

Aline Barroso Spejo

**“Regeneração nervosa após esmagamento de raízes
motoras na interface do SNC e SNP e tratamento
com células tronco mesenquimais”**

Campinas, 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Aline Barroso Spejo

“Regeneração nervosa após esmagamento de raízes motoras na interface do SNC e SNP e tratamento com células tronco mesenquimais”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Aline Barroso Spejo</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.


Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Sp32r	<p>Spejo, Aline Barroso, 1988- Regeneração nervosa após esmagamento de raízes motoras na interface do SNC e SNP e tratamento com células tronco mesenquimais / Aline Barroso Spejo. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Sistema nervoso - Regeneração. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Raízes nervosas espinhais. 4. Neuroproteção. 5. Sinapses. 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: Nerve regeneration after crushing of ventral roots at the interface of the CNS and PNS and treatment with mesenchymal stem cells

Palavras-chave em Inglês:

Nervous system - Regeneration

Mesenchymal stem cells

Spinal nerve roots

Neuroprotection

Synapses

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira [Orientador]

Valéria Paula Sassoli Fazan

Renata Graciele Zanon

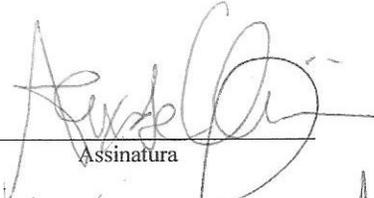
Data da defesa: 27-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 27 de fevereiro de 2013.

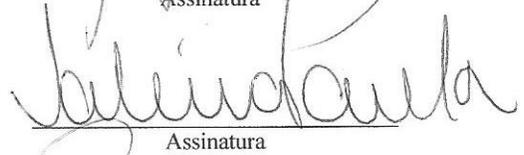
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira Orientador)



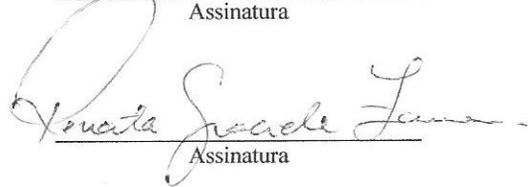
Assinatura

Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan



Assinatura

Profa. Dra. Renata Graciele Zanon



Assinatura

Profa. Dra. Elaine Minatel

Assinatura

Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli

Assinatura

À minha família e namorado Lucas, por tornarem possíveis todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos, tio e avó por todo amor, apoio e paciência;

Ao meu namorado Lucas, por seu amor, carinho, suporte e ajuda;

Ao meu orientador, Prof. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira por todo o aprendizado, apoio e por ter acreditado em meu potencial e ter contribuído para o meu crescimento profissional;

À Amanda Emirandetti, que muito me ajudou na iniciação científica e com certeza contribuiu muito para a minha formação como pesquisadora;

À UNICAMP, por proporcionar o cenário e os profissionais que contribuíram para meu aprendizado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, sua coordenação e à secretária Líliam por toda a ajuda concedida;

Ao CEMIB, por conceder os animais utilizados nesse trabalho;

Aos professores do programa, por todos os ensinamentos;

Aos técnicos do departamento Nori e Marquinho por todo o auxílio;

Ao professor Alfredo Miranda de Goes, sua aluna Juliana Lott Carvalho e à UFMG, pela concessão dos animais GFP e por toda a disponibilidade e auxílio para execução da citometria de fluxo;

Aos amigos do departamento de Anatomia;

Aos amigos do laboratório André, Sheila, Roberta, Camila, Gustavo, Rodrigo, Natália, Luciana, Gabriela, Suzana, Matheus, Gleidy, Kyl, Mateuzinho, Sérgio e Bárbara pela diversão, cafézinhos e também por me auxiliarem e discutirem idéias comigo;

Aos amigos de graduação, que hoje já não tenho mais contato todos os dias, mas que ainda me trazem muita diversão e companherismo;

À Fapesp, pelo apoio financeiro.

Sumário

Lista de abreviaturas _____	11
Lista de figuras _____	13
Lista de tabelas _____	18
Resumo _____	19
Abstract _____	21
1. Introdução _____	23
1.1 - Organização geral do sistema nervoso _____	24
1.2 - Degeneração e regeneração nervosa _____	26
1.3 - Lesão de raízes nervosas motoras _____	30
1.4 - Interface SNC – SNP _____	32
1.5 - Sinapses e plasticidade _____	32
1.6 - Células tronco mesenquimais _____	34
2. Justificativa _____	37

3. Objetivos	39
3.1 - Objetivo geral	40
3.2 - Objetivos específicos	40
4. Materiais e métodos	41
4.1 - Grupos experimentais	42
4.2 - Obtenção das células tronco mesenquimais EGFP	43
4.2.1- Genotipagem de animais EGFP	43
4.2.2 - Extração das células tronco derivadas da medula óssea	45
4.2.3 - Cultura celular primária	46
4.3 - Análise fenotípica das CTM por citometria de fluxo	46
4.4 - Esmagamento das raízes motoras	48
4.5 - Transplante de células tronco mesenquimais	49
4.6 - Eutanásia dos animais	50
4.7 - Imunoistoquímica	50
4.7.1 – Reação de imunoistoquímica	50
4.7.2 - Análise quantitativa dos resultados	52
4.8 - Sobrevivência neuronal	52
4.9 - Avaliação da regeneração do nervo isquiático	53

4.9.1 – Preparação dos espécimes	53
4.9.2 - Morfometria e contagem das fibras mielínicas	54
4.10 - Avaliação da função motora	56
4.11 - Análise estatística	58
5. Resultados	61
5.1 - Caracterização das CTM	62
5.1.1 – Morfologia	62
5.1.2 - Análise fenotípica por citometria de fluxo	63
5.2 - Enxerto e migração das CTM	65
5.3 - Efeito neuroprotetor – sobrevivência neuronal	68
5.4 - Destacamento sináptico	70
5.5 - Balanço sináptico excitatório / inibitório	77
5.5.1 - Terminações nervosas glutamatérgicas – inputs excitatórios	77
5.5.2 - Terminações nervosas GABAérgicas/glicinérgicas – inputs inibitórios	79
5.6 - Regeneração nervosa	82
5.6.1 - Área do nervo isquiático	82
5.6.2 - Quantificação das fibras mielínicas	82
5.6.3 - Parâmetros morfométricos	83

5.7 – Função motora	93
6. Discussão	97
6.1 - CTM e a sobrevivência neuronal	98
6.2 – CTM e a plasticidade sináptica	102
6.3 – CTM, regeneração nervosa e recuperação funcional	104
7. Conclusões	111
8. Referências bibliográficas	113
Comitê de ética	128

Lista de abreviaturas

AAV - Adenovírus associado

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

BSA - Albumina de soro bovino

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CNTF - Fator neurotrófico ciliar

CS – Célula de Schwann

CTM – Células tronco mesenquimais

DAM - Diâmetro dos axônios mielínicos

DF - Diâmetro das fibras mielínicas

DMEM - Meio de Eagle modificado pela Dubelco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EBM - Espessura da bainha de mielina

EGFP - Proteína verde fluorescente potencializada

GAD65 - Glutamato descarboxilase 65KDa

GDNF - Fator neurotrófico derivado da glia

GFAP - Proteína fibrilar ácida glial

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina-1

IL-1 - Interleucina-1

IL-6 - Interleucina-6

iNOS - Enzima óxido nítrico sintase

MAG - Glicoproteína associada à mielina

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

NGF - Fator de crescimento do nervo

NMDA - N-metil-D-aspartato

NT-3 - Neurotrofina-3

OMgp - Glicoproteína da mielina de oligodendrócitos

PB - Tampão fosfato

PBS - Tampão fosfato salino

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PFI - Índice funcional do nervo fibular

PL - Comprimento da pata

RZG - Razão "g"

SFB - Soro fetal bovino

SN - Sistema nervoso

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TS - Largura da pata

VGLUT1 - Transportador vesicular de glutamato-1

Lista de figuras

Figura 1. Genotipagem de ratos Lewis transgênicos EGFP. Observa-se, na imagem de um gel de agarose (ensaio de PCR), a banda com 438 pares de bases relativa ao alelo selvagem e a banda de 129 pares de bases do alelo transgênico EGFP. Na imagem observa-se, na sequência: ladder, “branco” (reação de PCR sem DNA para detectar contaminações), homozigoto positivo, heterozigoto (genótipo utilizado no presente trabalho) e homozigoto negativo.

Figura 2. Imagem mostrando, da esquerda para a direita, respectivamente, as raízes motoras L4, L5 e L6 esmagadas. Os pontos de esmagamento estão evidenciados pelas setas.

Figura 3. Esquema mostrando os três pontos de injeção de CTM ou DMEM na interface da substância branca e cinzenta, na região da lâmina IX, nos segmentos L4, L5 e L6 da medula espinal.

Figura 4. Secção transversal semi-fina de nervo isquiático corado com azul de toluidina e visto sob aumento de 200X no microscópio de luz. Seu perímetro foi circundado, utilizando-se o programa Image Tool, para a determinação da área do mesmo.

Figura 5. Imagem do nervo em aumento de 1000X. **A)** Transformada em preto e branco. **B)** Aplicado o limiar e apagado background e fibras que não apareciam inteiras na imagem original. Barra de escala: 10 μ m.

Figura 6. Impressão da pata do rato, indicando a largura da pata (distância entre o primeiro e o quinto dedo - toe spread, TS) e o comprimento da pata (distância entre o terceiro dedo e o calcanhar - print length, PL). (Figura adaptada de Sarikcioglu et al., 2009)

Figura 7. Cultura de CTM isoladas da medula óssea em quarta passagem. **A)** Microscopia de luz mostrando cultura em aumento de 100X. Barra de escala:100 μ m. **B)** Microscopia de luz mostrando

CTM em detalhe, em 400X. Observa-se morfologia similar e típica das células mesenquimais da medula óssea. Barra de escala: 25µm.

Figura 8. Análise fenotípica das CTM por citometria de fluxo. **A)** Gráfico de distribuição pontual FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade) utilizado para a seleção da população analisada R1. **B-I)** Histogramas de intensidade média de fluorescência (GRN-HLog: green fluorescence) versus número de eventos (counts). **B)** CD90. **C)** CD54. **D)** CD73. **E)** MHCI (RT1A). **F)** CD45. **G)** CD11b/c. **H)** CD34. **I)** MHCII (I-Ad/I-Ed).

Figura 9. Representação gráfica do percentual de células fluorescentes para cada anticorpo analisado dentro da população R1.

Figura 10. A) Visão esquemática da região lombar da medula espinal, mostrando os três sítios de injeção das CTM. **B)** Medula espinal após injeção de CTM. A flecha aponta o sítio de injeção. **C)** Detalhe ampliado do sítio de injeção em microscópio de luz. **D)** Sítio de injeção observado por microscopia de fluorescência. **E)** Detalhe da substância branca com CTM vista ao microscópio de fluorescência. Barra de escala: 50µm.

Figura11. Cortes histológicos da coluna anterior da medula espinal corados com cresil violeta. Efeito neuroprotetor das CTM sobre os motoneurônios, quatro semanas após a lesão. Observa-se a diminuição do número de motoneurônios, os quais apresentam grande corpo celular e. No grupo tratado com CTM há redução na perda destes neurônios. **A, B)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento. **C, D)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + DMEM. **E, F)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + CTM.

Figura 12. Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, quatro semanas após o esmagamento das raízes motoras. O grupo tratado com CTM significativo aumento dasobrevivência neuronal.

Figura13. Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-sinaptofisina, quatro semanas após a lesão. Observa-se, nos grupos esmagamento e esmagamento + DMEM, grande redução na imunorreatividade anti- sinaptofisina, indicando uma pequena cobertura sináptica nestes neurônios. Contudo, não se observam diferenças no padrão da marcação entre estes dois grupos. Já o grupo esmagamento + CTM apresenta menor redução na expressão de sinaptofisina, indicando maior cobertura sináptica nesse grupo em relação aos demais. **A, B)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento. **C, D)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + DMEM. **E, F)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + CTM. Barra de escala = 50µm.

Figura 14. Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica, quatro semanas após a lesão. Observa-se uma significativa redução do processo de eliminação sináptica no grupo tratado com CTM.

Figura15. Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-sinapsina quatro semanas após a lesão. Observa-se nos grupos esmagamento e esmagamento + DMEM grande redução na imunorreatividade para sinapsina, indicando uma pequena cobertura sináptica nestes neurônios. Contudo, não se observam diferenças no padrão da marcação entre estes dois grupos. Já o grupo esmagamento + CTM apresenta menor redução na expressão de sinapsina, indicando uma maior cobertura sináptica nesse grupo em relação aos demais. **A, B)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento. **C, D)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + DMEM. **E, F)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + CTM. Barra de escala = 50µm.

Figura 16. Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica, quatro semanas após a lesão. Observa-se uma significativa redução do processo de eliminação sináptica no grupo tratado com CTM.

Figura 17. Análise imunistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-VGLUT1, quatro semanas após a lesão. Observa-se em todos os grupos, grande redução na expressão de VGLUT1. Não se observa diferenças no padrão da marcação entre os três grupos. **A, B)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento. **C, D)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + DMEM. **E, F)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + CTM. Barra de escala = 50µm.

Figura 18. Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica por terminações glutamatérgicas, quatro semanas após a lesão. Não há diferença significativa entre os grupos.

Figura 19. Análise imunistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-GAD65, quatro semanas após a lesão. Observa-se maior redução na expressão de GAD65 no lado ipsilateral a lesão nos grupos esmagamento e esmagamento + DMEM, comparado ao grupo esmagamento + CTM, que apresentou menor redução na marcação. **A, B)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento. **C, D)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + DMEM. **E, F)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + CTM. Barra de escala = 50µm.

Figura 20. Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica para terminações GABAérgicas, quatro semanas após a lesão. Observa-se uma maior eliminação sináptica de terminações GABAérgicas nos grupos esmagamento e esmagamento + DMEM, comparativamente ao grupo tratado com CTM.

Figura 21. Representação gráfica da área do nervo isquiático, 12 semanas após a lesão. Observa-se uma menor área no grupo tratado com DMEM, em relação ao grupo tratado com CTM.

Figura 22. Número de fibras mielínicas estimadas para o nervo isquiático, 12 semanas após a lesão. O grupo tratado com DMEM apresenta menor número de fibras mielínicas em comparação ao grupo tratado com CTM.

Figura 23. Distribuição de freqüência do diâmetro das fibras (DF) mielínicas nos diferentes grupos experimentais, 12 semanas após a lesão.

Figura 24. Distribuição de freqüência do diâmetro dos axôniosmielínicos (DAM) nos diferentes grupos experimentais, 12 semanas após a lesão.

Figura 25. Distribuição de freqüência da espessura da bainha de mielina (EBM) nos diferentes grupos experimentais, 12 semanas após a lesão.

Figura 26. Distribuição de freqüência da razão “g” (RZG) nos diferentes grupos experimentais, 12 semanas após a lesão.

Figura 27. Vista panorâmica dos nervos observados por microscopia de luz, 12 semanas após a lesão. É possível notar ligeira diminuição do número de fibras mielínicas no grupo tratado com DMEM em relação ao tratado com CTM. Ainda, todos os grupos lesados apresentam maior número de axônios com menor diâmetro e menor mielinização, comparados ao nervo contralateral. Escala: 10 μ m.

Figura 28. Análise da função motora dos animais 12 semanas após a lesão. O comprimento (A) e largura (B) da pata são expressos na forma de razão percentual entre os valores ipsilateral / contralateral à lesão. O gráfico C representa valores do índice funcional do nervo fibular. É possível observar diferença significativa entre os grupos tratados com DMEM e com CTM, na quarta semana, quanto à largura da pata e índice funcional do nervo fibular.

Figura 29. Análise da função motora dos animais 12 semanas após a lesão. Representação gráfica dos valores da razão ipsi/contralateral, referente a pressão máxima exercida pela pata.

Figura 30. Análise da função motora dos animais 12 semanas após a lesão. Representação gráfica da razão ipsi/contralateral referente ao comprimento da passada.

Lista de tabelas

Tabela 1. Grupos experimentais e tempos de sobrevivência após o esmagamento das raízes motoras e técnicas utilizadas em cada grupo, bem como o objetivo de estudo de cada uma delas.

Tabela 2. Primers utilizados no PCR realizado para genotipar animais da linhagem EGFP.

Tabela 3. Anticorpos primários usados no ensaio de citometria de fluxo para caracterização das CTM. Cada anticorpo é seguido pelo fornecedor, animal hospedeiro, código do produto e concentração utilizada.

Tabela 4. Anticorpos primários usados no ensaio de imunohistoquímica. Cada anticorpo é seguido pelo fornecedor, animal hospedeiro, código do produto e concentração utilizada.

RESUMO

Estudos recentes mostram resultados promissores no tratamento de lesões ao sistema nervoso (SN) através do implante de células-tronco, atribuindo essa melhora funcional à produção de fatores tróficos pelas células. Neste trabalho, o efeito neuroprotetor e neuroregenerativo de células-tronco mesenquimais (CTM) de ratos Lewis-EGFP foi investigado após o esmagamento das raízes motoras L4, L5 e L6. Cinco ratas fêmeas Lewis foram utilizadas em cada um dos seguintes grupos: G1 - esmagamento de raízes motoras; G2 - esmagamento de raízes motoras e injeção de DMEM (Meio de Eagle modificado pela Dubelco) na interface da substância branca e cinzenta (funículo lateral); G3 - esmagamento de raízes motoras e injeção de CTM (funículo lateral). Após 4 semanas, a sobrevivência neuronal foi estudada por coloração de Nissl, onde se observou, a partir da contagem neuronal, aumento da sobrevivência no grupo tratado com CTM. A técnica de imunistoquímica foi utilizada para avaliar a expressão de sinaptofisina, sinapsina, VGLUT1 (Transportador vesicular de glutamato-1) e GAD65 (Glutamato descarboxilase 65KDa). A expressão de sinaptofisina e sinapsina na superfície dos motoneurônios lesionados mostrou uma menor redução de inputs em animais tratados com CTM, sugerindo uma possível redução no processo de eliminação sináptica. Para detectar possíveis mudanças no equilíbrio de inputs excitatórios / inibitórios em oposição ao corpo dos neurônios motores, os anticorpos VGLUT1 (marcador de terminais glutamatérgicos) e GAD 65 (marcador de terminais GABAérgicos) foram utilizados. A redução dos terminais glutamatérgicos foi semelhante em todos os grupos. Enquanto a redução de terminais GABAérgicos ocorreu em maior proporção em G1 e G2, em relação ao grupo tratado com CTM. Os dados indicam que CTM podem proteger os neurônios contra a excitotoxicidade, resultando em menor perda de células. Com sobrevivência de 12 semanas após a lesão, a regeneração nervosa foi avaliada através da análise morfológica do nervo isquiático (área do nervo, número e morfometria de fibras mielínicas) e da recuperação da função motora (*walking track test*). O grupo tratado com DMEM apresentou nervo com menor área e menor número de fibras

mielínicas do que o tratado com CTM, porém, o grupo tratado com células obteve resultados semelhantes ao grupo que sofreu apenas esmagamento. A morfometria revelou fibras com menor mielinização nos três grupos lesionados, em comparação ao nervo contralateral à lesão, porém, para os lados ipsilaterais não houve diferença entre os tratamentos. A função motora apresentou-se melhor no grupo tratado com CTM, quando comparada com o tratado com DMEM, mas não em relação ao grupo que sofreu apenas esmagamento. O efeito das CTM na função motora foi agudo, mostrando eficiência de 4 a 6 semanas após a lesão. Assim, as CTM mostraram efeito neuroprotetor e contribuíram para a regeneração, porém a forma de administração dessas células, através de injeção diretamente na medula, apesar de resultar num maior número de células enxertadas, contribuindo com a sobrevivência dos neurônios, mostrou-se um problema quando avaliada a regeneração e função motora dos animais, indicando a necessidade de desenvolvimento de outras formas de administração.

ABSTRACT

Recent studies have shown promising results in the treatment of nervous system injuries through stem cells implantation, attributing this functional improvement to the production of trophic factors by these cells. In this study, the neuroprotective and neuroregenerative effects of mesenchymal stem cells (MSC) from Lewis-EGFP mice was investigated after crushing the motor roots L4, L5 and L6. Five female rats Lewis were used in each of the following groups: G1 - motor roots crushing; G2 - motor roots crushing and DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) injection in the white/gray matter interface; G3 - motor roots crushing and MSC injection in the white/gray matter interface. At 4 weeks after injury, neuronal survival was evaluated by Nissl staining, and revealed, by the neuronal count, increased survival in the group treated with MSC. The technique of immunohistochemistry was used to evaluate the expression of synaptophysin, synapsin, VGLUT1 (Vesicular Glutamate Transporter-1) and GAD65 (Glutamate decarboxylase 65). The expression of synaptophysin and synapsin on the surface of lesioned motoneurons, showed a smaller decrease of inputs in animals treated with MSC, suggesting a possible reduction in synaptic elimination process. To detect possible changes in the balance of excitatory / inhibitory inputs reaching the cell body of the motoneurons, antibodies for VGLUT1 (marker of glutamatergic terminals) and GAD 65 (marker of GABAergic terminals) were used. The reduction of glutamatergic terminals was similar in all groups. While the reduction of GABAergic terminals was in greater extent in G1 and G2 with respect to the group treated with MSC. The data indicate that MSC can protect neurons against excitotoxicity, resulting in decreased cell loss. With survival of 12 weeks after the injury, nerve regeneration was assessed by morphological analysis of the sciatic nerve (nerve size, number and morphology of myelinated fibers) and motor function recovery (walking track test). The group treated with DMEM showed nerve with smaller area and fewer myelinated fibers than treated with MSC, however, the group treated with cells was not better than the group that only suffered crushing. Morphometry revealed fibers with less myelination in the three

injured groups, compared to the contralateral side, but there was no difference between treatments. Motor function appeared better in MSC-treated group in comparison to the DMEM-treated, but not in relation to the group which only suffered crushing. The effect of MSC in motor function was acute, demonstrating efficiency between 4 to 6 weeks after injury. Thus, the MSC shown to be neuroprotective and contributed to regeneration, but the form of administration of such cells, by direct injection into spinal cord, has to be improved or substituted by another method.

1. Introdução

1.1 - ORGANIZAÇÃO GERAL DO SISTEMA NERVOSO

Levando-se em consideração a organização dos neurônios na substância cinzenta medular, em 1952, Rexed propôs a divisão da mesma em dez lâminas. A lâmina IX contém os núcleos motores, que possuem diferentes dimensões de acordo com o segmento medular, caracterizando o aparecimento das intumescências cervical (inervação dos membros superiores) e lombar (inervação dos membros inferiores), ao longo da medula espinal (Rexed, 1952).

Os motoneurônios constituem um dos grupos de neurônios colinérgicos do SNC. Morfológica e funcionalmente, podem ser de dois tipos: motoneurônios- α que possuem corpo celular com diâmetro de aproximadamente 80-100 μ m, axônio bastante mielinizado e comprimento, no homem, de até 1m, (diretamente responsáveis pela contração muscular – inervação extrafusar) e motoneurônios- γ , que inervam fibras musculares intrafusais (Kandel et al., 2000)

Existem três principais fontes de inputs para motoneurônios- α : células do gânglio da raiz dorsal, motoneurônios superiores provenientes do córtex motor e em maior proporção, interneurônios da medula espinal (excitatórios ou inibitórios) (Bear et al., 2007).

Nos sulcos lateral anterior e posterior da medula, emergem filamentos radiculares, que se unem para formar, respectivamente, as raízes ventral e dorsal, que unidas, darão origem a cada nervo espinal. A raiz ventral é formada por axônios que se originam em motoneurônios situados nas colunas anterior e lateral da medula. Da união da raiz dorsal sensitiva, com a raiz ventral motora, forma-se o tronco do nervo espinal, que funcionalmente é misto. Denomina-se campo radicular motor o território inervado por uma única raiz ventral (Machado, 2000).

Os nervos periféricos apresentam axônios mielínicos e amielínicos, dependendo de suas relações com as células de Schwann (CS). Em um axônio mielínico, que em geral possui um diâmetro maior que 1 μ m, as CS, dispostas sequencialmente, formam ao seu redor uma estrutura tubular denominada bainha de mielina. As CS vizinhas estão separadas umas das outras por intervalos

destituídos de mielina e parcialmente cobertos por digitações laterais do seu citoplasma. Estes espaços são denominados nodos de Ranvier (Landon e Hall, 1976; Peters et al., 1976). Já nos axônios amielínicos, uma CS, através de projeções citoplasmáticas, envolve total ou parcialmente entre 5 a 25 axônios, não havendo a formação da bainha de mielina. Há exceções em que uma CS envolve um único axônio, o que foi observado no nervo renal de camundongos (Fazan et al., 2002). Dessa forma, os axônios amielínicos encontram-se individualmente alocados no interior de sulcos ou canais formados pelas expansões do citoplasma das CS (Peters et al., 1976).

O tecido de sustentação dos nervos é constituído por uma camada fibrosa mais externa de tecido conjuntivo denso, o epineuro, que reveste o nervo e emite septos para seu interior, preenchendo os espaços entre os feixes de fibras nervosas. Cada um desses feixes é revestido por uma bainha de várias camadas de células achatadas, justapostas, o perineuro. As células de bainha perineural unem-se por junções oclusivas, constituindo uma barreira à passagem de muitas macromoléculas e importante mecanismo de defesa contra agentes agressivos. A bainha perineural delimita um espaço preenchido por axônios, cada um envolvido pela bainha de mielina, com sua lâmina basal e um envoltório conjuntivo constituído principalmente por fibras reticulares sintetizadas pelas células de Schwann, chamado endoneuro. As bainhas conjuntivas conferem grande resistência e certa elasticidade aos nervos.

O nervo isquiático do rato se origina dos segmentos espinais L4, L5 e L6. Nenhuma dessas raízes é exclusiva desse nervo. Dá origem a quatro novos ramos, os dois maiores, nervos tibial e fibular, que suprem os compartimentos posterior da coxa e ventral e dorsal da perna e os nervos sural e cutâneo. A porcentagem motora no nervo tibial é de 22% e no fibular 31%, os outros ramos não apresentam componentes motores. O nervo isquiático, a meia altura, é composto por aproximadamente 27.000 axônios, 6% são mielinizados e motores, 23 e 48% são axônios sensitivos mielínicos e amielínicos respectivamente e 23% são axônios simpáticos amielínicos. Este nervo apresenta cerca de 7.800 fibras mielínicas, do qual 4.500 compõem o nervo tibial e 1.900 o nervo

fibular. Deste total de 7.800 fibras mielínicas, 1.600 axônios são motores, aproximadamente 20% (Schmalbruch, 1986).

1.2 - DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA

A fisiopatologia da injúria à medula espinal pode ser considerada em dois níveis: lesões primárias e secundárias. A lesão primária ocorre devido ao trauma físico e mecânico que promove uma destruição focal no tecido nervoso. O subsequente distúrbio funcional, isquemia, dano vascular, excitotoxicidade glutamatérgica, stress oxidativo e inflamação, são consideradas lesões secundárias, que são as responsáveis pela maior parte da morte celular (neuronal e glial) pós-lesão. A cicatriz formada subsequente pode ser considerada causa de lesão terciária (Leal-Filho, 2011).

Os eventos decorrentes da lesão podem ainda ser agrupados em fase aguda, subaguda e crônica.

A fase aguda é marcada por congestão vascular, extravasamento sanguíneo e necrose celular (Schwab e Bartholdi, 1996).

Na fase subaguda, uma série de alterações ocorre no corpo celular do neurônio, denominada cromatólise (Lieberman, 1971). Incluídos neste contexto, estão o edema do corpo celular, o deslocamento do núcleo para a periferia da célula e a dissolução da substância de Nissl, além de alterações na expressão de proteínas estruturais e envolvidas na transmissão sináptica. A perda de conexão do motoneurônio com seu alvo periférico gera interrupção de fornecimento, aos motoneurônios, de fatores neurotróficos produzidos pelo alvo que, juntamente com o trauma vascular, levam à excitotoxicidade, o que drasticamente reduz a sobrevivência dessas células. Quanto mais próxima do SNC a lesão for, mais extensiva é a degeneração de motoneurônios adultos. Assim, o tipo de injúria é de grande importância para a quantidade de células que degeneram.

Como estratégia neuroprotetora, após injúrias ao SN há um aumento na produção de fatores neurotróficos (Taniuchi et al., 1988), substâncias como fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator neurotrófico derivado do cérebro e da glia (BDNF, GDNF) e neurotrofina-3 (NT-3). Porém, os níveis dessas substâncias não são altos o bastante para efetivamente proteger o tecido contra a injúria.

Na medula espinal, a interação entre os motoneurônios e o microambiente medular desempenha uma função crucial para a sobrevivência, regulação do estado funcional e conectividade sináptica dos mesmos (Hamburguer, 1958; Oppenheim, 1991; Huh et al., 2000; Oliveira et al., 2001). A plasticidade do SN faz com que, após uma lesão, ocorra remodelação estrutural e funcional de seus circuitos. Os neurônios axotomizados apresentam uma perda significativa dos inputs, diminuindo ou mesmo abolindo a transmissão sináptica (Purves, 1975; Takata e Nagahama, 1983; Delgado-Garcia et al., 1988). Esse efeito, o qual é mais pronunciado no corpo neuronal, pode se tornar permanente se a reinervação com o órgão alvo não ocorrer (Brannstrom e Kellerth, 1998).

A morte de oligodendrócitos causa a perda de mielina dos axônios, bloqueando a transmissão dos potenciais de ação (Leal-Filho, 2011). Distalmente ao sítio da lesão, os estágios iniciais de degeneração Walleriana produzem fragmentação da mielina, o que ativa células imunes e gliais. Essas células liberam citocinas pró-inflamatórias e secretam moléculas quimioatrativas, que recrutam macrófagos para fagocitar os restos de mielina (Watkins e Maier, 2002). A injúria axonal pode também produzir um descontrole no transporte axonal rápido, produzindo acúmulos de neurofilamentos (Singh et al., 2006).

Ainda na fase subaguda, ocorre uma onda de reatividade de células nervosas (gliose reativa, relativo à astrócito e microglia ativados) e recrutamento de células imunes periféricas devido à quebra da barreira hematoencefálica (Schwab e Bartholdi, 1996). A resposta inflamatória acontece em duas ondas de infiltração de células imunes. A primeira consiste em neutrófilos e a segunda por macrófagos / monócitos. Os neutrófilos infiltram-se nas primeiras horas pós lesão, atingem seu máximo número em

24 horas e desaparecem em 3 dias (Schwab e Bartholdi, 1996). A segunda onda é composta principalmente por monócitos, que após 72 horas se diferenciam em macrófagos, que realizarão a fagocitose dos resíduos de mielina e de restos celulares necróticos e apoptóticos. Ao contrário dos neutrófilos, a ação dos macrófagos é sustentada por longos períodos. Monócitos, macrófagos e neutrófilos, que migram para o local da injúria, produzem citocinas e interleucinas que levam as células imunes responderem à lesão.

Metaloproteases de matriz, enzimas proteolíticas e oxidativas e citocinas pró-inflamatórias que são produzidas por neutrófilos e macrófagos infiltrantes, junto com a microglia residente, induzem um processo reativo de morte celular secundária no tecido que cerca o local original da injúria (Wright et al., 2011). Esse dano secundário se prolonga por dias e semanas após a injúria, o que pode levar a um aumento na cavitação e formação de cistos no centro da lesão, exacerbando a disfunção neurológica (Carlson, 1999; Wright et al., 2011).

A ativação de macrófagos leva à secreção de glutamato, citocinas pró-inflamatórias como IL-1 (interleucina-1), IL6 (interleucina-6) e TNF- α (fator de necrose tumoral α), e ativação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), que promove a síntese de radicais livres, causando a apoptose de neurônios e oligodendrócitos (Leskovar et al., 2000; Satake et al., 2000; Profyris et al., 2004). Paradoxalmente, a inflamação também pode ser uma resposta benéfica após a lesão. A fagocitose por macrófagos de fragmentos de mielina na medula espinal injuriada é essencial para posterior regeneração, uma vez que a mielina é inibidora da regeneração axonal. Macrófagos e microglia ativados também podem potencializar a liberação de substância neuroprotetoras, como CNTF, IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina-1) e neurotrofinas como NGF (fator de crescimento do nervo) e BDNF (Profyris et al., 2004). Além disso, após contribuir na fase aguda, esses fagócitos podem potencializar a regeneração na fase crônica, secretando fatores de sobrevivência neuronal e regeneração.

Os astrócitos produzem e secretam fatores neurotróficos e também degradam e removem proteínas e moléculas que podem ser tóxicas aos neurônios (glutamato em excesso pode tornar a célula excessivamente despolarizada, provocando sua morte por excitotoxicidade) (Leal-Filho, 2011). Participam da reconstrução da barreira hemato-espinal, limitando a infiltração de leucócitos periféricos e ativação da microglia residente, modulam o fluxo sanguíneo pela liberação de vasoconstritores, regulando o diâmetro dos vasos sanguíneos, retiram o excesso de glutamato, produzem antioxidantes como a glutathione, representando uma defesa contra o estresse oxidativo e cercam o local da injúria, impedindo seu espalhamento para áreas não lesadas (Karimi-Abdo Irezaee e Billakanti, 2012). Dessa forma, a reatividade astrogliar parece ser indispensável para minimizar a extensão de lesões à medula espinal nos estágios iniciais da mesma, embora exerça uma função lesiva e anti-regenerativa nos períodos mais crônicos.

Concomitantemente à evolução da degeneração Walleriana, inicia-se a regeneração axonal advinda do coto proximal, em contato com os corpos de neurônios axotomizados. Essa regeneração é considerada um fenômeno altamente complexo, o qual resulta em uma sucessão de eventos expressa de forma cronológica e sincronizada, visando o reajuste do microambiente do nervo e reinervação do órgão alvo (Ide, 1996). O sistema nervoso é dotado de potencial regenerativo após uma lesão, contudo, tal capacidade, é altamente dependente da correta expressão temporal dos diversos fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, bem como da interação entre os axônios em regeneração com as células não neuronais presentes no nervo (Barnes, 1985; Ide, 1996). No microambiente do SNC, contudo, a regeneração axonal é bastante reduzida, sendo impedida pela cicatriz glial que se estabelece após a injúria.

Na fase crônica, como resolução da inflamação anterior, os macrófagos deixam o território da lesão, podendo haver a formação de cistos preenchidos com líquido e começa a formação de uma extensiva cicatriz que circunda tais cavidades (Schwab e Bartholdi, 1996). O ponto final da evolução da cicatriz glial é a migração e proliferação de astrócitos. Estas células aumentam a produção de

proteína ácida fibrilar glial (GFAP), tornam-se hipertróficas e conectam muitos dos seus prolongamentos celulares com processos de células vizinhas, através de junções gap (Profyris et al., 2004). Astrócitos reativos se acumulam na margem da lesão na primeira semana pós-lesão e começam a formar a cicatriz, constituindo a maior parte da cicatriz glial. Uma menor parcela é formada por microglia / macrófagos reativos e fibroblastos meningeais (Schwab e Bartholdi, 1996). A cicatriz representa uma parede que isola o local da lesão primária por delinear a área necrótica, o que previne a disseminação dos eventos fisiopatológicos secundários para áreas intactas (Profyris et al., 2004).

Moléculas que inibem o crescimento dos axônios danificados são expressas nesse local. Essas moléculas podem ser divididas em duas categorias: (1) moléculas inibitórias associadas à mielina, como Nogo-A, MAG (glicoproteína associada à mielina) e OMgp (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos) e (2) moléculas sintetizadas por componentes celulares da cicatriz glial. Neste segundo grupo, apresenta maior importância, o proteoglicano condroitin-sulfato produzido pelos astrócitos reativos. O condroitin-sulfato é conhecido por inibir o crescimento do neurito por se ligar a moléculas promotoras do crescimento, como a laminina, prevenindo a interação dessa molécula com seu receptor integrina do cone de crescimento (Burg et al., 1996; Sanes e Jessell, 2000; Morgenstern et al., 2002; Profyris et al., 2004). Tratamentos com enzimas que digerem condroitin-sulfato (condroitinase ABC, por exemplo), promovem crescimento axonal e recuperação funcional (Bradbury et al., 2002).

1.3 - LESÃO DE RAÍZES NERVOSAS MOTORAS

O esmagamento de raízes nervosas espinais é uma das mais comuns ocorrências resultantes da postura bípede (Goodgold e Eberstein, 1977). As raízes da região lombo-sacral, em especial, podem ser facilmente comprimidas por herniações dos discos intervertebrais, bem como pela presença de tumores.

Na avulsão de raízes motoras, em que ocorre o arrancamento dos filamentos radiculares da superfície da medula espinal, os axônios motores são axotomizados na interface entre o SNC e SNP (Livesey e Fraher, 1992), resultando na perda de 80% das células nervosas lesadas durante a segunda ou terceira semanas após o trauma (Koliatsos et al., 1994). A causa mais comum da avulsão de raízes nervosas são acidentes de motocicleta e severa tração durante partos complicados, resultando em perdas motoras, sensitivas e autônomas da extremidade afetada. Nesses casos, é comum que algumas raízes sofram esmagamento e, muitas vezes, sejam consideradas clinicamente como saudáveis.

Existe uma relação direta entre compressão ou transecção de raiz nervosa e alteração da função neuronal (Yamaguchi et al., 1999; Rothman e Winkelstein, 2007). Após o trauma de raízes nervosas, mudanças axonais indicativas de disfunção e degeneração se iniciam proximal e distalmente à lesão (Kobayashi et al., 2004). A compressão da raiz nervosa resulta em isquemia e formação de edema, extravasamento de fluidos celulares e desencadeia, distalmente à compressão, a degeneração Walleriana (Kobayashi et al., 2004). Hubbard e Winkelstein (2008) demonstraram que a compressão transitória de raiz dorsal cervical é suficiente para interromper proteínas usadas para o transporte axonal em fibras mielinizadas, no interior de raízes comprimidas.

Tanto na avulsão, quanto no esmagamento, ocorre axotomia de todas as fibras, porém, o esmagamento é menos severo, visto que preserva a membrana basal das células de Schwann que circundam as fibras nervosas intactas. Apesar da interrupção do axônio, a preservação dos tubos de membrana basal permite que as células de Schwann provenham vias de orientação para axônios em regeneração (Mazzer et al., 2008; Wong et al., 2011). Embora nervos esmagados mantenham sua continuidade anatômica, regeneram espontaneamente e, por vezes, reinervam seu alvo. Quanto mais demorada a reinervação do alvo, maior a chance de atrofia permanente por denervação. Portanto, acelerar o processo regenerativo é crucial para a obtenção de resultados funcionais satisfatórios. A deterioração funcional, seguida do esmagamento, não se relaciona somente com o componente

axonal, mas também inclui outros elementos importantes, como a isquemia do membro afetado (Wong et al., 2011).

Até onde é de nosso conhecimento, nenhum outro trabalho investigou as conseqüências morfológicas e funcionais do esmagamento de raízes nervosas, embora existam vários que investigaram a avulsão das mesmas.

1.4 - INTERFACE SNC – SNP

A zona de transição entre o SNC e o SNP, presente na emergência dos filamentos radiculares que compõem as raízes nervosas da medula espinal, contém tecido nervoso central e periférico. Os dois tecidos são separados por uma interface irregular, mas claramente definida, que consiste numa superfície de tecido astrocítico, compreendendo o componente central da zona de transição. Centralmente a essa zona, bainhas de mielina são formadas por oligodendrócitos e o tecido de suporte é astrocítico. Periféricamente a ela, as bainhas são formadas por células de Schwann e envoltas em endoneuro. A interface é apenas atravessada por axônios, os mielinizados apresentam um internodo nessa região (Fraher, 1998).

1.5 - SINAPSES E PLASTICIDADE

A sinapse se constitui por um terminal axônico (terminal pré-sináptico) que traz o sinal, uma região na superfície da outra célula, onde é gerado um novo sinal (terminal pós-sináptico) e um espaço muito delgado entre os dois terminais, a fenda sináptica. O terminal pré-sináptico contém vesículas sinápticas com neurotransmissores. Geralmente os neurotransmissores são sintetizados no corpo neuronal e armazenados em vesículas no terminal pré-sináptico, sendo liberados na fenda por exocitose, durante a transmissão do impulso nervoso. Alguns neurotransmissores são sintetizados no

compartimento pré-sináptico, com participação de enzimas e precursores do corpo do neurônio por transporte axonal (Bear et al., 2007)

O principal neurotransmissor excitatório no SNC é o glutamato. Ele se liga a receptores na célula pós-sináptica que podem ser metabotrópicos e ionotrópicos. Neste último caso, podem ser receptores não-NMDA (AMPA e Kainato - canais permeáveis a Na^+ e K^+) e NMDA (canais permeáveis a Ca^{2+} , Na^+ e K^+). A estimulação excessiva do canal do tipo NMDA, por excesso de glutamato (comum durante lesões nervosas), promove exacerbada entrada de íons Ca^{2+} na célula, causando danos ao tecido nervoso, a chamada excitotoxicidade glutamatérgica. Os neurotransmissores inibitórios mais comuns no SNC são GABA e glicina.

Ao contrário do que se supunha até pouco tempo, o SN exibe certo grau de plasticidade, mesmo no adulto. A plasticidade é superior durante o desenvolvimento embrionário, quando se forma um contingente de neurônios supranumerários. Aqueles que não estabelecem sinapses estáveis com outros neurônios são eliminados. Após lesão do SNC, os circuitos neuronais se reorganizam, graças ao brotamento dos prolongamentos dos neurônios, que formam novas sinapses, para substituir ou compensar as perdas pela lesão. Assim, estabelecem-se novas comunicações que, dentro de certos limites, podem restabelecer as atividades funcionais dos circuitos perdidos. Essa propriedade do SN é denominada plasticidade neuronal. O processo regenerativo é controlado por diversos fatores de crescimento produzidos por neurônios, células da glia e por células alvo da atividade dos neurônios, chamadas neurotrofinas.

A plasticidade do SN faz com que, após uma lesão, ocorra remodelação estrutural e funcional de seus circuitos. Uma das modificações mais significativas, após uma lesão que resulte na interrupção do contato entre o motoneurônio e as fibras musculares, é a retração de botões pré-sinápticos presentes na superfície da célula axotomizada (Purves e Lichtman, 1978; Brannstrom e Kellerth, 1998). Os neurônios axotomizados apresentam, no período agudo pós-lesão, uma perda significativa

de inputs diminuindo, ou mesmo cessando temporariamente a transmissão sináptica (Purves, 1975; Takata e Nagahama, 1983; Delgado-Garcia et al., 1988). Ultraestruturalmente, na medula espinal, observa-se redução do número de contatos sinápticos no corpo dos motoneurônios do tipo α e na região proximal de seus dendritos.

No entanto, essa redução sináptica não ocorre de maneira equivalente para todos os tipos de botões sinápticos. Após a axotomia intramedular do funículo anterior da medula, os terminais glutamatérgicos são mais afetados durante a fase de eliminação dos terminais sinápticos. A eliminação preferencial de terminais glutamatérgicos pode ser interpretada como uma forma de se evitar a excitotoxicidade mediada por este neurotransmissor. Assim, há proporcionalmente uma maior eliminação de terminais excitatórios (Lindå et al., 2000; Cullheim et al., 2002; Oliveira et al., 2004). Nesta condição, a célula lesada 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 mesma (Linda et al., 1992; Piehl et al., 1993; Piehl et al., 1998; Linda et al., 2000).

1.6 - CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

As CTM constituem uma pequena população celular da medula óssea, correspondendo a cerca de 0,001 a 0,01% de todas as células nucleadas medulares. Podem ser usadas em transplante autólogo, dispensando uso de imunossupressores, sendo células prontamente disponíveis e de baixo potencial oncogênico.

Tratamentos experimentais com CTM no SN podem ser agrupados em duas estratégias principais, neuroproteção e neuroregeneração. Neuroproteção se refere à inibição da morte de células do tecido danificado, enquanto regeneração se refere ao reparo de axônios danificados ou brotamento de axônios intactos para reinervar os alvos (Azari et al., 2010).

As alterações metabólicas e morfológicas dos motoneurônios lesados podem ser explicadas em parte, pela desconexão entre o corpo celular do neurônio e o órgão alvo, o que leva à interrupção do aporte de fatores neurotróficos para o corpo celular. O efeito neuroprotetor promovido pelas CTM pode estar associado à produção de fatores neurotróficos localmente, capazes de ampliar e promover a regeneração de fibras nervosas no sítio da lesão (Li et al., 2002; Mahmood et al., 2004) e influenciar positivamente na sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica (Hell et al., 2009).

Além do papel neuroprotetor, as CTM são ainda capazes de promover a regeneração de fibras nervosas no sítio da lesão (Li et al., 2002; Mahmood et al., 2004). A expressão de BDNF por CTM se correlaciona com a sua capacidade em promover a sobrevivência e o crescimento de neuritos, em linhagens celulares de neuroblastoma. Entretanto, os efeitos produzidos pelas CTM são apenas parcialmente inibidos pela neutralização do BDNF por anticorpos específicos contra esta proteína, indicando que estas produzem outros fatores que contribuem para a sobrevivência neuronal e regeneração nervosa (Lu et al., 2003; Crigler et al., 2006).

Ao transplantar células-tronco hematopoiéticas para a medula espinal de camundongos que apresentam degeneração motoneuronal (camundongos *mdf -muscle deficient*), houve um aumento da sobrevivência de motoneurônios e conseqüente melhora funcional, apesar destas células apresentarem um fenótipo microglial. Tal fato foi atribuído à produção local de GDNF pelas células hematopoiéticas transplantadas (Cabanés et al., 2007). Adicionalmente, quando células-tronco neurais foram transplantadas para a medula lombar de camundongos com específica perda de motoneurônios (camundongos *pmn- progressive motor neuropathy*), houve um aumento significativo de 56% do tempo de vida destes animais, reforçando tal papel neuroprotetor. Após o transplante, essas células apresentaram-se pequenas e arredondadas e não expressavam nenhum marcador neuronal, sugerindo que permaneceram em um estágio indiferenciado (Ferrer-Alcon et al., 2007). Tal melhora poderia ser atribuída ao fato de que as células-tronco neurais secretam constitutivamente fatores neurotróficos (Lu et al., 2003). Esses resultados são consistentes com outros estudos, demonstrando

que a administração de neurotrofinas reduz a área de infarto após isquemia no SNC (Abe, 2000), induz a regeneração de axônios após lesão da medula espinal (Yan et al., 1992; Ye e Houle, 1997) e diminui a apoptose de interneurônios medulares induzida pela axotomia do nervo isquiático (Oliveira et al., 2002).

No entanto, o grande problema relacionado a estes fatores é o método de administração, uma vez que eles apenas são eficientes se liberados continuamente e no local em que são necessários. Neste contexto, esse trabalho propõe o uso de células tronco mesenquimais, visando a promoção de suporte trófico local, capaz de atenuar a morte aguda dos motoneurônios axotomizados proximalmente. Neste aspecto, o implante de células tronco diretamente na medula espinal promoveu melhora funcional em diferentes modelos experimentais (Chopp et al., 2000; Hofstetter et al., 2002; Cizkova et al., 2007). Porém, ainda há uma grande lacuna entre a melhora funcional e a determinação dos reais mecanismos e efeitos, a longo prazo, envolvidos no transplante das células-tronco no SN.

2. Justificativa

A impossibilidade de reparo eficiente de lesões no SNC é um importante problema médico. Modelos experimentais de lesões têm sido estudados a fim de se entender melhor os mecanismos envolvidos na sobrevivência, regeneração neuronal e na plasticidade sináptica e testar o potencial de diferentes tratamentos, a fim de prevenir as alterações induzidas por tais lesões.

A plasticidade do SN faz com que, após uma lesão, ocorra uma remodelação estrutural e funcional de seus circuitos. Os neurônios axotomizados apresentam, no período agudo pós-lesão, uma perda significativa de inputs, que ocorre em diferentes proporções entre os diferentes tipos de botões sinápticos. Nesse momento, o motoneurônio passa do estado de controlador principal da atividade motora, para um estado em que seu principal objetivo é sobreviver e gerar novos axônios.

Os motoneurônios que sobrevivem ao esmagamento de seu axônio têm potencial regenerativo, porém o retorno funcional, uma vez que a lesão causa grande perda neuronal, demanda estratégias para diminuição da morte celular pós-lesão e incentivo ao crescimento axonal.

Recentemente, uma possibilidade de reparo funcional destas lesões tem sido sugerida através do emprego de células tronco. A possibilidade de se fazer um transplante autólogo, dispensando uso de imunossuppressores, a pronta disponibilidade e o baixo potencial oncogênico, faz das CTM uma das melhores escolhas para terapia celular no momento. Estas propriedades fazem com que tais células sejam uma ferramenta promissora para o tratamento de um amplo espectro de lesões e doenças que são tratadas de formas pouco satisfatórias pelos métodos tradicionais (Wobus e Boheler, 2005). O implante de células tronco diretamente na medula espinal promove uma melhora funcional de animais com lesões no SNC (Chopp et al., 2000; Hofstetter et al., 2002; Cizkova et al., 2007).

Assim, a interação das CTM com o microambiente medular e seus efeitos sobre a sobrevivência, regeneração neuronal e plasticidade sináptica em motoneurônios lesados devem ser investigados, bem como a melhor forma e tempo de administração dessas células. Torna-se importante incluir análises funcionais, uma vez que ainda há uma grande lacuna entre a melhora funcional e a determinação dos reais mecanismos e efeitos, à longo prazo, envolvidos no transplante das células tronco no SN.

3. Objetivos

3.1 - OBJETIVOS GERAIS

Investigar o efeito neuroprotetor e neuroregenerativo de células tronco mesenquimais de medula óssea de animais Lewis (LEW-Tg EGFP F455/Rrrc) sobre motoneurônios alfa medulares em ratos LEW/HsdUnib, submetidos ao esmagamento de raízes motoras, avaliando-se a melhora funcional da marcha, bem como potenciais mecanismos envolvidos nos possíveis efeitos neuroprotetores e neuroregenerativos previamente descritos.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer e caracterizar fenotipicamente as CTM de animais transgênicos para a proteína GFP a serem transplantadas, bem como avaliar o fenótipo das mesmas;

Analisar o impacto do tratamento com CTM após esmagamento de raízes motoras no que diz respeito a:

- sobrevivência neuronal, através de contagem neuronal, por coloração de Nissl;
- cobertura sináptica dos motoneurônios, através da expressão de sinaptofisina e sinapsina, por imunistoquímica;
- cobertura sináptica excitatória / inibitória dos motoneurônios, através da expressão de GAD65 (marcador para terminações pré-sinápticas GABAérgicas) e VGLUT1 (marcador para terminações pré-sinápticas glutamatérgicas);
- regeneração dos axônios no nervo periférico (isquiático), através da análise da área do nervo, contagem de fibras mielínicas e morfometria das mesmas, através de microscópio de luz;
- recuperação funcional dos animais, através do *walking track test* (CatWalk).

4. Material e Métodos

4.1 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para este estudo foram utilizadas fêmeas adultas de ratos LEW/HsdUnib com sete semanas de idade e peso corporal de aproximadamente 150g obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB). Os experimentos foram conduzidos seguindo-se as normas de ética na experimentação animal, tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA - Unicamp, protocolo: 2356-1).

Todos os animais tiveram suas raízes nervosas motoras L4, L5 e L6, na região da intumescência lombar do lado direito, esmagadas por 2 vezes de 10 segundos com pinça número 4 (n=5, por grupo experimental). O lado não esmagado de cada animal foi utilizado como controle interno para análise dos resultados.

Foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

1. Esmagamento das raízes motoras (L4, L5 e L6);
2. Esmagamento das raízes motoras (L4, L5 e L6) e injeção de DMEM na interface da substância branca e cinzenta, na região da lâmina IX;
3. Esmagamento das raízes motoras (L4, L5 e L6) e injeção de células tronco mesenquimais na interface da substância branca e cinzenta, na região da lâmina IX.

As técnicas utilizadas nesse trabalho, bem como os grupos e tempos de sobrevida após a lesão são indicado na tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais e tempos de sobrevivida após o esmagamento das raízes motoras e técnicas utilizadas em cada grupo, bem como o objetivo de estudo de cada uma delas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	SOBREVIDA APÓS LESÃO	TÉCNICA UTILIZADA	OBJETIVO DE ESTUDO
Esmagamento Esmagamento + DMEM Esmagamento + CTM	4 semanas	Imunoistoquímica (sinaptofisina, sinapsina, VGLUT1 e GAD65)	Cobertura sináptica dos motoneurônios medulares
		Coloração de Nissl (contagem neuronal)	Sobrevivência neuronal
	12 semanas	Contagem e morfometria de fibras mielínicas do nervo isquiático por microscopia de luz	Regeneração nervosa
		Walking track test (Catwalk)	Recuperação funcional pós lesão

4.2 - OBTENÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EGFP

4.2.1- Genotipagem de animais EGFP

Visando resultados sem falsos positivos, optamos pelo uso de CTM marcadas endogenamente com EGFP (Proteína verde fluorescente potencializada). Esse traçador é considerado, por inúmeros autores, um marcador de longa vida e confiável para validar terapias celulares, no que diz respeito à traceamento, migração, sobrevivência e diferenciação celular.

As CTM-EGFP foram extraídas a partir de medula óssea de ratos transgênicos isogênicos adquiridos da Universidade de Missouri nos Estados Unidos, da linhagem Lewis, que possuem alterações genéticas caracterizadas pela presença do gene EGFP, provindo da água-viva *Aequorea victoria*, sob controle do promotor ubiquitina C e, portanto, expressam EGFP em todos os seus tecidos (LEW-Tg EGFP F455/Rrrc). A proteína GFP tem sido amplamente adotada para rastreamento de linhagens celulares ou tecidos vivos, congelados ou fixados e é detectada com alta sensibilidade e especificidade, em suspensão celular, por citometria de fluxo e *in situ*, por imunofluorescência.

Esta linhagem transgênica foi cedida pelo Prof. Dr. Alfredo de Miranda Góes, Departamento de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Para a manutenção da linhagem EGFP, por instrução dos fornecedores da linhagem, os cruzamentos foram feitos entre animais heterozigotos. Portanto, a genotipagem dos animais se fez necessária a fim de identificar tais animais, que além de serem a matriz da linhagem, são os animais com o genótipo utilizado para a extração das CTM, por apresentarem fluorescência, porém não tão intensa quanto os homozigotos positivos.

Para a análise do genótipo dos animais LEWIS-EGFP, cada indivíduo com quatro semanas de idade foi identificado e seu DNA extraído seguindo as orientações do Kit para extração de DNA (PureLink Genomic DNA Kits – Invitrogen). Assim, um fragmento da extremidade da cauda foi retirado e colocado em solução de digestão overnight a 55°C. Foi então centrifugado e o precipitado tratado com RNase e, após sucessivas lavagens e tratamentos com tampões específicos, a amostra de DNA genômico foi resfriado a -20°C até o momento do uso.

O PCR (reação em cadeia da polimerase) foi feito seguindo-se as orientações do Kit (Kit RTG-PCR beads – GEHealthcare), onde se adicionou 25ng da amostra de DNA, 10 pM/μL dos 3 primers utilizados (Tabela 2), completando-se com água ultrapura autoclavada até o volume de 25 μL. Em seguida colocou-se os tubos no termociclador (Stratagene Mx3005P, Agilent Technologies) por 3 minutos a 94 °C, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 64 °C, 1 minuto a 72 °C e então esse ciclo foi repetido 34 vezes.

Tabela 2. Primers utilizados no PCR realizado para genotipar animais da linhagem EGFP.

LWS 455 5F	AAC CTC CCA GTC CTT TGA ACG CTA
LWS 455 5R	GGT GCC AAG CCT CAA CTT CTT TGT
U3r-4	ATC AGG GAA GTA GCC TTG TGT GTG

Ao final do PCR, verificou-se o produto da amplificação por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5% para a determinação, segundo o padrão de bandas (Figura 1) do genótipo dos animais.

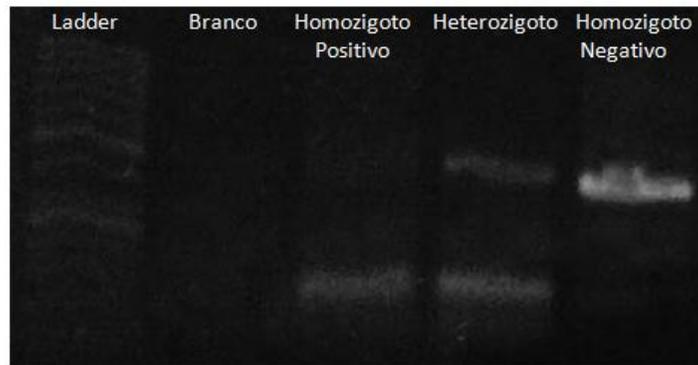


Figura 1. Genotipagem de ratos Lewis transgênicos EGFP. Observa-se, na imagem de um gel de agarose (ensaio de PCR), a banda com 438 pares de bases relativa ao alelo selvagem e a banda de 129 pares de bases do alelo transgênico EGFP. Na imagem observa-se, na sequência: ladder, “branco” (reação de PCR sem DNA, para detectar contaminações), homozigoto positivo, heterozigoto (genótipo utilizado no presente trabalho) e homozigoto negativo.

4.2.2 - Extração das células tronco derivadas da medula óssea

Os animais EGFP heterozigotos com 4 a 6 semanas de vida foram eutanasiados com halotano e tiveram suas tíbias e fêmures extraídos. Em meio estéril, as epífises dos ossos coletados foram cortadas expondo-se a medula óssea, que foi coletada pela centrifugação dos ossos dentro de uma ponteira de 1ml com a ponta cortada, inserida em um tubo falcon de 15ml, no qual a medula óssea precipitou. Após a centrifugação, o precipitado contendo a fração celular foi ressuscitado em meio de cultura basal.

4.2.3 - Cultura celular primária

As células obtidas da medula óssea foram semeadas em frasco para cultura celular T-75 (75 cm²) contendo 10 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e cultivadas em uma estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Nos dois dias subsequentes à extração, cada frasco foi cuidadosamente lavado, várias vezes com tampão fosfato salino (PBS), para remoção de hemácias e células não aderentes. O meio foi trocado a cada 3 dias.

Após duas semanas e sucessivas trocas periódicas do meio, as células não aderentes foram totalmente removidas e as aderentes expandidas obtendo-se, portanto uma cultura homogênea em monocamada.

Células confluentes em quarta passagem foram ressuspensas em DMEM e aplicadas na medula espinal nos animais do grupo experimental “esmagamento + CTM”, após o esmagamento das raízes motoras.

4.3 - ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CTM POR CITOMETRIA DE FLUXO

As CTM foram caracterizadas através da análise da presença das seguintes moléculas de superfície celular: CD90, CD54, CD73 e RT1A (MHC I). Essas proteínas são expressas por células tronco mesenquimais, sendo então utilizadas como “marcadores” positivos destas células (Dominici et al., 2006; Delorme et al., 2007).

Para verificar a existência de contaminações da cultura de células tronco mesenquimais, por células tronco hematopoéticas, também foi analisada a presença da molécula de superfície celular CD45, que é considerada “marcador” positivo destas células. Foram ainda usados como controle negativo os anticorpos para CD11b/c (marcadores de monócitos e macrófagos), CD34 (marcador de

células tronco hematopoiéticas e células endoteliais) e I-Ad/I-Ed (antígenos que correspondem ao MHC II, expressos em linfócitos e células apresentadoras de antígenos).

Para a citometria de fluxo, foram utilizadas CTM na quarta passagem. Após o tratamento com tripsina, aproximadamente 1×10^6 células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com os anticorpos primários citados na Tabela 3.

Tabela 3. Anticorpos primários usados no ensaio de citometria de fluxo para caracterização das CTM. Cada anticorpo é seguido pelo fornecedor, animal hospedeiro, código do produto e concentração utilizada.

Anticorpo	Fornecedor	Hospedeiro	Código do produto	Concentração
CD 90	BD Biosciences	camundongo	554892	1 / 250
CD 54	BD Biosciences	camundongo	554967	1 / 250
CD 73	BD Biosciences	camundongo	551123	1 / 250
RT1A (MHC I)	BD Biosciences	camundongo	554917	1 / 250
CD 45	BD Biosciences	camundongo	555480	1 / 250
CD 11 b/c	BD Biosciences	camundongo	554859	1 / 250
CD 34	Santa Cruz	camundongo	SC7324	1 / 200
I-Ad/I-Ed (MHC II)	BD Biosciences	camundongo	558593	1 / 250

As células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário marcado com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes: A-11001), diluído 1 / 500, por 30 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas em PBS, fixadas em formaldeído 2% e analisadas no citômetro de fluxo (Guava® easyCyte™ 6-2L Flow Cytometer, Millipore, EUA). Como controle negativo de fluorescência, também foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho versus granulocidade para estabelecer a população a ser analisada.

Os experimentos foram realizados em triplicata e um mínimo de 5.000 eventos foram adquiridos, utilizando o programa InCyte (Millipore, EUA). Os dados obtidos foram analisados no programa FlowJo 7.5.6. Primeiramente, a população de células a ser estudada foi delimitada através das regiões definidas no gráfico de tamanho versus granulosidade gerado pela análise de células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação. Posteriormente, utilizamos um gráfico de histograma para delimitar a região do controle negativo de fluorescência, referente às células que foram incubadas apenas com o anticorpo marcado com Alexa. A partir da definição destes parâmetros, iniciamos a análise das células marcadas com os anticorpos primários e secundários.

4.4 - ESMAGAMENTO DAS RAÍZES MOTORAS

Os animais dos três grupos experimentais foram anestesiados (60mg/Kg de quetamina e 10mg/Kg de xilazina) e tricotomizados na região média do dorso. Uma incisão dorsal paralela à coluna vertebral foi realizada na região torácica. A musculatura intrínseca do dorso foi afastada para exposição das vértebras torácicas baixas e lombares. Foi feita a laminectomia de aproximadamente três vértebras para que a intumescência lombar fosse exposta. A dura-máter foi aberta através de incisão longitudinal e, após dissecação do ligamento denticulado, a medula espinal foi cuidadosamente movimentada até que as raízes ventrais associadas à intumescência lombar fossem identificadas. O esmagamento foi realizado nas raízes lombares ventrais, referentes aos segmentos espinais L4, L5 e L6 do lado direito, com o auxílio de uma pinça tipo relojoeiro (№4), como indicado na figura 2. Após os procedimentos cirúrgicos, a musculatura, fáscia e a pele foram suturadas em camadas e os animais mantidos em biotério por um período de 4 (para imunistoquímica e contagem neuronal) ou 12 semanas (para contagem e morfometria de fibras mielínicas e avaliação motora).

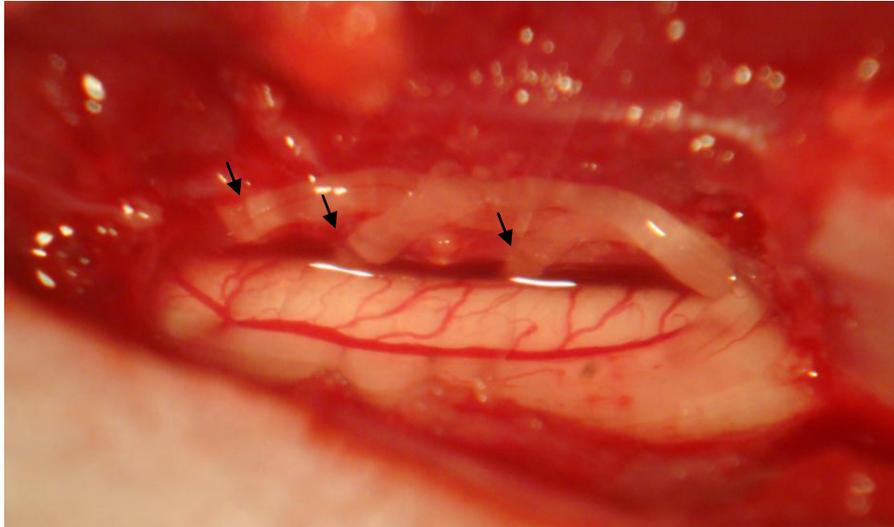


Figura 2. Imagem mostrando, da esquerda para a direita, respectivamente, as raízes motoras L4, L5 e L6 esmagadas. Os pontos de esmagamento estão evidenciados pelas setas.

4.5 - TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

As CTM foram colocadas diretamente na interface da substância branca e cinzenta, na região da lâmina IX nos segmentos L4, L5 e L6 da medula espinal com o auxílio de uma pipeta Pasteur de espessura capilar acoplada a uma seringa de Hamilton, instantes após o esmagamento das raízes motoras, como na figura 3. Foi injetado 1 μ l de suspensão celular em cada um dos três pontos equidistantes ao longo dos segmentos lesionados, somando um total de 3x10⁵ células aplicadas. Em um grupo experimental, o mesmo processo foi realizado, porém com a injeção de DMEM.

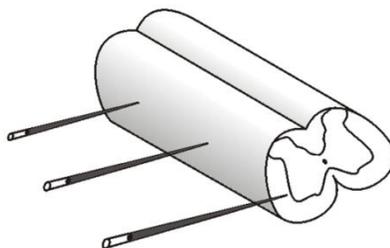


Figura 3. Esquema mostrando os três pontos de injeção de CTM ou DMEM na interface da substância branca e cinzenta, na região da lâmina IX, nos segmentos L4, L5 e L6 da medula espinhal.

4.6 - EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Após o período de sobrevivência pré-determinado, 4 ou 12 semanas, os animais foram eutanasiados. Todos foram anestesiados com uma combinação de Kensol (xilazina 10mg/Kg, Koning, Argentina) e Vetaset (quetamina, 50mg/Kg, Fort Dodge, USA) e, em seguida, submetidos à toracotomia. O sistema vascular foi perfundido transcárdiacamente com tampão fosfato de sódio (pH 7,4). Os próximos passos respeitaram o tipo de técnica empregada na sequência.

4.7 – IMUNOISTOQUÍMICA

4.7.1 – Reação de imunoistoquímica

Após perfusão com salina tamponada, os animais foram perfundidos com formaldeído a 4% em tampão de fosfato de sódio 0,1M; pH 7,4. As intumescências lombares foram dissecadas e pós-fixadas por 12 horas à 4°C. Foram então mantidas em solução de sacarose 10% por 24 horas, sacarose 20% por 24 horas e sacarose 30% por 24 horas. Em seguida, as medulas espinhais foram incluídas em Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e congeladas à temperatura de -35 a -40°C. Secções transversais da

medula espinal com 12µm de espessura foram obtidas em criostato e posteriormente armazenadas a -20°C até o momento da utilização.

Para a realização da imunistoquímica, as lâminas foram inicialmente climatizadas, lavadas com tampão fosfato (PB 0,1M) e tratadas com BSA (albumina de soro bovino) 3% no mesmo tampão por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram incubadas overnight com os anticorpos anti-sinaptofisina, sinapsina, VGLUT1 e GAD65 (Tabela 4), todos em BSA 1% e Triton 0,2% diluídos em PB 0,1M e mantidos em câmara úmida a 4°C. Após lavagens com PB 0,1M (3x 5 minutos), foram adicionados os anticorpos CY3 (Jackson Lab., USA), de acordo com a espécie onde foi produzido o anticorpo primário, na proporção de 1:250, diluído em BSA 1% e Triton 0,2% em PB 0,1M por 45 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas em PB 0,1M, montadas em glicerol/PB 0,1 M (3:1) sendo posteriormente analisadas.

As análises foram realizadas por microscopia de fluorescência, com o objetivo de:

- a) Detectar e quantificar a cobertura sináptica do corpo celular dos motoneurônios: anticorpos primários anti-sinaptofisina e anti-sinapsina.
- b) Detectar e quantificar terminações pré-sinápticas GABAérgicas próximas ao corpo celular dos motoneurônios: anticorpo primário anti-GAD65.
- c) Detectar e quantificar terminações pré-sinápticas glutamatérgicas em aposição ao corpo celular dos motoneurônios: anticorpo anti-VGLUT1.

Tabela 4. Anticorpos primários usados no ensaio de imunoistoquímica. Cada anticorpo é seguido pelo fornecedor, animal hospedeiro, código do produto e concentração utilizada.

Anticorpo	Fornecedor	Hospedeiro	Código do produto	Concentração
Sinaptofisina	Dako	camundongo	M0776	1 / 200
Sinapsina	Santa Cruz	cabra	SC7379	1 / 200
VGLUT1	Millipore	camundongo	MAB5502	1 / 200
GAD65	Abcam	camundongo	AB26113	1 / 750

4.7.2 - Análise quantitativa dos resultados

As lâminas imunomarcadas foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon, eclipse TS 100) utilizando-se o filtro de rodamina (CY3). No grupo tratado com CTM, as mesmas foram observadas utilizando-se o filtro de fluoresceína (CY2). Foi capturada uma imagem representativa de cada lado (lesionado e não lesionado) por corte (total de 3 cortes por animal experimental, obtidos ao longo dos segmentos lesados) da coluna ventral da medula espinal, utilizando-se uma câmera de alta sensibilidade (Nikon, DXM 1200F).

Para a quantificação, a densidade integrada de pixels, que representa a intensidade da imunomarcagem das proteínas, foi medida em oito áreas eqüidistante ao redor dos neurônios positivos, no corno anterior da medula espinal, utilizando-se o software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institutes of Health, USA). A proporção de densidade integrada de pixels foi calculada para cada animal e então estabelecida a média das proporções para cada grupo \pm erro padrão.

4.8 - SOBREVIVÊNCIA NEURONAL

Para contagem de motoneurônios foram utilizadas secções transversais da intumescência lombar, submetidas à coloração de Nissl. Os motoneurônios, presentes no núcleo motor lateral do corno anterior no lado ipsilateral (lesionado) e contralateral (não lesionado) foram contados em cortes

alternados de cada espécime na área lesada da intumescência lombar, sendo o intervalo entre eles de 240µm. Apenas as células com núcleo visível foram contadas. Para corrigir contagens duplas de neurônios, devido ao fato da mesma célula poder estar presente em duas secções, foi utilizada a fórmula de Abercrombie e Johnson (1946): $N=nt/(t+d)$; onde N é o número corrigido de neurônios contados, n é o número de neurônios contados, t é a distância entre as secções contadas (240µm) e d é o diâmetro médio do neurônio.

Como a diferença no tamanho afeta significativamente o número de células, o valor de d foi calculado especificamente para cada grupo experimental (ipsilateral e contralateral). Neste sentido, o diâmetro de 15 motoneurônios para cada grupo foi mensurado (Image Tool software, versão 3.00) e a média calculada.

4.9 - AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO

4.9.1 – Preparação dos espécimes

Após perfusão com salina tamponada, os animais foram perfundidos com solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em PB 0,1M, pH 7,4. Posteriormente a fixação, o nervo isquiático (segmento médio) foi dissecado e imerso na mesma solução fixadora por 24 horas, a 4°C. Os nervos foram então lavados em PB 0,1M, pH 7,4 e reduzidos sob lupa. Os fragmentos foram pós-fixados durante 3 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em PB 0,1M, pH 7,4.

Seguindo-se à pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e desidratados em série crescente de álcool e acetona, sendo incluídos em resina (Durcupan ACM, Fluka). Os blocos foram debastados e secções semi-finas (0,5µm) obtidas e coradas com azul de toluidina 0,25% para a observação ao microscópio de luz.

4.9.2 - Morfometria e contagem das fibras mielínicas

Utilizando-se o microscópio de luz, cada nervo foi digitalizado em aumento de 200x para que sua área total pudesse ser medida, utilizando-se o software Image Tool, versão 3.00 (Figura 4).

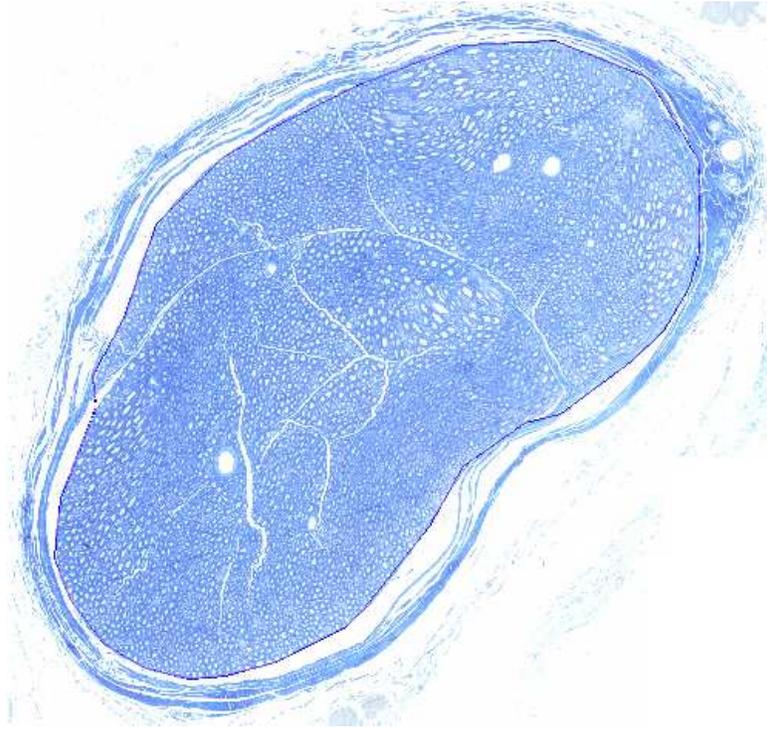


Figura 4. Secção transversal semi-fina de nervo isquiático corado com azul de toluidina e visto sob aumento de 200X no microscópio de luz. Seu perímetro foi circundado, utilizando-se o programa Image Tool, para a determinação da área do mesmo.

Cada nervo teve, no mínimo, 30% de sua área digitalizada em aumento de 1000X. Essas imagens foram utilizadas para a contagem e morfometria de fibras mielínicas.

Foi efetuada a contagem de axônios mielínicos em 30% da área total de cada nervo. O número total de fibras por nervo foi estimado a partir de uma regra de três simples, levando-se em conta a área total do nervo.

Para análise morfométrica, foram considerados os seguintes parâmetros: diâmetro das fibras mielínicas (DF), diâmetro dos axônios mielínicos (DAM), espessura da bainha de mielina (EBM) e razão "g" (RZG) ($RZG = DAM/DF$). A RZG consiste de um valor numérico que traz informações acerca do padrão de mielinização do nervo isquiático a partir da relação entre o DAM e o DF, sendo este valor próximo a 0,7 na normalidade. A resposta regenerativa axonal foi avaliada pelos resultados do DF e DAM.

Dois campos amostrados em cada nervo (em aumento de 1000X) foram empregados para obtenção das medidas da morfometria, que foi realizada utilizando-se o programa Adobe Photoshop CS4 extended. As imagens foram transformadas em preto e branco e então foi aplicada a ferramenta "limiar". O background que não seria medido, bem como as fibras que não apareciam inteiras na figura foram apagadas (Figura 5). Todos os axônios foram selecionados de uma só vez através da ferramenta de seleção apropriada e as medidas foram feitas automaticamente pelo programa, após calibração do mesmo. O menor diâmetro medido de cada fibra foi utilizado para a determinação de DF, uma vez que valores maiores poderiam ser distorcidos pela inclinação do corte. A diferença entre o DF e o DAM dividido por 2 foi empregada para obtenção da EBM (Mayhew e Sharma, 1984).

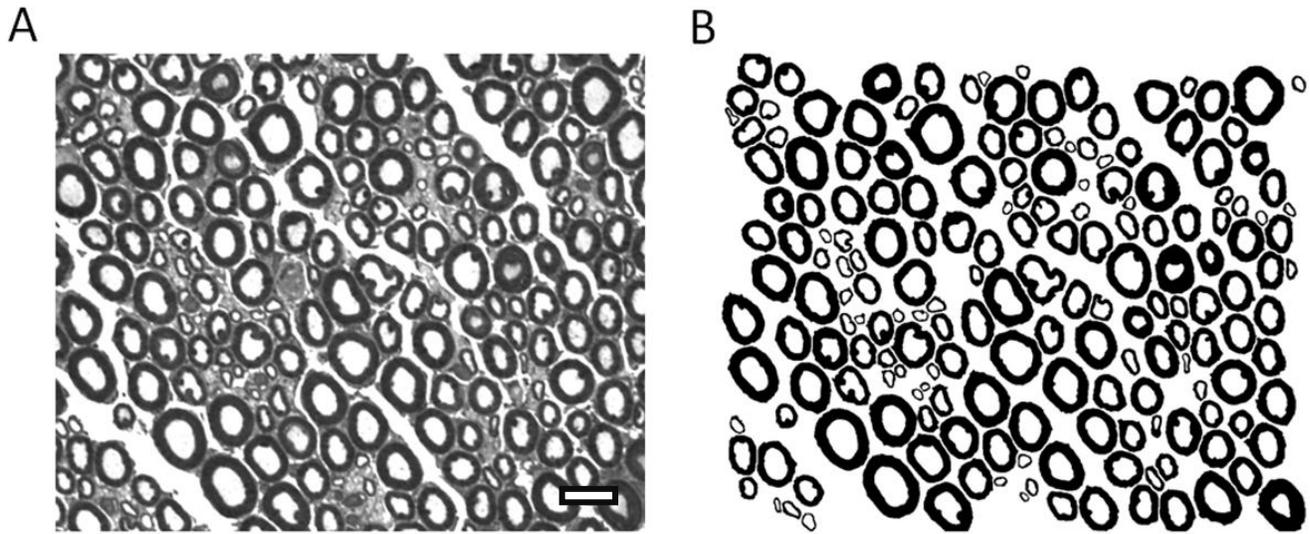


Figura 5. Imagem do nervo em aumento de 1000X. **A)** Mesma imagem, transformada em preto e branco. **B)** Aplicado o limiar e apagado background e fibras que não apareciam inteiras na imagem original. Barra de escala: 10 μ m.

4.10 - AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA

Os animais foram colocados para andar ao longo de uma passarela com um assoalho de vidro (100 cm comprimento x 15 cm largura x 0.6 cm espessura) localizada em uma sala escura, com uma luz vermelha ambiente. Uma luz fluorescente verde ilumina a borda do assoalho e é distribuída ao longo da plataforma, de forma homogênea. A luz é capaz de intensificar as áreas nas quais as patas dos animais entram em contato com a placa de vidro. Devido à tecnologia de pegadas iluminadas, as patas foram capturadas por uma câmera de vídeo de alta velocidade (Fujinon DF6HA-1B), posicionada abaixo da passarela. A câmera de vídeo transforma cada cena em uma imagem digital. As imagens digitais foram transferidas para o computador através de uma conexão Ethernet. A tecnologia de pegadas iluminadas permite que sejam detectadas até mesmo diferenças de pressão, como resultado de como o animal distribui o seu peso corporal nas quatro patas. Esta câmera digital possui uma taxa

de amostragem de 100 quadros por segundo. Já a combinação da luz verde na placa de vidro e a luz vermelha no teto iluminado tornam o contorno do corpo do animal visível quando ele atravessa a placa de vidro. Os sinais fornecidos pela câmera foram digitalizados, quadro a quadro, pela placa de vídeo PCImage-SG (Matrix vision GmH, Oppenheimer, Alemanha). O programa CatWalk adquire, armazena e analisa os vídeos dos animais caminhando pelo corredor e fornece para cada corrida efetuada uma tabela com vários parâmetros com valores para cada pata do animal.

Foram realizadas duas avaliações motoras antes da lesão. Após a lesão, as avaliações foram feitas duas vezes por semana para cada animal dos três grupos experimentais até 12 semanas pós-esmagamento. Em cada avaliação de 3 a 4 corridas foram registrados por animal.

Parâmetros de pressão máxima exercida pela pata, comprimento da passada (distância entre duas impressões da mesma pata) e comprimento e largura da pata foram analisados através da razão entre as patas posteriores ipsi / contralateral a lesão e estabelecido um valor percentual. Foi feita uma média para o valor pré-operatório e para cada uma das semanas analisadas por animal e, então, para cada grupo experimental \pm erro padrão.

Já para o cálculo do índice funcional do nervo fibular (peroneal functional index, PFI), as medições foram feitas de acordo com dois parâmetros: a distância entre o primeiro e o quinto dedo (largura da pata - toe spread, TS) e a distância entre o terceiro dedo e o calcanhar (comprimento da pata - print length, PL) (Figura 6).

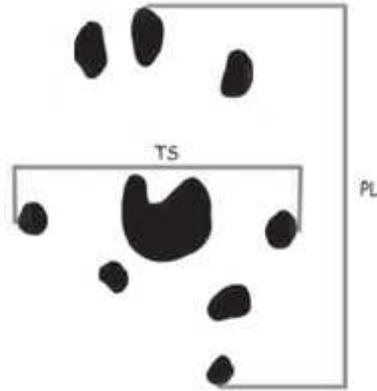


Figura 6. Impressão da pata do rato, indicando a largura da pata (distância entre o primeiro e o quinto dedo - toe spread, TS) e o comprimento da pata (distância entre o terceiro dedo e o calcanhar - print length, PL). (Figura adaptada de Sarikcioglu et al., 2009)

Estes parâmetros foram utilizados para a medição das pegadas das patas posterior direita (lesada) e posterior esquerda (não lesada) e os valores aplicados na seguinte fórmula descrita por Bain et al (1989):

$$PFI = 174.9 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 80.3 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) - 13.4$$

(E= lado lesionado, N=lado não lesionado).

4.11 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos resultados numéricos resultantes de todas as análises foram calculados a média e desvio padrão para cada grupo. Os dados de sobrevivência neuronal, imunistoquímica, área do nervo e contagem de fibras mielínicas foram avaliados pelo método de análise da variância – ANOVA de

uma via. Os dados da análise funcional (*walking track test*) e da morfometria das fibras mielínicas foram avaliados pelo método da análise da variância – ANOVA de duas vias. Nos dois casos, foi realizado o pós-teste Bonferroni. Assumiu-se um nível de significância igual a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5. Resultados

5.1 - CARACTERIZAÇÃO DAS CTM

5.1.1 - Morfologia

Após os procedimentos de extração, observou-se um semeado heterogêneo com predominância de células pequenas, arredondadas, não aderidas ao frasco de cultivo. A cada troca de meio, as células em suspensão, em sua maioria hematopoéticas maduras ou precursoras hematopoéticas foram sendo removidas. Após dez dias de cultivo, foi ainda possível observar algumas células arredondadas flutuantes sobre uma população celular aderida que apresentava morfologia fusiforme semelhante a fibroblastos e que formavam colônias. Gradualmente, as células remanescentes e aderentes foram predominando. Neste ponto, porém, ainda não havia uma cultura homogênea, podendo-se observar algumas células menores, aderidas. Após a quarta passagem, foi possível observar apenas um tipo celular presente com morfologia típica de células estromais medulares, com citoplasma extenso e achatado, um a dois prolongamentos não ramificados e núcleo contendo cromatina frouxa (Figura 7).

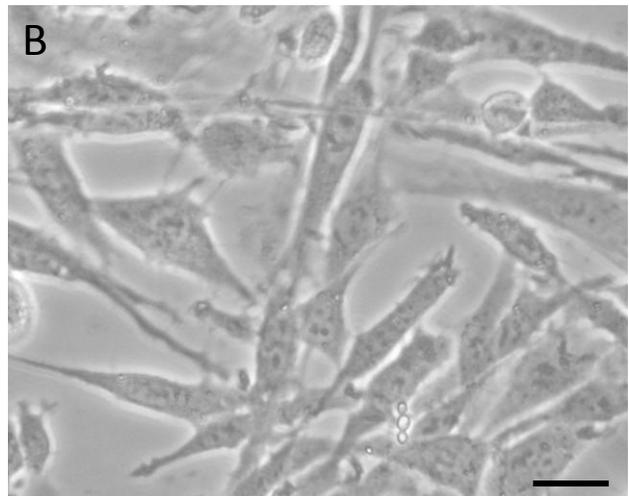
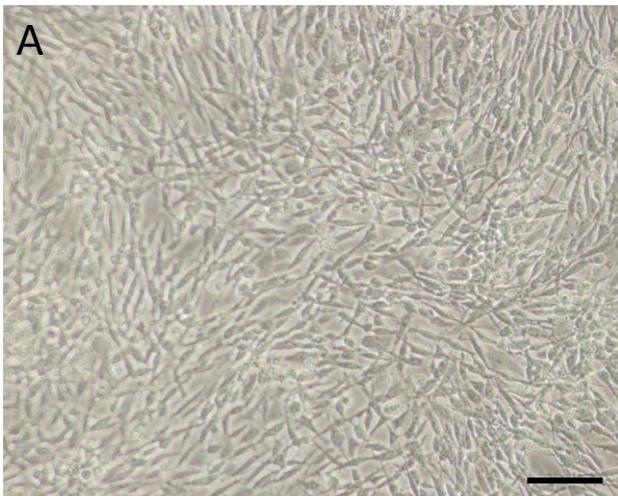


Figura 7. Cultura de CTM isoladas da medula óssea em quarta passagem. **A)** Microscopia de luz mostrando cultura em aumento de 100X. Barra de escala: 100µm. **B)** Microscopia de luz mostrando CTM em detalhe, em 400X. Observa-se morfologia similar e típica das células mesenquimais da medula óssea. Barra de escala: 25µm.

5.1.2 - Análise fenotípica por citometria de fluxo

A análise quantitativa foi realizada através de ensaios de citometria de fluxo, utilizando-se os anticorpos monoclonais CD90, CD54, CD73, RT1A (MHCI), CD 45, CD11b/c, CD34 e I-Ad/I-Ed (MHCII). Os determinantes de complementaridade CD90, CD54, CD73 e RT1A são, de acordo com a literatura, moléculas eleitas para a caracterização das células tronco mesenquimais.

Cerca de 99,8% expressaram CD90, 89% expressaram CD54, 88,6% das células expressaram CD73 e 90,8% expressaram RT1A (MHCI). O determinante de complementaridade CD45, uma molécula expressa por células hematopoéticas e seus precursores, foi detectado apenas em 1,07% das células analisadas, CD11b/c em 4,19% das células, CD34 em 1,88% das células e I-Ad/I-Ed (MHCII) em 2,23% das células (Figura 8 e 9). Esta análise permite definir uma população de células mesenquimais homogênea, claramente distinta da linhagem hematopoética. Para controle, foram utilizadas CTM submetidas apenas à incubação com o anticorpo secundário Alexa 488.

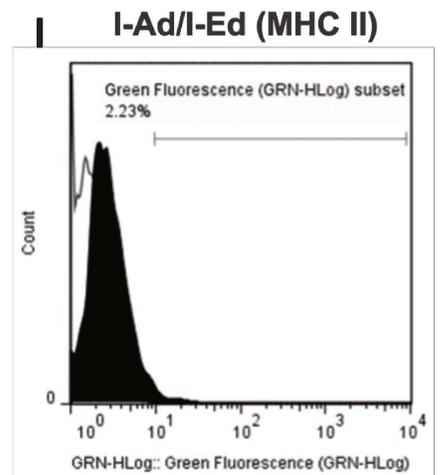
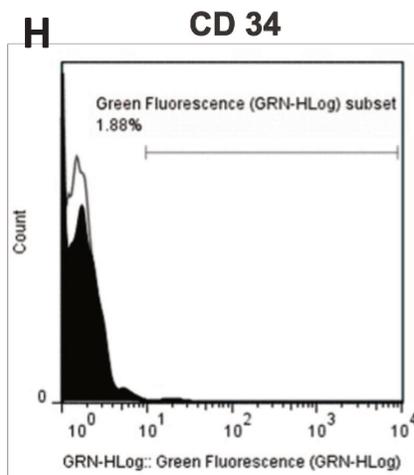
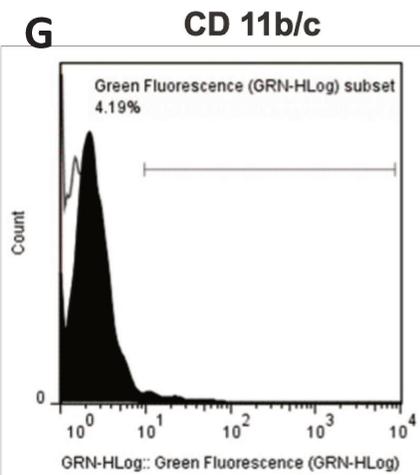
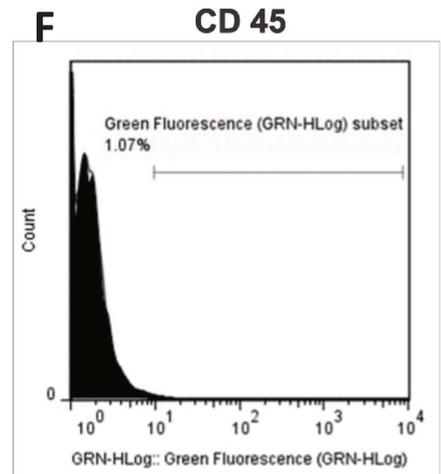
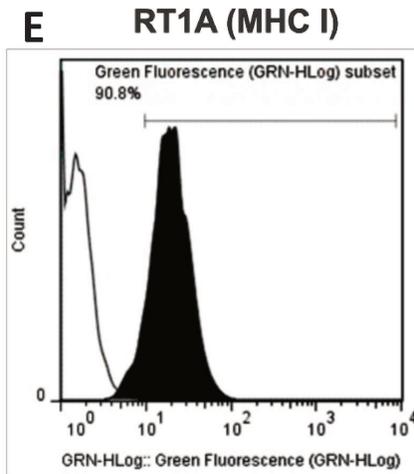
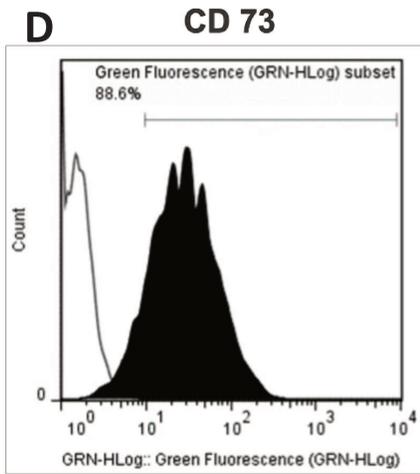
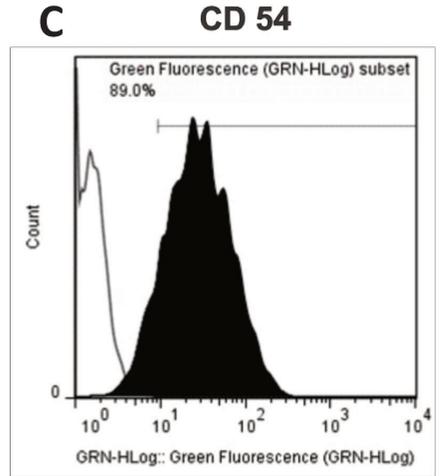
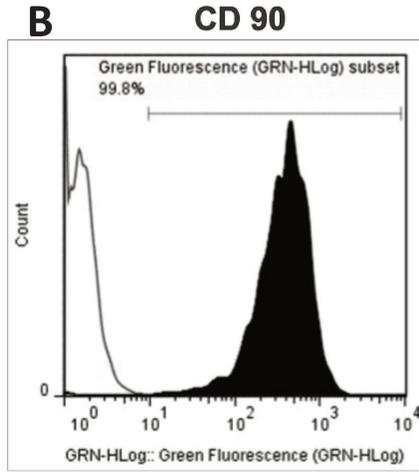
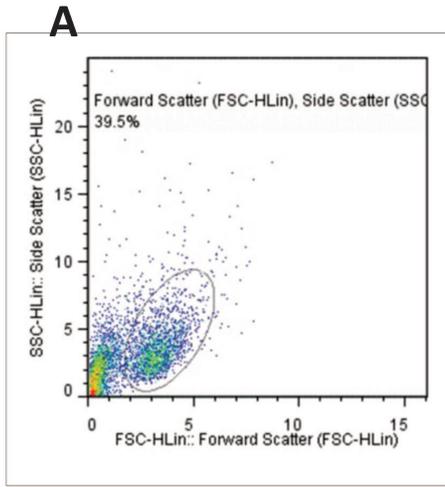


Figura 8. Análise fenotípica das CTM por citometria de fluxo. **A)** Gráfico de distribuição pontual FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade) utilizado para a seleção da população analisada R1. **B-I)** Histogramas de intensidade média de fluorescência (GRN-HLog: green fluorescence) versus número de eventos (counts). **B)** CD90. **C)** CD54. **D)** CD73. **E)** MHC I (RT1A). **F)** CD45. **G)** CD11b/c. **H)** CD34. **I)** MHCII (I-Ad/I-Ed).

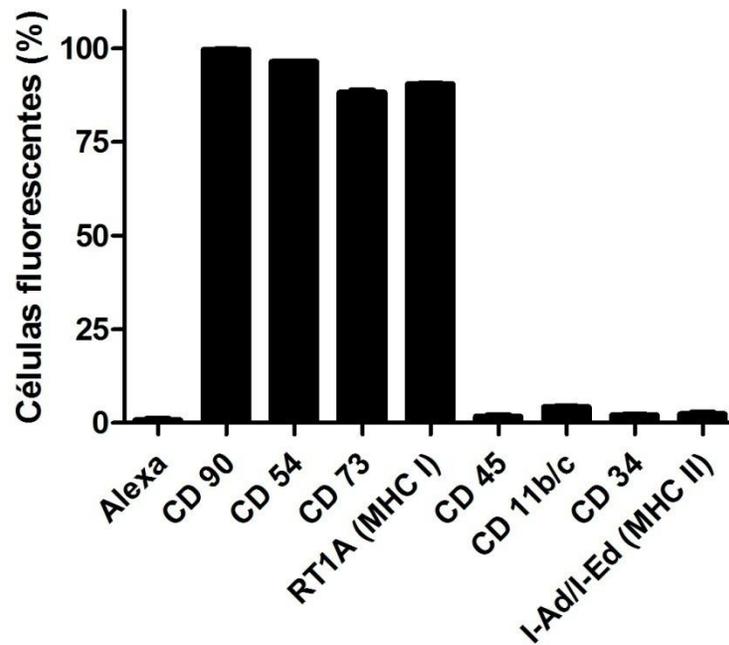


Figura 9. Representação gráfica do percentual de células fluorescentes para cada anticorpo analisado dentro da população R1.

5.2 - ENXERTO E MIGRAÇÃO DAS CTM

As CTM foram injetadas na interface entre a substância branca e cinzenta, no funículo lateral da medula espinal onde, após 4 semanas, foi possível encontrar um número significativo de células no

sítio de injeção (Figura 10C e 6D) e na substância branca medular (Figura 10E). Próximo ao corno anterior, adjacente aos motoneurônios, foram encontradas poucas ou nenhuma célula.

Na figura 10B observa-se a integridade da medula espinal, preservada após a injeção. Nota-se a preservação das áreas circunjacentes ao sítio da injeção e a presença dos motoneurônios no núcleo motor.

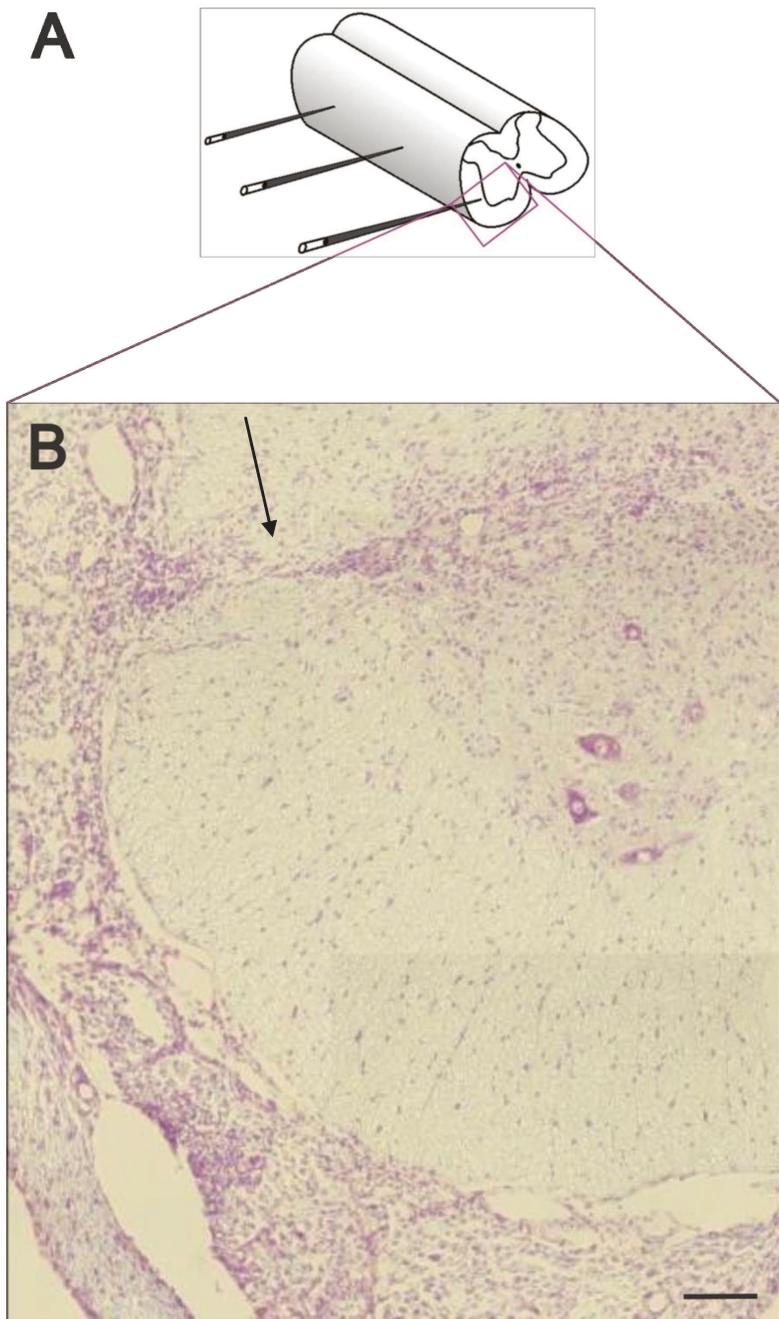


Figura 10. A) Visão esquemática da região lombar da medula espinal, mostrando os três sítios de injeção das CTM. **B)** Medula espinal após injeção de CTM. A flecha aponta o sítio de injeção. **C)** Detalhe ampliado do sítio de injeção em microscópio de luz. **D)** Sítio de injeção observado por microscopia de fluorescência. **E)** Detalhe da substância branca com CTM vista ao microscópio de fluorescência. Barra de escala: 50 μ m.

5.3 - EFEITO NEUROPROTETOR – SOBREVIVÊNCIA NEURONAL

O efeito do tratamento com CTM foi analisado, determinando-se a porcentagem de sobrevivência neuronal, sendo esta taxa a razão percentual entre o número de motoneurônios ipsilateral e contralateral à lesão.

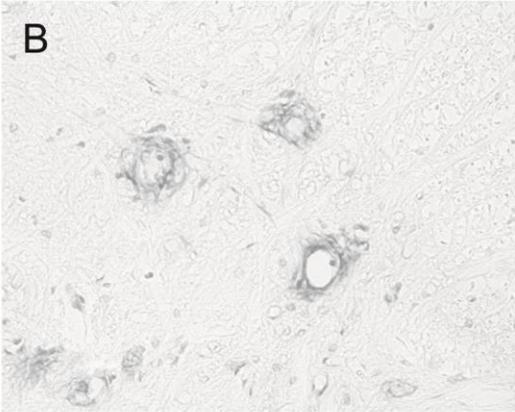
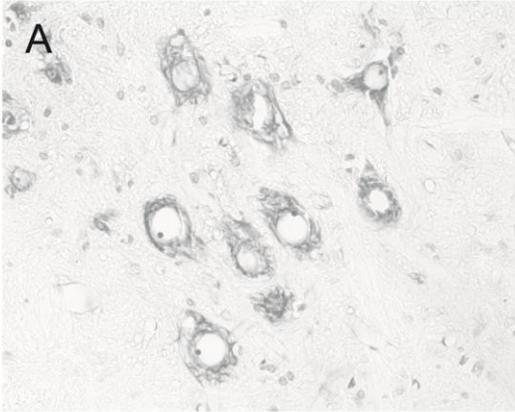
Não houve diferenças estatísticas no número absoluto de motoneurônios no lado contralateral à lesão nas diferentes condições experimentais (esmagamento: $9,56 \pm 1,42$; esmagamento + DMEM: $6,68 \pm 0,84$; esmagamento + CTM: $7,74 \pm 0,90$; valores médios absolutos por corte \pm erro padrão). Desta maneira, foi possível expressar a porcentagem de sobrevivência neuronal em relação ao lado contralateral nas diferentes situações experimentais.

Após quatro semanas, ocorreu uma intensa degeneração dos motoneurônios lesados no núcleo motor dos animais dos grupos esmagamento e esmagamento + DMEM. Por outro lado, notou-se a presença de vários neurônios no núcleo motor do grupo tratado com CTM, onde houve um número estatisticamente maior de neurônios sobreviventes (Figura 11). Calculou-se a razão percentual entre o número de motoneurônios presentes no lado ipsilateral e contralateral, obtendo-se as seguintes porcentagens de sobrevivência neuronal para cada grupo: esmagamento: $48,44\% \pm 2,23\%$; esmagamento + DMEM: $45,98\% \pm 6,51\%$; esmagamento + CTM: $67,37\% \pm 2,26\%$; valores médios por grupo \pm erro padrão; $p = 0,0067$. (Figura 12).

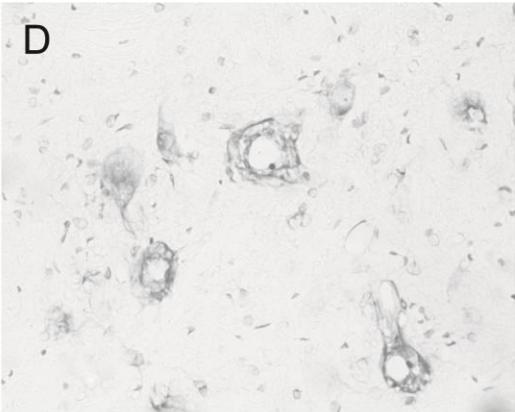
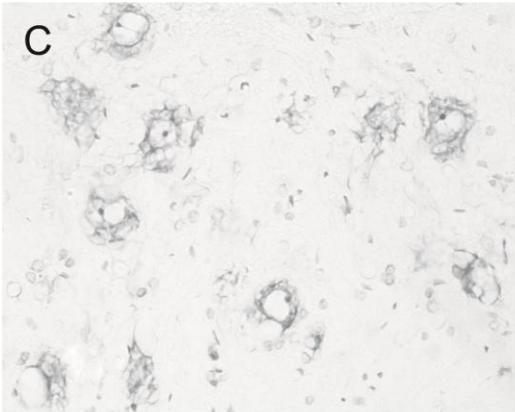
CONTRALATERAL

IPSILATERAL

ESMAGAMENTO



ESMAGAMENTO + DMEM



ESMAGAMENTO + CTM

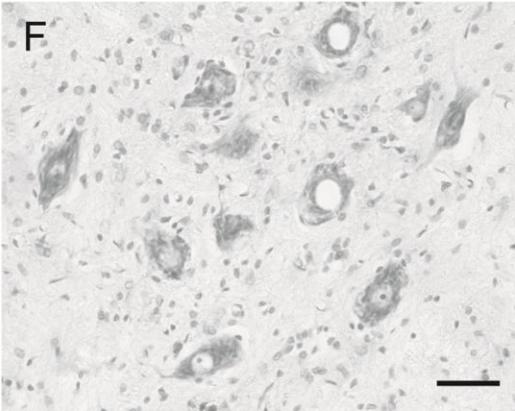
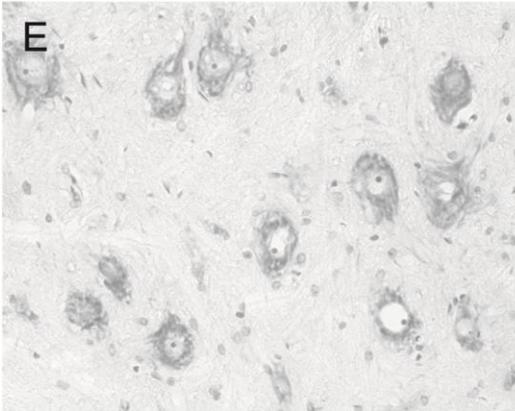


Figura 11. Cortes histológicos da coluna anterior da medula espinal corados com cresil violeta. Efeito neuroprotetor das CTM sobre os motoneurônios, quatro semanas após a lesão. Observa-se a diminuição do número de motoneurônios, os quais apresentam grande corpo celular. No grupo tratado com CTM há redução na perda destes neurônios. **A, B)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento. **C, D)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + DMEM. **E, F)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + CTM. Barra de escala = 50µm.

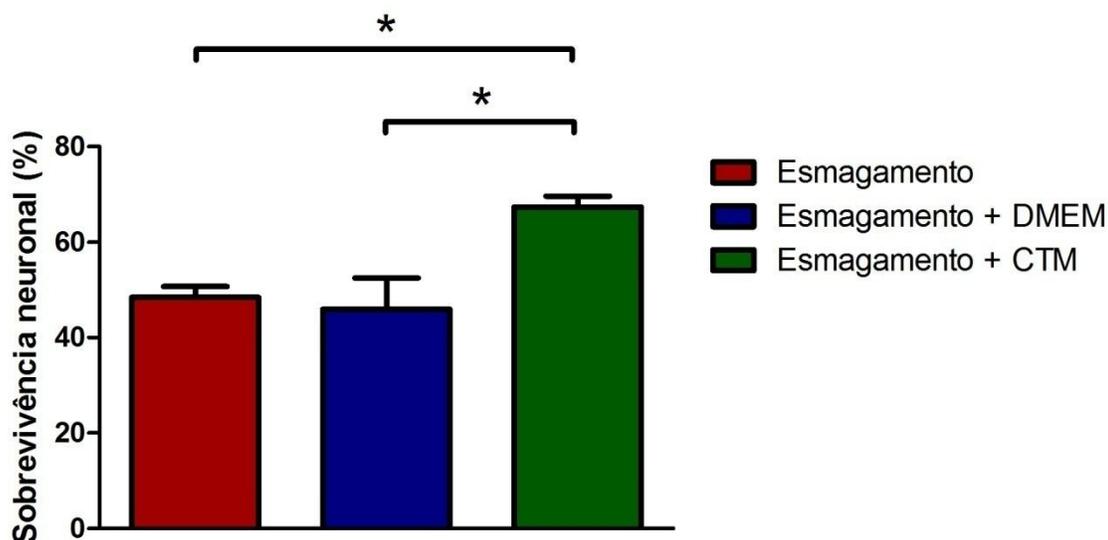


Figura 12. Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, quatro semanas após o esmagamento das raízes motoras. O grupo tratado com CTM apresentou significativo aumento da sobrevivência neuronal.

5.4 – DESTACAMENTO SINÁPTICO

Para avaliar as alterações na atividade sináptica após o esmagamento das raízes motoras e o tratamento com CTM, foi feita uma análise da imunoreatividade para a proteína sinaptofisina no núcleo motor da coluna ventral da medula espinal, quatro semanas após a lesão. A figura 13 evidencia a

similaridade entre os lados contralaterais à lesão para a marcação com sinaptofisina. Destaca-se a marcação adjacente à superfície celular dos grandes motoneurônios que compõem o núcleo motor. Observou-se uma intensa reatividade nesta área, a qual é atribuída ao grande número de inputs aos motoneurônios- α . Em contraste ao lado contralateral, a intensidade da expressão da sinaptofisina foi drasticamente reduzida na superfície dos motoneurônios que sofreram axotomia, nos animais não tratados e nos que receberam tratamento placebo (DMEM), indicando uma grande diminuição dos terminais em aposição a estes neurônios.

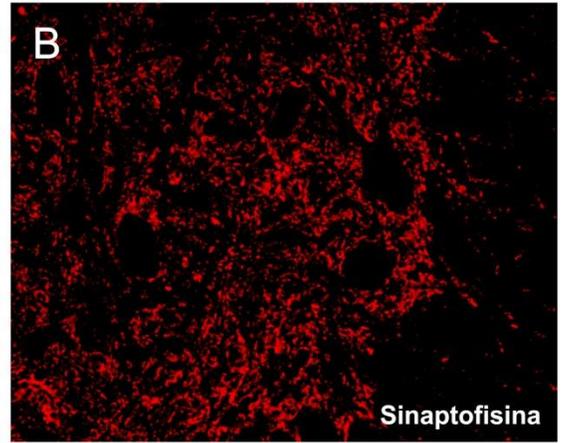
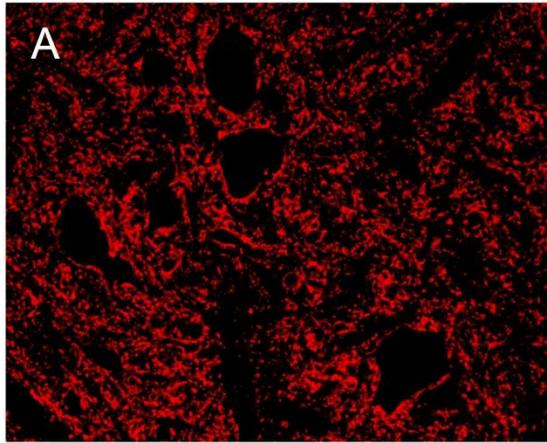
Nota-se que os neurônios axotomizados e tratados com as células tronco, apresentaram uma menor redução de terminais em aposição ao corpo celular, refletindo uma possível diminuição do processo de eliminação sináptica.

Esta observação baseou-se em uma avaliação quantitativa da cobertura sináptica através da densidade integrada de pixels, que reflete a intensidade da imunomarcação. Foi calculada a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo (esmagamento: $47,99\% \pm 3,50\%$; esmagamento + DMEM: $47,01\% \pm 4,68\%$; esmagamento + CTM: $74,01\% \pm 4,15\%$; $p=0,0008$; Figura 14).

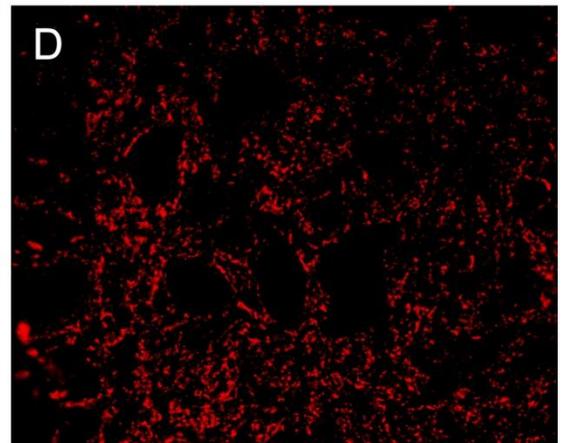
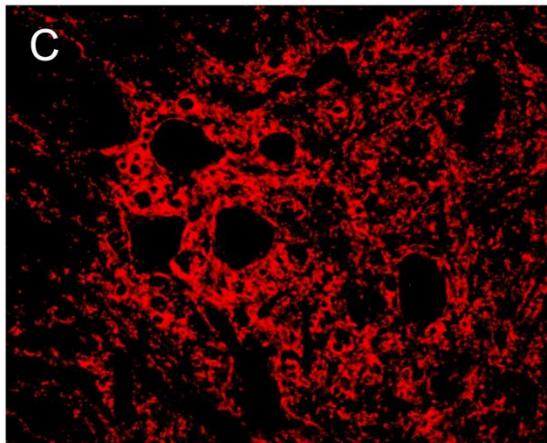
CONTRALATERAL

IPSILATERAL

ESMAGAMENTO



ESMAGAMENTO
+ DMEM



ESMAGAMENTO
+ CTM

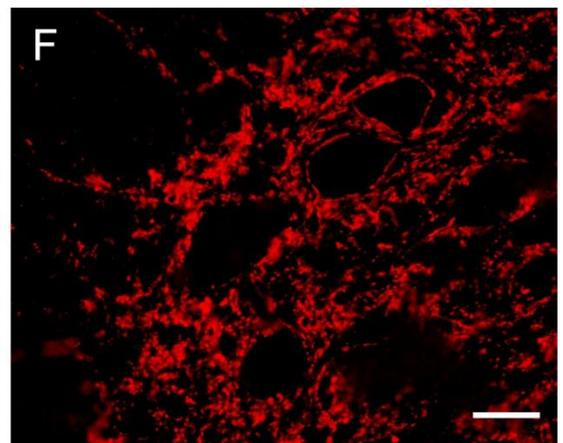
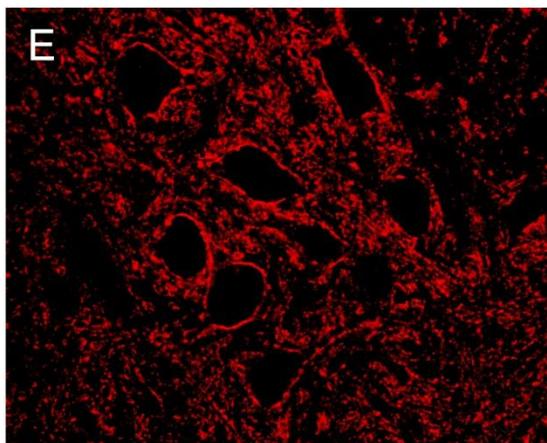


Figura 13. Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-sinaptofisina, quatro semanas após a lesão. Observa-se nos grupos esmagamento e esmagamento + DMEM grande redução na imunorreatividade anti-sinaptofisina, indicando uma pequena cobertura sináptica nestes neurônios. Contudo, não se observam diferenças no padrão da marcação entre estes dois grupos. Já o grupo esmagamento + CTM apresenta menor redução na expressão de sinaptofisina, indicando maior cobertura sináptica nesse grupo em relação aos demais. **A, B)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento. **C, D)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + DMEM. **E, F)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + CTM. Barra de escala = 50µm.

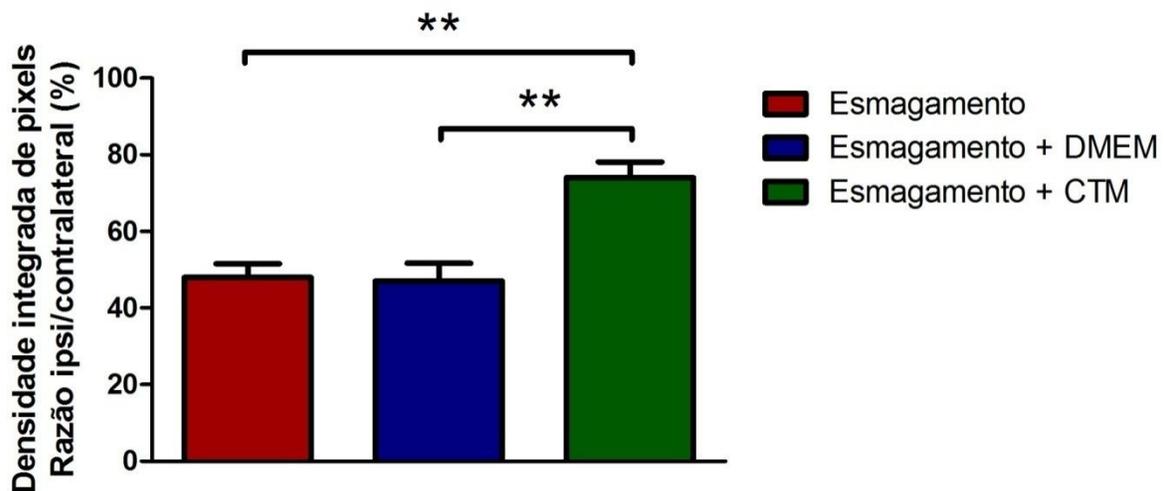


Figura 14. Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica quatro semanas após a lesão. Observa-se uma significativa redução do processo de eliminação sináptica no grupo tratado com CTM.

A avaliação das alterações na atividade sináptica também foi analisada a partir da imunomarcção anti-sinapsina. A figura 15 evidencia a similaridade entre os lados contralaterais e

diminuição de marcação nos lados ipsilaterais a lesão; diminuição esta, mais acentuada nos grupos esmagamento e esmagamento + DMEM, comparativamente ao grupo esmagamento + CTM .

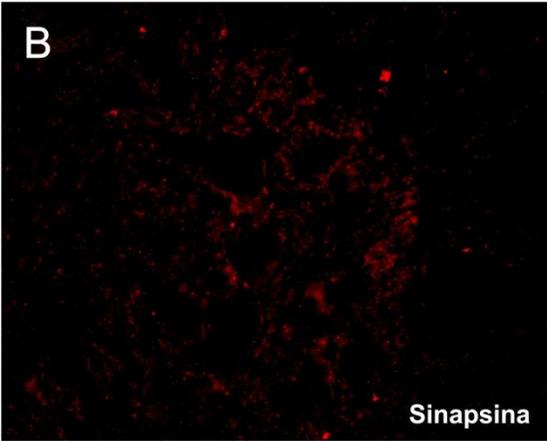
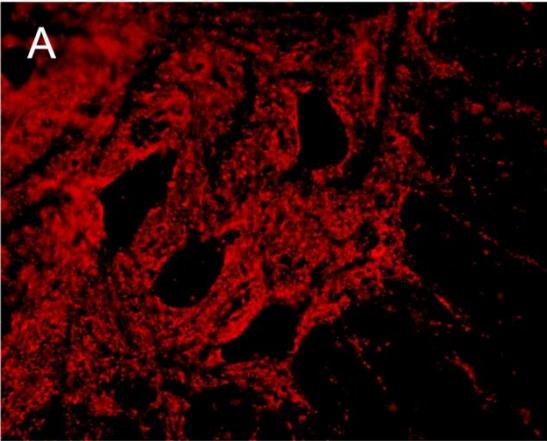
Assim como nas imunomarcações para sinaptofisina, a marcação para sinapsina também demonstrou que os neurônios axotomizados e tratados com as células tronco apresentaram uma menor redução de terminais em aposição ao corpo celular, refletindo uma possível diminuição do processo de eliminação sináptica.

Foi calculada a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo (esmagamento: 52,47% \pm 2,83%; esmagamento + DMEM: 54,59% \pm 3,36%; esmagamento + CTM: 69,61% \pm 2,37%; $p=0,0023$; Figura 16).

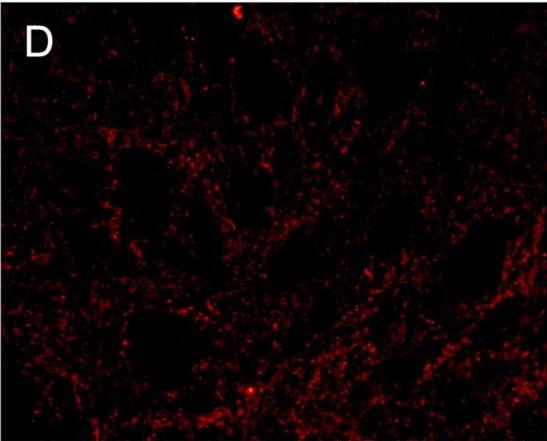
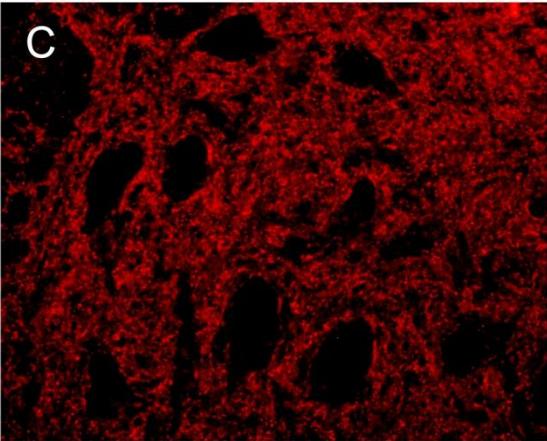
CONTRALATERAL

IPSILATERAL

ESMAGAMENTO



ESMAGAMENTO + DMEM



ESMAGAMENTO + CTM

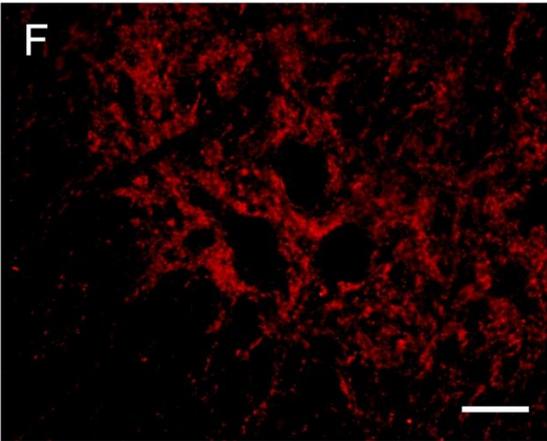
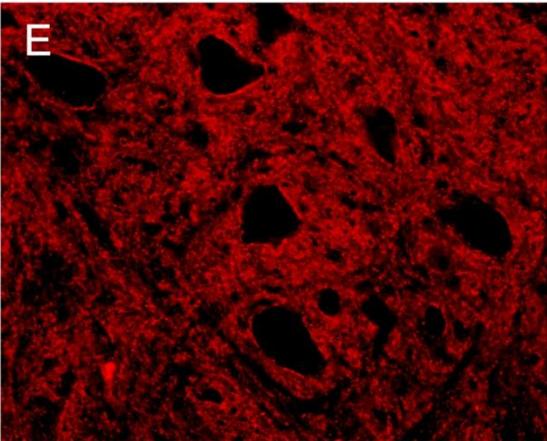


Figura15. Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-sinapsina quatro semanas após a lesão. Observa-se, nos grupos esmagamento e esmagamento + DMEM, significativa redução na imunorreatividade anti-sinapsina, indicando uma pequena cobertura sináptica nestes neurônios. Contudo, não se observam diferenças no padrão da marcação entre estes dois grupos. Já o grupo esmagamento + CTM apresenta menor redução na expressão de sinapsina, indicando maior cobertura sináptica nesse grupo, em relação aos demais. **A, B)** Lados contra e ipsilateral à lesão no grupo esmagamento. **C, D)** Lados contra e ipsilateral à lesão no grupo esmagamento + DMEM. **E, F)** Lados contra e ipsilateral à lesão no grupo esmagamento + CTM. Barra de escala = 50µm.

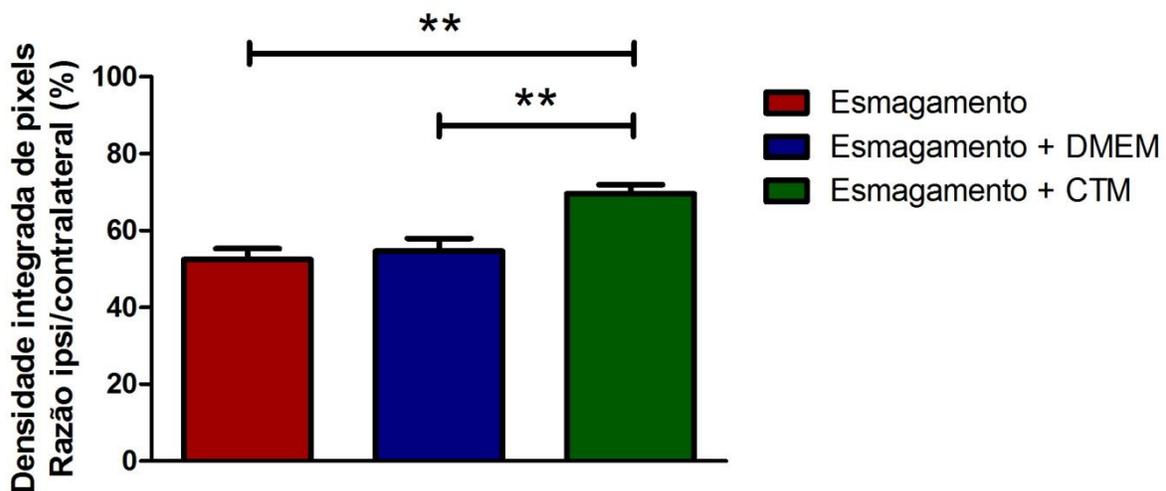


Figura 16. Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica quatro semanas após a lesão. Observa-se uma significativa redução do processo de eliminação sináptica no grupo tratado com CTM.

5.5 - BALANÇO SINÁPTICO EXCITATÓRIO / INIBITÓRIO

Para detectar possíveis alterações no balanço excitatório/inibitório das terminações nervosas que chegam aos corpos celulares dos motoneurônios, após o esmagamento das raízes motoras e com o tratamento com CTM, foi feita uma análise imunistoquímica da presença das proteínas VGLUT1 (marcador de terminações glutamatérgicas) e GAD 65 (marcador de terminações GABAérgicas) no núcleo motor da coluna ventral da medula espinal quatro semanas após a lesão.

5.5.1 - Terminações nervosas glutamatérgicas – inputs excitatórios

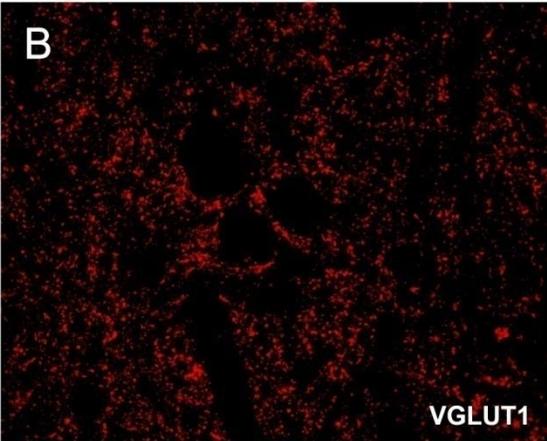
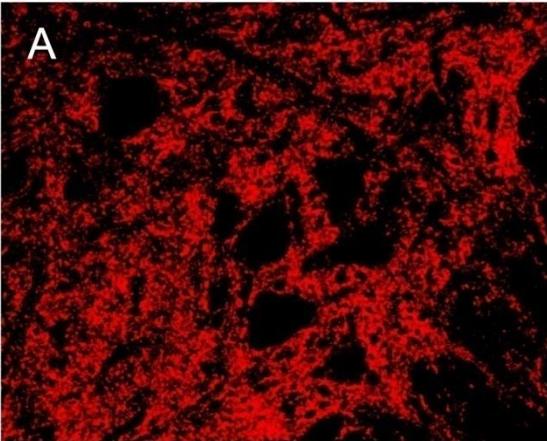
A figura 17, mostra a imunomarcacão da superfície celular dos motoneurônios para a proteína VGLUT1. É possível observar que há similaridade entre os lados contralaterais à lesão. A intensidade da expressão de VGLUT1 foi drasticamente reduzida na superfície dos motoneurônios cujos axônios foram esmagados, em todos os grupos estudados e na mesma proporção. Tal resultado demonstra que a perda de terminais glutamatérgicos que chegam aos corpos dos motoneurônios, acontece em uma mesma taxa para todos os grupos.

Foi calculada a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo (esmagamento: 61,68% \pm 2,50%; esmagamento + DMEM: 57,99% \pm 3,42%; esmagamento + CTM: 58,19% \pm 5,81%; $p=0,7832$; Figura 18).

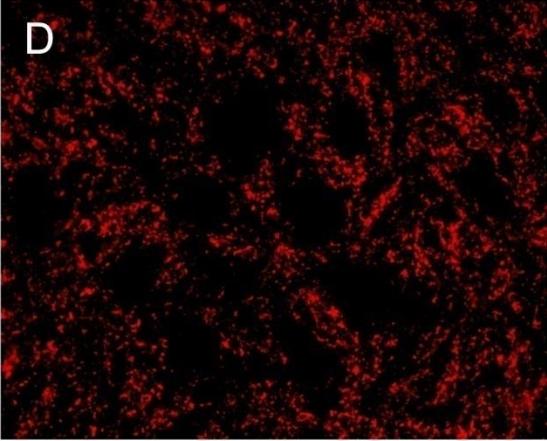
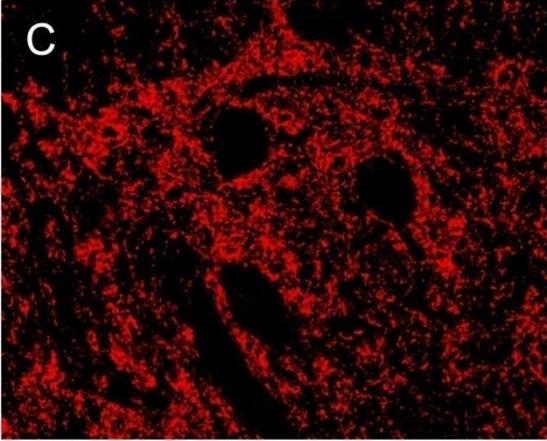
CONTRALATERAL

IPSILATERAL

ESMAGAMENTO



ESMAGAMENTO + DMEM



ESMAGAMENTO + CTM

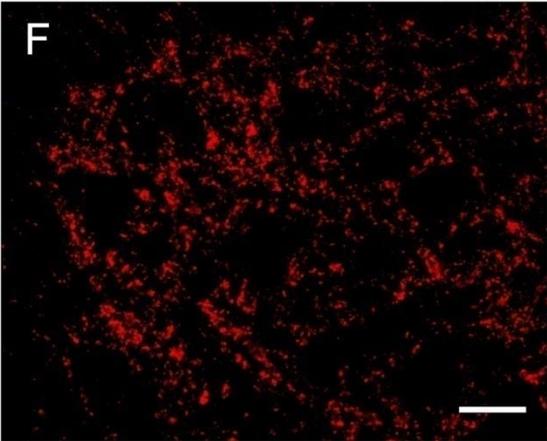
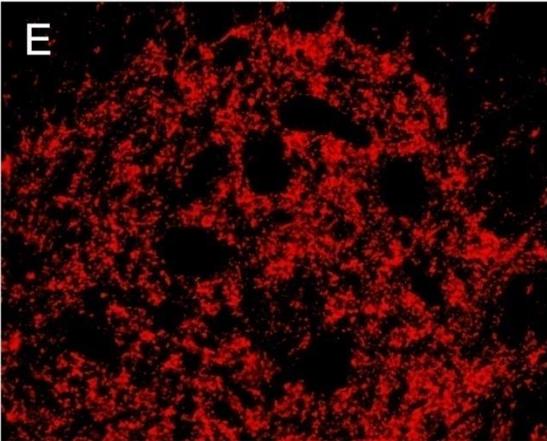


Figura 17. Análise imunistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-VGLUT1 quatro semanas após a lesão. Observa-se em todos os grupos grande redução na expressão de VGLUT1. Não se observa diferenças no padrão da marcação entre os três grupos. **A, B)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento. **C, D)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + DMEM. **E, F)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + CTM. Barra de escala = 50 μ m.

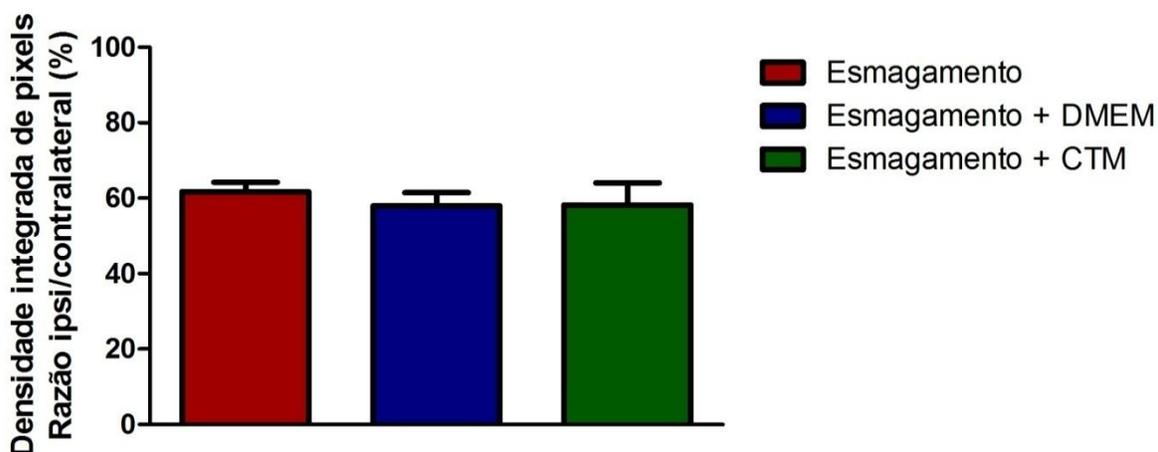


Figura 18. Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica por terminações glutamatérgicas quatro semanas após a lesão. Não há diferença significativa entre os grupos.

5.5.2 - Terminações nervosas gabaérgicas/glicinérgicas – inputs inibitórios

A figura 19, mostra a imunomarcagem da superfície celular dos motoneurônios para a proteína GAD65. É possível observar que há similaridade entre os lados contralaterais à lesão. A intensidade da expressão de GAD65 foi reduzida, na superfície dos motoneurônios cujos axônios foram esmagados, em maior proporção nos grupos esmagamento e esmagamento + DMEM comparativamente ao grupo tratado com CTM.

Foi calculada a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo (esmagamento: 68,35% \pm 1,97%; esmagamento + DMEM: 69,29% \pm 2,33%; esmagamento + CTM: 79,52% \pm 1,59%; $p=0,0032$; Figura 20).

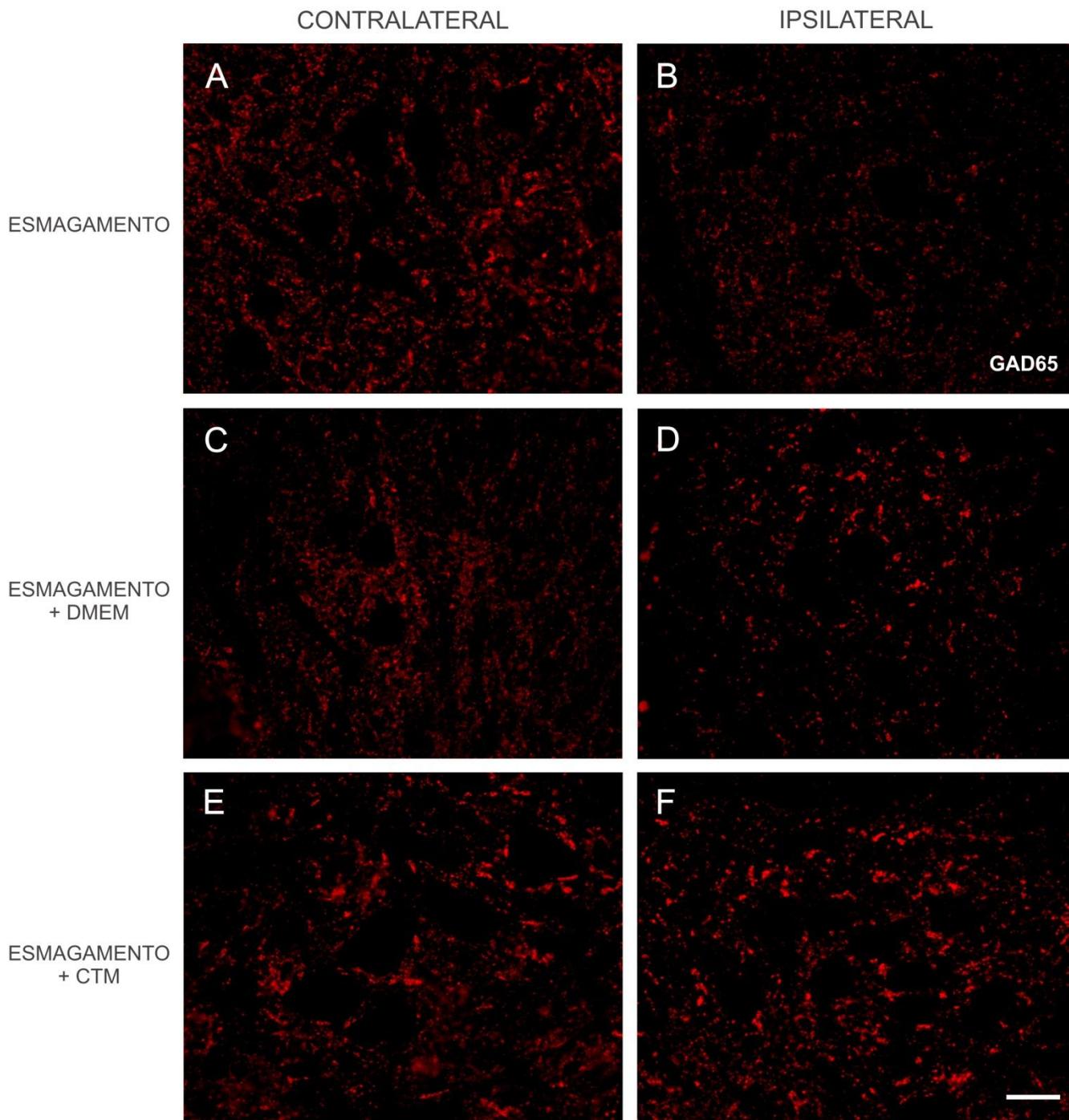


Figura19. Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-GAD65 quatro semanas após a lesão. Observa-se maior redução na imunoreatividade de GAD65 no lado ipsilateral a lesão nos grupos esmagamento e esmagamento + DMEM, comparativamente ao grupo esmagamento + CTM que apresentou menor redução da marcação. **A, B)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento. **C, D)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + DMEM. **E, F)** Lados contra e ipsilateral à lesão do grupo esmagamento + CTM. Barra de escala = 50µm.

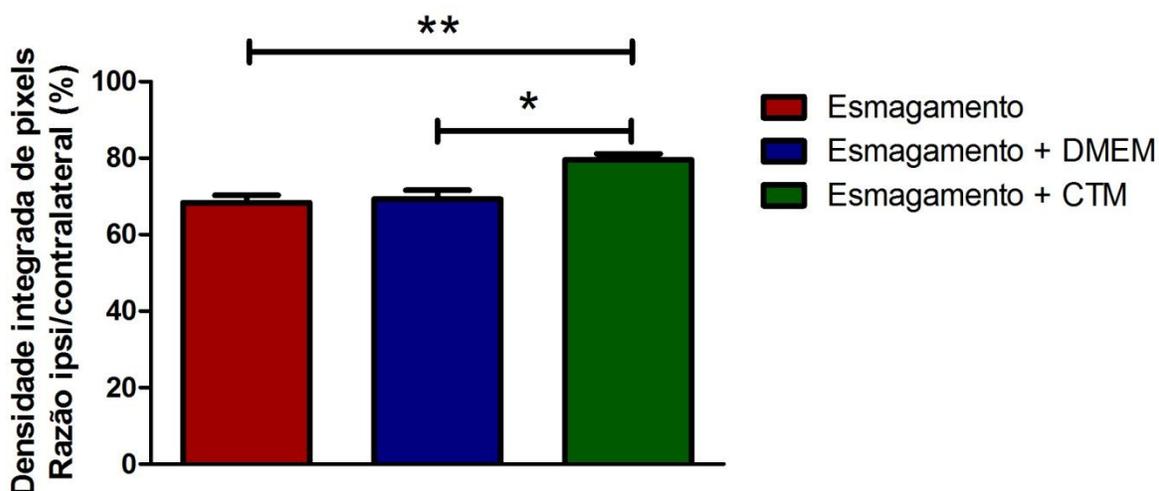


Figura 20. Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica para terminações GABAérgicas quatro semanas após a lesão. Observa-se uma maior eliminação de terminações GABAérgicas nos grupos esmagamento e esmagamento + DMEM comparativamente ao grupo tratado com CTM.

5.6 - REGENERAÇÃO NERVOSA

5.6.1 - Área do nervo isquiático

Foi calculada a área do nervo isquiático para cada grupo experimental (contralateral $5,400 \pm 0,38 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; esmagamento $5,43 \pm 0,20 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; esmagamento + DMEM $4,29 \pm 0,18 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; esmagamento + CTM $5,63 \pm 0,36 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0,0235$; Figura 21). O grupo tratado com DMEM apresentou menor área do que o tratado com CTM. Não houve diferença entre os demais grupos.

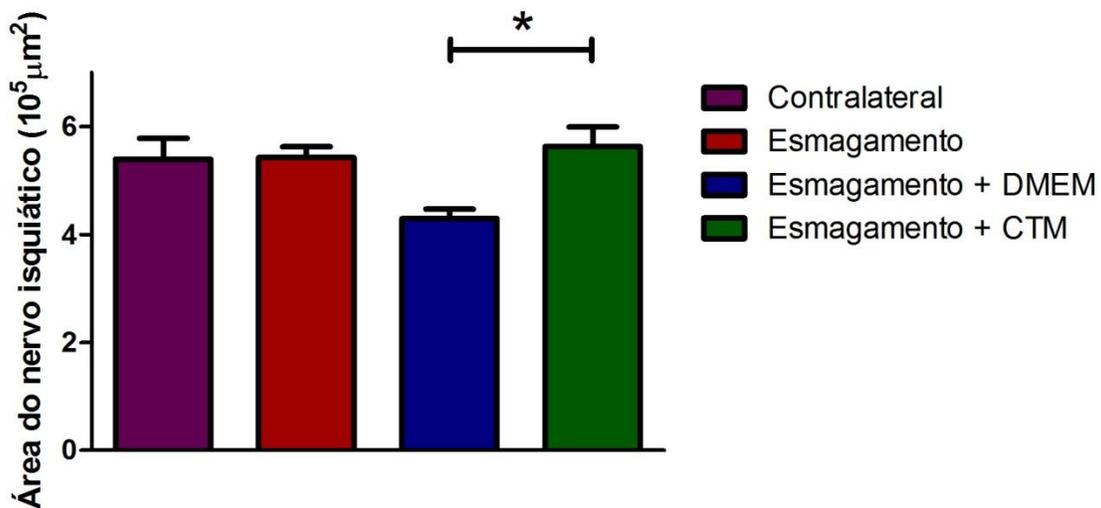


Figura 21. Representação gráfica da área do nervo isquiático 12 semanas após a lesão. Observa-se uma menor área no grupo tratado com DMEM, em relação ao grupo tratado com CTM.

5.6.2 - Quantificação das fibras mielínicas

Após o período de 12 semanas, estimou-se que os nervos contralaterais à lesão tinham, em média, $9.002 \pm 492,6$ axônios mielínicos, o grupo esmagamento apresentou $8.648 \pm 359,3$, no grupo esmagamento + DMEM obteve-se cerca de $7.639 \pm 530,3$, já no grupo esmagamento + CTM obteve-se aproximadamente 10.150 ± 679 axônios mielínicos (Figura 22).

O tratamento foi significativo para o número de fibras mielínicas ($p=0,0300^*$). Mais especificamente, a diferença se deu entre os grupos tratados com DMEM e com CTM.

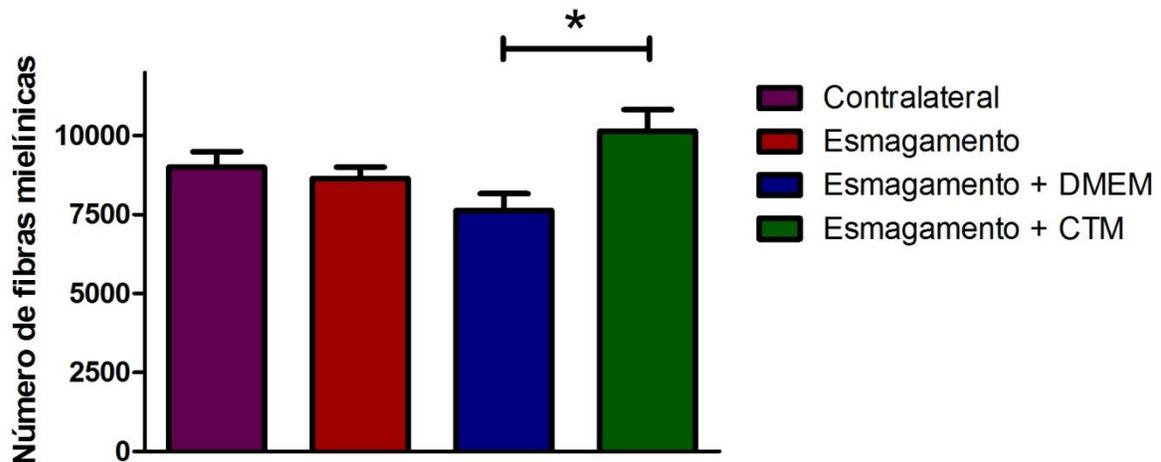


Figura 22. Número de fibras mielínicas estimadas para o nervo isquiático 12 semanas após a lesão. O grupo tratado com DMEM apresenta menor número de fibras mielínicas em comparação ao grupo tratado com CTM.

5.6.3 - Parâmetros morfométricos

Diâmetro das fibras (DF):

Os nervos do grupo contralateral apresentaram fibras mielínicas com diâmetros variando entre $1\mu\text{m}$ e $17\mu\text{m}$, com média igual a $7,89\pm 0,22\mu\text{m}$. As maiores porcentagens de fibras foram observadas entre as freqüência 4 e $12\mu\text{m}$, o que corresponde a 86,22% do total. As demais fibras, 13,78% restantes, estavam distribuídas nas outras classes de freqüências (Figura 23).

Quanto ao grupo esmagamento, fibras mielínicas apresentaram o diâmetro variando entre 1µm e 17µm, com média igual a $6,42 \pm 0,16\mu\text{m}$. As maiores porcentagens de fibras foram observadas entre as frequências 3 e 9 µm, o que corresponde a 77,96% do total. Já as outras fibras que completam este grupo denotam 22,04% (Figura 23).

As amostras derivadas dos animais do grupo esmagamento + DMEM obtiveram o DF variando entre 1µm e 16µm, atingindo a média de $5,98 \pm 0,27\mu\text{m}$. Os intervalos de frequência com mais ocorrência apareceram entre 3 e 9µm, representando 77,69% das fibras. O restante consiste de 22,31% do total (Figura 23).

No grupo esmagamento + CTM, o DF variou entre 1µm e 17µm, com média de $6,67 \pm 0,14\mu\text{m}$. A maioria das fibras mielínicas encontraram-se nos intervalos de frequência 3 a 10µm, o que corresponde a 83,41%. As fibras nos outros intervalos de frequência representam 16,59% do total (Figura 23).

Com relação à análise estatística intergrupos, não houve diferença significativa entre os grupos esmagamento, esmagamento + DMEM e esmagamento + CTM. Porém esses três grupos apresentaram diferenças em relação aos de nervos contralaterais à lesão.

O grupo esmagamento foi diferente do contralateral nos intervalos de frequência de 3µm (**), 4 µm (***) , 11µm (**) e 12µm (***) .

Já o grupo esmagamento + DMEM foi diferente estatisticamente do grupo contralateral nos intervalos de frequência de 2µm (*), 3µm (***) , 4 µm (**), 11µm (***) e 12µm (***) .

O grupo esmagamento + CTM diferiu do contralateral apenas nos intervalos de frequência de 3µm (**) e 12µm (***) .

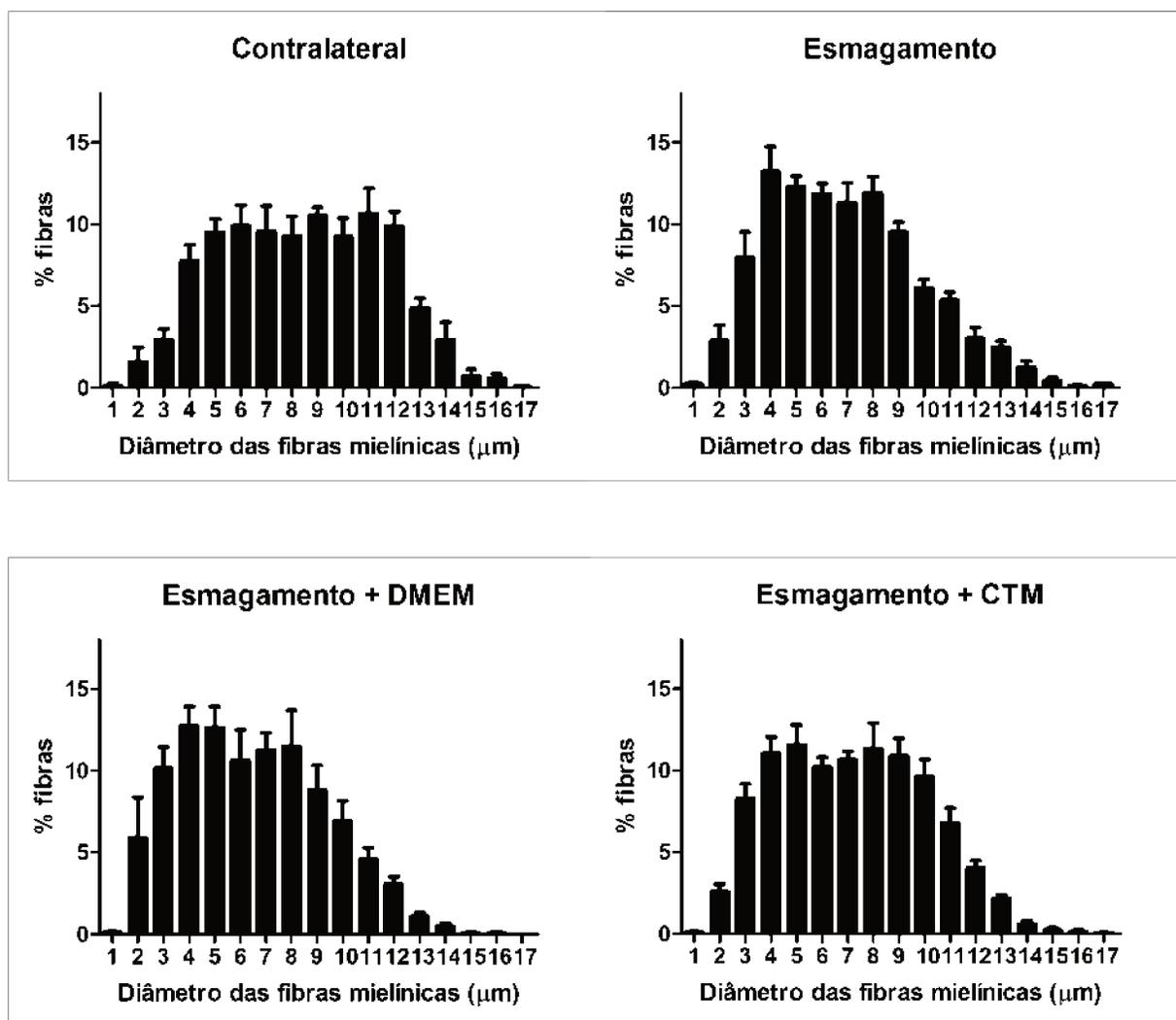


Figura 23. Distribuição de freqüência do diâmetro das fibras (DF) mielínicas nos diferentes grupos experimentais, 12 semanas após a lesão.

Diâmetro dos axônios mielínicos (DAM):

Os nervos do grupo contralateral apresentaram axônios mielínicos com diâmetros variando entre 1μm e 15μm, com média igual a $5,45 \pm 0,33\mu\text{m}$. As maiores porcentagens de axônios foram observadas entre as freqüência 3 e 9 μm, o que corresponde a 85,18% do total. Os demais axônios, 14,2% restantes, estavam distribuídas nas outras classes de freqüências (Figura 24).

Quanto ao grupo esmagamento, axônios mielínicos apresentaram o diâmetro variando entre 1 μ m e 15 μ m, com média igual a 4,53 \pm 0,16 μ m. As maiores porcentagens de axônios foram observadas entre as frequências 2 e 7 μ m, o que corresponde a 82,07% do total. Já os outros axônios que completam este grupo denotam 17,93% (Figura 24).

As amostras derivadas dos animais do grupo esmagamento + DMEM obtiveram o DAM variando entre 1 μ m e 14 μ m, atingindo a média de 4,08 \pm 0,21 μ m. Os intervalos de frequência com mais ocorrência apareceram entre 2 e 7 μ m, representando 84,47% das fibras. O restante consiste de 15,53% do total (Figura 24).

No grupo esmagamento + CTM, o DF variou entre 1 μ m e 15 μ m, com média de 4,72 \pm 0,24 μ m. A maioria dos axônios mielínicos encontraram-se nos intervalos de frequência 2 e 8 μ m, o que corresponde a 87,83%. Os axônios nos outros intervalos de frequência representam 12,17% do total (Figura 24).

Com relação à análise estatística observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos, com exceção do grupo esmagamento + DMEM em relação ao grupo contralateral.

Já o grupo esmagamento + DMEM foi diferente estatisticamente do grupo contralateral nos intervalos de frequência de 2 μ m (**), 3 μ m (*) e 8 μ m (*).

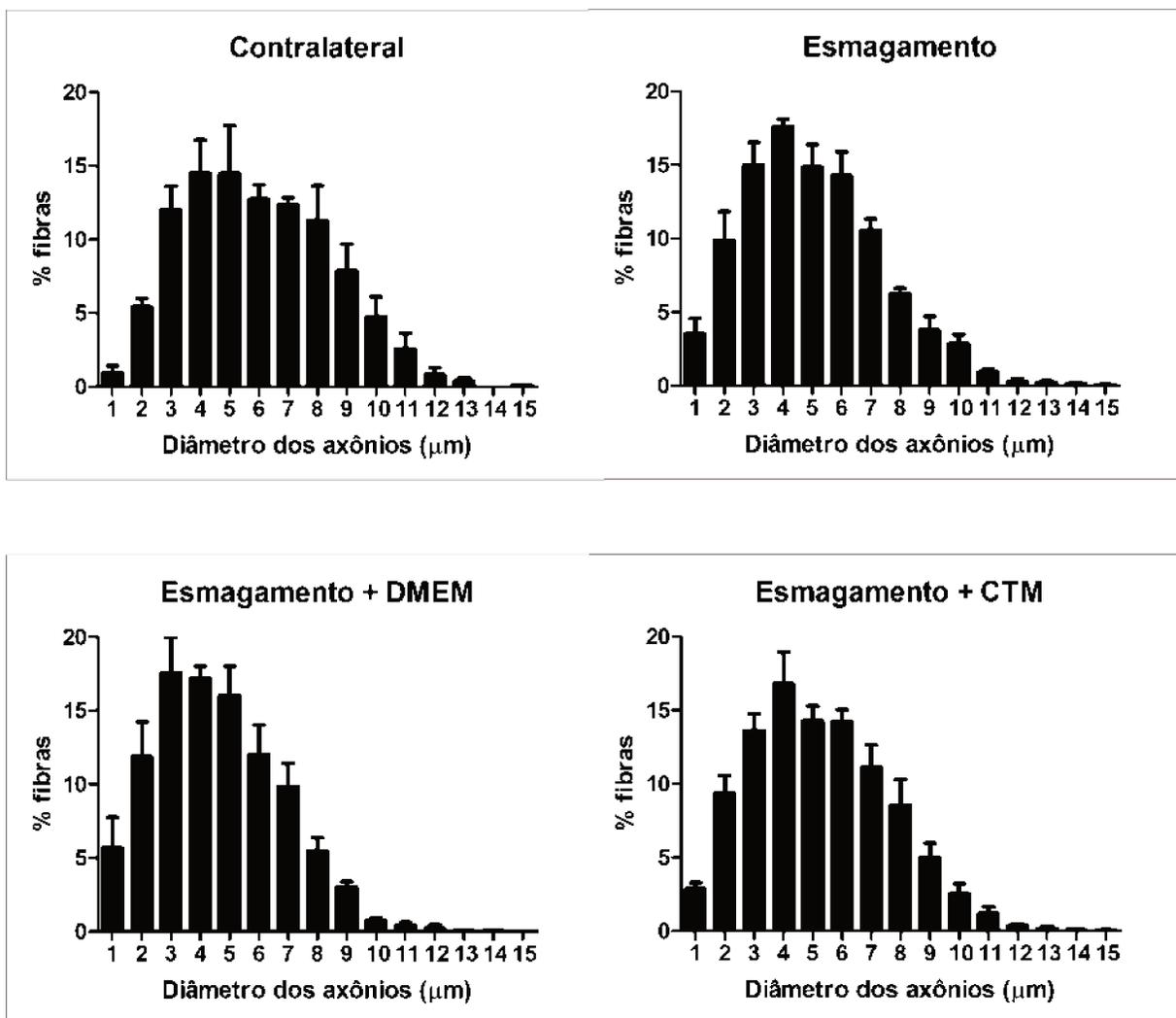


Figura 24. Distribuição de freqüência do diâmetro dos axôniosmielínicos (DAM) nos diferentes grupos experimentais, 12 semanas após a lesão.

Espessura da bainha de mielina (EBM):

Os nervos do grupo contralateral apresentaram espessura da bainha de mielina variando entre 0,2μm e 3μm, com média igual a $1,22 \pm 0,09\mu\text{m}$. As maiores porcentagens foram observadas entre as freqüência 0,6 a 1,8μm, o que corresponde a 77,79% do total. As demais classes de espessura, 22,21% restantes, estavam distribuídas nas outras classes de freqüências (Figura 25).

Quanto ao grupo esmagamento, axônios mielínicos apresentaram espessura da bainha de mielina variando entre 0,2 μ m e 3 μ m, com média igual a 0,95 \pm 0,05 μ m. As maiores porcentagens foram observadas entre as freqüência 0,4 a 1,4 μ m, o que corresponde a 83,11% do total. Já as outras fibras que completam este grupo denotam 16,89% (Figura 25).

As amostras derivadas dos animais do grupo esmagamento + DMEM obtiveram a EBM variando entre 0,2 μ m e 3 μ m, atingindo a média de 0,95 \pm 0,06 μ m. Os intervalos de freqüência com mais ocorrência apareceram entre 0,4 a 1,6 μ m, representando 88,39% das fibras. O restante consiste de 11,61% do total (Figura 25).

No grupo esmagamento + CTM, a EBM variou entre 0,2 μ m e 3 μ m, com média de 0,97 \pm 0,09 μ m. A maioria das espessuras encontraram-se nos intervalos de freqüência 0,4 a 1,4 μ m, o que corresponde a 80%. As fibras nos outros intervalos de freqüência representam 20% do total (Figura 25).

Com relação à análise estatística intergrupos, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos esmagamento, esmagamento + DMEM e esmagamento + CTM. Porém esse três grupos apresentaram diferenças em relação ao grupo de nervos contralaterais à lesão.

O grupo esmagamento foi diferente do contralateral na espessura de mielina no intervalo de 0,6 μ m (**).

Já o grupo esmagamento + DMEM foi diferente estatisticamente do grupo contralateral na espessura de mielina nos intervalos de freqüência de 0,4 μ m (***) e 0,6 μ m (**).

O grupo esmagamento + CTM diferiu do contralateral na espessura de mielina nos intervalos de freqüência de 0,4 μ m (*) e 0,6 μ m (**).

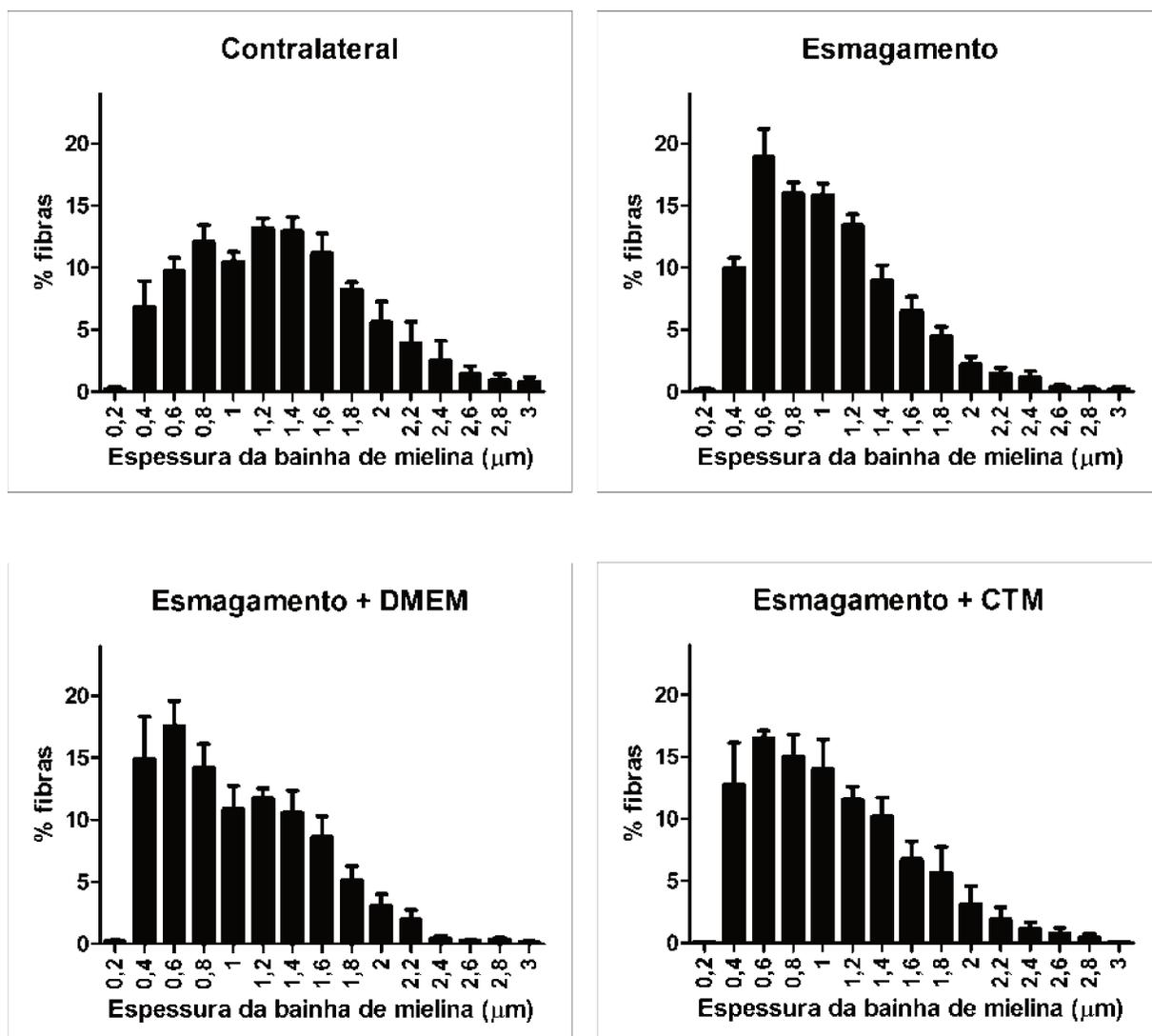


Figura 25. Distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina (EBM) nos diferentes grupos experimentais, 12 semanas após a lesão.

Razão "g" (RZG):

Os nervos do grupo contralateral apresentaram razão "g" variando entre 0,2 e 1, com média igual a $0,68 \pm 0,02$. As maiores porcentagens foram observadas entre as frequências 0,6 a 0,9 o que corresponde a 93,67% do total. As demais classes de espessura, 6,33% restantes, estavam distribuídas nas outras classes de frequência (Figura 26).

Quanto ao grupo esmagamento, axônios mielínicos apresentaram espessura da bainha de mielina variando entre 0,1 μ m e 1 μ m, com média igual a 0,70 \pm 0,02. As maiores porcentagens foram observadas entre as frequências 0,6 a 0,9, o que corresponde a 92,57% do total. Já as outras fibras que completam este grupo denotam 7,43% (Figura 26).

As amostras derivadas dos animais do grupo esmagamento + DMEM obtiveram a EBM variando entre 0,1 e 1, atingindo a média de 0,67 \pm 0,01. Os intervalos de frequência com mais ocorrência apareceram entre 0,6 a 0,9, representando 89,89% das fibras. O restante consiste de 10,11% do total (Figura 26).

No grupo esmagamento + CTM, a EBM variou entre 0,1 e 1m, com média de 0,69 \pm 0,02. A maioria das espessuras encontraram-se nos intervalos de frequência 0,6 a 0,9, o que corresponde a 91,03%. As fibras nos outros intervalos de frequência representam 8,97% do total (Figura 26).

Com relação à análise estatística intergrupos não houve diferença significativa entre os grupos.

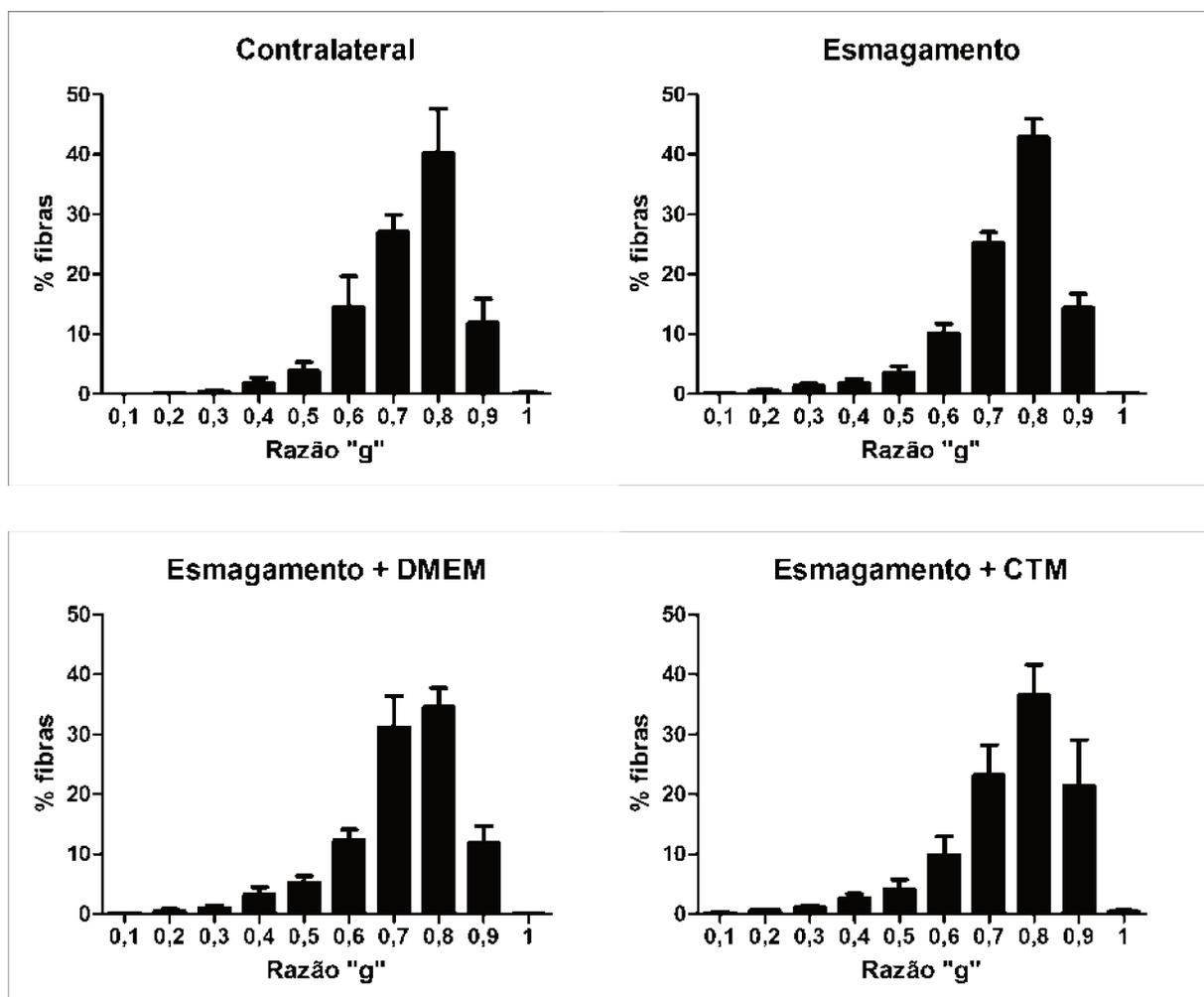


Figura 26. Distribuição de freqüência da razão "g" (RZG) nos diferentes grupos experimentais, 12 semanas após a lesão.

Desta forma, o grupo tratado com DMEM apresentou nervo com menor área e menor número de fibras mielínicas do que o tratado com CTM. A morfometria revelou fibras menores e com menor mielinização nos três grupos lesionados, em comparação ao nervo contralateral à lesão. Nessa análise não houve diferença estatística entre os diferentes tratamentos, embora seja possível observar uma tendência das distribuições de freqüência do grupo tratado com CTM serem mais semelhantes ao grupo contralateral que aos grupos esmagamento e esmagamento + DMEM (Figura 27).

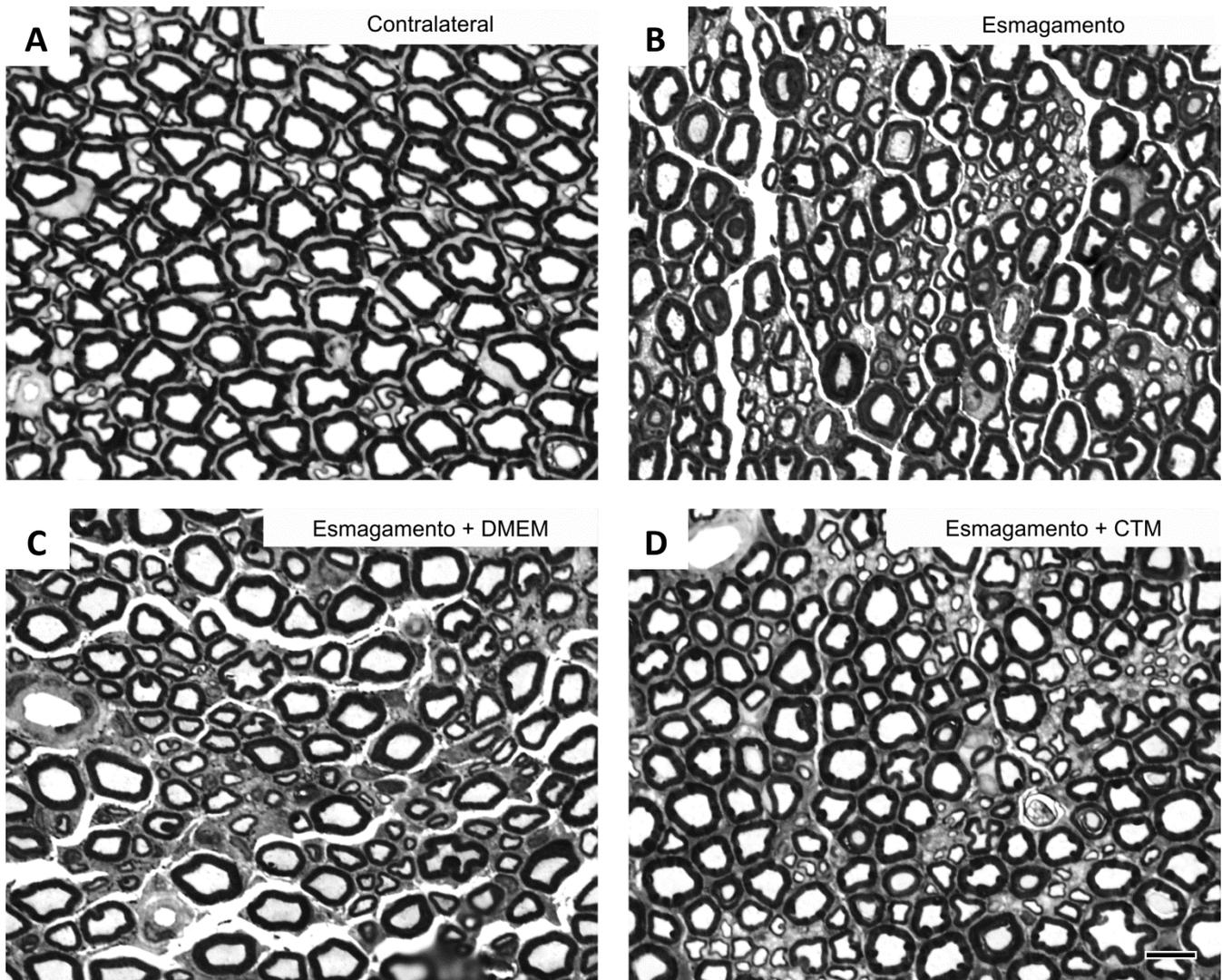


Figura 27. Vista panorâmica dos nervos observados por microscopia de luz, 12 semanas após a lesão. É possível notar diminuição do número de fibras mielínicas no grupo tratado com DMEM, em relação ao tratado com CTM. Ainda, todos os grupos lesados apresentam maior número de axônios com menor diâmetro e menor mielinização, comparados ao nervo contralateral. Escala: 10 μ m.

5.7 – FUNÇÃO MOTORA

A recuperação da função motora, após uma lesão nervosa, é produto da regeneração dos axônios.

Para o cálculo do índice funcional do nervo fibular (Figura 28), foram utilizados dois parâmetros: a distância entre o primeiro e o quinto dedo (largura da pata), bem como entre o terceiro dedo e o calcanhar (comprimento da pata).

O comprimento da pata não se mostrou diferente entre os grupos experimentais, durante as 12 semanas de análise. Já a largura da pata apresentou diferença entre os grupos esmagamento + DMEM e esmagamento + CTM, apenas 4 semanas após a lesão ($p < 0,001$) (Figura 28).

Como resultado da interação entre comprimento e largura da pata, dada pela fórmula do índice funcional do nervo fibular, o mesmo apresentou diferença entre os grupos esmagamento + DMEM e esmagamento + CTM, também apenas 4 semanas após a lesão ($p < 0,01$) (Figura 28).

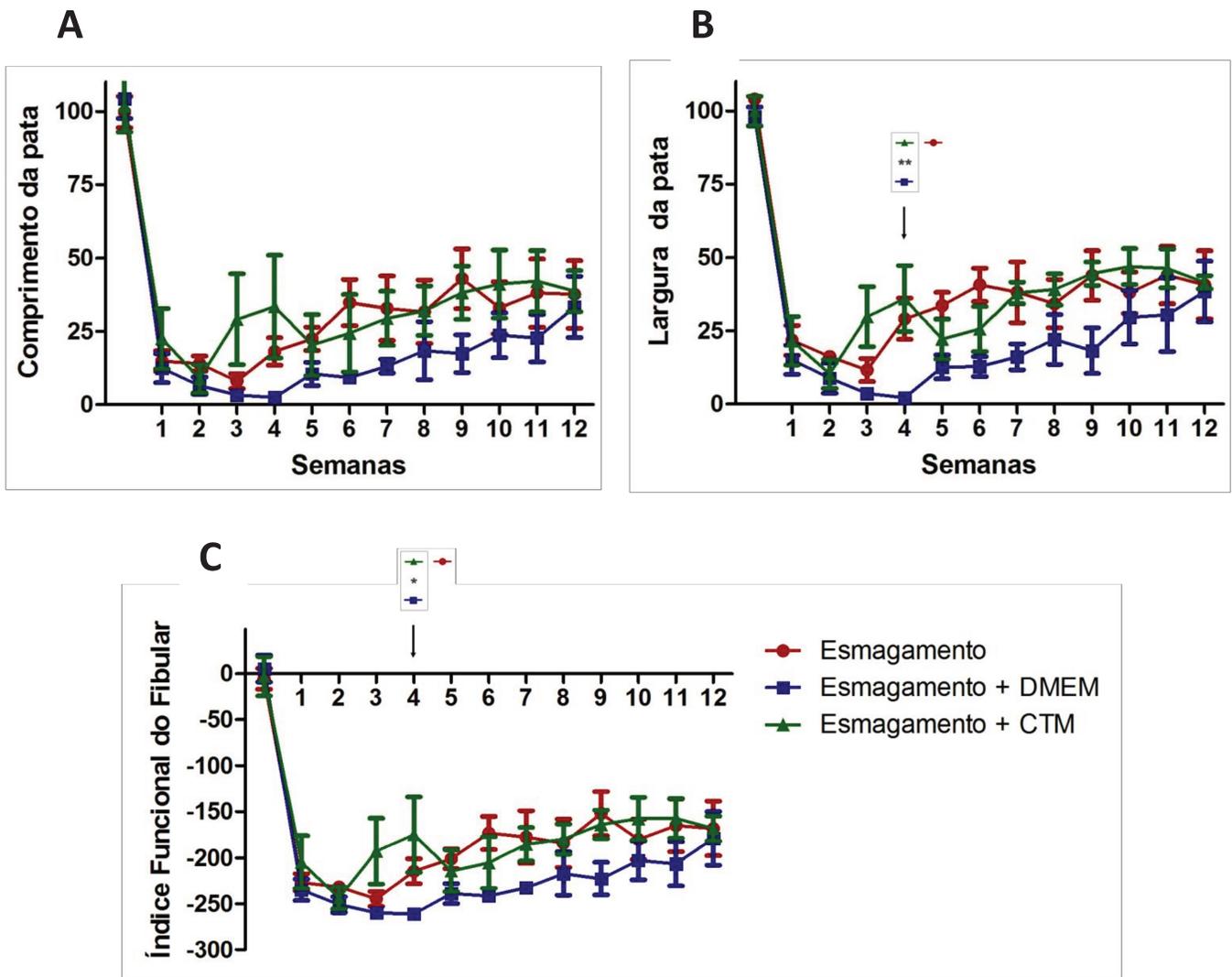


Figura 28. Análise da função motora dos animais 12 semanas após a lesão. O comprimento (A) e largura (B) da pata são expressos na forma de razão percentual entre os valores ipsilateral / contralateral à lesão. O gráfico C representa valores do índice funcional do nervo fibular. É possível observar diferença significativa entre os grupos tratados com DMEM e com CTM, na quarta semana, quanto à largura da pata e índice funcional do nervo fibular.

Foram também analisadas a máxima pressão exercida pela pata (Figura 29) e o comprimento da passada (Figura 30) dos membros posteriores, dos animais dos três grupos, com sobrevivência de 12

semanas. Os dados são expressos na forma de razão percentual entre os valores ipsilateral / contralateral à lesão.

O tratamento se mostrou significativamente positivo para a máxima pressão exercida pelas patas posteriores ($p=0,0063$). O grupo esmagamento + DMEM foi pior que do grupo esmagamento 5 e 6 semanas após a lesão e pior que o grupo esmagamento + CTM 3, 5 e 6 semanas após a lesão (Figura 29).

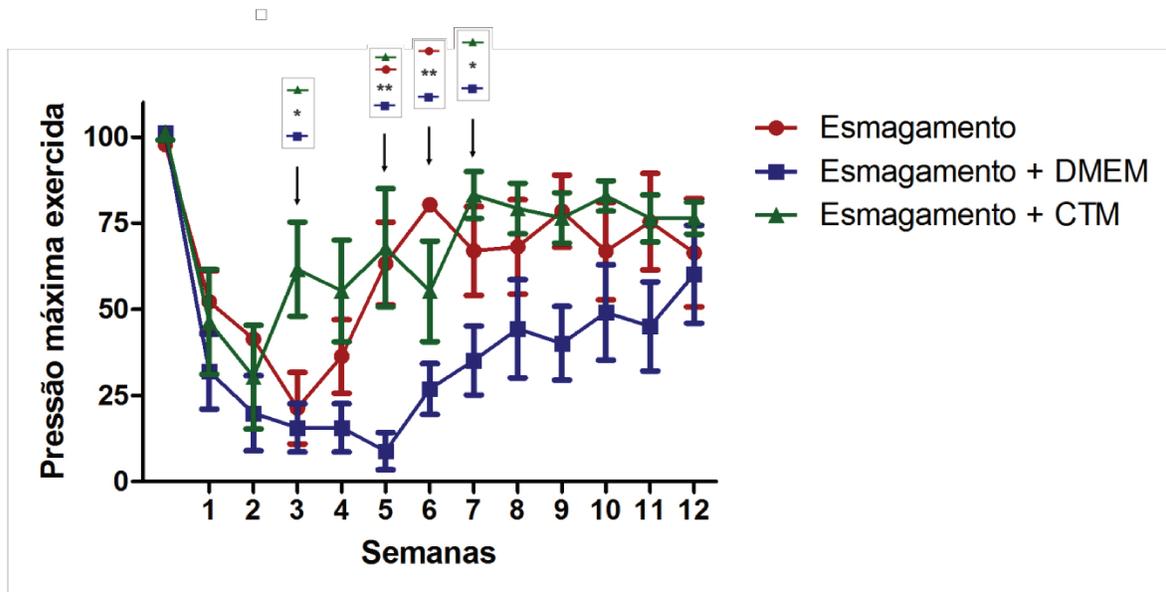


Figura 29. Análise da função motora dos animais 12 semanas após a lesão. Representação gráfica dos valores da razão ipsi/contralateral referente à pressão máxima exercida pela pata.

O tratamento se mostrou significativamente eficaz em relação à recuperação do comprimento da passada ($p=0,0029$). O grupo esmagamento + DMEM foi pior que o grupo esmagamento, 4 e 6 semanas após a lesão e pior que o grupo esmagamento + CTM nos mesmos períodos (Figura 30).

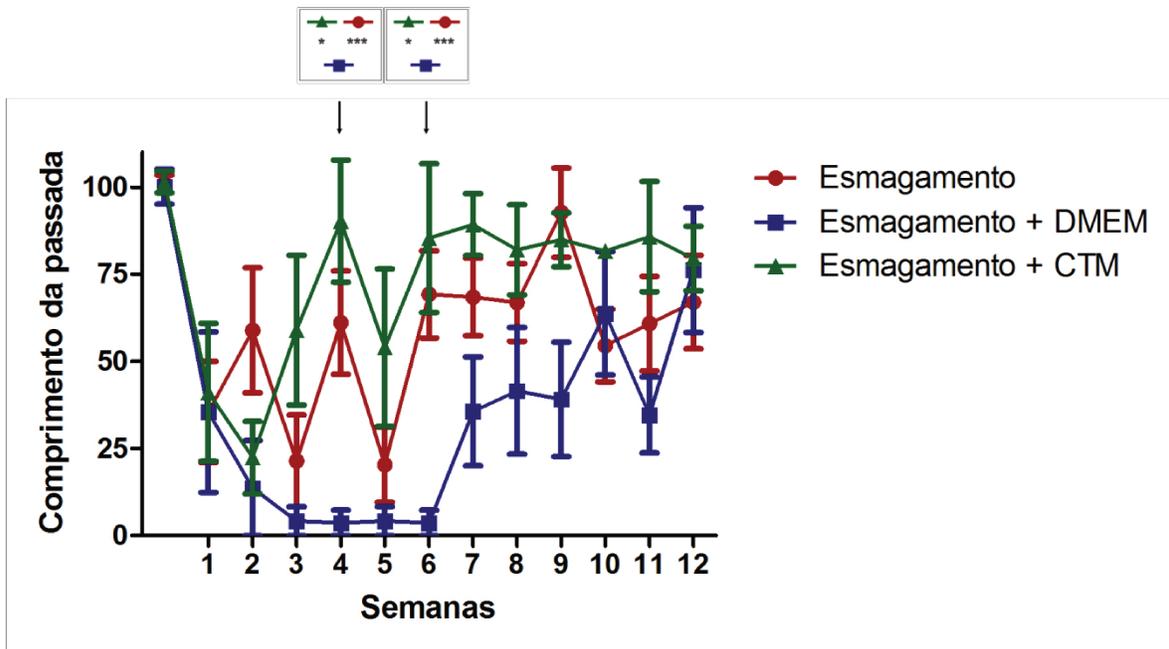


Figura 30. Análise da função motora dos animais 12 semanas após a lesão. Representação gráfica da razão ipsi/contralateral referente ao comprimento da passada.

6. Discussão

6.1 - CTM E A SOBREVIVÊNCIA NEURONAL

Experimentalmente, a degeneração neuronal pode ser induzida, em motoneurônios medulares, através da avulsão ou esmagamento de raízes ventrais na superfície da medula espinal. Ambas as lesões têm efeito nos respectivos segmentos da medula espinal, havendo degeneração de axônios motores, perda de sinapses, deterioração de conexões locais segmentares, morte de células nervosas e reações em células não neuronais, com a formação de uma cicatriz inibidora do crescimento axonal, a chamada cicatriz glial (Carlstedt, 2008).

Com a avulsão da raiz, a perda de conexão do motoneurônio com seu alvo periférico gera interrupção de fornecimento aos motoneurônios, de fatores neurotróficos produzidos pelo alvo, que juntamente com o trauma vascular levam à excitotoxicidade, o que drasticamente reduz o número de motoneurônios até cerca de 80% da população normal, dentro das primeiras duas semanas após a lesão (Koliatsos et al, 1994). O tipo de injúria é de grande importância para a quantidade de células que degeneram. No presente estudo, em que a lesão (esmagamento) é menos severa que a avulsão obtivemos, após quatro semanas, um menor índice de morte neuronal comparativamente à avulsão, onde cerca de 51% dos neurônios degeneraram. Tal resultado era esperado e indica que o modelo experimental é adequado para a investigação dos efeitos retrógrados resultantes da axotomia proximal por compressão.

A forma de morte dos motoneurônios depende de vários fatores. A opinião consensual é que tanto a morte celular programada quanto a necrose possam contribuir para a morte neuronal (Li et al., 1998; Wu, 2000; Chu e Wu, 2009). Motoneurônios avulsionados mostram danos necróticos, como a desintegração da membrana celular, ativação de macrófagos e ativação do sistema complemento durante a fase inicial após a lesão (Wu, 2000; Ohlsson e Havton, 2006, Chu e Wu, 2009). Na fase posterior, motoneurônios com dano são caracterizados por morte por apoptose, pela fragmentação do DNA, cromatólise, núcleo atrófico, tamanho reduzido da soma, acúmulo de neurofilamentos fosforilados no pericário e teste de TUNEL positivo (Koliatsus et al., 1994; Martin et al., 1999; Wu,

2000; Chu e Wu, 2009). Outros mecanismos que conduzem à morte do motoneurônio, tais como a resposta inflamatória à axotomia, por meio de ativação da microglia por citocinas, também têm sido descrito (Olsson et al., 2000).

Motoneurônios axotomizados aumentam a expressão de genes e proteínas relacionados com a sobrevivência e regeneração. Já os motoneurônios avulsionados, adotam vias de apoptose, superexpressam genes que remodelam o ambiente extracelular para regeneração e clivam pró-neurotrofinas para modular positivamente os seus efeitos benéficos (Hu et al., 2002; Chu e Wu, 2009). Redução nos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) também protege as células de morte celular por excitotoxicidade, dependente deste tipo de receptor (Piehl et al., 1995; Rameau et al., 2003; Chu e Wu, 2009). Expressão de vários fatores tróficos (Hammarberg et al., 1998; Chu e Wu, 2009) e seus receptores nos motoneurônios lesados sugerem que as células tentam sobreviver e se regenerar. A expressão de fatores neurotróficos é fortemente induzida como parte da resposta inflamatória mediada pela infiltração de macrófagos e ativação e liberação de citocinas (Korsching, 1993; Gu et al., 2005).

Fatores neurotróficos são moléculas que têm impacto significativo em eventos de desenvolvimento, como a sobrevivência celular, diferenciação e crescimento (Snider e Johnson, 1989; Chu e Wu, 2009). Proporcionar substâncias neurotróficas aos pacientes com lesão de raízes nervosas pode ser uma opção para resgatar neurônios da medula espinal, antes que a conectividade com a periferia seja estabelecida. Contudo, a produção de fatores neurotróficos em larga escala, bem como seus significativos efeitos colaterais quando administrados em grandes quantidades, dificulta sua utilização clínica. Além disso, há necessidade de um gradiente próximo-distal que possibilite a quimiotaxia para um crescimento guiado dos axônios em regeneração, inclusive para que estes deixem o território do SNC e se desenvolvam no SNP (raízes nervosas e nervos espinais, por exemplo).

Nesse sentido, CTM sintetizam vários fatores de crescimento neurotróficos e angiogênicos, incluindo BDNF, GDNF, NGF, IGF, GM-CSF, FGF2, TGF, bFGF, HGF, angiopoietina e VEGF (Rubina

et al., 2009; Lopatina et al., 2011; Kalinina et al., 2011). Células injetadas localmente na área danificada podem também liberar microvesículas / exossomos que são enriquecidas em lipídios bioativos (esfingosina-1-fosfato) e podem promover, tanto a vascularização de órgãos danificados, quanto inibição de apoptose (Ratajczak et al., 2010).

Numerosos estudos demonstraram que o BDNF é um fator de sobrevivência potente para neurônios motores em desenvolvimento e lesados *in vitro* e *in vivo* (Oppenheim et al., 1992; Sendtner et al., 1992; Henderson et al., 1993; Koliatsos et al., 1993; Chu e Wu, 2009). Além disso, promove o brotamento e crescimento axonal (Novikov et al., 1997; Streppel et al., 2002; Boyd e Gordon, 2003; Chu e Wu, 2009).

O GDNF é um fator trófico derivado de nervos periféricos e músculo. É o fator mais potente até agora identificado, 75 vezes mais potente do que o BDNF em ensaio de sobrevivência de motoneurônios (Henderson et al., 1994; Chu e Wu, 2009). GDNF é capaz de regular negativamente nNOS em 2 e 4 semanas após avulsão e resgatar a maioria dos neurônios motores, quando aplicado antes de duas semanas, mas não após quatro semanas (Zhou et al., 2006; Chu e Wu, 2009). Essa neurotrofina também tem papel importante na promoção da regeneração axonal na lesão de nervo periférico. A injeção de AAV (adenovírus associado) que codifica o GDNF, no segmento avulsionado lombar, resgatou motoneurônios avulsionados e aumentou brotamentos, embora não tenha promovido a regeneração dos axônios na raiz reimplantada nem tenha promovido a recuperação funcional (Blits et al., 2004; Chu e Wu, 2009). Aplicação via intratecal, após avulsão e reimplante de raízes nervosas lombares, promoveu sobrevivência neuronal e regeneração (Bergerot et al., 2004; Chu e Wu, 2009).

Os mais estudados FGFs envolvidos na sobrevivência neuronal são o FGF-1 (FGF ácido) e FGF-2 (FGF básico). Estudos experimentais no SNC e SNP revelaram que FGF exógeno pode aumentar a sobrevivência de motoneurônios após injúria (Anderson et al., 1988; Haastert et al., 2006; Chu e Wu, 2009). FGF-2, o mesmo tipo secretado por CTM, pode promover sobrevivência a longo-prazo de motoneurônios intermédio-laterais e do corno ventral, porém a função não foi restabelecida,

mostrando que o FGF não contribui para a regeneração, apenas para a sobrevivência (Teng et al., 1999; Chu e Wu, 2009).

HGF foi descoberto como um fator neurotrófico e quimioatrativo axonal para motoneurônios espinais. Seus benefícios são atribuídos a supressão da caspase-1, iNOS e redução da gliose. HGF foi administrado em modelo de avulsão, por infecção adenoviral, promovendo maior sobrevivência neuronal (Hayashi et al., 2006; Chu e Wu, 2009).

Após injúria da medula espinal, ocorre diminuição do fluxo sanguíneo, com consequente diminuição da perfusão de oxigênio e nutrientes aos tecidos nervosos, degradando as funções do mesmo. Embora a hipóxia afete diretamente neurônios, ela também induz respostas fisiológicas de proteção, pela ativação de genes induzidos por hipóxia. Estes podem proteger a célula contra apoptose e recuperar o fluxo sanguíneo por neovascularização. Um importante fator angiogênico induzido por hipóxia é o VEGF, que também é conhecido por regular a neuroproteção. An et al., 2010 demonstraram que CTM produzem VEGF, sendo um importante elo para recuperação funcional após lesão. Esses resultados indicam o VEGF como o principal mediador de proteção neuronal contra hipóxia. VEGF pode, ainda, resgatar motoneurônios após exposição crônica à excitotoxicidade glutamatérgica, em cultura organotípica (Tolosa et al., 2008; Chu e Wu, 2009).

Uma outra interpretação para a neuroproteção, por terapia celular, é que as CTM tornariam os motoneurônios menos vulneráveis aos efeitos lesivos induzidos pela lesão. Um possível mecanismo de degeneração dos motoneurônios, após a lesão, está relacionado ao dano oxidativo mediado por peroxinitrito e ao acúmulo de neurofilamentos fosforilados (Martin et al., 1999). Tem-se relatado que a atividade da óxido nítrico sintase seja induzida em motoneurônios medulares após lesões, o que sugere um importante papel dessa enzima na iniciação da morte neuronal (Ruan et al., 1995). Além disso, foi visto que o tratamento de animais após avulsão, com vetores virais codificantes para BDNF e GDNF foi capaz de suprimir a atividade da óxido nítrico sintase e consequentemente diminuir a degeneração (Watabe et al., 2000; Sakamoto et al., 2003; Watabe et al., 2005). A produção de fatores

neurotróficos pelas CTM poderia contribuir para a diminuição da atividade desta enzima e, conseqüentemente, gerar neuroproteção.

6.2 – CTM E A PLASTICIDADE SINÁPTICA

A maioria dos motoneurônios axotomizados proximalmente reduzem o tamanho dos ramos dendríticos (Linda et al., 1992; Chu e Wu, 2009) e conexão com neurônios vizinhos, por sinapses excitatórias (Linda et al., 2000; Chu e Wu, 2009). Essas mudanças morfológicas deixam a célula em situação de pausa funcional, visando reparo (Cullheim et al., 2002; Chu e Wu, 2009).

Em nosso estudo, a terapia com CTM além de promover a sobrevivência dos motoneurônios, cujos axônios foram transecionados pelo esmagamento das raízes ventrais, influenciou na organização dos inputs sinápticos. Assim, os animais que receberam células tronco apresentaram uma significativa redução do destacamento das sinapses. Esse fato pode estar relacionado à produção de BDNF pelas CTM que, segundo Novikov et al. (2000), previne o destacamento de sinapses após avulsão e restabelece a frequência e a cobertura sináptica, após tratamento com BDNF exógeno. Apesar da presente terapia celular não prevenir a perda inicial das sinapses, a presença da maioria é mantida, até quatro semanas após a lesão. Uma outra possibilidade a ser considerada é que o tratamento com CTM reduz a reação astrogliar, a qual participa diretamente do destacamento das sinapses na superfície do motoneurônio (Hell et al., 2009). Desta forma, a atenuação da astrogliose reativa pode ser um dos mecanismos envolvidos na redução da eliminação sináptica.

A perda de inputs sinápticos no corpo neuronal acontece preferencialmente para os inputs excitatórios, deixando as células sob influência inibitória durante o processo de reparo. Esses eventos mostram uma mudança no metabolismo nos motoneurônios injuriados, passando este do papel de elemento final para a via motora para o estado onde o principal objetivo é sobreviver e produzir novos axônios (Carlstedt, 2009).

Os motoneurônios que sofreram injúrias estão destinados à morte como resultado de um aumento de sensibilidade às influências excitatórias, assim, pode-se resgatar um significativo número de motoneurônios através da redução de efeitos excitatórios (Mentis et al., 1993; Greensmith e Vrbova, 1996). Nesse sentido, Pinter et al. (2010) propuseram, em seu estudo, o uso da droga riluzole (2-amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole), que é um componente que age no bloqueio de canais de Na^+ e Ca^{2+} dependente de voltagem, para ativar canais de K^+ , inibindo a liberação de glutamato pré-sináptico (Doble, 1996 ; Duprat et al., 2000). Riluzole foi capaz de efetivamente reduzir o dano neuronal isquêmico na medula espinal (Lang- Lazdunski et al., 1999) e prevenir a morte de motoneurônios *in vitro*, após exposição a agonistas glutamatérgicos (Estevez et al., 1995). Sua ação leva à redução considerável da excitabilidade dos neurônios lesados (Pinter et al., 2010).

No presente estudo, o esmagamento de axônios de motoneurônios muito proximalmente, fez com que grande extensão das terminações pré-sinápticas se retraíssem. Com o tratamento com células tronco, menos terminações foram destacadas porém, observou-se que esse destacamento não foi igual para inputs excitatórios e inibitórios. Os inputs excitatórios glutamatérgicos foram eliminados com mesma intensidade pelos três grupos analisados, enquanto que os inputs inibitórios GABAérgicos foram menos destacados pelo grupo tratado com células tronco. Ou seja, a preservação de sinapses no grupo tratado com CTM foi majoritariamente de inputs inibitórios. Se o contrário acontecesse, a célula ficaria mais exposta aos efeitos tóxicos do glutamato em excesso. Sendo assim, sugerimos o papel neuroprotetor das células tronco, contra a excitotoxicidade glutamatérgica, resultando em menor perda de células nervosas.

Essa proteção poderia ser explicada pela produção de BDNF pelas CTM. Novikov et al. (2000) administraram BDNF exógeno, notando que o mesmo sustenta principalmente terminações nervosas inibitórias, enquanto teve pouco efeito sobre terminações excitatórias. Assim, os resultados sugerem que o BDNF desloca o equilíbrio entre as sinapses excitatórias e inibitórias dos motoneurônios para um domínio de inibição. Já foi previamente relatado que neurotrofinas podem induzir a formação de sinapses inibitórias *in vitro* e modular a transmissão sináptica GABAérgica. No entanto, uma vez que

BDNF também melhora a transmissão glutamatérgica e pode despolarizar neurônios tão rapidamente quanto o neurotransmissor glutamato, a infusão de BDNF poderia induzir uma hiperativação de sinapses excitatórias, o que poderia, por sua vez, desencadear mecanismos compensatórios que conduzem a uma diminuição do número de terminais excitatórios e de um número aumentado de terminais inibitórios. Sendo assim, sugerimos que a produção de BDNF pelas CTM possa contribuir, conjuntamente com outros fatores, para modificar as circuitarias sinápticas junto ao motoneurônio lesionado, fazendo com que esses conservem mais inputs inibitórios, sofrendo menos com a excitotoxicidade.

Uma outra substância que poderia estar envolvida nesse contexto é o TGF- β , também secretado por CTM, que desempenha bem estabelecidos papéis como fator neurotrófico neuroprotetor. Descobertas recentes têm indicado que as vias de sinalização do TGF- β estão envolvidos na modulação da transmissão sináptica excitatória e inibitória no cérebro de mamíferos adultos. Sua sinalização está envolvida na regulação do crescimento de neuritos e na formação de sinapses (Krieglstein et al., 2011).

Uma outra forma de proteção de neurônios contra a excitotoxicidade, através da administração de CTM após lesão, foi descrita por Voulgari-Kokota et al. (2012). Essa neuroproteção se deu através da redução da sensibilidade neuronal para ligantes dos receptores glutamatérgicos e alteração da expressão gênica, sugerindo uma ligação entre os efeitos terapêuticos das CTM e a ativação da plasticidade no SNC injuriado.

6.3 – CTM, REGENERAÇÃO NERVOSA E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL

A cicatriz astrogliosa tem papel fundamental na falha dos axônios centrais regenerarem eficientemente após lesão. Isso contrasta com axônios periféricos que, dadas condições do microambiente, regeneram com relativa facilidade. A regeneração periférica depende da sobrevivência do neurônio axotomizado, entrada dos axônios em regeneração nos tubos endoneurais, que provêm via de orientação para o crescimento guiado, na presença de componentes da matriz extracelular

favoráveis, como laminina, que provê um substrato adequado para os axônios alongarem (Fraher, 1998). Eles também são influenciados por fatores tróficos derivados do nervo, ou do alvo, que podem aumentar a especificidade da reinervação e a influência trófica, como pelo NGF derivado de células de Schwann (Liuzzi e Tedeschi, 1991; Fraher, 1998).

No caso de esmagamento de raiz nervosa, o axônio deve regenerar inicialmente dentro do SNC, atravessando a cicatriz glial formada na borda da medula até encontrar a saída do SNC através da raiz ventral e, então, regenerar seu axônio rumo à reinervação do alvo, através do SNP. A regeneração periférica tem mais sucesso em casos de injúria por esmagamento, onde as fibras nervosas são interrompidas, porém não os tubos endoneurais. No SNC a situação é bem diferente, os axônios também tentam crescer novamente após a lesão, mas os brotamentos em regeneração são mal sucedidos em se desenvolver, devido a estímulos aversivos, provenientes de moléculas da matriz extracelular. A falta de um equivalente claramente definido dos tubos endoneurais no SNC tem sido tradicionalmente considerado um fator importante na conseqüente ausência de substrato orientado, que serviria como via de orientação para os axônios. A falha na regeneração também é parcialmente explicada pela inibição por produtos derivados da quebra da mielina. Processos astrocitários no local da injúria também impedem a regeneração (Fraher, 1998).

Regeneração, sem intervenção externa, parece ocorrer em certa medida, pelo menos em situações específicas. Um exemplo são os próprios axônios dos motoneurônios medulares que, mesmo em pequena porcentagem, conseguem atravessar o funículo anterior, em direção à zona de transição (Fraher, 1998). Após a transecção experimental no gato, alguns destes axônios se regeneraram através da cicatriz glial no SNC e repovoam raízes ventrais (Risling et al 1983, 1992, 1993; Carlstedt et al 1988; Fraher, 1998).

Dado que axônios motores tem que transpor uma longa distância para reinervar seu alvo, a sobrevivência à longo prazo é essencial. Assim, manter o nível de fatores tróficos é crucial para a sobrevivência do motoneurônio durante a regeneração. Fatores tróficos que podem melhorar o

brotamento em motoneurônios aumentam a probabilidade de um axônio se associar com células de Schwann na periferia. Idealmente, os fatores que proporcionam efeitos quimiotáticos ou neurotróficos para os axônios podem orientá-los para regenerar em direção ao alvo (Chu e Wu, 2009). Nesse sentido, a produção de BDNF, GDNF e IGF pelas CTM pode contribuir para a regeneração.

BDNF promove a mielinização *in vitro* (Yamauchi et al., 2004; Chu e Wu, 2009). A neutralização do BDNF endógeno reduz o comprimento de axônios regenerados e reduz axônios mielinizados, após esmagamento do nervo isquiático (Zhang et al., 2000; Chu e Wu, 2009). Por outro lado, a aplicação exógena de BDNF sustenta regeneração de axônios motores à longo prazo, em especial com a administração contínua (Boyd e Gordon, 2003; Chu e Wu, 2009). Uma melhora no diâmetro de axônios mielínicos e recuperação funcional foi documentada após administração de BDNF, após transecção periférica do nervo isquiático (Lewin et al., 1997; Lang et al., 2008).

A aplicação via intratecal de GDNF, após avulsão e reimplante de raízes nervosas lombares, promoveu sobrevivência neuronal e regeneração (Bergerot et al., 2004; Chu e Wu, 2009). Já o IGF tem poder sobre a sobrevivência neuronal bem pequeno, porém é bastante efetivo no crescimento axonal. A infusão de IGF, após o esmagamento do nervo isquiático em ratos adultos, aumentou a taxa de regeneração de axônios (Kanje et al., 1989; Near et al., 1992; Chu e Wu, 2009).

Adicionalmente aos fatores neurotróficos, um grupo de moléculas essenciais para o crescimento de neuritos e, conseqüentemente para a sobrevivência dos motoneurônios após uma lesão proximal, são os componentes da matriz extracelular. No nervo periférico, tem sido atribuído à laminina um importante papel na aderência de substratos para o crescimento do axônio. Desta forma, a presença da laminina é um fator preponderante para a capacidade regenerativa do neurônio. Interessantemente, ocorre uma regulação positiva da produção de receptores para as lamininas no caso da avulsão de raízes ventrais (Hammarberg et al., 2000). Recentemente, Carvalho et al. (2008) demonstraram que as CTM expressam laminina *in vivo*. Este achado poderia ser um indicativo de outra forma pela qual as CTM contribuem para a sobrevivência dos motoneurônios e regeneração dos

mesmos, como proposto no presente estudo. Assim, experimentos complementares serão necessários para investigar tal hipótese.

Além de promover ambiente com componentes favoráveis a regeneração, Wright e colaboradores (2007), demonstraram que CTM podem promover o crescimento de neuritos através de substratos inibitórios da regeneração, através de mecanismos mediados por contato. A adesão das CTM tanto com os neuritos em crescimento, quanto com as substâncias inibitórias pareceram desempenhar um papel nesse processo. A frequência de crescimento de neuritos foi proporcional ao número de CTM situadas na matriz com condroitin-sulfato. Observou-se, ainda, que CTM depositam, durante a migração celular, fragmentos de célula sobre o condroitin-sulfato, mascarando os efeitos do mesmo, permitindo que neuritos posteriormente crescessem por ali, formando um caminho permissivo no substrato inibitório. Outra possibilidade é que as CTM possam ter depositado moléculas de matriz permissivas através do substrato inibitório, como fibronectina e colágeno tipo I. Alternativamente, CTM podem ter degradado as moléculas inibitórias. CTM de humanos expressam metaloproteases de matriz tipo I e metaloprotease 2 e sua atividade enzimática está envolvida na degradação da matriz durante a migração dessa célula.

Ainda, CTM modificam o ambiente inflamatório na fase aguda e reduzem efeitos da cicatriz glial inibitória na fase subaguda e crônica, promovendo um ambiente permissivo à extensão axonal (Wright et al., 2011). CTM têm propriedades imunossupressivas, promovendo a redução da resposta inflamatória aguda à lesão medular, reduzindo a formação de cavitações e diminuição da reatividade de astrócitos e microglia/macrófagos (Abrams et al., 2009; Wright et al., 2011), o que pode levar à recuperação funcional seguida da lesão.

No presente estudo, o poder regenerativo das células tronco mesenquimais foi evidenciado, através da maior quantidade de fibras mielínicas, conseqüente maior área de nervo e melhor recuperação da função motora. Ainda, na análise morfométrica, foi observado que o padrão

morfológico das fibras nervosas do grupo tratado com CTM era mais semelhante ao do grupo contralateral do que dos demais grupos que sofreram esmagamento.

Essa melhora se fez presente quando em comparação ao grupo tratado com DMEM. Atribuímos isso a forma de administração das células adotada nesse trabalho. A injeção diretamente na medula foi escolhida por suprir com um grande número de células o território de lesão, logo após a injúria. Em termos de neuroproteção, esse grande *pool* de células foi bastante eficiente em prevenir a morte de neurônios, diminuir a influência negativa da excitotoxicidade glutamatérgica e prevenir o destacamento de sinapses. Porém, observando-se a regeneração, a lesão secundária causada pela injeção parece ter tornado o cenário regenerativo dentro do SNC mais difícil.

Um aspecto fundamental para a sobrevivência neuronal, após axotomia proximal, é que o aporte de fatores neurotróficos deve ser precoce. O tratamento imediato à lesão pode evitar a morte dos motoneurônios após avulsão (Wu et al., 2003; Gu et al., 2005), ao passo que o tratamento tardio (4 semanas após a avulsão) não reverte a taxa de sobrevivência dessas células (Gu et al., 2005). A liberação de fatores neurotróficos por vetor viral apresenta um ligeiro atraso na disponibilidade de fator trófico, diminuindo sua eficiência. Dessa forma, a liberação local de fatores neurotróficos, por CTM, pode fornecer imediatamente os fatores para os motoneurônios afetados. Além disso, é sabido que, além da produção desses fatores, as CTM contribuem de outras diversas maneiras para a regeneração dos axônios lesionados, sendo, portanto um tratamento que age de diversas formas, promovendo recuperação tecidual e funcional após uma lesão. Contudo, como a injeção diretamente na medula, da forma aqui apresentada, refletiu negativamente sobre a recuperação funcional, no grupo DMEM, entendemos que será importante aprimorar a técnica, bem como avaliar outras formas de administração.

A administração por injeção intra-venosa foi feita por Osaka et al. (2010), promovendo melhora funcional após injúria à medula espinal. Tendo em vista, que o transplante de células por injeção no parênquima resulta em injúria tecidual associada a riscos cirúrgicos e que a injeção intravenosa tem baixa eficiência e especificidade, Lundberg et al. (2009) propuseram a administração intra-arterial

(através da artéria carótida) no SNC injuriado, com método minimamente invasivo e significativamente mais eficiente que a via intravenosa, sem causar efeitos colaterais.

Ainda, tendo em vista a ação aguda das células, em termos da recuperação motora, representada pelo índice funcional do nervo fibular (efeito observado apenas na quarta semana após a lesão), seria interessante que novas células fossem administradas, uma ou duas semanas após a lesão, no sentido de manter os estímulos regenerativos.

7. Conclusões

- A administração de CTM no local da injúria promoveu neuroproteção, aumentando a sobrevivência neuronal após o esmagamento de raízes motoras;

- As CTM promoveram preservação dos inputs sinápticos justapostos ao corpo neuronal dos motoneurônios axotomizados sendo tal preservação majoritariamente de inputs inibitórios, refletindo possivelmente na proteção dos motoneurônios contra a excitotoxicidade glutamatérgica;

- As CTM promoveram regeneração, quando comparado com o grupo tratado com DMEM, apresentando maior número de fibras mielínicas, maior área de nervo periférico e ainda melhor recuperação funcional. Porém, essa diferença não se fez presente quando a comparação foi feita com o grupo que sofreu apenas esmagamento, mostrando possíveis efeitos deletérios da forma de administração das células, através de injeção na medula;

- O efeito regenerativo das células na recuperação funcional se mostrou mais agudo, tendo maior eficiência na quarta semana após a lesão.

8. Referências bibliográficas

Abe, K. (2000). Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1393-1408.

Abercrombie, M., Johnson, M. L. (1946). Quantitative histology of Wallerian degeneration: I. Nuclear population in rabbit sciatic nerve. *J Anat.* 80: 37-50.

Abrams, M.B., Dominguez, C., Pernold, K., Reger, R., Wiesenfeld-Hallin, Z., Olson, L., Prockop, D. (2009). Multipotent mesenchymal stromal cells attenuate chronic inflammation and injury induced sensitivity to mechanical stimuli in experimental spinal Cord injury. *Restor Neurol Neurosci* 27: 301 – 321.

An, S. S., Jin, H. L., Kim, K. N., Kim, D. S., Cho, J., Liu, M. L., Oh, J. S., Yoon do, H., Lee, M. H., Ha, Y. (2010). Neuroprotective effect of combined hypoxia-induced VEGF and bone marrow-derived mesenchymal stem cell treatment. *Childs Nerv Syst* 26:323–331.

Anderson, K. J., Dam, D., Lee, S., Cotman, C. W. (1988). Basic fibroblast growth factor prevents death of lesioned cholinergic neurons in vivo. *Nature*, 332 (6162): 360-361.

Azari, M. F., Mathias, L., Ozturk, E., Cram, D. S., Boyd, R. L., Petratos, S. (2010). Mesenchymal stem cells for treatment of CNS injury. *Current neuropharmacology* 8: 316-323.

Bain, J. R., Mackinnon, S. E., Hunter, D. A. (1989). Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*, 83: 129–138.

Barnes, D. M. (1985). What makes nerves regenerate? Many experimental strategies revolve around a central issue: What conditions promote regeneration and functional recovery in mammalian nerves? *Science* 230(4729): 1024-1025.

Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. (2007). *Neuroscience: exploring the brain*, 3 edição: Lippincott Williams e Wilkins.

Bergerot, A., Shortland, P. J., Anand, P., Hunt, S. P., Carlstedt, T. (2004). Co-treatment with riluzole and GDNF is necessary for functional recovery after ventral root avulsion injury. *Exp. Neurol* 187 (2): 359-366.

Blits, B., Carlstedt, T. P., Ruitenberg, M. J., de Winter, F., Hermens, W. T., Dijkhuizen, P. A., Claasens, J. W., Eggers, R., Vander Sluis, R., Tenenbaum, L., Boer, G. J., Verhaagen, J. (2004). Rescue and sprouting of motoneurons following ventral root avulsion and reimplantation combined with

intraspinal adeno-associated viral vector-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor or brain-derived neurotrophic factor. *Exp. Neurol* 189 (2): 303-316.

Boyd, J. G., Gordon, T. (2003). Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo. *Exp. Neurol* 183(2): 610-619.

Bradbury, E. J., Moon, L. D., Popat, R. J., King, V. R., Bennett, G. S., Patel, P. N., Fawcett, J. W., McMahon, S. B. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416: 636 – 640.

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

Burg, M. A., Tillet, E., Timpl, R., Stallcup, W. B. (1996). Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. *J. Biol. Chem* 271: 26110 – 26116.

Cabanes, C., Bonilla, S., Tabares, L., Martinez, S. (2007). Neuroprotective effect of adult hematopoietic stem cells in a mouse model of motoneuron degeneration. *Neurobiol Dis* 26: 408-418.

Carlson, S. L. (1999). Acute inflammatory response in the spinal cord following impact injury. *Exp Neurol* 151:77–88.

Carlstedt, T., Aldskogius, H., Rosario, C. (1988). Mammalian root-spinal cord regeneration. *Progress in Brain Research* 78: 225±229.

Carlstedt, T. (2008). Root repair review: Basic science background and clinical outcome. *Restorative Neurology and Neuroscience* 26: 225–241.

Carlstedt, T. (2009). Nerve Root Replantation. *Neurosurg Clin N Am* 20: 39–50.

Carvalho, S., Cortez, E., Stumbo, A. C., Thole, A., Caetano, C., Marques, R., Pelajo-Machado, M., Porto, L. C., Carvalho, L. (2008). Laminin expression during bone marrow mononuclear cell transplantation in hepatectomized rats. *Cell Biol Int* 32: 1014-1018.

Chopp, M., Zhang, X. H., Li, Y., Wang, L., Chen, J., Lu, D., Lu, M., Rosenblum, M. (2000). Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 11: 3001-3005.

Chu, T., Wu, W. (2009). Neurotrophic factor treatment after spinal root avulsion injury. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 9: 40-55.

Cizkova, D., Kakinohana, O., Kucharova, K., Marsala, S., Johe, K., Hazel, T., Hefferan, M. P., Marsala, M. (2007). Functional recovery in rats with ischemic paraplegia after spinal grafting of human spinal stem cells. *Neuroscience* 147: 546-560.

Crigler, L., Robey, R. C., Asawachaicharn, A., Gaupp, D., Phinney, D. G. (2006). Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol* 198: 54-64.

Cullheim, S., Wallquist, W., Hammarberg, H., Linda, 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 Res Brain Res Rev* 40: 309-316.

Delgado-Garcia, J. M., Del Pozo, F., Spencer, R. F., Baker, R. (1988). Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat--III axotomized motoneurons. *Neuroscience* 24: 143-160.

Delorme, B., Ringe, J., Gallay, N., Levern, Y., Kerboeuf, D., Jorgensen, C., Rosset, P., Sensebe, L., Layrolle, P., Haupl, T., Charbord, P. (2007). Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* 111(5):2631-5.

Doble, A. (1996). The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 47: S233–S241.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement *Cytotherapy* 8: 315-317.

Duprat, F., Lesage, F., Patel, A.J., Fink, M., Romey, G., Lazdunski, M. (2000). The neuroprotective agent riluzole activates the two p domain K_p channels TREK-1 and TRAAK. *Mol Pharmacol* 57: 906–912.

Estevez, A. G., Stutzmann, J. M., Barbeito, L. (1995). Protective effect of riluzole on excitatory amino acid-mediated neurotoxicity in motoneuron enriched cultures. *Eur. J. Pharmacol* 280: 47–53.

Fazan, V. P. S., Ma, X., Chapleau, M. W., Barreira, A. A. (2002). Qualitative and quantitative morphology of renal nerves in C57BL/6J mice. *The anatomical record* 268: 399-404.

Ferrer-Alcon, M., Winkler-Hirt, C., Perrin, F. E., Kato, A. C. (2007). Grafted neural stem cells increase the life span and protect motoneurons in pmn mice. *Neuroreport* 18: 1463-1468.

Fraher, J. P. (1998). The transitional zone and CNS regeneration. *J Anat* 194: 161±182. (Fraher et al., 1998)

Goodgold, J., Eberstein, A. (1977). *Electrodiagnosis of Neuromuscular Diseases*, 2 edição. Baltimore, MD, Williams e Wilkins.

Greensmith, L., Vrbova, G. (1996). Motoneuron survival: a functional approach. *Trends Neurosci* 19: 450-455.

Gu, H., Chai, H., Zhang, J., Yao, Z., Zhou, L., Wong, W., Bruce, I. C., Wu, W. (2005). Survival, regeneration and functional recovery of motoneurons after delayed reimplantation of avulsed spinal root in adult rat. *Experimental Neurology* 192: 89 – 99.

Haastert, K., Lipokatic, E., Fischer, M., Timmer, M., Grothe, C. (2006). Differentially promoted peripheral nerve regeneration by grafted Schwann cells over-expressing different FGF-2 isoforms. *Neurobiol Dis* 21(1): 138-153.

Hamburger, V. (1958). Regression versus peripheral control of differentiation on motor hypoplasia. *Am J Anat* 102(3): 365-409.

Hammarberg H.; Risling M.; Hokfelt T.; Cullheim S.; Piehl F. (1998). Expression of insulin-like growth factors and corresponding binding proteins (IGFBP 1-6) in rat spinal cord and peripheral nerve after axonal injuries. *J Comp Neurol* 400 (1): 57-72.

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

Hayashi, Y., Kawazoe, Y., Sakamoto, T., Ojima, M., Wang, W., Takazawa, T. Miyazawa, D., Ohya, W., Funakoshi, H., Nakamura, T., Watabe, K. (2006). Adenoviral gene transfer of hepatocyte growth factor prevents death of injured adult motoneurons after peripheral nerve avulsion. *Brain Res* 1111 (1): 187-195.

Hell, R. C. R., Costa, M. M. S., Góes, A. M., Oliveira, A. L. R. (2009). Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. *Neurobiol Dis* 33:290-300.

Henderson C. E., Camu W., Mettling C., Gouin A., Poulsen K., Karihaloo M., Rullamas J., Evans T., McMahon S. B., Armanini M. P. (1993). Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature* 363 (6426): 266-270.

Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R. A., Simpson, L. C. (1994). GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266 (5187): 1062-1064.

Hofstetter, C. P., Schwarz, E. J., Hess, D., Widenfalk, J., El Manira, A., Prockop, D. J., Olson, L. (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci* 99: 2199–2204.

Hu J., Fink D., Mata M. (2002). Microarray analysis suggests the involvement of proteasomes, lysosomes, and matrix metalloproteinases in the response of motor neurons to root avulsion. *Eur J Neurosci* 16(8): 1409-1416.

Hubbard, R. D., Winkelstein, B. A. (2008). Dorsal root compression produces myelinated axonal degeneration near the biomechanical thresholds for mechanical behavioral hypersensitivity. *Experimental Neurology* 212: 482–489.

Huh, G. S., Boulanger, L. M., Du, H., Riquelme, P. A., Brotz, T. M., Shatz, C. J. (2000). Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290: 2155-2158.

Ide, C. (1996). Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res* 25(2): 101-121.

Kalinina, N. I., Sysoeva V. Yu., Rubina, K. A., Parfenova, Ye. V., Tkachuk. V. A. (2011). Mesenchymal Stem Cells in Tissue Growth and Repair. *Acta Nature* 3: № 4 (11).

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M. (2000). Principles of neural science, 4 edição: Mcgraw-hill.

Kanje, M., Skottner, A., Sjoberg, J., Lundborg, G. (1989). Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res* 486 (2): 396-398.

Karimi-Abdolrezaee, S., Billakanti, R. (2012). Reactive astrogliosis after spinal cord injury - beneficial and detrimental effects. *Mol Neurobiol* 46: 251-264.

Kobayashi, S., Yoshizawa, H., Yamada, S. (2004). Pathology of lumbar nerve root compression. Part2: morphological and immunohistochemical changes of dorsal root ganglion. *J. Orthop Res* 22: 180–188.

Koliatsos, V. E., Price, W. L., Pardo, C. A., Price, D. L. (1994). Ventral root avulsion: an experimental model for death of adult motor neurons. *J Comp Neurol* 342: 35-44.

Koliatsos V. E., Clatterbuck R. E., Winslow J. W., Cayouette M. H., Price D. L. (1993). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo . *Neuron* 10(3): 359-367.

Korsching, S. (1993). The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J. Neurosci* 13: 2739 - 2748.

Krieglstein, K., Zheng, F., Unsicker, K., Alzheimer, C. (2011). More than being protective: functional roles for TGF- β /activin signaling pathways at central synapses. *Trends in Neurosciences* vol. 34, No. 8.

Landon, D.N. e Halls, S. (1976). The myelinated nerve fiber. In: *The peripheral nerve*. Ed. D. N. Landon. London. Chapman and Hall, p. 1-105.

Lang, E. M., Schlegel, N., Reiners, K., Hofmann, G. O., Sendtner, M., Asan, E. (2008). single-dose application of CNTF and BDNF improves remyelination of regenerating nerve fibers after C7 ventral root avulsion and replantation. *Journal of neurotrauma* 25:384–400.

Lang-Lazdunski, L., Heurteaux, C., Vaillant, N., Widmann, C., Lazdunski, M. (1999). Riluzole prevents ischemic spinal cord injury caused by aortic crossclamping. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117: 881–889.

Leal-Filho, M. B. (2011). Spinal cord injury:from inflammation to glial scar. *Surg Neurol Int* 2:112.

Leskovaar, A., Moriarty, L. J., Turek, J. J., Schoenlein, I. A., Borgens, R. B. (2000). The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems. *J Exp Biol* 203: 1783 - 1795.

Lewin, S. L., Utley, D. S., Cheng, E. T., Verity, A. N., Terris, D. J. (1997). Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope* 107: 992–999.

Li, L., Houenou, L. J., Wu, W., Lei, M., Prevet, D. M., Oppenheim, R. W. (1998). Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice. *J Comp Neurol* 396 (2): 158-168.

Li, Y., Chen, J., Chen, X. G., Wang, L., Gautam, S. C., Xu, Y. X., Katakowski, M., Zhang, L. J., Lu, M., Janakiraman, N., Chopp, M. (2002). Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 59: 514-523.

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

Linda, H., Piehl, F., Dagerlind, A., Verge, V. M., 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.

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

Liuzzi, F. J., Tedeschi, B. (1991) Peripheral nerve regeneration. *Neurosurgical Clinics of North America* 2: 31±42.

Livesey, F. J.; Fraher, J. F. (1992). Experimental traction injuries of cervical spinal nerve roots; a scanning EM study of rupture patterns in fresh tissue. *Neuropathol Appl Neurobiol* 18: 376-386.

Lopatina, T., Kalinina n., Karagyaur M., Stambolsky D., Rubina K., Revischin A., Pavlova G., Parfyonova Y., Tkachuk V. (2011). Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *Plos one* 6(3): e17899. doi:10.1371/journal.pone.0017899.

Lu, P., Jones, L. L., Snyder, E. Y., Tuszynski, M. H. (2003). Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* 181: 115-129.

Lundberg, J., Le Blanc, K., Söderman, M., Andersson, T., Holmin, S. (2009). Endovascular transplantation of stem cells to the injured rat CNS. *Neuroradiology* 51: 661– 667.

Machado, A. (2000). *Neuroanatomia funcional*, 2 edição: Atheneu.

Mahmood, A., Lu, D., Chopp, M. (2004). Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 21: 33-39.

Martin, L. J., Kaiser, A., Price, A. C. (1999). Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. *J Neurobiol* 40: 185-201.

Mayhew, T. M., Sharma, A. K. (1984). Sampling schemes for estimating nerve fiber size II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J Anat* 139: 59-66.

Mazzer, P. Y. C. N., Barbieri, C. H., Mazzer, N., Fazan, V. P. S. (2008). Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. *Journal of Neuroscience Methods* vol. 173, no. 2, 249–258.

Mentis, G. Z., Greensmith, L., and Vrbova, G. (1993). Motoneurons destined to die are rescued by blocking N-methyl-D-aspartate receptors by MK-801. *Neuroscience* 54: 283–285.

Morgenstern, D. A., Asher, R. A., Fawcett, J. W. (2002). Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res* 137: 313 – 332.

Near, S. L., Whalen, L. R., Miller, J. A., Ishii, D. N. (1992). Insulin-like growth factor II stimulates motor nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci* 89(24): 11716-11720.

Novikov, L. N., Novikova, L. N., Holmberg, P., Kellerth, J. (2000). Exogenous brain-derived neurotrophic factor regulates the synaptic composition of axonally lesioned and normal adult rat motoneurons. *Neuroscience* 100: 171-181.

Novikov, L., Novikova, L., Kellerth, J. O. (1997). Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience* 79(3): 765-774.

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

Oliveira, A. L., Risling, M., Negro, A., Langone, F., Cullheim, S. (2002). Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. *J Comp Neurol* 447: 381-393.

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

Olsson, T., Lundberg, C., Lidman, O., Piehl, F. (2000). Genetic regulation of nerve avulsion-induced spinal cord inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 917: 186-196.

Olsson, M., Havton, L. A. (2006). Complement activation after lumbosacral ventral root avulsion injury. *Neurosci Lett* 394 (3): 179-183.

Oppenheim, R. W., Yin, Q. W., Prevet, D., Yan, Q. (1992). Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature* 360 (6406): 755-757.

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

Osaka, M., Honmou, O., Murakami, T., Nonaka, T., Houkin, K., Hamada, H., Kocsis, J. D. (2010). Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain research* 1343: 226– 235.

Peters, A., Palay, S. L., Webster, H. de F. *The fine structure of the nervous system: the neurons and sprouting cells.* Philadelphia, Sanders, 1976. 406p.

Piehl, F., Arvidsson, U., Johnson, H., Cullheim, S., Dagerlind, A., Ulfhake, B., Cao, Y., Elde, R., Pettersson, R. F., 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., Tabar, G., Cullheim, S. (1995). Expression of NMDA receptor mRNAs in rat motoneurons is down-regulated after axotomy. *Eur J Neurosci* 7(10): 2101-2110.

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

Pinter, S., Gloviczki, B., Szabo, A., Marton, G., Nogradi, A. (2010). Increased survival and reinnervation of cervical motoneurons by riluzole after avulsion of the C7 ventral root. *Journal of neurotrauma* 27: 2273–2282.

Profyris, C., Cheema, S. S., Zang, D. W., Azari, M. F., Boyle, K., Petratos, S. (2004). Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology of Disease* 15: 415 – 436.

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

Purves, D. (1975). Functional and structural changes in mammalian sympathetic neurones following interruption of their axons. *J Physiol* 252: 429-463.

Rameau, G. A., Chiu, L. Y., Ziff, E. B. (2003). NMDA receptor regulation of nNOS phosphorylation and induction of neuron death. *Neurobiol Aging* 24(8): 1123-1133.

Ratajczak, M Z., Lee, H., Wysoczynski, M., Wan, W., Marlicz, W., Laughlin, M. J., Kucia, M., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J. (2010). Novel insight into stem cell mobilization-plasma sphingosine-1-phosphate is a major chemoattractant that directs the egress of hematopoietic stem progenitor cells from the bone marrow and its level in peripheral blood increases during mobilization due to activation of complement cascade/membrane attack complex. *Leukemia* 24: 976-985.

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

Risling, M., Cullheim, S., Hildebrand, C. (1983). Reinnervation of the ventral root L7 from ventral horn neurons following intramedullary axotomy in adult cats. *Brain Research* 280: 15±23.

Risling, M., Fried, K., Linda, H., Cullheim, S., Meier, M. (1992) Changes in nerve growth factor receptor immunoreactivity in the spinal cord after ventral funiculus lesions in adult rats. *Journal of Neurocytology* 21: 79±93.

Risling, M., Fried, K., Linda, H., Carlstedt, T., Cullheim, S. (1993) Regrowth of motor axons following spinal cord lesions: distribution of laminin and collagen in the CNS scar tissue. *Brain Research Bulletin* 30: 405±414.

Rothman, S M, Winkelstein, B A. (2007). Chemical and mechanical nerve root insults induce differential behavioral sensitivity and glial activation that are enhanced in combination. *Brain research* 1181: 30 – 43.

Ruan, R. S., Leong, S. K., Yeoh, K. H. (1995). The role of nitric oxide in facial motoneuronal death. *Brain Res* 698: 163-168.

Rubina, K., Kalinina, N., Efimenko, A., Lopatina, T., Melikhova, V., Tsokolaeva, Z., Sysoeva, V., Tkachuk, V., Parfyonova, Y. (2009). Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. *Tissue Eng Part A* 15(8): 2039-50.

Sakamoto, T., Kawazoe, Y., Shen, J. S., Takeda, Y., Arakawa, Y., Ogawa, J., Oyanagi, K., Ohashi, T., Watanabe, K., Inoue, K., Eto, Y., Watabe, K. (2003). Adenoviral gene transfer of GDNF, BDNF and TGF beta 2, but not CNTF, cardiotrophin-1 or IGF1, protects injured adult motoneurons after facial nerve avulsion. *J Neurosci Res* 72: 54-64.

Sanes, J. R., Jessell, T. M. (2000). The guidance of axons to their targets. In: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (Eds.), *Principles of neural science*, fourth ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1063 – 1086.

Sarikcioglu, L., Demirel, B. M., Utuk, A. (2009). Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia Morphol* 68: 1–7.

Satake, K., Matsuyama, Y., Kamiya, M., Kawakami, H., Iwata, H., Adachi, K., Kiuchi, K. (2000). Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury. *Brain Res Mol* 85: 114 – 122.

Schmalbruch, H. 1986. Fiber composition of the rat sciatic nerve. *The anatomical Record* 215:71-81.

Schwab, M. E., Bartholdi, D. (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76: 319–370.

Sendtner, M., Holtmann, B., Kolbeck, R., Thoenen, H., Barde, Y. A. (1992). Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 360:757–759.

Singh, A., Lu, Y., Chen, C., Kallakuri, S., Cavanaugh, J. (2006). A new model of traumatic axonal injury to determine the effects of strain and displacement rates. *Stapp Car Crash J* 50: 601–623.

Snider, W. D., Johnson, E. M. Jr. (1989). Neurotrophic molecules. *Ann Neurol* 26(4): 489-506.

Streppel, M., Azzolin, N., Dohm, S., Guntinas-Lichius, O., Haas, C., Grothe, C., Wevers, A., Neiss, W. F., Angelov, D. N. (2002). Focal application of neutralizing antibodies to soluble neurotrophic factors reduces collateral axonal branching after peripheral nerve lesion. *Eur J Neurosci* 15(8): 1327-1342.

Takata, M., Nagahama, T. (1983). Synaptic efficacy of inhibitory synapses in hypoglossal motoneurons after transection of the hypoglossal nerves. *Neuroscience* 10: 23-29.

Taniuchi, M., Clark, H. B., Schweizer, J. B., Johnsson, E. M. J. (1988). Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural localisation, suppression by axonal contact and binding properties. *J Neurosci* 8:664–681.

Teng, Y. D., Mocchetti, I., Taveira-DaSilva, A. M., Gillis, R. A., Wrathall, J. R. (1999). Basic fibroblast growth factor increases long-term survival of spinal motor neurons and improves respiratory function after experimental spinal cord injury. *J Neurosci* 19(16): 7037-7047.

Tolosa, L., Mir, M., Asensio, V. J., Olmos, G., Llado, J. (2008). Vascular endothelial growth factor protects spinal cord motoneurons against glutamate-induced excitotoxicity via phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neurochem* 105 (4),1080-90.

Voulgari-Kokota, A., Fairless, R., Karamita, M., Kyrargyri, V., Tseveleki, V., Evangelidou, M., Delorme, B., Charbord, P., Diem, R., Probert, L. (2012). Mesenchymal stem cells protect CNS neurons against glutamate excitotoxicity by inhibiting glutamate receptor expression and function. *Experimental Neurology* 236: 161 –170.

Watabe, K., Ohashi, T., Sakamoto, T., Kawazoe, Y., Takeshima, T., Oyanagi, K., Inoue, K., Eto, Y., Kim, S. U. (2000). Rescue of lesioned adult rat spinal motoneurons by adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci Res* 60: 511-519.

Watabe, K., Hayashi, Y., Kawazoe, Y. (2005). Peripheral nerve avulsion injuries as experimental models for adult motoneuron degeneration. *Neuropathology* 25: 371-380.

Watkins, L. R., Maier, S. F. (2002). Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* 82: 981–1011.

Wobus, A. M., Boheler, K. R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85: 635-678.

Wong, K., Naidu, M., David, P., Abdulla, M. A., Abdullah, N., Kuppasamy, U. R., Sabaratnam, V. (2011). peripheral nerve regeneration following crush injury to rat peroneal nerve by aqueous extract of medicinal mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr) Pers. (Aphylophoromycetideae). Evidence-based complementary and alternative medicine.

Wright, K. T., Masri, W. E., Osman, A., Roberts, S., Chamberlain, G., Ashton, B. A., Johnson, W. E. B. (2007). Bone marrow stromal cells stimulate neurite outgrowth over neural proteoglycans (CSPG), myelin associated glycoprotein and Nogo-A. Biochemical and biophysical research communications 354: 559–566.

Wright, K. T., Masri, W. E., Osman, A., Chowdhury, J., Johnson, W. E. B. (2011). Concise review: bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications. Stem Cells 29: 169–178.

Wu, W., Li, L., Yick, L.W., Chai, H., Xie, Y., Yang, Y., Pevette, D.M., Oppenheim, R.W. (2003). GDNF and BDNF alter the expression of neuronal NOS, c-Jun, and p75 and prevent motoneuron death following spinal root avulsion in adult rats. J. Neurotrauma 20: 603 – 612.

Wu, W. Response of nitric oxide synthase to neuronal injury. (2000). Handbook of chemical neuroanatomy 17(IX), 315-353.

Yamaguchi, K., Murakami, M., Takahashi, K., Moriya, H., Tatsuoka, H., Chiba, T., (1999). Behavioral and morphologic studies of the chronically compressed cauda equina. Spine 24, 845–851.

Yamauchi, J., Chan, J. R., Shooter, E. M. (2004). Neurotrophins regulate Schwann cell migration by activating divergent signaling pathways dependent on Rho GTPases. Proc Natl Acad Sci 101 (23): 8774-8779.

Yan, Q., Elliott, J., Snider, W. D. (1992). Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. Nature 360: 753-755.

Ye, J. H., Houle, J. D. (1997). Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons. Exp Neurol 143: 70-81.

Zhang, J. Y., Luo, X. G., Xian, C. J., Liu, Z. H., Zhou, X. F. (2000). Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. Eur J Neurosci 12: 4171–4180.

Zhou, L. H., Wu, W. (2006). Survival of injured spinal motoneurons in adult rat upon treatment with glial cell line-derived neurotrophic factor at 2 weeks but not at 4 weeks after root avulsion. *J Neurotrauma* 23(6): 920-927.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "Regeneração nervosa após esmagamento de raízes motoras na interface do SNC e SNP e tratamento com células tronco mesenquimais":

() 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 2356-1, Instituição: 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.*

Aline Barroso Spejo
Aluno(a): (Aline Barroso Spejo)

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Orientador(a): (Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Ana Maria Aparecida Guaraldo
Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura