de 1,1 a 2,5 μm , correspondendo a 49%. As demais frequências, 51%, estavam distribuídas nas demais classes. A razão “g” nesse grupo apresentou valores entre 0,37 e 0,87. Já nos camundongos C57BL/10, pudemos observar a frequência da EBM variando entre 0,18 e 7,95 μm . As maiores porcentagens de frequências de EBM foram encontradas nos intervalos de 1,3 a 2,7 μm , correspondendo a 49,4% do total de axônios. As demais frequências, 50,6%, estavam distribuídas nas demais classes. A razão “g” nesse grupo apresentou valores entre 0,26 e 0,96. A análise ipsilateral à lesão no grupo MDX + placebo, pudemos observar a frequência da EBM variando de 0,3 a 3,87 μm . As maiores porcentagens de frequências de EBM foram encontradas nos intervalos de 0,7 a 1,5 μm , correspondendo a 73,25% do total de axônios. As demais frequências, 26,75% estavam distribuídas nas demais classes. A razão “g” nesse grupo apresentou valores entre 0,45 e 0,92. Nos camundongos C57BL/10 a frequência da EBM variou de 0,41 a 4,7 μm . As maiores porcentagens de frequências de EBM foram encontradas nos intervalos de 0,9 a 1,9 μm , correspondendo a 82,21% do total de axônios. As demais frequências, 17,79%, estavam distribuídas nas demais classes. A razão “g” nesse grupo apresentou valores entre 0,39 e 0,91.

Após o tratamento com G-CSF em camundongos MDX, a análise contralateral à lesão, mostrou EBM variando de 0,1 a 8,51 μm . As maiores percentagens foram observadas nos intervalos de 0,1 a 8,51 μm , correspondendo a 56,86%. As demais frequências, 43,14%, estavam distribuídas nas demais classes. A razão “g” nesse grupo apresentou valores entre 0,39 e 0,99. Já nos camundongos C57BL/10, pudemos observar a frequência da EBM variando entre 0,22 e 8,03 μm . As maiores percentagens de frequências de EBM foram encontradas nos intervalos de 0,9 a 2,9 μm , correspondendo a 60,5% do total de axônios. As demais frequências, 39,5%, estavam distribuídas nas demais classes. A razão “g” nesse grupo apresentou valores entre 0,21, e 0,97. A análise ipsilateral à lesão no grupo MDX + G-CSF, pudemos observar a frequência da EBM variando de 0,13 a 3,87 μm . As maiores percentagens de frequências de EBM foram encontradas nos intervalos de 0,5 a 1,3 μm , correspondendo a 77,12% do total de axônios. As demais frequências, 22,28% estavam distribuídas nas demais classes. A razão “g” nesse grupo apresentou valores entre 0,49 e 0,96. Nos camundongos C57BL/10 a frequência da EBM variou de 0,24 a 2,75 μm . As maiores percentagens de frequências de EBM foram encontradas nos intervalos de 0,5 a 1,3 μm , correspondendo a 81,57% do total de axônios. As demais frequências, 18,43%, estavam distribuídas nas demais classes. A razão “g” nesse grupo apresentou valores entre 0,23, e 0,92.

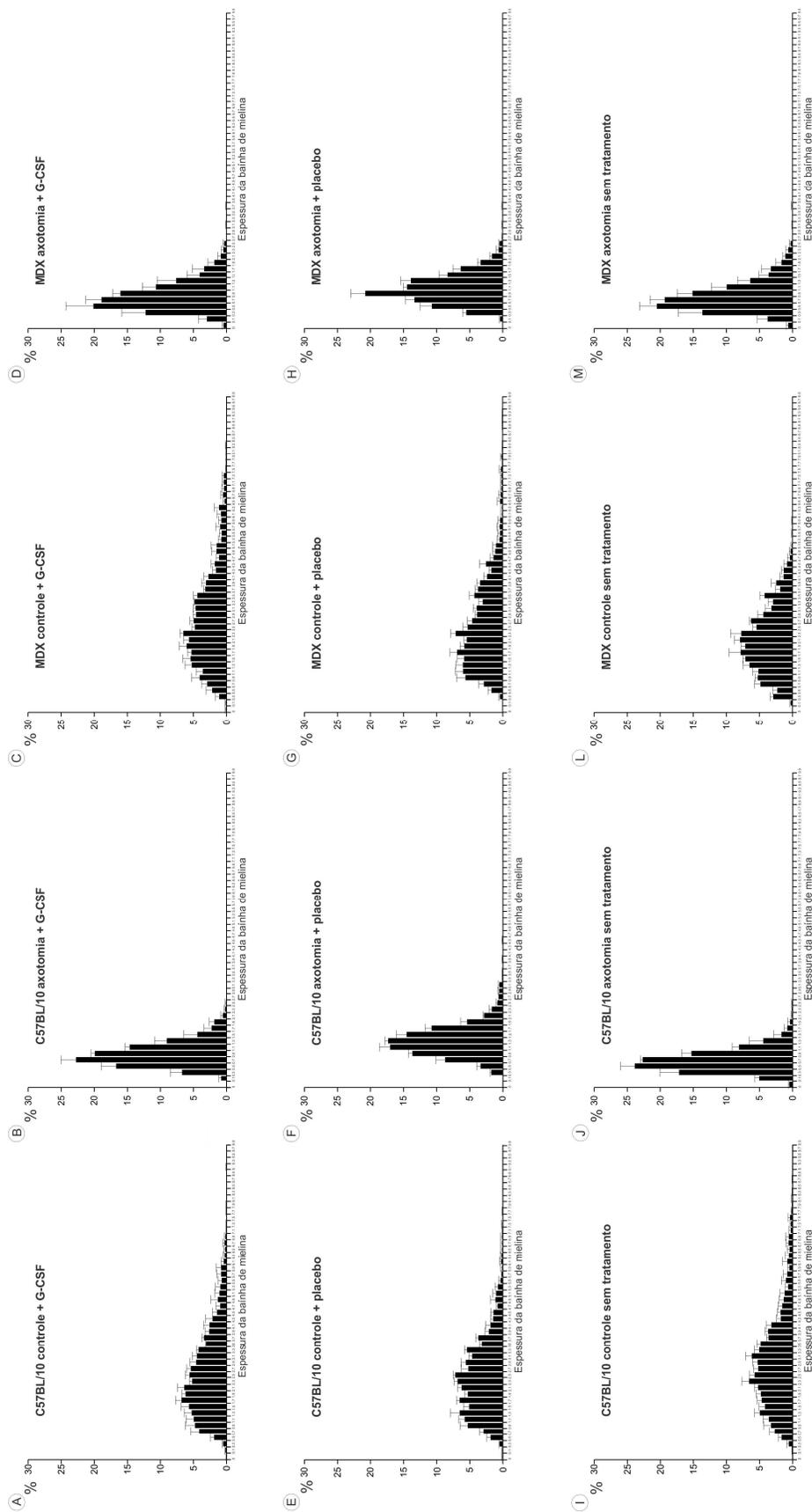


Figura 21: Distribuição da frequência da espessura da bainha de mielina (EBM) em nervos lesionados e não lesionados (contralateral), 21 dias após a lesão. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão.

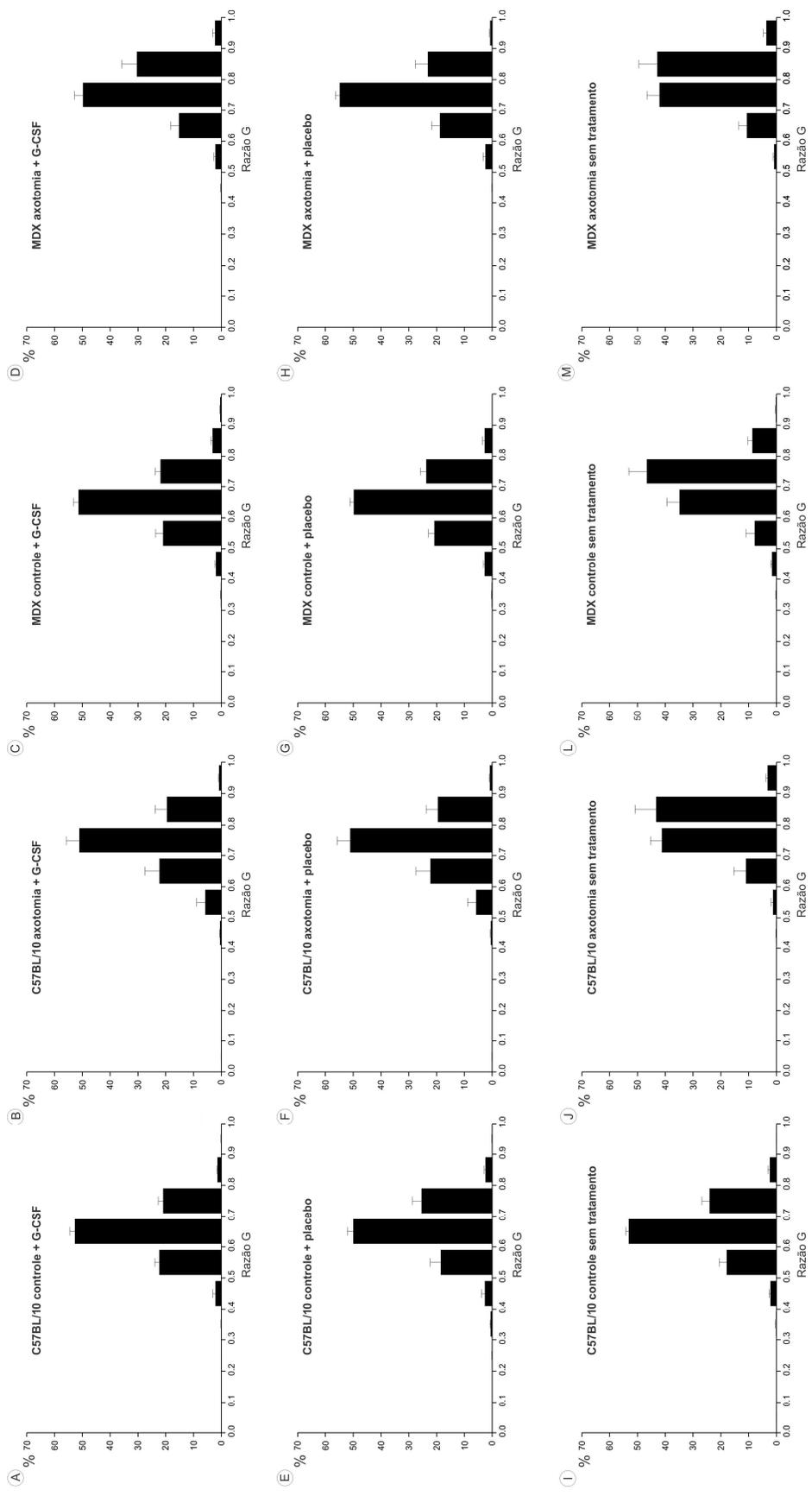


Figura 22: Distribuição da frequência da razão “g” (RZG) em nervos lesionados e não lesionados (contralateral), 21 dias após a lesão. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão.

4.8 Número total de axônios mielínicos

A figura 23 mostra a quantificação do número total de axônios mielínicos dos nervos submetidos à lesão sem tratamento, placebo e tratados com G-CSF. Na análise contralateral à lesão dos camundongos MDX sem tratamento, pudemos observar um aumento de 13% e 9% no número total de fibras mielínicas em relação aos camundongos não tratados e tratados com placebo, respectivamente. O mesmo pode ser observado nos camundongos C57BL/10, os quais apresentaram um aumento de, aproximadamente, 7% e 5% em relação aos camundongos não tratados e tratados com placebo, respectivamente. Quando analisamos os camundongos MDX sem tratamento com os camundongos C57BL/10 sem tratamento, pudemos observar uma redução de 13% no número total de axônios na linhagem MDX.

A análise ipsilateral mostrou que o tratamento com G-CSF promoveu um aumento no número de axônios mielínicos nos camundongos MDX, onde que os mesmos apresentaram um aumento de 21% e 20% em relação aos camundongos sem tratamento e tratados com placebo, respectivamente. Na linhagem C57BL/10 pudemos observar aumento de 1% e 3% em relação aos grupos sem tratamento e tratados com placebo, respectivamente.

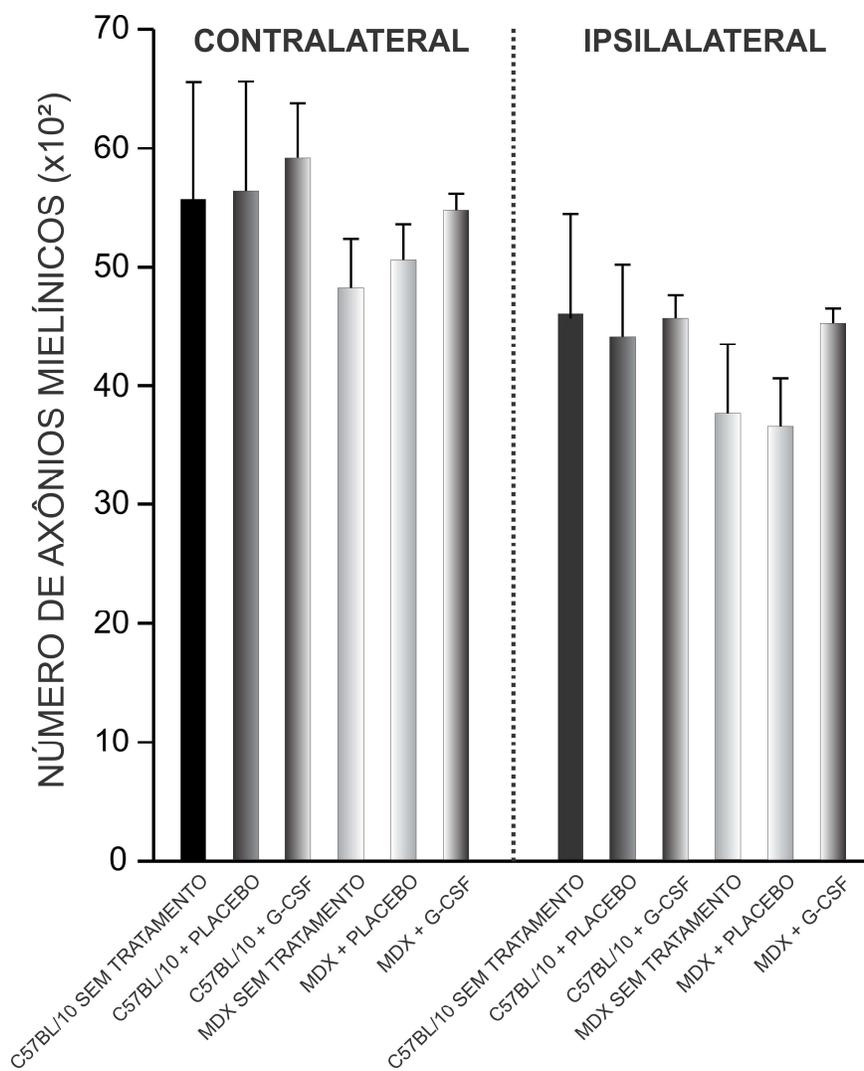


Figura 23: Análise quantitativa do número total de axônios mielínicos.

4.9 Número de fibras degeneradas durante análise morfológica do nervo isquiático

A figura 24 mostra a quantificação do número total de fibras degeneradas durante a análise morfológica dos nervos submetidos à lesão sem tratamento, placebo e tratados com G-CSF. A análise ipsilateral à lesão nos camundongos MDX tratados com G-CSF mostrou uma redução de 11% e 6% no número de fibras degeneradas em relação aos grupos sem tratamento e tratado com placebo, respectivamente. O mesmo pôde ser observado nos camundongos C57BL/10, onde o tratamento com G-CSF reduziu em 6% e 4% o número de fibras degeneradas em relação aos grupos sem tratamento e tratado com placebo, respectivamente.

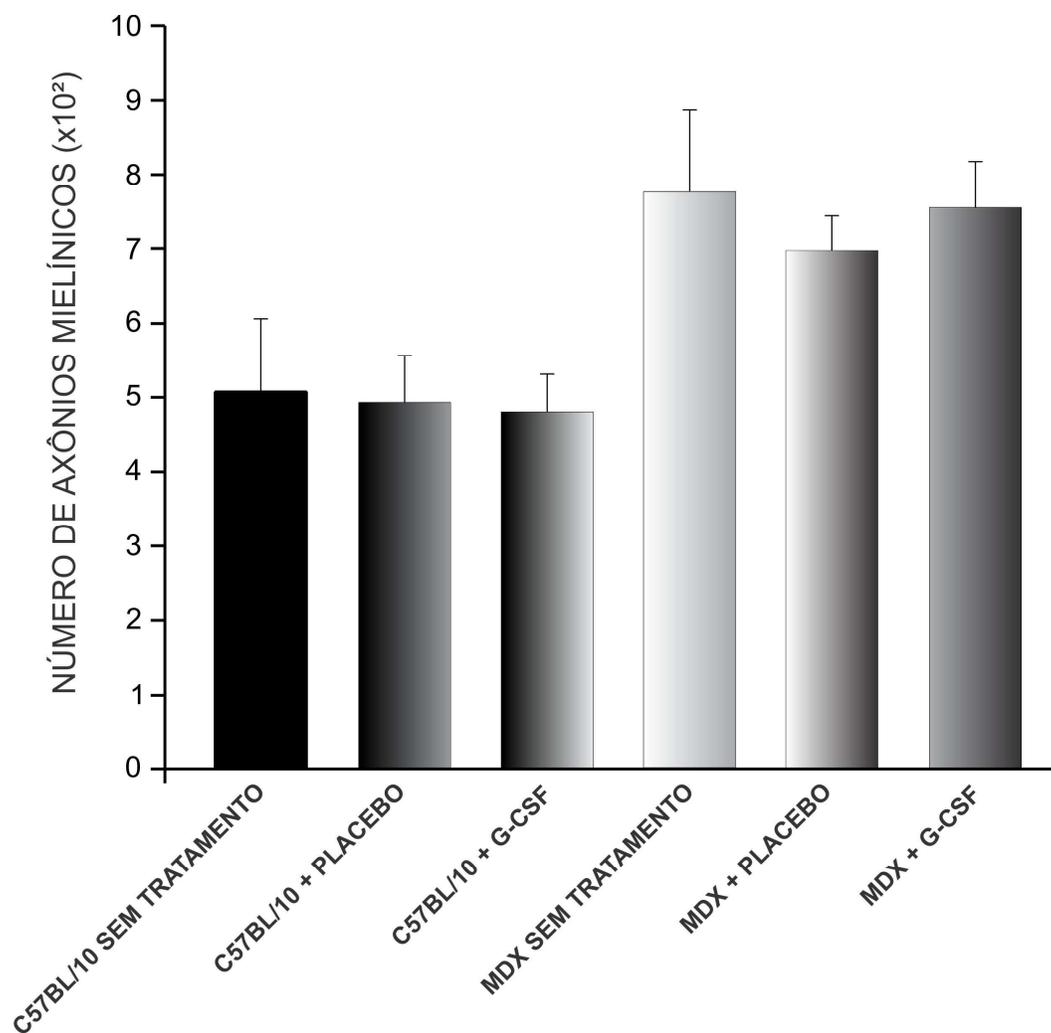


Figura 24: Análise quantitativa do número de fibras degeneradas.

4.10 Análise da função motora após esmagamento do nervo isquiático

Para a análise da recuperação da função motora, os camundongos foram monitorados durante três semanas, diariamente até o décimo dia após a lesão e, em dias alternados, do décimo primeiro até o vigésimo primeiro dia após a lesão. Os resultados demonstraram que os camundongos MDX, sem tratamento, placebo e tratados com G-CSF, apresentaram déficit motor mais intenso em relação aos camundongos C57BL/10 antes mesmo da lesão (MDX sem tratamento, $-35,14 \pm 3,82$, média da porcentagem da função motora + EP; C57BL/10 sem tratamento, $-7,63 \pm 0,94$, $p < 0,001$, Figura 25F; e MDX + placebo, $-35,82 \pm 1,57$; C57BL/10 + placebo, $-10,01 \pm 1,63$, $p < 0,001$, Figura 25E). O tratamento com G-CSF promoveu uma melhora na função motora nos camundongos MDX antes de serem submetidos à axotomia do nervo isquiático esquerdo. Conseqüentemente, não houve diferença estatística entre as linhagens (MDX + G-CSF, $-17,58 \pm 2,85$; C57BL/10 + G-CSF, $-10,84 \pm 2,00$, $p > 0,05$, Figura 25D). Quando comparamos os camundongos MDX sem tratamento com os camundongos MDX tratados com G-CSF observamos um aumento da função motora nos camundongos tratados com G-CSF (MDX sem tratamento, $-35,14 \pm 3,82$; MDX + G-CSF, $-17,58 \pm 2,85$, $p < 0,001$, Figura 25C). O mesmo pode ser visto quando comparamos o grupo placebo com o grupo tratado (MDX + placebo, $-35,82 \pm 1,57$; MDX + G-CSF, $-17,58 \pm 2,85$, $p < 0,01$, Figura 25C).

Ao final de três semanas, a curva de recuperação motora manteve-se similar entre as duas linhagens, porém os camundongos MDX apresentaram redução significativa da função motora (MDX sem tratamento, $-36,92 \pm 6,70$; C57BL/10 sem tratamento, $-7,70 \pm 2,99$, $p < 0,001$, Figura 25F; MDX + placebo, $-33,26 \pm 3,40$; C57BL/10 + placebo, $-15,76 \pm 2,55$, $p < 0,001$, Figura 25E:

MDX + G-CSF, $-18,71 \pm 2,66$; C57BL/10 + G-CSF, $-9,50 \pm 3,70$, $p < 0,05$, Figura 25D). A análise entre os grupos sem tratamento e tratado também demonstrou uma maior função motora nos camundongos MDX tratados em relação aos camundongos MDX sem tratamento (MDX sem tratamento, $-36,92 \pm 6,70$; MDX + G-CSF, $-18,71 \pm 2,66$, $p < 0,001$, Figura 25C). O mesmo pôde ser observado quando comparamos o grupo placebo com o grupo tratado (MDX + placebo, $-33,26 \pm 3,40$; MDX + G-CSF, $-18,71 \pm 2,66$, $p < 0,01$, Figura 25C)

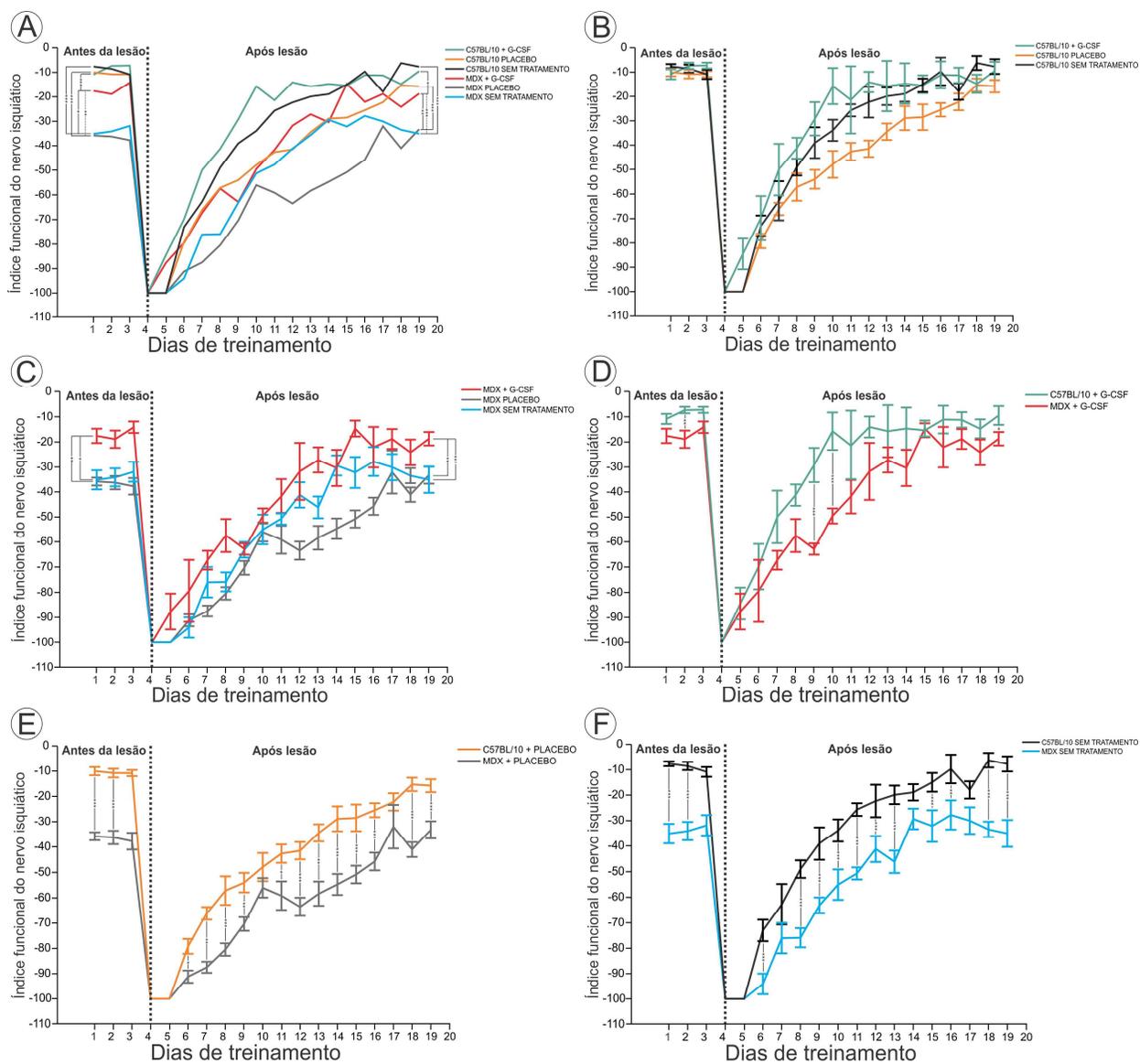


Figura 25: Gráficos mostrando a recuperação da função motora entre as linhagens C57BL/10 e MDX. Figura A – comparação da recuperação funcional do nervo isquiático entre os grupos sem tratamento, placebo e tratados com G-CSF nas linhagens MDX e C57BL/10. Figura B - comparação da recuperação funcional do nervo isquiático entre os grupos sem tratamento, placebo e tratados com G-CSF na linhagem C57BL/10. Figura C - comparação da recuperação funcional do nervo isquiático entre os grupos sem tratamento, placebo e tratados com G-CSF na linhagem MDX. Figura D - comparação da recuperação funcional do nervo isquiático entre os camundongos MDX e C57BL/10 tratados com G-CSF. Figura E - comparação da recuperação funcional do nervo isquiático entre os camundongos MDX e C57BL/10 tratados com placebo. Figura F - comparação da recuperação funcional do nervo isquiático entre os camundongos MDX e C57BL/10 sem tratamento.

4.11 Imunorreatividade para neurofilamento nos nervos lesionados não tratados e tratados com G-CSF

Dez dias após ao esmagamento do nervo isquiático a quantificação da imunoistoquímica para neurofilamento, através da densidade integrada de pixels, demonstrou uma redução significativa em camundongos MDX sem tratamento (MDX contralateral sem tratamento, $11,21 \pm 0,21$, C57BL/10 contralateral sem tratamento, $14,52 \pm 0,90$, $p < 0,001$: MDX ipsilateral sem tratamento, $7,19 \pm 0,18$, C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $11,22 \pm 0,25$, $p < 0,001$ Figura 26). Após tratamento com G-CSF, constatamos que houve aumento mais intenso da expressão de neurofilamento nos camundongos MDX (MDX contralateral sem tratamento, $11,21 \pm 0,21$; MDX contralateral + G-CSF, $13,85 \pm 0,14$, $p < 0,001$: MDX ipsilateral sem tratamento, $7,19 \pm 0,18$; MDX ipsilateral + G-CSF, $11,27 \pm 0,42$, $p < 0,01$: C57BL/10 contralateral sem tratamento, $14,52 \pm 0,90$; C57BL/10 contralateral + G-CSF, $15,31 \pm 0,28$, $p > 0,05$: C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $11,22 \pm 0,25$; C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $11,56 \pm 0,35$, $p > 0,05$, Figura 26).

NEUROFILAMENTO

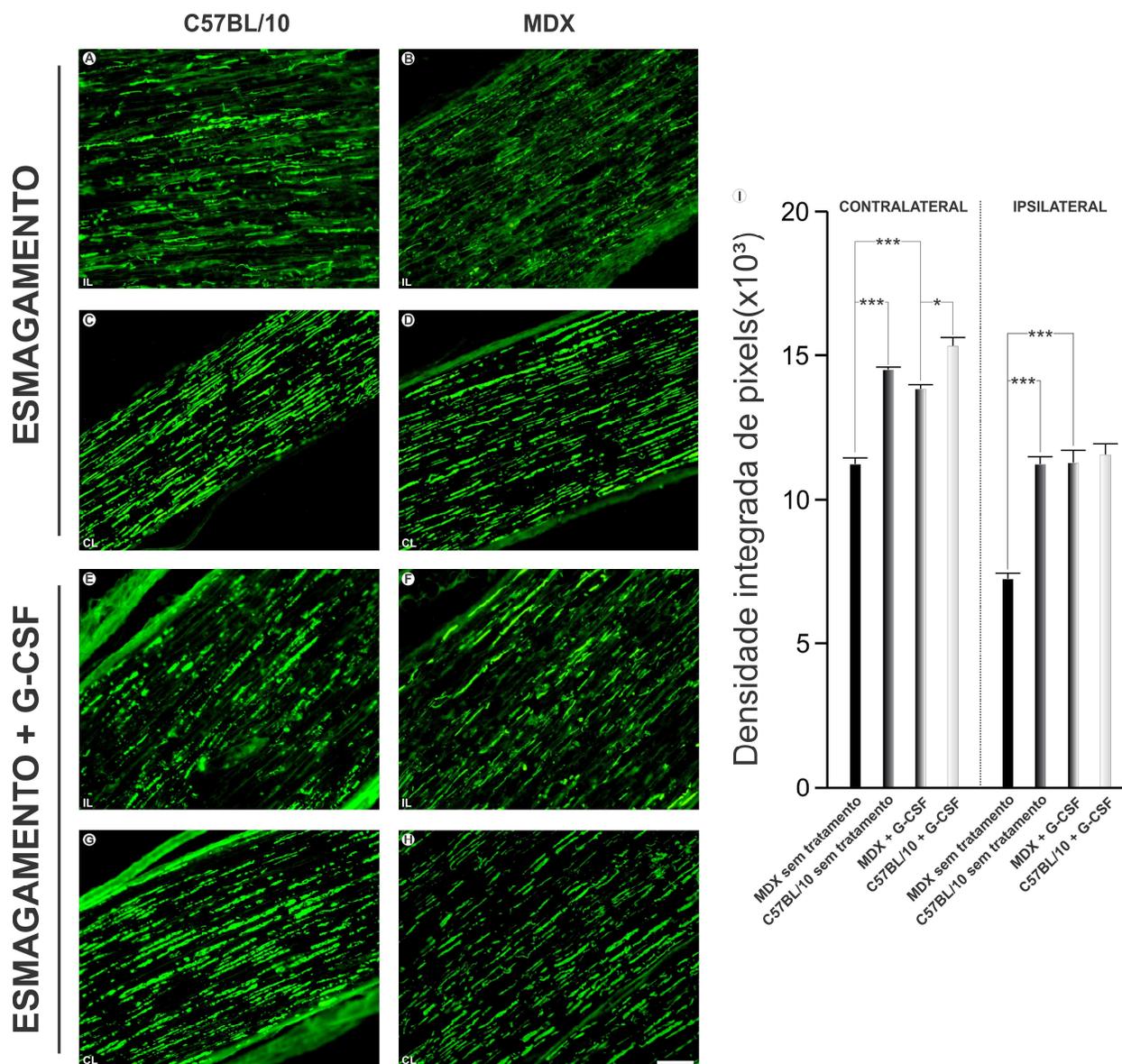


Figura 26: Imunomarcção anti-neurofilamento dez dias após esmagamento do nervo isquiático. Figuras A e B, mostrando nervo ipsilateral (IL) sem tratamento; Figuras C e D, mostrando nervo contralateral sem tratamento; Figuras E e F, mostrando nervo ipsilateral + G-CSF da; Figuras G e H, mostrando nervo contralateral + G-CSF. Note que há uma menor imunorreatividade na linhagem MDX em relação à linhagem C57BL/10 em todos os grupos. Porém, no grupo tratado com G-CSF houve um aumento da imunomarcção de neurofilamento contra e ipsilateral. Escala = 50 μ m.

A análise da imunistoquímica do nervo isquiático, 21 dias após a lesão, demonstrou um aumento da imunorreatividade para neurofilamento nos grupos sem tratamento, placebo e tratados com G-CSF (MDX contralateral sem tratamento, $11,49 \pm 0,27$; MDX ipsilateral sem tratamento, $6,49 \pm 0,59$, $p < 0,001$: MDX contralateral sem tratamento, $11,49 \pm 0,27$; C57BL/10 contralateral sem tratamento, $15,99 \pm 0,72$, $p < 0,01$: MDX ipsilateral sem tratamento, $6,49 \pm 0,59$; C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $9,44 \pm 0,59$, $p < 0,01$: C57BL/10 contralateral sem tratamento, $15,99 \pm 0,72$; C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $9,44 \pm 0,59$, $p < 0,001$: MDX contralateral + placebo, $10,94 \pm 0,28$; MDX ipsilateral + placebo, $7,52 \pm 0,77$, $p < 0,01$: MDX contralateral + placebo, $10,94 \pm 0,28$; C57BL/10 contralateral + placebo, $14,31 \pm 0,55$, $p < 0,01$: MDX ipsilateral + placebo, $7,52 \pm 0,77$; C57BL/10 ipsilateral + placebo, $11,21 \pm 0,26$, $p < 0,001$: MDX contralateral + G-CSF, $15,72 \pm 0,81$; MDX ipsilateral + G-CSF, $11,42 \pm 0,83$, $p < 0,01$: MDX contralateral + G-CSF, $15,72 \pm 0,81$; C57BL/10 contralateral + G-CSF, $16,92 \pm 0,42$, $p > 0,05$: MDX ipsilateral + G-CSF, $11,42 \pm 0,83$; C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $12,26 \pm 0,43$, $p > 0,05$: C57BL/10 contralateral + G-CSF, $16,92 \pm 0,42$; C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $12,26 \pm 0,43$, $p > 0,05$, Figura 27). Ao compararmos os grupos sem tratamento com os grupos tratados, pudemos observar que os camundongos tratados apresentaram um aumento mais intenso na expressão de neurofilamento e, também, na reorganização das fibras regeneradas (MDX contralateral sem tratamento, $11,49 \pm 0,27$; MDX contralateral + G-CSF, $15,72 \pm 0,81$, $p < 0,01$: MDX ipsilateral sem tratamento, $6,49 \pm 0,59$; MDX ipsilateral + G-CSF, $11,42 \pm 0,83$, $p < 0,01$: C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $9,44 \pm 0,59$; C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $12,26 \pm 0,43$, $p > 0,05$, Figura 27).

NEUROFILAMENTO

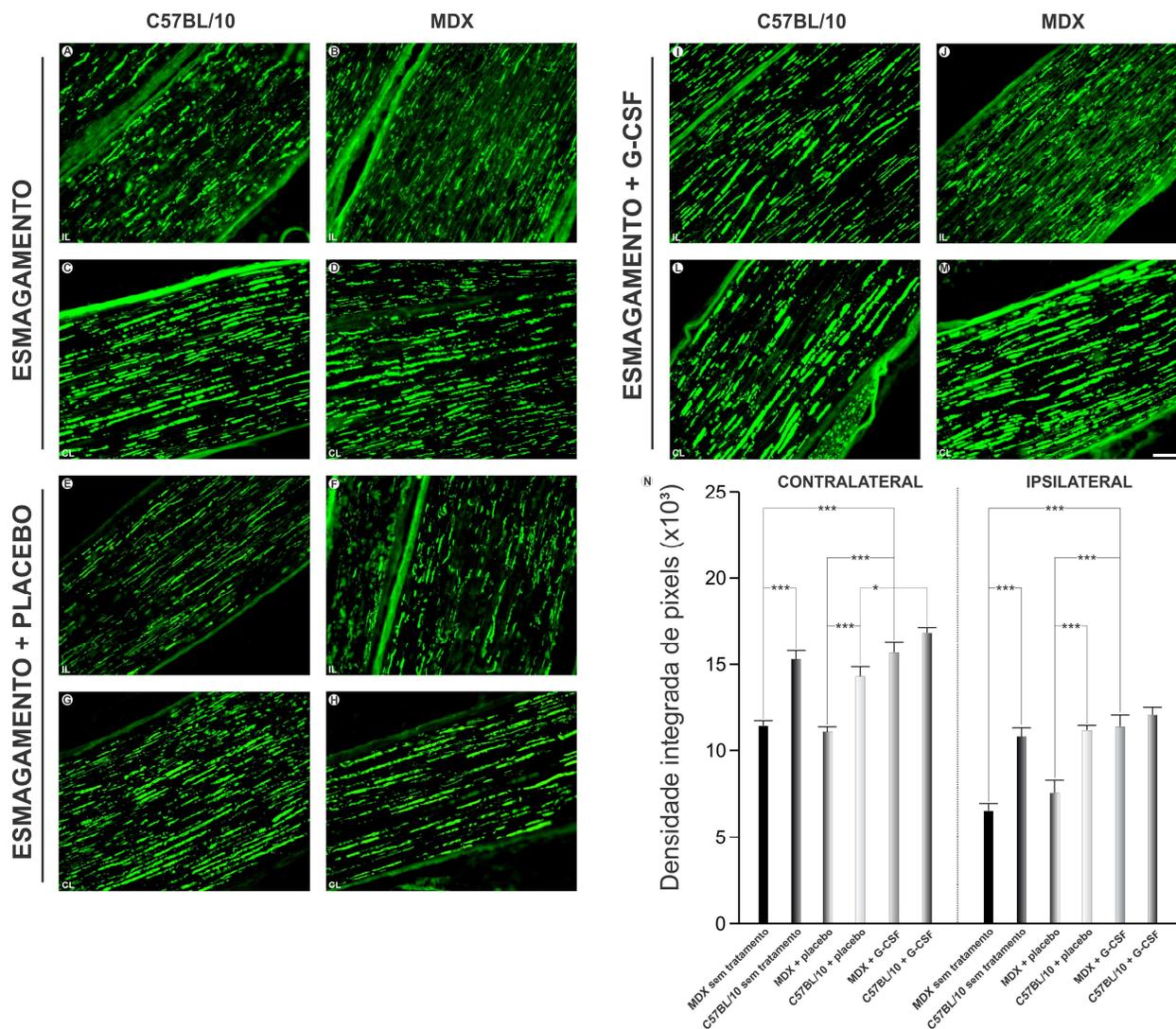


Figura 27: Imunomarcção anti-neurofilamento três semanas após o esmagamento do nervo isquiático. Figuras A e B, mostrando nervo ipsilateral (IL) sem tratamento; Figuras C e D, mostrando nervo contralateral sem tratamento; Figuras E e F, mostrando nervo ipsilateral + G-CSF da; Figuras G e H, mostrando nervo contralateral + G-CSF. Note que há uma maior imunorreatividade na linhagem C57BL/10 em relação à linhagem MDX em todos os grupos. Porém, no grupo tratado com G-CSF houve um aumento da imunomarcção de neurofilamento contra e ipsilateral. Escala = 50µm.

4.12 Imunorreatividade para p75NTR nos nervos lesionados não tratados e tratados com G-CSF

Dez dias após o esmagamento do nervo isquiático a quantificação da imunoistoquímica para p75NTR (receptor de baixa afinidade para neurotrofinas), através da densidade integrada de pixels, demonstrou um aumento mais intenso em camundongos MDX sem tratamento (MDX contralateral sem tratamento, $1,25 \pm 0,31$, C57BL/10 contralateral sem tratamento, $0,34 \pm 0,1$, $p < 0,001$: MDX ipsilateral sem tratamento, $6,18 \pm 0,21$, C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $3,47 \pm 0,21$, $p < 0,001$, Figura 28). Após tratamento com G-CSF pudemos constatar que houve aumento acentuado da expressão de neurofilamento nos camundongos MDX (MDX contralateral sem tratamento, $1,25 \pm 0,31$; MDX contralateral + G-CSF, $4,36 \pm 0,31$, $p < 0,001$: MDX ipsilateral sem tratamento, $6,18 \pm 0,21$; MDX ipsilateral + G-CSF, $13,20 \pm 0,2$, $p < 0,001$: C57BL/10 contralateral sem tratamento, $0,34 \pm 0,1$; C57BL/10 contralateral + G-CSF, $1,98 \pm 0,15$, $p < 0,001$: C57BL/10 ipsilateral sem tratamento, $3,47 \pm 0,21$; C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $11,71 \pm 0,40$, $p < 0,01$, Figura 28).

p75 NTR

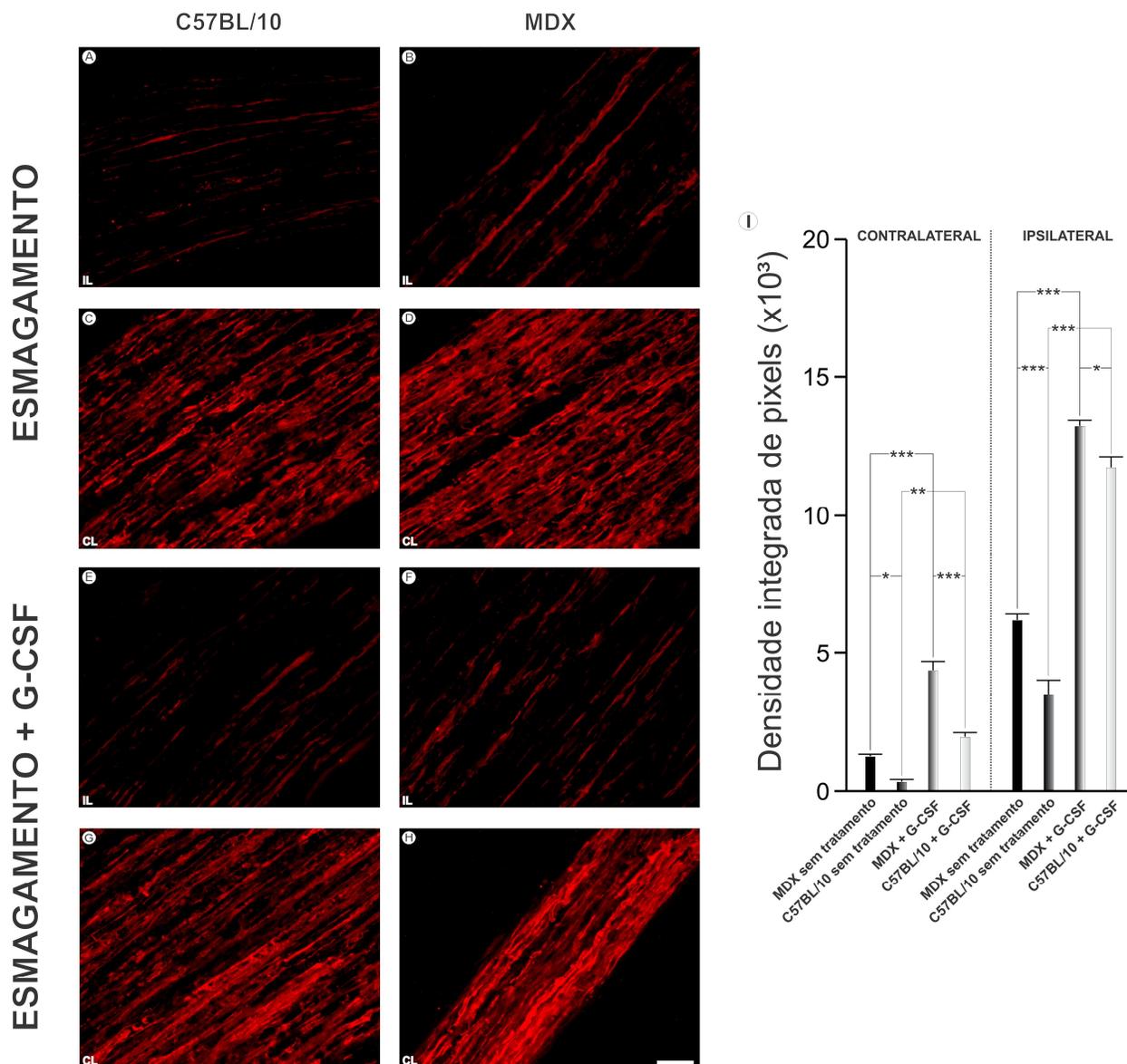


Figura 28: Imunomarcção anti-p75NTR dez dias após o esmagamento do nervo isquiático. Figuras A e B, mostrando nervo ipsilateral (IL) sem tratamento; Figuras C e D, mostrando nervo contralateral sem tratamento; Figuras E e F, mostrando nervo ipsilateral + G-CSF da; Figuras G e H, mostrando nervo contralateral + G-CSF. Note que há uma menor imunorreatividade na linhagem MDX em relação à linhagem C57BL/10 em todos os grupos. Porém, no grupo tratado com G-CSF houve um aumento da imunomarcção de neurofilamento contra e ipsilateral. Escala = 50 μ m.

Ao analisarmos a imunorreatividade para p75NTR, 21 dias após o esmagamento do nervo isquiático observamos maior reatividade nos camundongos MDX (MDX contralateral sem tratamento, $2,42 \pm 0,38$; MDX ipsilateral sem tratamento, $5,96 \pm 0,16$, $p < 0,001$: MDX contralateral sem tratamento, $2,42 \pm 0,38$; C57BL/10 contralateral sem tratamento, $0,85 \pm 0,17$, $p < 0,01$: MDX ipsilateral sem tratamento, $5,96 \pm 0,16$; C57Bl/10 ipsilateral sem tratamento, $6,97 \pm 0,23$, $p < 0,01$: C57BL/10 contralateral sem tratamento, $0,85 \pm 0,17$; C57Bl/10 ipsilateral sem tratamento, $6,97 \pm 0,23$, $p < 0,001$, Figura 29). Após tratamento com G-CSF pudemos observar um aumento mais intenso na expressão de p75NTR (MDX contralateral + G-CSF, $3,63 \pm 0,17$; MDX ipsilateral + G-CSF, $12,58 \pm 0,59$, $p < 0,001$: MDX contralateral + G-CSF, $3,63 \pm 0,17$: C57BL/10 contralateral + G-CSF, $1,80 \pm 0,21$, $p < 0,001$: MDX ipsilateral + G-CSF, $12,58 \pm 0,59$; C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $9,19 \pm 0,46$, $p < 0,001$: C57BL/10 contralateral + G-CSF, $1,80 \pm 0,21$: C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $9,19 \pm 0,46$, $p < 0,001$, Figura 29).

Esse aumento ficou mais evidenciado quando comparamos os grupos sem tratamento com os grupos tratados com G-CSF (MDX contralateral sem tratamento, $2,42 \pm 0,38$; MDX contralateral + G-CSF, $3,63 \pm 0,17$, $p < 0,05$: C57BL/10 contralateral sem tratamento, $0,85 \pm 0,17$; C57BL/10 contralateral + G-CSF, $1,80 \pm 0,21$, $p < 0,05$: MDX ipsilateral sem tratamento, $5,96 \pm 0,16$; MDX ipsilateral + G-CSF, $12,58 \pm 0,59$, $p < 0,001$: C57Bl/10 ipsilateral sem tratamento, $6,97 \pm 0,23$; C57BL/10 ipsilateral + G-CSF, $9,19 \pm 0,46$, $p < 0,01$, Figura 29)

p75 NTR

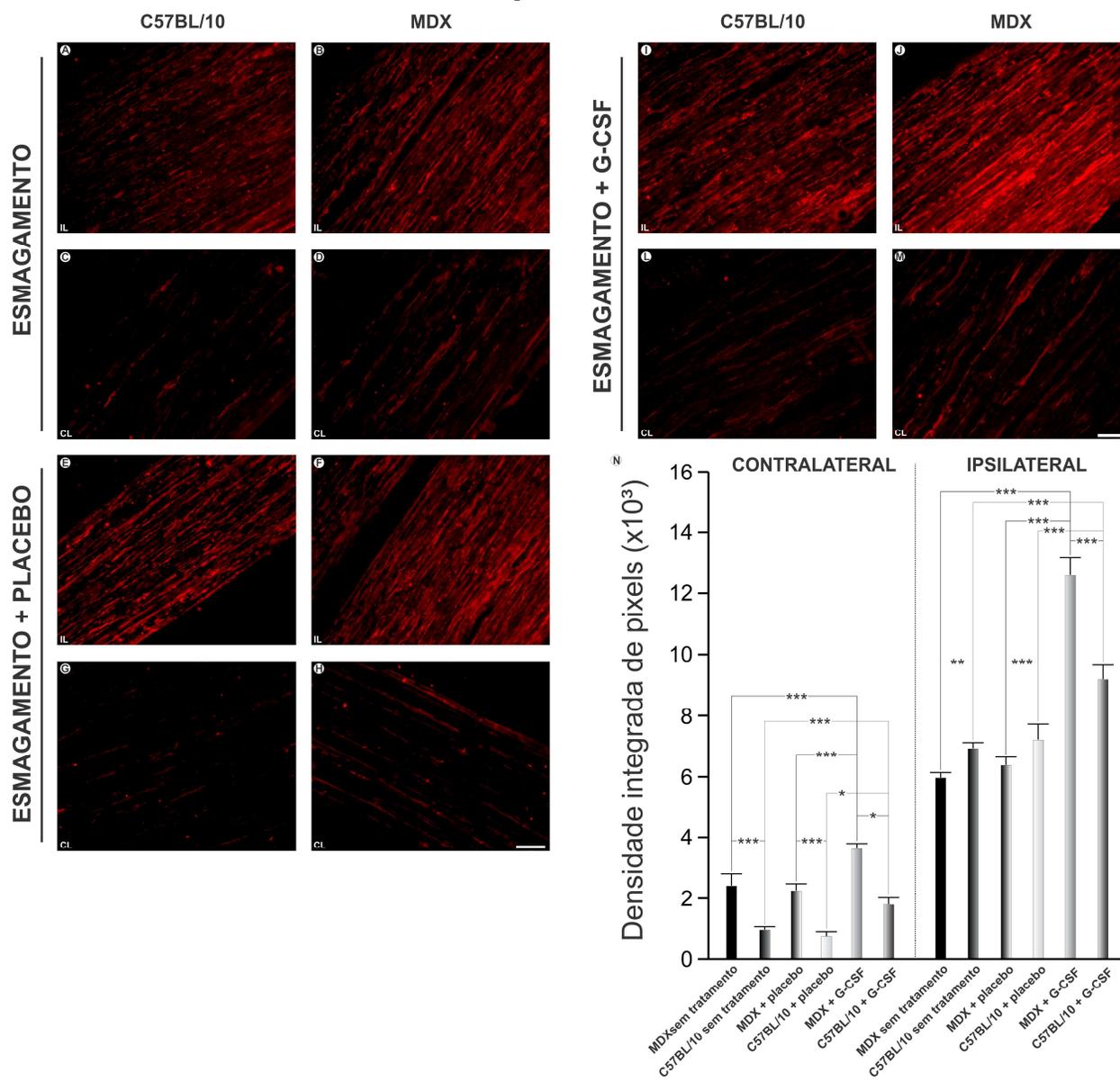


Figura 29: Imunomarcção anti-p75NTR (receptor de baixa afinidade para neurotrofinas) três semanas após o esmagamento do nervo isquiático. Figuras A e B, mostrando nervo ipsilateral (IL) sem tratamento; Figuras C e D, mostrando nervo contralateral sem tratamento; Figuras E e F, mostrando nervo ipsilateral + placebo; Figuras G e H, mostrando nervo contralateral + placebo. Figuras I e J, mostrando nervo ipsilateral + G-CSF; Figuras L e M, mostrando nervo contralateral + G-CSF. Note que há uma maior imunorreatividade na linhagem MDX em relação à linhagem C57BL/10 em todos os grupos. Porém, no grupo tratado com G-CSF houve um aumento da imunomarcção contra e ipsilateral. Escala = 50 μ m.

4.13 Análise morfológica do músculo sóleo em camundongos MDX tratados com G-CSF

Durante a análise das fibras musculares em camundongos que não foram submetidos à axotomia do nervo isquiático, pudemos observar que os camundongos MDX tratados com G-CSF apresentaram uma maior porcentagem de fibras musculares normais em relação aos camundongos que não foram submetidos ao tratamento, 55% e 46%, respectivamente (Figura 30). Consequentemente, a porcentagem de fibras regeneradas foi menor no grupo tratado (45%) em relação aos camundongos não tratados (54%). Nos camundongos C57BL/10 não foram observadas diferenças na porcentagem de fibras normais (98% para o grupo tratado e 99% para o grupo sem tratamento).

Sete dias após a axotomia do nervo isquiático as fibras musculares contra e ipsilateral foram quantificadas. Durante a análise ipsilateral, pudemos observar um efeito protetor do fármaco sobre as fibras musculares, onde que os camundongos tratados apresentaram 62% de fibras não afetadas pela degeneração, enquanto que, nos camundongos que não foram tratados com G-CSF foi observado 51% de fibras preservadas. Consequentemente, encontramos 38% de fibras regeneradas em camundongos MDX tratados com G-CSF e 49% de fibras regeneradas em camundongos MDX não submetidos ao tratamento com G-CSF. Nos camundongos C57BL/10 não constatamos diferenças entre os grupos sem tratamento e tratados com G-CSF, onde que apresentaram 95,7% e 95,6% de fibras normais, respectivamente (Figura 30).

SÓLEO

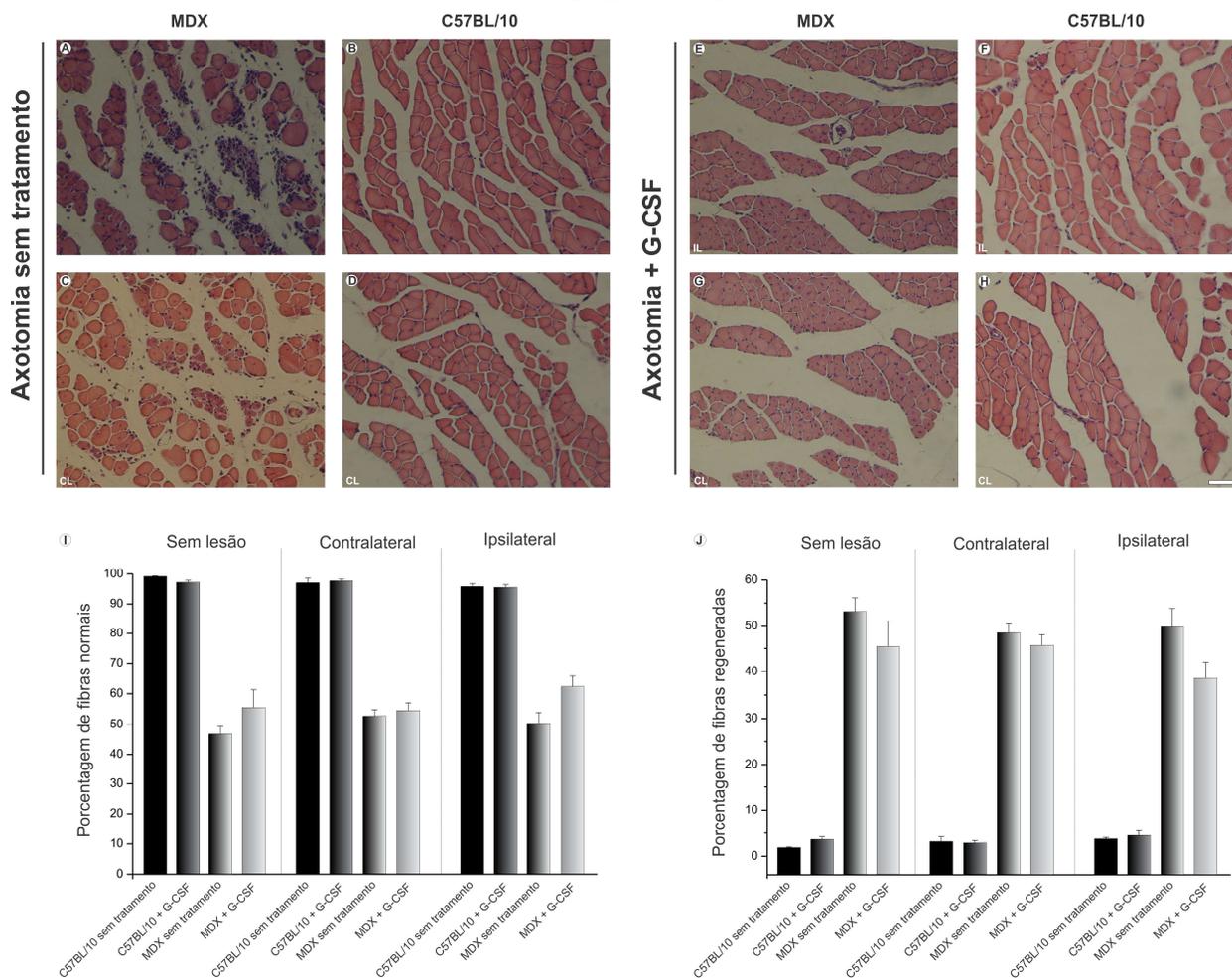


Figura 30: Coloração por H&E. Figuras A e C, mostrando músculo sóleo da linhagem C57BL/10 submetida à axotomia do nervo isquiático sem tratamento, ipsilateral e contralateral, respectivamente; Figuras B e D, mostrando músculo sóleo da linhagem MDX submetida à axotomia do nervo isquiático sem tratamento, ipsilateral e contralateral, respectivamente; Figuras E e G, mostrando músculo sóleo da linhagem C57BL/10 submetida à axotomia do nervo isquiático + G-CSF, ipsilateral e contralateral, respectivamente; Figuras B e D, mostrando músculo sóleo da linhagem MDX submetida à axotomia do nervo isquiático + G-CSF, ipsilateral e contralateral, respectivamente. Figura I, quantificação da porcentagem de fibras normais entre as linhagens. Figura J, quantificação da porcentagem de fibras regeneradas entre as linhagens. Escala = 20 μ m.

4.14 Efeitos *in vitro* do tratamento G-CSF em culturas primárias de astrócitos

Para confirmar os efeitos diretos do G-CSF sobre as células gliais, culturas purificadas de astrócitos provenientes de córtex cerebral de camundongos MDX e C57BL/10 neonatos foram estabelecidas. Baseando-se na literatura, diferentes concentrações de G-CSF foram utilizadas e os resultados a respeito das curvas de crescimento (Figura 31) e expressão de GFAP (Figuras 32, 33 e 34), G-CSF (Figuras 35, 36 e 37) e MHC-I (Figuras 38, 39 e 40) foram documentados e quantificados. Pudemos observar que astrócitos de camundongos MDX apresentaram uma taxa de crescimento 50% maior em relação aos camundongos C57BL/10. Após serem tratadas com as doses de 100 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ e 1000 $\mu\text{g/ml}$ durante sete dias, pudemos observar um aumento mais intenso do número de células nas duas linhagens, porém a linhagem MDX apresentou um maior número de células em relação à linhagem C57BL/10. No quinto dia de tratamento observamos, nas células da linhagem MDX tratadas com G-CSF, um pico na curva de crescimento celular, sendo que, a partir desse ponto a curva de crescimento começou a declinar (Figura 18). A linhagem C57BL/10 apresentou uma curva linear de crescimento ao longo do tratamento, exceto para a dosagem de 1000 $\mu\text{g/ml}$ onde, a partir do quinto dia de tratamento, houve um declínio do crescimento celular (Figura 31G).

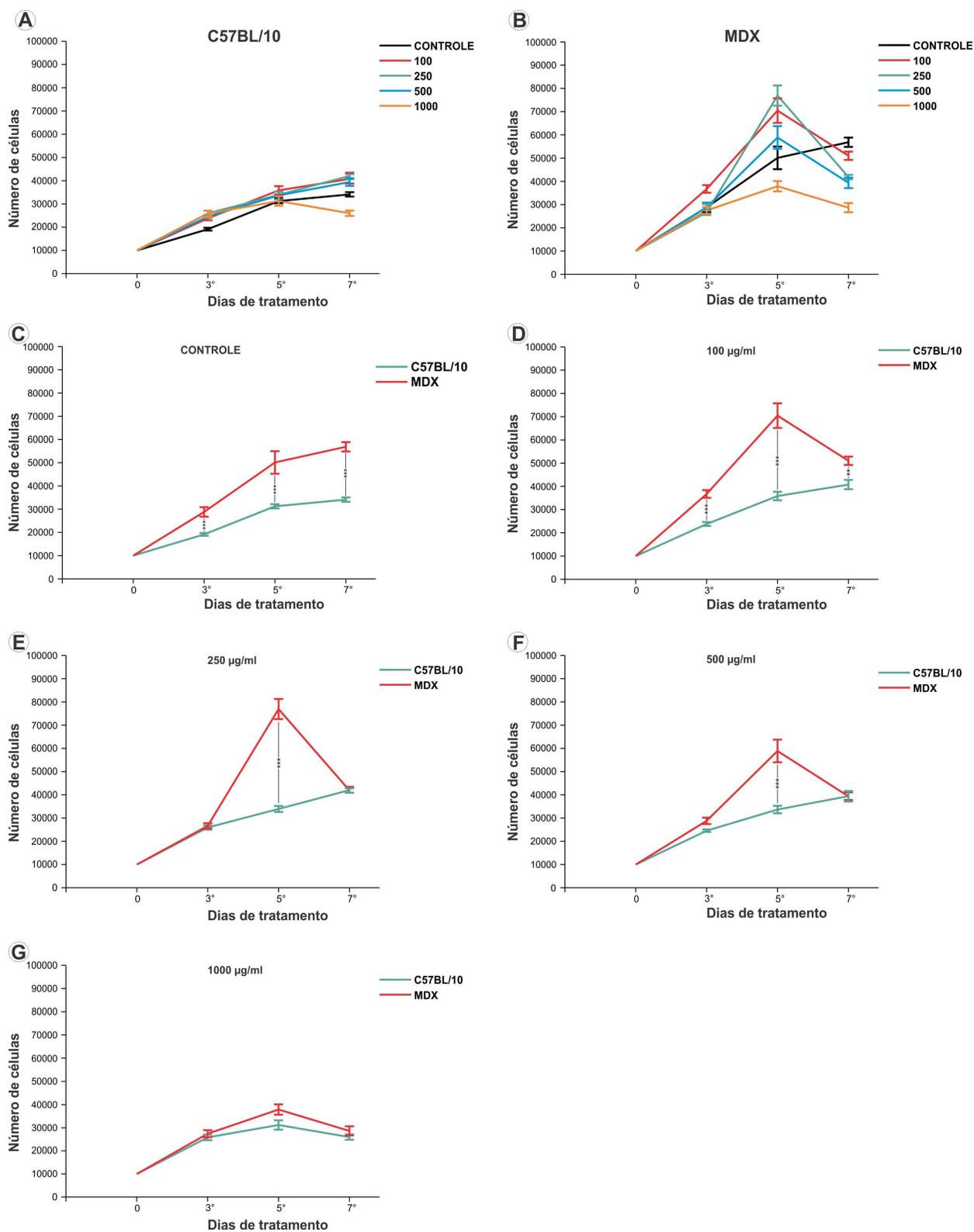


Figura 31. Curvas de crescimento celular. Figuras A e B representam as curvas de crescimento de todos os grupos estudados nas linhagens C57BL/10 e MDX, respectivamente; Figura C, comparação das curvas de crescimento do grupo controle para os camundongos C57BL/10 e MDX; Figura D, comparação das curvas de crescimento do grupo tratado com 100 $\mu\text{g/ml}$ para os camundongos C57BL/10 e MDX; Figura E, comparação das curvas de crescimento do grupo tratado com 250 $\mu\text{g/ml}$ para os camundongos C57BL/10 e MDX; Figura F, comparação das curvas de crescimento do grupo tratado com 500 $\mu\text{g/ml}$ para os camundongos C57BL/10 e MDX; Figura G, comparação das curvas de crescimento do grupo tratado com 1000 $\mu\text{g/ml}$ para os camundongos C57BL/10 e MDX

Após os três primeiros dias de tratamento, pudemos observar uma maior expressão de GFAP nos astrócitos dos grupos controle e tratado com 100 µg/ml na linhagem MDX, em relação à linhagem C57BL/10, (MDX controle, 12118,15 ± 916,28; C57BL/10 controle, 9216,33 ± 805,05, $p < 0,05$, média + erro padrão; MDX + 100 µg/ml, 14101,8 ± 1043,28; C57BL/10 + 100 µg/ml, 11843,51 ± 787,91, $p < 0,05$; MDX + 250 µg/ml, 15191,72 ± 704,97; C57BL/10 + 250 µg/ml, 13910,24 ± 793,61, $p > 0,05$; MDX + 500 µg/ml, 16475,93 ± 418,81; C57BL/10 + 500 µg/ml, 14702,24 ± 754,64, $p > 0,05$; MDX + 1000 µg/ml, 18084,3 ± 450,02; C57BL/10 + 1000 µg/ml, 17244,24 ± 650,33, $p > 0,05$, Figura 32). Quando analisamos a expressão de GFAP entre os grupos tratados dentro da mesma linhagem pudemos observar um aumento da imunorreatividade de forma gradual nas duas linhagens (MDX controle, 12118,15 ± 916,28; MDX + 100 µg/ml, 14101,8 ± 1043,28, $p > 0,05$; MDX + 250 µg/ml, 15191,72 ± 704,97, $p < 0,01$; MDX + 500 µg/ml, 16475,93 ± 418,81, $p < 0,001$; MDX + 1000 µg/ml, 18084,3 ± 450,02, $p < 0,001$, Figura 19K e C57BL/10 controle, 9216,33 ± 805,05; C57BL/10 + 100 µg/ml, 11843,51 ± 787,91, $p < 0,05$; C57BL/10 controle, 9216,33 ± 805,05; C57BL/10 + 100 µg/ml, 11843,51 ± 787,91, $p < 0,001$; C57BL/10 + 250 µg/ml, 13910,24 ± 793,61, $p < 0,001$; C57BL/10 + 500 µg/ml, 14702,24 ± 754,64, $p < 0,001$; C57BL/10 + 1000 µg/ml, 17244,24 ± 650,33, $p < 0,001$; Figura 32K).

Após 5 dias de cultivo celular e tratamento com G-CSF observamos que a linhagem MDX apresentou aumento acentuado da expressão de GFAP em todos os grupos analisados (MDX controle, 15746,52 ± 524,44; C57BL/10 controle, 12947,62 ± 667,27, $p < 0,01$, média + erro padrão; MDX + 100 µg/ml, 17358,58 ± 592,03; C57BL/10 + 100 µg/ml, 14037,87 ± 846,79, $p < 0,01$; MDX + 250 µg/ml, 19267,36 ± 862,6; C57BL/10 + 250 µg/ml, 16049,17 ± 895,15,

p<0,01: MDX + 500 µg/ml, 22136,8 ± 656,76; C57BL/10 + 500 µg/ml, 17032,87 ± 507,58,
p<0,001: MDX + 1000 µg/ml, 20907,2 ± 862,44; C57BL/10 + 1000 µg/ml, 17296,49 ± 378,4,
p<0,001, Figura 32K).

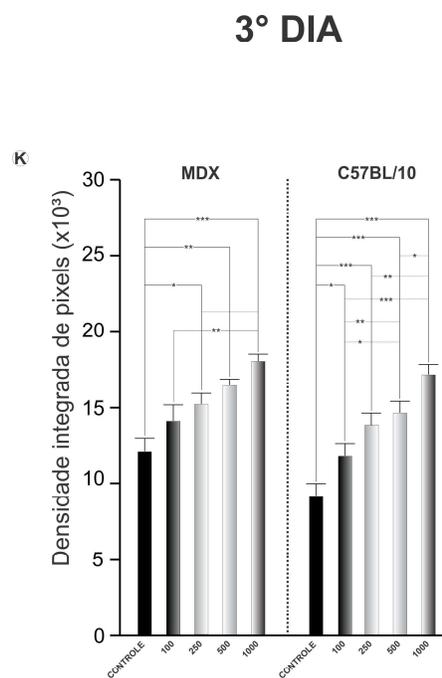
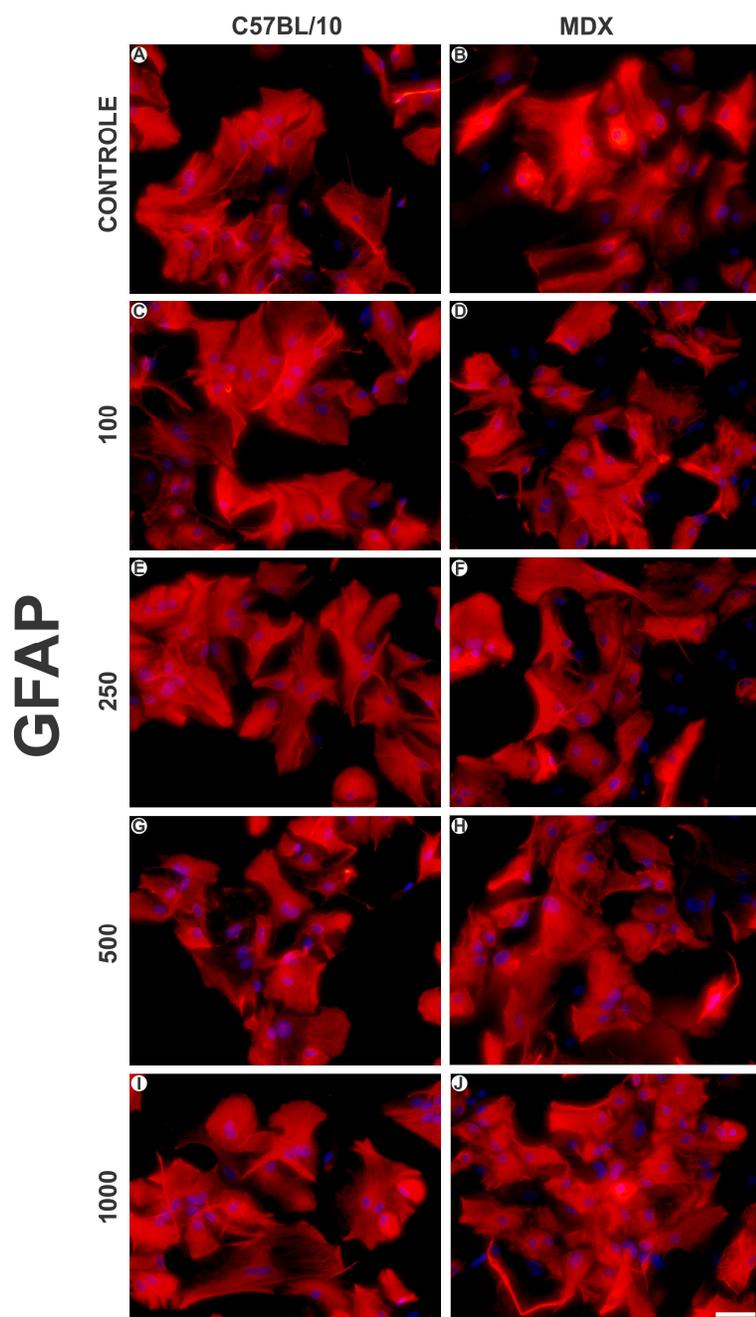
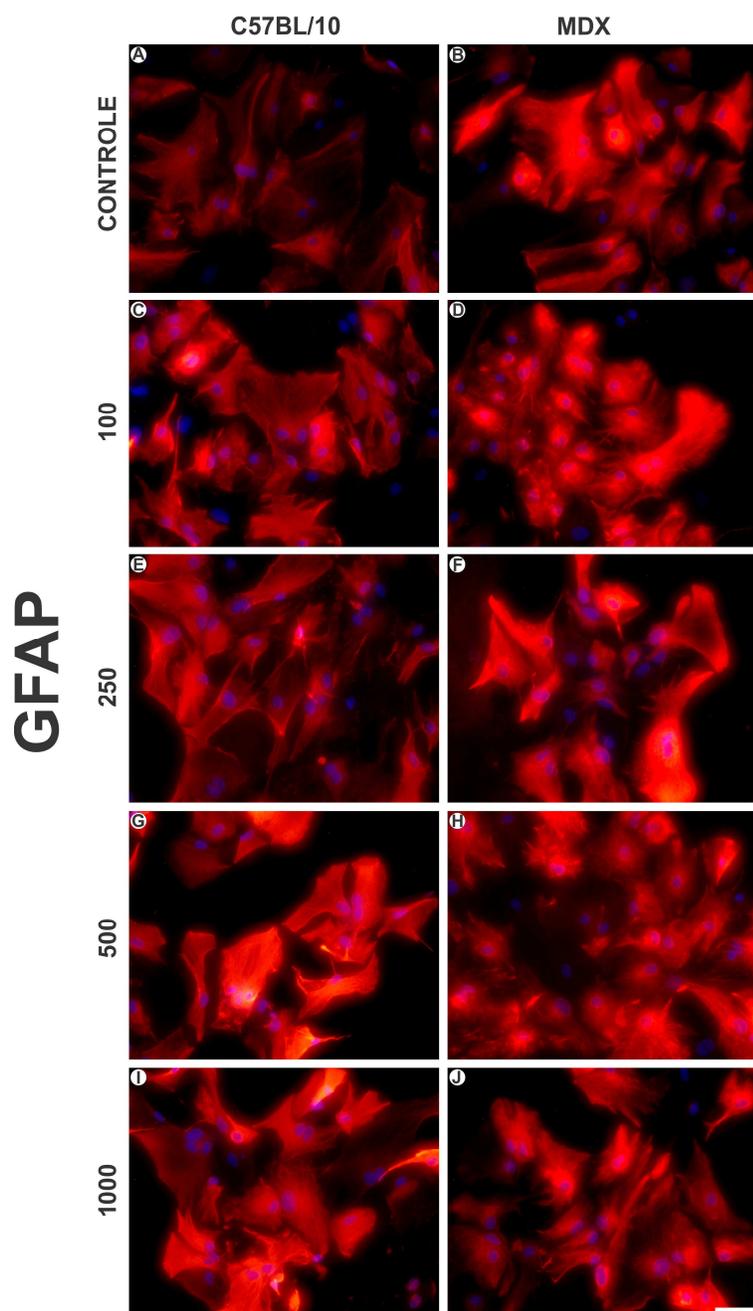


Figura 32 – Imunomarcção anti-GFAP para células cultivadas durante três dias. Figuras A e B, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras C e D, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 100 µg/ml de G-CSF, Figuras E e F, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 250 µg/ml de G-CSF. Figuras G e H, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 500 µg/ml de G-CSF. Figuras I e J, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 1000 µg/ml de G-CSF. Figura K, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50µm.

Ao analisarmos a expressão de GFAP entre os grupos dentro da mesma linhagem após cinco dias de tratamento pudemos observar um aumento acentuado da imunorreatividade, de forma gradual, nas duas linhagens, sendo que na linhagem MDX esse aumento foi substancialmente maior (MDX controle, $15746,52 \pm 524,44$; MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $17358,58 \pm 592,03$, $p > 0,05$; MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $19267,36 \pm 862,;$ MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $22136,8 \pm 656,76$, $p < 0,001$; MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $20907,2 \pm 862,44$, $p < 0,001$ e C57BL/10 controle, $12947,62 \pm 667,27$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $14037,87 \pm 846,79$, $p > 0,05$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $16049,17 \pm 895,15$, $p < 0,01$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $17032,87 \pm 507,58$, $p < 0,001$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $17296,49 \pm 378,4$, $p < 0,001$, Figura 33K).



5° DIA

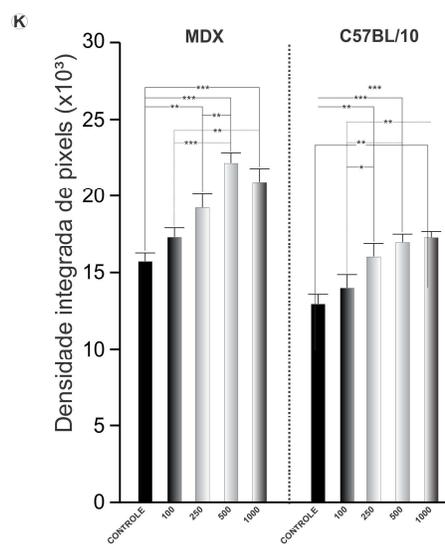
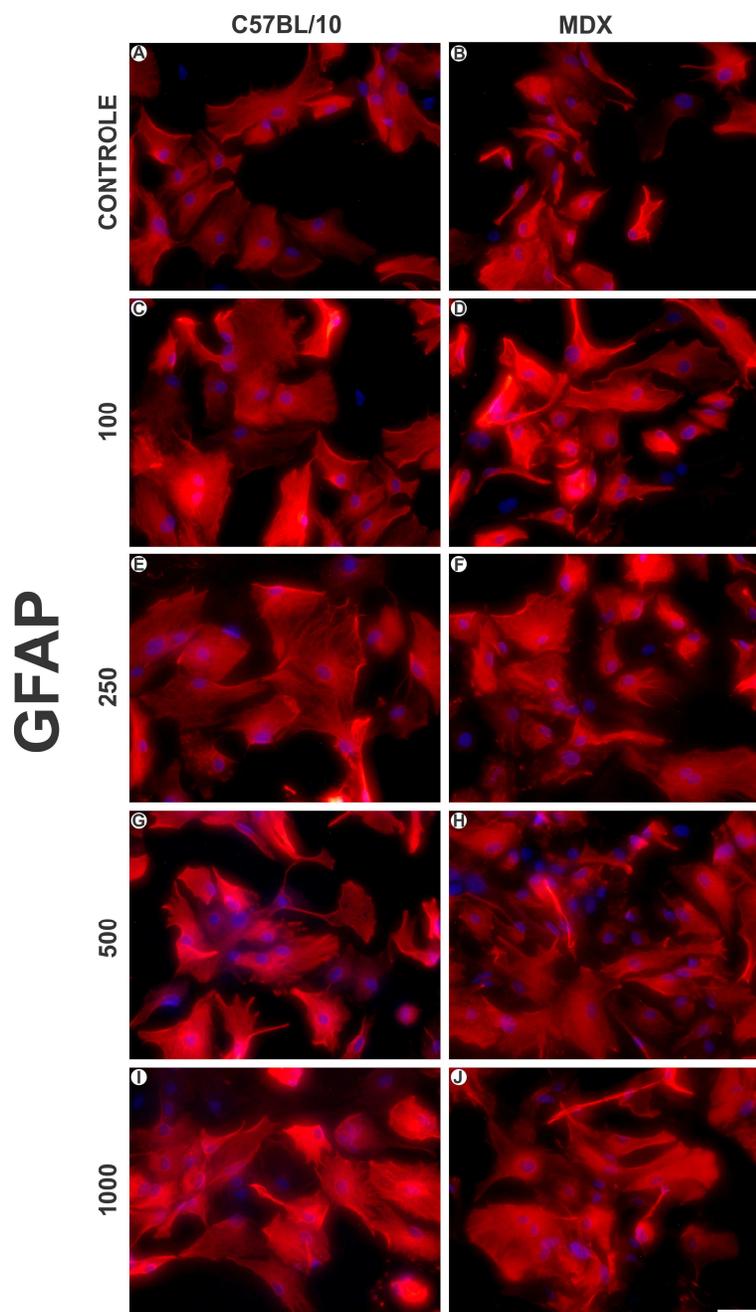


Figura 33 – Imunomarcção anti-GFAP para células cultivadas durante cinco dias. Figuras A e B, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras C e D, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 100 µg/ml de G-CSF, Figuras E e F, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 250 µg/ml de G-CSF. Figuras G e H, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 500 µg/ml de G-CSF. Figuras I e J, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 1000 µg/ml de G-CSF. Figura K, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50µm.

Após sete dias de cultivo celular, a expressão de GFAP apresentou um aumento em relação aos dias anteriores, porém pudemos observar somente aumento mais acentuado da imunorreatividade entre os grupos controles (MDX controle, $17048,33 \pm 757,18$; C57BL/10 controle, $15655,42 \pm 607,39$, $p > 0,05$, média + erro padrão: MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $19964,22 \pm 1064,27$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $17382,72 \pm 462,65$, $p < 0,05$: MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $21602,4 \pm 963,41$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $19654,31 \pm 950,37$, $p > 0,05$: MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $23082,55 \pm 525,8$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $20765,96 \pm 991,78$, $p > 0,05$: MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $22194,21 \pm 840,82$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $19742,26 \pm 1205,86$, $p > 0,05$, Figura 34K). A análise entre os grupos na linhagem MDX apresentou um aumento mais intenso entre os grupos tratados (MDX controle, $17048,33 \pm 757,18$; MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $19964,22 \pm 1064,27$, $p < 0,05$; MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $21602,4 \pm 963,41$, $p < 0,01$; MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $23082,55 \pm 525,8$, $p < 0,001$; MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $22194,21 \pm 840,82$, $p < 0,001$, Figura 34K).

Na linhagem C57BL/10 observamos, adicionalmente, aumento da expressão de GFAP após sete dias de tratamento (C57BL/10 controle, $15655,42 \pm 607,39$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $17382,72 \pm 462,65$, $p < 0,05$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $16049,17 \pm 895,15$, $p > 0,01$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $17032,87 \pm 507,58$, $p > 0,001$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $17296,49 \pm 378,4$, $p > 0,01$ Figura 34K).



7° DIA

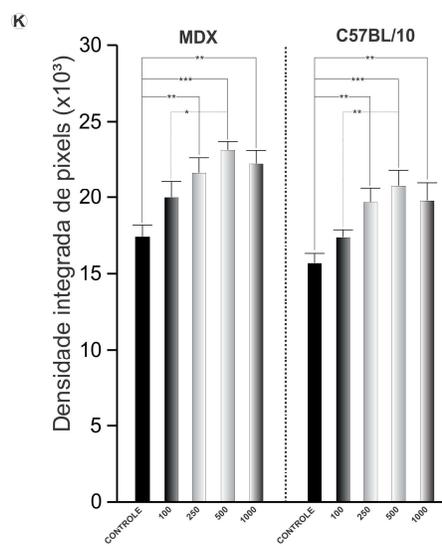
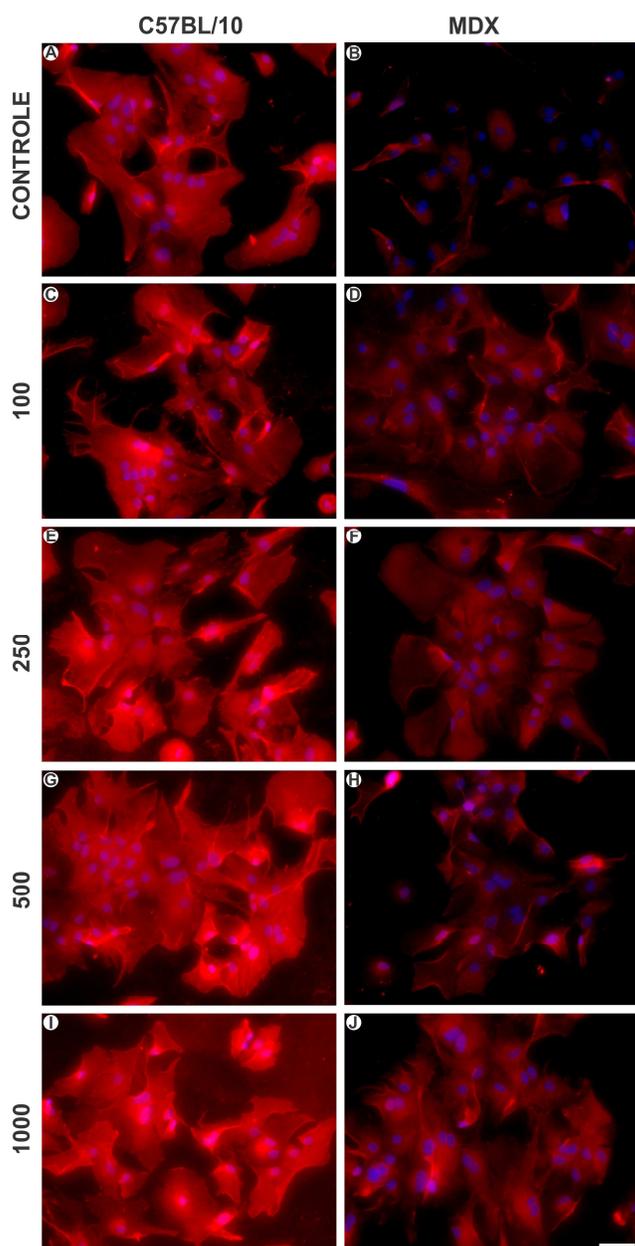


Figura 34 – Imunomarcção anti-GFAP para células cultivadas durante sete dias. Figuras A e B, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras C e D, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 100 µg/ml de G-CSF, Figuras E e F, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 250 µg/ml de G-CSF. Figuras G e H, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 500 µg/ml de G-CSF. Figuras I e J, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 1000 µg/ml de G-CSF. Figura K, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50µm.

A análise da imunorreatividade para o receptor de G-CSF revelou que a linhagem C57BL/10 apresentou uma expressão significativamente maior dessa molécula em todos os grupos, em relação à linhagem MDX (MDX controle, $2734,04 \pm 251,97$; C57BL/10 controle, $11837,17 \pm 1153,47$, $p < 0,001$, média + erro padrão: MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $6006,82 \pm 195,31$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $15518,81 \pm 1376,1$, $p < 0,001$: MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $8472,3 \pm 515,79$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $16204,35 \pm 832,43$, $p < 0,001$: MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $10102,6 \pm 318,22$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $18494,22 \pm 917,24$, $p < 0,001$: MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $11350,41 \pm 268,26$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $18972,91 \pm 467,78$, $p > 0,001$, Figura 35K). Entre os grupos da mesma linhagem, observamos um aumento mais intenso para camundongos MDX (MDX controle, $2734,04 \pm 251,97$; MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $6006,82 \pm 195,31$, $p < 0,001$; MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $8472,3 \pm 515,79$, $p < 0,001$; MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $10102,6 \pm 318,22$, $p < 0,001$; MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $11350,41 \pm 268,26$, $p < 0,001$, Figura 35K). Enquanto que nos camundongos C57BL/10 obteve-se um menor aumento, comparativamente aos camundongos MDX (C57BL/10 controle, $11837,17 \pm 1153,47$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $15518,81 \pm 1376,1$, $p < 0,05$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $16204,35 \pm 832,43$, $p < 0,01$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $18494,22 \pm 917,24$, $p < 0,001$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $18972,91 \pm 467,78$, $p > 0,001$, Figura 35K).

RECEPTOR DE G-CSF



3° DIA

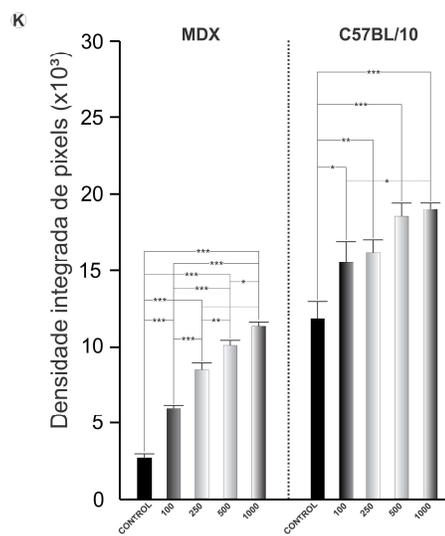
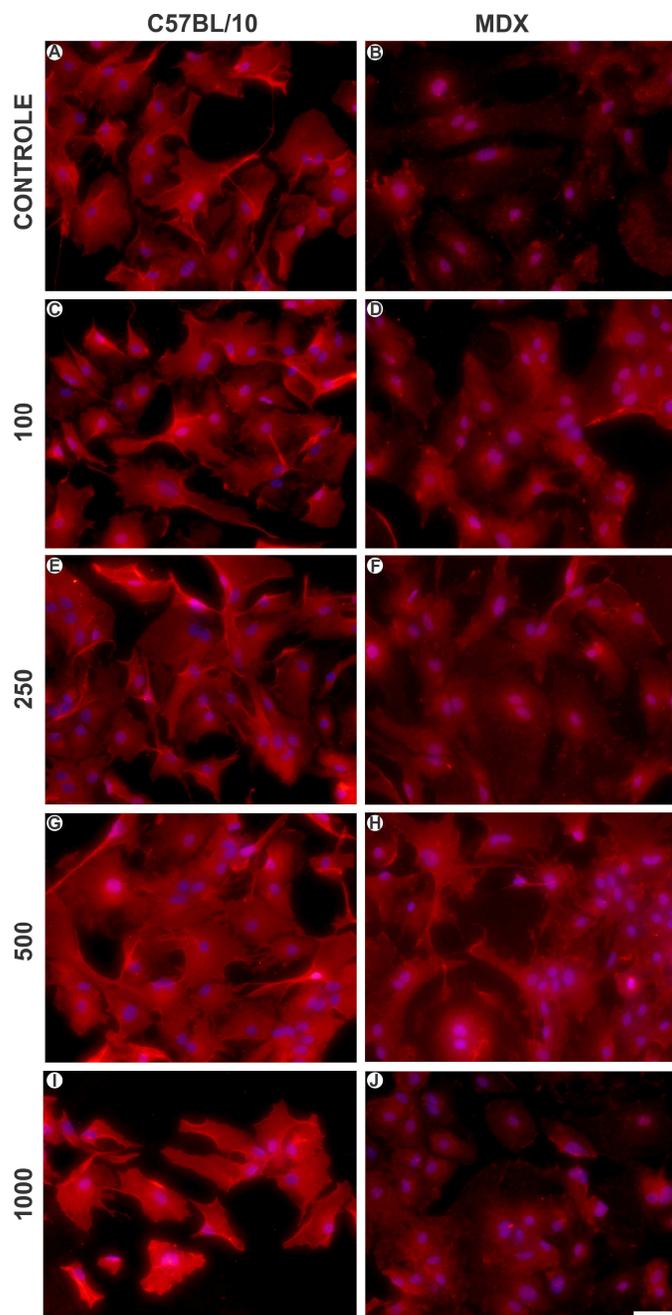


Figura 35 – Imunomarcção anti-receptor de G-CSF para células cultivadas durante três dias. Figuras A e B, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras C e D, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 100 µg/ml de G-CSF, Figuras E e F, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 250 µg/ml de G-CSF. Figuras G e H, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 500 µg/ml de G-CSF. Figuras I e J, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 1000 µg/ml de G-CSF. Figura K, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50µm.

Cinco dias após o início do tratamento o aumento continuou sendo mais intenso nos camundongos MDX, os quais apresentam menor reatividade no grupo controle (MDX controle, $9665,13 \pm 355,43$; C57BL/10 controle, $14531,3 \pm 658,13$, $p < 0,001$, média + erro padrão: MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $12865,26 \pm 805,07$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $17072,81 \pm 939,78$, $p < 0,001$: MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $14336,65 \pm 473,38$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $18606,7 \pm 490,96$, $p < 0,001$: MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $15707,23 \pm 760,43$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $19449,92 \pm 838,97$, $p < 0,001$: MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $17791,26 \pm 1187,8$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $20038,87 \pm 306,28$, $p < 0,05$, Figura 36K). Entre os grupos da mesma linhagem continuamos a observar um maior delta de aumento na expressão de G-CSF para camundongos MDX (MDX controle, $9665,13 \pm 355,43$; MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $12865,26 \pm 805,07$, $p < 0,01$; MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $14336,65 \pm 473,38$, $p < 0,001$; MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $15707,23 \pm 760,43$, $p < 0,001$; MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $17791,26 \pm 1187,8$, $p < 0,001$, Figura 36K). Porém, os camundongos C57BL/10 continuaram a apresentar maior expressão de receptor de G-CSF em relação aos camundongos MDX (C57BL/10 controle, $14531,3 \pm 658,13$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $17072,81 \pm 939,78$, $p < 0,05$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $18606,7 \pm 490,96$, $p < 0,001$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $19449,92 \pm 838,97$, $p < 0,001$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $20038,87 \pm 306,28$, $p < 0,001$, Figura 36K).

RECEPTOR DE G-CSF



5° DIA

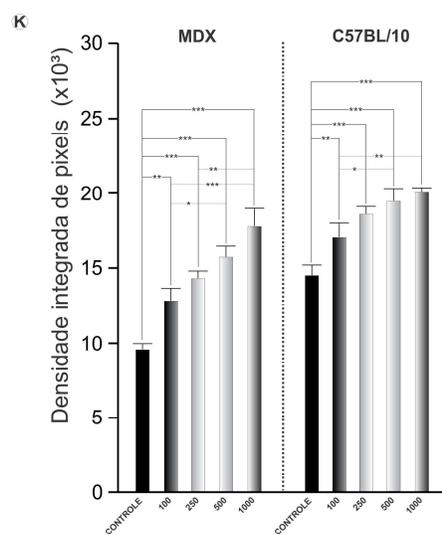
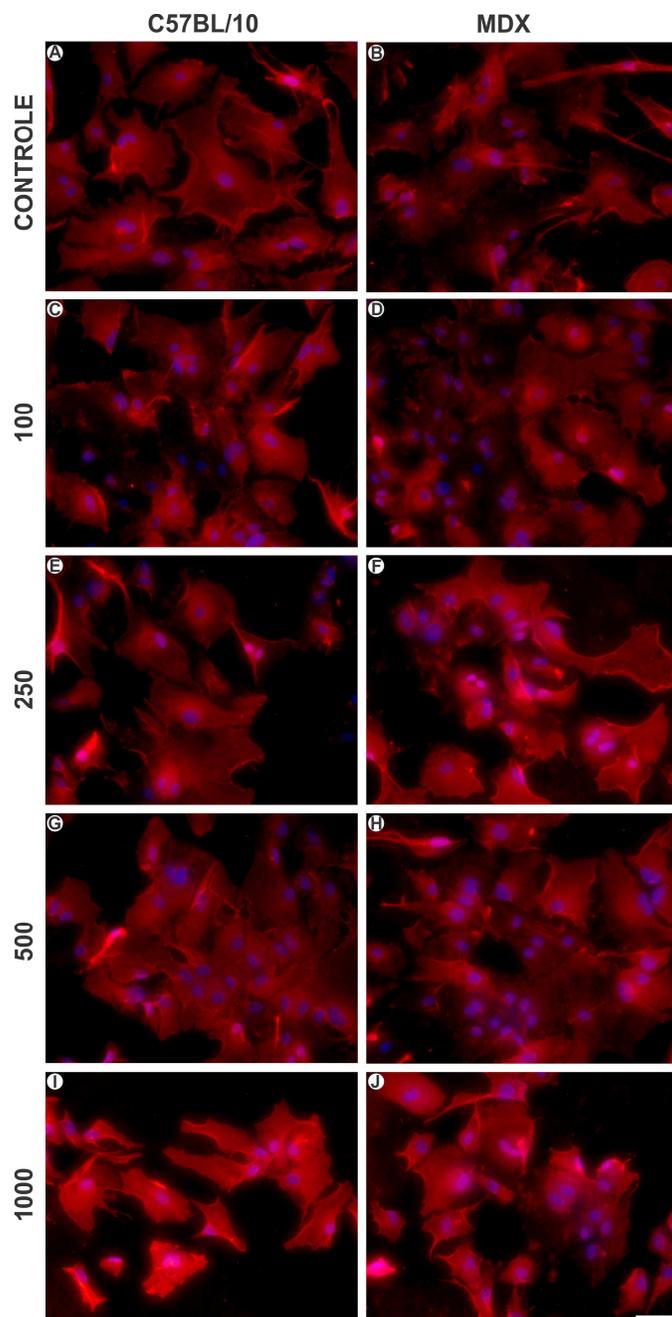


Figura 36 – Imunomarcção anti-receptor de G-CSF para células cultivadas durante cinco dias. Figuras A e B, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras C e D, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 100 µg/ml de G-CSF, Figuras E e F, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 250 µg/ml de G-CSF. Figuras G e H, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 500 µg/ml de G-CSF. Figuras I e J, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 1000 µg/ml de G-CSF. Figura K, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50µm.

Sete dias após o início do tratamento pudemos observar aumento mais intenso da expressão de receptor de G-CSF na linhagem MDX, porém a reatividade ainda esteve abaixo em comparação à linhagem C57BL/10 (MDX controle, $14830,81 \pm 273,31$; C57BL/10 controle, $19162,87 \pm 564,02$, $p < 0,001$, média + erro padrão: MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $17344,03 \pm 823,44$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $21775,0 \pm 303,05$, $p < 0,001$: MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $19140,07 \pm 1063,79$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $21303,79 \pm 272,67$, $p < 0,05$: MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $21228,61 \pm 897,65$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $23259,08 \pm 971,61$, $p > 0,05$: MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $21483,65 \pm 683,59$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $24342,37 \pm 765,99$, $p < 0,01$, Figura 37K). Sete dias após o início do tratamento pudemos observar que a linhagem MDX apresentou maior delta de aumento da expressão de receptor de G-CSF em relação aos camundongos C57BL/10 (MDX controle, $14830,81 \pm 273,31$; MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $17344,03 \pm 823,44$, $p < 0,05$; MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $19140,07 \pm 1063,79$, $p < 0,01$; MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $21228,61 \pm 897,65$, $p < 0,001$; MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $21483,65 \pm 683,59$, $p < 0,001$, Figura 37K). Mesmo com esse aumento, os camundongos C57BL/10 apresentaram maior expressão de receptor de G-CSF ao final de sete dias (C57BL/10 controle, $19162,87 \pm 564,02$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $21775,0 \pm 303,05$, $p < 0,01$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $21303,79 \pm 272,67$, $p < 0,05$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $23259,08 \pm 971,61$, $p > 0,001$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $24342,37 \pm 765,99$, $p < 0,001$, Figura 37K).

RECEPTOR DE G-CSF



7° DIA

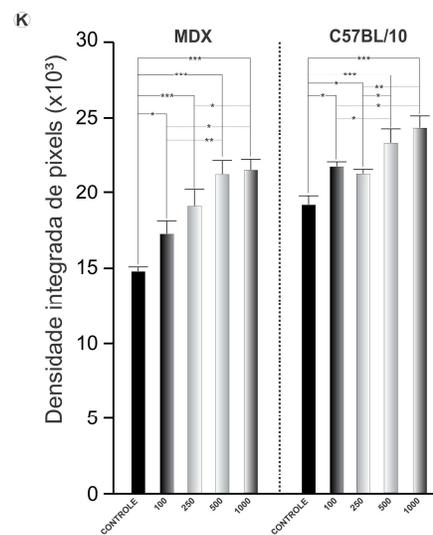
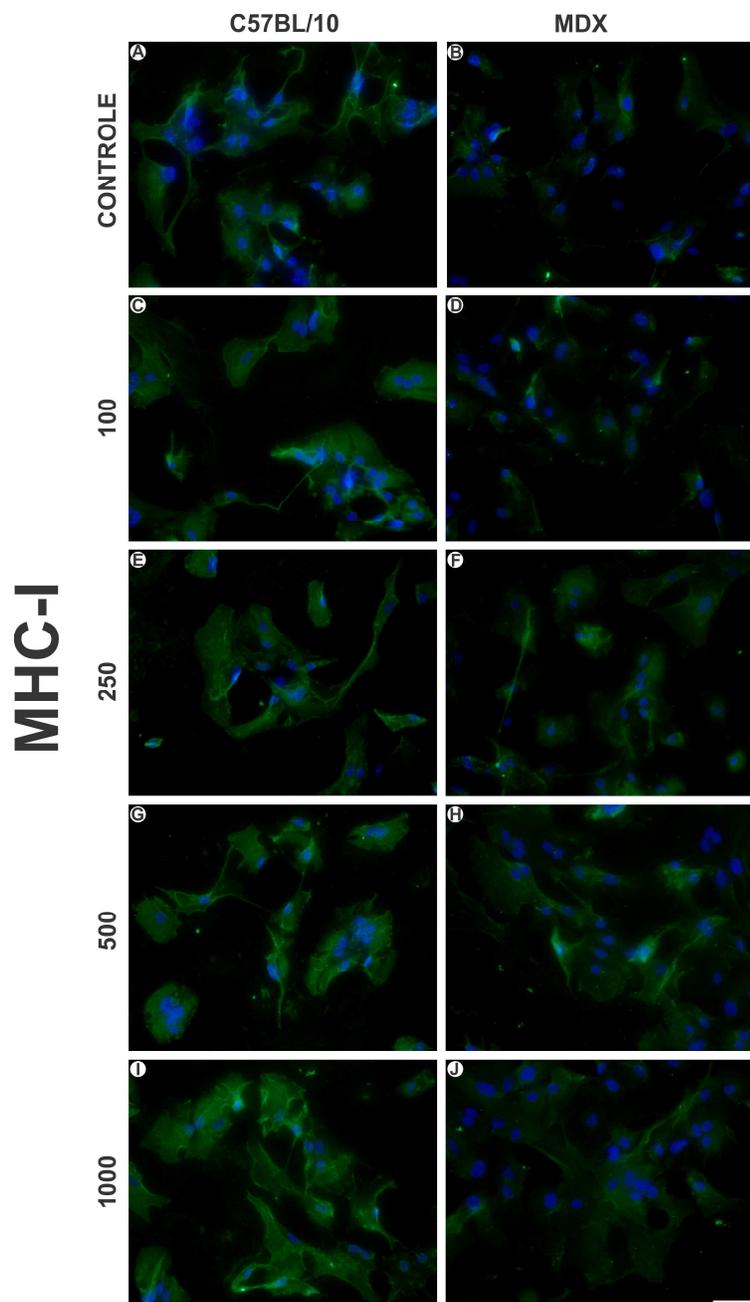


Figura 37 – Imunomarcção anti-receptor de G-CSF para células cultivadas durante sete dias. Figuras A e B, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras C e D, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 100 µg/ml de G-CSF, Figuras E e F, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 250 µg/ml de G-CSF. Figuras G e H, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 500 µg/ml de G-CSF. Figuras I e J, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 1000 µg/ml de G-CSF. Figura K, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50µm.

A análise da expressão de MHC-I demonstrou uma menor reatividade nos camundongos MDX (MDX controle, $4180,63 \pm 389,56$; C57BL/10 controle, $8952,9 \pm 387,91$, $p < 0,001$, média + erro padrão: MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $7819,18 \pm 841,83$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $11858,32 \pm 1131,08$, $p < 0,001$: MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $9208,64 \pm 458,86$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $12789,89 \pm 1054,15$, $p < 0,001$: MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $10640,94 \pm 259,54$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $13032,82 \pm 993,3$, $p < 0,05$: MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $11460,29 \pm 515,48$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $14173,18 \pm 714,83$, $p < 0,01$, Figura 38K). Quando analisamos cada dose de tratamento com o grupo controle pudemos observar que o G-CSF promoveu um aumento na reatividade da expressão de MHC-I nos camundongos MDX (MDX controle, $4180,63 \pm 389,56$; MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $7819,18 \pm 841,83$, $p < 0,0016$; MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $9208,64 \pm 458,86$, $p < 0,001$; MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $10640,94 \pm 259,54$, $p < 0,001$; MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $11460,29 \pm 515,48$, $p < 0,001$, Figura 38K). Os camundongos C57BL/10 apresentaram maior imunorreatividade para MHC-I em relação aos camundongos MDX (C57BL/10 controle, $8952,9 \pm 387,91$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $11858,32 \pm 1131,08$, $p < 0,05$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $12789,89 \pm 1054,15$, $p < 0,01$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $13032,82 \pm 993,3$, $p < 0,01$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $24342,37 \pm 765,99$, $p < 0,001$, Figura 38K).



3° DIA

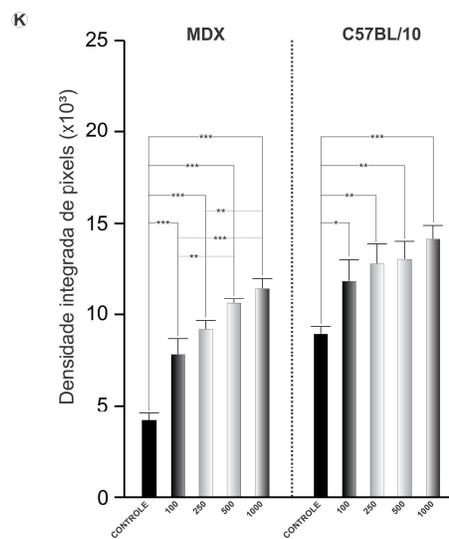
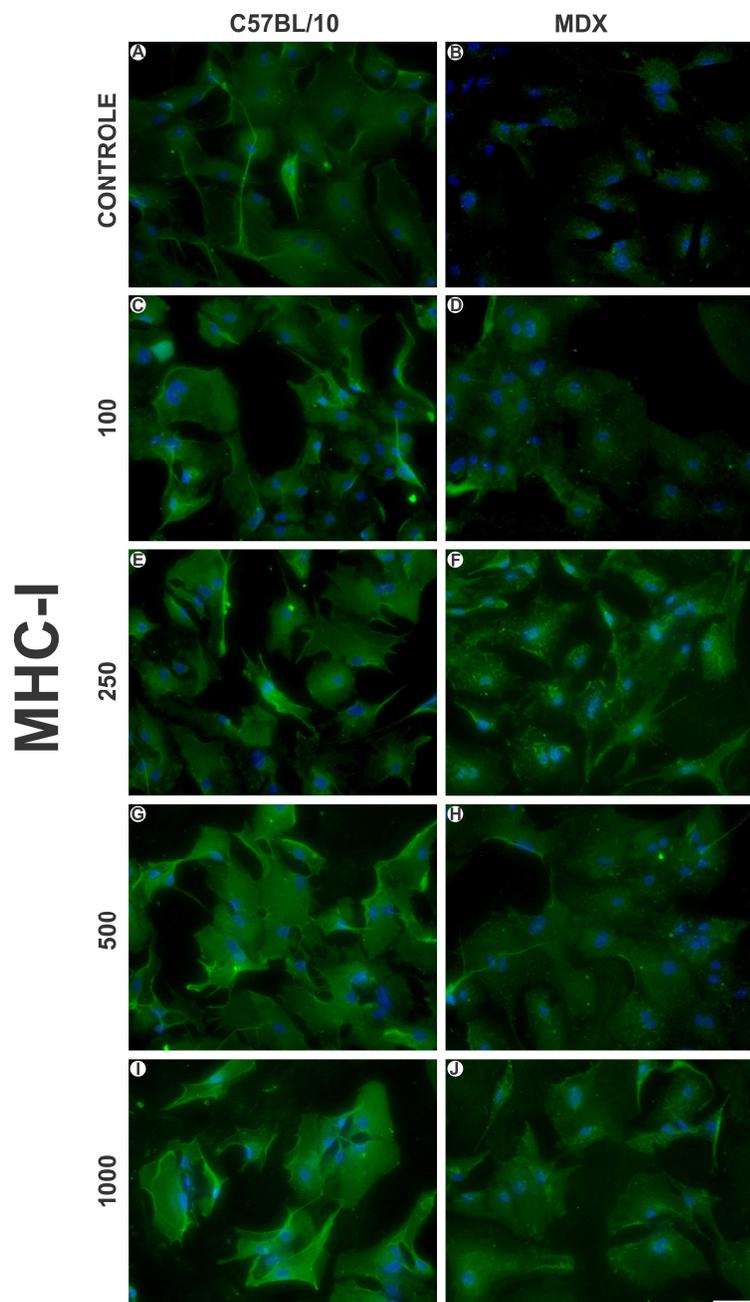


Figura 38 – Imunomarcção anti-MHC-I para células cultivadas durante três dias. Figuras A e B, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras C e D, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 100 µg/ml de G-CSF, Figuras E e F, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 250 µg/ml de G-CSF. Figuras G e H, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 500 µg/ml de G-CSF. Figuras I e J, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 1000 µg/ml de G-CSF. Figura K, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50µm.

Cinco dias após o início do tratamento pudemos observar uma maior reatividade para o MHC-I nas duas linhagens em relação ao terceiro dia (MDX controle, $6926,66 \pm 747,77$; C57BL/10 controle, $12861,87 \pm 668,77$, $p < 0,001$: MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $9054,13 \pm 745,15$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $15013,76 \pm 1305,79$, $p < 0,001$: MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $12915,22 \pm 857,43$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $18150,47 \pm 836,75$, $p < 0,001$: MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $12956,01 \pm 386,24$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $19250,3 \pm 1103,51$, $p < 0,001$: MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $13117,61 \pm 285,69$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $19812,37 \pm 645,73$, $p < 0,001$, Figura 39K). A análise entre os grupos da linhagem MDX demonstrou aumento da imunorreatividade de MHC-I após tratamento com G-CSF (MDX controle, $6926,66 \pm 747,77$; MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $9054,13 \pm 745,15$, $p < 0,05$; MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $12915,22 \pm 857,43$, $p < 0,001$; MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $12956,01 \pm 386,24$, $p < 0,001$; MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $13117,61 \pm 285,69$, $p < 0,001$, Figura 39K). Também foi evidenciado aumento da imunorreatividade para MHC-I nos camundongos C57BL/10 após cinco dias de tratamento (C57BL/10 controle, $12861,87 \pm 668,77$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $15013,76 \pm 1305,79$, $p > 0,05$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $18150,47 \pm 836,75$, $p < 0,001$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $19250,3 \pm 1103,51$, $p < 0,001$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $19812,37 \pm 645,73$, $p < 0,001$, Figura 39K).



5° DIA

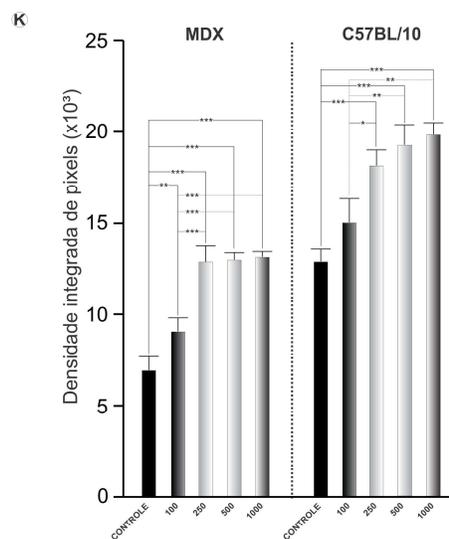
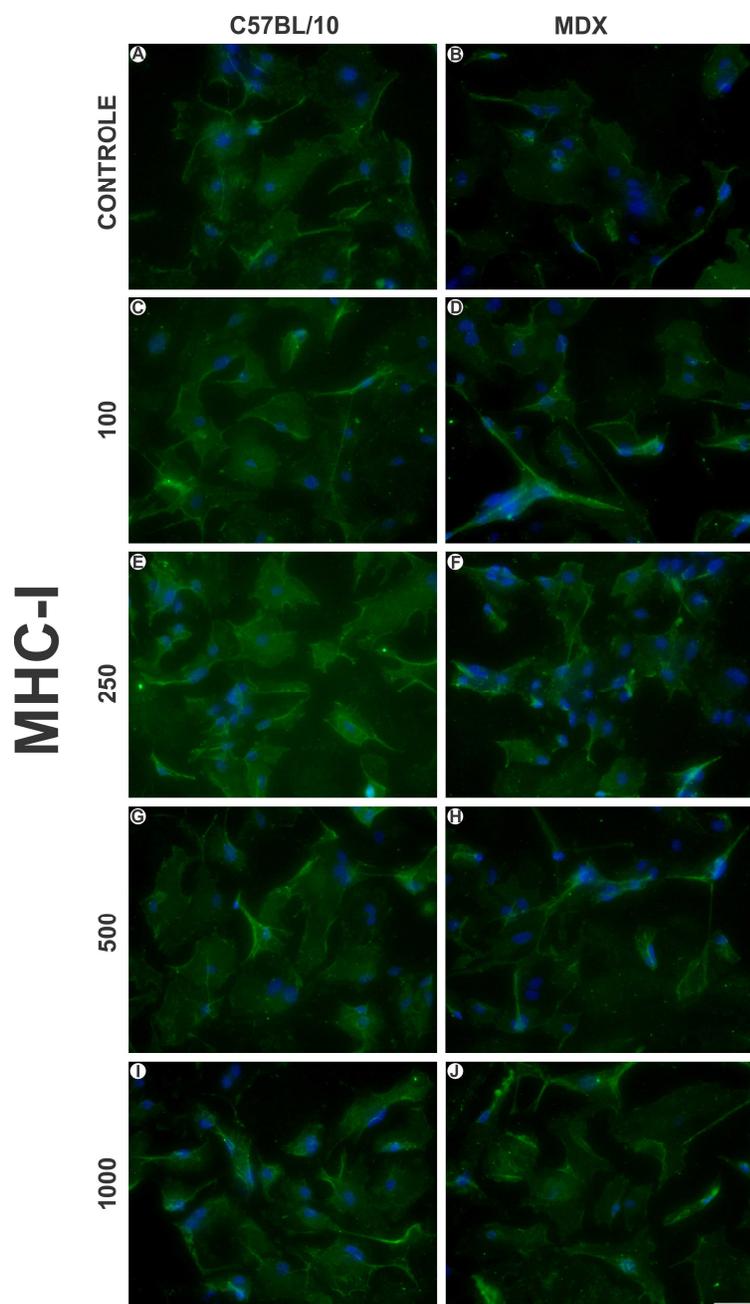


Figura 39 – Imunomarcção anti-MHC-I para células cultivadas durante cinco dias. Figuras A e B, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras C e D, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 100 µg/ml de G-CSF, Figuras E e F, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 250 µg/ml de G-CSF. Figuras G e H, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 500 µg/ml de G-CSF. Figuras I e J, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 1000 µg/ml de G-CSF. Figura K, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50µm.

A imunorreatividade continuou a aumentar sete dias após o início do tratamento, sendo mais evidenciado nos camundongos C57BL/10 (MDX controle, $9233,68 \pm 318,3$; C57BL/10 controle, $14779,12 \pm 545,17$, $p < 0,001$; MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $11070,9 \pm 1102,41$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $16364,46 \pm 486,16$, $p < 0,001$; MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $13064,47 \pm 721,92$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $19425,79 \pm 1090,72$, $p < 0,001$, : MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $13236,89 \pm 1061,4$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $19004,06 \pm 610,76$, $p < 0,001$; MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $9274,19 \pm 487,34$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $18464,49 \pm 754,93$, $p < 0,001$, Figura 40K).

A análise entre os grupos mostrou que o tratamento contínuo promoveu um aumento da expressão de MHC-I nas duas linhagens nas dosagens de 100 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ e 500 $\mu\text{g/ml}$. Na dosagem de 1000 $\mu\text{g/ml}$ pudemos observar uma redução na imunorreatividade de MHC-I nas duas linhagens (MDX controle, $9233,68 \pm 318,3$; MDX + 100 $\mu\text{g/ml}$, $11070,9 \pm 1102,41$, $p > 0,05$; MDX + 250 $\mu\text{g/ml}$, $13064,47 \pm 721,92$, $p < 0,01$; MDX + 500 $\mu\text{g/ml}$, $13236,89 \pm 1061,4$, $p < 0,01$; MDX + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $9274,19 \pm 487,34$, $p > 0,05$ e C57BL/10 controle, $14779,12 \pm 545,17$; C57BL/10 + 100 $\mu\text{g/ml}$, $16364,46 \pm 486,16$, $p > 0,05$; C57BL/10 + 250 $\mu\text{g/ml}$, $19425,79 \pm 1090,72$, $p < 0,001$; C57BL/10 + 500 $\mu\text{g/ml}$, $19004,06 \pm 610,76$, $p < 0,001$; C57BL/10 + 1000 $\mu\text{g/ml}$, $18464,49 \pm 754,93$, $p < 0,01$, Figura 40K).



7° DIA

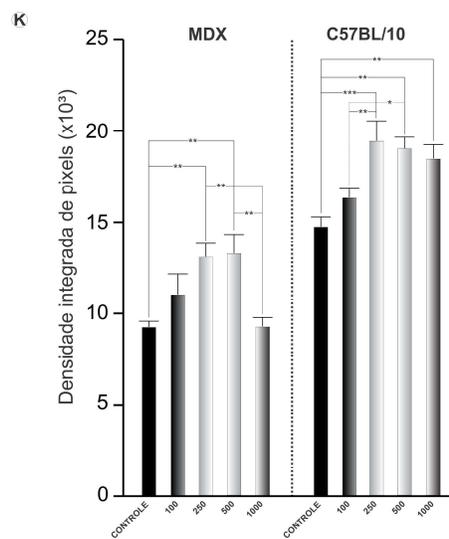


Figura 40 – Imunomarcção anti-MHC-I para células cultivadas durante sete dias. Figuras A e B, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras C e D, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 100 µg/ml de G-CSF, Figuras E e F, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 250 µg/ml de G-CSF. Figuras G e H, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 500 µg/ml de G-CSF. Figuras I e J, mostrando células de C57BL/10 e MDX, respectivamente, tratadas com 1000 µg/ml de G-CSF. Figura K, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50µm.

5. DISCUSSÃO

A maior parte dos estudos sobre a Distrofia Muscular de Duchenne está voltada, exclusivamente, para o sistema muscular. Em um desses estudos, PASTORET & SEBILLE (1995) investigaram os ciclos de degeneração/regeneração muscular, a partir da segunda semana até 104 semanas de vida nos camundongos MDX, um dos modelos animais para estudo da doença. Seus resultados mostraram que já na segunda semana de vida algumas anormalidades são encontradas nas fibras de músculos como tibial anterior (MTA), músculo extensor longo dos dedos (MELD), músculo plantar longo (MPL) e músculo sóleo (MS). Dentre tais alterações estavam pequenos focos dispersos de fibras musculares com degeneração cercados por infiltrados celulares, fibras musculares “pálidas” e pequenos grupos de fibras musculares regeneradas com núcleo celular central. Já na terceira semana de vida essas anormalidades se tornaram evidentes e disseminadas em todos os músculos estudados por esses autores. Esses mesmos autores mostraram que na sexta semana de vida os músculos dos membros posteriores apresentam por volta de 50% de suas fibras musculares com núcleos não periféricos e que na oitava semana de vida todos os músculos, em camundongos MDX, apresentavam fibras hipertrofiadas coexistindo com focos de pequenas fibras em vários estágios de maturação, proporcionando um aumento na variedade do diâmetro das fibras musculares.

No SNC, a expressão da distrofina foi demonstrada por HUARD *et al.* (1992) no cerebelo, no córtex cerebral, no hipocampo e na medula espinal de humanos e macacos. No entanto, LIDOV *et al.* (1993) demonstraram que em camundongos normais a distrofina é expressa em maior quantidade nos neurônios do córtex cerebral e nas células de Purkinje.

MYATAKE *et al.* (1991) propõem que a distrofina influencia na estabilidade da membrana celular e, também, contribui para o transporte intracelular. Em outro estudo, SBRICCOLI *et al.* (1995) estudaram a arquitetura do tracto córtico-espinal nos camundongos MDX com três meses de idade. Os resultados mostraram que não havia diferença na distribuição das fibras desse tracto entre as linhagens MDX e C57BL/10. Porém, o número absoluto de axônios na linhagem MDX constatado foi menor em relação ao grupo controle.

Tendo-se em vista as possíveis repercussões do processo de degeneração/regeneração muscular no microambiente medular, o tratamento prévio e após a axotomia do nervo isquiático com G-CSF foi abordado no presente estudo no intuito para reestabelecer a homeostasia do microambiente medular e, posteriormente, podermos analisar a capacidade regenerativa dos motoneurônios alfa medulares. Assim, camundongos MDX foram submetidos a tratamento diário com G-CSF, através de doses subcutâneas de 200 µg/kg/dia, durante sete dias antes e sete dias após a axotomia unilateral do nervo isquiático com o intuito de analisar os possíveis efeitos neuroprotetor e antiinflamatório deste fármaco no sistema nervoso central, periférico e muscular esquelético. Através da sua farmacodinâmica no organismo, alguns trabalhos têm demonstrado que o G-CSF possui uma surpreendente atividade no SNC, como por exemplo, efeito neuroprotetor (ZAVALA *et al.*, 2002; SCHÄBITZ *et al.*, 2003; GIBSON *et al.*, 2005; HENZE *et al.*, 2005; PITZER *et al.*, 2008), angiogênico (LEE *et al.*, 2005) e antiapoptótico (SCHNEIDER *et al.*, 2005; SOLAROGLU *et al.*, 2006; NISHIO *et al.*, 2007). No sistema muscular, alguns estudos têm demonstrado que o G-CSF diminui os efeitos inflamatórios e, conseqüentemente, promove uma melhora na função motora (SUGANO *et al.*, 2005; BALDO *et al.*, 2008).

A axotomia do nervo isquiático é um modelo experimental bem estabelecido para o estudo da correlação entre reatividade glial e a resposta neuronal à lesão ao nível da coluna anterior da medula espinal (LUNDBERG *et al.*, 2001). Isso se deve ao fato de que neste modelo de lesão, em particular, os únicos elementos diretamente afetados pela lesão são os axônios dos neurônios medulares. Assim, todas as alterações observadas nas adjacências dos corpos dos motoneurônios, incluindo-se a astrogliose reativa e a ativação das moléculas de MHC I, são reflexo de uma direta comunicação neurônio/glia.

A axotomia distal também induz de forma direta, adicionalmente à ativação astrogliar, a retração dos terminais pré-sinápticos em contato com o corpo celular e dendritos de motoneurônios alfa medulares (BRÄNNSTRÖM & KELLERTH, 1998; ALDSKOGIUS *et al.*, 1999). Essa retração é mais intensa nos terminais que fazem sinapse com o corpo celular dos motoneurônios (BRÄNNSTRÖM & KELLERTH, 1998) e ocorre na fase aguda da lesão, sendo influenciadas pela alteração do estado fisiológico dos neurônios que passam de um estado de transmissão para uma condição de sobrevivência e regeneração (PIEHL *et al.*, 1998). REIER *et al.* (1989), propuseram que os astrócitos atuam como barreira física ao crescimento dos axônios através da formação do tecido cicatricial, porém podem promover a sua regeneração liberando fatores neurotróficos (BABA, 1998). Portanto, os astrócitos têm influência direta dinâmica dos contatos sinápticos (WALZ, 1989; ARAQUE & PEREA, 2004), podendo, assim, interferir nos processos de reorganização sináptica após uma lesão (ALDSKOGIUS *et al.*, 1999).

Os resultados de imunohistoquímica e de microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que a reatividade glial varia entre as duas linhagens estudadas. Nos experimentos

de imunistoquímica, no grupo contralateral sem lesão/sem tratamento, observamos um aumento, de aproximadamente 35%, da imunorreatividade para GFAP nos camundongos MDX em relação aos camundongos C57BL/10. Ipsilateral à lesão, nos camundongos axotomizados sem tratamento, houve um aumento acentuado na reatividade astrocitária (GFAP), em relação ao grupo contralateral, nas duas linhagens estudadas. Nesse aspecto, os experimentos de imunistoquímica revelaram que, no grupo MDX contralateral sem tratamento, foi evidenciada uma maior atividade dos astrócitos, demonstrada por uma astrogliose na região dos motoneurônios alfa-medulares. Esse aumento foi de aproximadamente 31% em relação ao mesmo grupo da linhagem C57BL/10. Quando os camundongos foram tratados com G-CSF, a imunomarcção contralateral apresentou-se aumentada, sendo que os camundongos MDX continuaram com maior expressão em relação aos camundongos C57BL/10, em torno de 24%. Ipsilateral, esse aumento foi de 31% em relação à linhagem C57BL/10.

Ao analisarmos o grupo contralateral + G-CSF com os grupos contralateral sem tratamento e contralateral + placebo, foi possível observar que houve um aumento da expressão de GFAP nas duas linhagens, sendo que nos camundongos MDX esse aumento foi de, aproximadamente, 43% em relação ao grupo sem tratamento e de 53% em relação ao grupo placebo. Na linhagem C57BL/10 pudemos notar um aumento aproximado de 45% em relação ao grupo sem tratamento e 54% em relação ao grupo placebo. Ipsilateral à lesão houve um aumento de, aproximadamente, 44% em relação ao grupo sem tratamento e de 59% em relação ao grupo placebo, nos camundongos MDX. Na linhagem C57BL/10 pudemos notar um aumento de 43% em relação ao grupo sem tratamento e 60% em relação ao grupo placebo. Alguns trabalhos mostram que os astrócitos e micróglia possuem papel negativo na plasticidade sináptica e

regeneração nervosa após lesão nervosa (ALDSKOGIUS *et al.*, 1999; EMIRANDETTI *et al.*, 2006). Porém, novas evidências demonstram que os astrócitos desempenham papel positivo durante a regeneração nervosa (BARRETO *et al.*, 2011), como por exemplo, neuroproteção (NEDERGAARD & DIRNAGL, 2005) reestabelecimento da barreira hematoencefálica (DEL ZOPPO, 2009; KAUR & LING, 2008), absorção de íons potássio (WALZ, 2000; BARRETO *et al.*, 2011), regulação nos níveis de glutamato (OUYANG *et al.*, 2007), produção e secreção de fatores antioxidantes (ANDERSON & SWANSON, 2000; DRINGEN, 2000; DRINGEN & GUTTERER, 2000; LINDENAU *et al.*, 2000; SIMS *et al.*, 2004; SWANSON *et al.*, 2004) e secreção de fatores neurotróficos (RIDET *et al.*, 1997). Nossos resultados estão de acordo com trabalho anterior (KODA *et al.*, 2007), onde os autores demonstraram maior expressão de GFAP após lesão da medula espinal em camundongos tratados com G-CSF. Tais resultados indicam que a reatividade glial estimulada pelo tratamento com G-CSF, pode ter um papel importante na reorganização do microambiente medular, especialmente em camundongos MDX.

No entanto, ao analisarmos a razão ipsi/contralateral uma semana após a axotomia do nervo isquiático, pudemos constatar que não houve diferença significativa entre as linhagens pesquisadas. Apesar da não diferença estatística entre as razões ipsi/contralateral entre as duas linhagens, sugerimos que a linhagem MDX apresente uma maior resposta astrocitária em relação à linhagem C57BL/10 levando-se em conta a diferença de astrogliose entre os lados ipsi e contralateral de cada linhagem. Essa diferença ficou mais evidenciada nos camundongos tratados com G-CSF.

Com o intuito de confirmar os nossos resultados de imunohistoquímica, foram realizadas culturas primárias de astrócitos provenientes do córtex cerebral de neonatos. Os resultados mostraram que os camundongos MDX apresentaram uma reatividade astrogliar mais intensa em relação aos camundongos C57BL/10. Essa atividade ficou mais evidenciada quando tratamos as células com G-CSF. A partir de doses crescentes e de dias de crescimento, vimos que o G-CSF, além de possuir um efeito mitótico, tem a capacidade de estimular a expressão de proteínas como GFAP, MHC e receptor de G-CSF. Porém, pudemos constatar que o tratamento prolongado com o G-CSF pode promover citotoxicidade, como ficou evidenciado nas células tratadas com G-CSF durante sete dias consecutivos.

Também pudemos constatar que após a axotomia do nervo isquiático houve um aumento mais intenso na expressão de IBA-1, principalmente após tratamento com G-CSF em camundongos MDX. Recentes estudos demonstraram que a micróglia é capaz de estimular a produção de fatores neutróficos após lesão no SNC, exercendo função ativa no processo regenerativo e de reparação do tecido nervoso lesado (BATCHELOR et al., 2002), estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento (TNF- β), tendo, assim, papel neuroprotetor (STREIT, 2005; HANISCH & KETTENMANN, 2007). CULHEIM & THAMS (2007) sugeriram que a reatividade microglial e a expressão de MHC-I possuem papel fundamental no processo de retração e eliminação sináptica após lesão nervosa periférica. Isto foi comprovado em nosso laboratório, que demonstrou tal correlação após axotomia do nervo isquiático, analisando a dinâmica sináptica nos motoneurônios alfa medulares (EMIRANDETTI et al., 2010)

O fato dos camundongos MDX apresentarem níveis basais de GFP superiores aos camundongos C57/BL10 sugere que a evolução da doença repercute diretamente no microambiente medular, resultando em modificações importantes na citoarquitetura dos circuitos medulares. Acreditamos que tais alterações, contribuam para o aparecimento da astrogliose reativa observada nos camundongos sem lesão/sem tratamento e tratados com G-CSF (Figura 8), bem como contralateralmente nos camundongos axotomizados sem tratamento e tratados com G-CSF (Figura 9).

A análise ultraestrutural das adjacências da membrana de motoneurônios alfa demonstrou a presença de processos de eliminação sináptica nos camundongos MDX sem lesão/sem tratamento e MDX contralateral e ipsilateral sem tratamento. Nos grupos ipsilateral sem tratamento, as duas linhagens apresentaram acentuada retração sináptica, sendo que nos camundongos MDX a eliminação sináptica foi menor ao se avaliar previamente a porcentagem de cobertura sináptica e após a axotomia do nervo isquiático (MDX – 18% e C57/BL10 – 31%, aproximadamente). Este fato demonstra que, além da eliminação sináptica resultante da evolução da doença, os camundongos MDX provavelmente apresentam um menor potencial de resposta a uma lesão nervosa periférica. Porém, ao analisarmos os grupos tratados com G-CSF, pudemos observar uma preservação da porcentagem de cobertura sináptica total. Nos camundongos MDX essa preservação ficou mais evidente no grupo ipsilateral + G-CSF, em torno de 30% maior em relação a linhagem MDX ipsilateral sem tratamento e 20% nos camundongos C57BL/10 ipsilateral + G-CSF em relação ao grupo C57BL/10 ipsilateral sem tratamento. A análise contralateral dos camundongos MDX tratados com G-CSF com os camundongos MDX sem tratamento não apresentou diferença significativa, porém pudemos observar que os terminais pré-

sinápticos, nos camundongos tratados com G-CSF, não apresentaram muitas retrações parciais em relação aos camundongos MDX sem tratamento. Portanto, pudemos supor que o G-CSF promoveu um efeito neuroprotetor no microambiente medular durante o curso da distrofia muscular de *Duchenne*. Essa neuroproteção foi refletida na preservação dos circuitos dos motoneurônios medulares e na redução no número de terminais parcialmente retraídos.

A análise quantitativa da porcentagem de cobertura sináptica para cada tipo de terminal pré-sináptico revelou que há uma diminuição significativa de terminais inibitórios (Tipo F) e excitatórios (Tipo S) em nos grupos sem tratamento da linhagem MDX (sem lesão, contralateral e ipsilateral) em relação aos mesmos grupos da linhagem C57/BL10. Ainda, tendo-se em vista as diferenças entre os grupos estudados, notamos uma diferença entre a perda de cobertura para os terminais F e S antes e após a axotomia do nervo isquiático, sendo os do tipo S mais retraídos. Nos camundongos tratados com G-CSF, notamos uma maior porcentagem de cobertura de terminais do tipo F, aproximadamente 68% na linhagem MDX e 63% na linhagem C57BL/10. Por outro lado pudemos observar uma redução significativa da porcentagem de cobertura de terminais do tipo S após a axotomia do nervo isquiático nos camundongos C57BL/10 tratados com G-CSF (em torno de 48%) e, nos camundongos MDX, aproximadamente 10%. Nesse aspecto, nossos resultados estão de acordo com SCHÄBITZ *et al* (2003) onde os autores demonstraram que o G-CSF reduz os efeitos citotóxicos induzidos por glutamato. Esses fatos nos indicam que o tratamento com G-CSF pode ser capaz de promover uma seletividade no processo de eliminação sináptica, dando preferência na manutenção do contato sináptico dos terminais tipo F (inibitórios). Nesse sentido, pudemos sugerir que o tratamento com G-CSF promoveu, aos neurônios afetados pela lesão periférica, um microambiente propício para a regeneração axonal.

Completando a análise ultraestrutural, quantificamos a quantidade do número de terminais pré-sinápticos/100µm em aposição com a membrana neuronal. Pudemos constatar que nos camundongos tratados houve uma menor perda de contato sináptico em relação aos camundongos sem tratamento, principalmente na linhagem MDX. Logo, pudemos sugerir que o tratamento prévio com G-CSF proporcionou uma neuroproteção ao microambiente medular durante o curso da distrofia muscular de Duchenne. Tal efeito protetivo se refletiu na preservação dos circuitos medulares, bem como na redução do número de sinapses parcialmente retraídas.

A maior imunorreatividade de GFAP nos camundongos sem lesão/sem tratamento e ipsilateral sem tratamento demonstra que, além da perda sináptica resultante da evolução da doença, os camundongos MDX provavelmente apresentam um menor potencial de resposta a uma lesão nervosa periférica. Tal fato pode estar relacionado ao fato desses camundongos apresentarem uma menor expressão de MHC I. Pudemos constatar que os camundongos MDX apresentaram menor expressão de MHC-I nas culturas primárias de astrócitos. O tratamento com G-CSF promoveu um aumento mais acentuado da expressão de MHC-I nos astrócitos de camundongos MDX. Porém, camundongos C57BL/10 também apresentaram aumento acentuado da expressão de MHC-I, sendo que esse aumento foi significativamente maior em relação aos camundongos MDX. Portanto, pudemos sugerir que o G-CSF possui, possivelmente, papel de agente regulador de MHC-I nos astrócitos. Estudos mais detalhados deverão ser realizados para tentar saber de que forma o G-CSF interfere na expressão de proteínas como MHC-I e GFAP.

Sugerimos que a maior intensidade da reação astrogial nos camundongos MDX, antes e sete dias após a axotomia do nervo isquiático, esteja envolvida diretamente aos ciclos de degeneração/regeneração muscular que esses camundongos sofrem a partir da segunda semana de vida (PASTORET & SEBILLE, 1995), os quais podem promover uma situação semelhante, e menos intensa, a de uma axotomia periférica, quando há desconexão parcial do nervo periférico na placa neuromuscular durante o processo de degeneração muscular.

A comunicação entre neurônio e glia, por intermédio da sinalização de MHC I, provavelmente envolve receptores que podem ser capazes de traduzir o sinal do MHC I para os neurônios e, também, para os astrócitos e microglia. Procurando entender o papel funcional das moléculas de MHC I no SNC, especificamente na plasticidade e na regeneração sináptica de neurônios em camundongos adultos, OLIVEIRA *et al.* (2004), realizaram a transecção do nervo isquiático em camundongos deficientes para a expressão da proteína microglobulina β -2, uma subunidade do complexo de MHC I. Neste trabalho, os autores demonstraram que o MHC I possui papel importante para a manutenção seletiva dos terminais inibitórios em oposição aos neurônios axotomizados. A ausência ou uma menor expressão de MHC I resulta em não seletividade de retração dos botões pré-sinápticos, diminuindo, assim, o potencial regenerativo dos neurônios lesionados (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Tal fato está de acordo com o evidenciado na linhagem MDX, tendo-se em vista a perda sináptica relativa após a axotomia do nervo isquiático, como demonstrada anteriormente. Semelhantemente, SABHA *et al.* (2008), demonstraram que a menor expressão de MHC I em camundongos C57/BL6J resulta numa menor capacidade regenerativa em relação aos camundongos A/J, que apresentaram uma maior expressão de MHC I. Neste aspecto, é possível sugerir que os camundongos MDX apresentem

um menor potencial regenerativo axonal após lesões periféricas, reflexo da evolução da doença associada a uma menor capacidade de expressar MHC I.

Tal hipótese foi testada através do esmagamento do nervo isquiático, seguido pela análise da recuperação motora pelo “*CatWalk TM*” (*Noldus Information Technology*). A curva de recuperação motora manteve-se similar entre as duas linhagens. Os resultados demonstraram que os camundongos MDX sem tratamento, tratados com placebo e tratados com G-CSF apresentam déficit motor mais acentuado em relação aos camundongos C57BL/10 antes mesmo da lesão (aproximadamente 92% menor no grupo sem tratamento, 80% menor no grupo placebo e 57% menor no grupo tratado. O tratamento com G-CSF promoveu uma melhora significativa na função motora nos camundongos MDX, em torno de 20%, antes mesmo da lesão em relação ao grupo sem tratamento e 15% em relação ao grupo placebo. Essa melhora foi constante durante as três semanas de análise funcional e, no final do experimento, foi de 20% em relação ao grupo sem tratamento e de 15% em relação ao grupo placebo. Pudemos sugerir que a redução da função motora na linhagem MDX pode estar relacionada diretamente aos ciclos de degeneração muscular que afetam, de forma direta, as junções neuromusculares ao nível dos sarcolemas. E assim, conseqüentemente à diminuição do número de junções neuromusculares, há uma redução de fibras musculares para a realização de movimentos, alterando a função motora nesses camundongos. Tais observações estão de acordo com a análise morfológica do músculo sóleo, que demonstrou uma redução significativa no número de fibras regeneradas e uma aumento no número de fibras não atingidas pela degeneração muscular em camundongos MDX tratados com G-CSF, em torno de 18% e 19%, respectivamente. Uma interpretação para esse fato, é que o tratamento promoveu proteção às fibras musculares atingidas pela degeneração muscular ou, até

mesmo, pela axotomia do nervo isquiático. Portanto, pudemos sugerir que o tratamento com G-CSF atua diretamente na redução da inflamação muscular e promove uma proteção das fibras musculares após o primeiro ciclo de degeneração muscular em camundongos MDX.

A análise morfológica após o esmagamento dos nervos isquiáticos foi realizada através de microscopia eletrônica de transmissão e imunistoquímica. A análise ultraestrutural foi baseada no estudo do diâmetro da fibra mielínica, do diâmetro dos axônios, da espessura da bainha de mielina e da razão “g”. Constatamos uma redução no número de axônios regenerados camundongos MDX em relação aos camundongos C57BL/10 após a axotomia do nervo isquiático, sendo 21% menor nos grupos sem tratamento e tratado com placebo. Porém, a análise no grupo tratado com G-CSF mostrou uma redução significativa na diferença de porcentagem de fibras regeneradas entre as linhagens, passando para 1% após a transecção do nervo isquiático.

A espessura da bainha de mielina é uma indicação direta da recuperação funcional do nervo, já que esta relacionada com o nível de atividade fisiológica das células de *Schwann*. Esse parâmetro tem sido utilizado em vários estudos para avaliar a evolução do processo regenerativo axonal (LEVI & BUNGE,1994; OLIVEIRA, 2000; PIERUCCI *et al.*,2008). O tratamento com G-CSF promoveu uma redução na espessura da bainha de mielina e no diâmetro dos axônios nas duas linhagens estudadas. Por outro lado, observamos um menor número de fibras em processo de fagocitose e um maior número de axônios em processo de remielinização, em relação aos grupos não tratados com G-CSF. Através desses resultados pudemos sugerir que o tratamento com G-CSF proporcionou um ambiente favorável para regeneração nervosa periférica e, ao mesmo tempo, atuando positivamente na atividade das células de *Schwann*.

A razão “g” (RZG) é estabelecida pelo quociente entre o diâmetro dos axônios e o diâmetro da fibra de mielina. É utilizada como parâmetro morfométrico que expressa a relação que a célula de *Schwann* e o axônio durante a regeneração funcional do nervo (RUSHTON, 1951; SMITH & KOLES, 1970; WAXMAN, 1980). As duas linhagens estudadas apresentaram redução da razão “g” após tratamento com G-CSF, sendo que na linhagem MDX essa redução foi 66% maior em relação à linhagem C57BL/10. Pudemos supor que essa diminuição possa estar relacionada à diminuição dos espaços internodais das fibras axonais mielínicas, devido à proliferação e atividade aumentada das células de *Schwann* (IKEDA & OKA, 2012). Através desses dados pudemos supor que as células de *Schwann* apresentam características metabólicas não semelhantes nas duas linhagens. Portanto, estes dados nos condizem que a menor capacidade regenerativa axonal nos camundongos MDX pode estar diretamente relacionada com o microambiente neural.

Já na imunohistoquímica, foi observado um aumento da imunorreatividade para neurofilamento e p75NTR contralateral e ipsilateralmente à lesão, em camundongos MDX sem tratamento e tratados com G-CSF. Similarmente, a imunomarcagem mostrou melhor reorganização de fibras regeneradas em camundongos tratados com G-CSF. Apesar dos camundongos MDX apresentarem uma menor função motora em relação aos camundongos controle, os resultados indicam que o tratamento com G-CSF é capaz de reduzir os efeitos inflamatórios e atuar positivamente no processo de regeneração nervosa periférica após esmagamento do nervo isquiático.

No que diz respeito à atividade sináptica, estudada indiretamente pela expressão de sinaptofisina, observou-se uma reduzida imunorreatividade na linhagem MDX, ipsilateral, contralateral e nos camundongos sem lesão. Os camundongos MDX sem lesão e sem tratamento apresentaram uma perda significativa da expressão de sinaptofisina, aproximadamente 25%, em relação à linhagem C57BL/10. No grupo sem lesão tratado com G-CSF os camundongos MDX apresentaram um aumento da expressão de sinaptofisina, aproximadamente 80%, em relação aos camundongos MDX sem tratamento. A análise contralateral após axotomia do nervo isquiático demonstrou uma perda aproximada de 32% da expressão de sinaptofisina nos camundongos MDX sem tratamento em relação aos camundongos C57BL/10 sem tratamento. Porém, ao compararmos o grupo tratado com os grupos sem tratamento e placebo, pudemos observar que houve um aumento da expressão de sinaptofisina nas duas linhagens, sendo que esse aumento foi mais evidente na linhagem MDX (aumento de, aproximadamente, 80% em relação ao grupo sem tratamento e de 79% em relação ao grupo placebo). Na região ipsilateral, a análise entre o grupo tratado e os grupos sem tratamento e placebo demonstrou um aumento mais acentuado na linhagem MDX (aproximadamente 92% em relação ao grupo sem tratamento e 89% em relação ao grupo placebo).

O fato dos camundongos MDX apresentarem uma menor expressão de sinaptofisina indica que essa redução de sinapses nos motoneurônios alfa-medulares, seja decorrente da desconexão parcial entre o órgão alvo e o motoneurônio durante o período de ciclos de degeneração/regeneração que acontece a partir da segunda semana pós-natal. Ressalte-se que, na sexta semana, idade em que os camundongos foram submetidos à axotomia do nervo isquiático, pôde-se evidenciar núcleo central (um indicativo de regeneração) em aproximadamente 50% das

fibras musculares (PASTORET & SEBILLE, 1995). Além disso, nos camundongos MDX há uma diminuição do número de células do tracto córtico-espinal (SBRICCOLI *et al.*, 1995;). Isso também poderia diminuir o número de *inputs* aos motoneurônios alfa-medulares e, assim, provocar uma diminuição na cobertura sináptica nos corpos neuronais medulares. Logo, o tratamento prévio com G-CSF pode ser crucial para aumentar a estabilidade dos terminais pré-sinápticos nos motoneurônios medulares e neutralizar parcialmente os efeitos deletérios da doença no sistema nervoso central.

Tendo-se em vista o descrito acima, os resultados obtidos, em relação à diminuição da expressão da proteína sinaptofisina e da cobertura sináptica quando comparados aos achados de OLIVEIRA *et al.* (2004), estão de acordo com a idéia de que o MHC I atua na estabilidade dos terminais sinápticos. Ainda, levando-se em conta o seu papel na sinalização entre os terminais pré-sinápticos e os neurônios motores, bem como na comunicação destes com a glia, a maior expressão dessa proteína nos camundongos C57BL/10, pode favorecer o processo de regeneração nervosa em relação aos camundongos MDX.

Como foi demonstrado por OLIVEIRA *et al.* (2004), após uma lesão nervosa, o MHC I desempenha um papel fundamental na estabilização seletiva das sinapses inibitórias, contribuindo para que o processo de retração ocorra de forma específica. SABHA *et al.* (2008) correlacionaram a maior da expressão de MHC I com a intensificação do processo de eliminação sináptica após sete dias da axotomia periférica no microambiente medular. Isso ficou evidenciado nas duas linhagens, porém com uma menor expressão de MHC I na linhagem MDX. Uma hipótese para esse evento é o processo de degeneração/regeneração muscular desses

camundongos já na idade jovem (PASTORET & SEBILLE, 1995), promovendo uma “desconexão parcial” do nervo isquiático com os seus órgãos-alvo, possivelmente estimulando o aumento da expressão das moléculas de MHC I nesses camundongos. Tal fato pode contribuir para que os camundongos MDX respondam de maneira distinta daquela observada normalmente num animal controle, como mostrado nos trabalhos de SABHA *et al.* (2008) e LINDÅ *et al.* (1998), onde a expressão de MHC I se manteve elevada num período de até 3 semanas após a axotomia do nervo isquiático. Assim, o aumento nos níveis de MHC-I em camundongos MDX através do tratamento com G-CSF, pode ser uma estratégia para melhorar a resposta à lesão e aumentar a estabilidade de terminais pré-sinápticos em camundongos MDX durante o curso da distrofia muscular de Duchenne.

Em conjunto, esses resultados nos indicam que o tratamento com G-CSF é capaz de estimular a reatividade glial sem a eliminação exarcebada de terminais pré-sinápticos. Essa reatividade glial pode ser interpretada como neuroprotetora, contribuindo para a estabilização do microambiente medular adjacente aos motoneurônios alfa medulares.

6. CONCLUSÕES

1 – A axotomia do nervo isquiático resulta em aumento acentuado da expressão de MHC I nas duas linhagens estudadas. Contudo, nos camundongos MDX, este aumento é menor, quando comparado à linhagem C57BL/10;

2 – O aumento da expressão de MHC I em camundongos MDX, tratados com G-CSF, pode indicar um papel ativo da droga no potencial regenerativo após a lesão;

3 – O tratamento com G-CSF em camundongos MDX resulta em efeito neuroprotetor no microambiente medular, após a lesão nervosa periférica;

4 – Camundongos MDX apresentam uma menor função motora em relação aos camundongos C57BL/10; porém, o tratamento com G-CSF promove uma melhora na função motora em camundongos MDX. No entanto, a diminuição da função motora nos camundongos MDX não pode ser totalmente revertida com a utilização de G-CSF;

5 – O tratamento com G-CSF é capaz de reduzir os efeitos inflamatórios e atuar positivamente no processo de regeneração nervosa periférica, após esmagamento do nervo isquiático;

6 – O tratamento com G-CSF, em culturas primárias de astrócitos, aumenta a expressão GFAP, MHC-I e do receptor de G-CSF em camundongos MDX. Esse aumento na reatividade

glial e no MHC-I pode estimular a plasticidade sináptica *in vivo*, contribuindo positivamente na estabilidade dos circuitos medulares durante o curso da distrofia muscular de Duchenne;

7 – A redução dos *inputs* dos motoneurônios alfa medulares e o aumento da astrogliose nos camundongos MDX podem estar relacionados aos ciclos de degeneração/regeneração muscular que ocorrem após o nascimento. Adicionalmente, a menor expressão de MHC I nos camundongos MDX pode indicar uma reduzida capacidade de reajuste de *inputs* pelos motoneurônios, o que sugere um menor potencial regenerativo após lesão em relação aos camundongos C57BL10.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA-HEIDEMANN K, FRIEDERICH S, KLAMP T, BOEHM U, GUETHLEIN LA, ORTMANN B. 2002. Regulation of the expression of mouse TAP-associated glycoprotein (tapasin) by cytokines. *Immunol Lett.* 83(3):197-207.

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

ALDSKOGIUS H and SVENSSON, M. 1993. Neuronal and glial responses to axon injury. In S.K. Malhotra (eds): *Advances in structural biology*. Greenwich, Connecticut: JAI Press.

ALDSKOGIUS H, LIU L, SVENSSON M. 1999. Glial responses to synaptic damage and plasticity. *Journal Neuroscience Research*, 58:33-41.

ANDERSON CM, SWANSON RA. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*;32(1): 1-14.

ARAHATA K, ISHIHARA T, NONAKA I, OZAWA E, SUGITA H. 1988. Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature*, 333:861-868.

ARAQUE A, PEREA G. 2004. Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia*. 47:241-248.

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

BABBITT BP, ALLEN PM, MATSUEDA G, HABER E, UNANUE ER. 1985. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature*, 317:359-361.

BALABAN B, MATTHEWS DJ, CLAYTON GH, CARRY T. 2005. Corticosteroid treatment and functional improvement in Duchenne Muscular Dystrophy: long-term effect. *Am J Phys Med Rehabil.*, 84:843-850.

BATCHELOR PE, PORRITT MJ, MARTINELLO P, PARISH CL, LIBERATORE GT, DONNAN GA, et al. 2002. Macrophages and microglia produce local trophic gradients that stimulate axonal sprouting toward but not beyond the wound edge. *Mol Cell Neurosci*; 21: 436-53.

BODIAN D. 1964. An electron-microscopic study of the monkey spinal cord. *Bull. Hopk. Hosp.*, 114:13-119.

BALDO MP, DAVEL APC, NICOLETTI-CARVALHO JE, BORDIN S, ROSSONI LV, MILL JG. 2008. Granulocyte Colony-stimulating Factor Reduces Mortality by Suppressing Ventricular

Arrhythmias in Acute Phase of Myocardial Infarction in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* TM; 52:375–380.

BARRETO G, WHITE RE, OUYANG Y, XU L, GIFFARD RG. 2011. Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 11(2): 164–73.

BARRETO GE, GONZALEZ J, TORRES Y, MORALES L. 2011. Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci Res*. (2): 107–13. Epub 2011 Jun 14.

BEGLEY CG, LOPEZ AF, NICOLA NA, WARREN DJ, VADAS MA, SANDERSON CJ. 1986. Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. *Blood*., 68(1):162-6.

BOULANGER LM, HUG GS, SHATZ CJ. 2001. Neuronal plasticity and cellular immunity: shared molecular mechanisms. *Curr. Op. Neurobiol.*, 11: 568-578.

BRÄNNSTRÖM T, KELLERTH JO. 1998. Changes in synaptology of adult cat spinal alpha-motoneurons after axotomy. *Experimental Brain Research*, 118:1-13.

BURGESS AW, METCALF D. 1980. Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. *Int J Cancer*., 26(5):647-54.

CARRETA D, SANTARELLI M, VANNI D, CARRAI R, SBRICCOLI A, PINTO F, MINCIACCHI D. 2001 The organization of spinal projecting brainstem neurons in an animal modelo f muscular dystrophy: A retrograde tracinig study on mdx mutante mice. *Brain Research*, 895:213-222.

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

CHELLY J, KAPLAN JC, MAIRE P, GAUTRON S, KAHN A. 1988. Transcription of the dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1189-1192.

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.

CULLHEIM S, WALLQUIST W, HAMMABERG H, LINDÅ H, PIEHL F, CARLSTEDT T, RISLING M. 2002. Properties of motoneurons underlying their regenerative capacity after axon lesions in the ventral funiculus or at the surface of the spinal cord. *Brain Research Rev*. 40:309-316.

CULLHEIM S, THAMS S. 2007. The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Res*; 55: 89–96.

DE MEDINACELI L, FREED WJ, Wyatt RJ. 1982. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 77(3):634-43.

DEL ZOPPO GJ. 2009. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience*.158(3): 972–82.

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

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

DRINGEN R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. 62(6): 649–71.

DRINGEN R, GUTTERER JM, HIRRLINGER J. 2000. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem.*; 267(16): 4912–6.

ECHEVERRY S, SHI XQ, ZHANG J. 2007. Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. *International Association for the Study of Pain (IASP)*, 135:37-47.

EMIRANDETTI A, ZANON RG, SABHA MJ, OLIVEIRA ALR. 2006. Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. *Brain Research*, 1095:35-42.

EMIRANDETTI A, SIMÕES GF, ZANON RG, OLIVEIRA AL. (2010) Spinal motoneuron synaptic plasticity after axotomy in the absence of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Neuroinflammation*. 24;7:31.

GIBSON CL, BATH PM, MURPHY SP. 2005. G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 25(4):431-9.

GRAEBER MB, KREUTZBERG GW. 1986. Astrocytes increase in glial fibrillary acidic protein during retrograde changes of facial motor neurons. *Journal Neurocytol.*, 15:363-373.

GRAY EG, GUILLERY RW. 1966. Synaptic morphology in the normal and degenerating nervous system. *Int. Rev. Cytol.*, 19:111-182.

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

- HAMMARBERG H, LIDMAN O, LUNDBERG C, ELTAYEB SY, GIELEN AW, MUHALLAB S. 2000. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and Natural Killer cells. *The Journal of Neurosci.*, 20(14): 5283-5291.
- HANISCH UK, KETTENMANN H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*; 10: 1387–94.
- HANSON E, RÖNNBÄCK L. 1995. Astrocytes in glutamate neurotransmission. *FASEB J.*, 9:343-350.
- HARTUNG T. 1998. Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol.*, 5(3):221-5.
- HENZE C, LESCOT T, TRAVER S, SALTHUN-LASSALLE B, HIRSCH EC, MICHEL PP, HARTMANN A. 2005. Granulocyte colony-stimulating factor is not protective against selective dopaminergic cell death in vitro. *Neurosci Lett.*;383(1-2):44-8. Epub 2005 Apr 13.
- HUARD J, COTÉ PY, PARENT A, BOUCHARD JP, TREMBLAY JP. 1992. Dystrophin-like immunoreactivity in monkey and human brain areas involved in learning and motor functions. *Neuroscience Lett.*, 141:181-186.
- HU B, YASUI K., 1997. Effects of colony-stimulating factors (CSFs) on neutrophil apoptosis: possible roles at inflammation site. *Int J Hematol.*;66(2):179-88.
- HUH GS, BOULANGER LM, DU H, RIQUELME PA, BROTZ TM, SHATZ CJ. 2000. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science.*,290; 2155-58.
- IKEDA M, OKA Y. 2012. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration. *Brain Behav.* (4):382-90.
- JUDGE LM, HARAGUCHI M, CHAMBERLAIN JS. 2005. Dissecting the signaling and mechanical functions of the dystrophin-glycoprotein complex. *Journal of Cell Science.*, 119:1537-1546.
- KANDEL ER, SHWARTZ JH, JESSEL TM. 2000. *Principles of Neural Science*, 4 Edition: McGraw-Hill.
- KANG J, JIANG L, GOLDMAN SA, NEDERGAARD M. 1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neuroscience*, 1:683-692.
- KAUR C, LING EA. 2008. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions *Curr Neurovasc Res.*(1): 71–81.

KODA M, NISHIO Y, KAMADA T, SOMEYA Y, OKAWA A, MORI C, YOSHINAGA K, OKADA S, MORIYA H, YAMAZAKI M. 2007. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res.* 29;1149:223-31.

LAGROTA-CANDIDO J, VASCONCELLOS R, CAVALCANTI M, BOZZA M, SAVINO W[, QUIRICO-SANTOS T. 2002. Resolution of skeletal muscle inflammation in mdx dystrophic mouse is accompanied by increased immunoglobulin and interferon-gama production. *Int. J. Exp. Path.* 83:121-132.

LEE ST, CHU K, JUNG KH, KO SY, KIM EH, SINN DI, LEE YS, LO EH, KIM M, ROH JK. 2005. Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Research*, 1058:120 – 128

LEVI ADO and BUNGE M. 1994. Studies of myelin formation after transplantation of human Schwann cells in vitro the severe combined immunodeficient mouse. *Exp. Neurol.*, 130:41-52.

LIDOV HG, BYERS TJ, KUNKEL LM. 1993. The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: an immunocytochemical study. *Neuroscience*, 54:167-187.

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

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

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

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

LINDENAU J, NOACK H, POSSEL H, ASAYAMA K, WOLF G. 2000. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia.* 1; 29(1): 25–34.

LOWE DA, WILLIAMS BO, THOMAS DD, GRANG, R. 2006. Molecular and cellular contractile dysfunction of dystrophic muscle from young mice. *Muscle & Nerve.*, 34:92-100.

LUNDBERG C, LIDMAN O, HOLMDAHL R, OLSSON T, PIEHL F. 2001. Neurodegeneration and glial activation patterns after mechanical nerve injury are differentially regulated by non-MHC genes in congenic inbred rat strains. *J Comp Neurol.*, 26;431(1):75-87.

MACHADO A. 2000. *Neuroanatomia Funcional*. 2ª Edição, São Paulo, Editora Atheneu.

MAYHEW TM, SHARMA AK. 1984. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J Anat.* 1984 Aug;139 (Pt 1):59-66.

MCCARTHY KD, de VELLIS J.1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.*;85(3):890-902.

MCDOWALL RM, DUNN MJ, BILLIAU A. 1990. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Science*, 99:199-217.

MCGRAW J, HIEBERT GW, STEEVES JD. 2001. Modulation astrogliosis after neurotrauma. *Journal Neuroscience Research*, 63:109-115.

MORAN LB, GRAEBER MB. 2004. The facial nerve axotomy model. *Brain. Res. Rev.* 44:154-178.

MYATAKE M, MIIKE, T, ZHAO JE, YOSHIOKA K, UCHINO M, USUKU G. 1991. Dystrophin: localization and presumed function. *Muscle Nerve*, 14(2):113-119.

NEDERGAARD M, DIRNAGL U (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia*. 2005 (4):281-6.

NISHIO Y, KODA M, KAMADA T, SOMEYA Y, KADOTA R, et al. (2007) Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol.*;66(8):724-31

NONAKA I. 1998. Animals models of muscular dystrophies. *Laboratory Anim. Sci.* 48:8-16.

NORTON WT. 1999. Cell reactions following acute brain injury: a review. *Neurochem. Res.*, 24:23-218.

OLIVEIRA ALR, LANGONE F. 2000. Non-neuronal cells are not the limiting factor for the low axonal regeneration in C57BL/6J mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33:1467-1475,.

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

- OUYANG YB, VOLOBOUEVA LA, XU LJ, GIFFARD RG. 2007 Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J Neurosci.*; 27(16): 4253–60.
- PASTORET C, SEBILLE A. 1995. MDX mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *Journal of Neurological Sciences*, 129:97-105.
- PEARCE JMS. 2005. Early Observations on Duchenne-Meryon muscular dystrophy. *Eur Neurol.*, 54: 46-48.
- PEKNY M 2001. Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin Knock-out mice. *Porg. Brain Research*, 132:23-30.
- PIAO CS, GONZALEZ-TOLEDO ME, XUE YQ, DUAN WM, TERAO S, GRANGER DN, KELLEY RE, ZHAO LR. 2009. The role of stem cell factor and granulocyte-colony stimulating factor in brain repair during chronic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* (4):759-70
- PIEHL F, ARVIDSSON U, JOHNSON H, CULLHEIM S, DAGERLIND A, ULFHAKE B, CAO Y, ELDE R, PETTERSSON RF, TERENIUS L, *et al.*, 1993. GAP-43, aFGF, CCK and alpha- and beta-CGRP in rat spinal motoneurons subjected to axotomy and/or dorsal root severance. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1321-1333.
- PIEHL F, HAMMARBERG H, HOKFELT T, CULLHEIM S. 1998. Regulatory effects of trophic factors on expression and distribution of CGRP and GAP-43 in rat motoneurons. *J. Neurosci.*, 5:1321-1333.
- PIERUCCI A, DUEK EAR, OLIVEIRA ALR. 2008. Peripheral nerve regeneration through biodegradable conduits prepared using solvent evaporation. *Tissue Engineering*, 14(5):595-606.
- PITZER C, Kruger C, Plaas C, Kirsch F, Dittgen T (2008) Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*; 131, 3335-3347.
- PLOEGH HL, ORR HT, STROMINGER JL. 1981. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell*, 24:287-299.
- PURVES D, LICHTMAN JW. 1978. Formation and maintenance of synaptic connections in autonomic ganglia. *Physiol Rev.* 58, 821-862.
- RADLEY HG, DAVIES MJ, GROUNDS MD. 2007. Reduced muscle necrosis and long-term benefits in dystrophic mdx mice after cV1q (blockade of TNF) treatment. *Neuromuscular Disorders*, 18:227-238
- REIER PJ, ENG LF, JAKEMAN L. 1989. Reactive astrocyte and axonal outgrowth in the injured CNS: is gliosis really an impediment to regeneration? *Neur. Reg. Transpl. Front. Clinical Neuroscience*, 6:193-209.

RIDET JL, MALHOTRA SK, PRIVAT A, GAGE FH. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.*; 20(12): 570–7.

ROMANES G. 1946. Motor localization and the effects of nerve injury on the ventral horn cells of the spinal cord. *J Anat.*, 80:117-131.

RUSHTON WAH. 1951. A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J. Neurosci.*, 37(7): 2739-2748.

SABHA MJR, EMIRANDETTI A, CULLHEIM S, OLIVEIRA, ALR. 2008. MHC I expression and synaptic plasticity ind different mice strains after axotomy. *Synapse*, 62:137-148.

SBRICCOLI A, SANTARELLI M, CARRETA D, PINTO F, GRANATO A, MINCIACCHI D. 1995. Architectural changes of the cortiço-spinal system in the dystrophin defective mdx mice. *Neuroscience Letters*, 200:53-56.

SCHÄBITZ WR, KOLLMAR R, SCHWANINGER M, JUETTLER E, BARDUTZKY J, et al. 2003 Neuroprotective effect of granulocyte colonystimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke.*; 34(3):745-51.

SCHNEIDER A, KUHN HG, SCHÄBITZ WR. 2005. A role for G-CSF (granulocytecolony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle*; 4(12):1753-7.

SIMS NR, NILSSON M, MUYDERMAN H. 2004. Mitochondrial glutathione: a modulator of brain cell death. *J Bioenerg Biomembr.* 2004 Aug; 36(4): 329–33

SMITH RS, KOLES ZJ. 1970. Myelinated nerve fibers – computed effect of myelin thickness on conduction velocity. *Am. J. Physiol.*, 219: 1256-1260.

SOLAROGLU I, CAHILL J, JADHAV V, ZHANG JH. 2006. A novel neuroprotectant granulocyte-colony stimulating factor. *Stroke*; 37(4):1123-8.

SPENCER MJ, MONTECINO-RODRIGUES E, DORSHKIND K, TIDBALL JG. 2001. Helper (CD4+) and cytotoxic (CD8+) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Cli. Immunol.*, 989:235-243.

STREIT WJ. 2005. Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer’s disease. *Brain Res Brain Res*; 48: 234–9.

SUGANO Y, ANZAI T, YOSHIKAWA T, MAEKAWA Y, KOHNO T, MAHARA K, NAITO K, OGAWA S. 2005. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res.*;65(2):446-56.

SWANSON RA, YING W, KAUPPINEN TM. 2004. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med.* 2004 Mar;4(2): 193–205.

TAKATA M, NAGAHAMA T. 1983. Synaptic efficacy of inhibitory synapses in hypoglossal motoneurons after transaction of the hypoglossal nerves. *Neuroscience*. 10, 23-29.

TESTUT L, LATARJET A. 1986. *Tratado de Anatomia Humana*. Tomo Segundo. 2^a Reimpresión Barcelona –Espanha, Salvat Editores S.A.

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

THORSBY E. 1999. MHC structure and function. *Transplant. Proc.*, 31:713-716.

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

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

WALZ W. 2000. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int.*; 36(4-5): 291-300.

WAXMAN, S.G. 1980. Structure-function relations in nerves and nerve injuries. IN: *NERVE repair and regeneration: its clinical and experimental basis*. Eds. D.L. Jewett, H.R. McCarroll, Jr., St. Louis, Mosby, p. 186-198.

WELTE K, PLATZER, E, LU, L, GABRILOVE, JL, LEVI, E, MERTELSMANN, R. 1985. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 82(5):1526-30.

WENDELL-SMITH CP, BLUNT MJ, BALDWIN F. 1966. the ultrastructural characterization of macroglial cell types. *J. Comp. Neurol.*, 127(2):219-240.

WHITEHEAD NP, YEUNG EW, ALLEN D. 2006. Muscle damage in MDX (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 33:657-662.

WOLF JR. 1970. Quantitative aspects of astroglia. In. *Proceedings of the sixth international congress of neuropathology*, Paris: Masson; 327-352.

ZANON RG, OLIVEIRA ALR. 2006. MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transaction. *Experimental Neurology*, 200:521-531.

ZAVALA F, ABAD S, EZINE S, TAUPIN V, MASSON A, BACH JF. 2002. G-CSF Therapy of Ongoing Experimental Allergic Encephalomyelitis Via Chemokine- and Cytokine-Based Immune Deviation. *J Immunol.*15;168(4):2011-9.

ANEXO 1

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "Plasticidade sináptica em motoneurônios alfa medulares de camundongos MDX tratados com fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF)":

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

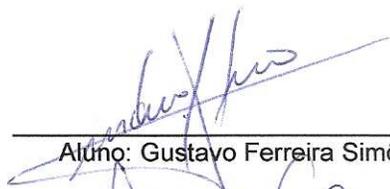
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 1776-1, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

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

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

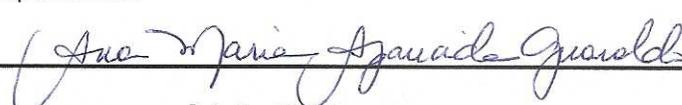

Aluno: Gustavo Ferreira Simões


Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

ANEXO 2

Granulocyte-Colony Stimulating Factor Improves MDX Mouse Response to Peripheral Nerve Injury

Gustavo Ferreira Simões, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira*

Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

Abstract

Background: G-CSF has been shown to increase neuronal survival, which may positively influence the spinal cord microenvironment during the course of muscular dystrophies.

Methodology/Principal Findings: Male MDX mice that were six weeks of age received a left sciatic nerve transection and were treated with intraperitoneal injections of 200 µg/kg/day of G-CSF 7 days before and 7 days after the transection. The axotomy was performed after the cycles of muscular degeneration/regeneration, consistent with previous descriptions of this model of muscular dystrophy. C57BL/10 mice were used as control subjects. Seven days after the surgery, the animals were sacrificed and their lumbar spinal cords were processed for immunohistochemistry (anti-MHC I, anti-Synaptophysin, anti-GFAP and anti-IBA-1) and transmission electron microscopy. MHC I expression increased in both strains of mice after the axotomy. Nevertheless, the MDX mice displayed a significantly smaller MHC I upregulation than the control mice. Regarding GFAP expression, the MDX mice showed a stronger astrogliosis compared with the C57BL/10 mice across all groups. Both groups that were treated with G-CSF demonstrated preservation of synaptophysin expression compared with the untreated and placebo groups. The quantitative analysis of the ultrastructural level showed a preservation of the synaptic covering for the both groups that were treated with G-CSF and the axotomized groups showed a smaller loss of synaptic contact in relation to the treated groups after the lesion.

Conclusions/Significance: The reduction of active inputs to the alpha-motoneurons and increased astrogliosis in the axotomized and control groups may be associated with the cycles of muscle degeneration/regeneration that occur postnatally. The G-CSF treated group showed a preservation of the spinal cord microenvironment after the lesion. Moreover, the increase of MHC I expression in the MDX mice that were treated with G-CSF may indicate that this drug performs an active role in regenerative potential after lesions.

Citation: Simões GF, Oliveira ALRd (2012) Granulocyte-Colony Stimulating Factor Improves MDX Mouse Response to Peripheral Nerve Injury. PLoS ONE 7(8): e42803. doi:10.1371/journal.pone.0042803

Editor: Joao B. Calixto, Universidad Federal de Santa Catarina, Brazil

Received: March 7, 2012; **Accepted:** July 11, 2012; **Published:** August 13, 2012

Copyright: © 2012 Simões, Oliveira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2009/06686-6, 2009/05565-0 and 2012/14236-3). ALRO receives a fellowship from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: alroliv@unicamp.br

Introduction

The use of MDX mice is a well-established experimental model for studying Duchenne Muscular Dystrophy [1–8]. During the course of the disease, the MDX mice present degeneration/regeneration muscle cycles [3,8,9]. Studies have demonstrated that, on the first postnatal day, the MDX mice's muscle fibers already show a discontinuation of sarcomeres and disorganized myofibrils, thus characterizing muscle degeneration processes [3]. In another study, the authors showed that two-week-old MDX mice showed signs of muscle degeneration/regeneration such that some of the muscle fibers displayed central nuclei and cellular infiltrates. These changes were widespread in most of the muscles during the animals' third week of life [8]. The same authors have showed that, during the sixth week of life, 50% of all muscle fibers of the hind limbs presented central nuclei. This myonecrosis is often preceded by the collapse and detachment of the basal lamina of the sarcolemma and subsequent muscle fiber degeneration, and it is associated with extensive inflammation. During such a process,

CD4+ and CD8+ accumulate in the MDX mice's skeletal muscles, especially from the fourth postnatal week [10]. In addition, during muscle regeneration, B lymphocytes proliferate and the secretion of IFN-β increases.

Apart from the characteristic muscle degeneration, due to the absence of dystrophin, in MDX mice, the lack of such a protein in the central nervous system (CNS) has also been implicated in neuronal loss [11,12]. In this sense, it has been suggested that dystrophin performs an important role in developing and maintaining the structural and functional properties of neurons [12]. Evidence of abnormal connections in the brains of adult MDX mice was first demonstrated by Carreta et al. [13]. Previously, it had been demonstrated that there was a decrease in the number of axons in the corticospinal tract of MDX mice [12]. This change indicated an important role for dystrophin in the cerebral cortex, and the complete loss of dystrophin's expression in the CNS of the MDX mice also altered its neural function [14].

A previous study showed that MDX mice presented additional spinal cord alterations [15]. Synaptic changes in alpha-motoneurons during the course of the disease were described, especially a decrease in synaptic inputs and an increased glial reaction in the motor column. Associated with this, a decreased expression of the major histocompatibility complex of class I (MHC I) was detected in MDX mice. It has been shown that MHC I expression by neurons and glial cells is correlated with post-lesion synaptic plasticity and ultimately with the regenerative response following injury. Such changes were correlated with the course of the disease and were regarded as additional contributors to the deterioration of motor function and to the decrease in regenerative potential that follows a lesion [15].

To date, although there is no consensus regarding DMD treatment, glucocorticoid corticosteroid (prednisone and deflazacort) prescriptions have been used as standard therapies [16]. However, it is possible that neuroprotective pharmacological treatments may result in a positive response during the course of the disease, which also reduces the inflammatory response at the peripheral level. With respect to this possible positive response, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) has been shown to have neurotrophic action [17,18], including anti-apoptotic activity in neurons [19,20,21,22], to stimulate neovascularization [23–26], to present an anti-inflammatory effect [26–30] and to stimulate neurogenesis [31,32].

G-CSF is a glycoprotein that contains 19.6 kilo Daltons and is a member of the cytokine family of growth factors. G-CSF was initially described more than twenty years ago as an inducer of cell differentiation in leukemic monocytic WEHI-3B [34,35]. G-CSF has received FDA (U.S. Food and Drug Administration) approval and is commonly used to treat neutropenia [35–37] or to enhance success in bone marrow transplants [34,38]. The known sources of G-CSF are monocytes, mesothelial cells, fibroblasts and endothelial cells. G-CSF stimulates the growth of neutrophil precursors and critically regulates the survival of mature post-mitotic neutrophils by inhibiting apoptosis [34,38,39].

The administration of G-CSF mobilizes stem and progenitor cells from bone marrow into the circulatory system, which in turn cross the blood-brain barrier and head toward the affected area in the CNS. Thus, G-CSF promotes anti-apoptotic effects on alpha-motoneurons after sciatic nerve axotomy in neonatal mice [40]. Moreover, this treatment induces upregulation of G-CSF receptors in such neurons, which may improve the effectiveness of the drug [40]. Studies of spinal cord injuries have shown that G-CSF enhanced motor recovery [41–45] and increased the vascularization of the lesioned microenvironment [44], which preserved the microenvironment within the lesioned area. [46,47].

Lee et al. [22] showed that, after ischemic injury in the CNS, G-CSF treatment increased the production of vascular endothelial cells and decreased the length of the ischemic area. Concomitantly, it induced neurological functional recovery by providing a neuroprotective effect that reduced the extent of infarction and inflammatory infiltration [22]. In another study, the authors demonstrated a reduction in the signs of the disease in mice that were induced to the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) following treatment with G-CSF [48]. The effects promoted by G-CSF that should be highlighted [48] include the maintenance of the integrity of the myelin sheath of the axons that were located in the cerebellum [48], a reduction in the recruitment of T cells to the CNS [48], discrete signs of inflammation and a limiting of the production of TNF- α [48], which is associated with early infiltration and neurological deficits.

Aims

Based on the literature noted above, the aim of this study was to investigate the possible neuroprotective effects of G-CSF on the synaptic elements that related to spinal alpha-motoneurons following an axotomy of the sciatic nerve in MDX mice. Additionally, the immunomodulatory action of G-CSF on the expression of MHC I by neurons and glial cells and on glial reactivity-related markers was studied using immunohistochemistry. The overall benefit of the treatment was evaluated by analyzing both the ultrastructure of the spinal cord and spinal motoneurons and the pre-synaptic inputs that were located opposite to the neuron cell body.

Materials and Methods

Experimental Animals

Six-week-old male (20–25 g) mice from the strains C57BL/10 and MDX were used. The mice were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB) at the University of Campinas, Brazil. The animals were grouped in plastic cages and were permitted free access to food and water. The animals' cages were maintained with a controlled light/dark cycle (12 h) and at a temperature of 21°C. The experiments were carried out in accordance with the ethical principles for animal experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (CEUA), protocol number 1776-1. The animals were divided into six groups (axotomized/ipsilateral+G-CSF–n = 10, axotomized/ipsilateral/non treated–n = 10, axotomized/ipsilateral+placebo–n = 5, axotomized/contralateral+G-CSF treated–n = 10, axotomized/contralateral/non treated–n = 10, axotomized/contralateral+ placebo–n = 5 and normal animals–n = 10). In the treated groups, 200 mg/kg/day of G-CSF was administered subcutaneously to the mice for seven days before and seven days after axotomy. In the placebo groups, the mice received subcutaneous injections of 200 μ l of 5% glucose (G-CSF vehicle) seven days before and seven days after axotomy.

Sciatic Nerve Injury

The mice were anesthetized with a mixture of Vetaset (ketamine, Fort Dodge, 50 mg/kg) and kensol (xylazine, Körmig, 10 mg/kg), totaling 0.12 ml/25 g of body weight. After trichotomy at the left mid-thigh, a skin incision approximately 1.5 cm long was made using a scalpel. The skin and the thigh muscles were carefully retracted, exposing the sciatic nerve, which was injured at the level of the obturator foramen. The sciatic nerve transection was performed with iris microscissors. A 2-mm segment of the distal stump of the nerve was removed and diverted from its natural direction to avoid realignment between the stumps. The muscles were repositioned, and the skin was sutured. After surgery, the mice were maintained in a vivarium at the Nerve Regeneration Laboratory, Department of Anatomy, Institute of Biology, Unicamp, until they were sacrificed. Following sacrifice, the spinal cords were obtained and processed for immunohistochemistry and transmission electron microscopy. After fixation, the specimens were dissected and kept in fixative for 12 hours at a temperature of 4°C.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, the lumbar spinal cords were embedded in Tissue-Tek (Miles Inc., USA) and frozen in liquid nitrogen at –40°C for cryostat sectioning (12 μ m). Primary rabbit anti-synaptophysin (1:100, Dako, Glostrup, Denmark),

goat anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-IBA-1 (1:600, Wako, Chuo-Ku, Osaka, Japan) and rat anti-MHC class I (1:100, BMA Biomedicals AG, Augst, Switzerland) anti-sera were used. The anti-sera were diluted in a solution that contained BSA and Triton X-100 in 0.01 M PBS. The sections were incubated overnight at 4°C in a moist chamber. After being rinsed in 0.01 M PBS, the sections were incubated with Cy3- or Cy2-conjugated secondary anti-sera (1:250, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) for 45 min in a moist chamber at room temperature. The sections were then rinsed in PBS, mounted in a mixture of glycerol/PBS (3:1), and observed using a Nikon TS100 microscope that was equipped with a digital camera (Nikon, Tokyo, Japan, DXM1200i). For quantitative measurements, the lesioned segments were first identified by decreased synaptophysin immunolabeling in the motoneuron microenvironment, combined with an increased glial reaction. Three alternate sections (the ipsi and contralateral sides of the spinal cord) were chosen from each animal ($n=5$ for each group). These sections were used to capture images from the ventral horn at a final magnification of $\times 200$ with all of the settings unchanged. Quantification was performed using the enhance contrast and density slicing feature of IMAGEJ software (version 1.33u, National Institutes of Health, USA). The integrated density in pixels was measured in eight areas per motoneuron present on the lateral motor nucleus from each side. Lesioned neurons were visualized by the decreased synaptophysin labeling around the cell body. The non lesioned/lesioned ratio of the integrated density of the pixels was calculated for each section (for the axotomy groups) and then as a mean value for each spinal cord. The data were represented as the mean \pm standard error of the mean (se).

Electron Microscopy

The lumbar spinal cords were dissected out and stored overnight in fixative (1.5% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PB, pH 7.34) at 4°C. The specimens were then trimmed, osmicated, dehydrated and embedded in Durcupan (Fluka, Steinheim, Switzerland). Ultrathin sections from the L4–L6 segments were placed on formvar-coated copper grids, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Tecnai Biotwin G² Spirit transmission electron microscope (FEI Company, The Netherlands), which was operated at 120 kV. Neurons that possessed large bodies ($>35 \mu\text{m}$ in diameter), which were found in the sciatic motoneuron pool and cut in the nuclear plane, were identified as alpha-motoneurons by the presence of C-type nerve terminals. Neurons were identified as axotomized based on the occurrence of chromatolytic changes in the cell bodies. A qualitative analysis was performed for all of the experimental groups. The surfaces of the experimental animals' cells were photographed at a magnification of $11,000\times$ by an Eagle 2 K video camera (FEI Company, The Netherlands) that was connected to a computer system. The images were then mounted together using vector graphics software. The synaptic terminals that opposed the motor neuron somata were identified, and the membrane coverings of all of the terminals were measured and calculated as both a percent of the membrane length and their numbers per $100 \mu\text{m}$ of cell membrane. These measurements were carried out using the measurement tool of the Image Tool software (Version 3.0, The University of Texas, Health Center in Santo Antonio, USA). The terminals were typed according to the nomenclature as S-

type (with spherical synaptic vesicles that contained glutamate as the neurotransmitter), F-type (with flattened synaptic vesicles alone or flattened and spherical vesicles that contained glycine/gamma-aminobutyric acid (GABA) as the neurotransmitter) or C-type (with a subsynaptic cistern that contained acetylcholine as the neurotransmitter) [49]. The distance between consecutive nerve terminals that covered the motoneurons was also determined. A total of 120 alpha-motoneurons were studied. Two motoneurons were analyzed from each nonlesioned mouse, totaling 40 nonlesioned neurons ($n=20$ for each strain—MDX and C57BL/10). Additionally, two motoneurons were sampled from each side of the spinal cord from the axotomized mice, totaling four motoneurons per animal (axotomized/untreated: $n=20$ – ipsilateral, $n=20$ – contralateral; axotomized+G-CSF: $n=20$ – ipsilateral, $n=20$ contralateral).

Statistical Analysis

The data are presented as the mean \pm SEM and were analyzed using one-way ANOVA followed by *Bonferroni post hoc* test for multiple comparisons at $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) and $P<0.001$ (***)

Results

MHC I Expression after Treatment with G-CSF

No differences in MHC I expression were observed in the nonlesioned animals across the mice strains (Figure S1).

In the ipsilateral groups, increased immunoreactivity was observed in the region of the lateral motor nucleus in the ventral column of the spinal cord (Figure 1). The ipsilateral/untreated group showed a similar MHC I expression to the ipsilateral+placebo group. Overall, the C57BL/10 strain showed a greater MHC I expression in all experimental groups compared with the MDX animals. After treatment with G-CSF, a significant increase in the MHC I expression was observed in both strains, especially in the MDX mice (a 31% increase was observed compared with the placebo group and a 24% increase compared with the untreated group). The C57BL/10 G-CSF treated mice showed an MHC I expression increase of 15% compared with the placebo group and an 11% increase compared with the untreated group. All of the quantitative data that were described in this section are presented as supporting information in Table S1.

Immunoreactivity Against Synaptophysin Following Sciatic Nerve Axotomy and Treatment with G-CSF

Figure 2 shows the immunoreactivity for synaptophysin in the ventrolateral motor nucleus of the anterior horn of the spinal cord at seven days after axotomy of the sciatic nerve (for ipsi and contralateral sides). The quantitative data revealed that the G-CSF treatment enhanced the expression of synaptophysin in the nonlesioned spinal cords (Figure S2). Such an increase in immunoreactivity was proportionally greater in the C57BL/6J mice than in the MDX animals.

After treatment with G-CSF, the MDX mice exhibited an approximately 80% increased expression of synaptophysin compared with the untreated group. This same pattern was observed in the C57BL/10 strain and there was a significant increase in the expression of synaptophysin, approximately 53% after treatment. Even accounting for the increased expression of synaptophysin after treatment with G-CSF, the MDX mice showed a significantly lower expression of synaptophysin than the C57BL/10 mice.

In the axotomized groups, the MDX mice showed a significant decrease in synaptophysin expression on the contralateral side to the lesion compared with the C57BL/10 mice.

MHC I

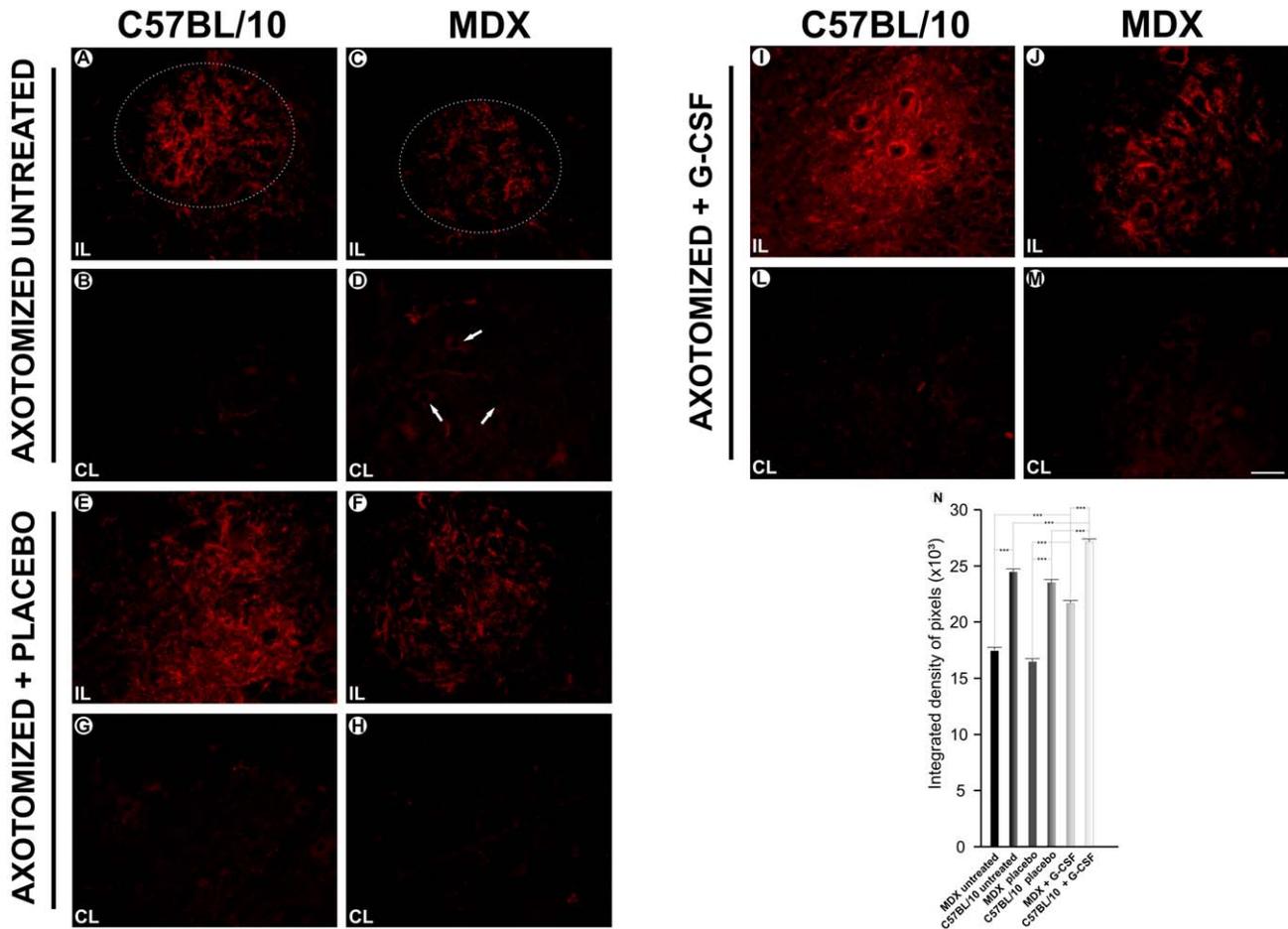


Figure 1. Anti-MHC I immunostaining one week after axotomy. **A** and **C**, the ipsilateral (IL) and contralateral ventral column of the spinal cord of the C57BL/10 strain seven days after axotomy; **B** and **D**, the ipsilateral and contralateral ventral column of the spinal cord of the MDX strain seven days after axotomy; **E** and **G**, the ipsilateral and contralateral of the C57BL/10 ipsilateral+ placebo group seven days after the axotomy; **F** and **H**, the ipsilateral and contralateral of the MDX ipsilateral+ placebo group; **I** and **L**, the ipsilateral and contralateral of the C57BL/10 ipsilateral+ G-CSF group; **J** and **M**, the ipsilateral and contralateral of the MDX ipsilateral+ G-CSF group. **(N)** the quantitative analysis of the integrated density of the pixels between the left sides of the groups studied. In all experiments: $n = 5$. In **A–M**, magnification, X200 (scale bar, 50 μ m). The alpha-motoneurons were quantified in 3 distinct fields along the lumbar intumescence. In **N**, $***p < 0.001$ vs. CT, values are means \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0042803.g001

The MDX mice showed decreased immunoreactivity against synaptophysin on the ipsilateral side. Additionally, among the MDX mice, the G-CSF treatment led to a greater preservation of synaptic inputs after injury compared with the untreated and placebo groups. Accordingly, in the C57BL/10 strain, an increase of synaptophysin immunolabeling could be observed after treatment. The analysis of the ipsi/contralateral ratio indicated that there was no difference between the groups and strains studied. All of the quantitative data that were described in this section are presented as supporting information in Table S1.

Reactive Astrogliosis after Treatment with G-CSF

An increase in GFAP immunoreactivity was observed in the nonlesioned/untreated group of the MDX mice compared with the same group of C57BL/10 mice. After treatment with G-CSF, GFAP immunolabeling increased in both strains, although the

MDX mice maintained a greater expression than the C57BL/10 mice (Figure S3).

In both strains, the ipsilateral side of the axotomized/untreated groups presented increased immunoreactivity compared with the contralateral side (Figure 3). Additionally, contralateral to the lesion, the MDX strain showed significantly greater upregulation of labeling than the C57BL/10 strain. The MDX mice showed approximately 31% more upregulation than the C57BL/10 mice. In the placebo group, the MDX mice's increase was 30% greater than the C57BL/10 mice. The treated MDX group presented an increase of approximately 24% compared with the C57BL/10 strain.

The ipsilateral side of the axotomized groups showed a significant increase in GFAP expression after the lesion, primarily among the MDX strain. In the untreated group, there was an increase of approximately 30% compared with the C57BL/10 group. The placebo group showed an increase of approximately 32%, and the G-CSF treated group displayed an increase of 31%.

Synaptophysin

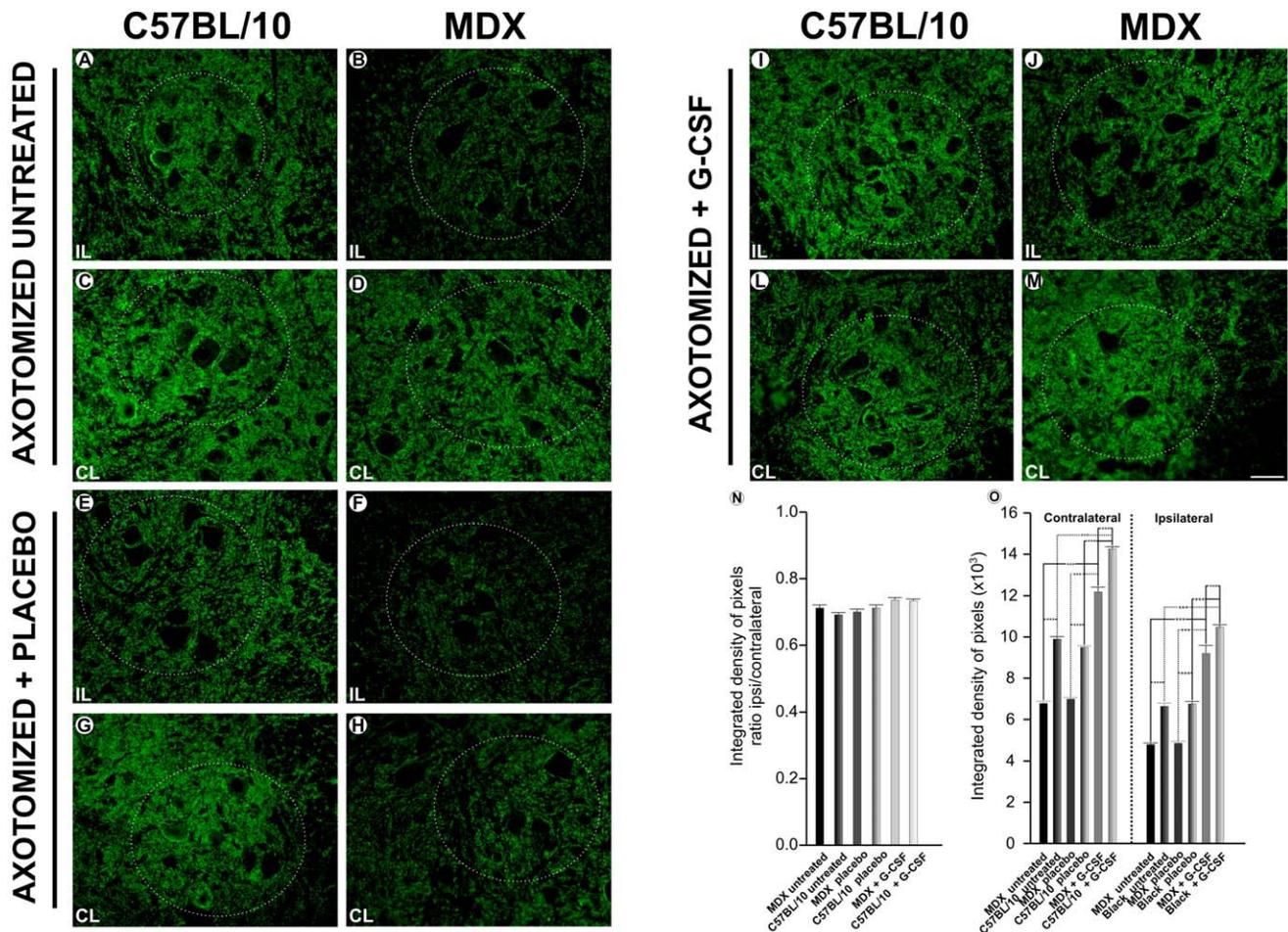


Figure 2. Anti-synaptophysin immunostaining one week after axotomy. **A** and **C**, the ipsilateral (IL) and contralateral ventral column of the spinal cord of the C57BL/10 strain seven days after axotomy; **B** and **D**, the ipsilateral and contralateral ventral column of the spinal cord of the MDX strain seven days after axotomy; **E** and **G**, the ipsilateral and contralateral of the C57BL/10 ipsilateral+ placebo group seven days after the axotomy; **F** and **H**, the ipsilateral and contralateral of the MDX ipsilateral+ placebo group; **I** and **L**, the ipsilateral and contralateral of the C57BL/10 ipsilateral+ G-CSF group; **J** and **M**, the ipsilateral and contralateral of the MDX ipsilateral+ G-CSF group. **N** and **O**, the quantitative analysis of the integrated density of pixels between the ipsi/contralateral ratio and right and left sides, respectively. The circled areas show the motor nucleus of the sciatic nerve and alpha-motoneurons of each lineage. In all experiments: $n = 5$. In **A–M**, magnification, X200 (scale bar, 50 μm). The alpha-motoneurons were quantified in 3 distinct fields along the lumbar intumescence. In **N**, $***p < 0.001$ vs. CT, values are means \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0042803.g002

A comparison of the G-CSF treated group with the untreated and placebo groups found an increased expression of GFAP in both strains among the treated group. The C57BL/10 mice that were treated with G-CSF displayed an increase of approximately 43% compared with the untreated group and 60% compared with the placebo group.

An analysis of the ipsi/contralateral ratio among the different experimental groups indicated no difference between the groups and strains studied. All of the quantitative data that were described in this section are presented as supporting information (Table S2).

Immunoreactivity for IBA-1 after Treatment with G-CSF

The immunoreactivity against IBA-1 remained at low levels in the nonlesioned/untreated and nonlesioned+G-CSF groups. (Figure S4).

After axotomy, the immunoreactivity displayed by the contralateral/untreated and contralateral+placebo groups was similar to the immunoreactivity displayed by the non lesioned/untreated group (Figure 4). In the contralateral+G-CSF group, no significant differences were found between the strains. However, for the contralateral side, the MDX mice that were treated with G-CSF presented a significant increase in immunoreactivity compared with the other two groups (21% greater than the untreated group and 20% greater than the placebo group). A non-significant increase in the expression of IBA-I was depicted after axotomy. Interestingly, for the ipsilateral side, the G-CSF-treated animals from both strains displayed an increased expression of IBA-I (15% greater than the untreated group and 12% greater than the placebo group in the MDX mice and 17% greater than the untreated group and 14% greater than the placebo group for the C57BL/10 mice).

GFAP

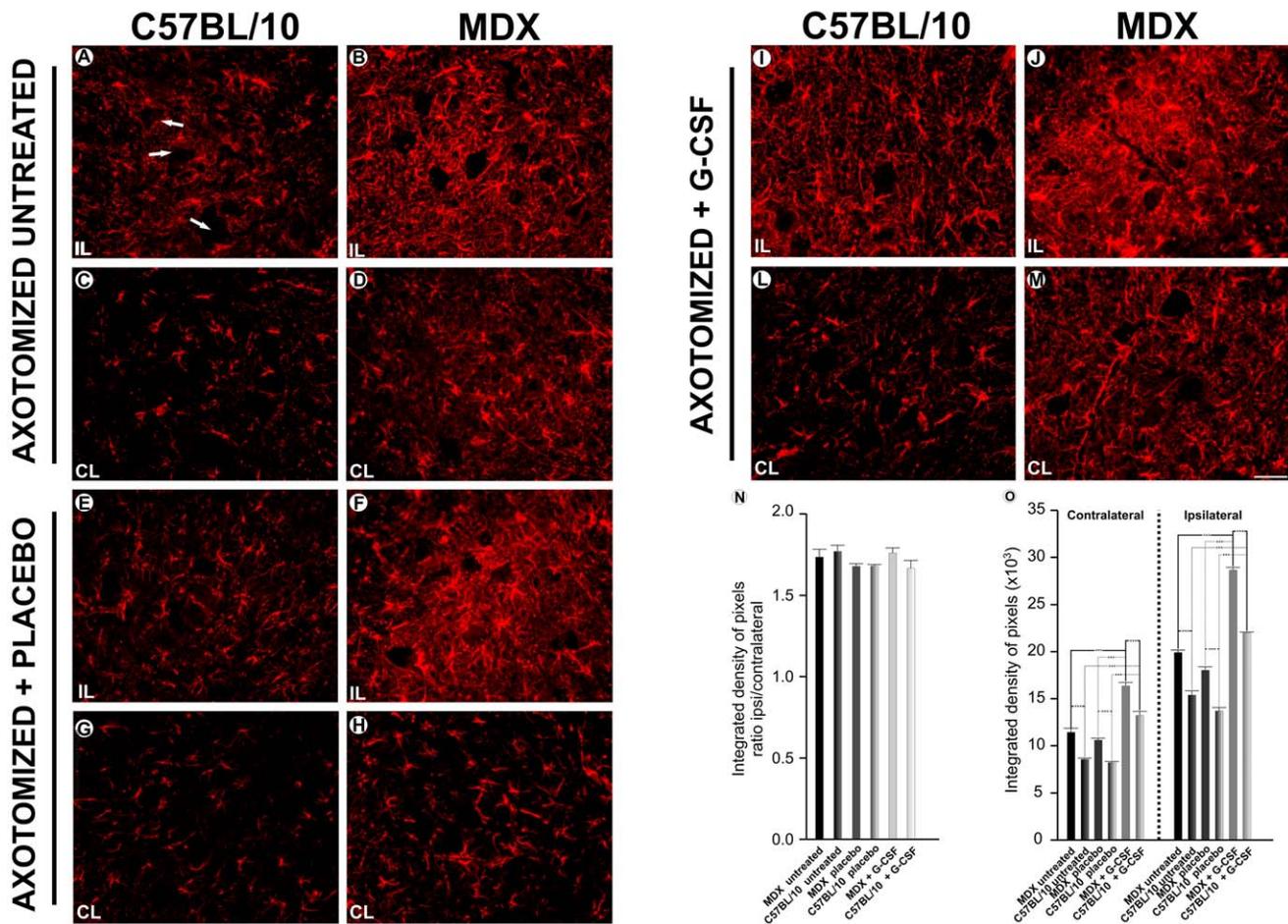


Figure 3. Anti-GFAP immunostaining one week after axotomy. **A** and **C**, the ipsilateral (IL) and contralateral ventral column of the spinal cord of the C57BL/10 strain seven days after axotomy; **B** and **D**, the ipsilateral and contralateral ventral column of the spinal cord of the MDX seven days after axotomy; **E** and **G**, the ipsilateral and contralateral of the C57BL/10 ipsilateral+ placebo group seven days after the axotomy; **F** and **H**, the ipsilateral and contralateral of the MDX ipsilateral+ placebo group; **I** and **L**, the ipsilateral and contralateral of the C57BL/10 ipsilateral+ G-CSF group; **J** and **M**, the ipsilateral and contralateral of the MDX ipsilateral+ G-CSF group. In all experiments: $n=5$. In **A–M**, magnification, $\times 200$ (scale bar, $50 \mu\text{m}$). The alpha-motoneurons were quantified in 3 distinct fields along the lumbar intumescence. In **N**, $***p<0.001$ vs. CT, values are means \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0042803.g003

All of the quantitative data are presented as supporting information (Table S2).

Ultrastructural Changes in Spinal Cord Injury after Sciatic Nerve Axotomy and Subsequent Treatment with G-CSF

All of the motoneurons considered for this analysis displayed at least one cholinergic pre-synaptic terminal (type C) in apposition to the neuronal membrane surface. The ultrastructural analysis of the samples from the non lesioned animals revealed a broad and even covering on the membrane surface (Figure 5). However, in MDX mice, some ultrastructural abnormalities were observed concerning the pre-synaptic terminals located in opposition to the spinal alpha-motoneurons. Such ultrastructural changes were found less frequently in the non lesioned MDX mice that were treated with G-CSF. Moreover, the neurons that were affected by the lesion showed changes that indicated chromatolysis, such as a displacement of the nucleus to the periphery of the cell body and a decrease in cytoplasm electron density that was consistent with the

dissolution of Nissl corpuscles. Thin glial projections that were in contact with the postsynaptic membrane were also frequently identified, filling the space between the synaptic terminal and postsynaptic membrane (Figure 6). These structures were identified as astrocytes because of their low electron density.

All of the ultrastructural changes described after axotomy were exacerbated in the MDX mice. A quantitative analysis of the untreated MDX mice showed a reduction in synaptic covering compared with the C57BL/10 mice (Figure 7A). The differences were significant for the ipsilateral/untreated group, resulting in a 21% reduction in synaptic covering in the MDX strain. Among the nonlesioned/untreated and contralateral/untreated specimens, those samples from the MDX mice showed significantly less synaptic covering than the C57BL/10 strain. Additionally, no significant differences were found between groups in the analysis of the nonlesioned/untreated MDX and axotomized contralateral/untreated MDX groups. However, when these two groups were compared with the axotomized ipsilateral/untreated MDX group, a significant

IBA-1

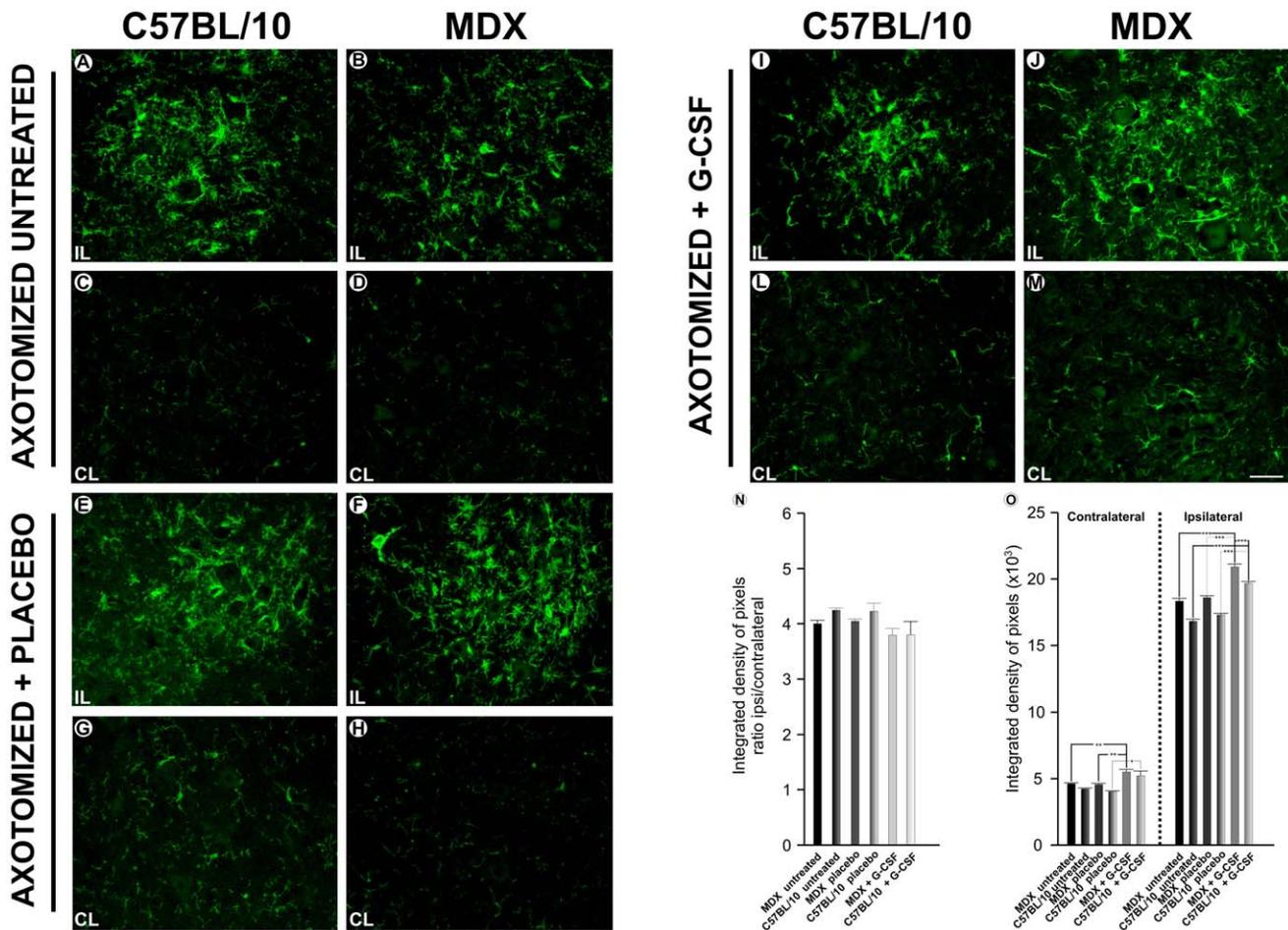


Figure 4. Anti-IBA1 immunostaining one week after axotomy. **A** and **C**, the ipsilateral (IL) and contralateral ventral column of the spinal cord of the C57BL/10 strain seven days after axotomy; **B** and **D**, the ipsilateral and contralateral ventral column of the spinal cord of the MDX seven days after axotomy; **E** and **G**, the ipsilateral and contralateral of the C57BL/10 ipsilateral+ placebo group seven days after the axotomy; **F** and **H**, the ipsilateral and contralateral of the MDX ipsilateral+ placebo group; **I** and **L**, the ipsilateral and contralateral of the C57BL/10 ipsilateral+ G-CSF group; **J** and **M**, the ipsilateral and contra lateral of the MDX ipsilateral+ G-CSF group. In all experiments: n = 5. In **A–M**, magnification, X200 (scale bar, 50 μ m). The alpha-motoneurons were quantified in 3 distinct fields along the lumbar intumescence. In **N**, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. CT, values are means \pm SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0042803.g004

reduction in synaptic covering could be observed along the injured side. Interestingly, an analysis of the G-CSF-treated mice showed important preservation of the synaptic covering at one week after sciatic nerve transection (Table S3).

It is important to emphasize that a significant increase in synaptic covering was also observed in the non lesioned MDX mice that were treated with G-CSF. The same increase in synaptic covering was observed for the C57BL/10 strain.

The quantitative analysis of the F bouton covering (boutons containing flattened vesicles with glycine as the neurotransmitter) revealed a significantly smaller number in both strains after transection of the sciatic nerve. This decrease was more pronounced in the MDX strain than in the C57BL/10 strain (Figure 8A). However, the MDX mice that were treated with G-CSF had a greater number of F presynaptic terminals after axotomy than the untreated mice. An increased covering of F terminals after treatment with G-CSF was also observed in the C57BL/10 strain.

The percentage of S boutons (boutons containing spherical vesicles with glutamate as the neurotransmitter) showed significant differences between the groups. The percentage was lower in the MDX mice than in the C57BL/10 mice (Figure 8B). The analysis of the nonlesioned/untreated and the contralateral/untreated groups showed no significant differences between groups for the MDX strain. This lack of difference was also observed in the same groups of the C57/BL10 strain. However, treatment with G-CSF promoted a significant reduction in the percentage of S boutons in apposition to the neuronal membrane for both strains. All of the numerical data concerning synaptic covering are presented in the supporting information (Table S4).

The number of boutons/100 μ m in apposition to the neuronal membrane in the MDX ipsilateral/untreated group was significantly lower than the C57BL/10 (Figure 7B). However, mice that were treated with G-CSF lost fewer synaptic contacts one week after injury. This preservation of presynaptic boutons in the mice that were treated with G-CSF was more evident when compared

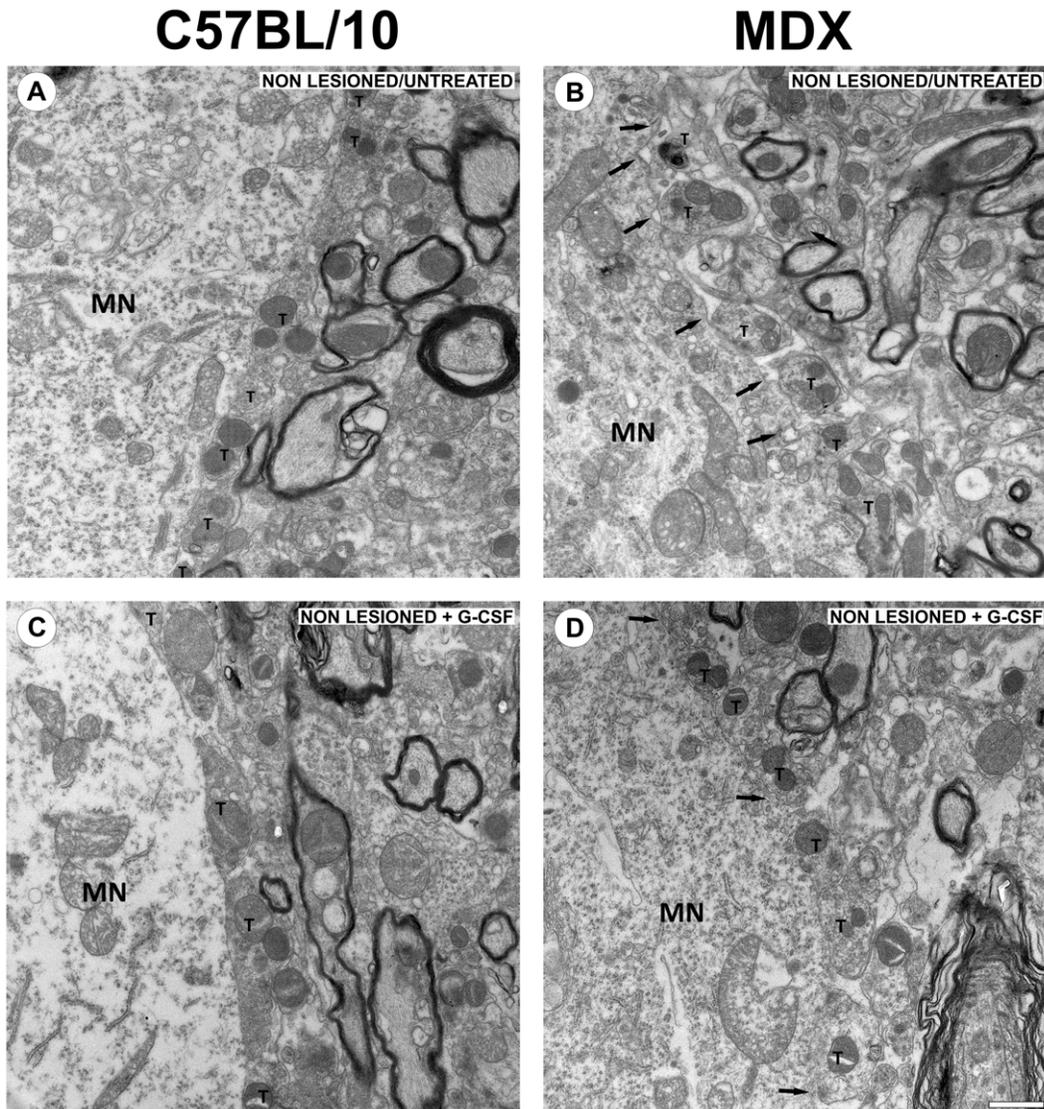


Figure 5. Synaptic covering of non lesioned mice. (A–D) Transmission electron microscopy images. (A) synaptic covering of non lesioned/untreated neuron of the C57BL/10 strain. (B) synaptic covering of non lesioned/untreated neuron of the MDX strain. (C) synaptic covering of non lesioned +G-CSF neuron of the C57BL/10 strain. (D) synaptic covering of non lesioned +G-CSF neuron of the MDX strain. Note some retractions and astrocytic projections (arrows) between the terminals and the membrane of the neuron in Figure B. In all experiments: $n = 5$. In A–D, magnification, $\times 4800$ (scale bar, $1 \mu\text{m}$). In B and D, the arrows indicate that the alpha-motoneurons are partially detached, with a reduced area of apposition. In A–D, T indicates the presynaptic terminals and MN indicates the alpha-motoneuron's cell body.
doi:10.1371/journal.pone.0042803.g005

with untreated mice. In the non lesioned/untreated groups, the axotomized contralateral/untreated side and axotomized contralateral+G-CSF side, a significant reduction in the number of boutons in apposition to the neuronal membrane was observed in the MDX strain compared with the C57BL/10 strain (Figure 7B).

An analysis of the number of F boutons/ $100 \mu\text{m}$ of neuronal membrane in both strains showed a significant difference between the nonlesioned/untreated and contralateral/untreated groups, with a lower number in the MDX mice than in the C57BL/10 mice (Figure S5 - A). However, no significant differences were observed between the MDX ipsilateral/untreated and the C57BL/10 ipsilateral/untreated groups. After treatment with G-CSF, a smaller decrease in F boutons after axotomy was observed. Consequently, a significant increase in the number of F terminals in apposition to the neuronal membrane/ $100 \mu\text{m}$ was observed

for the G-CSF groups compared with the untreated groups (Figure S5–A).

An analysis of the number of S boutons in apposition/ $100 \mu\text{m}$ of neuronal membrane showed a significant reduction between the strains after lesion (Figure S5 - B). For the MDX mice, there was no significant difference between the nonlesioned/untreated mice and the contralateral/untreated mice. However, a comparison between the non lesioned/untreated, axotomized contralateral/untreated side and the axotomized ipsilateral/untreated side showed a significant reduction of S boutons in apposition to the neuronal membrane/ $100 \mu\text{m}$. After treatment with G-CSF, a lower number of S boutons in apposition to the neuronal membrane/ $100 \mu\text{m}$ were observed in the G-CSF group compared with the untreated groups in both strains (Figure S5–B). All of the numerical data concerning the

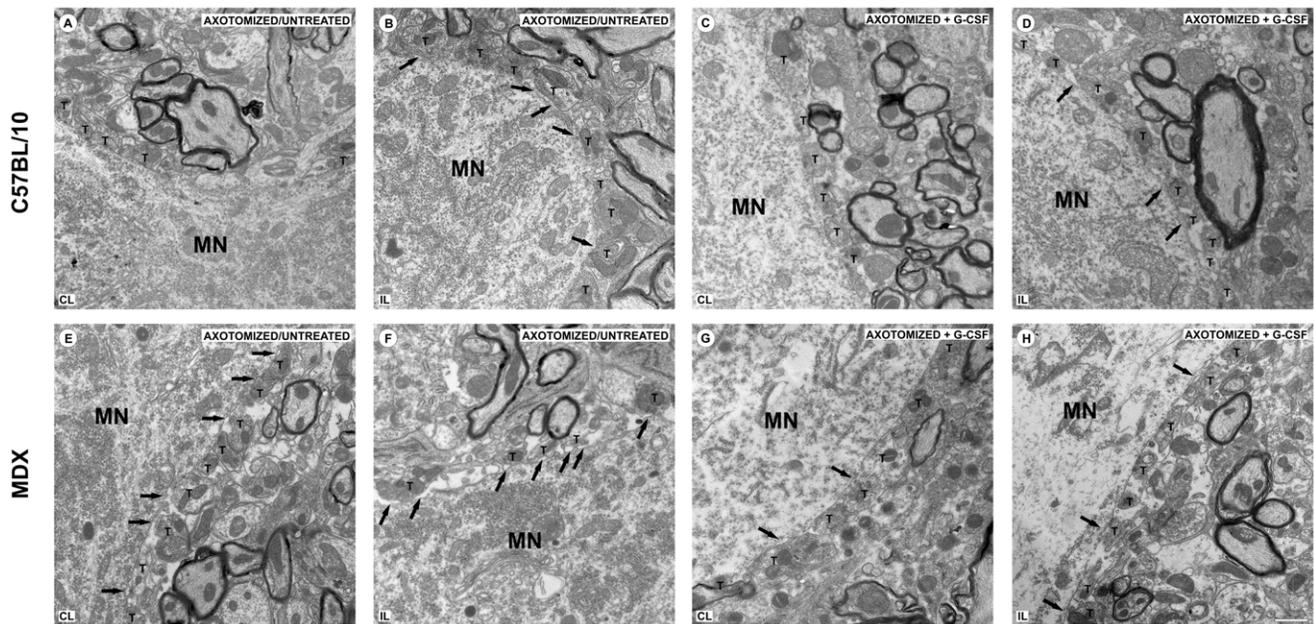


Figure 6. Surface ultrastructure of alpha-motoneurons one week after axotomy. (A–H) Transmission electron microscopy images. (A) synaptic covering of neuron of the C57BL/10 contralateral/untreated group. (B) synaptic covering of neuron of the C57BL/10 ipsilateral/untreated group. The astrocytic retractions and projections in this group express a significant increase compared with the contralateral side of the same strain one week after injury. (C) synaptic covering of neuron of the C57BL/10 contralateral+G-CSF group. (D) synaptic covering of neuron of the C57BL/10 ipsilateral+G-CSF group. (E) synaptic covering of neuron of the MDX contralateral/untreated group. (F) synaptic covering of neuron of the MDX ipsilateral/untreated group. (G) synaptic covering of neuron of the MDX contralateral+ G-CSF group. (H) synaptic covering of neuron of the MDX ipsilateral+ G-CSF group. Note the retraction and gliosis processes exacerbated in the untreated groups. In the groups treated with G-CSF, the retraction processes must be smaller. In all experiments: $n=5$. In A–H, magnification, $\times 4800$ (scale bar, 1 μm). In B–H, the arrows indicate that the alpha-motoneurons are partially detached, with a reduced area of apposition. In A–H, T indicates the presynaptic terminals and MN indicates alpha-motoneurons cell body.
doi:10.1371/journal.pone.0042803.g006

number of boutons/100 μm are presented in the supporting information (Table S5).

The gaps between the clusters of terminals that were located in apposition to the postsynaptic membrane were measured to calculate the frequency of distribution at intervals of 1 μm . This analysis indicated a higher frequency of larger spaces between synaptic terminals in the MDX nonlesioned/untreated and MDX contralateral/untreated groups compared with the C57BL/10 mice. This difference was most evident after axotomy in the untreated MDX mice due to the increased synaptic retraction that occurred. Even with the exacerbated retraction of synaptic boutons, the terminals still remained in small groups, which indicated selectivity in the retraction process. Among the groups that were treated with G-CSF, an increase in the number of spaces between the presynaptic terminals of smaller size was noticed, and a reduction was observed in the number of spaces between the presynaptic terminals of larger size. This pattern was observed in both strains studied, although it was more evident in the MDX animals than in the C57BL/10 animals (Figure S6).

Discussion

Muscular dystrophy is a multifaceted disease that develops in childhood and evolves into paralysis and death. Most of the knowledge about MD focused on the muscular system because this system is the primary target for potential treatments. Few studies have been devoted to a better understanding of the absence of dystrophy in the central nervous system (CNS). The current authors have previously shown that MDX mice displayed significant changes in the spinal cord circuits during the course

of Duchenne muscular dystrophy and that spinal motoneurons were affected [15]. By studying the ultrastructure of the inputs to the alpha-motoneurons, it was possible to show a retrograde loss of inputs similar to the pattern triggered by peripheral nerve lesion. The hypothesis was raised that adjustments occur in the synaptic spinal motoneurons during the process of muscle degeneration/regeneration, thereby promoting a partial disconnection of the peripheral nerve with its target.

The presentation of a lower expression of synaptophysin among the MDX mice indicates that this reduction of synapses in the alpha-motoneurons could be due to a partial disconnection between the motoneuron and the target organ during the cycles of degeneration/regeneration that occur from the second postnatal week. Moreover, in MDX mice, there was a decrease in the number of cells in the corticospinal tract [12]. This decrease in cells could also decrease the number of inputs to the alpha-motoneurons and thus cause a reduction in synaptic covering to the cell bodies. The same authors have also shown changes in the architecture of the corticospinal tract in MDX mice at 3 months of age [12]. These changes were related to a reduction in the size and number of axons. Nevertheless, the number of motoneurons that were retrogradely labeled in the lumbar ventral horn after injections of wheat germ agglutinin in horseradish peroxidase (WGA-HRP) was very similar in the MDX mice and the C57BL/10 mice. Bearing in mind the possible repercussions of the muscle degeneration/regeneration that occurred in the spinal cord microenvironment, the pre-treatment and post-lesion administration of G-CSF has been addressed in this study as a pharmacological strategy to retard the evolution of the disease in the CNS

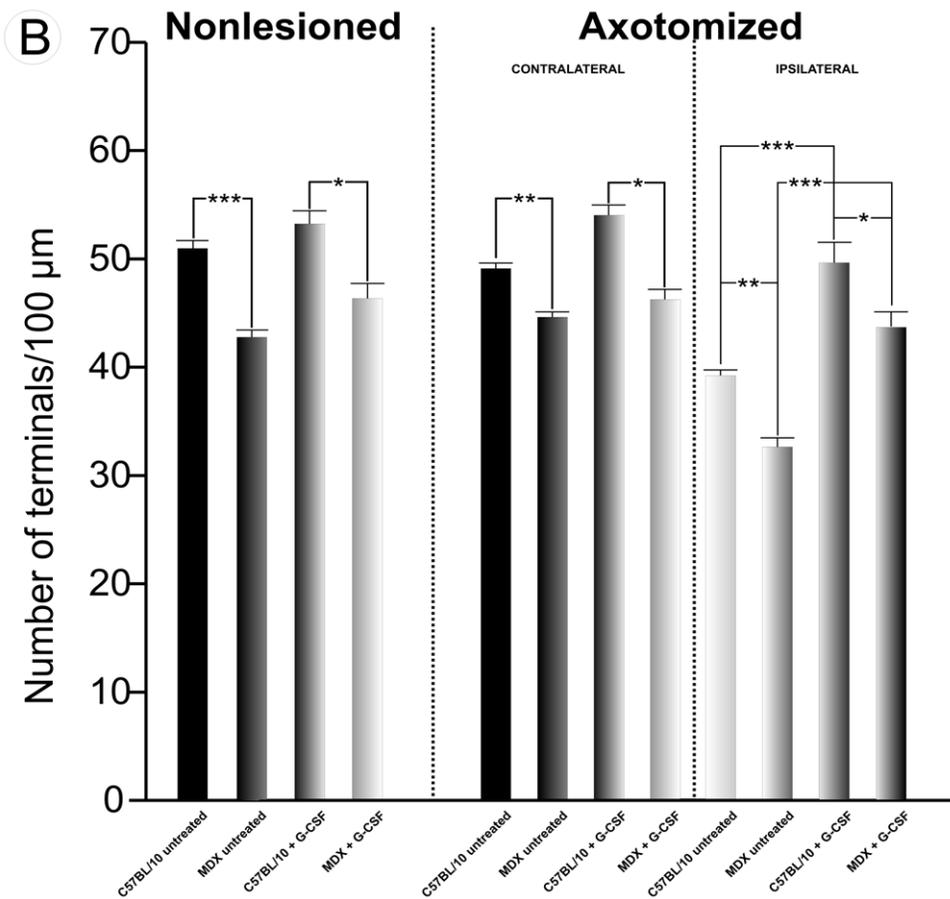
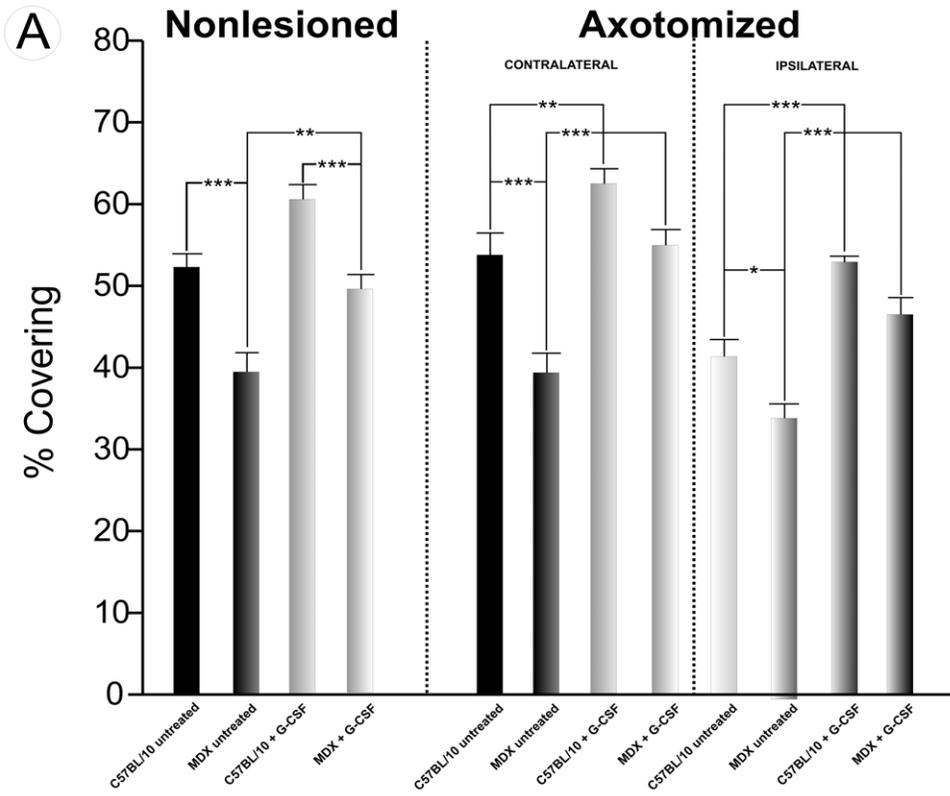


Figure 7. Quantitative analysis. (A) quantitative analysis of the ultrastructure of the synapses showing the percentage of synaptic covering in the non lesioned, ipsilateral and contralateral, untreated and treated with G-CSF groups. (B) quantitative analysis of the ultrastructure of the number of presynaptic terminals in the neuronal membrane apposition/100 μm between the non lesioned, ipsilateral and contralateral, untreated and treated with G-CSF groups. In all experiments: $n = 5$. In A and B, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. CT, values are means \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0042803.g007

and to improve the regenerative potential of the lesioned neurons after axotomy.

The overall distribution of the spinal cord synapses was studied in terms of the expression of synaptophysin. There was reduced immunoreactivity in the MDX strain. The MDX mice showed a significant decrease in the expression of synaptophysin after the lesion, approximately 25% lower compared with the C57BL/10 strain, which indicated a decreased ability to respond to injury. However, the treated group displayed an increased expression of synaptophysin compared with the placebo and untreated groups, and the pattern was more pronounced in the MDX mice than the C57BL/10 mice (an increase of approximately 80% compared with the untreated group and 79% compared with the placebo group). This difference may indicate that the G-CSF treatment is neuroprotective by increasing the synaptic stability in the spinal cord and partially counteracting the deleterious effects of the disease. The effectiveness of G-CSF may also be related to the expression of its receptor by spinal neurons, which are the primary targets of such cytokines in the CNS [50].

As demonstrated after nerve injury, MHC I plays a key role in the selective stabilization of inhibitory synapses and contributes to the specificity of the input rearrangement [15,51–53]. SABHA et al. [54] correlated the increased expression of MHC I with the intensification of the synaptic elimination process after seven days of peripheral axotomy in the spinal cord microenvironment. This correlation appeared to be valid in the present work, although the MDX mice presented a lower expression of MHC I than the C57BL/10 mice. Thus, stimulating increased levels of the MHC I molecule in MDX mice via treatment with G-CSF may be a strategy to improve the animals' response to injury and to increase the stability of the synapses in the spinal cord during the course of the disease. The results herein indicate a way to improve the response to injury in MDX mice, reinforcing the idea that pharmacological treatments may delay worsening of the disease and preserve the motor network.

The ultrastructural analysis was consistent with the results discussed above in that the alpha-motoneurons showed synaptic loss in the untreated MDX. The G-CSF treatment reduced such a loss and also decreased the elimination of terminals after axotomy. A quantitative analysis of the synaptic covering for each type of presynaptic terminal revealed that there was a significant decrease in inhibitory (F type) and excitatory (S type) terminals in the MDX untreated groups (non lesioned, contralateral and ipsilateral). Keeping in mind the differences between the groups, a difference was identified in the covering for the F and S terminals before and after axotomy, such that the S type was the most affected type. In mice that were treated with G-CSF, an increased percentage of F-type terminal covering was observed (approximately 70% for the ipsilateral group). A significant reduction in the percentage covering of S-type terminals was observed after the peripheral axotomy (approximately 11% for a). Such results indicate that treatment with G-CSF may be able to promote a selective synaptic elimination process with a preference for the maintenance of F-type synaptic contacts. This preference may lead to neuroprotection because excitotoxicity is avoided due to most of the glutamatergic terminals being retracted from the motoneuron cell bodies. This result is in line with previous data [51,55].

In addition to the prevention of excitotoxicity, the amount of presynaptic terminals/100 μm in apposition to the neuronal membrane was also increased in the MDX mice after G-CSF treatment. Therefore, we suggest that the pretreatment with G-CSF provided neuroprotection to the spinal cord microenvironment during the course of Duchenne muscular dystrophy. This protective effect was reflected in the preservation of spinal cord motoneuron circuits and in the reduction of the number of partially retracted synapses.

The expression of GFAP and IBA-1 demonstrated that glial reactivity was further enhanced in MDX mice than in the control animals. Surprisingly, the treatment with G-CSF increased the immunolabeling of positive astrocytes for GFAP and IBA-1 for microglial cells, which possibly indicated a higher

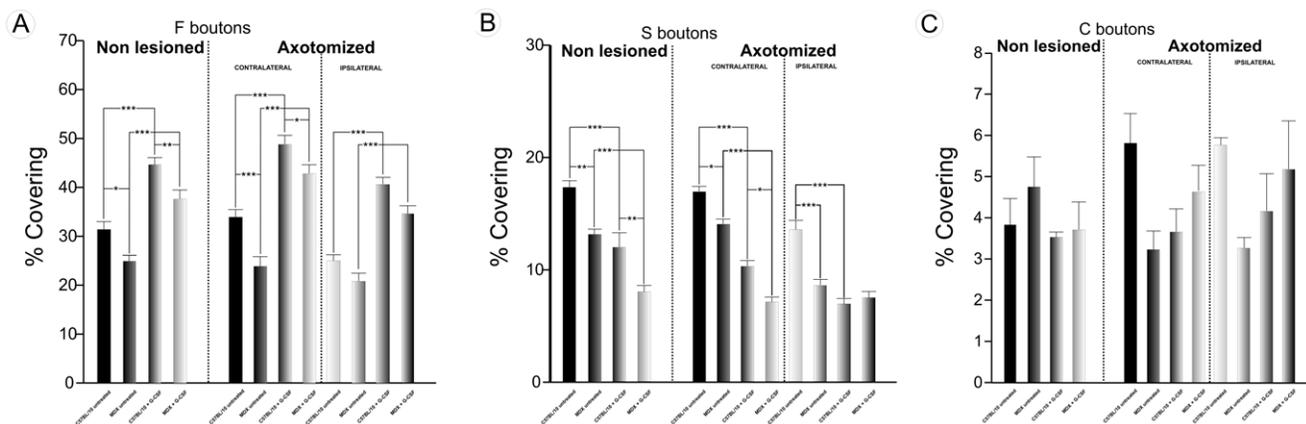


Figure 8. Quantitative analysis. Representation of ultrastructural quantitative analysis of the synaptic covering percentage. (A) quantitative analysis of the synaptic covering percentage of F terminals. (B) quantitative analysis of the synaptic covering percentage of S terminals. (C) quantitative analysis of the synaptic covering percentage of C terminals. In all experiments: $n = 5$. In A and B, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. CT, values are means \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0042803.g008

astrogliosis and immunity response showed by the activated microglia. Although astrocytes and microglia may play a negative role on synaptic plasticity and neuronal regeneration [56,57], new evidences opposing such ideas have been demonstrated. Recent studies have shown that astrocytes may develop a positive role during nervous system regeneration [58]. Among such effects, neuroprotection [59], reestablishment of the blood-brain barrier [60,61], uptake of K⁺ [62,63], and regulation of glutamate levels [64] may be highlighted. Additionally, the production and release of important antioxidant factors [65–70] and the secretion of neurotrophic factors [71] are also of great importance. Therefore, astroglial reactivity, which was stimulated by the G-CSF treatment, may play a key role in the reorganization of the neuronal microenvironment surrounding the motoneurons, especially in MDX mice. Similarly, recent studies showed that microglia also synthesize and release neurotrophic factors after injury to the CNS by developing a role in repair and contributing to the regenerative process in the CNS [72–74]. CULHEIM and THAMS [75] suggested that microglia and MHC I expression play an important role in the removal synaptic terminals after nerve axotomy. Our results indicate that treatment with G-CSF stimulates the glial reaction without an exacerbation of synaptic loss. This pattern may be interpreted as the reactive glia being driven towards a neuroprotective role by contributing to the stability of the surrounding microenvironment of the motoneurons.

Taken together, the present data indicate that the G-CSF treatment is neuroprotective, acting at the spinal cord level and increasing the stability of F-type terminals. The MDX mice displayed a close-to-normal synaptic plasticity in response to injury after the G-CSF administration. Overall, our data suggest that such an immunomodulatory drug may contribute to delaying the course of DMD by preserving the spinal cord microenvironment.

Supporting Information

Figure S1 Anti-MHC I immunostaining on non lesioned mice. **A**, the ventral column of the spinal cord of the C57BL/10 strain without treatment; **B**, ventral column of the spinal cord of the MDX strain without treatment; **C**, the ventral column of the spinal cord of the C57BL/10 strain treated with G-CSF; **D**, ventral column of the spinal cord of the MDX strain treated with G-CSF. In all experiments: n = 5. In **A–D**, magnification, X200 (scale bar, 50 μm). (TIF)

Figure S2 Anti-synaptophysin immunostaining on non lesioned mice. **A**, the ventral column of the spinal cord of the C57BL/10 strain without treatment; **B**, the ventral column of the spinal cord of the MDX strain without treatment; **C**, the ventral column of the spinal cord of the C57BL/10 strain treated with G-CSF; **D**, the ventral column of the spinal cord of the MDX strain treated with G-CSF. **E**, quantitative analysis of the integrated density of pixels between the right and left sides. The circled areas show the motor nucleus of the sciatic nerve and alpha-motoneurons of each lineage. In all experiments: n = 5. In **A–M**, magnification, X200 (scale bar, 50 μm). The alpha-motoneurons were quantified in 3 distinct fields along the lumbar intumescence. In **E**, **p<0.01 vs. CT, values are means ± SEM. (TIF)

Figure S3 Anti-GFAP immunostaining on non lesioned mice. **A**, the ventral column of the spinal cord of the C57BL/10

strain without treatment; **B**, ventral column of the spinal cord of the MDX strain without treatment; **C**, the ventral column of the spinal cord of the C57BL/10 strain treated with G-CSF; **D**, ventral column of the spinal cord of the MDX strain treated with G-CSF. **E**, quantitative analysis of the integrated density of pixels between the right and left sides. In all experiments: n = 5. In **A–D**, magnification, X200 (scale bar, 50 μm). The alpha-motoneurons were quantified in 3 distinct fields along the lumbar intumescence. In **E**, ***p<0.001 vs. CT, values are means ± SEM. (TIF)

Figure S4 Anti-IBA1 immunostaining on non lesioned mice. **A**, the ventral column of the spinal cord of the C57BL/10 strain without treatment; **B**, ventral column of the spinal cord of the MDX strain without treatment; **C**, the ventral column of the spinal cord of the C57BL/10 strain treated with G-CSF; **D**, the ventral column of the spinal cord of the MDX strain treated with G-CSF. **E**, quantitative analysis of the integrated density of pixels between the right and left sides. In all experiments: n = 5. In **A–D**, magnification, X200 (scale bar, 50 μm). The alpha-motoneurons were quantified in 3 distinct fields along the lumbar intumescence. In **E**, p>0.05 vs. CT, values are means ± SEM. (TIF)

Figure S5 Synapse quantitative analysis. Representation of the ultrastructural quantitative analysis of the number of presynaptic terminals in neuronal membrane apposition/100 μm. **(A)** quantitative analysis of the number of F terminals in neuronal membrane apposition/100 μm. **(B)** quantitative analysis of the number of S terminals in neuronal membrane apposition/100 μm. **(C)** quantitative analysis of the number of C terminals in neuronal membrane apposition/100 μm. In all experiments: n = 5. In **A**, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0.001 vs. CT. In **B**, **p<0.01, ***p<0.001 vs. CT, values are means ± SEM. (TIF)

Figure S6 Frequency distribution (in microns) of the spaces between the synaptic terminals retracted along the membrane surface of the motoneurons. **(A)** C57Bl/10 non lesioned/untreated. **(B)** MDX non lesioned/untreated. **(C)** C57Bl/10 non lesioned+G-CSF. **(D)** MDX non lesioned+G-CSF. **(E)** C57Bl/10 contralateral/non lesioned. **(F)** MDX contralateral/non lesioned. **(G)** C57Bl/10 contralateral+G-CSF. **(H)** MDX contralateral+G-CSF. **(I)** C57Bl/10 ipsilateral/non lesioned. **(J)** MDX ipsilateral/non lesioned. **(L)** C57Bl/10 ipsilateral+G-CSF. **(M)** MDX ipsilateral+G-CSF. In all experiments: n = 5. In **A–M**, values are means ± SEM. (TIF)

Table S1 MHC I and synaptophysin immunolabeling quantification in non lesioned, untreated, placebo and treated with G-CSF groups. The data represent the mean value of the integrated density of pixels measured ± SEM. The different letters in each column represent the significant differences among the experimental groups. (DOCX)

Table S2 GFAP I and IBA 1 immunolabeling quantification in non lesioned, untreated, placebo and treated with G-CSF groups. The data represent the mean value of the integrated density of pixels measured ± SEM. The different letters in each column represent the significant differences among the experimental groups. (DOCX)

Table S3 Transmission electron microscopy quantification for the percentage of covering and number of

boutons/100 μm in non lesioned, untreated, placebo and treated with G-CSF groups. The data represent the mean value of the percentage covering and the number of boutons/100 μm \pm SEM. The different letters in each column represent the significant differences among the experimental groups.
(DOCX)

Table S4 Transmission electron microscopy quantification for the percentage of F, S and C boutons' covering in non lesioned, untreated, placebo and treated with G-CSF groups. The data represent the mean value of the percentage covering \pm SEM. The different letters in each column represent the significant differences among the experimental groups.
(DOCX)

References

- Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ (1984) X-chromosome linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 81: 1189–1192.
- Tanabe Y, Esaki K, Nomura T (1986) Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. *Acta Neuropathologica* 69, 91–95.
- Torres LF, Duchon LW (1987) The mutant *mdx*: inherited myopathy in the mouse. *Morphological studies of nerves, muscles and end-plates*. *Brain*. Pt 2: 269–99.
- Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51: 919–928.
- Ryder-Cook AL, Sicinski P, Thomas K, Davies KE, Worton RG, et al. (1988) Localization of the *mdx* mutation within the mouse dystrophin gene. *The EMBO Journal*, 7(10): 3017–3021.
- Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, et al. (1989) The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation. *Science*; 244(4912): 1578–80.
- Lefaucheur JP, Pastoret C, Sebille A (1995) Phenotype of dystrophinopathy in old *mdx* mice. *Anat Rec*. 242(1): 70–76.
- Pastoret C, Sebille A (1995) MDX mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *Journal of Neurological Sciences*, 129: 97–105.
- Nonaka I (1998) Animals models of muscular dystrophies. *Laboratory Anim. Sci.* 48: 8–16.
- Lagrotta-Candido J, Vasconcellos R, Cavalcanti M, Bozza M, Savino W, et al. (2002) Resolution of skeletal muscle inflammation in *mdx* dystrophic mouse is accompanied by increased immunoglobulin and interferon-gamma production. *Int. J. Exp. Path.*, 83: 121–132.
- Lidov HG, Byers TJ, Kunkel LM (1993) The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: an immunocytochemical study. *Neuroscience*, 54: 167–187.
- Sbriccoli A, Santarelli M, Carreta D, Pinto F, Granato A, et al. (1995) Architectural changes of the cortico-spinal system in the dystrophin defective *mdx* mice. *Neuroscience Letters*, 200: 53–56.
- Carreta D, Santarelli M, Vanni D, Carrai R, Sbriccoli A, et al. (2001) The organization of spinal projecting brainstem neurons in an animal model of muscular dystrophy: A retrograde tracing study on *mdx* mutant mice. *Brain Research*, 895: 213–222.
- Daoud F, Candelario-Martínez A, Billard J-M, Avital A, Khelfaoui M, et al. (2009) Role of Mental Retardation-Associated Dystrophin-Gene Product Dp71 in Excitatory Synapse Organization, Synaptic Plasticity and Behavioral Functions. *PLoS ONE* 4(8): e65
- Simões GF, Oliveira ALR (2010) Alpha motoneuron input changes in dystrophic MDX mice after sciatic nerve transection. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 36 (1): 55–70.
- Wong BL, Christopher C (2002) Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal. *J Child Neurol.*, 17(3): 183–90.
- Konishi Y, Chui DH, Hirose H, Kunishita T, Tabira T (1993) Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res.*; 609(12): 29–35.
- Schneider A, Wysocki R, Pitzer C, Krüger C, Laage R, et al. (2006) An extended window of opportunity for G-CSF treatment in cerebral ischemia. *BMC Biol.*; 4: 36.
- Schäbitz WR, Kollmar R, Schwanninger M, Juetler E, Bardutzky J, et al. (2003) Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke*; 34(3): 745–51.
- Meuer K, Pitzer C, Teismann P, Krüger C, Goricke B, et al. (2006) Granulocyte-colony stimulating factor is neuroprotective in a model of Parkinson's disease. *J Neurochem.*; 97(3): 675–686.

Table S5 Transmission electron microscopy quantification for the number of boutons/100 μm of F, S and C boutons' covering in non lesioned, untreated, placebo and treated with G-CSF groups. The data represent the mean value of the number of boutons/100 μm \pm SEM. The different letters in each column represent the significant differences among the experimental groups.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Dr. Renata Graciele Zanon for the thoughtful discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ALRO. Performed the experiments: GFS. Analyzed the data: ALRO GFS. Wrote the paper: ALRO GFS.

- Solaroglu I, Cahill J, Jadhav V, Zhang JH (2006) A novel neuroprotectant granulocyte-colony stimulating factor. *Stroke*; 37(4): 1123–8.
- Henriques A, Pitzer C, Dupuis L, Schneider A (2010) G-CSF protects motoneurons against axotomy-induced apoptotic death in neonatal mice. *MC Neuroscience*; 11: 25
- Lee ST, Chu K, Jung KH, Ko SY, Kim EH, et al. (2005) Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Res.*; 1058(1–2): 120–8.
- Ohki Y, Heissig B, Sato Y, Akiyama H, Zhu Z, et al. (2005) Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *FASEB J.*; 19(14): 2005–7.
- Takagi Y, Omura T, Yoshiyama M, Matsumoto R, Enomoto S, et al. (2005) Granulocyte-colony stimulating factor augments neovascularization induced by bone marrow transplantation in rat hindlimb ischemia. *J Pharmacol Sci.*; 99(1): 45–51.
- Görgen I, Hartung T, Leist M, Niehörster M, Tiegs G, et al. (1992) Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor- α . *J Immunol.*; 149(3): 918–24.
- Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Ioculano M, et al. (1997) The effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor on vascular dysfunction and splanchnic ischaemia-reperfusion injury. *Br J Pharmacol.*; 120(2): 333–9.
- Hartung T (1998) Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol.*; 5(3): 221–5.
- Heard SO, Fink MP (1999) Counterregulatory control of the acute inflammatory response: granulocyte colony-stimulating factor has anti-inflammatory properties. *Crit Care Med.*; 27(5): 1019–21.
- Pitzer C, Krüger C, Plass C, Kirsch F, Dittgen T (2008) Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*; 131, 3335–3347.
- Schneider A, Kuhn HG, Schäbitz WR (2005) A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle*; 4(12): 1753–7.
- Jung KH, Chu K, Lee ST, Kang L, Kim SU, et al. (2006) G-CSF protects human cerebral hybrid neurons against in vitro ischemia. *Neurosci Lett.*; 394(3): 168–73.
- Kawada H, Takizawa S, Takanashi T, Morita Y, Fujita J, et al. (2006) Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation*; 113(5): 701–10.
- Begley CG, Lopez AF, Nicola NA, Warren DJ, Vadas MA, et al. (1986) Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. *Blood*; 68(1): 162–6.
- Burgess AW, Metcalf D (1980) Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. *Int J Cancer*; 26(5): 647–54.
- Dong F, Dale DC, Bonilla MA, Freedman M, Fasth A, et al. (1997) Mutations in the granulocyte colony-stimulating factor receptor gene in patients with severe congenital neutropenia. *Leukemia*; 11(1): 120–5.
- Ward AC (2007) The role of the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSF-R) in disease. *Front Biosci.*; 1(12): 608–18.
- Welte K, Platzer E, Lu L, Gabrilove JL, Levi E, et al. (1985) Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 82(5): 1526–30.
- Hu B, Yasui K (1997) Effects of colony-stimulating factors (CSFs) on neutrophil apoptosis: possible roles at inflammation site. *Int J Hematol.*; 66(2): 179–88.

40. Henriques A, Pitzer C, Dupuis L, Schneider A (2010) G-CSF protects motoneurons against axotomy induced apoptotic death in neonatal mice. *BMC Neuroscience* 2010, 11: 25.
41. Koda M, Nishio Y, Kamada T, Someya Y, Okawa A, et al. (2007) Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res.*; 1149: 223–31.
42. Nishio Y, Koda M, Kamada T, Someya Y, Kadota R, et al. (2007) Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol.*; 66(8): 724–31.
43. Luo J, Zhang HT, Jiang XD, Xue S, Ke YQ (2009) Combination of bone marrow stromal cell transplantation with mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes functional recovery after spinal cord transection. *Acta Neurochir (Wien)*, 151(11): 1483–92.
44. Osada T, Watanabe M, Hasuo A, Imai M, Suyama K, et al. (2010) Efficacy of the coadministration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor in the activation of intrinsic cells after spinal cord injury in mice. *J Neurosurg Spine.*; 13(4): 516–23.
45. Dittgen T, Pitzer C, Plas C, Kirsch F, Vogt G, et al. (2012) Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) improves motor recovery in the rat impactor model for spinal cord injury. *PLoS ONE* 7(1): e29880. doi:10.1371/journal.pone.0029880
46. Sanli AM, Serbes G, Calişkan M, Kaptanoğlu E, Sargon MF, et al. (2010) Effect of granulocyte-colony stimulating factor on spinal cord tissue after experimental contusion injury. *J Clin Neurosci.* (12): 1548–52.
47. Lee JS, Yang CC, Kuo YM, Sze CI, Hsu JY, et al. (2012) Delayed Granulocyte Colony-Stimulating Factor Treatment Promotes Functional Recovery in Rats With Severe Contusive Spinal Cord Injury. *Spine (Phila Pa 1976)*; 37(1): 10–7.
48. Zavala F, Abad S, Ezine S, Taupin V, Masson A, et al. (2002) G-CSF Therapy of Ongoing Experimental Allergic Encephalomyelitis Via Chemokine- and Cytokine-Based Immune Deviation. *J Immunol.* 15; 168(4): 2011–9.
49. 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.
50. Tanaka M, Kikuchi H, Ishizu T, Minohara M, Osoegawa M, et al. (2006) Intrathecal upregulation of granulocyte colony stimulating factor and its neuroprotective actions on motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.*; 65(8): 816–25.
51. Oliveira AL, Thams S, Lidman O, Piehl F, Hökfelt T, et al. (2004) A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *PNAS.* 101(51): 17843–17848.
52. Zanon RG, Oliveira ALR (2006) MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transection. *Experimental Neurology*, 200: 521–531.
53. Emirandetti A, Zanon RG, Sabha MJ, Oliveira ALR (2006). Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. *Brain Research*; 1095: 35–42.
54. Sabha M Jr, Emirandetti A, Cullheim S, Oliveira ALR (2008) MHC I expression and synaptic plasticity in different mice strains after axotomy. *Synapse*, 62: 137–148.
55. Lindä H, Piehl F, Dagerlind A, Verge VM, Arvidsson U, et al. 1992. Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons. *Exp. Brain Res.*; 91: 284–295.
56. Aldskogius H, Liu L, Svensson M (1999) Glial responses to synaptic damage and plasticity. *J Neurosci Res.* 1999; 58(1): 33–41. Review.
57. Emirandetti A, Zanon RG, Sabha M Jr, Oliveira AL (2006) Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. *Brain Res.* 2006; 1095(1): 35–42.
58. Barreto G, White RE, Ouyang Y, Xu L, Giffard RG (2011) Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 11(2): 164–73.
59. Nedergaard M, Dirnagl U (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia.* 2005 (4): 281–6.
60. del Zoppo GJ (2009) Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 158(3): 972–82.
61. Kaur C, Ling EA (2008) Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions *Curr Neurovasc Res.*(1): 71–81
62. Walz W (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int.*; 36(4–5): 291–300.
63. Barreto GE, Gonzalez J, Torres Y, Morales L (2011) Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci Res.* (2): 107–13. Epub 2011 Jun 14.
64. Ouyang YB, Voloboueva LA, Xu LJ, Giffard RG (2007) Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J Neurosci.*; 27(16): 4253–60.
65. Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*; 32(1): 1–14.
66. Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 62(6): 649–71.
67. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem.*; 267(16): 4912–6.
68. Lindenau J, Noack H, Possel H, Asayama K, Wolf G (2000) Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia.* 2000 Jan 1; 29(1): 25–34.
69. Sims NR, Nilsson M, Muyderman H (2004) Mitochondrial glutathione: a modulator of brain cell death. *J Bioenerg Biomembr.* 2004 Aug; 36(4): 329–33
70. Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med.* 2004 Mar; 4(2): 193–205.
71. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.*; 20(12): 570–7.
72. Batchelor PE, Porritt MJ, Martinello P, Parish CL, Liberatore GT, et al. (2002) Macrophages and microglia produce local trophic gradients that stimulate axonal sprouting toward but not beyond the wound edge. *Mol Cell Neurosci.*; 21: 436–53.
73. Streit WJ (2005) Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res.*; 48: 234–9.
74. Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.*; 10: 1387–94.
75. Cullheim S, Thams S (2007) The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Res.*; 55: 89–96.