

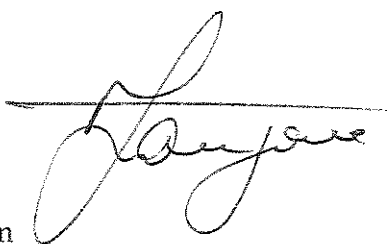
Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Apoptose de neurônios motores, interneurônios e neurônios
sensitivos induzida pela transecção do nervo ciático em
ratos recém nascidos: padrão temporal e efeitos do
tratamento com fatores neurotróficos (NGF e CNTF)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) <i>Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira</i> e aprovada pela Comissão Julgadora <i>14/05/99</i>
--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências na área de Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Francesco Langone
Co-Orientador: Prof. Dr. Staffan Cullheim



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Apoptose de neurônios motores, interneurônios e neurônios sensitivos induzida pela transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos: padrão temporal e efeitos do tratamento com fatores neurotróficos (NGF e CNTF)

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências na
área de Biologia Celular



9913850

UNID.	BC
N.º CHAMADA:	
TAMBO DO:	38 106
PROG.	229/99
	X
PREL.	R\$ 11,00
DATA	20/07/99
N.º CPO	

CM-00125394-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de
OL4a Apoptose de neurônios motores, interneurônios e neurônios
sensitivos induzida pela transecção do nervo ciático em ratos
recém nascidos: padrão temporal e efeitos do tratamento com
fatores neurotróficos (NGF e CNTF)/Alexandre Leite Rodrigues
de Oliveira. -- Campinas, SP:[s.n.],1999.
176f.:ilus.

Orientador: Francesco Langone
Co-Orientador: Staffan Cullheim
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Medula espinhal. 2. Sistema nervoso central. 3. Nervo ciático.
I. Langone, Francesco. II. Universidade Estadual de Campinas. Ins-
tituto de Biologia. III. Título.

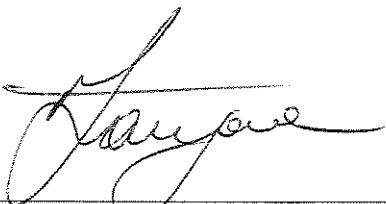
Local e Data: Campinas, 14 de Maio de 1999.

BANCA EXAMINADORA

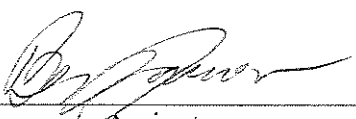
Titulares:

Orientador:

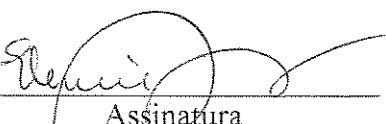
Prof. Dr. Francesco Langone


Assinatura

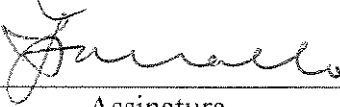
Prof. Dr. Benito Pereira Damasceno


Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari


Assinatura

Prof. Dr. José Vassallo

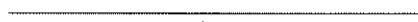

Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

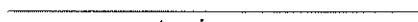

Assinatura

Suplentes:

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos


Assinatura

Profa. Dra. Gláucia Aparecida Pinto


Assinatura

A parte experimental deste estudo foi realizada no Departamento de Neurociências do Instituto Karolinska, Estocolmo, Suécia, com uma bolsa de doutorado sanduíche cedida pela CAPES (proc. BEX0737-8).

Célia, meu especial agradecimento pelo carinho, apoio e incentivo constante, fundamentais para a realização deste estudo. Nosso amor, tão especial, concretizou-se no presente mais precioso que jamais pude imaginar em receber.

“Ter um filho representa, acima de tudo receber uma missão e ter uma grande oportunidade.”

Roberto Shinyashiki

Dedico este estudo ao meu querido avô
Noel, figura tão especial e marcante em
minha vida, que infelizmente não mais
está entre nós e tanto sinto falta.

Aos meus pais, sempre presentes em todas as etapas de minha vida, agradeço e reforço meus sentimentos de amor e respeito.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francesco Langone, orientador e amigo especial, pela orientação criteriosa, pelo empenho e incentivo à realização de parte deste estudo no exterior, sempre preocupando-se com a melhor formação possível de seus orientados.

Ao Prof. Dr. Staffan Cullheim, pelo exemplo, amizade e por ter contribuído grandemente para que minha permanência no Instituto Karolinska tenha sido um período de intensa realização pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Antônio Cintra, querido amigo, inicialmente por ter intermediado o contato com o Prof. Cullheim e principalmente pelo carinho e apoio fundamentais durante minha permanência na Suécia.

Ao Prof. Dr. Mårten Risling pela amizade e pela co-orientação durante meu período no Instituto Karolinska.

As queridas Anita e Maria, pela amizade e auxílio técnico durante a realização da parte experimental deste estudo.

Aos técnicos e amigos, Marco e Nori, pelo grande auxílio nos serviços de rotina para microscopia eletrônica bem como processamento do material fotográfico neste estudo.

Ao amigo Lino pela realização de parte dos cortes ultrafinos empregados na análise ultraestrutural deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa sanduíche, tornando assim possível a realização deste trabalho junto ao Instituto Karolinska.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Biologia Celular pela calorosa acolhida e pelo incentivo constante.

Ao Departamento de Anatomia Patológica, pela utilização de seu microscópio eletrônico, possibilitando a documentação de parte do material utilizado neste estudo.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	<i>i</i>
Resumo.....	<i>ii</i>
Abstract.....	<i>iii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Aspectos gerais.....	02
1.2 Organização morfofuncional da medula espinhal.....	04
1.3 Morte neuronal em ratos recém nascidos.....	10
1.4 Fatores neurotróficos na sobrevivência e regeneração neuronal.....	15
1.5 Características e mecanismos da apoptose.....	19
OBJETIVOS.....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1 Animais e grupos experimentais.....	28
2.2 Procedimento cirúrgico.....	30
2.2.1 Para a transecção do nervo ciático.....	30
2.2.2 Para o tratamento com fatores neurotróficos.....	31
2.2.3 Para a transecção das raízes dorsais da medula.....	31
2.3 Sacrifício dos animais.....	32
2.3.1 Para a realização da reação do TUNEL.....	32
2.3.2 Para o estudo ultraestrutural.....	33
2.4 Reação do TUNEL para a detecção de células apoptóticas.....	35
2.4.1 Utilizando nucleotídeos conjugados com fluoresceína.....	35
2.4.2 Utilizando nucleotídeos conjugados com peroxidase (HRP).....	36
2.5 Análise qualitativa e quantitativa das células apoptóticas evidenciadas pela reação do TUNEL.....	38
2.5.1 Avaliação da área total dos gânglios dorsais	39

6.FIGURAS E TABELAS.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
ANEXO I.....	133
ANEXO II.....	138

ABREVIATURAS

BDNF	brain derived neurotrophic factor
BTX	α -bungarotoxina
Ced-3	cell death abnormal 3
Ced-4	cell death abnormal 4
Ced-9	cell death abnormal 9
CNTF	ciliary neurotrophic factor
DNA	ácido desoxirribonucleico
dUTP	deoxiuridina trifosfato
EDL	músculo extensor longo dos dedos
EPSP	potencial pós-sináptico excitatório
Ex	dia embrionário <i>x</i>
HRP	horseradish peroxidase
ICE	enzima conversora de interleucina 1 β
IL-6	interleucina 6
IPSP	potencial pós-sináptico inibitório
kpb	kilo pares de bases
LIF	leukemia inhibitory factor
MCP	morte celular programada
NGF	nerve growth factor
NMDA	n-metil-d-aspartato
NT-3	neurotrophin 3
NT-4/5	neurotrophin 4/5
NT-6	neurotrophin 6
PBS	phosphate buffered saline
Px	dia pós-natal <i>x</i>
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
TA	músculo tibial anterior
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TrK B	tyrosine kinase B
TrK C	tyrosine kinase C
TrkA	tyrosine kinase A
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling

Resumo

A transecção de um nervo periférico em ratos recém nascidos leva à extensa morte dos neurônios axotomizados. Neste estudo, demonstramos que a transecção do nervo ciático em ratos neonatos induz a TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling) marcação de motoneurônios e de neurônios sensitivos dos gânglios dorsais, indicando que mecanismos apoptóticos estão envolvidos. Tais resultados foram comprovados pelas observações à microscopia eletrônica. Interessantemente, observamos também um grande aumento da TUNEL marcação nos interneurônios localizados nas lâminas mais profundas da coluna dorsal. Esta localização sugere que para a sobrevivência dos interneurônios, tanto a integridade das aferências sensitivas como dos motoneurônios, suas prováveis células alvo, é essencial. No intuito de melhor compreender a importância relativa da perda do alvo (motoneurônios) e da aferência (neurônios sensitivos) sobre a indução da apoptose em interneurônios, foram comparados os padrões temporais e espaciais do aparecimento das células apoptóticas na medula e nos gânglios espinhais após a transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos (P2). Os padrões temporais da TUNEL marcação dos motoneurônios e interneurônios induzidos pela lesão foram semelhantes (pico entre 8-48 horas após a lesão), enquanto que a marcação dos neurônios sensitivos ocorreu mais tardiamente (24-72 horas). Por outro lado, sabe-se que a morte dos motoneurônios e neurônios sensitivos, resultante da axotomia, pode dever-se à ausência de fatores neurotróficos devido à perda do contato com as células alvo. Assim, estudamos também, os efeitos do tratamento do coto proximal do nervo lesado com CNTF e NGF, utilizados para impedir a morte dos motoneurônios e neurônios sensitivos respectivamente. Tanto o NGF quanto o CNTF promoveram uma diminuição na TUNEL marcação dos interneurônios. Contudo, o CNTF resgatou preferencialmente interneurônios nas lâminas mais profundas das colunas dorsais e nas ventrais, enquanto que o NGF foi mais eficaz nas lâminas superficiais. Os resultados obtidos dão suporte à hipótese de que os interneurônios medulares, no neonato, são dependentes tanto do alvo quanto da aferência para sua sobrevivência.

Abstract

Transection of a peripheral nerve in neonatal rats induces an extensive death of axotomized neurons. We demonstrate here that spinal motoneurons and sensory dorsal root ganglia neurons become TUNEL-labeled (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling) after sciatic nerve transection in neonatal rats, thus indicating that apoptotic mechanisms are involved in the death process. Interestingly, there is also a profound increase of TUNEL-labeled interneurons in the deep dorsal horn. This location suggests that an intact afferent input and/or contact with target organs are essential for interneuronal survival. Death of motoneurons and sensory neurons could be a result of the injury *per se* and/or the deprivation of neurotrophic substances, secondary to the loss of contact with target cells. In order to define the relative importance of the loss of a potential target (motoneuron) and a potential afferent input (dorsal root ganglion cell) for the induction of apoptosis in interneurons in this situation, we have compared the distributions and time courses for TUNEL labeling in the L5 segment of the spinal cord and the L5 dorsal root ganglion after sciatic nerve transection in the neonatal (P2) rat. In additional experiments were studied the effects on TUNEL labeling of interneurons after treatment of the cut sciatic nerve with either ciliary neurotrophic factor (CNTF), in order to rescue motoneurons, or nerve growth factor (NGF) to rescue dorsal root ganglion cells. The time courses of the TUNEL labeling in motoneurons and interneurons induced by the lesion show large similarities (peak at 8-48h postoperatively), while the labeling in dorsal root ganglion cells occurs later (24-72h). Both CNTF and NGF decrease the number of TUNEL labeled interneurons, but there is a regional difference, in that CNTF preferentially saves interneurons in deep dorsal and ventral parts of the spinal cord, while rescuing effects of NGF are mainly seen in the superficial dorsal horn. The results are interpreted as signs of a trophic dependence on both the target and the afferent input for the survival of interneurons neonatally.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

Durante a embriogênese do Sistema Nervoso, neurônios são gerados em excesso e, através de um processo de ajuste finamente regulado, grande porcentagem destes é eliminada (Oppenheim & Chu-Wang, 1978; Oppenheim, 1991). De fato, muitos neurônios entram em processo de morte celular programada (MCP), pela ativação de determinados genes e síntese de proteínas específicas, sendo eliminados sem que ocorra o desencadeamento de processo inflamatório. Por sua vez, outros neurônios estabelecerão contatos sinápticos entre si e/ou com órgãos alvo, sobrevivendo assim pelo adequado suprimento de fatores neurotróficos (Hamburger, 1958; Levi-Montalcini, 1987; Oppenheim, 1991).

Contudo, um fato muito interessante é que os neurônios motores e sensitivos de mamíferos recém nascidos são particularmente susceptíveis à morte após sofrerem axotomia. Em ratos, a transecção do nervo ciático no dia do nascimento (P0), leva à morte de 53% a 89% dos neurônios sensitivos axotomizados presentes nos gânglios das raízes dorsais. Esta lesão provoca ainda a perda de praticamente todos os motoneurônios atingidos (Schmalbruch, 1987; Schmalbruch, 1988). Estudos de Lowrie & Vbrová (1992) propuseram que o fenômeno da morte de motoneurônios se inicia no terceiro dia pós lesão, havendo um pico de morte neuronal após uma semana, tanto para motoneurônios como para neurônios sensitivos.

Baseados nas características e peculiaridades dos efeitos da transecção do nervo ciático em ratos neonatos, a morte neuronal poderia ser resultante de dois tipos básicos de morte celular: apoptose e necrose. A necrose é caracterizada por uma rápida destruição celular, com aumento acentuado de suas dimensões, mal

funcionamento das organelas citoplasmáticas, culminando com a desintegração celular (Walker *et al.*, 1988). Tal desintegração promove extravasamento de substância intracitoplasmática no espaço extracelular, causando afluxo de macrófagos, ativação do sistema imunológico e inflamação local (McConkey *et al.*, 1996).

A apoptose, por outro lado, constitui-se num processo de autodestruição celular extensamente caracterizado por uma série de alterações morfológicas bem definidas. É um processo ativo que necessita da transcrição de DNA e síntese protéica de moléculas específicas, as quais irão atuar intracelularmente em diferentes níveis, levando à completa destruição da célula (Adams & Cory, 1998; Ashkenazi & Dixit, 1998; Thornberry & Lazebnik, 1998). Porém, ao contrário da necrose, não há ativação do sistema imunológico a ponto de ocorrer o desencadeamento de processo inflamatório.

Há crescentes evidências na literatura que mecanismos apoptóticos podem estar relacionados à morte neuronal observada após transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos (Oliveira *et al.*, 1997; Lawson & Lowrie, 1998). Além disso, há fortes indícios de que a perda dos motoneurônios e neurônios sensitivos axotomizados induz apoptose de interneurônios medulares, indicando que esta lesão promove efeitos mais amplos do que o atualmente conhecido (Oliveira *et al.*, 1997). Assim, pela utilização de uma técnica para detecção do processo apoptótico, através da marcação de fragmentos de DNA, buscamos, neste estudo, encontrar evidências que subsidiem essa hipótese, empregando o modelo experimental de transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos. Ainda, no intuito de melhor compreender a importância da sobrevivência dos motoneurônios e neurônios sensitivos sobre a preservação dos interneurônios medulares, empregamos fatores

neurotróficos capazes de atuar preferencialmente sobre os motoneurônios ou neurônios sensitivos.

1.2 Organização morfofuncional da medula espinhal

Durante a embriogênese, o SNC origina-se a partir da placa neural a qual é formada por células neuroectodérmicas (Baker *et al.*, 1997a). A placa neural apresenta-se dilatada cranialmente e estreitada caudalmente. Desta forma, a porção mais expandida irá originar o encéfalo e a parte caudal a medula espinhal (Larsen, 1997). Durante a neurulação ocorre, pelo dobramento da placa neural no sentido longitudinal, a formação do tubo neural. Das margens laterais da placa neural, origina-se uma população especial de células constituindo a chamada crista neural. Estas células irão destacar-se do tubo neural, migrando para regiões específicas do corpo, diferenciando-se e originando diferentes tipos celulares (Larsen, 1997), tais como as células de Schwann (Webster & Favilla, 1984) e os melanócitos. As células derivadas da crista neural também originam importantes componentes do SNP, tais como os gânglios das raízes dorsais, seus neurônios e células gliais (Larsen, 1997).

Os neurônios medulares, células gliais da medula espinhal e as células do canal do epêndima, por outro lado, têm sua origem no neuroepitélio adjacente ao canal central (Baker *et al.*, 1997a; Baker *et al.*, 1997b). Este epitélio recebe a denominação de camada ventricular e produz inicialmente os chamados neuroblastos os quais irão originar os neurônios do SNC. Os neuroblastos migram perifericamente ao canal central, formando uma segunda camada chamada de manto, externamente à camada ventricular. Esta camada, contendo células nervosas, desenvolve-se para formar a substância cinzenta do SNC. Os brotamentos

axonais provenientes destes neurônios crescem em direção à periferia, estabelecendo uma terceira camada que formará a substância branca. Tão logo as células matriciais presentes na camada neuroepitelial encerram a produção de neuroblastos, inicia-se a produção de um outro tipo celular denominado glioblasto. Este irá diferenciar-se em tipos gliais distintos, incluindo os astrócitos, os oligodendrócitos e as células ependimárias (Burt, 1993).

Ao final da neurulação, os neuroblastos contidos na camada do manto passam a organizar-se em quatro colunas ao longo de toda a extensão da medula espinhal, sendo duas denominadas dorsais ou alares e duas ventrais ou basais. Lateralmente, as colunas alares estão separadas das basais pelo denominado sulco limitante. Dorsal e ventralmente mostram-se separadas pelos futuros funículos dorsal e ventral, respectivamente. As células nervosas presentes nas colunas ventrais originarão os motoneurônios medulares, cujos axônios emergem do tubo neural pelo sulco ventrolateral para inervarem os músculos estriados esqueléticos. As células nervosas presentes nas colunas dorsais darão origem aos neurônios de associação ou interneurônios (Larsen, 1997).

Ao final do desenvolvimento ficam evidentes na medula, duas conspícuas zonas denominadas substâncias cinzenta e branca. A substância branca, a qual constitui a porção mais externa da medula, agrega uma grande quantidade de fibras nervosas mielínicas as quais constituem os chamados tratos medulares que interconectam a medula com outras regiões do SNC, estando agrupados em três funículos (Kandel *et al.*, 1991). O primeiro deles, no sentido dorso-ventral, é o funículo posterior ou dorsal, presente entre o sulco lateral posterior e o sulco mediano posterior; o segundo é o funículo lateral, situado entre os sulcos lateral anterior e posterior; o

terceiro é denominado funículo anterior ou ventral, estando localizado entre a fissura mediana anterior e o sulco lateral inferior.

A substância cinzenta, mais interna, apresenta uma dominância de corpos celulares de neurônios, fibras amielínicas e capilares sangüíneos. Quando observada em secção transversal, apresenta a forma aproximada de um H, podendo ser identificadas duas colunas de cada lado da linha mediana; uma anterior ou ventral e uma posterior ou dorsal, havendo uma barra transversal de substância cinzenta que as interliga, denominada de comissura cinzenta (Carpenter, 1988). A coluna dorsal é relativamente longa e estreita, sendo que seus neurônios recebem fibras aferentes advindas das raízes dorsais.

A transmissão da informação sensorial vinda da periferia inclui duas funções diferentes: especificar as características dos estímulos em termos de modalidades funcionais e informar o sistema nervoso central sobre a localização dos estímulos. Para isso, há subpopulações de neurônios sensitivos primários dedicados a transmitir tipos específicos de informações sensoriais, apresentando um padrão citoarquitetônico específico de suas conexões medulares (Burt *et al.*, 1993; Kandel *et al.*, 1991). Contudo, é importante ressaltar que a separação e processamento dos diferentes estímulos é realizado em vários níveis, incluindo o tronco cerebral, o tálamo e o córtex cerebral (Kandel *et al.*, 1991).

Estudos eletrofisiológicos e neuroanatômicos comprovaram que fibras aferentes de diferentes modalidades funcionais estão conectadas a grupos distintos de neurônios de segunda ordem os quais diferem em sua localização dorsoventral no interior da substância cinzenta da medula espinhal (Willis & Coggeshall, 1978; Brown, 1981). Ainda, as investigações eletrofisiológicas sugerem um padrão

somatotópico de localização destes neurônios secundários, onde cada região da periferia é representado em um local específico ao longo da extensão mediolateral da coluna dorsal (Light & Durovic, 1984; Wilson *et al.*, 1986).

A substância cinzenta da medula espinhal mostra-se organizada em colunas e lâminas. Assim, a extremidade da coluna dorsal recebe as terminações sensoriais primárias, transmitindo os estímulos para centros superiores do SNC tais como tálamo, cerebelo e tronco cerebral. Esta porção da substância cinzenta também é fundamental para o estabelecimento de arcos reflexos. Por outro lado, os cornos ventrais da medula contém os neurônios motores inferiores, responsáveis pela inervação dos músculos estriados esqueléticos (Burt, 1993). Assim, levando-se em conta a disposição dos diferentes tipos neuronais na substância cinzenta, admite-se duas formas de sistematização de sua estrutura, sendo a primeira em núcleos e a segunda em lâminas. Esta última, proposta por Rexed (1952; 1954), constitui-se num mapa citoarquitetônico da medula espinhal, obtida a partir da correlação entre as conexões sinápticas e dados eletrofisiológicos.

Assim, pode-se verificar que dentro de um circuito medular, existem interneurônios de primeira, segunda e terceira ordem, de acordo com a sua localização e conexões sinápticas (Eccles *et al.*, 1956). Além disso, tem-se que um mesmo neurônio pode receber aferências provenientes de diferentes origens sensoriais, podendo ser excitatórias e/ou inibitórias.

Um exemplo ilustrativo da variedade de aferências sobre um mesmo neurônio, seria o dos interneurônios medulares que fazem sinapse com motoneurônios. Neste caso, os interneurônios recebem aferências advindas de fibras aferentes cutâneas, de fibras dos fusos musculares (Ia e tipoII), de fibras aferentes dos receptores

tendíneos de Golgi (Ib) e de fibras de receptores articulares (Lundberg, 1975; 1979a,b; Baldissera *et al.*, 1987; Schomburg, 1990). Assim, a resposta final dos motoneurônios depende da somatória de todas as suas aferências excitatórias e inibitórias (Kandel *et al.*, 1967; Dale, 1985; Di Prisco *et al.*, 1990; Lacaille *et al.*, 1987; Konnerth *et al.*, 1988).

Contudo, além das evidências eletrofisiológicas sobre as conexões dos interneurônios, estudos morfológicos foram de fundamental importância para o melhor conhecimento da organização neuroanatômica da medula espinhal. Porém, a citoarquitetura medular só pôde ser amplamente investigada posteriormente ao desenvolvimento de técnicas neuroanatômicas refinadas. Neste sentido, os estudos introduzindo o método de transporte transgangliônico da peroxidase do rábano silvestre (HRP – horseradish peroxidase) realizados por DeGroat *et al.* (1978); Grant *et al.* (1979) e Messulan & Brushart (1979) facilitaram grandemente o desenvolvimento desta área do conhecimento.

Este método não só foi de grande valia para a investigação somatotópica da organização das projeções de diferentes nervos sensitivos na coluna dorsal da medula (Grant *et al.*, 1979; Mesulan & Brushart, 1979; Ygge & Grant, 1983; Swett & Woolf, 1985) como também possibilitou o estudo da distribuição laminar total de diversos nervos periféricos (Grant *et al.*, 1979; Smith, 1983; Ygge & Grant, 1983). Neste contexto, Molander *et al.* 1984, baseados nas descrições de Rexed (1952; 1954) no gato, geraram conhecimentos importantes sobre a representação laminar dos nervos responsáveis pela inervação tanto muscular quanto cutânea dos segmentos lombosacrais da medula espinhal no rato.

Interneurônios dedicados à transmissão de informação proprioceptiva, os quais fazem sinapses com fibras aferentes tipo Ia, foram encontradas nas lâminas V, VI, na parte dorsal da lâmina VII, ao redor do núcleo motor (lâmina IX) e na lâmina VIII (Harrison *et al.*, 1986). Interneurônios que recebem sinapses de fibras tipo Ib foram encontradas nas lâminas V e VI e porção dorsal das lâminas VII e VIII., correspondendo às regiões de chegada das aferências advindas dos órgãos tendíneos de Golgi (Hongo *et al.*, 1978, 1987; Ishizuka *et al.*, 1979).

Os interneurônios em contato com fibras aferentes tipo II, principalmente advindas de fusos musculares, foram encontrados nas lâminas IV e V e de VI a VIII, principalmente nos segmentos L4 e L5 (Fukushima & Kato, 1975; Lundberg *et al.*, 1987; Edgley & Jankowska, 1987). Os interneurônios que recebem aferências de fibras tipo III e IV, localizam-se principalmente nas lâminas I e IV a VI (Hoheisel *et al.*, 1989). Um dado neuroanatômico importante é que os interneurônios localizados na zona intermediária e no início da coluna ventral da medula espinhal (lâmina IV-VI, parte medial), projetam-se para os núcleos motores. Eles recebem aferências de fibras Ia e fazem conexões sinápticas sobre motoneurônios α . Tais conexões podem ser excitatórias ou inibitórias, sendo que os motoneurônios alvo podem ser flexores ou extensores (Brown, 1991).

Ao contrário dos neurônios relacionados à propriocepção, os quais projetam-se principalmente para as lâminas mais internas da coluna dorsal e zona intermediária da medula espinhal, aqueles cuja função é a nocicepção, projetam-se abundantemente para as lâminas superficiais (I a III). As fibras que penetram a zona marginal (lâmina I) são do tipo A δ (tipo III; Ligth *et al.*, 1979; Réthelyi *et al.*, 1982; Mense & Prahakar, 1986) e fibras amielínicas do tipo C (tipo IV; Gobel *et al.*, 1981). Ainda, terminações de fibras aferentes cutâneas embora projetando-se na

lâmina I, são mais proeminentes nas lâminas II-IV (Grant & Ygge, 1981; Molander & Grant, 1986). A lâmina II parece ser a maior área de projeção de fibras amielínicas da pele (Sugiura *et al.*, 1986). Ainda, as fibras mielínicas advindas dos mecanorreceptores de adaptação rápida e lenta terminam em diferentes partes das lâminas III a VI.

1.3 Morte neuronal em ratos recém nascidos

Durante o período correspondente à primeira semana pós-natal dos mamíferos, os motoneurônios medulares e os neurônios sensitivos presentes nos gânglios das raízes dorsais, apresentam-se ainda imaturos morfológica e funcionalmente (Lowrie & Vbrová, 1992). Nessas condições, uma axotomia é capaz de induzir a morte de praticamente toda a população lesionada (Lowrie *et al.*, 1994).

A morte neuronal induzida pela lesão axonal em ratos neonatos tem sido extensivamente investigada, e comparada à morte celular programada que ocorre durante o desenvolvimento (Lowrie & Vbrová, 1992). Sabe-se que para os motoneurônios, o período de MCP ocorre entre o 15º e 17º dias embrionários (E15 e E17), enquanto que no caso dos neurônios sensitivos, este processo se dá entre E17 e E19 (Oppenheim, 1991). Em ratos neonatos, há uma perda natural de aproximadamente cinquenta por cento da população de motoneurônios medulares, sendo que, morfológicamente, uma proporção destas células mostra grande condensação da cromatina ao longo da superfície interna do envelope nuclear, um fato característico do processo de apoptose (Oppenheim & Chu-Wang, 1983; Milligan *et al.*, 1994). No caso da lesão axonal no rato neonato, a desconexão entre o corpo celular do neurônio e o órgão alvo, provoca uma drástica diminuição do

aporte de fatores neurotróficos para o corpo celular, o que em última instância resulta na morte neuronal. Esta hipótese foi comprovada no estudo realizado por Kashiwara *et al.* (1987), onde foram utilizados ratos com quatro dias de vida, os quais tiveram o ramo do nervo tibial para o músculo gastrocnêmio medial esquerdo transeccionado. No grupo cuja reinervação do músculo foi permitida, a morte dos motoneurônios foi grandemente reduzida. De fato, a amplitude e duração da atividade elétrica do nervo, nos animais cuja regeneração foi impedida decresceu significativamente, enquanto que nos animais cuja reinervação foi permitida, houve uma gradativa recuperação.

Além da hipótese da necessidade do aporte de substâncias tróficas para a sobrevivência neuronal no período neonatal, existem fortes evidências de que a interação dos cones de crescimento com as fibras musculares também sejam fundamentais. Este contato induz o início do processo de estabelecimento das junções neuromusculares, fazendo com que os neurônios passem de um período de crescimento para um período de atividade sináptica. Tais alterações fisiológicas são fundamentais para o amadurecimento celular, resultando num estado relativamente independente do órgão alvo, no que diz respeito ao fornecimento de fatores neurotróficos (Vbrovâ & Lowrie, 1989).

No sentido de dar subsídios à hipótese da necessidade do contato funcional com o músculo para a sobrevivência de motoneurônios, Burls *et al.* (1991) empregaram a α -bungarotoxina (BTX) em ratos neonatos. Os resultados mostraram uma maciça morte de motoneurônios medulares após o esmagamento do nervo ciático no quinto dia pós-natal, nos animais tratados com BTX. Em contraste, no grupo onde foi apenas realizado o esmagamento, não ocorreu morte neuronal significativa. Além disso, observaram que o tratamento com BTX no quinto dia pós-natal promoveu

uma perda maior de motoneurônios (86%) comparativamente à transecção do nervo ciático no dia do nascimento (P0).

Uma explicação para este fato seria que, no caso do grupo tratado com BTX, as aferências sensitivas continuariam a existir, podendo causar uma prolongada despolarização dos motoneurônios, resultando numa maior morte celular. No caso da transecção do ciático em P0, o desenvolvimento do componente sensitivo também seria afetado, reduzindo o número de aferências excitatórias e/ou inibitórias sobre os motoneurônios. Tais resultados são consistentes com as observações de Miyata *et al.* (1986), os quais descreveram que a administração de NGF, cujo principal efeito seria resgatar os neurônios sensitivos após a lesão neonatal, aumentou o nível de perda de motoneurônios no mesmo segmento medular.

Nesse contexto, é fundamental inquerir quanto tempo os motoneurônios axotomizados sobrevivem após sua desconexão do músculo e qual seria o padrão temporal de morte destas células. Lowrie *et al.* (1994), numa contribuição importante para responder essas questões, realizaram o esmagamento do nervo ciático em ratos recém nascidos (P3) e analisaram o desenvolvimento do processo de morte motoneuronal. Para isso, previamente à lesão (P0), os animais receberam uma injeção de corante fluorescente nos músculos extensor longo dos dedos e tibial anterior. O transporte retrógrado deste corante e seu acúmulo no corpo celular dos motoneurônios permitiu estudar a cronologia da morte destas células.

Os resultados mostraram que, com o esmagamento do nervo ciático, a morte dos motoneurônios acontece até o décimo segundo dia pós lesão, sendo a maior perda celular concentrada nos seis primeiros dias. Uma vez que os primeiros sinais de

reinervação do músculo são apenas observados dez a doze dias pós lesão, é provável que a maioria dos motoneurônios morra antes de qualquer contato com o órgão alvo. Além disso, foi observado que a perda inicial de motoneurônios concentra-se na porção mais caudal da lâmina IX lateral. Como a maturação da medula espinhal ocorre em sentido rostro-caudal, pode-se dizer que os neurônios mais imaturos são os mais susceptíveis à morte após a lesão. Tal fato está de acordo com o conceito de que quanto mais maduro o animal, os neurônios tornam-se gradativamente mais resistentes à ausência de suprimento trófico (Lowrie & Vbrov, 1992).

Tem sido amplamente comprovada a ocorrência da MCP em vários tipos neuronais, incluindo-se motoneurônios, neurônios sensitivos, células de Purkinje no cerebelo e neurônios do córtex cerebral (Oppenheim, 1991; Sanders & Wride, 1995; Clarke & Clarke, 1996). Contudo, este mecanismo de ajuste do número de neurônios em relação ao órgão alvo não foi evidenciado em todas as populações neuronais, como por exemplo neurônios da ponte e núcleo rubro (Armstrong & Clarke, 1979; Oppenheim, 1981; McKay & Oppenheim, 1991).

Apenas recentemente, Lawson *et al.* (1997), demonstraram a ocorrência da MCP em interneurônios medulares. Isto foi possível pela utilização de uma técnica capaz de identificar *in situ* o processo de fragmentação do DNA característico da apoptose. Interessantemente, foi observado que os interneurônios medulares de ratos, entram em MCP a partir do último dia pré-natal (E20), apresentando o pico no dia do nascimento (P0), sendo ainda detectável até o oitavo dia pós-natal.

Uma possível explicação para a maior perda interneuronal ocorrer em P0 pode ser a série de alterações abruptas que ocorrem durante e logo após o nascimento.

Particularmente, as alterações no sistema sensorial, poderiam levar a um ajuste fino das conexões medulares. Apesar do extensivo conhecimento dos efeitos da axotomia neonatal, pela secção de um nervo periférico, sobre os motoneurônios e neurônios sensitivos, pouco se sabe sobre a resposta dos interneurônios medulares relacionados com estas populações neuronais. Os resultados de Sugimoto *et al.* (1990) indicam a presença de neurônios picnóticos após a perda da aferência ou do componente eferente, sugerindo que os efeitos desta axotomia são bastante mais extensos do que previamente imaginado. Desta forma, torna-se interessante um melhor conhecimento da resposta dos interneurônios medulares à lesão periférica.

Nesta linha de raciocínio, Walters *et al.* (1998) investigaram influência de mecanismos de excitotoxicidade sobre a morte de motoneurônios após axotomia. Para isso, realizaram dois tipos de lesão: o esmagamento do nervo ciático e o esmagamento seletivo do nervo fibular. Desta forma, no primeiro tipo de lesão, tanto os motoneurônios quanto os neurônios sensitivos que atuam sobre os músculos antagonistas foram lesionados, havendo uma possível diminuição das aferências sensitivas sobre os motoneurônios que inervam os músculos agonistas. No caso da lesão do nervo fibular, foram preservadas as vias aferentes que se projetam para os motoneurônios axotomizados que inervam os músculos agonistas.

Os resultados mostraram que, no caso da lesão do nervo ciático, houve uma morte de motoneurônios cinquenta por cento menor, quando comparada à lesão do nervo fibular. Porém, é importante ressaltar que, em ambos os casos, a morte neuronal atinge valores expressivos, superiores a setenta por cento da população total de motoneurônios. Uma interpretação para este fato é que a axotomia seletiva do nervo fibular, por manter a inervação recíproca, poderia levar a uma ativação excessiva dos receptores de glutamato tipo NMDA, elevando os níveis de cálcio

intracelular. Isto desencadearia uma série de eventos intracelulares cujo resultado seria a morte neuronal. Tais eventos poderiam estar ligados à ativação de endonucleases tais como DNase I e II (Peitseh *et al.*, 1993; Zhivotovsky *et al.*, 1994), transglutaminases (Piacentini *et al.*, 1991) e proteases diversas como as da família da enzima conversora de interleucina 1β (Zhivotovsky *et al.*, 1994; Neanati *et al.*, 1995).

Recentemente, Lawson *et al.* (1998), também propuseram que a excitotoxicidade resultante da eliminação de sinapses inibitórias pode desencadear um processo de morte neuronal por apoptose. Adicionalmente, observaram que os interneurônios medulares também foram afetados pela perda dos motoneurônios e neurônios sensitivos, entrando em apoptose.

1.4 Fatores neurotróficos na sobrevivência e regeneração neuronal

Os fatores neurotróficos são proteínas caracterizadas pela seletividade de sua ação em certas populações de neurônios do sistema nervoso central e periférico. São fundamentais para a diferenciação e sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento e para a manutenção da correta função neuronal no adulto. Atualmente, considera-se a existência de duas classes distintas de fatores neurotróficos. A primeira constitui-se na família das neurotrofinas, cujo protótipo é o NGF (nerve growth factor). Além do NGF, esta família compreende outras quatro proteínas conhecidas: o BDNF (brain derived neurotrophic factor), a neurotrofina 3 (NT-3), a neurotrofina 4/5 (NT-4/5) e a neurotrofina 6 (NT-6), embora esta última só tenha sido identificada e isolada em peixes (Götz *et al.*, 1994). A segunda inclui fatores neurotróficos estruturalmente distintos das neurotrofinas, sendo

representada pelo CNTF (ciliary neurotrophic factor) o qual atua através de receptores comuns à outras citocinas, tais como LIF (leukemia inhibitory factor) e IL-6 (interleucina 6).

Todas as neurotrofinas são polipeptídeos homodiméricos formados por aproximadamente 120 aminoácidos. Apresentam características bioquímicas similares, possuindo um grau de homologia de cinquenta a sessenta por cento em suas seqüências de aminoácidos (Angeletti & Bradshaw, 1971; Leibrock *et al.*, 1989; Ernfors *et al.*, 1990; Maisonpierre *et al.*, 1990; Berkemeier *et al.*, 1991; Hallböök *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1992).

O NGF foi o primeiro fator neurotrófico identificado, tendo sido descoberto na década de 50 (Levi-Montalcini, 1951), concretizando assim a teoria neurotrófica proposta por Cajal (1928). Esta neurotrofina é responsável pela regulação da sobrevivência, brotamento axonal e produção de neurotransmissores numa população neuronal particular: os neurônios do sistema autônomo simpático (Korshing, 1993). O NGF produzido pelas células alvo liga-se a receptores específicos presentes no cone de crescimento dos neurônios, é internalizado e transportado retrogradamente até o corpo celular, aonde exerce suas funções (Levi-Montalcini, 1987; Thoenen *et al.*, 1987). Além dos neurônios do simpático, sabe-se que o NGF também atua sobre subpopulações de neurônios sensitivos e, no sistema nervoso central, em neurônios colinérgicos septais e do corpo estriado, (Alderson *et al.*, 1990; Knüsel *et al.*, 1991; Ventimiglia *et al.*, 1993).

Uma outra característica do NGF é sua habilidade em direcionar o crescimento dos axônios de neurônios sensitivos e simpáticos tanto durante o desenvolvimento quanto no processo regenerativo. Isto ocorre como resultado do estabelecimento de

um gradiente de concentração entre os cones de crescimento e o órgão alvo, consolidando a idéia do neurotropismo na hipótese neurotrófica (Levi-Montalcini, 1987).

Apesar do conhecimento das propriedades neurotróficas do NGF, apenas na década de 80 foram obtidas evidências satisfatórias sobre o mecanismo pelo qual esta neurotrofina é captada pelos neurônios e que esta é produzida pelas células alvo. Estas evidências foram obtidas a partir da observação de que a administração de 6-hidroxidopamina em ratos neonatos, cujo efeito é a destruição das terminações adrenérgicas, ou vinblastina, que bloqueia o transporte axonal, provoca a morte da maioria dos neurônios simpáticos (Angeletti & Levi-Montalcini, 1970). Interessantemente, os efeitos degenerativos causados por estas drogas são comparáveis em magnitude, aos efeitos da aplicação de anticorpos anti-NGF. Ainda, a transecção dos axônios pós-gangliônicos do gânglio cervical superior, em ratos recém nascidos, resulta na morte de aproximadamente 90 por cento dos neurônios simpáticos presentes no gânglio (Hendry, 1975). Nestas situações, a morte neuronal pode ser prevenida pela aplicação de NGF exógeno (Johnson *et al.*, 1980; Levi-Montalcini *et al.*, 1975; Hendry, 1975, Aloe *et al.*, 1975).

Um grande avanço para o entendimento da seletividade de atuação das neurotrofinas sobre diferentes populações neuronais foi a identificação do protooncogene tirosino-quinase A (TrkA) como receptor do NGF (Kaplan *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1991). Estudos subsequentes revelaram que outras neurotrofinas utilizam diferentes receptores tipo Trk (Barbacid, 1993; Glass & Yancopoulos, 1993; Bothwell, 1995). Atualmente sabe-se que o NGF é ligante específico para o TrkA, enquanto que BDNF e NT-4/5 são ligantes preferenciais do TrkB e que o NT-3 liga-se ao TrkC (Ip *et al.*, 1993; Barbacid, 1993; Bothwell, 1995).

O CNTF é um membro da família das citocinas a qual também inclui a oncostatina M, o fator inibitório de leucemia (LIF) e a interleucina 6 (IL-6) (Bazan, 1991; Rose & Bruce, 1991). É produzido por células de Schwann associadas a fibras mielínicas no SNP e por subpopulações de astrócitos, sendo amplamente presente no SNC (Stöckli *et al.*, 1991). Assim como o NGF e as outras neurotrofinas, o CNTF é internalizado e retrogradamente transportado até o corpo celular após uma lesão periférica (Sendtner *et al.*, 1990).

Diversas evidências foram obtidas indicando que o CNTF desempenha um papel fundamental no processo de resposta à lesão no SNC. Observou-se que subsequente a uma lesão a nível de SNP ou SNC são desencadeadas dramáticas alterações nos níveis de CNTF. Lesões mecânicas provocadas no cérebro, por exemplo, levam a um expressivo aumento na quantidade de mRNA para CNTF bem como da própria proteína no local lesionado (Ip *et al.*, 1993; Asada *et al.*, 1995). Interessantemente, este aumento na expressão do mRNA para CNTF foi localizado em astrócitos reativos presentes no tecido cicatricial originado no local da lesão (Ip *et al.*, 1993; Rudge *et al.*, 1992). Desta forma, é possível que o CNTF apresente uma função dupla no desenvolvimento do processo pós-lesional, atuando como molécula neurotrófica para os neurônios em regeneração e como estimulador da multiplicação glial (Rudge *et al.*, 1992).

No SNP normal, foram detectados altos níveis de RNA mensageiro e de CNTF no citoplasma das células de Schwann contidas no nervo ciático (Stöckli *et al.*, 1991; Rende *et al.*, 1992; Friedmann *et al.*, 1992). Porém, após uma lesão, os níveis de mRNA para CNTF diminuem drasticamente no coto distal (Friedmann *et al.*, 1992) e aumenta a quantidade desta proteína no espaço extracelular (Sendtner

et al., 1992a). Desta forma acredita-se que, no SNP, o CNTF é estocado nas células de Schwann para ser liberado em resposta à lesão.

Essa citocina despertou grande interesse após a observação de seus efeitos sobre a sobrevivência de motoneurônios tanto *in vitro* quanto *in vivo*, durante o período de embriogênese e após lesão periférica em ratos recém nascidos (Hagg *et al.*, 1992; Sendtner *et al.*, 1990; Sendtner *et al.*, 1992a). Sendtner *et al.* (1990) demonstraram em ratos recém nascidos que o tratamento com CNTF impede efetivamente a morte de motoneurônios após a transecção do nervo facial. Adicionalmente, Sendtner *et al.* (1992) observaram que o CNTF é um potente neuroprotetor, evitando a morte de motoneurônios em um modelo experimental de neuropatia motora progressiva (Sendtner *et al.*, 1992b).

1.5 Características e mecanismos da apoptose

Embora o conceito de apoptose seja relativamente novo, há mais de um século acredita-se que a morte celular possa ser regulada por mecanismos celulares intrínsecos, desempenhando papel fundamental para a homeostase dos diversos órgãos. Além disso, já se atribuía a este tipo de mecanismo de morte celular uma importante função na regulação do desenvolvimento nos organismos multicelulares. Ainda, acoplado a este conceito, já se postulava que deveria ocorrer uma renovação celular constante, havendo, para isto, um mecanismo capaz de balancear a razão entre divisão e morte celular (Zhivotonsky *et al.*, 1994).

Em diversos estudos clássicos abordando a morte celular programada ou induzida, pode-se encontrar descrições pormenorizadas dos eventos que atualmente

se sabe estarem ligados à apoptose. Entre eles, as observações de Shöder (1914) que, ao estudar a mucosa uterina durante o período pré menstrual, descreveu células fragmentadas com cromatina condensada. Tal ocorrência foi por ele denominada de picnose e interpretada como resultado da MCP.

Walter Flemming (1885), em seu estudo sobre a regressão dos folículos ovarianos em mamíferos, observou que este tipo de morte celular estava associado à geração de pequenas células e partículas celulares nas quais o núcleo estava em processo de fragmentação. Este fenômeno foi por ele denominado cromatólise. Posteriormente, Glücksmann (1951) e Sanders (1966) defenderam a idéia de que o processo de morte celular exibiria um padrão conservado, nas diferentes espécies, de alterações morfológicas essenciais durante a embriogênese. Contudo, o conceito e a magnitude da distribuição e o padrão da morte celular em tecidos adultos ainda não havia sido descrita.

Kerr, Willie e Currie (1972) propuseram a existência de um mecanismo geral de morte celular, o qual denominaram apoptose. Isto foi possível a partir de estudos baseados na indução de atrofia hepática causada por isquemia, bem como na observação das alterações morfológicas da glândula adrenal na ausência de ACTH. Neste estudo clássico, foram descritos em detalhes as características fundamentais do processo de morte celular por apoptose em diferentes tecidos. Propuseram que as modificações estruturais ocorrem em dois estágios distintos. O primeiro compreenderia a condensação nuclear e citoplasmática e a fragmentação da célula em um número variável de partes relativamente bem preservadas ultraestruturalmente, denominados corpos apoptóticos. Num segundo momento, estes elementos seriam ativamente fagocitados por células vizinhas, havendo uma

série de alterações semelhantes à autólise *in vitro*, ocorrendo no interior dos fagossomos, sendo rapidamente degradados enzimaticamente.

Adicionalmente à definição de apoptose, observou-se que este processo ocorre com extrema precisão temporal, envolvendo síntese protéica. Neste sentido, Lockshin & Beaulaton (1974), demonstraram que a morte celular durante a metamorfose de insetos, ocorria temporalmente com precisão, após sinais hormonais e neurológicos específicos. Também comprovaram que, neste caso, a morte celular por apoptose necessitava de síntese protéica, uma vez que a aplicação de inibidores de transcrição de mRNA ou de síntese protéica a impedia de ocorrer. A partir destes estudos, Lockshin & Beaulaton (1974) propuseram o termo “morte celular programada” fundamentando a idéia de que a morte celular fisiológica poderia ser geneticamente regulada. Desta forma, é muito importante a diferenciação do processo de MCP e apoptose. A MCP é um processo natural de morte celular, cuja cronologia é geneticamente regulada, que ocorre durante processos de ajuste das dimensões de uma determinada população celular, normalmente no período da embriogênese. Por outro lado, a apoptose é um mecanismo de autodestruição caracterizado por uma involução morfológica da célula. Apesar da apoptose ser geneticamente regulada, seu desencadeamento pode ser observado em qualquer período da vida do organismo.

As maiores evidências comprobatórias do controle genético da MCP foram obtidos em importantes estudos realizados com *C. elegans* (Ellis *et al.*, 1991; Yuan & Horvitz, 1992; Yuan *et al.*, 1993; Hengartner & Horvitz, 1994). Durante o desenvolvimento deste nemátoda, 131 das 1090 células somáticas formadas no hermafrodita entram em MCP. Estas mortes são precisamente controladas, sendo que em todos os animais as mesmas células morrem, cada uma numa idade

embrionária característica, exibindo condensação da cromatina, contração citoplasmática, fragmentação nuclear, culminando com a formação de corpos apoptóticos, os quais são fagocitados pelas células vizinhas.

Quatorze genes mostram-se envolvidos nas várias etapas de morte celular; sendo que deste total, três genes (*ced-3*; *ced-4* e *ced-9*) são ativados na via final de morte das 131 células. Pela mutação destes genes foi possível deduzir-se que *ced-3* e *ced-4* são necessários para a morte celular, enquanto que *ced-9* é um bloqueador deste processo. A clonagem dos genes *ced-3*; *ced-4* e *ced-9* revelaram alta homologia estrutural e funcional entre diferentes espécies, reforçando o conceito da existência de um mecanismo básico e conservado de morte celular (Ellis *et al.*, 1991).

O gene *ced-3* apresenta homologia com a família de proteases cisteína específicas, onde os principais membros são a enzima conversora de interleucina 1 β (ICE), a Ich-1/Nedd-2 e Ich-2. Tais proteases induzem a MCP em diferentes tipos celulares, inclusive neurônios, estando relacionadas portanto, à via efetora final que leva à morte celular. O gene *ced-4* gera uma proteína de 63Kda altamente hidrofílica, cujo homólogo não foi detectado em mamíferos, sendo sua função bioquímica desconhecida. Por outro lado, o gene *ced-9* decodifica uma proteína com alto grau de homologia com o produto do protooncogene Bcl-2, cujo efeito é anti-apoptótico (Yuan & Horvitz, 1992; Yuan *et al.*, 1993).

Subseqüentemente à descrição original sobre a MCP e apoptose, uma série de estudos buscou melhor entender os mecanismos intrínsecos relacionados a estes processos (Walker *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 1992; Oberhammer *et al.*, 1993). Para isso, diversas técnicas citoquímicas, imunocitoquímicas e

bioquímicas foram desenvolvidas e aprimoradas. Em quase todos os casos onde foram detectadas alterações morfológicas, observou-se fragmentação internucleossomal de DNA, sendo esta considerada um marcador bioquímico da apoptose. Neste tipo de degradação, provocada pela ativação de endonucleases endógenas, o DNA é clivado na região de ligação entre as histonas e os nucleossomos. Como o DNA presente em torno das histonas apresenta uma extensão de 180 a 200 pares de bases, múltiplos deste intervalo são freqüentemente encontrados, sendo denominados fragmentos apoptóticos (“apoptotic laddering”).

Por outro lado, alguns estudos identificaram durante o processo apoptótico, a presença de grandes fragmentos de DNA, cujo tamanho variava entre 50 e 300 kpb (Walker *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993). Timócitos de ratos induzidos a entrar em apoptose via tratamento com dexametasona, por exemplo, apresentaram não apenas fragmentação internucleossomal, mas também grandes fragmentos de DNA (Brown *et al.*, 1993). De maneira semelhante, grandes fragmentos sem clivagem internucleossomal foram observados em linfócitos cuja apoptose foi induzida pelo tratamento com teniposida, um inibidor da topoisomerase II, enzima que atua na transcrição do DNA (Roy *et al.*, 1992). Tal processo de geração de grandes fragmentos de DNA tem sido interpretados como possível precursor da fragmentação internucleossomal, sendo os dois processos portanto interligados (Walker *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 1992; Oberhammer *et al.*, 1993).

A endonuclease DNase I, cuja ação é cálcio e magnésio dependente, é uma forte candidata a ser uma das responsáveis pelo processo de fragmentação cromatínica. Anticorpos anti DNase I bem como seus inibidores, reduzem grandemente a fragmentação internucleossomal *in vitro* (Peitsch, 1993). Além

disso, adição desta enzima em núcleos isolados resulta na formação de fragmentos de DNA os quais possuem terminações 5'-PO₄ e 3'-OH idênticas àquelas encontradas em células apoptóticas *in vivo*. Apesar destas evidências, sabe-se que a DNase I está presente nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e vesículas secretórias pequenas, em células normais. Contudo, em células apoptóticas, devido à perda de integridade do sistema de biomembranas, pode estar presente no espaço perinuclear e assim penetrar no núcleo.

Adicionalmente às endonucleases, também a atividade proteolítica é fundamental durante o processo de fragmentação cromatínica. Interessantemente, a cromatina normal apresenta-se organizada em subdomínios de 50 (“loops”) e 300 kpb (rosetas) enquanto que o DNA associa-se aos complexos de histonas originando nucleossomos com extensão de 180 a 200 pares de bases. Desta forma, as proteínas associadas à cromatina provavelmente impedem a ação das endonucleases, por tornar inacessíveis os sítios de ação destas enzimas (Walker *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993).

Sabe-se que a topoisomerase II e a lamina B, as quais são substratos de proteases implicadas na apoptose, ligam-se à cromatina com uma periodicidade de 300kpb e 30-50 kpb, respectivamente; enquanto que a histona H1 esta disposta ao longo da cromatina a cada 180-200 pb. Assim, uma digestão sequencial destes polipetídeos poderia explicar a formação dos grandes fragmentos de 50 e 300Kpb observados no início do processo apoptótico. Estes podem ser detectados através de eletroforese (Walker *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1992).

Levando-se em conta este processo de fragmentação internucleossomal do DNA, Gavrieli *et al.* (1992) propuseram uma técnica para a detecção *in situ*, de

células apoptóticas, a qual denominaram TUNEL (“terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labeling”). O princípio desta metodologia baseia-se no emprego da enzima TdT, uma DNA polimerase encontrada em pré-linfócitos e em estágios iniciais da diferenciação do tecido linfóide (Chang & Bollum, 1986).

A TdT catalisa um processo de adição seqüencial de desoxiribonucleotídeos trifosfato (e.g. 11-dUTP), previamente marcados com digoxigenina, aos terminais 3'-OH de fragmentos de DNA fita dupla ou simples. Após a incorporação dos nucleotídeos, estes são visualizados pela utilização de anticorpos anti-digoxigenina conjugados com um fluorógeno ou peroxidase. Como o DNA presente em células normais ou em período proliferativo apresenta um quantidade insignificante de terminais 3'-OH, estas células não são marcadas. Ainda, células em processo de necrose, apesar de poderem apresentar um certo grau de fragmentação cromatínica que pode resultar em pequeno nível de marcação, podem ser diferenciadas das apoptóticas pela intensidade deste sinal, o qual é bastante forte nestas últimas (Gold, 1994).

Contudo, apesar da sensibilidade e confiabilidade da reação do TUNEL, a análise morfológica em nível ultraestrutural, constitui-se numa metodologia fundamental para o estudo e detecção do processo de MCP e apoptose. Neste sentido, as alterações ultraestruturais típicas durante o processo apoptótico incluem condensação da cromatina, desorganização do citoesqueleto e desestabilização do sistema celular de membranas. Este último leva ao rompimento celular originando corpos apoptóticos que contém organelas citoplasmáticas em seu interior. Interessantemente, esta série de alterações ocorrem sem que haja ativação significativa do sistema imunológico, não havendo portanto desencadeamento de processo inflamatório. Além disso, a apoptose é caracterizada por ocorrer em

células isoladas e que, no início do processo, perdem contato com as células vizinhas.

A morfologia da apoptose mostra-se marcadamente em contraste com as alterações observadas durante o processo de necrose celular. Este processo pode ser evidenciado *in vitro*, após a aplicação de altas doses de substâncias citotóxicas no meio de cultura. Nestas condições, as células rapidamente incham e se desintegram, havendo uma característica disfunção das organelas citoplasmáticas e colapso mitocondrial. Este processo resulta no derramamento de material intracitoplasmático no meio extracelular, o que causa inflamação, com influxo de células imunocompetentes e fagocíticas. A necrose *in vivo* também é observada após lesões que levam ao rompimento celular ou da homeostase tecidual, podendo ser caracterizada como um distúrbio de caráter irreversível. Pode ser referida como necrose coagulativa, onde células contíguas colapsam sem que haja perda de contato com as vizinhas (para revisão ver Zhivotonsky *et al.*, 1994).

OBJETIVOS

A partir dos dados presentes na literatura sobre os efeitos da transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos, este estudo teve como objetivos:

- Obter evidências sobre o tipo de morte celular desencadeada pela transecção do nervo ciático neste modelo experimental, através da utilização da técnica do TUNEL e microscopia eletrônica;
- Estudar o padrão temporal da morte por apoptose de motoneurônios, neurônios sensitivos e interneurônios medulares após a transecção do nervo ciático;
- Estudar a importância relativa dos motoneurônios e neurônios sensitivos na sobrevivência dos interneurônios presentes nas lâminas I a VI, através da aplicação de NGF e CNTF no coto proximal dos nervos lesionados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e grupos experimentais

Para este trabalho foram utilizados ratos Sprague-Dawley recém nascidos, com idade de dois dias. Os animais foram divididos em três lotes, levando-se em conta a realização dos seguintes estudos: 1) padrão temporal da morte neuronal por apoptose, após transecção do nervo ciático; 2) influência da administração de neurotrofinas sobre a morte neuronal após transecção do nervo ciático e 3) efeito da transecção das raízes dorsais sobre a morte de interneurônios medulares.

Estudo 1

Para este estudo, os animais foram divididos em subgrupos levando-se em conta o tempo de sobrevida após a cirurgia para a transecção do nervo ciático, como mostra a Tabela I.

Tabela I – Divisão dos grupos experimentais e controle para o estudo do padrão temporal da morte neuronal por apoptose, após transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos.

Grupo	Sobrevida	Animal operado	Animal normal (sobrevida)
1	4 horas	3	3 (P2+4h)
2	8 horas	3	3 (P2+8h)
3	12 horas	3	3 (P2+12h)
4	24 horas	3	3 (P2+24h)
5	48 horas	3	3 (P2+48h)
6	72 horas	3	3 (P2+72h)
7	1 semana	3	3 (P2+1 semana)

É importante ressaltar que, devido à existência de um período de morte interneuronal pós-natal, foi empregado um grupo controle para cada período de sobrevivência, onde os animais possuíam a idade igual a dois dias de vida mais o período pós-cirúrgico correspondente.

Ainda para este experimento, três animais P2 tiveram seu nervo ciático transeccionado e, após um período de vinte e quatro horas, foram sacrificados e processados para estudo ultraestrutural.

Estudo 2

Para este estudo, ratos recém-nascidos com dois dias de vida foram submetidos à transecção do nervo ciático, sendo tratados com fatores neurotróficos seguindo-se a Tabela II.

Tabela II - Divisão dos grupos experimentais e controle para o estudo da influência da administração de neurotrofinas sobre a morte neuronal por apoptose, após transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos.

Grupo	Tratamento	N
1	NGF	3
2	CNTF	3
3	NGF+CNTF	3
4	PBS 0,1M (controle)	3

Estudo 3

Este experimento foi realizado empregando-se três ratos P2, os quais foram operados para a transecção de raízes dorsais correspondentes ao nervo ciático, com

o objetivo de investigar os efeitos da ausência do componente sensitivo sobre a morte de interneurônios medulares.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Karolinska, Estocolmo, Suécia.

2.2. Procedimento Cirúrgico

2.2.1. Para a transecção do nervo ciático

Sob hipotermia profunda, os animais foram colocados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico (Zeiss, Germany). A pele da coxa esquerda foi incisada e, afastando-se a musculatura, procedeu-se à exposição do nervo ciático. Com o auxílio de uma microtesoura, o nervo foi dissecado em sentido proximal, até sua emergência no forame esquiático. Neste ponto, procedeu-se à transecção do nervo ciático, retirando-se um segmento de aproximadamente três milímetros do coto distal, no sentido de assegurar-se a ausência de contato com o coto proximal.

Concluída a cirurgia, a musculatura foi recolocada em posição e a pele suturada com dois ou três pontos cirúrgicos com fio de seda 7-0 (Ethicon). Subseqüentemente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram colocados em local aquecido até que despertassem da anestesia. Em seguida foram devolvidos à companhia da mãe, aonde permaneceram até o momento de serem sacrificados.

2.2.2 Para o tratamento com fatores neurotróficos (NGF e CNTF)

Subseqüentemente aos procedimentos cirúrgicos para a transecção do nervo ciático, descritos no item 2.2.1, quando previsto no protocolo experimental, procedeu-se o tratamento com soluções contendo Nerve Growth Factor (NGF), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) ou NGF+CNTF.

Para isso, um fragmento de gelfoam (4mm²) foi embebido em 15µl de solução salina tamponada (PBS 0,1M) contendo NGF (10µg/µl), CNTF (25µg/µl) ou uma mistura de NGF+CNTF. Após a total absorção do volume de solução, o fragmento de gel foi introduzido no leito muscular do nervo ciático previamente transecionado, em contato direto com o seu coto proximal.

Três animais receberam o fragmento de gel contendo 15µl de PBS 0,1M, sendo utilizados como controle. Após os procedimentos acima descritos, os animais foram recolocados em companhia da mãe por um período de vinte e quatro horas, quando foram sacrificados.

2.2.3 Para a transecção das raízes dorsais

Três ratos P2 foram anestesiados por hipotermia, sendo colocados em decúbito ventral e mantidos numa placa de Petri contendo gelo triturado. Para a exposição da medula espinhal e raízes nervosas, a pele da região do dorso do animal foi incisada e a musculatura eretora da coluna vertebral foi rebatida, expondo-se assim as lâminas esquerdas das últimas vértebras torácicas. Estas foram então seccionadas com o auxílio de uma microtesoura e retiradas com uma pinça de relojoeiro número 4.

Uma vez exposta a medula espinhal, a dura-máter foi identificada e seccionada longitudinalmente, dando acesso às diversas raízes nervosas presentes na intumescência lombar. Pelo menos três raízes sensitivas foram identificadas e transeccionadas na altura da conexão com a medula espinhal. Em seguida, estas foram giradas 180° e mantidas em seu leito. A musculatura foi recomposta, sendo a pele suturada por meio de quatro ou cinco pontos cirúrgicos com fio de sutura 7-0 (Ethicon). Findos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram recolocados em companhia da mãe por um período de vinte e quatro horas quando foram então sacrificados.

2.3. Sacrifício dos animais

2.3.1. Para a realização da reação do TUNEL

Após os períodos de sobrevida de quatro, oito, doze, vinte e quatro, quarenta e oito, setenta e duas horas e uma semana, os animais pertencentes ao primeiro protocolo experimental foram sacrificados. Os ratos pertencentes ao segundo e terceiro grupos experimentais, foram sacrificados vinte e quatro horas após a cirurgia. Todos os animais foram anestesiados profundamente com hidrato de cloral (0,6g/10ml; 1ml/animal, i.p.), sendo em seguida submetidos a toracotomia e exposição do coração. Através do ventrículo esquerdo, foram perfundidos 20 ml de formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M.

Após a fixação, a região do dorso contendo a intumescência lombar (L4, L5, L6) e os gânglios espinhais L5, foram obtidas e imersas na mesma solução fixadora por doze horas. Passado esse período, com o auxílio de uma lupa, a medula

espinhal foi dissecada e a intumescência lombar, bem como o gânglio L5, foram identificados e separados em frascos individuais contendo PBS 0,01M. Após duas lavagens, o tampão foi substituído por uma solução de sacarose 10% em PBS 0,1M e os espécimes armazenados em geladeira a 4°C por 12 horas.

Passado o período em sacarose, os espécimes foram congelados em gelo seco, embebidos em Tissue-Tek, sendo então armazenados em biofreezer (-70°C) até posterior utilização. Na ocasião da confecção dos cortes histológicos, os espécimes foram retirados do biofreezer, montados em um suporte de metal e levados a um criostado Micron. No caso das intumescências lombares, foram obtidos cortes transversais (12µm de espessura) alternados de forma a ser preservada uma secção a cada cinco obtidas. Seis cortes foram colocados em cada lâmina de vidro, previamente gelatinizada, sendo estes secos ao ar por trinta minutos e, em seguida, acondicionados em caixas plásticas para armazenamento em freezer (-20°C). No caso dos gânglios espinhais, sempre que possível, foram obtidos cortes seriados, transversais em relação ao maior eixo da peça (14µm). Entre seis e oito secções foram colocadas em cada lâmina de vidro gelatinizada, sendo a secagem e armazenamento idênticos às secções de medula espinhal.

2.3.2. Para o estudo ultraestrutural

No sentido de analisar as alterações ultraestruturais ligadas à morte celular por apoptose, três ratos P2 tiveram seu nervo ciático esquerdo transeccionado sendo sacrificados vinte e quatro horas após a cirurgia.

Os animais foram anestesiados profundamente com hidrato de cloral (0,6g/10ml; 1 ml/animal, i.p.), sendo em seguida submetidos a toracotomia e exposição do coração. Através do ventrículo esquerdo, foram perfundidos 20 ml de solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH=7,38.

Em seguida à perfusão, retirou-se a região do dorso contendo a intumescência lombar (L4,L5,L6) e os gânglios espinhais L5 esquerdo e direito, sendo estes imersos na mesma solução fixadora por doze horas. Passado esse período, a medula espinhal foi dissecada juntamente com os gânglios dorsais. Identificou-se e separou-se a intumescência lombar e os gânglios L5 esquerdo e direito, transferindo-os para frascos individuais contendo PBS 0,01M. Após quatro lavagens em PBS 0,01M, os espécimes foram submetidos a um período de pós-fixação em tetróxido de ósmio 1%, diluído em PBS, pH 7,38. Seguindo-se a pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água bidestilada, desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina Vestopal.

Após a polimerização da resina, os blocos correspondentes à intumescência lombar e gânglios L5 esquerdo e direito foram aparados sob lupa e levados a um ultramicrotomo (LKB, Bromma 8800) equipado com navalha de vidro, para confecção de cortes transversais semi-finos com 0,5 μ m de espessura. Estes foram corados com azul de toluidina 0,5%, sendo utilizados para análise ao microscópio óptico. Os mesmos blocos foram então aparados novamente para a confecção de cortes ultrafinos (600Å). As secções foram colocadas sobre tela de cobre com furo único, previamente revestidas com Formvar e contrastadas com acetato de uranila 0,5% e citrato de chumbo. Os espécimes foram então observados e fotografados ao microscópio eletrônico (Zeiss) operando a 60KV.

2.4. Reação do TUNEL para detecção de células apoptóticas

A detecção dos neurônios apoptóticos foi realizada através da técnica do TUNEL (teminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labeling). No intuito de identificar-se os tipos celulares bem como estudar-se a morfologia das células apoptóticas, foram empregadas duas técnicas distintas. A primeira baseou-se no emprego de anticorpos anti-digoxigenina conjugados com fluoresceína. Desta forma foi possível uma detecção precisa dos núcleos apoptóticos TUNEL positivos.

O segundo protocolo baseou-se na técnica descrita por Gravieli *et al.* 1992, empregando-se a peroxidase do rábano silvestre (horshadish peroxidase - HRP) para a visualização dos nucleotídeos incorporados enzimaticamente aos fragmentos de DNA. Este protocolo foi escolhido pois possibilita a contra-coloração com cresil violeta, o que viabilizou a identificação dos tipos celulares apoptóticos bem como o estudo de sua morfologia ao microscópio óptico.

2.4.1. Utilizando nucleotídeos conjugados com fluoresceína

As secções foram retiradas do freezer aproximadamente vinte minutos previamente à utilização, para climatização. Posteriormente, foram imersas e lavadas em PBS 0,01M por duas vezes, retirando-se o meio de inclusão. Em seguida foram pós-fixadas em uma solução de etanol/ácido acético (2:1) por cinco minutos a -20°C e lavadas duas vezes por cinco minutos em PBS 0,01M.

As lâminas foram então transferidas para uma câmara úmida e 100µl do tampão de equilíbrio (Oncor, s7110-1) foram aplicados sobre os espécimes, os

quais foram em seguida recobertos com um filme plástico (5cm^2) e incubados por cinco minutos em temperatura ambiente. O tampão de equilíbrio foi retirado e os espécimes incubados por uma hora na solução de reação contendo $16\mu\text{l}/5\text{cm}^2$ da enzima TDT (Oncor, s7110-2) e $38\mu\text{l}$ de tampão de reação (Oncor, s7110-3) em uma estufa mantida a 37°C . A reação foi terminada pela transeferência das lâminas para um recipiente contendo 40ml da solução de interrupção e lavagem (Oncor, s7110-4) por trinta minutos a 37°C agitando-se a cada 10 minutos.

Em seqüência os espécimes foram lavados em PBS 0,01M por três vezes durante três minutos, sendo novamente transferidos para uma câmara úmida. Aplicou-se então a solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fluoresceína ($24,5\mu\text{l}/5\text{cm}^2$; Oncor s7110-6) e uma solução bloqueadora ($28\mu\text{l}/5\text{cm}^2$; Oncor s7110-5), sendo os cortes recobertos com um filme plástico (5cm^2) e incubados no escuro em temperatura ambiente por trinta minutos.

Passado o período de reação, o plástico foi retirado e as lâminas lavadas em PBS por três vezes durante cinco minutos em temperatura ambiente sendo secas e montadas em meio contendo glicerol. O material foi observado sob microscópio de fluorescência (Leitz, DM RBE) utilizando-se o filtro para fluoresceína.

2.4.2. Utilizando nucleotídeos conjugados com peroxidase (HRP)

Após climatização das lâminas à temperatura ambiente, estas foram imersas e lavadas em PBS 0,01M por duas vezes, retirando-se o meio de inclusão. Em seguida, os espécimes foram pós-fixados em etanol/ácido acético (2:1) por cinco minutos a -20°C e lavadas por duas vezes de cinco minutos em PBS 0,01M.

As lâminas foram então imersas em H_2O_2 2% em água bidestilada por cinco minutos no intuito de inativar-se a peroxidase endógena. Seguindo-se esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01M por duas vezes durante cinco minutos e transferidas para uma câmara úmida previamente aquecida a 37°C. As secções receberam então 50µl de uma solução contendo tampão de reação (Tris 30mM, pH 7,2; cacodilato de sódio 140mM, cloreto de cobalto 1mM) e cobertas com um filme plástico (5cm²) por cinco minutos. Em seguida a solução foi substituída por outra contendo a enzima TdT (0,3U/µl) e o nucleotídeo dUTP biotinilado (0,2nM/10U TdT; Boehringer Mannheim) em tampão de reação, sendo os espécimes incubados por duas horas a 37°C.

Passada a etapa de incorporação do nucleotídeo, a reação foi interrompida pela transferência das lâminas para um recipiente contendo 40 ml de uma solução de cloreto de sódio 300mM e citrato de sódio 30mM em temperatura ambiente por quinze minutos.

As secções foram então incubadas com uma solução de albumina bovina 2% (Sigma) por dez minutos e, em seguida, com uma solução contendo anticorpos anti-biotina conjugados à avidina-peroxidase (Santa Cruz ABC kit, sc-2017) por trinta minutos em temperatura ambiente. A peroxidase incorporada nos fragmentos de DNA foi visualizada pela reação com uma solução de 3,3',5,5'-diaminobenzidina. As lâminas foram lavadas em água bidestilada por duas vezes durante 5 minutos, contracoradas com cresil violeta e montadas com lamínulas em DPX (Sigma) para observação ao microscópio óptico.

2.5. Análise qualitativa e quantitativa das células apoptóticas evidenciadas pela reação do TUNEL

Para cada animal, a segunda secção de cada lâmina, num total de seis lâminas alternadas foi utilizada para o mapeamento e contagem dos neurônios TUNEL positivos. Assim, cada corte foi analisado sob microscópio óptico (Leitz, DM RBE) num aumento final de 400 vezes, sendo que os núcleos contendo fragmentação de DNA foram identificados por emitirem fluorescência no comprimento de onda da fluoresceína. Só foram considerados positivos os núcleos contendo fluorescência intensa, sendo utilizados para o mapeamento e contagem.

Com o auxílio de um esboço de uma secção transversal da medula espinhal a nível lombar, os neurônios TUNEL positivos foram então registrados de acordo com sua localização *in situ*, sendo feita uma diferenciação para os motoneurônios em relação aos interneurônios. Portanto, para cada animal, seis mapeamentos de secções representativas foram realizados, totalizando dezoito cortes por grupo experimental e controle. Este procedimento foi realizado para o estudo do padrão temporal da morte neuronal por apoptose e para o estudo do efeito da administração de neurotrofinas sobre a morte neuronal após a transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos.

Em seguida à obtenção do posicionamento dos neurônios, obteve-se seu número total em cada secção, levando-se em conta o lado ipsilateral e contralateral à lesão realizada. Os valores obtidos nos seis cortes para cada animal (esquerdo e direito) foram então somados e assim empregados para o cálculo das médias em cada grupo experimental e controle. Ainda, com o objetivo de melhor compreender a influência da transecção do nervo ciático sobre as diferentes populações

interneurais, foram realizadas contagens diferenciais nas lâminas I-III e IV-VI na coluna posterior da medula. Para isso, as secções foram registradas individual e sequencialmente num único corte representativo, com o auxílio de uma mesa digitalizadora (Wacom Ultrapad, A5) e software Adobe Illustrator 7.0 (Adobe Systems Inc., USA), de forma a possibilitar sua visualização em separado ou em conjunto. Ainda, no experimento empregando fatores neurotróficos, no sentido de obter-se um valor relativo do número de interneurônios TUNEL marcados no lado ipsilateral e contralateral, calculou-se a razão (R) entre o número de células marcadas no lado esquerdo e direito ($R=E/D$).

A contagem dos neurônios sensitivos apoptóticos foi realizada seguindo-se os mesmos critérios adotados para os cortes transversais de medula espinhal. Neste caso, foram utilizados quatro cortes alternados do gânglio L5 esquerdo e direito de cada animal, sendo os valores somados para obter-se o número final por animal em cada grupo experimental e controle.

A análise qualitativa foi realizada pelo estudo das secções de medula e gânglios espinhais empregando-se a técnica do TUNEL associado à HRP, contraindo-se com cresil violeta. Desta forma foi possível a identificação de neurônios medulares bem como motoneurônios e neurônios sensitivos.

2.5.1. Avaliação da área total dos gânglios dorsais

Devido à extensa morte neuronal sensitiva causada pela transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos, pode ocorrer uma diminuição do volume total dos gânglios espinhais associados à lesão. Tal diminuição foi quantificada a partir de

uma análise da área da secção transversal dos gânglios espinhais em animais normais e operados, vinte e quatro horas após a lesão.

Assim, quatro cortes alternados, localizados na porção central de cada gânglio L5, foram corados com cresil violeta e digitalizados com o auxílio de uma videocâmera Kappa e software NIH Image. Através da utilização de uma lente reticulada e do software NIH Image, foi obtida a área das secções nos animais operados e normais.

2.6. Tratamento estatístico

Os resultados quantitativos foram analisados empregando-se os valores das médias e respectivos erros-padrão submetidos à análise da variância de uma via. Para a análise *post-hoc* das diferenças entre as médias dos diferentes grupos, utilizou-se o teste de Newman Keuls, assumindo-se um nível de significância igual a 0,05. No estudo do efeito dos fatores neurotróficos na sobrevivência dos interneurônios medulares, utilizou-se o teste de Mann-Witney, assumindo-se um nível de significância igual a 0,05.

3. RESULTADOS

3.1 Neurônios TUNEL positivos presentes nos animais normais e operados

Os motoneurônios ultraestruturalmente normais apresentavam, além do proeminente retículo endoplasmático rugoso (substância de Nissl), ribossomos livres bem como polissomos. A substância de Nissl em nível ultraestrutural corresponde ao retículo endoplasmático rugoso disposto ordenadamente, sendo as cisternas organizadas paralelamente e sobrepostas em intervalos bastante regulares. Mitocôndrias cuja morfologia era compatível com a normalidade estavam também presentes. O núcleo possuía grandes dimensões e sua forma era circular e sua posição central. A cromatina mostrou-se homogênea, sendo a presença do nucléolo constante. O envelope nuclear mostrou-se contínuo e possuindo duplo contorno. (Figura 1A).

Nos motoneurônios apoptóticos observou-se uma profunda desorganização citoplasmática, não sendo possível a identificação da substância de Nissl, indicando a ocorrência de cromatólise. Estas células apresentavam-se fragmentadas, sendo as organelas citoplasmáticas agrupadas em coágulos elétron densos (Figuras 1A e 1B). Nestes agrupamentos era possível observar-se mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e pequenas vesículas. O restante do citoplasma era elétronlúcente sendo preenchido por filamentos intermediários. Era comum a existência de um citoplasma mais elétron denso nas adjacências do núcleo em fragmentação. Com relação ao sistema de membranas, há indícios morfológicos de sua desorganização. Desta forma, foi possível observar-se constantemente invaginações da membrana citoplasmática, muitas vezes originando grandes vesículas contendo, eventualmente, organelas diversas. Frequentemente foram observadas pequenas vesículas eletronlúcentes nas proximidades destas formações (Figura 1A).

Nos motoneurônios apoptóticos, o envelope nuclear estava fragmentado, sendo que o material nuclear muitas vezes interdigitava-se àqueles grupamentos de organelas acima descritos. A cromatina mostrava-se compactada havendo regiões bastante densas. Em algumas células foi possível evidenciar-se fragmentação nuclear. É interessante ressaltar que em todos os espécimes observados, células apoptóticas sempre estavam circundadas por células ultraestruturalmente normais, cujas organelas e sistema de membrana mostrava-se bem preservado.

Os interneurônios apoptóticos foram identificados tanto nas colunas ventrais quanto dorsais da medula espinhal, sendo morfológicamente semelhantes nos animais operados e não operados, variando somente em número e localização. Durante a análise ultraestrutural dos espécimes, acreditamos ter observado células em diferentes estágios apoptóticos. Assim, de acordo como o grau de compactação da cromatina, nível de integridade do envelope nuclear e características ultraestruturais do citoplasma, os neurônios foram classificados como em estágios inicial, intermediário e avançado de apoptose.

Os neurônios considerados em estágio inicial do processo apoptótico apresentavam alterações nucleares e citoplasmáticas sutis, comparativamente às células vizinhas (Figura 2). O citoplasma destas células caracterizava-se por uma pequena compactação das organelas, as quais apresentavam morfologia normal. Contudo, observou-se a presença de vesículas com diferentes dimensões, bem como estruturas semelhantes a vacúolos contendo material eletrondenso, provavelmente resultado de um início de perda da integridade do sistema celular de membranas (Figura 2B). Levando-se em consideração a idade dos animais utilizados, é possível que estas Figuras correspondam ao resultado da digestão de componentes das membranas celulares, tais como esfingolipídeos. Estes neurônios

considerados em período inicial de apoptose ainda apresentavam um início de compactação da cromatina, concentrada perifericamente, não mais sendo possível a identificação do nucléolo. Ainda, era possível observar que o núcleo apresentava uma área reduzida em relação às células morfológicamente normais (Figura 2B).

Os neurônios considerados em estágio intermediário de apoptose apresentavam as características clássicas deste processo de morte celular, tanto no seu componente nuclear quanto citoplasmático (Figura 3). O núcleo mostrava-se altamente elétrondenso, possuindo áreas de maior e menor compactação (Figura 3B). Geralmente o envelope nuclear estava fragmentado, havendo contato direto entre componentes citoplasmáticos e a cromatina. O citoplasma apresentava-se fragmentado em subcompartimentos cuja elétrondensidade era variável. Nestes, podiam ser identificadas diferentes organelas e pequenos vacúolos, sempre circundados por filamentos intermediários. A grande maioria de organelas citoplasmáticas encontrava-se altamente compartimentalizada em bolsões elétrondensos, sendo que alguns deles não continham fragmentos nucleares, enquanto outros estavam em contato com a cromatina compactada (Figura 3B). Eventualmente foi possível observar-se fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos.

Os neurônios classificados como em estágio apoptótico avançado não mais possuíam integridade celular, mostrando-se fragmentados em corpos apoptóticos. Estes constituíam-se de porções celulares delimitadas por membrana citoplasmática (Figura 4A). Continham organelas em processo degenerativo acentuado, muitas vezes incluídas em estruturas semelhantes a lisossomos, circundadas por agregados de filamentos intermediários. Interessantemente, estes fragmentos celulares

mostravam-se em contato com neurônios adjacentes bem como axônios, sem aparente resposta inflamatória.

Em alguns casos, foi possível identificar-se células gliais fagocitando partes destes corpos apoptóticos, sendo clara a presença de lisossomos primários e secundários. Estas estruturas possuíam elétrondensidade variável porém grandemente superior a qualquer organela circundante (Figura 4B).

Os neurônios sensitivos TUNEL positivos, nos cortes contracorados com cresil violeta, possuíam núcleo bastante condensado, sendo a marcação homogênea e evidente. A análise ultraestrutural dos gânglios espinhais revelou várias Figuras apoptóticas, compatíveis com as observações realizadas à microscopia de luz. A partir destas observações é possível afirmar que vinte e quatro horas após a transecção do nervo ciático, há uma evidente ocorrência de neurônios apoptóticos.

Quanto aos neurônios normais presentes nos gânglios sensitivos, não foram observadas diferenças morfológicas entre células presentes nos gânglios sensitivos dos animais normais e operados. Estas células apresentavam núcleo bastante volumoso e em posição central. Este continha cromatina homogênea e pouco compactada, sendo observados apenas pequenos grupamentos esparsos de material cromatínico mais denso, originando corpos mais intensamente contrastados. O nucléolo era sempre evidente, apresentando-se extremamente denso sendo possível a distinção de grânulos mais compactados (porção granulosa) e porções mais frouxas (parte fibrosa). O envelope nuclear estava constituído por uma delicada membrana dupla, sendo as duas lâminas separadas por um pequeno espaço (Figura 5A).

Os neurônios sensitivos, considerados apoptóticos, apresentaram um padrão uniforme e característico, o qual diferiu em alguns aspectos daquele observado nos motoneurônios e interneurônios medulares. Observou-se uma compactação da cromatina, concentrada no centro do núcleo, havendo apenas um halo periférico de substância elétron-densa de densidade diferente da cromatina. Nas células tidas como em processo inicial de apoptose, a integridade nuclear estava aparentemente mantida. Nestas células foi possível identificar-se claramente as duas lâminas do envelope nuclear. Contudo, estas não se apresentavam contínuas e o espaço entre elas estava aumentado em relação às células ultraestruturalmente normais. Havia também a presença de poros cujas dimensões mostravam-se bastante aumentadas. Nossas observações indicaram que à medida que o processo apoptótico avançava, a integridade do envelope nuclear tornava-se menor, culminando com sua total fragmentação (Figura 6B).

O citoplasma dos neurônios morfológicamente normais continha substância de Nissl abundante, sendo que nestas formações, as cisternas do retículo endoplasmático mostravam-se ricamente decoradas por ribossomos. Elementos do complexo de Golgi, mitocôndrias bem como vesículas compatíveis com lisossomos e talvez grânulos de lipofuccina também foram observados (Figura 5A).

As alterações citoplasmáticas observadas nos neurônios sensitivos mostraram-se distintas das presentes nos motoneurônios e interneurônios no que diz respeito ao modo de compactação das organelas. Nessas células houve uma intensa e homogênea coagulação citoplasmática, ocorrendo um significativo aumento na elétron-densidade, não sendo possível a identificação da substância de Nissl (Figura 5B). Foi possível identificar adensamentos de mitocôndrias cuja morfologia aparentemente não era normal. Cisternas de retículo endoplasmático estavam

dispersas e continham, ao seu redor, adensamentos de substância densa (Figuras 5B e 6A). Vesículas elétronalucentes bem como estruturas semelhantes a lisossomos também puderam ser identificados.

Comparando-se diferentes Figuras de neurônios sensitivos em degeneração, foi possível constatar que à medida que o processo apoptótico avançava, o citoplasma diminuiu significativamente de volume. Ocorreu uma intensa desorganização do sistema de membranas e um aparente isolamento das células em degeneração, as quais destacam-se das vizinhas. Houve um processo de fragmentação celular, sendo possível a identificação de grupamentos de organelas segregadas nestes subcompartimentos. Nos neurônios em estágio apoptótico avançado, observou-se rompimento do envelope nuclear levando a um contato direto da cromatina com componentes citoplasmáticos (Figura 6B).

As células satélite mostravam-se destacadas dos neurônios identificados como apoptóticos e, em geral, possuíam diversas estruturas citoplasmáticas compatíveis com lisossomos e vacúolos. Nos casos onde havia a presença de corpos apoptóticos, estas células apresentavam-se em processo ativo de fagocitose (Figuras 5A e 6B).

Nos animais normais, através de emprego de nucleotídeos visualizados com fluoresceína, foram encontrados neurônios TUNEL positivos em todas as secções analisadas (Figuras 8A e H, 9A e H, 10 e 11). Estas observações foram comprovadas pela técnica do TUNEL revelada com peroxidase e contracorada com cresil violeta.

Os neurônios TUNEL positivos estavam localizados nos cornos dorsal e ventral da medula espinhal, não tendo sido identificadas células marcadas nos funículos da substância branca. Observou-se que o número de células marcadas nos animais normais não diferiu entre o lado esquerdo e direito, havendo porém, um pico transitório da marcação entre os interneurônios após dois dias e meio de vida (P2+12horas) (Figura 13). Um pequeno número de motoneurônios (Figuras 10 e 11) e neurônios sensitivos (L5) (Figuras 9 e 12) TUNEL positivos foi detectado.

Nos animais operados, observou-se a presença de neurônios TUNEL positivos em ambos os lados da medula, havendo porém diferenças entre o lado ipsilateral e contralateral à lesão, como descrito a seguir. Contudo, o padrão morfológico das células marcadas não diferiu entre lados, quer nos animais operados, quer nos animais não operados. Desta forma, provavelmente há uma sobreposição entre a morte celular programada que ocorre naturalmente durante o período pós natal e a morte induzida pela lesão do nervo ciático, sendo que ambas apresentam características apoptóticas.

À microscopia óptica, as células TUNEL positivas observadas em secções contracordadas com cresil violeta mostraram as características básicas do processo apoptótico. Os núcleos mostravam-se condensados e em processo de fragmentação, havendo eventualmente regiões mais reativas ao TUNEL, concentradas perifericamente (Figura 7). O citoplasma dessas células mostrava-se bastante reduzido em volume estando muitas vezes fragmentado.

3.2. Contagem, padrão de distribuição e padrão temporal dos neurônios TUNEL positivos após a transecção do nervo ciático

3.2.1. Motoneurônios

A Tabela I apresenta o número total de motoneurônios TUNEL positivos presentes nas secções transversais de medula espinhal provenientes de animais normais e de animais cujo nervo ciático esquerdo foi transeccionado. Estão representados os valores médios (média±erro padrão) obtidos nos lados ipsilateral e contralateral dos animais P2 operados após 4, 8, 12, 24, 48, 72 horas e uma semana da lesão. No caso dos animais normais, os valores descritos representam o número de neurônios TUNEL positivos encontrados em animais recém nascidos sacrificados em P2+4, P2+8, P2+12, P2+24 (P3), P2+48 (P4), P2+72 (P5) horas e P2+1 semana (P9). Estes dados estão graficamente representados na Figura 12 . A distribuição espacial dos motoneurônios TUNEL positivos está ilustrada nas Figuras 10 e 11.

Os resultados obtidos nos animais normais mostraram a presença de uma morte residual de motoneurônios até o quinto dia pós-natal, oscilando entre $0,33 \pm 0,33$ em P2+4h e $1,33 \pm 0,88$ em P2+12h no lado esquerdo e entre $0,33 \pm 0,33$ em P2+8h, P4 e P5 e $1,00 \pm 0,58$ em P2+4h e P2+8h. Estes resultados são compatíveis com os valores obtidos no lado contralateral à lesão em todos os períodos estudados. Neste caso, os valores oscilaram entre $0,67 \pm 0,33$ em P2+72h e $1,33 \pm 0,33$ em P2+4h, P2+12h, P2+24h e P2+48h. Tal fato demonstra que a morte motoneuronal induzida pela transecção do nervo ciático não promove perdas no lado contralateral ($F(28,41)=16,60$; $p<0,05$).

Por outro lado, a transecção do nervo ciático esquerdo em P2 levou a um aumento significativo do número de motoneurônios TUNEL positivos no lado ipsilateral à lesão ($p < 0,05$). Tal aumento passou a ser estatisticamente significativo em P2+8h ($9,00 \pm 2,08$), mantendo-se neste patamar até o segundo dia pós lesão ($7,67 \pm 0,88$). O número de motoneurônios TUNEL positivos retornou a um nível semelhante ao contralateral três dias após a lesão ($1,00 \pm 0,58$).

3.2.2. Neurônios sensitivos

A Tabela II apresenta o número total de neurônios sensitivos TUNEL positivos presentes nas secções transversais dos gânglios dorsais L5 provenientes de animais normais e de animais cujo nervo ciático esquerdo foi transeccionado. Estão representados os valores médios (média $\pm$ erro padrão) obtidos nos gânglios L5 ipsilateral e contralateral dos animais P2 operados após 4, 8, 12, 24, 48, 72 horas e uma semana da lesão. No caso dos animais normais, os valores descritos representam o número de neurônios sensitivos TUNEL positivos encontrados em animais recém nascidos sacrificados em P2+4, P2+8, P2+12, P2+24 (P3), P2+48 (P4), P2+72 (P5) horas e P2+1 semana (P9). Estes dados estão graficamente representados na Figura 12.

Assim como observado nos motoneurônios, foi possível detectar-se uma porcentagem de morte neuronal nos gânglios sensitivos, indicando que processos apoptóticos podem estar envolvidos no ajuste fino da população de neurônios sensitivos após o nascimento. Porém, ao contrário do observado nos motoneurônios, a morte residual de neurônios sensitivos continua ocorrendo até o nono dia pós natal, tendo sido detectados em média $7,67 \pm 0,66$ neurônios

apoptóticos no lado contralateral à lesão, $9,33 \pm 0,33$ no gânglio esquerdo e $9,17 \pm 0,77$ de animais P9 normais. Apesar disso, observa-se uma tendência de diminuição da TUNEL marcação já em 72 horas após a lesão ($F(28,41)=16,60$; $p<0,05$).

A transecção do nervo ciático esquerdo em P2 levou a um extensiva morte de neurônios sensitivos presentes no gânglio L5 ipsilateral à lesão. Interessantemente, em contraste com o ocorrido nos motoneurônios, a resposta dos neurônios sensitivos foi mais tardia. Assim, 4 e 8 horas após a axotomia não foi observado aumento significativo da marcação, permanecendo os valores médios em $9,67 \pm 2,08$ e $10,67 \pm 1,85$ respectivamente. Somente após 12 horas da lesão observou-se um aumento significativo do número de neurônios apoptóticos ($24,33 \pm 2,90$), sendo o pico de morte atingido apenas doze horas mais tarde, ou seja, 24 horas após a lesão ($60,67 \pm 12,17$; $p<0,05$). Os valores médios do número de neurônios sensitivos permaneceram elevados até as 72 horas seguintes à transecção do nervo ciático, quando retornaram ao nível basal em P2+1 semana ($7,67 \pm 0,66$).

3.2.3. Interneurônios

A Tabela III apresenta o número total de interneurônios TUNEL positivos presentes nas secções transversais de medula espinhal provenientes de animais normais e de animais cujo nervo ciático esquerdo foi transeccionado. Estão representados os valores médios (média $\pm$ erro padrão) obtidos nos lados ipsilateral e contralateral dos animais P2 operados após 4, 8, 12, 24, 48, 72 horas e uma semana da lesão. No caso dos animais normais, os valores descritos representam o número de neurônios sensitivos TUNEL positivos encontrados em animais recém nascidos

sacrificados em P2+4, P2+8, P2+12, P2+24 (P3), P2+48 (P4), P2+72 (P5) horas e P2+1 semana (P9). Estes dados estão graficamente representados na Figura 13. As Figuras 10 e 11 apresentam a distribuição espacial dos interneurônios TUNEL positivos identificados em todas as secções analisadas.

Analisando-se os valores médios do número de interneurônios TUNEL positivos nos animais normais, observa-se que não há diferenças significativas entre os lados esquerdo e direito em todos os tempos de sobrevivência estudados ($F(28,41)=44,35$; $p<0,05$). Contudo, dois dias e meio após o nascimento, observou-se um pico de morte celular por apoptose. Desta forma, em P2+8h, o número médio de células marcadas foi de $49,00\pm2,52$ no lado esquerdo e de $45,33\pm4,37$ no lado direito ao passo que em P2+12h estes valores foram de $83,33\pm2,96$ no lado esquerdo normal e $82,33\pm0,33$ no lado direito normal, respectivamente. Estes valores tenderam a decrescer gradativamente após este período, atingindo o mínimo de marcação em P9.

A axotomia do nervo ciático em ratos neonatos com dois dias de vida acarretou um aumento significativo do número de interneurônios medulares apoptóticos no lado ipsilateral à lesão. Tal aumento foi bastante acentuado 8 horas após a transecção ($104,00\pm9,61$), sendo aproximadamente 67 por cento superior ao lado contralateral, mantendo-se neste nível até P2+24 horas ($100,67\pm14,65$). Após este período, o número de interneurônios, apesar de ainda ser estatisticamente superior ao contralateral ($p<0,05$), passou a decrescer após 48 horas ($65,67\pm2,73$), atingindo o nível dos animais não operados em P2+72 horas ($33,33\pm3,76$).

Uma observação importante diz respeito aos interneurônios apoptóticos presentes no lado contralateral à lesão. Detectou-se ali, um aumento significativo

do número de interneurônios TUNEL positivos, comparativamente aos animais não operados. Este aumento pode ser detectado 8 horas subseqüentemente à lesão ($70,33 \pm 9,34$), sendo aproximadamente 60 por cento superior aos lados esquerdo e direito dos animais não operados, mantendo-se assim até P2+24 horas ($65,00 \pm 9,17$).

3.2.3.1 Interneurônios apoptóticos presentes nas lâminas I, II e III

Como mostra a Tabela IV e as Figuras 10, 11 e 13B, a lesão do nervo ciático em ratos P2 levou a um aumento significativo ($F(28,41)=10,67; p<0,05$) do número de interneurônios apoptóticos presentes nas lâminas mais superficiais da medula espinhal, em comparação aos animais normais, tanto no lado ipsilateral quanto contralateral à transecção. Contudo, o lado ipsilateral apresentou os maiores valores de células apoptóticas.

Em P2+8 horas, já foi possível observar um aumento significativo de interneurônios apoptóticos no lado ipsilateral. Este foi 31 por cento superior ao lado contralateral e três vezes maior que dos lados esquerdo e direito dos animais não operados. Tal diferença foi mantida até 24 horas subseqüentemente à transecção ($26,33 \pm 2,90$), sendo 107 por cento superior ao contralateral e aos lados esquerdo e direito dos animais não operados. Após 48 horas da lesão, o número de interneurônios apoptóticos retornou gradativamente aos níveis observados no lado contralateral e nos animais não operados.

Nos animais não operados, foi constatada morte de interneurônios por apoptose a partir de P2+4 horas ($11,67 \pm 0,88$, lado esquerdo; $13,00 \pm 2,52$, lado

direito). Este manteve-se estável até P4 ($8,00 \pm 2,00$, lado esquerdo; $11,33 \pm 0,88$, lado direito), mostrando um decréscimo a partir de P5 ($5,00 \pm 1,53$, lado esquerdo; $5,00 \pm 0,58$, lado direito) e atingindo o nível mínimo em P9 ($3,00 \pm 1,00$, lado esquerdo; $2,00 \pm 0,58$, lado direito).

3.2.3.2 Interneurônios presentes nas lâminas IV, V e VI

O número médio de interneurônios apoptóticos encontrados na porção medial das lâminas IV, V e VI está expresso na Tabela V. Estes valores estão representados graficamente na Figura 13C, sendo o padrão de distribuição destes neurônios ilustrado nas Figuras 10 e 11.

A transecção do nervo ciático nas condições experimentais utilizadas, promoveu um aumento significativo do número de interneurônios TUNEL positivos encontrados nas lâminas IV, V e VI ($F(28,41)=$; $p<0,05$). Tal aumento pôde ser detectado bilateralmente ($16,67 \pm 0,66$ ipsilateral; $14,00 \pm 1,15$ contralateral) a partir de 4 horas pós lesão, sendo estes valores superiores aos encontrados no lado esquerdo e direito de animais não operados ($10,67 \pm 3,29$ esquerdo; $10,67 \pm 1,20$ direito). A partir de 8 horas subsequentes à lesão, o número de interneurônios apoptóticos presentes no lado contralateral passou a ser estatisticamente superior ao lado ipsilateral e lados esquerdo e direito nos animais não operados. Porém, ao contrário dos neurônios presentes nas lâminas I, II e III, não foi observado aumento significativo de células apoptóticas no lado contralateral da medula espinhal.

O pico de morte interneuronal nas lâminas IV, V e VI foi observado 24 horas após a axotomia ($26,33 \pm 2,40$), sendo 154 por cento superior ao valor obtido no

lado contralateral ($10,33 \pm 0,88$). Quarenta e oito horas após a lesão, o número médio de neurônios TUNEL positivos diminuiu atingindo valores semelhantes aos observados no lado contralateral e nos animais não operados, mantendo-se neste nível até uma semana pós lesão.

3.2.3.3 Interneurônios presentes fora das lâminas I a VI e IX

A Tabela VI contém os valores referentes ao número médio de interneurônios apoptóticos encontrados nas colunas dorsal e ventral da medula espinhal, fora das lâminas I a VI e IX. Estes valores estão graficamente representados na Figura 13D e sua distribuição espaço-temporal pode ser observada nas Figuras 10 e 11.

Nossos resultados permitiram verificar que o pico de morte natural de interneurônios medulares ocorre ao redor de 12 horas após o nascimento (Figura 13A e D) e está concentrado fora das lâminas I a VI e IX. Este processo correspondeu a um aumento transitório de aproximadamente 100 por cento do número de neurônios TUNEL positivos presentes no lado esquerdo ($59,33 \pm 4,04$) e direito ($57,67 \pm 4,49$) de animais normais a partir de P2+8 horas, retornando ao nível basal em P3. O período de morte natural de neurônios na medula espinhal ainda pode ser observado até P9, quando apresentou os menores valores, correspondendo a apenas 20 por cento do número observado em P2+12 horas ($F(28,41)=4,78$; $p<0,05$).

Os efeitos da transecção do nervo ciático sobre a morte interneuronal nessa região foram menos evidentes comparativamente àqueles observados nas lâminas I

a VI, apesar da existência de diferenças significativas. Após 4, 8 e 48 horas da axotomia, houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na quantidade de interneurônios apoptóticos, havendo inclusive um acréscimo no lado contralateral, em relação aos animais não operados.

Um fato importante que merece destaque é que durante o pico de morte interneuronal nas lâminas I a VI, ou seja, 24 horas após a lesão, observa-se uma queda do número médio de neurônios apoptóticos no restante da medula (48%). Por outro lado, a transecção do nervo ciático leva a um aumento da morte de interneurônios em todas as regiões da medula 8 e 12 horas pós lesão. Nestes momentos, observa-se que há um percentual maior de neurônios apoptóticos nas lâminas superficiais da medula e outras regiões (77%) comparativamente as lâminas IV, V e VI (23%). Esta distinção é ainda mais evidente em P2+48, onde neurônios apoptóticos fora das lâminas I a VI correspondem a aproximadamente 83 por cento do total.

3.3. Influência dos componentes aferente e eferente na sobrevivência de interneurônios medulares

O estudo do padrão temporal e distribucional dos interneurônios medulares demonstrou que esta ocorre, em determinados momentos, concentrada em duas regiões específicas da medula espinhal, correspondendo às lâminas I a III e IV a VI. Devido a particularidades funcionais de cada região em questão, foram realizados dois experimentos com o intuito de verificar a importância relativa do componente aferente e eferente no processo de indução da apoptose de

interneurônios: 1) Transecção das raízes dorsais e 2) Transecção do nervo ciático e tratamento com NGF, CNTF e NGF+CNTF.

3.3.1 Efeito da transecção das raízes dorsais sobre a marcação TUNEL positiva de interneurônios medulares

Vinte e quatro horas após a transecção das raízes nervosas sensitivas, as medulas estavam macroscopicamente bem preservadas, podendo ser identificado claramente o local lesionado. A observação dos cortes transversais possibilitou a identificação das raízes transeccionadas, não havendo alterações significativas na forma e estrutura da medula.

A análise da reação do TUNEL neste grupo experimental restringiu-se a identificação das células apoptóticas no que diz respeito à sua natureza e à sua localização, nas lâminas de Rexed. A perda da aferência levou a um aumento importante do número de interneurônios apoptóticos localizados nas lâminas superficiais da coluna dorsal, havendo também um aumento da quantidade de células TUNEL positivas na porção medial das lâminas IV, V e VI (Figuras 14A e B). Contudo, como a análise destes resultados não envolveu a contagem e mapeamento neuronal, não foi possível comprovar estatisticamente a existência de aumento na morte de interneurônios no lado contralateral.

3.3.2. Efeito da administração de NGF e CNTF sobre o número e padrão de distribuição de neurônios TUNEL positivos

3.3.2.1. Motoneurônios e neurônios sensitivos

(Tabelas VII, VIII e Figuras 16 e 17)

A aplicação de CNTF reduziu significativamente ($F(16,23)=7,57$; $p<0,05$) a quantidade de motoneurônios TUNEL positivos 24 horas após a transecção do nervo ciático esquerdo. Tal redução foi da ordem de pelo menos 60 por cento ($3,00\pm0,58$) em relação ao grupo tratado com PBS ($8,00\pm2,09$). O NGF, por outro lado, não foi eficaz na prevenção da morte dos motoneurônios, sendo o número médio destes presentes no lado esquerdo da medula dos animais tratados ($8,00\pm1,53$) estatisticamente igual ao obtido no tratamento com PBS. O grupo tratado com a mistura de NGF e CNTF apresentou resultado idêntico ao obtido empregando-se apenas CNTF ($3,00\pm0,58$). Em nenhum grupo observou-se efeito significativo dos tratamentos sobre a sobrevivência de motoneurônios no lado contralateral.

O tratamento com NGF foi altamente eficaz ($p<0,05$) no resgate dos neurônios sensitivos axotomizados, reduzindo a morte neuronal em até cinco vezes ($19,67\pm5,18$) comparativamente ao grupo tratado com PBS ($71,67\pm4,67$). Por outro lado, o tratamento com CNTF não impediu a perda neuronal sensitiva, sendo o número médio de neurônios TUNEL positivos ($57,33\pm9,50$) estatisticamente semelhante ao grupo controle. No grupo tratado com a mistura de CNTF + NGF observou-se uma acentuada diminuição do número de neurônios sensitivos apoptóticos ($12,00\pm2,31$), compatível com aquela observada no grupo tratado apenas com NGF.

Nos grupos tratados com PBS ou CNTF os valores médios de neurônios sensitivos apoptóticos encontrados nos gânglios direitos foram estatisticamente iguais àqueles presentes nos gânglios direitos dos animais que tiveram o nervo ciático correspondente apenas transeccionado. Contudo, nos grupos tratados com NGF e NGF+CNTF constatou-se uma redução significativa ($p<0,05$) do número médio de neurônios apoptóticos presentes nos gânglios L5 contralaterais ($9,00\pm0,58$, tratado com NGF; $9,33\pm0,33$, tratado com NGF+CNTF; Tabela VIII)

3.3.2.2. *Interneurônios*

(Tabelas IX, X, XI, XII e Figuras 15, 17 e 19)

Os tratamentos com NGF e CNTF tiveram efeito estatisticamente significativo na sobrevivência de interneurônios, reduzindo o número de neurônios apoptóticos, comparativamente ao grupo tratado com PBS, 24 horas após a transecção do nervo ciático em ratos P2 ($F(16,23)=16.97$; $p<0,05$).

O grupo tratado com CNTF apresentou uma redução de 13 por cento no número de interneurônios TUNEL positivos distribuídos nos cornos dorsal e ventral da medula espinhal, comparativamente ao controle ($111,00\pm4,34$, CNTF; $128,33\pm6,56$, PBS). O tratamento com NGF levou a uma diminuição de aproximadamente 17 por cento no número de interneurônios apoptóticos em comparação ao grupo controle ($107\pm6,56$). A análise do número médio de interneurônios medulares apoptóticos após a transecção do nervo ciático e tratamento com a combinação de NGF+CNTF revelou uma redução significativa no número de células TUNEL marcadas ($p<0,05$). Este valor foi aproximadamente 15 por cento menor ($93,00\pm2,65$) em comparação com os grupos onde os fatores

neurotróficos foram administrados separadamente. Em nenhum grupo observou-se diferenças significativas dos tratamentos na sobrevivência dos interneurônios presentes no lado contralateral.

No sentido de melhor entender as modificações relacionadas com a indução de apoptose subsequente a transecção do nervo ciático foi calculada a razão ($R=E/D$) entre o número de interneurônios marcados encontrados nos lados ipsilateral (E) e contralateral (D) a lesão. Este valor permitiu uma melhor avaliação do efeito da lesão e do tratamento na sobrevivência dos interneurônios. De fato, os valores de R confirmaram que o tratamento com NGF e CNTF separadamente foi capaz de resgatar um número estatisticamente significativo de interneurônios em comparação ao grupo controle (Tabela IX, Figura 19A).

Contudo, observou-se que o tratamento do coto proximal do nervo axotomizado com CNTF, não promoveu alterações significativas do número de interneurônios apoptóticos presentes nas lâminas superficiais (I, II e III) do corno dorsal da medula espinhal ($22,00 \pm 1,53$), comparativamente ao grupo controle ($23,67 \pm 0,88$, PBS) ($F(8,11)=3,66$; $p<0,05$). A aplicação de NGF ($20,33 \pm 0,53$), bem como a combinação de NGF+CNTF ($19,00 \pm 1,00$) apresentou como resultado, uma tendência de reduzir do número de células apoptóticas nessa região, não atingido porém valores estatisticamente significativos (Figura 19B).

O cômputo de R confirmou a tendência apresentada pelos valores absolutos. Desta forma, os tratamentos com NGF e NGF+CNTF mostraram-se mais efetivos no resgate dos interneurônios presentes nas lâminas I, II e III ($1,42 \pm 0,30$ – NGF; $1,88 \pm 0,32$ – NGF+CNTF).

Semelhantemente ao observado nas lâminas superficiais, o emprego do CNTF mostrou-se ineficaz na prevenção da morte dos interneurônios localizados na porção medial das lâminas IV, V e VI, sendo os valores médios estatisticamente iguais ao grupo tratado com PBS ($p < 0,05$). Tal tendência foi confirmada pela análise da razão entre os lados ipsi e contralateral ($2,16 \pm 0,43$ – PBS; $2,13 \pm 0,12$ – CNTF). Por outro lado, o NGF promoveu uma diminuição significativa da morte dos interneurônios presente nas lâminas profundas do corno dorsal, fato constatado pelo cálculo de R ($1,29 \pm 0,04$) ($F(8,11) = 52,03$; $p < 0,05$). Ainda, a associação entre NGF e CNTF praticamente aboliu a morte interneuronal nas referidas lâminas ($1,09 \pm 0,02$; Figura 19C; $p < 0,05$).

O CNTF mostrou-se eficaz no resgate dos neurônios localizados principalmente no corno ventral da medula espinhal. Tal redução foi estatisticamente significativa ($F(8,11) = 14,63$; $p < 0,05$) considerando-se os valores de R ($1,28 \pm 0,08$ – CNTF; $1,67 \pm 0,10$ – PBS). O número médio de interneurônios apoptóticos presentes fora das lâminas IX, I-III e IV-VI, não foi alterado pelo tratamento com NGF ($1,51 \pm 0,02$) nem com o emprego da combinação NGF+CNTF (Figura 19D).

3.4. Efeito da morte dos neurônios sensitivos sobre a área dos gânglios espinhais

Como foi descrito anteriormente, a transecção do nervo ciático no modelo empregado promoveu uma extensa morte neuronal nos gânglios das raízes dorsais 24 horas após a lesão. Contudo, como mostra a Tabela XIII, a partir dos resultados morfométricos obtidos, constatou-se que esta morte de neurônios sensitivos não causou uma diminuição estatisticamente significativa da área total das secções

transversais dos gânglios dorsais. Esta diminuição mostrou-se da ordem de menos de 7 por cento, não interferindo portanto nas contagens e estimativas dos neurônios TUNEL positivos.

4. DISCUSSÃO

É bem conhecido que lesões nervosas periféricas em ratos recém nascidos levam à extensiva morte dos neurônios axotomizados que, pelo menos em parte, pode ser explicado pela privação de moléculas neurotróficas advindas dos órgãos alvo (Lowrie & Vrbová, 1992; Lowrie *et al.*, 1994; Vejsada *et al.*, 1995; Junger & Varon, 1997). O esmagamento do nervo ciático no dia do nascimento, por exemplo, provoca a morte de praticamente todos os motoneurônios afetados (Lowrie *et al.*, 1987). Um estudo do padrão temporal de morte de motoneurônios após o esmagamento do nervo ciático ao nível de fossa poplíteia, em ratos recém nascidos com 3 dias de vida, mostrou que os primeiros sinais de perda neuronal ocorrem nas primeiras 72 horas após o esmagamento (Lowrie *et al.*, 1994). Além disso, Lowrie *et al.* (1994) mostraram que durante tal período, praticamente a metade dos motoneurônios havia desaparecido. Desta forma, quanto mais tardiamente a lesão for realizada, menor será a perda neuronal. Por outro lado, quando a lesão é uma secção total do nervo, acompanhada do impedimento da regeneração axonal, seus efeitos sobre a morte dos neurônios é sempre mais drástica (Kashihara *et al.*, 1987). Ainda, outro fator relevante para o efeito da lesão nervosa periférica sobre a morte neuronal é o local da lesão, ou seja, uma axotomia mais próxima ao corpo celular do neurônios é capaz de promover um efeito deletério superior ao de uma axotomia nas proximidades do órgão alvo (Kashihara *et al.*, 1987).

Assim, levando-se em consideração os dados da literatura, empregamos neste estudo o modelo da transecção do nervo ciático, ao nível do forame obturatório, em ratos P2, com o objetivo de estudar os mecanismos de morte neuronal subsequente à axotomia,. Ainda, para melhor analisar os efeitos da axotomia de motoneurônios e neurônios sensitivos sobre os interneurônios medulares, lançamos mão do

tratamento da lesão nervosa administrando fatores neurotróficos capazes de resgatar motoneurônios (CNTF) e neurônios sensitivos (NGF), respectivamente. Adicionalmente, realizamos também a transecção das raízes dorsais dos gânglios sensitivos para avaliar a importância do componente aferente na sobrevivência dos interneurônios medulares.

Primeiramente, verificamos em nosso estudo que a transecção do nervo ciático na altura do forame obturatório em animais P2 promoveu uma resposta de proporções semelhantes ou superiores à observada por Lawson & Lowrie (1998). Estes autores verificaram um aumento do número de motoneurônios apoptóticos 18 horas após a lesão, havendo um pico após 24 horas, em relação ao lado contralateral. Em nosso trabalho observamos um grau semelhante de morte de motoneurônios, porém mais precocemente, ou seja 8 horas após a lesão. Isto poderia ser atribuído ao fato de que, além da lesão no nosso estudo ter sido mais proximal do que a descrita por Lawson & Lowrie (1998), com a transecção isolamos completamente os cotos proximal e distal, interrompendo assim o eventual fluxo de substâncias neurotróficas em direção ao corpo celular. Consideramos este procedimento de grande importância, uma vez que a axotomia provoca um aumento acentuado da produção de fatores neurotróficos no coto distal do nervo (Seddon, 1943; Whiteside *et al.*, 1998). Ainda, os neurônios em processo regenerativo expressam os receptores de alta e baixa afinidade para estes fatores. Por exemplo, os efeitos do BDNF e do NGF, são mediados pelos receptores tirosino-quinase B e A, presentes nos cones de crescimento das fibras motoras e sensitivas, respectivamente (Ip *et al.*, 1993). Assim, acreditamos ter provocado com a transecção do nervo uma lesão aguda dos motoneurônios e neurônios sensitivos, capaz de mais precocemente levar à morte a sua grande maioria.

Os efeitos da axotomia na sobrevivência neuronal podem ser estudados a partir de várias técnicas ao nível de microscopia de luz e eletrônica. Na maioria dos estudos de microscopia de luz, foram empregadas técnicas de contagem celular em cortes seriados, sendo os neurônios corados citoquimicamente (Snider, 1992). A contagem de neurônios após a marcação retrógrada com HRP (horseradish peroxidase) é outro método utilizado para se estimar a morte celular subsequente a axotomia (Peyronnard *et al.*, 1986). Contudo, pelo fato dos axônios presentes no coto proximal do nervo poderem sofrer graus variáveis de degeneração retrógrada, é possível que uma percentagem de neurônios sobreviventes não seja capaz de captar a HRP no local de aplicação. Desta forma, tal método pode superestimar a morte neuronal (Peyronnard *et al.*, 1986; McBride *et al.*, 1990). Outra estratégia para o estudo da morte neuronal é o emprego de traçadores fluorescentes tais como “fluorogold” (Schmued & Fallon, 1986) e “fast blue” (Skirboll *et al.*, 1986; Lowrie *et al.*, 1992), os quais permanecem no interior das células por um longo período. Estes traçadores podem ser aplicados antes da axotomia, sendo os neurônios sobreviventes visualizados posteriormente com precisão.

Os resultados obtidos por estudos que empregaram as técnicas acima mencionadas, demonstraram apenas o desaparecimento celular, sem contudo identificar e caracterizar o processo que leva à morte celular. Em nosso trabalho, um dos objetivos principais foi a caracterização do processo de morte neuronal induzida pela transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos. Desta forma, utilizamos uma técnica de marcação *in situ* dos neurônios que apresentavam fragmentação do DNA, resultante da ação de endonucleases, para assim evidenciar as células em provável processo de morte por apoptose (Gavrieli *et al.*, 1992).

Sabe-se porém que, em alguns casos, características de células apoptóticas podem também ser observadas em células necróticas. Um exemplo é a própria fragmentação do DNA, característica da apoptose, que eventualmente pode ocorrer em células em necrose (Li *et al.*, 1998). Como descrito na literatura, apoptose e necrose são processos constituídos por séries de eventos que podem ser melhor caracterizados, morfologicamente, à microscopia de luz e eletrônica. Neste sentido, foi fundamental o emprego de outras técnicas capazes de diferenciar o processo de apoptose da necrose celular. Por isto, concomitantemente com a identificação de fragmentação do DNA, realizamos o estudo ultraestrutural das medulas e gânglios espinhais 24 horas após a transecção do nervo ciático em ratos P2, com o objetivo de confirmar a ocorrência de apoptose nessas regiões.

Os resultados por nós obtidos revelaram que os motoneurônios, neurônios sensitivos e interneurônios medulares apresentavam as características morfológicas básicas do processo de apoptose, estando de acordo com descrições prévias de outros autores (Kerr *et al.*, 1972; McConkey *et al.*, 1996, Lawson & Lowrie *et al.*, 1998). Assim, a compactação da cromatina, bem como a degeneração do envelope nuclear foram freqüentemente observadas nos neurônios apoptóticos. O citoplasma dessas células apresentava desde alterações sutis, tais como pequena compactação de organelas acompanhada por aumento da eletrondensidade, até grandes modificações estruturais, culminando com a total fragmentação celular. Em alguns casos, pôde-se observar células gliais fagocitando corpos apoptóticos, sendo importante ressaltar a ausência de inflamação local. Tal característica tem sido descrita como fundamental para a caracterização do processo apoptótico (McConkey *et al.*, 1996).

Modificações nucleares, tais como grande compactação da cromatina, bem como vazamento de material nuclear para o citoplasma, conforme por nós descrito, foram também observados por Clarke & Hornung (1989) e Clarke (1990). Eventos relacionados à cromatólise, como migração do núcleo para a periferia da célula e dissolução da substância de Nissl, também foram características por nós observadas, estando em conformidade com a literatura (Peters *et al.*, 1991).

No que diz respeito ao padrão temporal da morte de motoneurônios por apoptose, nossos achados mostraram que, após 8 horas da transecção do nervo ciático, havia um número estatisticamente superior de neurônios TUNEL positivos comparativamente ao lado contralateral da medula. Este aumento manteve-se até 48 horas subseqüentes à lesão, retornando ao nível basal após 72 horas. É importante notar que a técnica do TUNEL por nós empregada, demonstra a fragmentação do DNA em células ainda existentes, o que permitiu detectar mais precocemente a ocorrência do processo de morte celular em comparação ao observável com as técnicas citoquímicas convencionais (Oppenheim *et al.*, 1991; Snider, 1992; Lowrie *et al.*, 1994).

De fato, Lawson & Lowrie (1998), empregando a técnica do TUNEL, reportaram um padrão temporal de morte de motoneurônios bastante semelhante ao por nós obtido. Nesse trabalho foi realizado o esmagamento do nervo ciático em ratos P2, na altura da fossa poplítea, sendo os animais sacrificados a partir de 18 horas pós-lesão até 10 dias. Esses autores constataram que após 18 horas já havia um número significativo de motoneurônios apoptóticos, ocorrendo um pico 24 horas após a axotomia. Porém, ao contrário dos resultados por nós obtidos, Lawson & Lowrie (1998) observaram um número de motoneurônios apoptóticos bastante reduzido após 48 e 72 horas.

Desta forma, nossos resultados, conjugados com os presentes na literatura, permitem concluir que a axotomia neonatal resulta na morte neuronal por apoptose, que pode ser precocemente observada. Contudo, devemos ressaltar que as técnicas citoquímicas convencionais são extremamente úteis para a quantificação da perda neuronal após tempos de sobrevivência superiores a 6 dias (Lowrie *et al.*, 1994).

Até recentemente, a morte celular natural por apoptose, ou morte celular programada, havia sido demonstrada em várias populações neuronais, incluindo-se motoneurônios, neurônios sensitivos dos gânglios dorsais, células de Purkinje no cerebelo e neurônios do córtex cerebral (Oppenheim, 1991; Sanders & Wride, 1995; Clarke & Clarke, 1996). Interessantemente, em 1997, Lawson e colaboradores demonstraram a existência de morte celular programada de interneurônios medulares de rato nos primeiros dias de vida pós-natal. Em nosso estudo obtivemos resultados semelhantes àqueles de Lawson *et al.* (1997) nos animais controle. Adicionalmente, observamos que a transecção do nervo ciático em ratos neonatos também causa a morte de interneurônios, a qual coincide com o período de morte natural, que ocorre do dia do nascimento até o sexto dia pós-natal (Oliveira *et al.*, 1997). Desta forma, é possível afirmar que a lesão causada pela transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos produz não apenas a morte dos motoneurônios e neurônios sensitivos axotomizados, mas também, indiretamente, de interneurônios medulares.

A partir da observação desse fato, nos concentramos então, na obtenção de informações sobre a importância relativa das aferências sensitivas e das eferências motoras na morte de interneurônios medulares após a lesão do nervo. Inicialmente, realizamos uma análise comparativa do padrão temporal da TUNEL marcação dos motoneurônios, interneurônios medulares e neurônios sensitivos dos gânglios

dorsais. Nossos resultados mostraram um rápido aumento do número de neurônios motores e interneurônios TUNEL positivos a partir de 4 horas após a transecção do nervo ciático. Este aumento do número de neurônios TUNEL positivos foi maior entre 8 e 24 horas pós lesão na população dos interneurônios e, entre 8 e 48 horas, na dos motoneurônios. Em contraste, os gânglios sensitivos responderam mais tardiamente à lesão. Estes últimos apresentaram os primeiros sinais de aumento do número de células TUNEL marcadas 12 horas após a axotomia, com o pico às 24 horas pós lesão. Contudo, até 72 horas após a lesão foi possível detectar um aumento significativo da frequência de neurônios TUNEL positivos.

Uma questão importante no uso da marcação de células apoptóticas pela técnica do TUNEL é a identificação do tipo celular afetado. Assim, em nosso trabalho, foi necessário discernir se a TUNEL marcação estava presente exclusivamente nos interneurônios e não nas células gliais, já que estas podiam também ter sido afetadas secundariamente pela morte neuronal. Neste sentido, o emprego da técnica do TUNEL associada a HRP nos permitiu a identificação adequada das células apoptóticas. Na medula espinhal, tal marcação estava restrita apenas motoneurônios e interneurônios. Além disso, as informações obtidas com a microscopia eletrônica nos permitiram concluir pela não ocorrência da morte de células gliais.

Segundo nosso conhecimento, parece não existirem estudos sobre a morte de células gliais em ratos neonatos empregando-se modelos experimentais semelhantes ao por nós utilizado. Contudo, estudos realizados em animais normais não relataram a ocorrência de morte de células gliais em virtude da perda neuronal natural, quer durante o desenvolvimento, quer no período neonatal (Oppenheim, 1991; Harris & McCaig, 1984; Coggeshall *et al.*, 1984; Lawson *et al.*, 1997). Em

particular, Lawson *et al.* (1997) submeteram secções de medula espinhal de animais neonatos à reação do TUNEL e marcação das células com anticorpo anti-PGP9.5 (protein gene product 9.5), para a identificação de neurônios, e com anticorpo anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein), para a identificação de células gliais. Seus resultados mostraram categoricamente que apenas os neurônios apresentavam-se TUNEL positivos.

Além disso, se em nosso estudo tivesse ocorrido morte de células gliais, esta deveria ter-se estendido ao funículo dorsal, que continha fibras aferentes de neurônios sensitivos apoptóticos, que poderiam ter entrando em processo degenerativo. Porém, não observamos marcação TUNEL positiva nessa região, reforçando portanto a não ocorrência da morte de células gliais por apoptose.

Por outro lado, a transecção do nervo ciático, por nós realizada, resultou na ocorrência tanto de neurônios como de células satélites TUNEL positivas nos gânglios sensitivos. As células gliais porém, foram facilmente diferenciáveis dos neurônios em virtude de suas pequenas dimensões e de sua localização.

Ainda com relação aos gânglios sensitivos, Whiteside *et al.* (1998) também observaram que a transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos (P2) resultou num significativo aumento da TUNEL marcação nessas estruturas 24 horas após a axotomia. Contudo, 72 horas após a lesão, a maioria das células TUNEL positivas presentes no gânglio sensitivo era constituída por células satélites. Nossos resultados foram semelhantes aos observados por Whiteside *et al.* (1998) no que diz respeito à frequência de neurônios apoptóticos 24 horas após a lesão. Porém, diferem após o período de 72 horas, onde foi ainda por nós

identificada uma quantidade média 2,5 vezes superior de neurônios sensitivos TUNEL positivos, comparativamente ao lado contralateral.

Um outro aspecto que levamos em consideração em nosso experimento, foi a eventual redução do volume dos gânglios sensitivos em decorrência da morte celular. Contudo, os nossos resultados da avaliação morfométrica de cortes alternados dos gânglios sensitivos mostrou que, 24 horas após a transecção do nervo ciático, não houve diferença significativa entre os grupos lesado e controle.

É importante considerar que para a avaliação consistente da ocorrência de apoptose em uma dada população celular, deve-se levar em conta o período de tempo entre o início do processo, com marcação TUNEL positiva, e o efetivo desaparecimento da célula. Este fato pode ser ilustrado pelos achados de Biobao & Dubois-Dauphin (1996) estudando a morte de motoneurônios após a transecção do nervo facial em ratos recém nascidos. Estes autores observaram um pico de TUNEL marcação 28 horas após a axotomia, porém, o desaparecimento de motoneurônios foi detectada pela coloração com cresil-violeta até 120 horas. Assim, existe um período de tempo entre a TUNEL marcação positiva e a efetiva morte neuronal. Acredita-se que previamente a este período ocorra síntese de proteínas pró apoptóticas e anti apoptóticas, sendo que o balanço entre elas leva a morte celular.

De fato, neste mesmo trabalho, Biobao & Dubois-Dauphin (1996), utilizando animais transgênicos que apresentam uma expressão acentuada da proteína anti apoptótica Bcl-2, verificaram ser possível abolir a TUNEL marcação dos motoneurônios após a transecção do nervo facial em ratos recém nascidos. Neste contexto porém, é importante lembrar que um estudo recente realizado em

camundongos, demonstrou que as características morfológicas relacionadas a morte dos motoneurônios após axotomia neonatal do nervo ciático, embora acompanhada de TUNEL marcação, exibia tanto similaridades como diferenças com as características atualmente aceitas para o processo apoptótico (Li *et al.*, 1998). Assim, acreditamos que em nosso estudo, as observações morfológicas à microscopia eletrônica foram de fundamental importância para a confirmação de que os neurônios observados realmente encontravam-se em apoptose.

Quanto ao padrão temporal da TUNEL marcação dos interneurônios medulares, nossos resultados diferem daqueles relatados por Lawson & Lowrie (1998) empregando o modelo de lesão nervosa periférica no rato recém nascido. Esses autores detectaram nos animais lesados um maior número de neurônios TUNEL positivos fora da lâmina IX, em comparação com os animais normais, não descrevendo, contudo, regiões preferenciais de TUNEL marcação. Esse aumento foi observado a partir de 4 dias após a cirurgia, com um pico aos 6 dias, retornando ao nível basal aos 8 dias. O padrão descrito por Lawson & Lowrie (1998) foi consideravelmente mais lento que o verificado em nosso estudo. É plausível supor que essa diferença seja devida ao tipo de lesão empregada nos dois estudos. Conforme já mencionado, sabe-se que essas duas situações experimentais, ou seja, transecção e esmagamento do nervo ciático, resultam em grandes diferenças na presença de substâncias neurotróficas existentes no coto distal do nervo lesionado, podendo eventualmente alterar padrão de morte dos interneurônios.

Além disso, em confronto com o trabalho de Lawson & Lowrie (1998), observamos um aumento significativo do número de interneurônios TUNEL positivos no lado ipsilateral à lesão a partir de 4 horas após a cirurgia, o qual manteve-se superior ao lado contralateral até 48 horas. Tal aumento foi mais

precoce nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula, sendo por outro lado, mais tardio nas lâminas profundas. Levando-se em conta que o pico de morte por apoptose dos neurônios sensitivos ocorre 24 horas após a lesão, nossos resultados podem ser interpretados como se os interneurônios presentes nas lâminas superficiais da medula fossem mais sensíveis a alterações funcionais da aferência sensitiva decorrentes da lesão, em comparação com aqueles localizados nas lâminas profundas. É importante notar ainda, que a secção dos prolongamentos periféricos das fibras aferentes primárias induz uma série de modificações nos neurônios sensitivos lesados. Por exemplo, estas células apresentam aumento da expressão de CGRP (calcitonin gene related protein), substância P e outros neuropeptídeos (Jessel *et al.*, 1979; Nielsh *et al.*, 1987; Xu *et al.*, 1990; Dumolin *et al.*, 1991; Kashiba *et al.*, 1992; Hökfelt *et al.*, 1994), bem como síntese de neurotrofinas e seus receptores, tais como NGF e TrkA (Ernfors *et al.*, 1993). Desta forma, é possível que as modificações funcionais acima mencionadas resultem na diminuição do fluxo de fatores neurotróficos dos neurônios sensitivos para os interneurônios medulares, induzindo a morte destes por apoptose, antes que seja possível detectar-se alguma alteração morfológica nos gânglios das raízes dorsais.

Por sua vez, os resultados encontrados no que diz respeito ao padrão temporal da TUNEL marcação dos interneurônios presentes nas lâminas mais profundas (IV, V e VI), devem ser interpretados levando-se em conta que os mesmos estão inseridos numa rede neuronal mais complexa. Estes, em sua maioria, recebem aferências intramedulares, supramedulares e aferências sensitivas primárias, e fazem sinapse com motoneurônios. Portanto, podemos supor que os mesmos possuam um maior aporte de fatores tróficos após a lesão, em relação aos interneurônios das lâminas superficiais, o que poderia determinar um maior tempo de sobrevivência dos mesmos.

Ainda, os resultados obtidos com a transecção das raízes dorsais da medula mostram um aumento importante na TUNEL marcação de interneurônios se comparada àquela obtida com a transecção do nervo ciático. Esse resultado evidencia a grande importância das aferências para a sobrevivência dos interneurônios, principalmente daqueles localizados nas lâminas I, II e III.

Em um estudo bastante recente, Waters *et al.* (1998) propuseram um outro papel para os interneurônios. Esses autores postularam que os interneurônios podem contribuir para a morte dos motoneurônios medulares após o esmagamento do nervo ciático em ratos neonatos. Ou seja, após uma lesão desse tipo podem prevalecer sobre alguns motoneurônios sinapses excitatórias mediadas por glutamato liberado por interneurônios, levando a um aumento do cálcio intracelular nos motoneurônios. Para dar subsídios a esta hipótese, Waters *et al.* (1998) realizaram o esmagamento do nervo ciático em um grupo de animais e apenas do nervo fibular em outros. No segundo caso foram preservadas as aferências inibitórias, decorrentes da inervação recíproca, sobre um determinado grupo de motoneurônios. Os resultados mostraram que a preservação do componente sensitivo, proveniente do nervo tibial não lesado, resultou na sobrevivência de uma parcela maior de motoneurônios axotomizados, em comparação com o grupo que teve o nervo ciático lesado.

Embora não possamos descartar a importância das conexões a nível medular, mesmo que estas desempenhem um papel reduzido no processo de morte de motoneurônios, como proposto por Waters *et al.* (1998), não acreditamos que essa seja a preponderante. Assim, é provável que a ausência de contato com o órgão alvo, bloqueando o fluxo de fatores neurotróficos, seja a causa da morte da maioria dos motoneurônios e neurônios sensitivos axotomizados. Porém, levando-se em

conta os resultados por nós obtidos no que diz respeito à perda interneuronal subsequente a transecção do nervo ciático, acreditamos ter obtido indícios de que estes são dependentes da sobrevivência dos motoneurônios e neurônios sensitivos. Embora, uma certa população de interneurônios inibitórios possa contribuir para a sobrevivência dos motoneurônios, como proposto por Waters *et al.* (1998).

O papel dos fatores neurotróficos na sobrevivência de motoneurônios, interneurônios e neurônios sensitivos, como referido acima, fica mais evidente ao analisarmos nossos resultados de TUNEL marcação, obtidos com a administração de CNTF e NGF após a axotomia.

É bem conhecido que a administração de fatores neurotróficos diretamente sobre coto proximal do nervo transeccionado em ratos recém nascidos, é capaz de resgatar os motoneurônios e os neurônios sensitivos diretamente afetados pela axotomia (Levi-Montalcini, 1987; Sendtner *et al.*, 1990). Entre as substâncias neurotróficas, o NGF possui a propriedade de atuar preferencialmente sobre neurônios sensitivos (Yip *et al.*, 1984). Por outro lado, esta substância tem-se mostrado ineficaz para proteger os motoneurônios, o que é consistente com o fato destes últimos não apresentarem o receptor de alta afinidade (TrkA) para esta neurotrofina (Yan *et al.*, 1993). O CNTF, por sua vez, tem sido descrito como uma molécula neurotrófica capaz de prevenir, ainda que temporariamente, a morte dos motoneurônios após axotomia em ratos neonatos (Sendtner *et al.*, 1991; Oppenheim *et al.*, 1991; Vejsada *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996; Ulenkate *et al.*, 1996). Também foram descritos alguns efeitos protetores do CNTF sobre neurônios sensitivos (Lo *et al.*, 1995).

Os resultados por nós obtidos, num intervalo de 24 horas após a lesão, demonstraram um expressiva redução do número de neurônios sensitivos apoptóticos após 24 horas da lesão. Interessantemente, observamos também no lado contralateral, não tratado, uma redução significativa do número de neurônios sensitivos TUNEL positivos. Podemos supor que tal resultado possa ter sido produzido pela eventual passagem do NGF para a circulação sistêmica, ou mesmo devido à sua difusão através dos tecidos no animal neonato. Por outro lado, o NGF não teve efeito significativo sobre a frequência de motoneurônios TUNEL marcados.

O CNTF, por sua vez, apresentou algum efeito benéfico sobre os neurônios sensitivos, havendo uma pequena diminuição da TUNEL marcação em relação ao grupo tratado com PBS. É possível que esse efeito possa ser atribuído ao fato de que o CNTF compartilha receptores com outras citocinas, tais como IL-6 e LIF (Ip *et al.*, 1996). Desta forma, o CNTF pode ter ativado tais receptores presentes nos neurônios sensitivos, contribuindo para a sua sobrevivência. Por outro lado, o efeito protetor dessa molécula sobre os motoneurônios foi altamente significativo. Ou seja, 24 horas após o tratamento, o número de motoneurônios apoptóticos foi estatisticamente igual ao lado contralateral não lesado. Desta forma, conforme já referido anteriormente, a aplicação local dessa molécula confirmou os resultados obtidos por outros autores sobre as propriedades neuroprotetoras do CNTF (Sendtner *et al.*, 1990; Sendtner *et al.*, 1992)

O tratamento com a associação de NGF e CNTF produziu resultados semelhantes aos observados com o tratamento empregando-se cada uma das moléculas separadamente. Também foi possível observar um pequeno efeito aditivo do CNTF à ação protetora do NGF sobre os neurônios sensitivos,

corroborando os resultados observados quando da administração isolada desta molécula. A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que a utilização do NGF e CNTF, no modelo experimental por nós empregado, foi capaz de atuar com satisfatória seletividade sobre os componentes sensitivo e motor, respectivamente.

Esta seletividade permitiu assim, o estudo da importância dos componentes sensitivo e motor para a sobrevivência dos interneurônios medulares após axotomia periférica em ratos neonatos. Neste sentido, após o tratamento com NGF, o número total de interneurônios TUNEL marcados decresceu significativamente. Contudo, essa redução foi particularmente mais expressiva, na região das lâminas superficiais da coluna dorsal, ou seja, nas regiões da substância cinzenta mais intensamente inervadas por fibras aferentes primárias (Brown, 1981). O CNTF também promoveu um decréscimo do número total de interneurônios apoptóticos, mas neste caso, predominantemente nas regiões mais profundas do corno dorsal e no corno ventral, regiões onde estão presentes interneurônios pré-motores (Burke, 1990; Brown, 1991; Jankowska, 1992). Os efeitos combinados do CNTF e NGF foram mais evidentemente demonstrados na região medial das lâminas IV a VI, local dos interneurônios conectados às fibras Ia e Ib, mediando a conexão dissináptica entre os neurônios sensitivos e os motoneurônios (Jankowska, 1992).

Os resultados da sobrevivência dos interneurônios, com o resgate dos neurônios sensitivos e motores pela aplicação de NGF e CNTF, ficou ainda mais evidente quando computamos a razão entre o número de neurônios TUNEL marcados nos lados ipsi e contralateral à lesão (vide tabelas IX a XII). Este procedimento foi utilizado considerando a variação que pode ter ocorrido no período de morte natural de interneurônios entre os diferentes indivíduos.

Assim, nossos achados dão fortes subsídios para a hipótese de que as fontes de fatores neurotróficos para um interneurônio medular não estão restritas apenas ao neurônio alvo, mas também à sua aferência (para revisão vide Linden, 1994). O impacto do componente aferente neste contexto é de particular interesse para o estudo de neurônios com um árvore dendrítica extensa, como a dos motoneurônios, a qual propicia a influência de um grande número de aferências (Brown *et al.*, 1991).

Existem outros dados da literatura que dão suporte a esta hipótese, tais como aqueles obtidos em experimentos onde se fez a remoção de um órgão sensorial. Por exemplo, após a retirada do globo ocular em camundongos recém nascidos segue-se uma extensa degeneração do colículo superior (DeLong & Sidman, 1962) e do corpo geniculado lateral (Heumann & Rabinowicz, 1980).

Contudo, embora acreditemos que nossos resultados tenham contribuído para a compreensão da ocorrência de apoptose após lesão de nervos periféricos em ratos neonatos, sem dúvida, há necessidade ainda de aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos que levam a morte celular natural ou induzida.

6. CONCLUSÕES

- 1) A transecção do nervo ciático, realizada em animais P2, provoca a morte dos motoneurônios e neurônios sensitivos axotomizados e, secundariamente, de interneurônios medulares.
- 2) O emprego da técnica do TUNEL, associada à microscopia eletrônica permitiu comprovar que motoneurônios, interneurônios e neurônios sensitivos entram em processo de apoptose após a transecção do nervo ciático em ratos P2.
- 3) A partir da utilização da técnica do TUNEL associada à HRP foi possível confirmar que as células TUNEL positivas na substância cinzenta da medula eram neurônios e não células gliais.
- 4) A morte de motoneurônios por apoptose observada neste estudo restringiu-se às primeiras 72 horas após a transecção do nervo ciático, sendo mais precoce do que os dados da literatura.
- 5) A morte por apoptose de neurônios sensitivos ocorre mais tardiamente em relação à população de interneurônios e de motoneurônios.
- 6) A apoptose de interneurônios presentes nas lâminas mais profundas da medula espinhal ocorre mais tardiamente (24 horas) em comparação com os interneurônios localizados nas lâminas mais superficiais.

- 7) Os resultados obtidos com a transecção das raízes dorsais da medula mostraram um aumento significativo do número de interneurônios TUNEL positivos, evidenciando a grande importância do componente aferente para a sobrevivência dos interneurônios.
- 8) A administração local de fatores neurotróficos permitiu analisar separadamente a importância dos neurônios motores e sensitivos sobre as distintas populações dos interneurônios medulares.
- 9) O CNTF agiu predominantemente resgatando os interneurônios localizados nas lâminas mais profundas do corno dorsal e no corno ventral, locais onde encontram-se os interneurônios pré-motores. O NGF apresentou um efeito mais evidente nas lâminas superficiais da medula espinhal, promovendo uma redução da TUNEL marcação. A administração conjunta do NGF com o CNTF promoveu uma redução da TUNEL marcação primordialmente na região medial das lâminas IV, V e VI, local onde estão presentes os interneurônios conectados às fibras Ia e Ib.
- 10) Nossos achados dão suporte à hipótese de que as fontes de fatores neurotróficos para os interneurônios medulares não estão restritas apenas ao neurônio alvo, mas também à sua aferência.

6. FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Motoneurônio em fase avançada de apoptose

- A.** Micrografia eletrônica de um corte transversal da medula espinhal, na região da lâmina IX, ao nível de intumescência lombar, de um rato recém nascido (P2), vinte e quatro horas após a transecção do nervo ciático. No centro da micrografia, é possível identificar um motoneurônio apoptótico típico. O citoplasma mostra-se subdividido em compartimentos delimitados por membrana citoplasmática (setas brancas), havendo em seu interior, aglomerados de organelas, onde é possível identificar-se mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e vesículas elétronalucentes (*). Observe-se também, um motoneurônio ultraestruturalmente normal, sendo possível identificar-se em seu citoplasma, substância de Nissl, formada pelo retículo endoplasmático rugoso abundante, localizado ao redor do núcleo (setas amarelas). Pode-se identificar no citoplasma, mitocôndrias ultraestruturalmente normais (setas vermelhas). O envelope nuclear mostra-se bem preservado, sendo visível sua dupla membrana (setas azuis). Barra = 3,63 μm .
- B.** Detalhe da micrografia anterior, na região do corpo apoptótico contendo o núcleo em processo degenerativo. Observe-se o desarranjo nuclear, não mais havendo a presença do envelope. As setas amarelas indicam a interdigitação da cromatina no citoplasma. Esta apresenta-se bastante compactada, porém há regiões mais elétrondensas (setas brancas). É importante notar a existência de pontos de conexão entre os subcompartimentos citoplasmáticos (setas azuis). Barra = 3,63 μm .

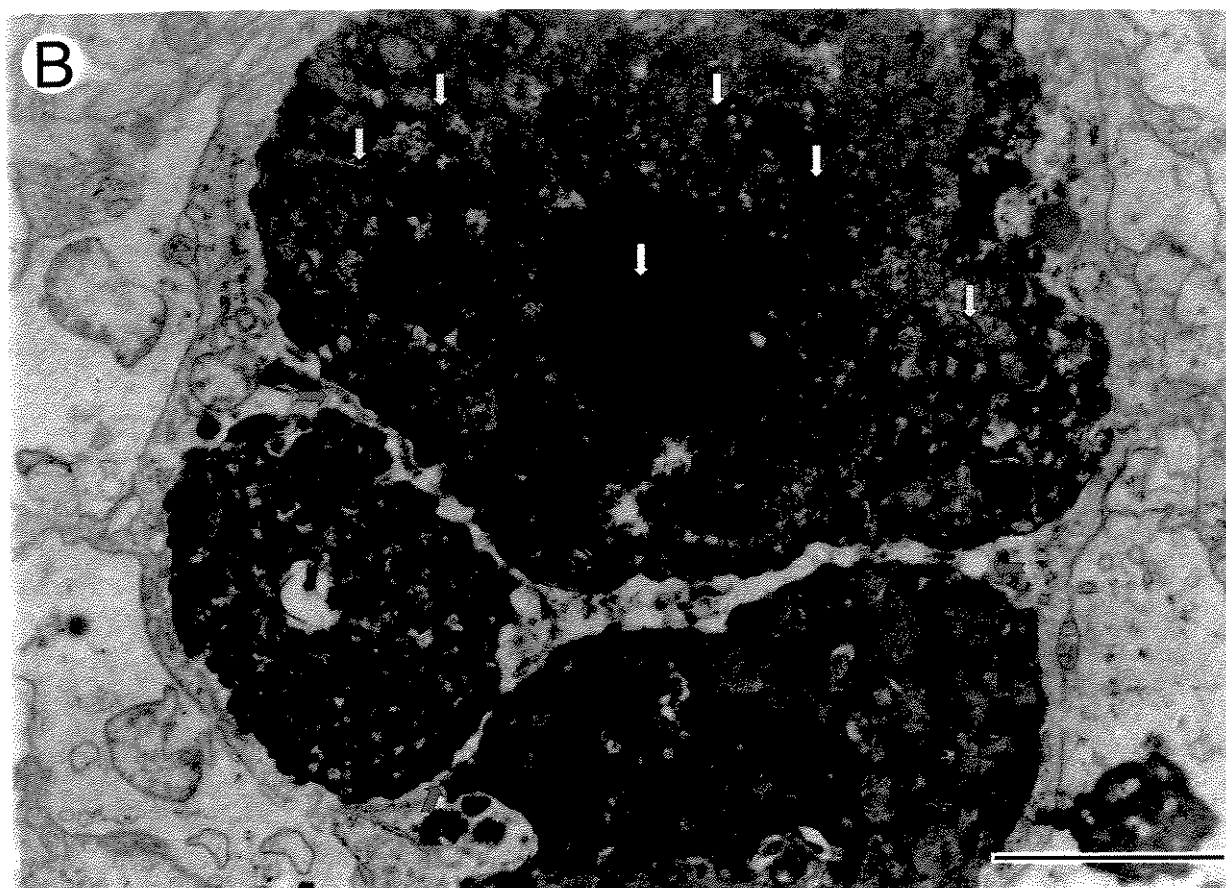
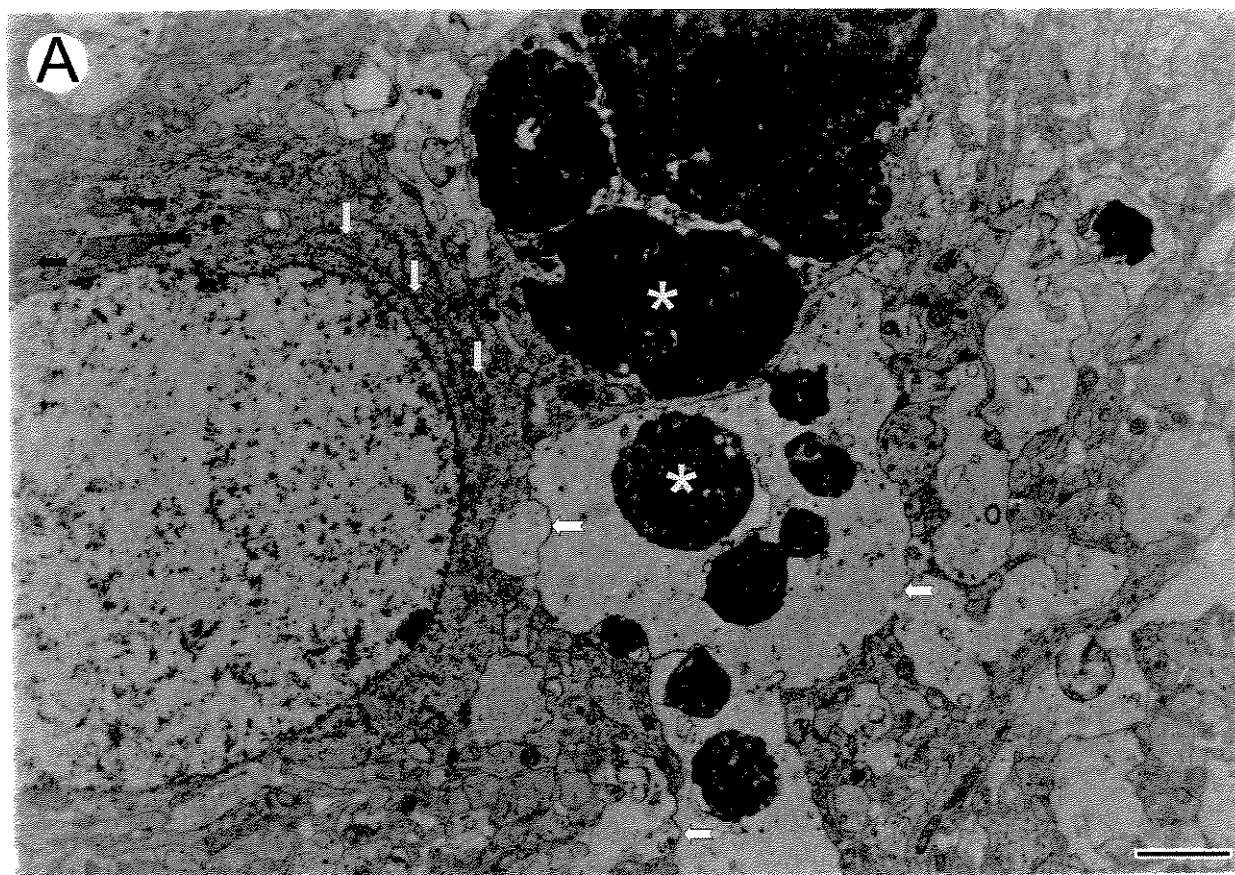


Figura 2 – Apoptose de interneurônios em fase precoce (lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal)

- A.** Micrografia eletrônica de um corte transversal de medula espinhal, na região superficial da coluna dorsal esquerda de um rato recém nascido (P2), vinte e quatro horas após a transecção do nervo ciático. É possível observar-se um interneurônio normal localizado na extremidade esquerda do campo (*). Este apresenta em seu citoplasma, substância de Nissl (setas amarelas), complexo de Golgi (seta azul) e mitocôndrias (setas vermelhas) morfolologicamente normais. O núcleo mostra-se bem preservado, estando a cromatina com grau de compactação baixo, compatível com a normalidade. O nucléolo está bem evidente sendo possível a diferenciação entre porção granulosa (seta verde) e fibrosa (seta branca). À direita do neurônio normal, é possível observar-se dois outros interneurônios considerados em processo inicial de apoptose. Nestes pode-se observar o início de compactação da cromatina, principalmente na periferia do núcleo (setas curvas amarelas). Também é possível constatar sinais de um processo degenerativo citoplasmático. Assim, há um início de agrupamento de organelas, formando regiões com maior elétrondensidade (setas laranja). Barra = 3,63 μ m.
- B.** Detalhe da figura anterior, mostrando o citoplasma de um interneurônio em processo inicial de apoptose. Note-se a existência de lisossomos contendo substância densa (setas amarelas), denotando o início do processo de autólise celular, provavelmente componentes lipoproteicos de membrana e organelas. Também é possível observar o início da fragmentação do citoplasma em subcompartimentos delimitados por membrana (setas vermelhas). Barra=3,63 μ m.

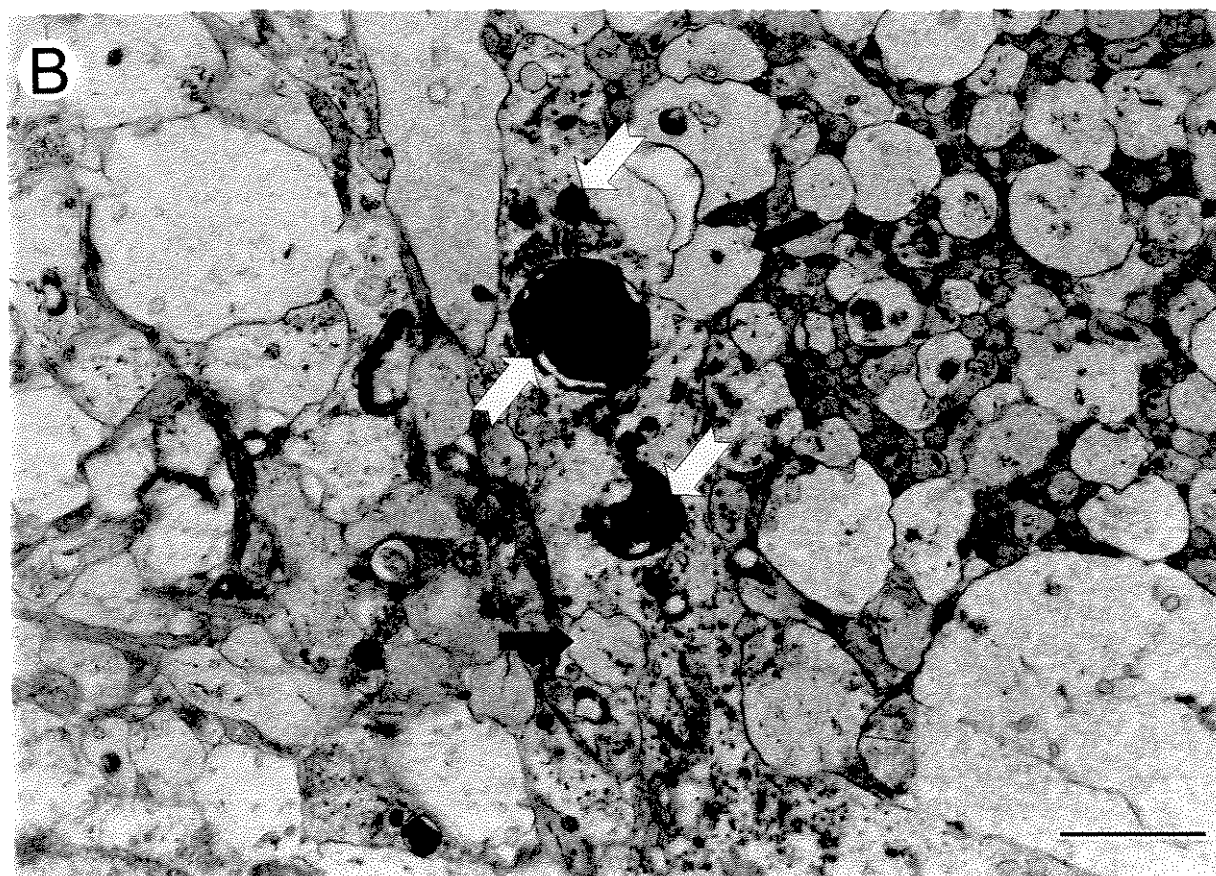
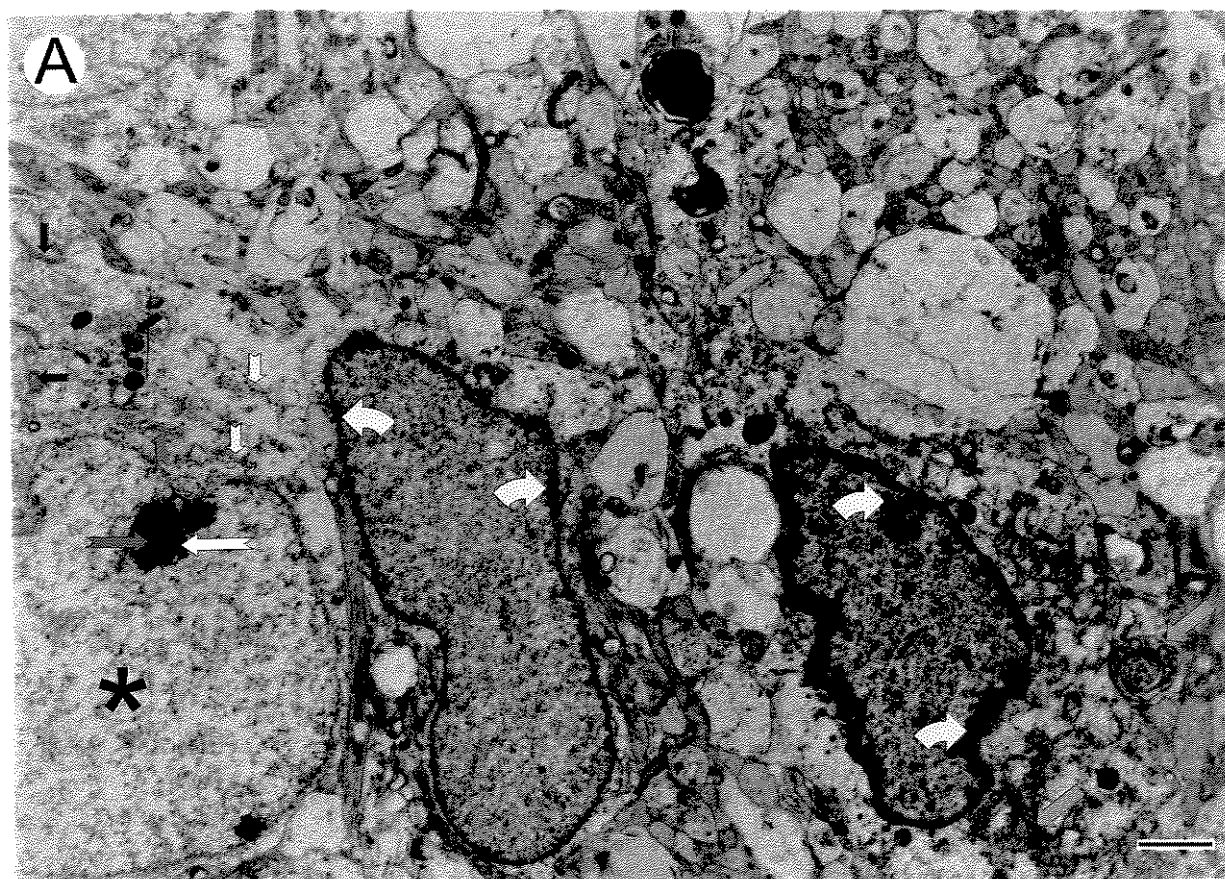


Figura 3 – Apoptose de interneurônios em fase avançada (lâminas profundas do corno dorsal da medula espinhal)

- A.** Micrografia eletrônica de um corte transversal de medula espinhal, na região correspondente às lâminas IV, V e VI da coluna dorsal esquerda de um rato recém nascido (P2), vinte e quatro horas após a transecção do nervo ciático. Observe-se um neurônio considerado em estágio intermediário de apoptose. A cromatina encontra-se compactada (seta vermelha), não sendo possível a identificação do envelope nuclear, havendo contato direto do material nuclear com o citoplasma. O citoplasma mostra-se fragmentado em diversos compartimentos (setas amarelas). A seta azul aponta uma célula glial, provavelmente um astrócito, ao lado de um neurônio aparentemente normal (*). Barra = 3,63 μm .
- B.** Micrografia eletrônica de um corte transversal de medula espinhal, na região correspondente às lâminas IV, V e VI da coluna dorsal esquerda de um rato recém nascido (P2), vinte e quatro horas após a transecção do nervo ciático. Observe-se ao centro, um interneurônio apoptótico em processo de fragmentação citoplasmática. O núcleo está contido num dos fragmentos (seta vermelha) e não está íntegro, havendo contato da cromatina com organelas citoplasmáticas coaguladas ao seu redor. A cromatina apresenta-se compactada, havendo regiões mais elétrondensas (setas brancas). Outro fragmento celular bastante denso apresenta em seu interior organelas compactadas e em processo degenerativo (seta azul). Outras regiões do citoplasma mostram-se mais elétronlucentes, contendo filamentos intermediários e lisossomos. Barra = 3,63 μm .

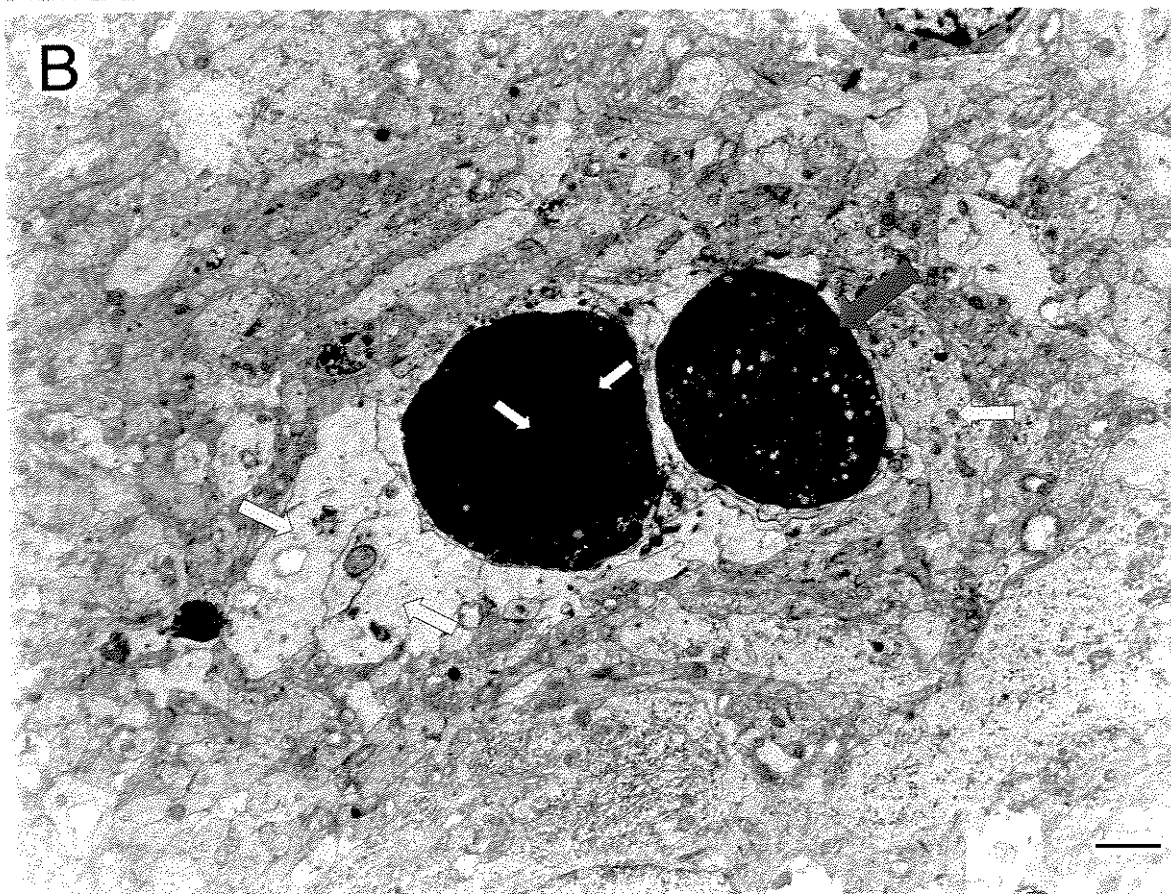
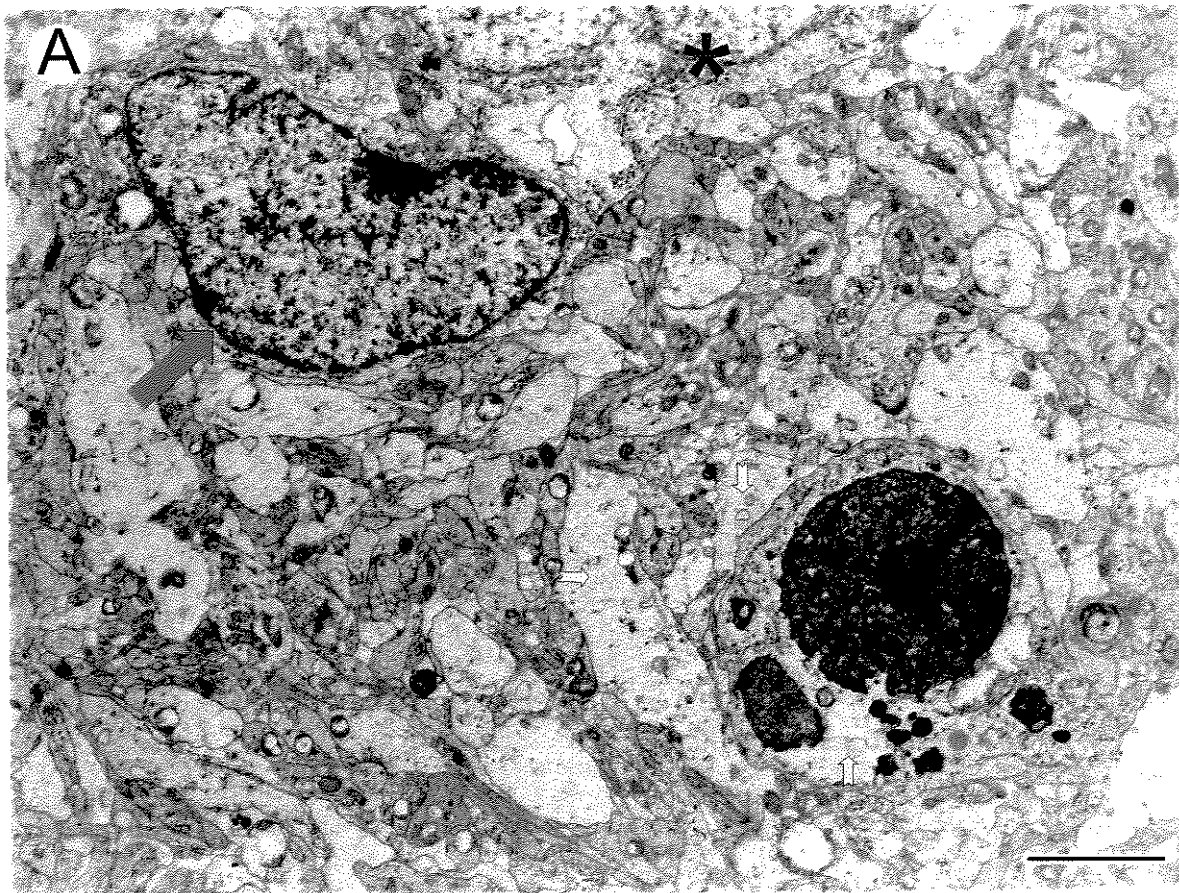


Figura 4 – Corpos apoptóticos presentes na região intermédia da medula espinhal

- A.** Micrografia eletrônica de um corte transversal da medula espinhal, na região intermédia, ao nível de intumescência lombar, de um rato recém nascido (P2), vinte e quatro horas após a transecção do nervo ciático. Observe-se um corpo apoptótico de um interneurônio considerado em estágio avançado de apoptose (seta azul). É possível identificar-se mitocôndrias em processo degenerativo (setas amarelas), bem como lisossomos com diferentes graus de compactação (setas laranja). Note-se que o microambiente circundante está bem preservado, não havendo sinais de resposta inflamatória. Podem ser identificados axônios ultraestruturalmente normais (setas brancas) contendo neurofilamentos ordenados paralelamente ao eixo longitudinal (Nf). Barra = 3,63 μm .
- B.** Micrografia eletrônica de um corte transversal da medula espinhal, na região intermédia, ao nível de intumescência lombar, de um rato recém nascido (P2), vinte e quatro horas após a transecção do nervo ciático. Note-se a presença de uma célula glial em cujo citoplasma identificam-se lisossomos em diferentes estágios de compactação (setas brancas). Estes provavelmente contém restos celulares provenientes de corpos apoptóticos. Acima desta célula, encontra-se um interneurônio medular ultraestruturalmente normal (*). O núcleo apresenta cromatina frouxa (Cr) e nucléolo (seta amarela). Barra = 3,63 μm .

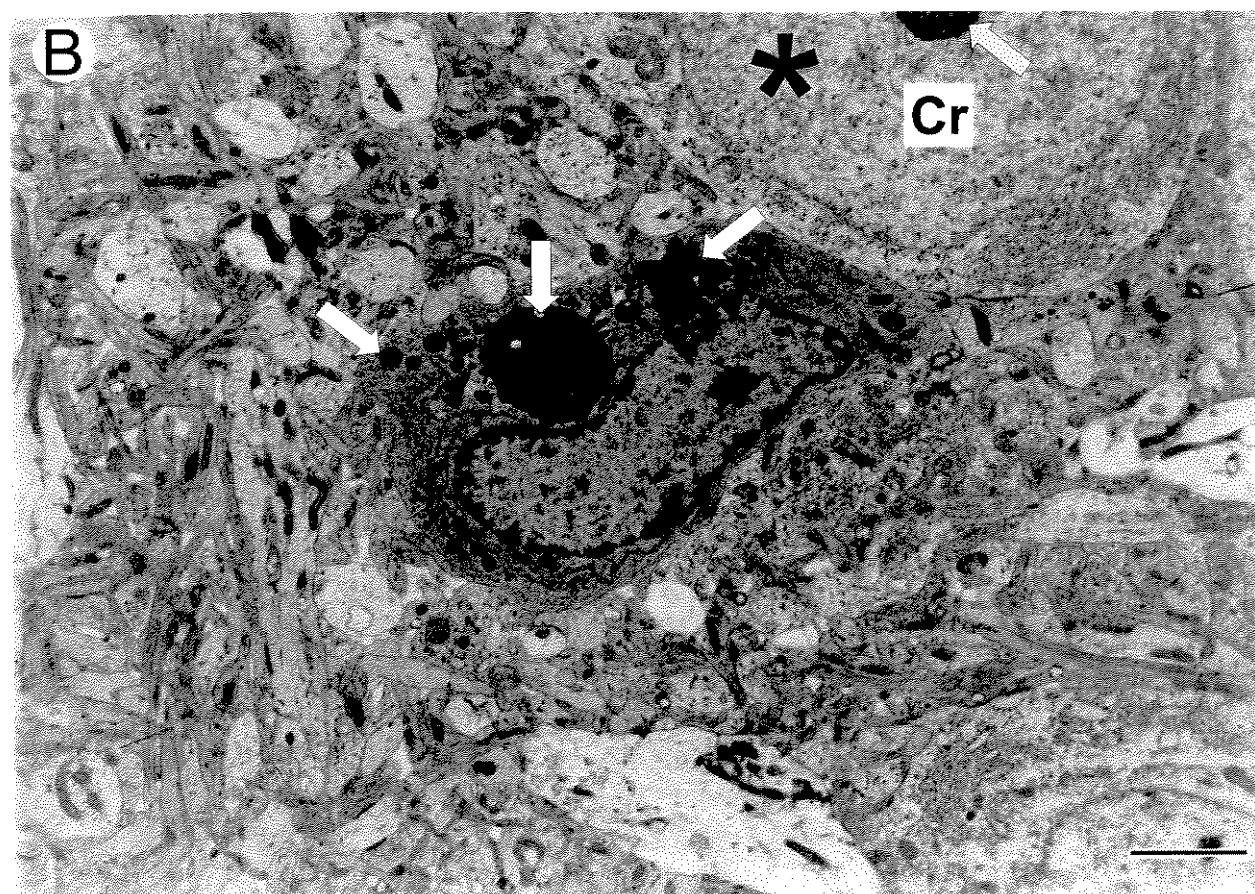
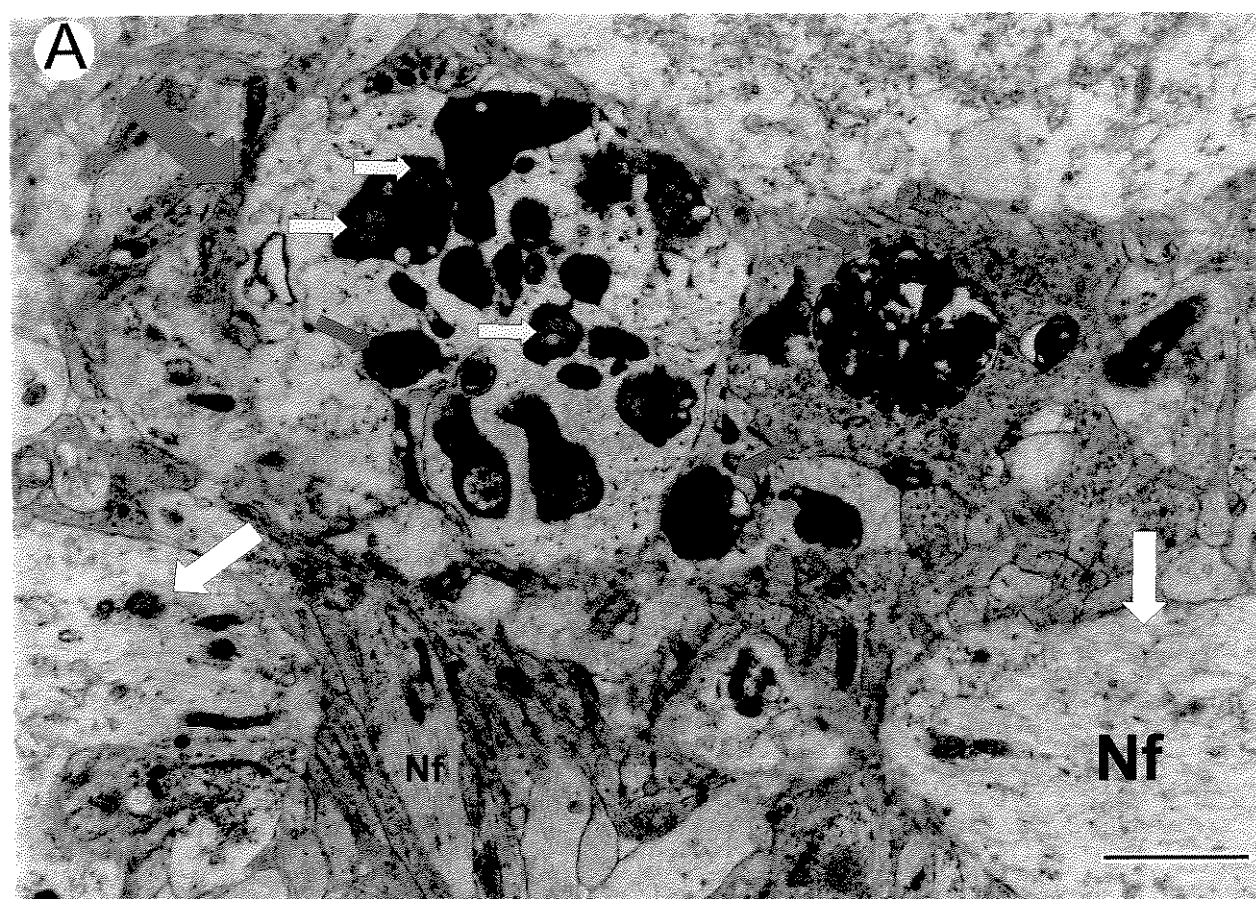


Figura 5 – Apoptose de neurônios sensitivos dos gânglios dorsais

- A.** Micrografia eletrônica de um corte transversal do gânglio L5 da raiz dorsal de um rato recém nascido (P2), vinte e quatro horas após a transecção do nervo ciático. Os asteriscos apontam neurônios em processo avançado de apoptose, aparentemente sendo fagocitados pelas células satélites circundantes. Também pode-se notar a uma célula fagocítica, possivelmente um macrófago residente, nas imediações das células em degeneração (Mac). Observe-se ainda, um neurônio sensitivo normal contendo substância de Nissl (setas brancas) e mitocôndrias (setas amarelas) bem preservadas. O núcleo está delimitado pelo envelope nuclear (seta vermelha) estando a cromatina frouxa e o nucléolo presente (seta preta). A seta laranja indica uma célula satélite. Barra = 3,63 μm .
- B.** Micrografia eletrônica de um corte transversal do gânglio L5 da raiz dorsal de um rato recém nascido (P2), vinte e quatro horas após a transecção do nervo ciático. Observe-se um neurônio sensitivo em apoptose, circundado por outros neurônios ultraestruturalmente normais. Nestes é possível identificar a substância da Nissl (setas amarelas). O neurônio em apoptose não possui substância de Nissl, estando o citoplasma altamente compactado e elétron denso. Os ribossomos mostram-se agrupados ao redor de cisternas do retículo endoplasmático (setas brancas). O núcleo não apresenta-se íntegro, havendo contato com o material citoplasmático (seta azul). A cromatina mostra-se com diferentes graus de compactação (setas laranja). Barra = 3,63 μm .

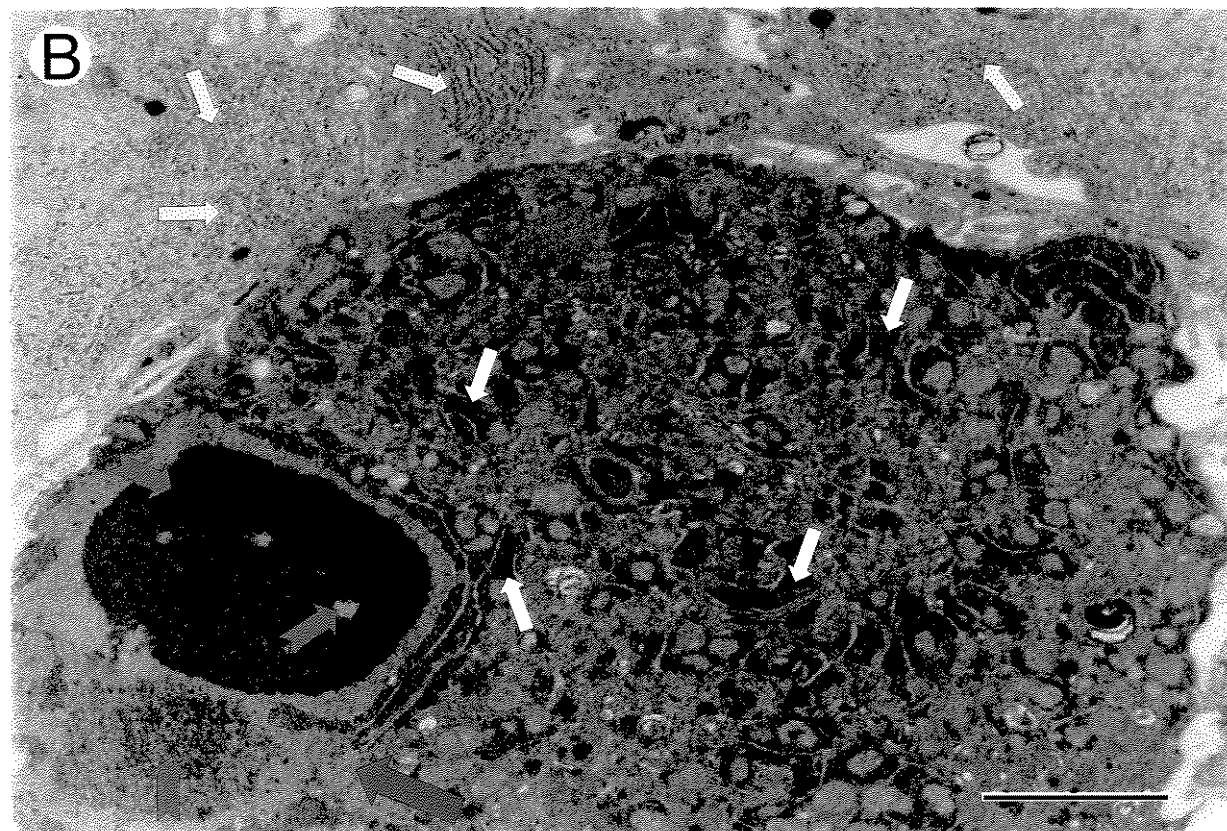
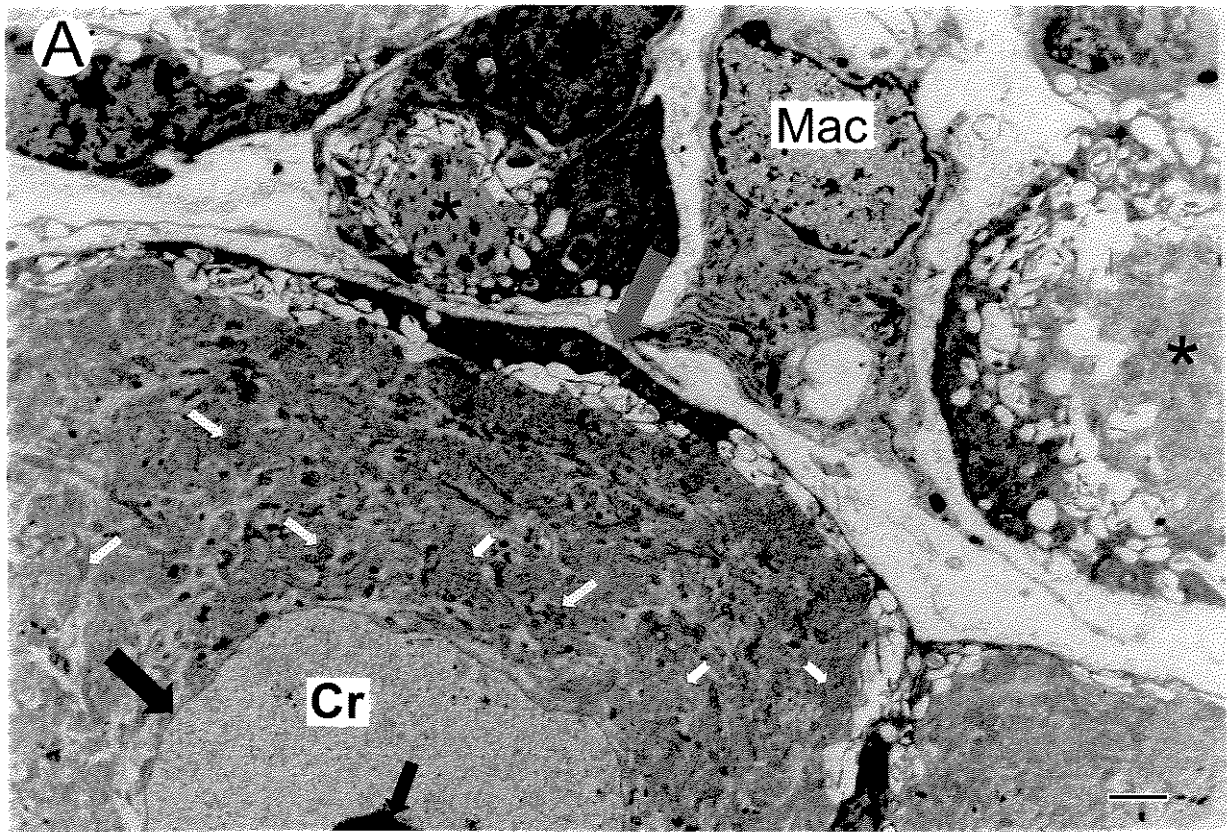


Figura 6 – Apoptose em fase avançada de neurônios sensitivos

- A.** Micrografia eletrônica de um corte transversal do gânglio L5 da raiz dorsal de um rato recém nascido (P2), vinte e quatro horas após a transecção do nervo ciático. Observe-se um neurônio em processo apoptótico intermediário, havendo uma redução do volume citoplasmático em relação ao volume nuclear. As organelas mostram-se elétrondensas, havendo diversas vesículas intracitoplasmáticas (setas amarelas). O material nuclear mostra-se em contato direto com o citoplasma (setas azuis) e a cromatina possui diferentes graus de compactação (setas brancas). A célula como um todo está destacada do microambiente circundante, havendo diversas projeções citoplasmáticas advindas das células circundantes (setas vermelhas). Barra = 3,63 μm .
- B.** Micrografia eletrônica de um corte transversal do gânglio L5 da raiz dorsal de um rato recém nascido (P2), vinte e quatro horas após a transecção do nervo ciático. Observe-se um neurônio sensitivo em processo avançado de apoptose, apresentando um acentuado grau de degradação citoplasmática e nuclear. O envelope nuclear está rompido, havendo mistura de seu material com o citoplasma (setas vermelhas). A cromatina está compactada, havendo o início da fragmentação do núcleo pela interdigitação da membrana citoplasmática (seta amarela). O citoplasma mostra-se com volume reduzido, podendo ser observados fragmentos delimitados por membrana citoplasmática (*). Barra=3,63 μm .

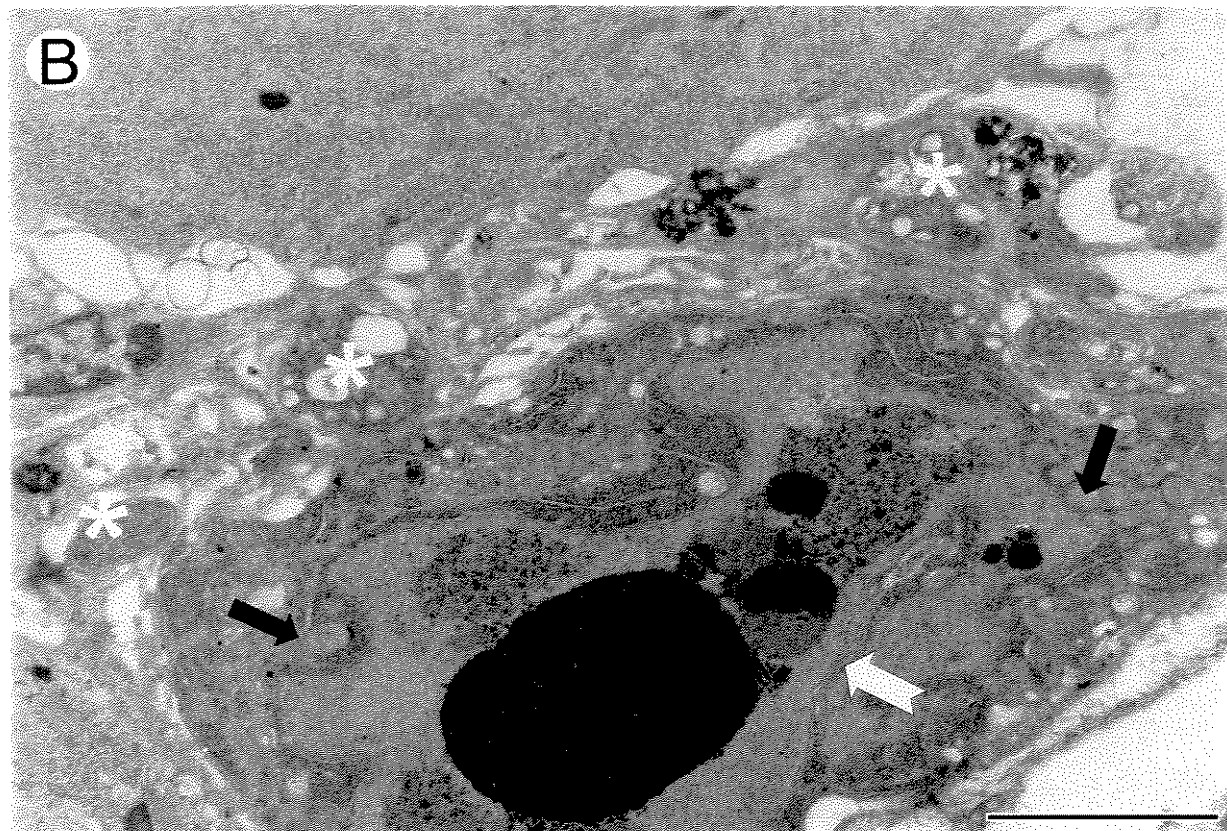
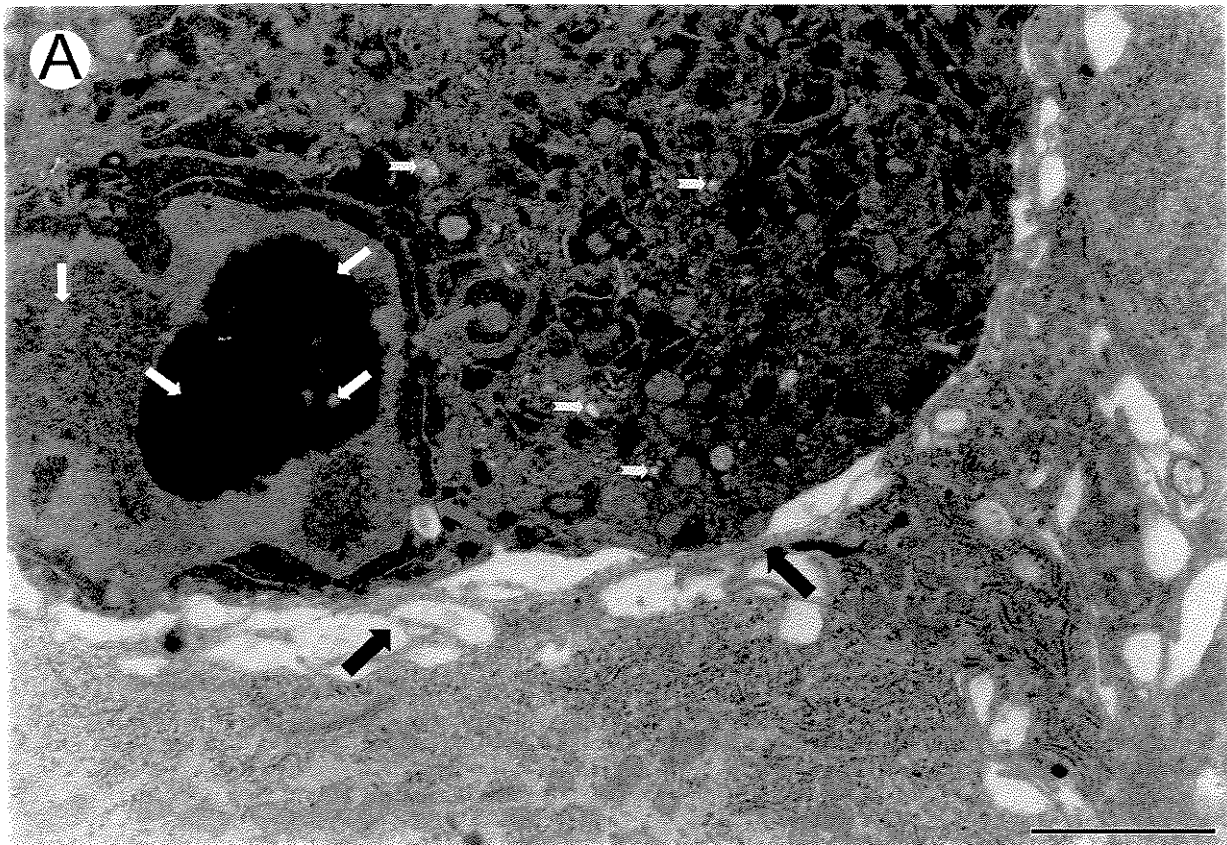


Figura 7 – Fotomicrografias de cortes transversais de medula espinhal e gânglio sensitivo (L5) contendo neurônios TUNEL positivos, visualizados pela técnica da HRP, 24 horas após a transecção do nervo ciático de ratos recém nascidos (P2).

- A. Fotomicrografia de um motoneurônio TUNEL positivo presente na lâmina IX esquerda, 24 horas após a transecção do nervo ciático ipsilateral. Observe a condensação da cromatina e a retração do corpo celular do neurônio marcado. Barra=20µm.
- B. Fotomicrografia de interneurônios TUNEL positivos, presentes na região correspondente à lâmina IV medial, vinte e quatro horas após a transecção do nervo ciático esquerdo. Note os diferentes graus de condensação da cromatina (setas) e a presença de um núcleo picnótico (seta dupla). Barra=20µm.
- C. Fotomicrografia de um neurônio sensitivo TUNEL positivo localizado num gânglio dorsal L5 esquerdo, 24 horas após a transecção do nervo ciático. Barra=20µm.

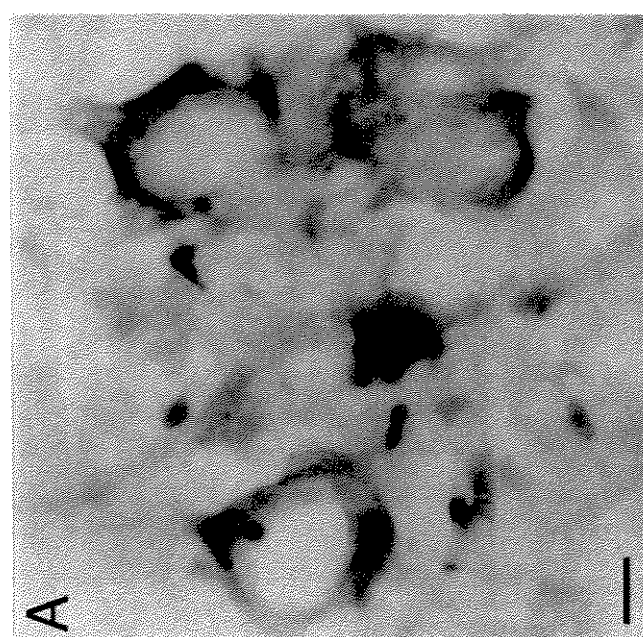
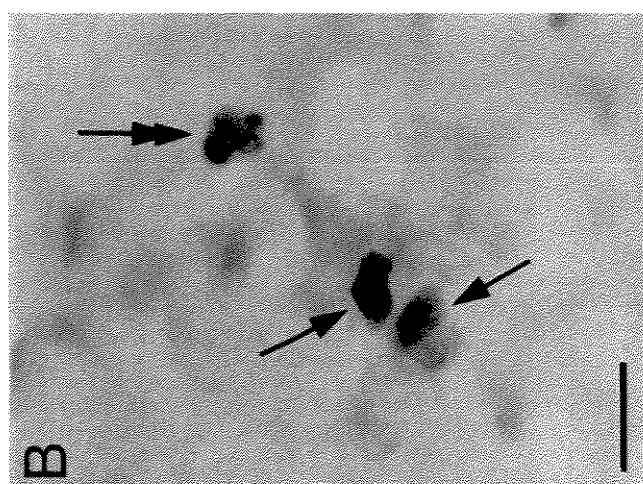
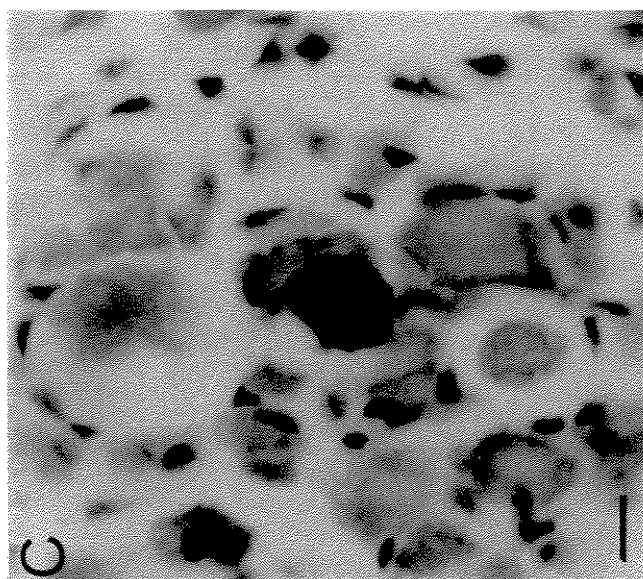


Figura 8 – Fotomicrografias de secções transversais de medulas espinhais ao nível do segmento L5 mostrando a presença de interneurônios TUNEL marcados, visualizados pela técnica da fluoresceína. **A.** rato recém nascido (P2) não operado, **B.** 8 horas após a transecção do nervo ciático, **C.** 12 horas após a lesão, **D.** 24 horas após a lesão, **E.** 48 horas após a lesão, **F.** 72 horas após a lesão e **G.** 7 dias após a lesão. A fotomicrografia **H** representa a mesma área amostrada nas figuras anteriores em um rato P9 normal. DF=funículo dorsal; CL=contralateral; IL=ipsilateral. Barra=100µm.

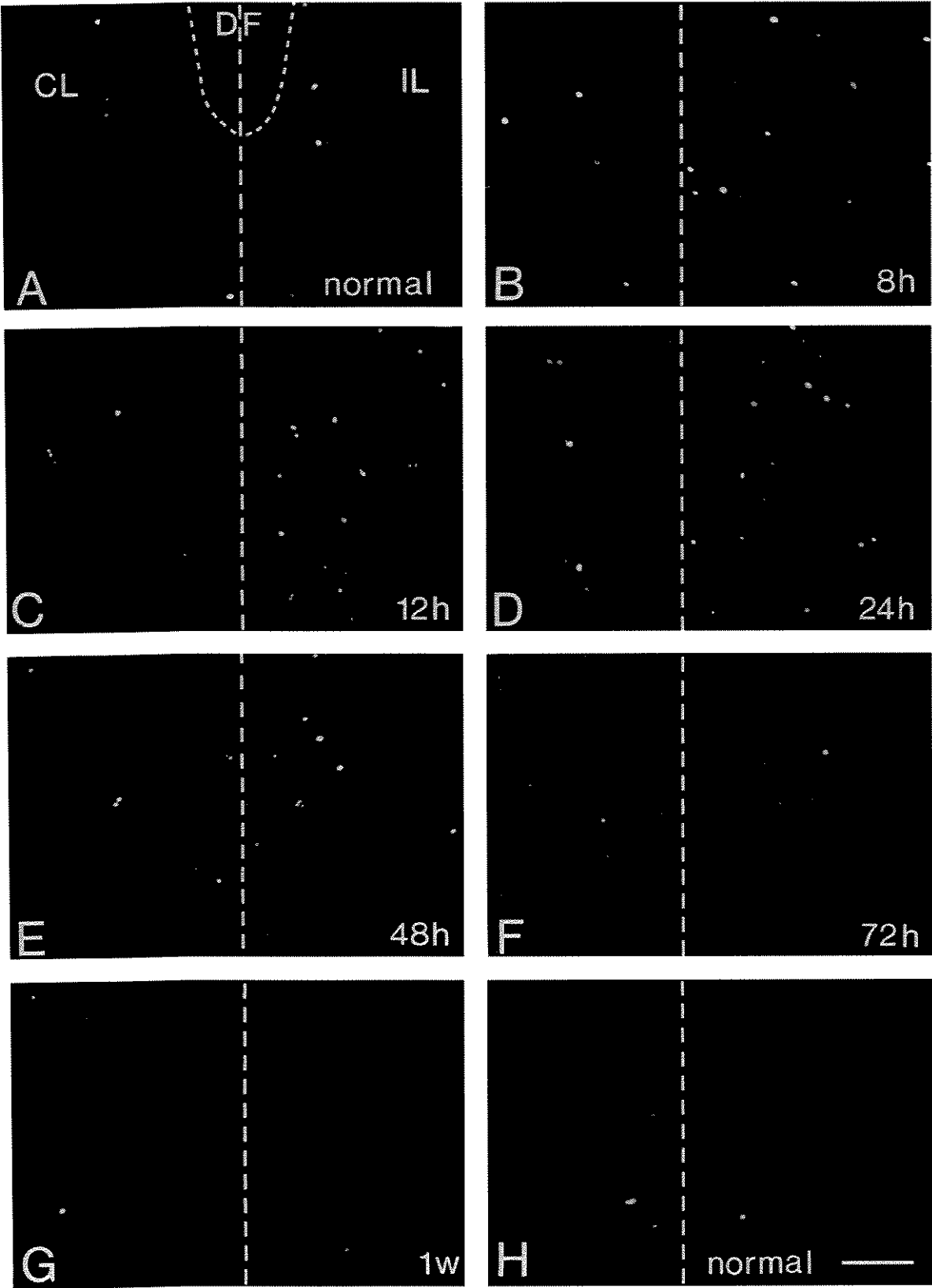


Figura 9 – Fotomicrografias de secções transversais de gânglios espinhais (L5) mostrando a presença de neurônios sensitivos TUNEL positivos, visualizados pela técnica da fluoresceína. **A.** rato recém nascido (P2) não operado, **B.** 8 horas após a transecção do nervo ciático, **C.** 12 horas após a lesão, **D.** 24 horas após a lesão, **E.** 48 horas após a lesão, **F.** 72 horas após a lesão e **G.** 7 dias após a lesão. A fotomicrografia **H** representa a mesma área amostrada nas figuras em um rato P9 normal. CL=contralateral; IL=ipsilateral. Barra=100µm.

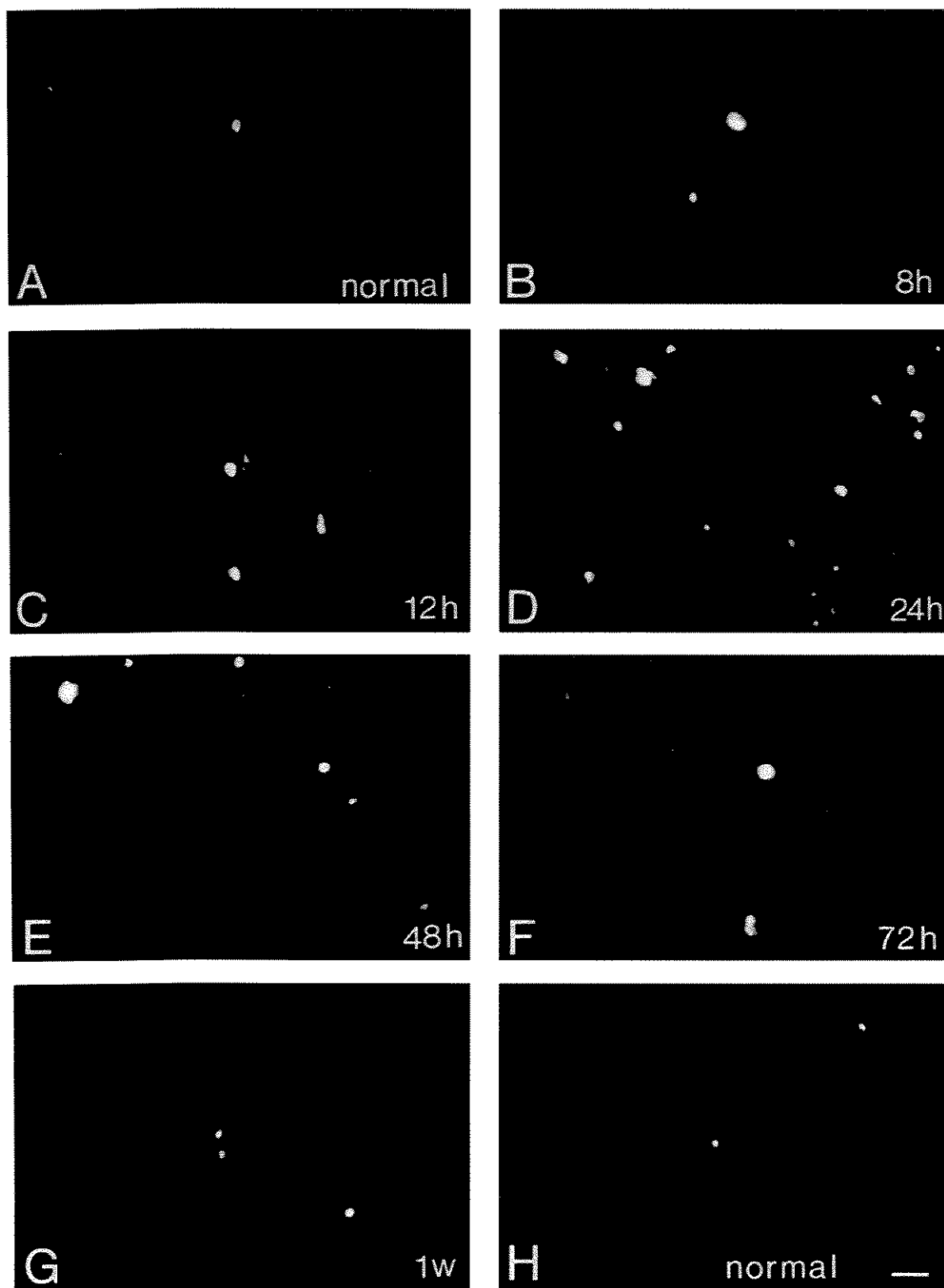


Figura 10 – Distribuição de interneurônios (círculos) e motoneurônios (triângulos) TUNEL marcados 4, 8, 12, e 24 horas após a transecção do nervo ciático de ratos recém nascidos (P2). Todos os neurônios TUNEL positivos identificados (6 secções por animal), ao nível da intumescência lombar (L4-L6) foram plotados em um desenho esquemático representativo. A distribuição da TUNEL marcação observada nos ratos não operados, os quais possuíam a mesma idade dos grupos experimentais, também está representada. CL=contralateral; IL=ipsilateral.

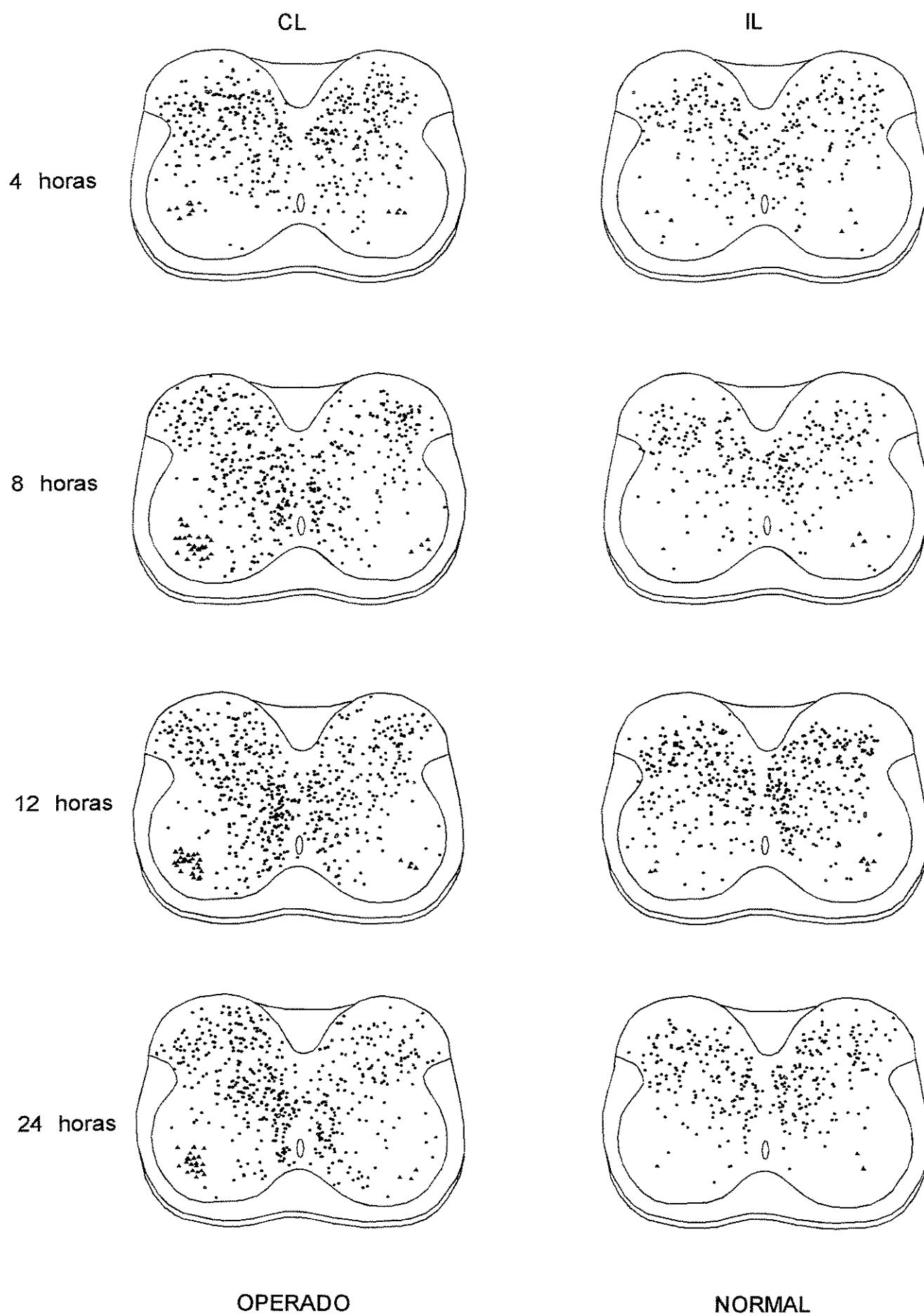


Figura 11 – Distribuição de interneurônios (círculos) e motoneurônios (triângulos) TUNEL marcados 48, 72 horas e 1semana após a transecção do nervo ciático de ratos recém nascidos (P2). Todos os neurônios TUNEL positivos identificados (6 secções por animal), ao nível da intumescência lombar (L4-L6) foram plotados em um desenho esquemático representativo. A distribuição da TUNEL marcação observada nos ratos não operados, os quais possuíam a mesma idade dos grupos experimentais, também está representada. CL=contralateral; IL=ipsilateral.

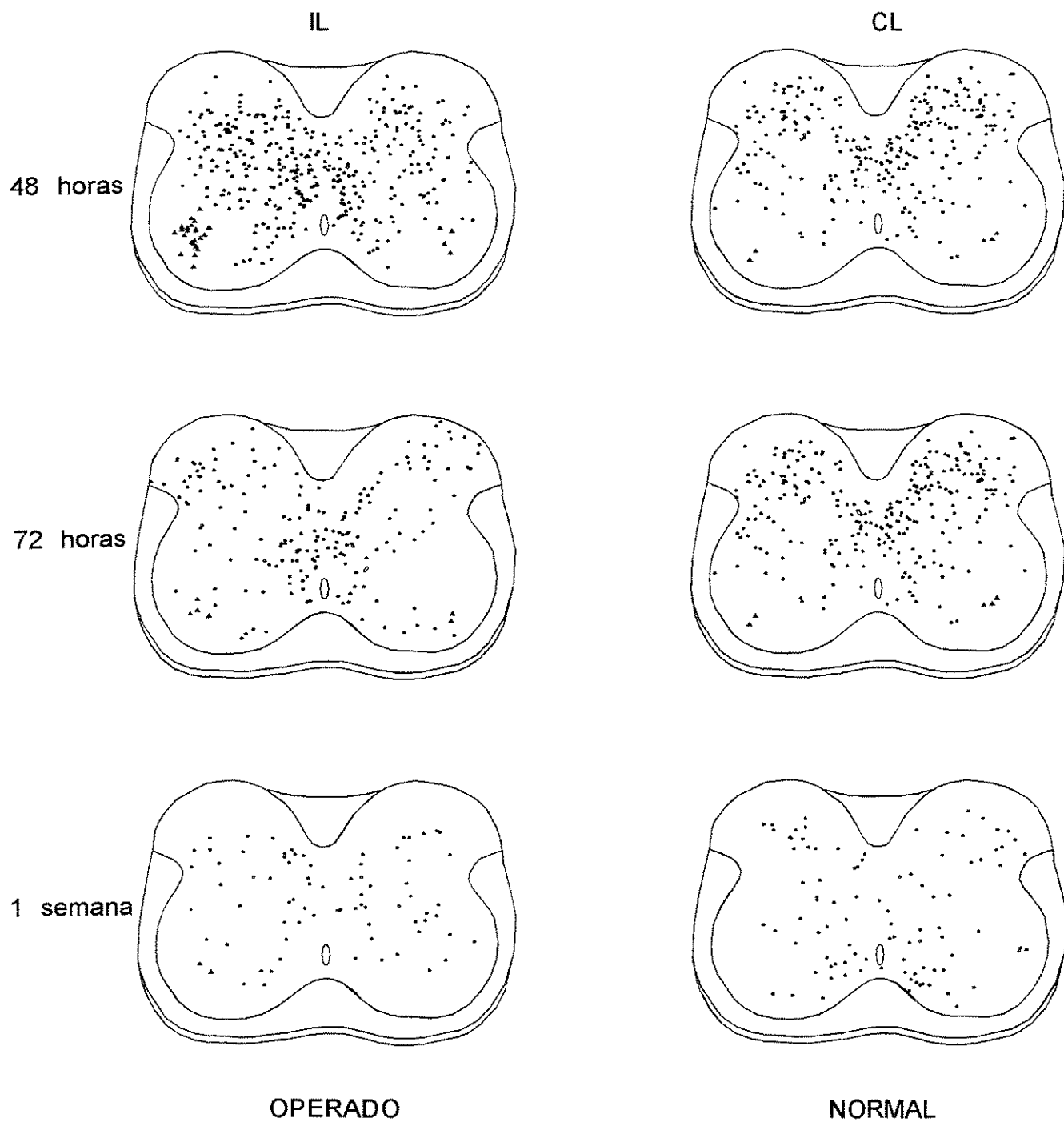
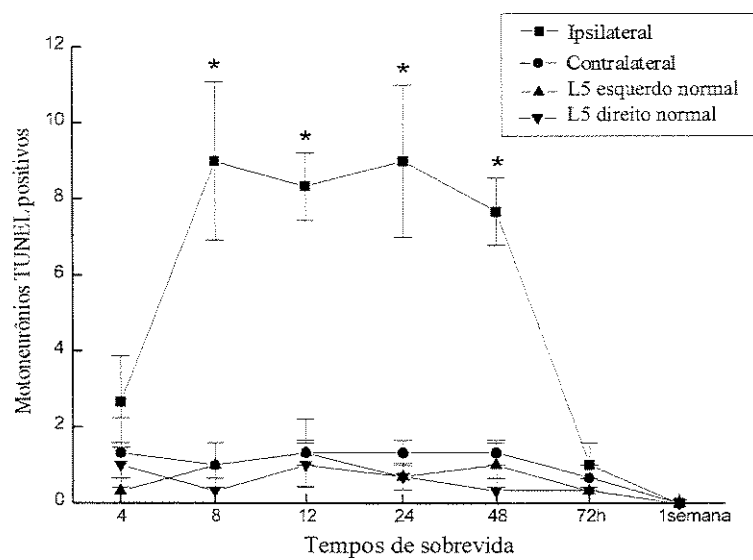


Figura 12 – **A.** Gráfico mostrando o padrão temporal da TUNEL marcação de motoneurônios após a transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos (P2). O número de motoneurônios positivos encontrados no lado contralateral da medula espinhal dos animais operados e nos lados esquerdo e direito dos animais normais também estão representados. O asterisco corresponde a uma diferença significativa em relação ao lado contralateral ($p < 0,05$)

B. Gráfico mostrando o padrão temporal da TUNEL marcação de neurônios sensitivos presentes no gânglio dorsal (L5) após a transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos (P2). O número de neurônios sensitivos positivos encontrados no lado contralateral da medula espinhal dos animais operados e nos lados esquerdo e direito dos animais normais também foram plotados. Um asterisco corresponde a uma diferença significativa em relação ao lado contralateral ($p < 0,05$). Dois asteriscos representam um valor estatisticamente superior a todos os demais ($p < 0,05$).

A



B

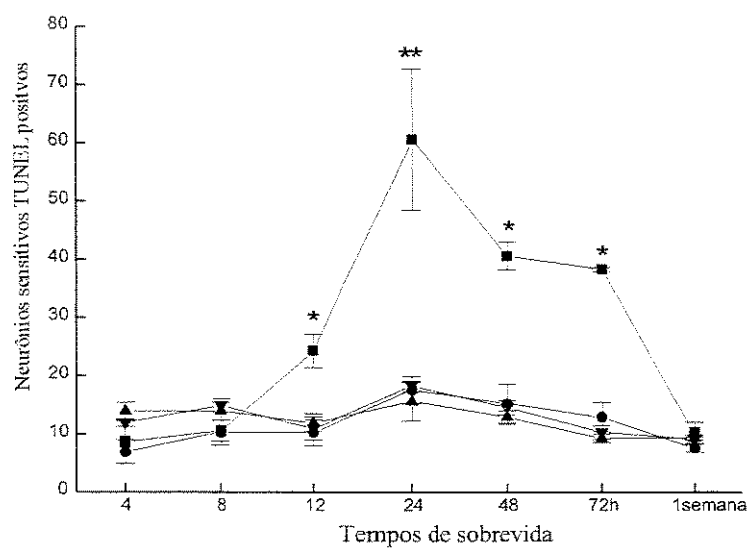
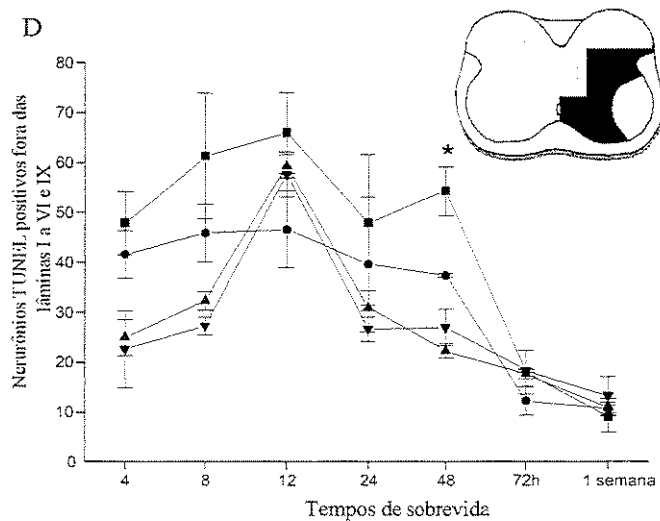
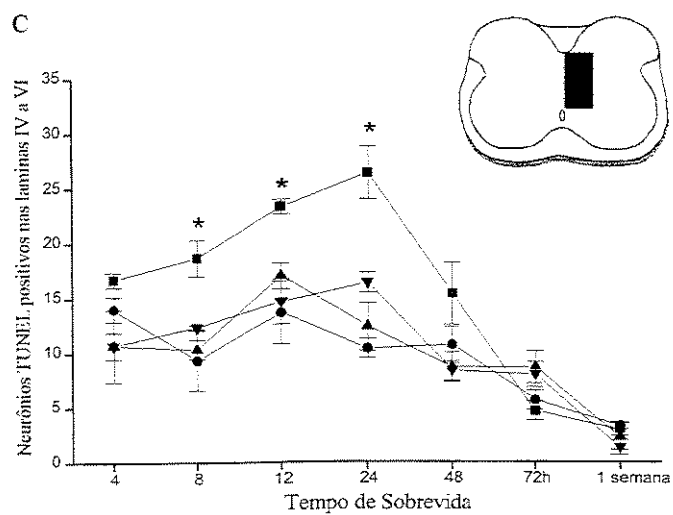
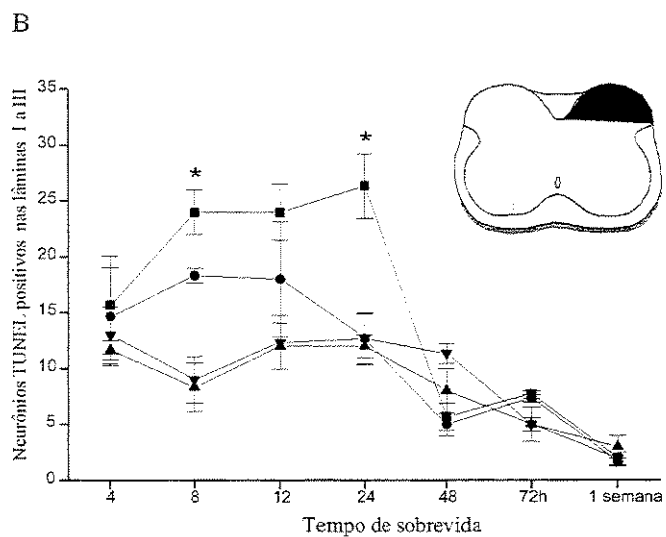
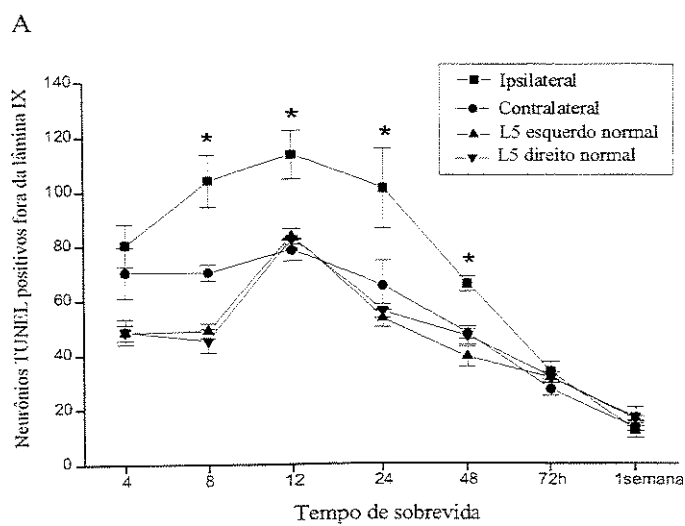


Figura 13 – Gráficos representando o padrão temporal da TUNEL marcação de interneurônios após a transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos. O número de interneurônios encontrados no lado contralateral da medula espinhal dos animais operados bem como nos lados esquerdo e direito dos animais normais também foram plotados. Em **A** estão representados todos os neurônios fora da lâmina IX, sendo que os demais gráficos ilustram os interneurônios presentes nas lâminas I-III (**B**), parte medial das lâminas IV-VI (**C**) e todos os outros interneurônios fora das lâminas I-VI e IX (**D**). Cada asterisco corresponde a uma diferença significativa em relação ao lado contralateral ($p < 0,05$)



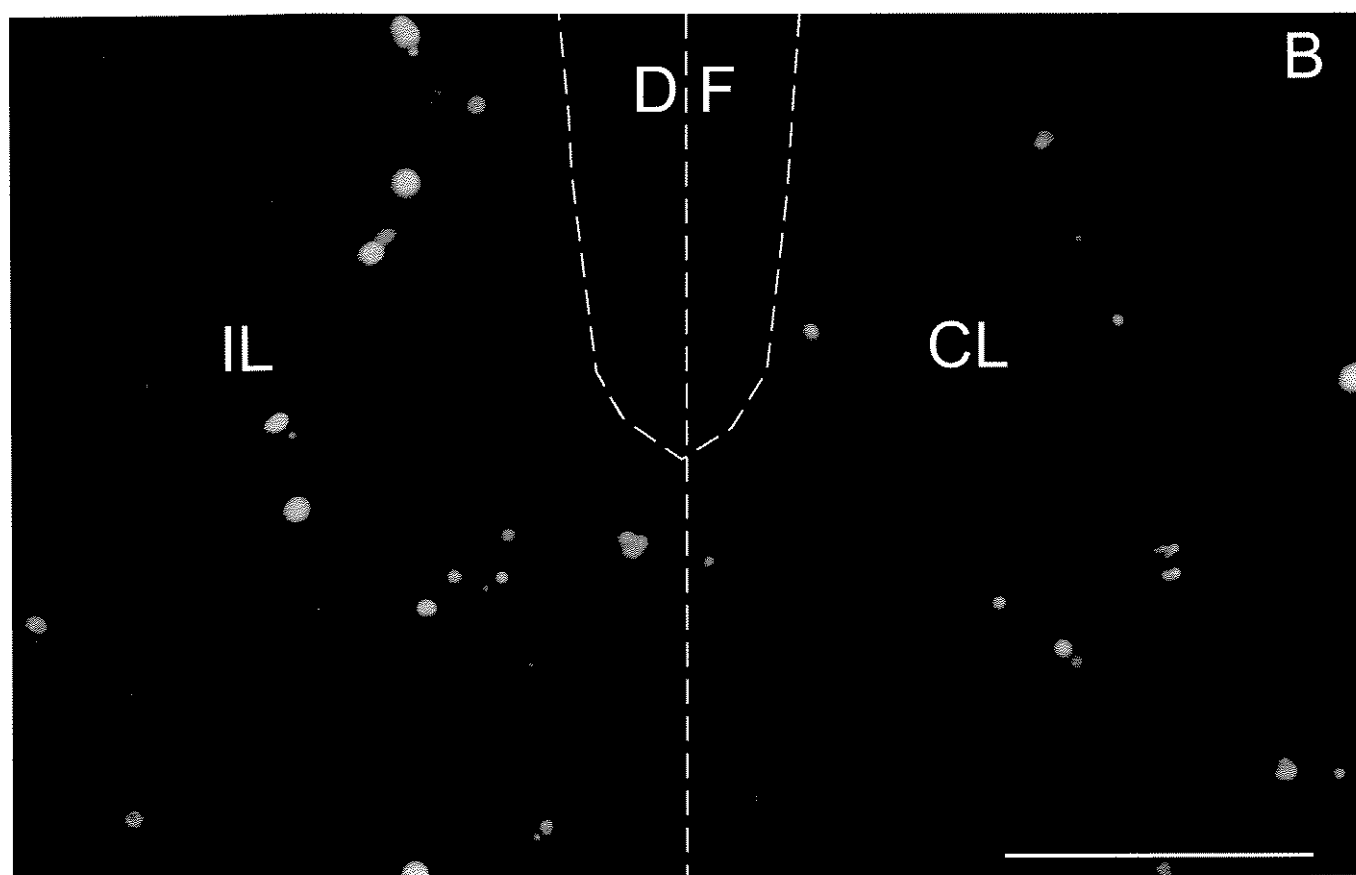
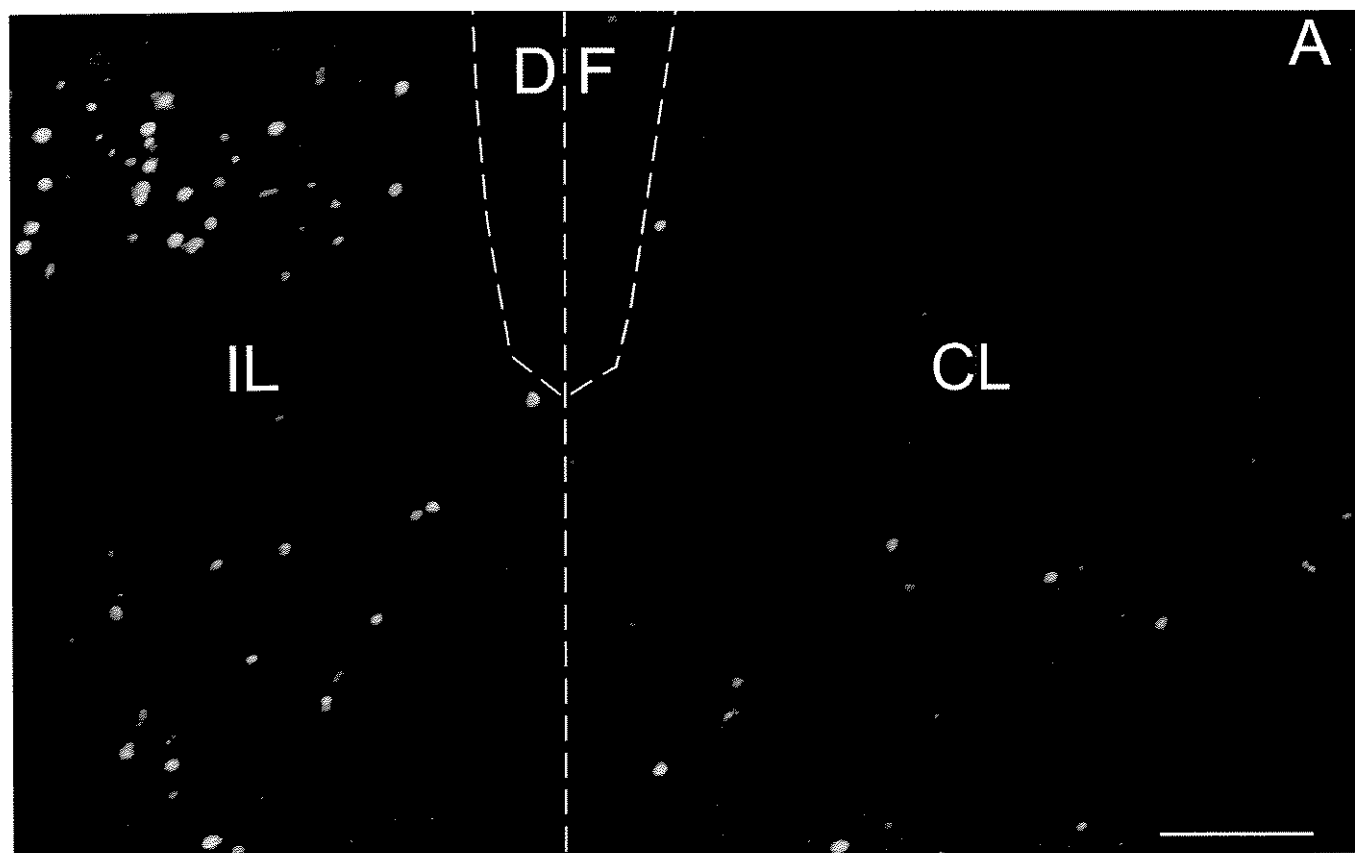


Figura 14 – **A.** Fotomicrografia de secção transversal de medula espinhal ao nível do segmento L5 mostrando a presença de interneurônios TUNEL positivos 24 horas após a transecção das raízes dorsais, em ratos recém nascidos (P2). Observe-se o grande número de interneurônios TUNEL positivos nas lâminas superficiais, bem como um aumento importante nas lâminas mais profundas. DF=funículo dorsal; IL=ipsilateral, CL=contralateral. Barra=100µm.

B. Fotomicrografia de secção transversal de medula espinhal ao nível do segmento L5 mostrando a presença de interneurônios TUNEL positivos 24 horas após a transecção das raízes dorsais, em ratos recém nascidos (P2). Observe-se a maior quantidade de interneurônios TUNEL positivos presentes no lado ipsilateral à lesão, na parte medial das lâminas IV, V e VI. DF=funículo dorsal; IL=ipsilateral, CL=contralateral. Barra=50µm.

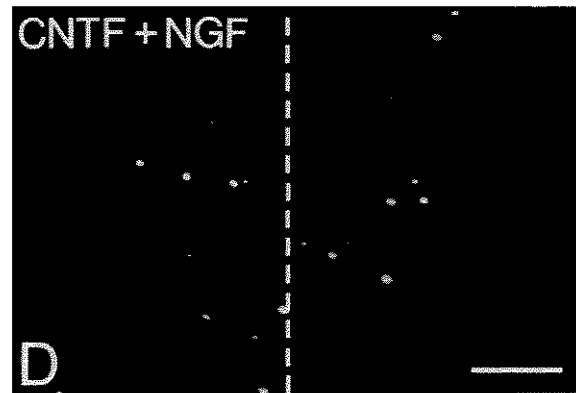
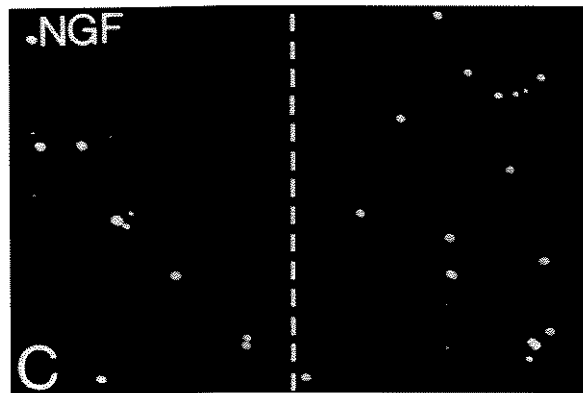
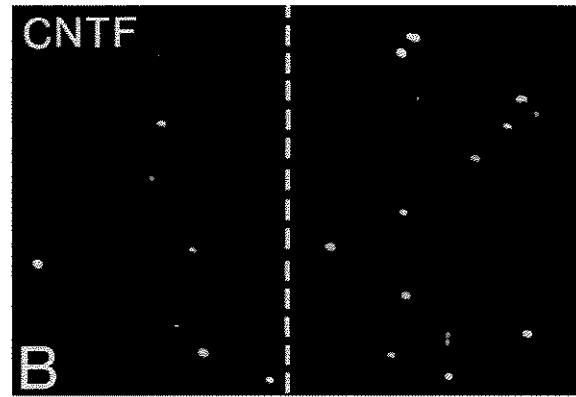
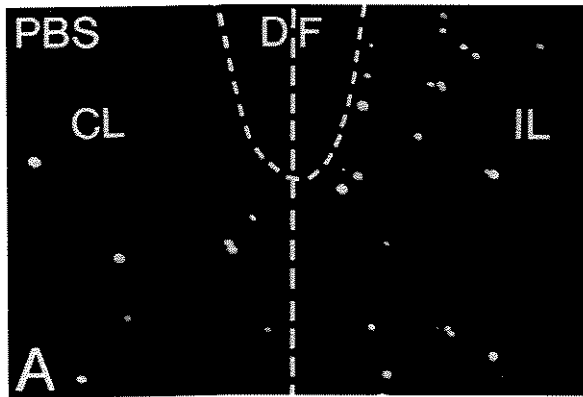


Figura 15 – Fotomicrografias de secções transversais de medulas espinhais ao nível do segmento L5 mostrando a presença de interneurônios TUNEL positivos 24 horas após a transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos. Efeitos do tratamento com PBS (**A**), CNTF (**B**), NGF (**C**) e uma mistura do NGF+CNTF (**D**). DF=funículo dorsal; CL=contralateral; IL=ipsilateral. Barra=100µm.

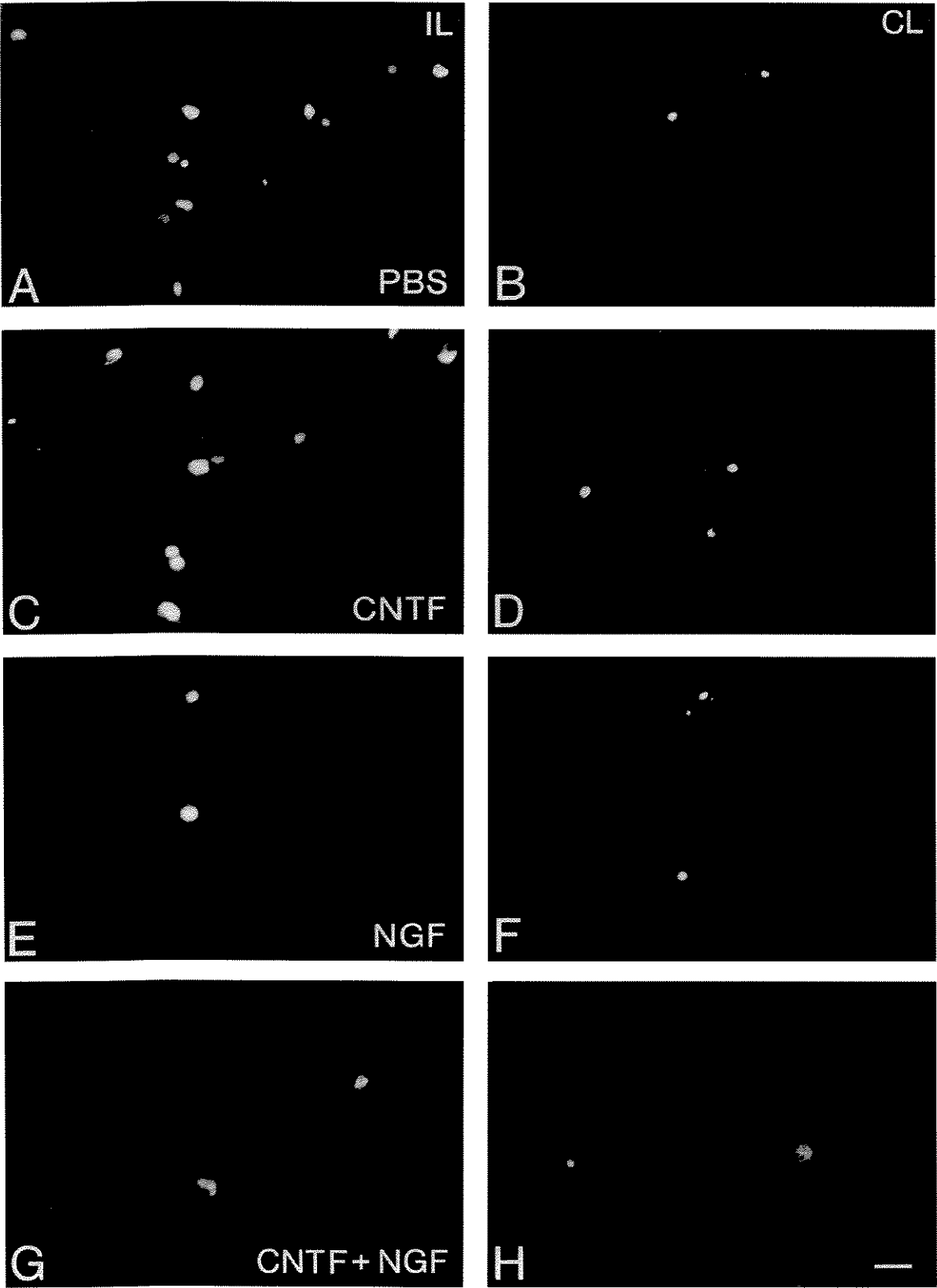


Figura 16 – Fotomicrografias de secções transversais de gânglios espinhais ao nível de L5 mostrando a presença de neurônios sensitivos TUNEL positivos 24 horas após a transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos (P2). Efeitos do tratamento com PBS (**A, B**), CNTF (**C, D**), NGF (**E, F**) e uma mistura do NGF+CNTF (**G, H**). CL=contralateral; IL=ipsilateral. Barra=100µm.

Figura 17 – Distribuição de interneurônios (círculos) e motoneurônios (triângulos) TUNEL marcados 24 horas após a transecção do nervo ciático em ratos recém nascidos (P2). Os animais receberam PBS, NGF, CNTF ou uma mistura de NGF+CNTF em seus cotos proximais, utilizando-se um fragmento de gelfoam. Todos os neurônios TUNEL positivos identificados, ao nível da intumescência lombar (L4-L6), 6 cortes por animal, foram plotados em um único desenho esquemático representativo. CL=contralateral; IL=ipsilateral.

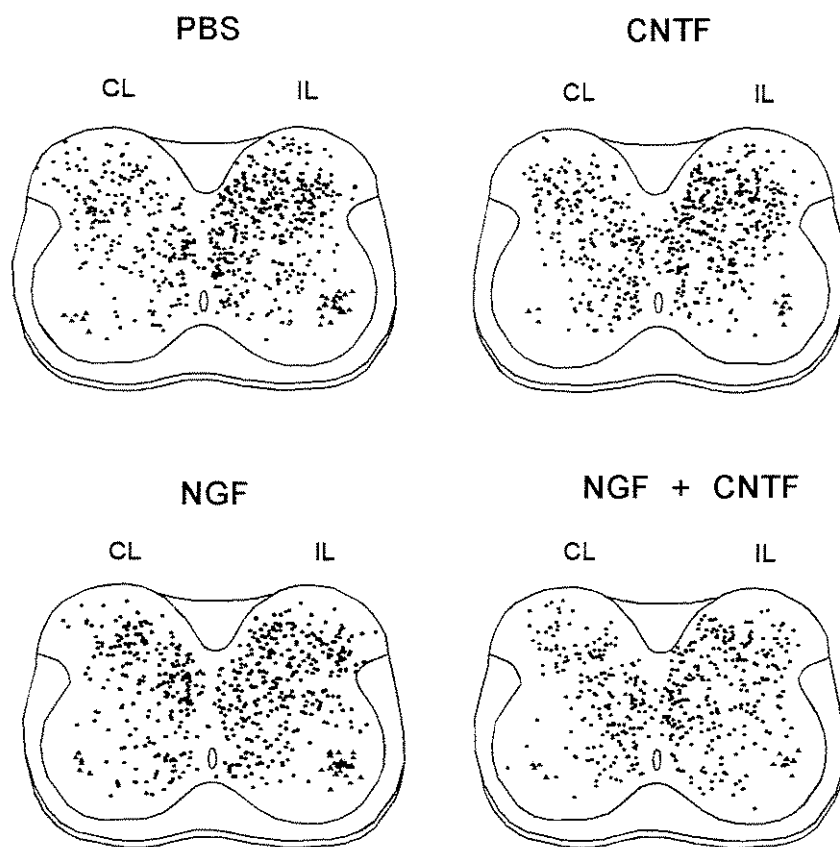
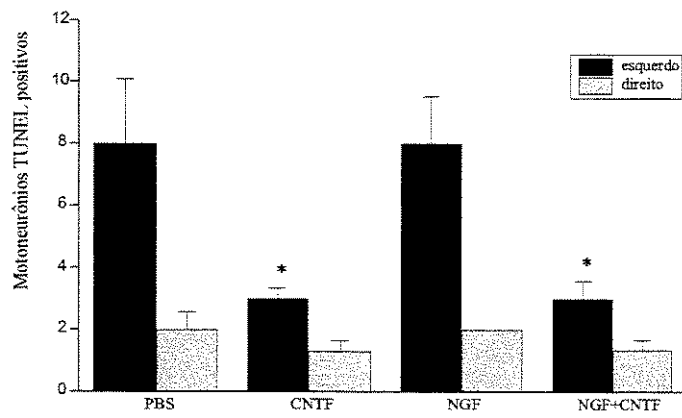


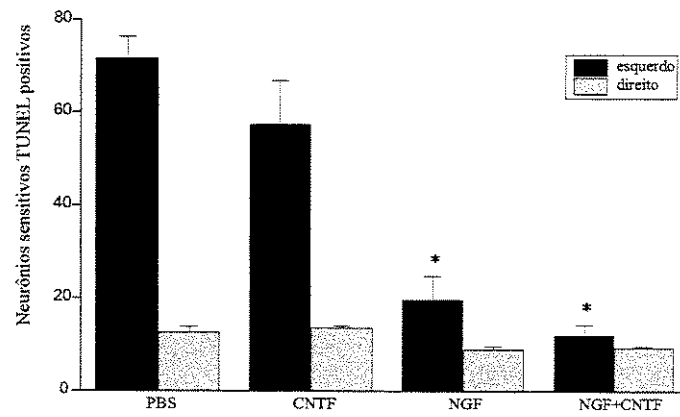
Figura 18 – **A.** Gráfico mostrando o número de motoneurônios TUNEL positivos 24 horas após a transecção do nervo ciático e tratamento com PBS, NGF, CNTF ou uma mistura de NGF+CNTF em ratos recém nascidos (P2). Os asteriscos apontam o efeito significativo do tratamento com CNTF e NGF+CNTF em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

B. Gráfico mostrando o número de neurônios sensitivos (L5) TUNEL positivos 24 horas após a transecção do nervo ciático e tratamento com PBS, NGF, CNTF ou uma mistura de NGF+CNTF em ratos recém nascidos (P2). Os asteriscos apontam o efeito significativo do tratamento com NGF e NGF+CNTF em relação aos demais grupos ($p < 0,05$)

A



B



- Figura 19 – **A.** Gráfico mostrando a razão do número de interneurônios TUNEL positivos entre o lado esquerdo e direito, 24 horas após a transecção do nervo ciático e tratamento com PBS, NGF, CNTF ou uma mistura de NGF+CNTF em ratos recém nascidos (P2). Os asteriscos correspondem a um efeito significativo do tratamento com CNTF e NGF ($p<0,05$).
- B.** Gráfico mostrando a razão do número de interneurônios TUNEL positivos entre o lado esquerdo e direito, encontrados nas lâminas I, II e III, 24 horas após a transecção do nervo ciático e tratamento com PBS, NGF, CNTF ou uma mistura de NGF+CNTF em ratos recém nascidos (P2).
- C.** Gráfico mostrando a razão do número de interneurônios TUNEL positivos entre o lado esquerdo e direito, encontrados nas lâminas IV, V e VI, 24 horas após a transecção do nervo ciático e tratamento com PBS, NGF, CNTF ou uma mistura de NGF+CNTF em ratos recém nascidos (P2). Os asteriscos correspondem a um efeito significativo do tratamento com NGF e NGF+CNTF ($p<0,05$).
- D.** Gráfico mostrando a razão do número de interneurônios TUNEL positivos entre o lado esquerdo e direito, encontrados fora das lâminas I a VI e IX, 24 horas após a transecção do nervo ciático e tratamento com PBS, NGF, CNTF ou uma mistura de NGF+CNTF em ratos recém nascidos (P2). O asterisco corresponde a um efeito significativo do tratamento com CNTF ($p<0,05$).

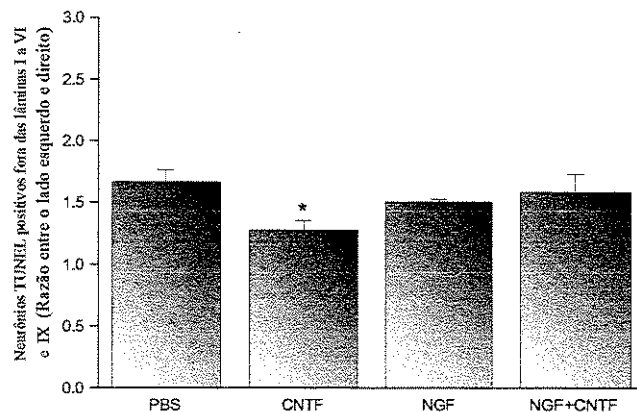
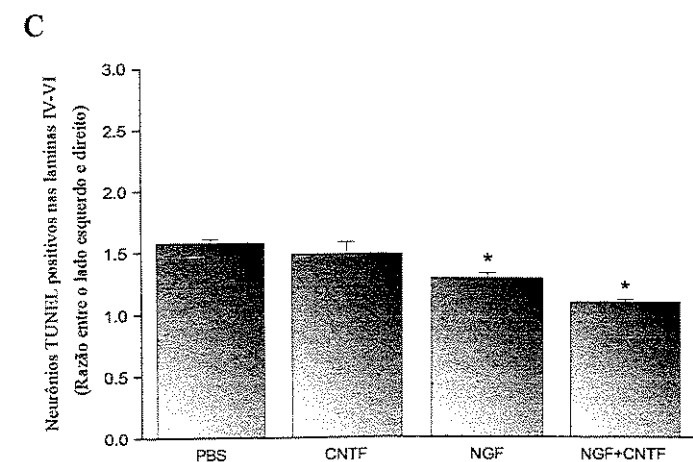
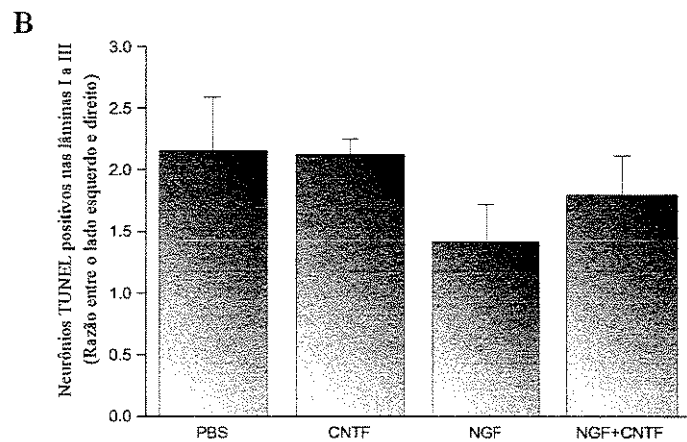
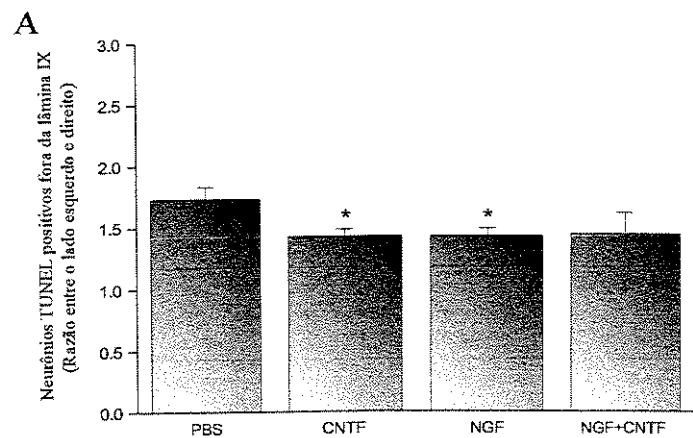


Tabela I - Número médio de motoneurônios TUNEL positivos encontrados em cortes transversais de medulas espinhais ao nível de intumescência lombar (L4 a L6). Estão representados os animais normais e animais cujo nervo ciático esquerdo foi transeccionado em P2. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. O asterisco ao lado do valor da média, nos animais operados, corresponde a uma diferença significativa em comparação ao lado esquerdo operado dos demais grupos, tomando-se um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls.

Grupo	Motoneurônios	
	Esquerda	Direita
4h operado	2,67 $\pm$ 1,20	1,33 $\pm$ 0,33
4h normal	0,33 $\pm$ 0,33	1,00 $\pm$ 0,58
8h operado	9,00 $\pm$ 2,08 *	1,00 $\pm$ 0,58
8h normal	1,00 $\pm$ 0,58	0,33 $\pm$ 0,33
12h operado	8,33 $\pm$ 0,88 *	1,33 $\pm$ 0,33
12h normal	1,33 $\pm$ 0,88	1,00 $\pm$ 0,58
24h operado	9,00 $\pm$ 2,00*	1,33 $\pm$ 0,33
24h normal	0,73 $\pm$ 0,35	0,73 $\pm$ 0,35
48h operado	7,67 $\pm$ 0,88 *	1,33 $\pm$ 0,33
48h normal	1,00 $\pm$ 0,58	0,33 $\pm$ 0,33
72h operado	1,00 $\pm$ 0,58	0,67 $\pm$ 0,33
72h normal	0,33 $\pm$ 0,33	0,33 $\pm$ 0,33
1 semana operado	0,33 $\pm$ 0,33	-
1 semana normal	-	-

Tabela II - Número médio de neurônios sensitivos TUNEL positivos encontrados em cortes transversais de gânglios L5 das raízes dorsais. Estão representados os animais normais e animais cujo nervo ciático esquerdo foi transeccionado em P2. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. Um asterisco ao lado do valor da média, nos animais operados, corresponde a uma diferença significativa em comparação com os grupos cujos tempos de sobrevida foram de 4, 8, 48 horas e 1 semana. Dois asteriscos correspondem a uma diferença significativa em relação aos demais grupos operados. Para todas as comparações, tomou-se um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls.

	Neurônios Sensitivos			
	Esquerda - operado	Direita - operado	Esquerda - normal	Direita - normal
4h	9,67 $\pm$ 2,08	10,00 $\pm$ 2,00	14,00 $\pm$ 1,53	12,00 $\pm$ 0,58
8h	10,67 $\pm$ 1,85	10,33 $\pm$ 2,19	14,00 $\pm$ 1,53	15,00 $\pm$ 1,15
12h	24,33 $\pm$ 2,90*	10,33 $\pm$ 2,25	12,00 $\pm$ 1,53	11,00 $\pm$ 2,00
24h	60,67 $\pm$ 12,17**	17,67 $\pm$ 2,33	15,67 $\pm$ 3,29	18,33 $\pm$ 0,88
48h	40,67 $\pm$ 2,33*	15,33 $\pm$ 3,29	13,00 $\pm$ 1,15	14,67 $\pm$ 1,20
72h	38,33 $\pm$ 0,33	13,00 $\pm$ 2,52	9,33 $\pm$ 0,66	10,33 $\pm$ 1,20
1 semana	10,33 $\pm$ 1,85	7,67 $\pm$ 0,66	9,33 $\pm$ 0,33	9,17 $\pm$ 0,77

Tabela III - Número médio de interneurônios TUNEL positivos encontrados em cortes transversais de medulas espinhais ao nível de intumescência lombar (L4 a L6). Estão representados os animais normais e animais cujo nervo ciático esquerdo foi transecionado em P2. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. Um asterisco ao lado do valor da média, nos animais operados, corresponde a uma diferença significativa em comparação com os grupos cujos tempos de sobrevida foram de 48 horas e 1 semana. Dois asteriscos correspondem a uma diferença significativa em relação aos demais grupos operados. O símbolo ($\blacklozenge$), ao lado do valor da média, corresponde a uma diferença significativa em relação aos animais normais. Para todas as comparações, tomou-se um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls.

Grupo	Interneurônios	
	Esquerda	Direita
4h operado	80,33 $\pm$ 7,88*	70,33 $\pm$ 9,34 $\blacklozenge$
4h normal	48,33 $\pm$ 2,96	48,67 $\pm$ 4,66
8h operado	104,00 $\pm$ 9,61**	70,30 $\pm$ 2,96 $\blacklozenge$
8h normal	49,00 $\pm$ 2,52	45,33 $\pm$ 4,37
12h operado	113,33 $\pm$ 8,95**	78,33 $\pm$ 3,93 $\blacklozenge$
12h normal	83,33 $\pm$ 2,96	82,33 $\pm$ 0,33 $\blacklozenge$
24h operado	100,67 $\pm$ 14,65**	65,00 $\pm$ 9,17
24h normal	53,00 $\pm$ 3,23	55,70 $\pm$ 2,60
48h operado	65,67 $\pm$ 2,73*	47,33 $\pm$ 1,85
48h normal	39,00 $\pm$ 3,60	46,67 $\pm$ 3,33
72h operado	33,33 $\pm$ 3,76	27,00 $\pm$ 2,31
72h normal	31,33 $\pm$ 0,88	31,33 $\pm$ 1,85
1 week operado	12,33 $\pm$ 2,90	13,33 $\pm$ 1,20
1 week normal	16,33 $\pm$ 0,88	17,00 $\pm$ 3,51

Tabela IV - Número médio de interneurônios TUNEL positivos presentes nas lâminas I, II e III, encontrados em cortes transversais de medulas espinhais ao nível de intumescência lombar (L4 a L6). Estão representados os animais normais e animais cujo nervo ciático esquerdo foi transeccionado em P2. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. Um asterisco ao lado do valor da média, nos animais operados, corresponde a uma diferença significativa em comparação com os demais grupos operados, tomando-se um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls.

Interneurônios (Lâminas I, II e III)

Grupo	Esquerdo - operado	Direito - operado	Esquerdo - normal	Direito - normal
4h	15,67 $\pm$ 4,37	14,67 $\pm$ 4,37	11,67 $\pm$ 0,88	13,00 $\pm$ 2,52
8h	24,00 $\pm$ 2,00*	18,33 $\pm$ 0,66	8,33 $\pm$ 2,19	9,00 $\pm$ 2,08
12h	24,00 $\pm$ 2,52*	18,00 $\pm$ 5,13	12,00 $\pm$ 2,08	12,33 $\pm$ 2,40
24h	26,33 $\pm$ 2,90*	12,67 $\pm$ 2,33	12,00 $\pm$ 1,00	12,67 $\pm$ 2,19
48h	5,67 $\pm$ 1,20	5,00 $\pm$ 1,00	8,00 $\pm$ 2,00	11,33 $\pm$ 0,88
72h	7,67 $\pm$ 0,33	7,33 $\pm$ 0,33	5,00 $\pm$ 1,53	5,00 $\pm$ 0,58
1 semana	2,00 $\pm$ 0,58	1,67 $\pm$ 0,33	3,00 $\pm$ 1,00	2,00 $\pm$ 0,58

Tabela V - Número médio de interneurônios TUNEL positivos presentes nas lâminas IV, V e VI, encontrados em cortes transversais de medulas espinhais ao nível de intumescência lombar (L4 a L6). Estão representados os animais normais e animais cujo nervo ciático esquerdo foi transecionado em P2. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. Um asterisco ao lado do valor da média, nos animais operados, corresponde a uma diferença significativa em comparação com os grupos cujos tempos de sobrevivência foram de 48 horas e 1 semana. Dois asteriscos correspondem a uma diferença significativa em relação aos demais grupos operados. Para todas as comparações, tomou-se um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls.

Interneurônios (Lâminas IV – VI)

Grupo	Esquerdo - operado	Direito - operado	Esquerdo – normal	Direito - normal
4h	16,67 $\pm$ 0,66*	14,00 $\pm$ 1,15	10,67 $\pm$ 3,29	10,67 $\pm$ 1,20
8h	18,67 $\pm$ 1,67*	9,33 $\pm$ 2,73	10,33 $\pm$ 0,88	12,33 $\pm$ 0,19
12h	23,33 $\pm$ 0,66**	13,67 $\pm$ 2,85	17,00 $\pm$ 1,15	14,67 $\pm$ 2,03
24h	26,33 $\pm$ 2,40**	10,33 $\pm$ 0,88	12,33 $\pm$ 2,19	16,33 $\pm$ 0,88
48h	15,33 $\pm$ 2,85*	10,67 $\pm$ 1,67	8,67 $\pm$ 1,33	8,33 $\pm$ 0,88
72h	4,67 $\pm$ 0,88	5,67 $\pm$ 0,88	8,67 $\pm$ 1,45	8,00 $\pm$ 1,15
1 semana	3,00 $\pm$ 0,58	3,33 $\pm$ 0,33	2,33 $\pm$ 1,20	1,33 $\pm$ 0,66

Tabela VI - Número médio de interneurônios TUNEL positivos fora das lâminas I a VI e IX, encontrados em cortes transversais de medulas espinhais ao nível de intumescência lombar (L4 a L6). Estão representados os animais normais e animais cujo nervo ciático esquerdo foi transeccionado em P2. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão.

Interneurônios (fora das lâminas I a VI e IX)				
Grupo	Esquerdo - operado	Direito - operado	Esquerdo - normal	Direito - normal
4h	48,00 $\pm$ 6,36	41,67 $\pm$ 4,82	25,00 $\pm$ 6,24	22,67 $\pm$ 7,70
8h	61,33 $\pm$ 12,59	46,00 $\pm$ 10,00	32,33 $\pm$ 1,86	27,33 $\pm$ 1,77
12h	66,00 $\pm$ 8,09	46,67 $\pm$ 13,32	59,33 $\pm$ 4,04	57,67 $\pm$ 4,49
24h	48,00 $\pm$ 13,67	39,67 $\pm$ 13,50	31,00 $\pm$ 0,58	26,67 $\pm$ 2,40
48h	54,33 $\pm$ 4,91	37,33 $\pm$ 0,33	22,33 $\pm$ 1,46	27,00 $\pm$ 6,24
72h	18,00 $\pm$ 7,55	12,33 $\pm$ 2,91	17,67 $\pm$ 0,88	18,33 $\pm$ 0,34
1 semana	9,00 $\pm$ 3,06	10,67 $\pm$ 0,88	11,00 $\pm$ 1,73	13,33 $\pm$ 3,85

Tabela VII - Número médio de motoneurônios TUNEL positivos encontrados em cortes transversais de medulas espinhais ao nível de intumescência lombar (L4 a L6), após o tratamento com PBS (0,1M), NGF (10 μ g/ μ l), CNTF (25 μ g/ μ l) ou uma mistura de NGF+CNTF, 24 horas após a transecção do nervo ciático esquerdo em ratos P2. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. Um asterisco ao lado do valor da média, corresponde a uma diferença significativa em comparação com os valores observados no lado esquerdo dos demais grupos, tomando-se um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls.

	Motoneurônios	
	Esquerda	Direita
PBS	8,00 $\pm$ 2,09	2,00 $\pm$ 0,58
CNTF	3,00 $\pm$ 0,58*	1,30 $\pm$ 0,35
NGF	8,00 $\pm$ 1,53	2,00 $\pm$ 0,58
CNTF+NGF	3,00 $\pm$ 0,58*	1,33 $\pm$ 0,35

Tabela VIII - Número médio de neurônios sensitivos TUNEL positivos encontrados em cortes transversais de gânglios L5 das raízes dorsais, após o tratamento com PBS (0,1M), NGF (10 μ g/ μ l), CNTF (25 μ g/ μ l) ou uma mistura de NGF+CNTF, 24 horas após a transecção do nervo ciático esquerdo em ratos P2. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. Um asterisco ao lado do valor da média, nos animais operados, corresponde a uma diferença significativa em comparação com os valores observados no lado esquerdo dos demais grupos. Dois asteriscos ao lado do valor da média, no lado contralateral à lesão, correspondem a um efeito significativo do tratamento com NGF e NGF+CNTF em relação aos grupos tratados com PBS e CNTF. Tomou-se um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls.

	Neurônios Sensitivos	
	Esquerda	Direita
PBS	71,67 $\pm$ 4,67	12,67 $\pm$ 1,20
CNTF	57,33 $\pm$ 9,50	13,67 $\pm$ 0,34
NGF	19,67 $\pm$ 5,18*	9,00 $\pm$ 0,58**
CNTF+NGF	12,00 $\pm$ 2,31*	9,33 $\pm$ 0,33**

Tabela IX - Número médio do total de interneurônios TUNEL positivos encontrados em cortes transversais de medulas espinhais ao nível de intumescência lombar (L4 a L6), 24 horas após a transecção do nervo ciático esquerdo em ratos P2 e tratamento com PBS (0,1M), NGF (10 μ g/ μ l), CNTF (25 μ g/ μ l) ou uma mistura de NGF+CNTF,. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. Os valores de R representam a razão entre o lado ipsilateral e contralateral à lesão. O asterisco ao lado do valor da média corresponde a uma diferença significativa em relação aos demais tratamentos, tomando-se um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Man-Whitney.

	Interneurônios		
	Esquerda	Direita	Razão (R)
PBS	128,33 $\pm$ 7,34	74,00 $\pm$ 2,09	1,74 $\pm$ 0,10
CNTF	111,00 $\pm$ 4,34	78,00 $\pm$ 6,42	1,43 $\pm$ 0,06*
NGF	107,00 $\pm$ 6,56	75,00 $\pm$ 2,64	1,43 $\pm$ 0,06*
CNTF+NGF	93,00 $\pm$ 2,65	65,67 $\pm$ 7,36	1,45 $\pm$ 0,17

Tabela X - Número médio do total de interneurônios TUNEL positivos nas lâminas I, II e III, 24 horas após a transecção do nervo ciático esquerdo em ratos P2 e tratamento com PBS (0,1M), NGF (10 μ g/ μ l), CNTF (25 μ g/ μ l) ou uma mistura de NGF+CNTF,. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. Os valores de R representam a razão entre o lado ipsilateral e contralateral à lesão.

Interneurônios (Lâminas I, II e III)			
	Esquerda	Direita	Razão (R)
PBS	23,67 $\pm$ 0,88	11,67 $\pm$ 1,85	2,16 $\pm$ 0,43
CNTF	22,00 $\pm$ 1,53	10,33 $\pm$ 0,33	2,13 $\pm$ 0,12
NGF	20,33 $\pm$ 0,53	15,00 $\pm$ 1,73	1,42 $\pm$ 0,30
CNTF+NGF	19,00 $\pm$ 1,00	11,67 $\pm$ 2,33	1,80 $\pm$ 0,32

Tabela XI - Número médio do total de interneurônios TUNEL positivos nas lâminas IV, V e VI, 24 horas após a transecção do nervo ciático esquerdo em ratos P2 e tratamento com PBS (0,1M), NGF (10 μ g/ μ l), CNTF (25 μ g/ μ l) ou uma mistura de NGF+CNTF,. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. Os valores de R representam a razão entre o lado ipsilateral e contralateral à lesão. O asterisco ao lado do valor da média corresponde a uma diferença significativa em relação aos demais tratamentos, tomando-se um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Man-Whitney.

Interneurônios (Lâminas IV – VI)			
	Esquerda	Direita	Razão (R)
PBS	23,67 $\pm$ 1,85	15,00 $\pm$ 1,00	1,58 $\pm$ 0,03
CNTF	22,00 $\pm$ 2,64	14,67 $\pm$ 0,88	1,49 $\pm$ 0,09
NGF	22,33 $\pm$ 1,86	17,33 $\pm$ 0,88	1,29 $\pm$ 0,04*
CNTF+NGF	17,67 $\pm$ 1,53	16,33 $\pm$ 0,88	1,09 $\pm$ 0,02*

Tabela XII - Número médio de interneurônios TUNEL positivos fora das lâminas I a VI e IX, encontrados em cortes transversais de medulas espinhais ao nível de intumescência lombar (L4 a L6), após o tratamento com PBS (0,1M), NGF (10 μ g/ μ l), CNTF (25 μ g/ μ l) ou uma mistura de NGF+CNTF, 24 horas após a transecção do nervo ciático esquerdo em ratos P2. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. Os valores de R representam a razão entre o lado ipsilateral e contralateral à lesão. O asterisco ao lado do valor da média corresponde a uma diferença significativa em relação aos demais tratamentos, tomando-se um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Man-Whitney.

Interneurônios (Fora das lâminas I a VI e IX)			
	Esquerda	Direita	Razão (R)
PBS	79,00 $\pm$ 7,03	47,33 $\pm$ 2,34	1,67 $\pm$ 0,10
CNTF	67,00 $\pm$ 3,06	53,00 $\pm$ 5,69	1,28 $\pm$ 0,08*
NGF	64,33 $\pm$ 4,92	42,67 $\pm$ 2,73	1,51 $\pm$ 0,02
CNTF+NGF	56,33 $\pm$ 2,03	37,33 $\pm$ 5,67	1,59 $\pm$ 0,28

Tabela XIII – Área média dos gânglios espinhais das raízes dorsais, obtidos através da análise de cortes transversais. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias, tomando-se um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls.

Área dos gânglios espinhais das raízes dorsais		
Grupo	Esquerdo	Direito
Normal	0,75 $\pm$ 0,03	0,74 $\pm$ 0,14
Operado	0,79 $\pm$ 0,11	0,79 $\pm$ 0,11

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J.M. & Cory, Z. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-1326.
- Alderson, R.F., Alterman, A.L., Barde, Y.A., Lindsay, R.M. (1990) Brain derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron*, **5**, 297-306.
- Aloe, L., Mugnaini, E., Levi-Montalcini, R. (1975) Light and electron microscopic studies on the excessive growth of sympathetic ganglia in rats injected daily from birth with 6-OHDA and NGF. *Arch. Ital. Biol.*, **113**(4), 326-353.
- Angeletti, P.U. & Levi-Montalcini, R. (1970) Sympathetic nerve cell destruction in newborn mammals by 6-hydroxydopamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 114-121.
- Angeletti, R.H. & Bradshaw, R.A. (1971) The amino acid sequence of 2.5S mouse submaxillary gland nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2417-2420.
- Armstrong, R.C. & Clarke, P.G. (1979) Neuronal death and the development of the pontine nuclei and inferior olive in the chick. *Neuroscience*, **4**, 1635-1647.
- Asada, H., Ip, N.Y., Razack, N., Parfitt, M.N., Plunkett, R.J. (1995) Time course of ciliary neurotrophic factor mRNA expression is coincident with the presence of protoplasmic astrocytes in traumatized rat striatum. *J. Neurosci. Res.*, **40**, 22-30.
- Ashkenazi, A. & Dixt, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.
- Baker, C.V.H. & Bronner-Fraser, M. (1997) The origins of the neural crest. Part I: embryonic induction. *Mech. Dev.*, **69**, 3-11.

- Baker, C.V.H. & Bronner-Fraser, M. (1997) The origins of the neural crest. Part II: an evolutionary perspective. *Mech. Dev.*, **69**, 13-29.
- Baldissera, F., Cavallari, P., Fournier, E., Pierrot-Deseilligni, E., Shindo, M. (1987) Evidence for mutual inhibition of opposite Ia interneurons in the human limb. *Exp. Brain Res.*, **66**, 106-114.
- Barbacid, M. (1993) Nerve growth factor: a tale of two receptors. *Oncogene*, **8**, 2033-2042.
- Bazan, J.F. (1991) Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron*, **7**, 197-208.
- Berkemeier, L.R., Winslow, J.W., Kaplan, D.R., Nicolics, K., Goeddel, D.V., Rosenthal, A. (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron*, **7**, 857-866.
- Biobao F. & Dubois-Dauphin (1996) Time course of axotomy-induced apoptotic cell death in facial motoneurons of neonatal wild type and bcl-2 transgenic mice. *Neuroscience*, **71**(4), 1111-1119.
- Bothwell, M. (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Ann. Rev. Neurosci.*, **18**, 223-253.
- Brown, A.G. (1981) Functional organization in groups of neurons. In: Nerve cells and nervous systems. An introduction to neuroscience. London: Springer-Verlag, pp. 159-175.
- Brown, D.G., Sun, X.M., Cohem, G.M. (1993) Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J. Biol. Chem.*, **268**(5), 3037-3039.
- Burke, R.E. (1990) Spinal cord: Ventral horn. In G.M. Shepherd (ed): The Synaptic Organization of the Brain. New York: Oxford University Press, pp 88-132.

- Burls, A., Subramaniam, K., Lowrie, M.B., Vbrová, G. (1991) Absence of nerve-muscle interaction influences the survival of developing motoneurons. *Eur. J. Neurosci.*, **3**, 216-221.
- Burt, A.M. (1993) Neuroanatomia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 412pp.
- Cajal, S.R. (1959) Degeneration and regeneration of the nervous system. New York, Hafner, 459pp.
- Carpenter, M.B. (1988) Human neuroanatomy. Interamericana, 7ª edição, 700pp.
- Chang, L.M.S. & Bollum, F.J. (1986) Molecular biology of terminal transferase. *Crit. Rev. Biochem.*, **21**, 27-32.
- Clarke, P.G. & Hornung, J.P. (1989) Changes in the nuclei of dying neurons as studied with thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.*, **283**(3), 438-449.
- Clarke, P.G. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol (Berl.)*, **181**(3), 195-213.
- Clarke, P.G.H. & Clarke, S. (1996) Nineteen century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat. Embryol. (Berl.)*, **193**, 81-99.
- Coggenshall, R.E., Pover, C.M., Fitzgerald, M. (1984) Dorsal root ganglion cell death and surviving cell numbers in relation to the development of sensory innervation in the rat hindlimb. *Dev. Brain Res.*, **82**, 193-212.
- Cohem, , G.M., Sun, X.M., Snowden, R.T., *et al.* (1992) Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *J. Biochem.*, **286**, 331-334.
- Dale, N. (1985) Reciprocal inhibitory interneurons in the *xenopus* embryo spinal cord. *J. Physiol.*, **363**, 61-70.

- DeGroat, W.C., Nadelhaft, I., Morgan, C., Schable, T. (1978) Horseradish peroxidase tracing of visceral efferent and primary afferent pathways in the cat's sacral spinal cord using benzidine processing. *Neurosci. Letters*, **10**, 103-108.
- DeLong G.R. and Sidman R.L. (1962) Effects of eye removal at birth on histogenesis of the mouse superior colliculus: An autoradiographic analysis with tritiated thymidine. *J. comp. Neurol.* 118:205-219.
- DiPrisco, G.V., Wallén, P., Grillner, S. (1990) Synaptic effects of intraspinal stretch receptor neurons mediating movement-related feedback during locomotion. *Brain Res.*, **530**, 161-166.
- Dumoulin, F.L., Raivich, G., Streit, W.J., Kreutzberg, G.W. (1991) Deferential regulation of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in regenerating rat facial nucleus and dorsal root ganglion. *Eur. J. Neurosci.*, **3**, 338-342.
- Eccles, J.C., Fatt, P., Landgren, S. (1956) Central pathway for direct inhibitory action of impulses in largest afferent nerve fibers to muscle. *J. Neurophysiol.*, **19**, 75-95.
- Edgley, S.A., & Jankowska, E. (1987) An inrteneuronal relay for group I and II muscle afferens in the midlumbar segments of the cat spinal cord. *J. Physiol.*, **389**, 675-690.
- Ellis, R., Yuan, J., Horvitz, H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **7**, 663-698.
- Ernfors, P., Ibáñez, C.F., Ebental, T., Olson, L., Person, H. (1990) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to β -nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5454-5458.

- Ernfors, P., Rosario, C.M., Merlio, J.P., *et al.* (1993) Expression of mRNAs for neurotrophin receptors in the dorsal root ganglion and spinal cord during development and following peripheral or central axotomy. *Molec. Brain Res.*, **17**, 217-226.
- Fleming, W. (1885) Über die bildung von richtungsfiguren in saugethiereiern beim untergang graafschet follikel. *Arch. Anat. Entw. Gesch.*, 221-244.
- Friedman, B., Scherer, S., Rudge, J.S., Helgren, M., Morrissey, D., *et al.* (1992) Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin related Schwann cells in vivo. *Neuron*, **9**, 295-305.
- Fukushima, K. & Kato, M. (1975) Spinal interneurons responding to group II muscle afferent fibers in the cat. *Brain Res.*, **90**, 307-312.
- Gavrieli Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.*, **119**, 493-501.
- Glass, D.J. & Yancopoulos, G.D. (1993) The neurotrophins and their receptors. *Trends Cell Biol.*, **3**, 262-268.
- Glücksman, A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **26**, 59-86.
- Gobel, S., Falls, W.M., Humphrey, E. (1981) Morphology and synaptic connections of ultrafine primary axons in lamina I of the spinal dorsal horn: candidates for the terminal axonal arbors of primary neurons with unmyelinated (C) axons. *J. Neurosci.*, **1**, 1163-1179.
- Gold, R. (1994) Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by combined use of in situ tailing and nick transplantation techniques. *Lab. Invest.*, **71**, 219-225.

- Götz, R., Köster, R.C.W., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharf, M., Thoenen, H. (1994) Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*, **372**, 266-269.
- Grant, G., Arvidsson, J., Robertson, B., Ygge, J. (1979) Transganglionic transport of horsehadish peroxidase in primary sensory neurons. *Neurosci Lett.*, **12**, 23-28.
- Hagg, T., Quon, D., Higaki, J., Varon, S. (1992) Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF receptor expression in the adult rat CNS. *Neuron*, **8**, 145-158.
- Hallböök, F., Ibáñez, C.F., Persson, H. (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron*, **6**, 845-858.
- Hamburger, V. (1958) Regression versus peripheral control of differentiation on motor hypoplasia. *Am. J. Anat.*, **102**, 365-409.
- Harris, A.J. & McCaig, C.D. (1984) Motoneuron death and motor unit size during embryonic development of the rat. *J. Neurosci.*, **4**, 13-24.
- Harrison, P.J., Jankowska, E., Zytnicki, D. (1986) Lamina VIII interneurons interposed in crossed reflex pathways in the cat. *J. Physiol.*, **371**, 147-166.
- Hendry, I.A. (1975) The effects of axotomy on the development of the rat superior cervical ganglion. *Brain Res.*, **90**(2), 235-244.
- Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. (1994) *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene bcl-2. *Cell*, **76**, 665-676.
- Henry, I.A. (1975) The response of adrenergic neurones to axotomy and nerve growth factor. *Brain Res.*, **94**(1), 87-97.

- Heumann D. and Rabinowicz T. (1980) Postnatal development of the dorsal lateral geniculate nucleus in the normal and enucleated albino mouse. *exp. Brain Res.* 38:75-85.
- Hoheisel, U., Lehmann-Willenbrock, E., Mense, S. (1989) Termination patterns of identified group II and III afferent fibers from deep tissues in the spinal cord of the cat. *Neuroscience*, **28**, 495-507.
- Hökfelt, T., Zhang, X. and Wiesenfeld-Hallin, Z. (1994) Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *TINS*, **17**, 22-30.
- Hongo, T., Ishizuka, N., Mannen, H., Sasaki, S. (1978) Axonal trajectory of single group Ia and Ib fibers in the cat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, **8**, 321-328.
- Ikeda, K., Iwasaki, Y., Shiojima, T., Kinoshita, M. (1996) Neuroprotective effect of various cytokines on developing spinal motoneurons following axotomy. *J. Neurol. Sci.*, **135**, 109-113.
- Ip, N.Y., Ibáñez, C.F., Nye, S.H., *et al.* (1992) Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3060-3064.
- Ip, N.Y., Stitt, T.N., Tapley, P., *et al.* (1993) Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the trks in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron*, **10**, 137-149.
- Ishizuka, N., Mannen, H., Hongo, T., Sasaki, S. (1979) Trajectory of group Ia afferent fibers stained with horseradish peroxidase in the lumbosacral spinal cord of the cat: three dimensional reconstructions from serial sections. *J. Comp. Neurol.*, **186**, 189-212.
- Jankowska E. (1992) Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors. *Prog. Neurobiol.* 38. 335-378.

- Jessel, T., Tsunoo, A., Kanazawa, I., Otsuka, M. (1979) Substance P: depletion in the dorsal horn of the rat spinal cord after section of the peripheral process of primary sensory neurons. *Brain Res.*, **168**, 247-259.
- Johnson, E.M. Jr., Gorin, P.D., Brandeis, L.D., Pearson, J. (1980) Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure in utero to maternal antibody to nerve growth factor. *Science*, **210**, 916-918.
- Junger, H. and Varon, S. (1997) Neurotrophin-4 (NT-4) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promote the survival of corticospinal motor neurons of neonatal rats in vitro. *Brain Res.*, **762**, 56-60.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M.. (1991) Principles of neural science. 3rd edition. USA: Prentice-Hall International Inc. 1135pp.
- Kandel, E.R., Frazier, W.T., Waziri, R., Coggeshall, R.E. (1967) Direct and common connections among identified neurons in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.*, **53**, 1352-1376.
- Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V., Parada, L.F. (1991) The trk protooncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, **252**, 554-556.
- Kashiba, H., Senba, E., Ueda, Y., Tohyama, M. (1992) Co-localized but target-unrelated expression of vasoactive intestinal polypeptide and galanin in rat dorsal root ganglion neurons after peripheral nerve crush injury. *Brain Res.*, **582**, 47-57.
- Kashihara, Y., Kuno, M. & Miyata, Y. (1987) Cell death of axotomized motoneurons in neonatal rats and its prevention by peripheral reinnervation. *J. Physiol.*, **386**, 135-148.
- Kerr, J.F.R., Willie, A.H., Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257.

- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S., *et al.* (1991) The trk B tyrosine kinase receptor is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*, **66**, 395-403.
- Knüsel, B., Winslow, J.W., Rosenthal, A., Burton, L.E., Seid, D.P., Nikolics, K., Hefti, F. (1991) Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 961-965.
- Konnerth, A., Takahashi, T., Edwards, F., Sakmann, B. (1988) Single channel and synaptic currents recorded in neurons of mammalian brain and spinal cord slices. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **14**, 1406.
- Korshing, S. (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J. Neurosci.*, **13**(7), 2739-2748.
- Lacaille, J.-C., Müller, A.L., Kunkel, D.D., Schwartzkroin, P.A. (1987) Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: Electrophysiology and morphology. *J. Neurosci.*, **7**, 1979-1993.
- Larsen, W.J. (1997) Human embryology. Ed. Mark Strauss. New York: Churchill Livingstone, 2nd edition, 512p.
- Lawson, S.J. & Lowrie, M.B. (1998) The role of apoptosis and excitotoxicity in the death of spinal motoneurons and interneurons after neonatal injury. *Neuroscience*, **87**, 337-348.
- Lawson, S.J., Davis, H.J., Bennett, J.P. & Lowrie, M.B. (1997) Evidence that spinal interneurons undergo programmed cell death postnatally in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, **9**, 794-799.
- Leibrock, J., Lottspeich, A.H., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., Barde, Y.-A. (1989) Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*, **341**, 149-152.

- Levi-Montalcini, R. (1951) Selective growth-stimulating effects of mouse sarcomas on the sensory and sympathetic nervous system of chick embryos. *J. Exp. Zool.*, **116**, 321-362.
- Levi-Montalcini, R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science*, **237**, 1154-1162.
- Levi-Montalcini, R., Aloe, L., Mugnaini, E., Oesch, F., Thoenen, H. (1975) Nerve growth factor induces volume increase and enhances tyrosine hydroxylase synthesis in chemically axotomized sympathetic ganglia of newborn rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**(2), 595-599.
- Li, L., Houenou L.J., Wu, W., Lei, M., Prevette, D.M. & Oppenheim R.W. (1998) Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice. *J. comp. Neurol.*, **396**, 158-168.
- Li, L., Oppenheim, R.W., Lei, M., Houenou, L.J. (1994) Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. *J. Neurobiol.*, **25**, 759-776.
- Ligth, A.R. & Durovic, R.G. (1984) Features of laminar and somatotopic organization of lumbar spinal cord units receiving cutaneous inputs from hindlimb receptive fields. *J. Neurophysiol.*, **52**, 449-458.
- Ligth, A.R., Trevino, D.L., Perl, E.R. (1979) Morphological features of functionally defined neurons in the marginal zone and substantia gelatinosa of the spinal dorsal horn. *J. Comp. Neurol.*, **186**, 151-171.
- Linden R. (1994) The survival of developing neurons: a review of afferent control. *Neuroscience*. **58**:671-682.
- Lo A.C., Li, L., Oppenheim, R.W., Prevette, D., Houenou, L.J. (1995) Ciliary neurotrophic factor promotes the survival of spinal sensory neurons following axotomy but not during the period of programmed cell death. *Exp. Neurol.*, **134**, 49-55.

- Locksin, R.A. & Beaulaton, J. (1974) Programmed cell death. *Life Sci.*, **15**, 1549-1565.
- Lowrie M.B., Krishnan, S., Vbrová, G. (1987) Permanent changes in muscle and motoneurons induced by nerve injury during a critical period of development of the rat. *Brain Res.*, **428**, 91-101.
- Lowrie, M.B. & Vrbová, G. (1992) Dependence of posnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. *TINS*, **15**, 80-84.
- Lowrie, M.B., Lavalette, D., Davis, C.E. (1994) Time course of motoneurons death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. *Dev. Neurosci.*, **16**, 279-284.
- Lundberg, A. (1975) Control of spinal mechanisms from the brain. In: The nervous system, Vol. I, The basic neurosciences, Ed. D.B. Tower. New York: Raven Press. pp. 253-265.
- Lundberg, A. (1979b) Multisensory control of spinal reflex pathways. *Prog. Brain Res.*, **50**, 11-28.
- Lundberg, A., Malmgren, K., Shomburg, E.D. (1987) Reflex pathways from group II muscle afferens. 1. Distribution and linkage of reflex actions to alpha motoneurons. *Expl. Brain Res.*, **65**, 271-281.
- Lundeberg, A. (1979a) Integration in propriospinal motor centre controlling the forelimb in the cat. In: Integration in the nervous system. Eds. H. Asanuma and V.S. Wilson. Tokyo: Igaru-Shoin. pp. 47-65.
- Maisopierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M., Yancopoulos, G.D. (1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*, **247**, 1446-1451.

- Mcbride, R.L., Feringa, E.R., Garver, M.K., Williams, J.K. Jr. (1990) Retrograde transport of fluoro-gold and rubrospinal neurons 10 and 20 weeks after T-9 spinal cord transection. *Exp. Neurol.*, **108**(1), 83-85.
- McConkey D.J., Orrenius S. (1996) Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells*, **14**, 619-631.
- McConkey D.J., Zhivostovisky, B., Orrenius S. (1996) Apoptosis – molecular mechanisms and biomedical implications. *Mol. Asp. Med.*, **17** (1), 1-110.
- Mckay, S.E. & Oppenheim, R.W. (1991) Lack of evidence for cell death among avian spinal cord interneurons during normal development and following removal of targets and afferens. *J. Neurobiol.*, **22**, 721-733.
- Mense, S. & Prahakar, N.R. (1986) Spinal termination of nociceptive afferent fibers from deep tissues in the cat. *Neurosci. Lett.*, **66**, 169-174.
- Messulan, M.-M., & Brushart, T.M. (1979) Transganglionic and anterograde transport of horseradish peroxidase across dorsal root ganglia: a tetramethylbenzidine method for tracing central sensory connections of muscles and peripheral nerves. *Neurosci.*, **4**, 1107-1117.
- Milligan, C.E., Oppenheim, R.W., Schwartz (1994) Motoneurons deprived of trophic support in vitro require new gene expression to undergo programmed cell death. *J. Neurol.*, **25**(8), 1005-1016.
- Miyata, Y., Kashihara, Y., Homa, S., Kuno, M. (1986) Effects of nerve growth factor on the survival and synaptic function of Ia sensory neurons in neonatal rats. *J. Neurosci.*, **6**, 2012-2018.

- Molander, C. & Grant, G. (1986) Laminar distribution and somatotopic organization of primary afferent fibers from hindlimb nerves in the dorsal horn. A study by transganglionic transport of horseradish peroxidase in the rat. *Neuroscience*, **19**, 297-312.
- Molander, C., Xu, Q., Grant, G. (1984) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J. Comp. Neurol.*, **230**, 133-141.
- Neanati, N., Fernandez, A., Wright, S., Kiefer, J., McConkey, D.J. (1995) Degradation of lamin B₁ preceds oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei. *J. Immunol.*, **154**, 3788-3795.
- Nielsen, U., Bisby, M.A., Keen, P. (1987) Effect of cutting or crushing the rat sciatic nerve on synthesis of substance P by isolated L5 dorsal root ganglia. *Neuropeptides*, **10**, 137-145.
- Obeshammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., *et al.* (1993) Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO*, **12**(9), 3679-3684.
- Oliveira, A.L.R., Risling, M., Deckner, M., Lindholm, T., Langone, F., Cullheim, S. (1997) Neonatal sciatic nerve transection induces TUNEL labeling of neurons in the rat spinal cord and DRG. *Neuroreport*, **8**, 2837-2840.
- Oppenheim, R.W. (1991b) Cell death during development of the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.*, **14**, 453-501.
- Oppenheim, R.W., Chu-Wang, I-Wu, Mader-Drot, J.L. (1978) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. III. The differentiation of motoneurons prior to their induced degeneration following limb-bud removal. *J. Comp. Neurol.*, **177**, 87-112.
- Oppenheim, R.W., Prevette, D., Qin-Wei, Y., Collins, F., Macdonald, J. Control of embryonic motoneurons survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. (1991a) *Science*, **251**, 1616-1618.

- Peitesh, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., McDonald, H.R., Mannherz, H.G., Tschopp, J. (1993) Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degeneration during apoptosis (programmed cell death). *EMBO*, **12**, 371-377.
- Peitsh, M.C., Muller, C., Tschopp, J. (1993) DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. *Nucleic Acids Res.*, **21**(18), 4206-4209.
- Peters, A., Palay, S.L., Webster, H. de F. (1991) The fine structure of the nervous system – neurons and their supporting cells. 3rd edition. New York: Oxford University Press., pp.494.
- Peyronnard, J.M., Charron, L., Lavoie, J., Messier, J.P. (1986) Differences in horseradish peroxidase labeling of sensory, motor and sympathetic neurons following chronic axotomy of the rat sural nerve. *Brain Res.*, **364**(1), 137-150.
- Piacentini, M, Autuori, F., Dini, L., Farrace, M.G., Ghibelli, L., Piredda, L., Fesus, L. (1991) Tissue transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor stimulation. *Cell Tissue Res.*, **263**, 227-234.
- Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., Jacobson, M.D. (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, **262**, 695-700.
- Rende, M., Muir, D., Ruoslahti, E., Hagg, T., Varon, S., Manthorpe, M. (1992) Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor in adult rat sciatic nerve. *Glia*, **5**, 25-32.
- Réthelyi, M., Light, A.R., Perl, E.R. (1982) Synaptic complexes formed by functionally defined primary afferent units with fine myelinated fibers. *J. Comp. Neurol.*, **207**, 381-393.
- Rexed, B. (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, **96**, 415-496.

- Rexed, B. (1954) A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, **100**, 297-379.
- Rose, T.M. & Bruce, A.G. (1991) Oncostatin M is a member of a cytokine family that induces leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8641-8645.
- Roy, C., Brown, D.L., Little, J.E., Valentine, B.K., Walker, P.R., *et al.* (1992) The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. *Exp. Cell Res.*, **200**(2), 416-424.
- Rudge, J.S., Alderson, R.F., Pasnikowski, E., McClain, J., Ip, N.Y., Lindsay, R.M. (1992) Expression of ciliary neurotrophic factor and the neurotrophins – nerve growth factor, brain derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 – in cultured rat hippocampal astrocytes. *Eur. J. Neurosci.*, **4**, 459-471.
- Sanders, E.J. & Wride, M.A. (1995) Programmed cell death in development. *Int. Rev. Cytol.*, **163**, 105-173.
- Sanders, J.W. (1966) Death in embryonic systems. *Science*, **154**, 604-612.
- Schmalbruch, H. (1987) Loss of sensory neurons after sciatic nerve section in the rat. *Anat. Rec.*, **219**, 323-329.
- Schmalbruch, H. (1988) The effect of peripheral nerve injury on immature motor and sensory neurons and on muscle fibres. Possible relation to the histogenesis of Werdnig-Hoffmann disease. *Rev. Neurol.*, **144**, 721-729.
- Schomburg, E.D. (1990) Spinal sensorimotor systems and their supraspinal control. *Neuroscience Res.*, **7**, 265-340.

- Schumued, L.C. & Fallon, J.H. (1986) Fluoro-gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.*, **377**(1), 147-154.
- Sendtner, M., Kreutzberg, G.W., Thoenen, H. (1990) Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature*, **345**, 4401.
- Sendtner, M., Schmalbruch, H., Stökli, K.A., Carroll, P., Kreutzberg, G.W., Thoenen, H. (1992) Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature*, **358**, 502-504.
- Shröder, R. (1914) Über des verhalten der uterus-schleimhaut um die zeit der menstruation. *Maratschr. Geburtsh. Gynak.*, **39**, 3-21.
- Skirboll, L.R., Crawley, J.N., Hommer, D.W. (1986) Functional studies of cholecystokinin-dopamin co-existence: electrophysiology and behavior. *Prog. Brain Res.*, **68**, 357-370.
- Smith, C. (1983) The development and posnatal and postnatal organization of primary afferent projections of the rat thoracic spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, **220**, 29-43.
- Snider, W.D., Elliott, J.L., Yan, Q. (1992) Axotomy iduced neuronal death during development. *J. Neurol.*, **23**, 1231-1246.
- Stökli, K.A., Lillien, L.E., Naher-Noe, M., *et al.* (1991) Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J. Cell Biol.*, **115**, 447-459.
- Sugimoto, T., Bennet, G.J., Kajanser, K.C. (1990) Transinaptic degeneration in the superficial dorsal horn after sciatic nerve injury: effects of chronic constriction injury, transection and strychnine. *Pain*, **42**, 205-219.

- Sugiura, Y., Lee, C.L., Perl, E.R. (1986) Central projections of identified , unmyelinated (C) afferent fibers innervating mammalian skin. *Science*, **234**, 358-361.
- Swett, J.E. & Wolf, C.J. (1985) The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, **231**, 66-77.
- Tan, S.A., Deglon, N., Zurn, A.D., Baetge, E.E., Bamber, B., Kato, A.C., Aebischer, P. (1996) Rescue of motoneurons from axotomy-induced cell death by polymer encapsulated cells genetically engineered to release CNTF. *Cell Transplant.*, **5**, 577-587.
- Thoenen, H., Bandtlow, C., Heumann, R. (1987) The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **109**, 145-178.
- Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316.
- Ulenkate, H.J., Gispen, W.H., Jennekens, F.G. (1996) Effects of ciliary neurotrophic factor on retrograde cell reaction after facial nerve crush in young adult rats. *Brain Res.*, **717**, 29-37.
- Vbrová, G. & Lowrie, M.B. (1989) The role of nerve-muscle interactions in the pathogenesis of SMA. In: Current concepts in childhood spinal muscular atrophy. Eds. L. Merlini, C. Granata and V. Dubowitz. Berlin: Springer-Verlag. pp. 33-43.
- Vejsada, R., Sagot, Y., Kato, A.C. (1995) Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, **7**, 108-115.
- Ventimiglia, R., Mather, P., Lindsay, R.M. (1993) Brain derived neurotrophic factor promotes survival and biochemical and morphological differentiation of striatal GABA neurons *in vitro*. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **19**, 666.

- Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobe, G.C., Kerr, J.F. (1988). Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.*, **13**, 18-54.
- Walker, P.R., Kokileva, L., LeBlanc, J, Sikorska, M. (1993) Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Biotechniques*, **15**(6), 1032-1040.
- Walters H.J., Barnet, G, O'Hanlon, G.M., Lowrie, M.B. (1998) Motoneuron survival after neonatal peroneal nerve injury in the rat – evidence for sparing effect of reciprocal inhibition. *Exp. Neurol.*, **152**, 95-100.
- Walters, H.J., Barnett, G., O'Hanlon, G.M., Lowrie, M.B. (1998) Motoneuron survival after peroneal nerve injury in the rat – evidence for the sparing effect of reciprocal inhibition. *Exp. Neurol.*, **152**, 95-100.
- Webster, H de F. & Favilla, J.T. (1984) Development of peripheral fibers. In: *Peripheral Neuropathy*. Eds. P.J. Dyck, P.K. Thomas, E.H. Lambert, R.P. Bunge. Philadelphia, Saunders. p. 329-359.
- Whiteside, G., Doyle, C.A., Hunt, S.P., Munglani, R. (1998) Differential time course of neuronal and glial apoptosis in neonatal rat dorsal root ganglia after sciatic nerve axotomy. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 3400-3408.
- Willis, W.D. & Westlund, K.N. (1997) Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J. Clin. Neurophysiol.*, **14**(1), 2-31.
- Wilson, P., Meyers, D.E.R. and Snow, P.J. (1986) The detailed somatotopic organization of the dorsal horn in the lumbosacral enlargement of the cat spinal cord. *J. Neurophysiol.*, **55**(3), 604-617.

- Xu, X.-J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Villar, M.J., Fahrenkrug, J., Hökfelt, T. (1990) On the role of galanin, substance P and other neuropeptides in primary sensory neurons of the rat: studies on spinal reflex excitability and peripheral axotomy. *Eur. J. Neurosci.*, **2**, 733-743.
- Yan, Q., Elliott, J.C., Matheson, C., Sun, J., Zhang, L., Mu, X., Rex, K.L. & Snider, W.D. (1993) Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons in vivo. *J. Neurobiol.*, **24**, 1555-1577.
- Ygge, J & Grant, G. (1983) The organization of the thoracic spinal nerve projection in the rat dorsal horn demonstrated with transganglionic transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, **216**, 1-9.
- Yip, H.K., Rich, K.M., Lampe, P.A. & Johnson, E.M.Jr. (1984) The effects of nerve growth factor and its antiserum on the postnatal development and survival after injury of sensory neurons in rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci.*, **4**, 2986-2992.
- Yuan, J., & Horvitz, H.R. (1992) The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development*, **446**, 309-320.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, H.R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*, **75**, 641-652.
- Zhivotonsky, B., Wade, D., Nicotera, P., Orrenius, S. (1994) Role of nucleases in apoptosis. *Int. Appl. Immunol.*, **105**, 333-338.

ANEXO I

TRANSECTION of a peripheral nerve in neonatal rats induces an extensive death of axotomized neurons. We demonstrate here that spinal motoneurons and sensory dorsal root ganglia neurons become TUNEL-labeled after sciatic nerve transection in neonatal rats, thus indicating that apoptotic mechanisms are involved in the death process. Interestingly, there is also a profound increase of TUNEL-labeled interneurons in the deep dorsal horn. This location suggests that an intact afferent input and/or contact with target cells is essential for interneuronal survival. Death of motoneurons and sensory neurons could be a result of the injury per se and/or the deprivation of neurotrophic substances, secondary to the loss of contact with target cells.

Key words: Apoptosis; Axotomy; Interneurons; Motoneurons; Rat

Neonatal sciatic nerve transection induces TUNEL labeling of neurons in the rat spinal cord and DRG

A. L. R. Oliveira,^{1,2,CA} M. Risling,¹
M. Deckner,¹ T. Lindholm,¹ F. Langone²
and S. Cullheim¹

¹Department of Neuroscience, Karolinska Institute, S17177, Stockholm, Sweden;

²Department of Anatomy, State University of Campinas/SP, Brazil

CA Corresponding Author and Address

Introduction

Peripheral nerve section induces extensive death of axotomized motoneurons in neonatal rats.^{1–3} One explanation for this is that axonal transection blocks the contact between the motoneuron and the target muscle, thereby depriving the motoneurons of various trophic substances. This explanation is supported by the fact that the death can be partially prevented with the administration of trophic factors, including nerve growth factor (NGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin (NT-4/5), ciliary neurotrophic factor (CNTF) and glial derived neurotrophic factor (GDNF).^{4–8} Another way to reduce neuronal death after peripheral axotomy is to repair the transected nerve in order to allow axonal regeneration to the target.⁹ However, few studies have investigated the mechanisms that are involved in the neuronal death after axotomy. Two different basic mechanisms are responsible for cell death: apoptosis or programmed cell death (PCD) and necrosis. Necrosis is characterized by passive cell disassemblance, immune system activation and inflammation.¹⁰ On the other hand, PCD is an active process requiring the activation of certain genes by which cells undergo silent and quick self destruction without detectable inflammation. PCD is characterized by early chromatin condensation followed by fragmentation, cell shrinkage, reorganization of the

cytoskeleton, organelle relocation and production of apoptotic bodies.¹¹

In order to study the role of neuronal death after sciatic nerve transection in neonatal rats, we used the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labeling (TUNEL) technique for detection of apoptotic cells¹² in the spinal cord and dorsal root ganglia. We report here that spinal motoneurons, interneurons in the deep dorsal horn and ventral horn as well as sensory neurons in the dorsal root ganglia undergo PCD after sciatic nerve transection in the neonatal rat.

Materials and Methods

Animals, surgery and tissue preparation: Six 2-day-old Sprague-Dawley rats were used. Under deep hypothermia, the left sciatic nerve of three pups was exposed and cut at the sciatic foramen level. Twenty-four hours later, the rats were sacrificed by an overdose of chloral hydrate (0.6 mg/kg, i.p.) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS). Three unoperated rats were used as control. The L4, L5 and L6 spinal cord segments and L5 dorsal root ganglia were dissected out and left in the same fixative for 24 h, washed in PBS and kept in PBS with 10% sucrose overnight at 4°C. Cryostat transverse sections of the spinal cords (18 µm) and the dorsal root ganglia

(12 μ m) were obtained and transferred to chrome alum gelatine-coated slides, dried at room temperature for 30 min and stored at -20°C until use.

Staining of apoptotic nuclei (TUNEL): Two different TUNEL protocols were used for the detection of apoptotic neurons. The first was based on digoxigenin nucleotides conjugated with fluorescein and the second was based on biotin nucleotides visualized with the horseradish peroxidase (HRP) method and counterstained with cresyl fast violet.

For the fluorescein-based protocol, the sections were post-fixed in ethanol/acetic acid (2:1) for 5 min at -20°C and rinsed twice for 5 min in PBS. The slides were transferred to a humidified chamber and the equilibration buffer solution was applied (Oncor, s7110-1) and incubated for 5 min at room temperature. The equilibration buffer was shaken off and the TdT enzyme solution (Oncor, s7110-2 and 3) was applied for 60 min at 37°C . The reaction was stopped with the stop/wash solution (Oncor, s7110-4) for 30 min at 37°C . After washing in PBS for 10 min, the sections were incubated with the fluorescein solution (Oncor, s7110-5 and 6) for 30 min. The slides were rinsed in PBS and mounted with glass coverslips in 30% glycerol solution.

The HRP-based protocol was based on the TUNEL technique reported by Gravielli *et al.*,¹² with slight modifications. In brief, the sections were post-fixed in ethanol/acetic acid (2:1) for 5 min at -20°C and rinsed twice for 5 min in 0.01 M PBS. Endogenous peroxidase was inactivated with 2% H_2O_2 in distilled water for 5 min at room temperature. Sections were incubated in a TdT buffer (30 mM Tris, pH 7.2, 140 mM sodium cacodylate, 1 mM cobalt chloride) for 10 min at room temperature. TdT (0.3U/ μ l) and biotinylated dUTP (0.2 nM/10 U TdT; Boehringer, Mannheim) in TdT buffer were then added and incubated for 2 h at 37°C . The reaction was stopped by incubation with 300 mM sodium chloride and 30 mM sodium citrate at room temperature for 15 min. The sections were incubated with 2% bovine serum albumin (Sigma) for 10 min and covered for 30 min with an anti-biotin peroxidase complex (SantaCruz ABC kit, sc-2017). The peroxidase was visualized with a 3,3',5,5'-diaminobenzidine solution, washed in distilled water, counterstained with cresyl fast violet and mounted with DPX (Sigma).

TUNEL positive cells analysis: In each animal, six alternate sections of the L4-L6 spinal cord segments and four sections of the L5 left and right ganglia were stained with the fluorescein-based TUNEL protocol and used for mapping and counting of apoptotic cells. For each of the L5 ganglia, the maximal

cross-sectional area was determined to estimate possible shrinkage, secondary to cell loss. It was found that such shrinkage, if any, could not exert any significant influence on the numbers obtained. The morphological characteristics of the cells undergoing apoptosis were identified in sections stained with the HRP-based TUNEL protocol and counterstained with cresyl fast violet. The analysis was performed at 400 $\times$ magnification in a Leitz DM RBE microscope. The numerical data are presented as mean $\pm$ s.d.

Results

Location and morphology of TUNEL-labeled cells: In normal animals, a number of TUNEL-labeled nuclei were found in both the dorsal and ventral horns. Such nuclei seemed to be located in small neurons as revealed from counterstained sections. The cells showed the basic characteristics of apoptosis, i.e. early chromatin condensation followed by fragmentation, cell shrinkage and cell fragmentation. A small number of TUNEL-labeled cells were detected in the motor nuclei.

One day after sciatic nerve transection there was a distinctly larger number of TUNEL-labeled interneurons on the operated side, while the intact side had about the same frequency of labeling as in the normal material. The increase in TUNEL labeling was evident in the deep dorsal horn, especially laminae IV-VI, but an increased number of TUNEL-positive interneurons was also observed in the superficial dorsal horn and in the ventral horn (Figs 1,3). TUNEL-labeled neurons in the motor nuclei, probably motoneurons, were found on the lesion side of operated animals, but very few labeled motoneurons were observed on the unoperated side (Figs 2,3).

The L5 dorsal root ganglia of the unoperated animals and intact right L5 dorsal root ganglia of the operated animals showed very few TUNEL-labeled sensory neurons. In the operated group, the left L5 ganglia showed a large number of TUNEL-positive nuclei all over the sections (Figs 1,2).

Number of TUNEL-labeled neurons: The total number of TUNEL-positive motoneurons, sensory neurons and interneurons is shown in Table 1. The number of labeled interneurons in unoperated animals did not differ between sides but operated animals displayed larger numbers, even on the intact side of the cord (20% higher; $p < 0.05$). On the operated side, the number was even higher (54%; $p < 0.05$). The total number of labeled motoneurons found in the operated side was approximately nine times higher than on the intact side and in unoperated animals.

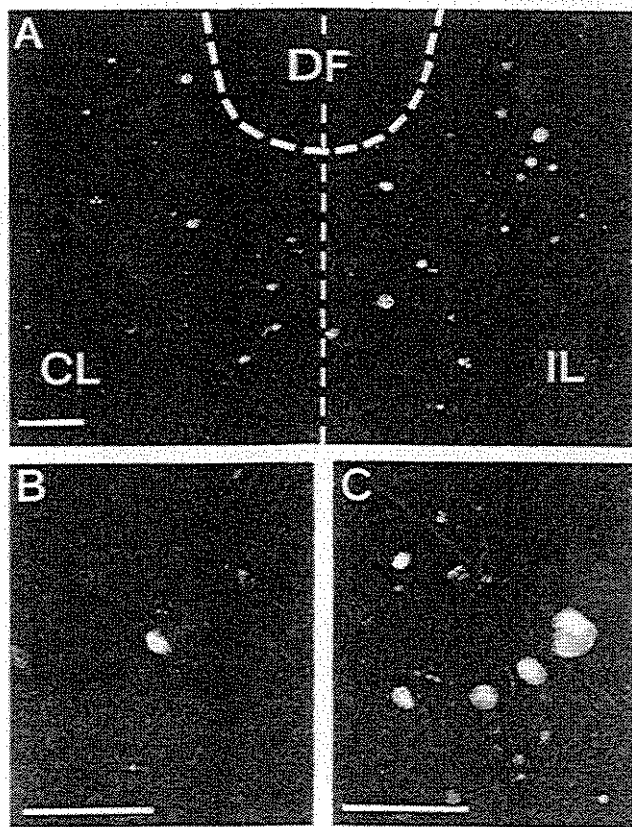


FIG. 1. Photomicrographs of transverse sections through the L5 spinal cord segment and L5 dorsal root ganglia showing TUNEL-labeled neurons, 24 h after neonatal left sciatic nerve transection. (A) *In situ* fluorescein-biotin-dUTP nick end-labeled neurons are found in both the dorsal and ventral horns. DF, dorsal funiculus; IL, ipsilateral; CL, contralateral. Bar = 200 μ m. (B) *In situ* fluorescein-biotin-dUTP nick end-labeled sensory neuron found in a L5 ganglion of an unoperated animal. Bar = 200 μ m. (C) *In situ* fluorescein-biotin-dUTP nick end-labeled sensory neurons found in the ipsilateral L5 ganglion of an operated animal. Bar = 200 μ m.

The total number of labeled sensory neurons found in L5 ganglia of unoperated animals did not differ between sides nor from the intact side of the operated animals. On the operated side, the number was 3.5 times higher.

Discussion

Peripheral nerve transection in neonatal animals leads to an extensive death of axotomized motoneurons in the spinal cord and primary afferent sensory neurons in dorsal root ganglia (DRGs).^{2,13,14} Recently, it has been proposed that this death of motoneurons may be the result of an apoptotic process.¹⁵ We have confirmed this possibility, and also demonstrated that apoptosis may underlie the death of axotomized DRG neurons at this age. Our results also strongly suggest that peripheral nerve injury may also induce apoptosis in interneurons in affected spinal cord segments. Apoptotic death of interneurons was seen in normal animals, thus confirming earlier observations in the neonatal rat spinal cord made by Lawson *et al.*¹⁶ but, after sciatic nerve transection, there was a substantial increase in the number of TUNEL-labeled cells, especially in laminae IV–VI. This region contains interneurons which are the target for primary afferent fibers, as well as the origin of projections to the motoneurons.¹⁷ Such interneurons may be especially vulnerable in the neonatal peripheral nerve injury model, which removes both afferent inputs and axon targets of these cells, both of which may supply trophic support to the interneurons. Our results suggested a certain degree of interneuron death on the contralateral side of the spinal cord. Since there are no direct connections between

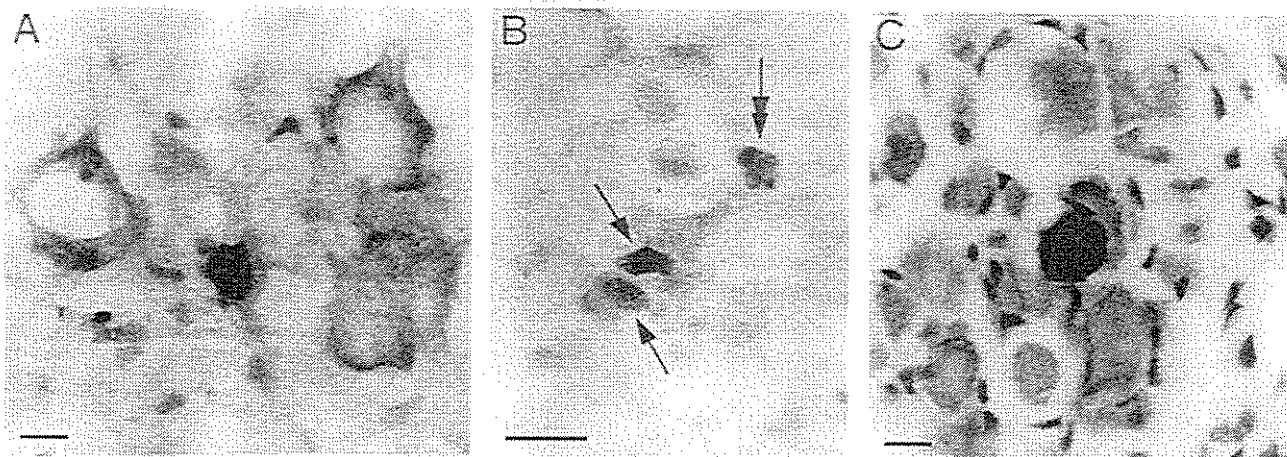
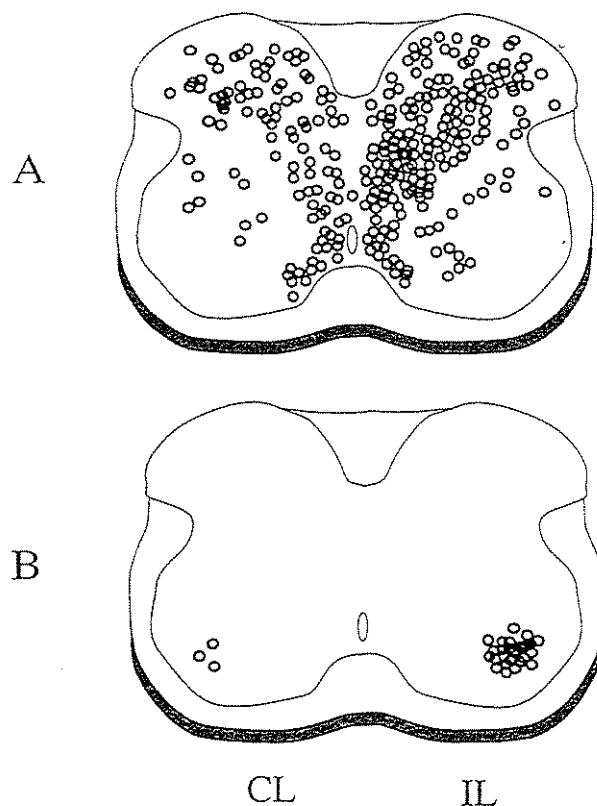


FIG. 2. Photomicrographs of transverse sections of lumbar spinal cords and L5 dorsal root ganglia showing TUNEL-labeled neurons, 24 h after neonatal left sciatic nerve transection. (A) High-power magnification photomicrograph of a TUNEL-HRP-labeled motoneuron in the left lamina IX 1 day after an ipsilateral sciatic nerve transection. Note the chromatin condensation and cell shrinking. Bar = 20 μ m. (B) High-power magnification photomicrograph of TUNEL-HRP labeled interneurons in the left deep dorsal horn 1 day after sciatic nerve transection. Note the different degrees of chromatin condensation (arrows) and the presence of a pycnotic nucleus (double arrow). Bar = 20 μ m. (C) High-power magnification photomicrograph of a TUNEL-HRP labeled dorsal root ganglion sensory neuron. Bar = 20 μ m.

Table 1. Number of TUNEL-labeled motoneurons, sensory neurons and interneurons in operated (left sciatic nerve transection) and unoperated neonatal rats

	TUNEL-labeled motoneurons		TUNEL-labeled sensory neurons		TUNEL-labeled interneurons	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right
Operated group (n = 3)	9.0 ± 3.5	1.0 ± 1.0	60.7 ± 21.1	17.6 ± 2.5	100.7 ± 25.4	65.0 ± 15.9
Unoperated group (n = 3)	0.7 ± 0.6	0.7 ± 0.6	16.7 ± 4.6	18.3 ± 1.5	53.0 ± 5.6	55.7 ± 4.5

**FIG. 3.** Distribution of TUNEL-labeled interneurons (**A**) and motoneurons (**B**) after left sciatic nerve transection in neonatal rats. All TUNEL-labeled neurons found at the lumbar intumescence level (L4–L6) are plotted on a single representative transverse section. IL, ipsilateral; CL, contralateral.

primary afferent fibers and contralaterally located interneurons at the level of the cord studied here¹⁷ removal of primary afferent inputs may induce deleterious effects also in second-order interneurons.

The apoptosis induced by the peripheral nerve lesion seen here evidently overlaps in time with the period of apoptotic death of interneurons in the normal spinal cord,¹⁶ while there are normally only very few apoptotic motoneurons and dorsal root ganglia cells at the studied age. Nevertheless, it seems as if both naturally occurring neuron death and death of neurons after neonatal peripheral nerve lesion are induced by apoptosis. This may indicate that the deleterious effects seen after nerve section have the same cause as has been proposed for the programmed

cell death during normal development, i.e. a lack of target-derived life supporting substances,^{2,4–8} rather than direct traumatic effects induced by the axotomy. This is supported by findings that a number of trophic substances, manufactured by Schwann cells and muscle are able to rescue lesioned neonatal motoneurons after peripheral nerve section in the neonate.^{4–8}

Conclusion

Sciatic nerve transection in the neonatal rat induces an increased frequency of TUNEL-labeling of motoneurons and interneurons in the spinal cord and sensory neurons in dorsal root ganglia, indicating that apoptotic mechanisms are involved in the death of such cells. The number of TUNEL-labeled interneurons is especially increased in regions which contain interneurons mediating disynaptic information from primary afferent fibers to the motoneurons, suggesting that the lack of an afferent input and/or target nerve cells may be of importance for the induction of apoptosis in interneurons. The strong increase in number of TUNEL-labeled motoneurons and dorsal root ganglion cells may primarily reflect apoptotic death due to a loss of trophic support from the respective target organs.

References

- Kuno M. *Neurosci Res* 9, 155–172 (1990).
- Lowrie MB and Vrobová G. *Trends Neurosci* 15, 80–84 (1992).
- Snider WD, Elliot JL, Yan Q. *J Neurobiol* 23, 1231–1246 (1992).
- Sendtner M, Holtman B, Thoenen H. *Neurosci Res* 360, 757–759 (1992).
- Yan Q, Elliot JL and Snider WD. *Nature* 360, 753–755 (1992).
- Hughes RA, Sendtner M and Thoenen H. *J Neurosci Res* 36, 663–671 (1993).
- Sendtner M, Schmalbruch H, Stockli KA et al. *Nature* 58, 502–504 (1992).
- Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA et al. *Science* 266, 1062–1064 (1994).
- Kashihara Y, Kuno M and Miyata Y. *Exp Neurol* 126, 233–246 (1987).
- Walker NI, Harmon BV, Gobe GC and Kerr JF. *Exp Pathol* 13, 18–54 (1988).
- McConkey DJ, Zhivotovsky B and Orrenius S. *Mol Asp Med* 17, 1–69 (1996).
- Gravielli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA. *J Cell Biol* 119, 493–501 (1992).
- Schmalbruch H. *Anat Rec* 219, 323–329 (1987).
- Schmalbruch H. *Rev Neurol* 144, 721–729 (1988).
- De Bilbao F and Dubois-Dauphin M. *Neuroscience* 71, 1111–1119 (1996).
- Lawson SJ, Davies AJ, Bennett JP and Lowrie MB. *Eur J Neurosci* 9, 794–799 (1997).
- Brown AG. Functional organization in groups of neurons. In: *Nerve Cells and Nervous Systems. An Introduction to Neuroscience*. London: Springer-Verlag, 1991: 159–175.

ACKNOWLEDGEMENTS: This study was supported by grants from the Swedish Medical Research Council (projects 6815 and 8657), Karolinska Institute, the International Spinal Research Trust, M. and A. Wallenbergs Stiftelse, and a scholarship from CAPES (Brazil) to A.L.R.O. (proj. BEX737/96-8).

Received 9 June 1997;

accepted 29 June 1997

ANEXO II

Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by NGF and CNTF

by

Alexandre L.R. de Oliveira^{1,2}, Mårten Risling¹, Alessandro Negro³, Francesco Langone⁴ and Staffan Cullheim^{1*}

¹ Department of Neuroscience, Doktorsringen 17, Karolinska Institutet, S-171 77 Stockholm, Sweden

² Department of Anatomy and ⁴ Department of Physiology and Biophysics, State University of Campinas, 13081-970 cx. 6109, Campinas, Brazil

³ Department of Biological Chemistry, Via Trieste 75, University of Padova, 35121 Padova, Italy

Correspondence: Staffan Cullheim, Department of Neuroscience, Doktorsringen 17, Karolinska Institutet, S-171 77 Stockholm, Sweden

E-mail: Staffan.Cullheim@neuro.ki.se

Running title: Apoptosis of interneurons after sciatic nerve lesion

Key words: TUNEL labeling; motoneuron; dorsal root ganglion; nerve injury; trophism

Abstract

We have previously shown, that not only motoneurons and dorsal root ganglion cells, but also interneurons in the spinal cord may undergo apoptotic cell death as a result of neonatal peripheral nerve transection in the rat. In order to define the relative importance of the loss of a potential target (motoneuron) and a potential afferent input (dorsal root ganglion cell) for the induction of apoptosis in interneurons in this situation, we have compared the distributions and time courses for TUNEL labeling, which detects apoptotic cell nuclei, in the L5 segment of the spinal cord and the L5 dorsal root ganglion after sciatic nerve transection in the neonatal (P2) rat. In additional experiments were studied the effects on TUNEL labeling of interneurons after treatment of the cut sciatic nerve with either ciliary neurotrophic factor (CNTF), in order to rescue motoneurons, or nerve growth factor (NGF) to rescue dorsal root ganglion cells. The time courses of the TUNEL labeling in motoneurons and interneurons induced by the lesion show large similarities (peak at 8-48h postoperatively), while the labeling in dorsal root ganglion cells occurs later (24-72h). Both CNTF and NGF decrease the number of TUNEL labeled interneurons, but there is a regional difference, in that CNTF preferentially saves interneurons in deep dorsal and ventral parts of the spinal cord, while rescuing effects of NGF are mainly seen in the superficial dorsal horn. The results are interpreted as signs of a trophic dependence on both the target and the afferent input for the survival of interneurons neonatally.

Introduction

During the development of the nervous system, neurons are generated in larger numbers than needed. As a consequence, many neurons die undergoing programmed cell death (PCD) during the period when contact with target cells is established (Oppenheim, 1991; Pettmann and Henderson, 1998). This death is probably, at least in part, a result of a competition among neurons for target-derived neurotrophic factors during this critical period (Hamburger, 1958; Levi-Montalcini, 1987; Oppenheim, 1991). In the rat, the PCD of spinal motoneurons occurs between embryonic days 15 (E15) and 17 (E17) (Harris and McCaig, 1984), while primary afferent neurons in dorsal root ganglia (DRGs) die between E17 and E19 (Coggeshall et al., 1994). Recently, Lawson et al. (1997) showed that rat spinal cord interneurons also undergo PCD, but in this case death occurs around birth (E20 - postnatal day (P)4).

It is well established that a peripheral nerve lesion in neonatal rats leads to an extensive death of axotomized neurons (Romanes, 1946; Schmalbruch, 1987, 1988; Lowrie and Vrbová, 1992). One possible explanation to the fatal response to axon injury in neonatal neurons is that the disconnection between the neuron cell body and the target organ leads to a deficit in the neurotrophic supply. This is supported by the fact that delaying the reinnervation can increase the magnitude of neuronal death after axotomy (Kashihara et al., 1987). Also, the administration of different neurotrophic factors to cut axons can rescue specific types of neurons (Ip & Yancopoulos, 1995; Lewin & Barde, 1996). Thus, treatment with NGF after axotomy counteracts cell death among DRG neurons, while application of BDNF, CNTF and NT-3 separately or in combination rescues axotomized spinal motoneurons (Sendtner et al., 1990; Oppenheim et al., 1991; Oppenheim et al., 1992; Sendtner et al., 1992; Yan et al., 1992; Vejsada et al., 1995). However, it is still unclear why different neuronal populations and even neurons from the same pool respond differently to injury and do not have the same regenerative capacity (Fawcett, 1992).

Cell death can be induced via necrosis or apoptosis. Necrosis is characterized by rapid cell disintegration, cellular swelling, organelle dysfunction and passive cell disassemblance (Walker et al., 1988). These events activate the immune system leading to macrophage invasion and local inflammation. In contrast, apoptosis is an active process, accomplished by a specialized and highly conserved cellular machinery, leading to a series of morphological alterations. Thus, it is characterized by early chromatin condensation followed by internucleosomal DNA cleavage, cell shrinkage, reorganization of the cytoskeleton, organelle relocation and production of apoptotic bodies (Wyllie et al., 1980). Apoptosis requires the activation of certain genes and is carried out by a family of cysteine proteases called caspases. The entire process ends in a silent and quick cell self destruction without detectable inflammation. Members of the Bcl-2 protein family seem to be key regulators of apoptosis by inhibiting or enhancing activation of the caspases (for references, see Adams and Cory, 1998; Ashkenazi and Dixit, 1998;

Thornberry and Lazebnik, 1998). In the nervous system, cell death may involve aspects of both apoptosis and necrosis (Li et al., 1998; Pettmann and Henderson, 1998).

We have shown recently that apoptotic death may underlie the loss of spinal motoneurons, DRG neurons and interneurons in the spinal cord after neonatal sciatic nerve transection (Oliveira et al., 1997). In this situation, the loss of interneurons coincides with the programmed apoptotic death of such neurons, which occurs from birth up to the sixth postnatal day in the rat (Lawson et al., 1997), while programmed cell death of motoneurons and DRG neurons takes place prenatally (Harris and McCaig, 1984; Oppenheim, 1991; Coggeshall et al., 1994). Thus, the damage caused by a neonatal peripheral nerve transection involves not only death of directly injured motoneurons and DRG neurons, but also indirectly a loss of spinal interneurons. The aim of this study was to weigh the roles for motoneurons and DRG neurons, respectively, for the deleterious outcome of the interneurons. This was done by comparing the time courses of the apoptosis, as revealed by use of the TUNEL technique (Gavrieli et al., 1992), among motoneurons, DRG cells and interneurons after neonatal sciatic nerve transection, and by studying the effects of CNTF and NGF which rescue motoneurons and DRG neurons, respectively, on the TUNEL labeling pattern of interneurons.

Materials and Methods

Animals, surgery and tissue preparation

For this study, 42 neonatal Sprague-Dawley rats were used. The animals were collected in two main groups (operated and unoperated) of 21 animals in each group. In the operated group, two days old pups were anesthetized by use of deep hypothermia and the left sciatic nerve was exposed and cut at the sciatic foramen level. After survival times of 4, 8, 12, 24, 48, 72 hours and 7 days, the rats were killed by intraperitoneal administration of an overdose of chloral hydrate (0.6 mg/kg) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffered saline (PBS). In the unoperated groups, the rats were killed at the same age as the pups in the operated groups. The L4, L5 and L6 spinal cord segments and L5 dorsal root ganglia were dissected out and left in the same fixative for 24h, washed in PBS and kept in PBS with 10% sucrose overnight at 4°C. Cryostat transverse sections of the spinal cords (18 mm) and the dorsal root ganglia (12 mm) were obtained and transferred to chrome alum gelatine-coated slides, dried at room temperature for 30 min and stored at -20°C until utilization. The experimental procedures

were approved by the local ethical committee at the Karolinska Institutet (Stockholms Norra Djurförsökssetiska Nämnd, project N57/96).

Staining of apoptotic nuclei (TUNEL labeling)

The sections were post-fixed in ethanol/acetic acid (2:1) for 5 min at -20°C and rinsed twice for 5 min in PBS. The slides were transferred to a humidified chamber and the equilibration buffer solution was applied (Oncor, s7110-1) and incubated for 5 min at room temperature (RT). The equilibration buffer was shaken off and the TdT enzyme solution (Oncor, s7110-2 and 3) was applied for 60 min at 37°C. The reaction was stopped with the stop/wash solution (Oncor, s7110-4) for 30 min at 37°C. After washing in PBS for 10 min, the sections were incubated with the fluorescein solution (Oncor, s7110-5 and 6) for 30 min. The slides were rinsed in PBS and mounted with glass coverslips in 30% glycerol solution.

Analysis of TUNEL positive cells

In each animal, six alternate sections of the L4-L6 spinal cord segments and four sections of the L5 left and right ganglia were stained with the fluorescein-based TUNEL protocol and used for mapping and counting of apoptotic cells. All TUNEL positive nuclei in each studied section of the spinal cord were examined in a Leitz DM RBE microscope at 400x magnification and plotted in a drawing of a representative section with a digital tablet (Wacon ultrapad). For each survival time and treatment, TUNEL-labeled profiles in 18 (spinal cord) or 12 (DRG) sections deriving from 3 separate animals were indicated in a single representative drawing. The mapped profiles were then digitized to an Adobe Illustrator 7.0 software for Macintosh.

The numerical data are presented as means $\pm$ SD. For the statistical analysis, the ANOVA and Newmann-Kuels tests with Primer 1.0 software were used at the 5% level to assess differences between means.

Treatment with neurotrophic factors (CNTF, NGF and CNTF+NGF)

Nine neonatal (P2) Sprague-Dawley rats were subjected to sciatic nerve transection on the left side, as previously described. Immediately after the lesion, a piece of gelfoam soaked with 15 μ l of CNTF (human

recombinant, 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBS) or NGF (Sigma, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; $n=3$) or a mixture of NGF plus CNTF (concentrations as above; $n=3$) was put in direct relation to the proximal nerve stump in three animals. After 24 hours, the animals were killed and subjected to tissue fixation, sectioning and TUNEL labeling as described above. The numerical data were obtained as described above but, in the case of the interneurons, ratios between the ipsi- and contralateral sides were calculated. Statistical significant differences between ratios were assessed using the Mann-Whitney test with Statview 4.0 software at the 5% level.

Results

Location and morphology of TUNEL-labeled cells in the normal rat

In normal animals, a number of TUNEL-labeled nuclei were found in the spinal cords at all studied ages (Figs 1A, H, 2, 4A and 5). As observed in counterstained sections, such nuclei were located in small cells in both the dorsal and ventral horns. The number of TUNEL-labeled cells in unoperated animals did not differ between sides, but at two and a half days after birth, a transient increase in TUNEL labeling among interneurons was observed (Fig. 5). A small number of motoneurons were detected as TUNEL positive (Figs 2 and 4A) and the L5 DRGs showed very few TUNEL-labeled cells (Figs 3A, H and 4B). TUNEL-labeled cells showed the basic characteristics of apoptosis, which were chromatin condensation and fragmentation, cell shrinkage and disintegration.

Time course of TUNEL labeling of neurons after sciatic nerve lesion

At the first time interval after the lesion (4 hours), the number of TUNEL labeled motoneurons was still normal. However, at 8 hours there was a sharp increase in number of labeled motoneurons (Figs 2, 4A). This increase was maintained up to 48 hours and then decreased to normal levels. No increase in TUNEL labeling of motoneurons could be detected on the unoperated side.

The number of TUNEL labeled cells on the lesion side of the spinal cord outside the lateral motor column was about twice the normal at 8 hours after the lesion. This increase was maintained at high levels up to 24 hours after lesion, and then gradually returning to normal at 72 hours postoperatively. As shown in Figure 5, the lesion induced pattern of TUNEL labeling among interneurons in the superficial dorsal horn (approximately laminae I- III) and in medial part of deeper laminae (approximately laminae IV-VI)

showed a large similarity, with a possible quicker return to normal in the superficial laminae. On the contralateral side, there was a 50-100% increase in TUNEL labeling between 8 and 12 hours postoperatively in the superficial dorsal horn, while no such increase was seen in the medial part of deeper laminae.

The sciatic nerve transection induced an extensive TUNEL labeling of ipsilateral DRG cells, which was first detected at 12 hours after lesion (Figs 3, 4B). The labeling frequency peaked at 24 hours and then gradually decreased after 48-72 hours, reaching normal levels after one week. No increased labeling was seen on the unoperated side.

Treatment with neurotrophic factors (NGF, CNTF, NGF+CNTF)

The increase in death rate among spinal interneurons after neonatal sciatic nerve lesion, as suggested here, may depend on a loss of afferent input to the interneurons and/or a loss of target cells, such as axotomized motoneurons. In order to weigh the relative importance of these two possibilities, the proximal stump of the cut nerve was treated with neurotrophic factors with a reported rescuing effect on motoneurons (CNTF) and sensory DRG neurons (NGF). These factors were also used in combination. Twenty-four hours after the neurotrophic factor application, the TUNEL method was used to identify the apoptotic neurons.

In control animals that were treated with PBS, there were no differences in the number of apoptotic motoneurons and sensory neurons compared to untreated animals. Similarly, the number and distribution pattern of TUNEL positive interneurons in the PBS treated animals did not differ to those in the untreated group.

The application of CNTF diminished the number of TUNEL-labeled motoneurons by at least 60% (Fig 6A). This cytokine was less effective in reducing the number of TUNEL-positive sensory neurons, although some rescuing effect cannot be excluded (Fig 6B). With regard to the CNTF effect on interneurons, there was a significant reduction ($p < 0.05$) in the ratio between the numbers of TUNEL-labeled profiles on the lesion and control sides outside the lateral motor nuclei, with the greatest effects seen in the ventral part of the cord (lateral lamina IV-lamina VII) (Fig 7).

NGF treatment profoundly reduced the number of TUNEL-labeled DRG neurons after lesion, but did not have any effects on the labeling of spinal motoneurons (Fig 6B). Also NGF exerted effects on the TUNEL-labeling of interneurons with a statistically significant ($p < 0.05$) decrease in the ratio between the numbers of labeled cells on the lesion versus the control sides in treated animals (Fig 7). In this case, however, there was a tendency towards larger effects in the superficial dorsal horn than in deeper laminae.

The combined application of CNTF and NGF to the proximal nerve stump diminished the number of TUNEL-labeled motoneurons to the same extent as after CNTF alone (Fig 6A). In the DRGs, the number of TUNEL-positive cells were almost normalized after this treatment (Fig 6B). The combination did not seem to affect the labeling of interneurons to any larger extent than what was seen for either CNTF or NGF alone, with the exception for the medial part of deep laminae in the dorsal horn, where the combined treatment almost extinguished the lesion induced labeling (Fig 7).

Discussion

Cell types labeled with the TUNEL technique

One crucial question regarding the interpretation of the TUNEL labeling data regards to what extent it represents labeling of neurons and not supporting cells that could be affected secondarily, as a consequence of the removal of neurons with their axons. As for the DRG, such secondary effects have indeed been described in a recent study in the rat (Whiteside et al., 1998). In this study, neonatal sciatic nerve transection resulted in a significant increase in TUNEL labeling at 1 day post-surgery, which was predominantly due to labeling of neurons, but at 3 days survival there was a further increase in labeling with a strong dominance for glial cells. Our results differ somewhat, in that the peak of TUNEL labeling frequency occurred already at 1 day post-lesion, which may suggest a lower degree of glial labeling in our study. Anyhow, the slower increase of TUNEL labeling in the DRG compared to the spinal cord as demonstrated here should still reflect a true difference in the response of involved neurons. There is also a possibility that some TUNEL-positive cells in the spinal cord following peripheral nerve lesion are in fact secondarily affected glial cells. Still, if such cells make up a large proportion of the labeled profiles, one would expect a labeling in the dorsal column, which contains large numbers of primary afferent axons that are likely to be degenerating after the lesion. Such labeling has not been detected here, which indicates that the large majority of TUNEL-labeled profiles in the spinal cord are indeed neurons.

Time courses of TUNEL labeling

We have reported previously, that after sciatic nerve transection in the neonatal rat, not only motoneurons and DRG cells die, but also interneurons in the spinal cord, that can only indirectly be affected by the peripheral nerve lesion. We have here tried to weigh the relative importance of the afferent

input versus the target for the fate of interneurons in the studied situation. First, we investigated and compared the time courses of the TUNEL labeling of spinal motoneurons, interneurons and DRG sensory neurons. Our results show a very early response in both motoneurons and interneurons with the first TUNEL positive labeling induced by the lesion already at 4 h postoperatively. This increase in TUNEL labeling was most robust at 8-24 h after the lesion among the interneurons and at 8-48 h among motoneurons. In contrast, DRG cells responded later to the axotomy. Thus, such cells displayed the first signs of an increase in TUNEL labeling at 12 h after the lesion with the peak at 24 h, but still at 72 h post-lesion there was a significant increase in TUNEL labeling frequency.

Earlier studies in the neonatal rat have shown that motoneurons start to die off on the third day after peripheral nerve injury with a peak at six days (Lowrie et al., 1994). Our findings suggest a quicker response, but it should be noted that the TUNEL technique used here demonstrates DNA fragmentation in cells that are still existing. Furthermore, in a recent study using the TUNEL technique has been reported a time course for the labeling of motoneurons that is similar to that shown here (Lawson and Lowrie, 1998). Thus, the possibility that some motoneurons die later as a consequence of events that are not associated with apoptosis should be considered. In this context, it is of interest that a recent study in the mouse has demonstrated that the morphological characteristics of motoneuron death following neonatal axotomy, although accompanied with TUNEL labeling, exhibit both similarities and differences with currently accepted definitions of apoptosis (Li et al., 1998).

With regard to the time course of the lesion-induced TUNEL labeling of interneurons, our results differ from another, recent study of the apoptosis in the spinal cord after peripheral nerve lesion in the neonate rat (Lawson and Lowrie, 1998). In this report was detected an increase in TUNEL labeling outside the motor nuclei that started as late as 4 days postoperatively with a peak at 6 days and a return to normal at 8 days, which gives a considerably slower time course than what is found in our study. The reason for the difference is not clear, but one obvious discrepancy in methodology is between the two studies is that in the previous one the sciatic nerve was crushed, while we have transected the nerve. These situations present large differences in the availability of substances confined to the distal nerve segment for the lesioned neurons, which may well have consequences for indirectly affected interneurons. Still, as mentioned above, this difference in methodological approach did not seem to have a major influence on the time course of TUNEL labeling of motoneurons.

The time courses found by us may be interpreted as if the interneurons are more strongly dependent on the target motoneurons than on the afferent input. It should be noticed, however, that cutting the peripheral branch of a primary afferent neuron induces a number of changes in the severed neuron, with a downregulation of a number of substances, such as CGRP, substance P and other neuropeptides (Jessel et al., 1979; Nielsch et al., 1987; Xu et al., 1990; Dumoulin et al., 1991; Kashiba et al., 1992; Håkfelt et al.,

1994) and an upregulation of neurotrophins and their receptors, such as BDNF and trkB (Ernfors et al., 1993). This may in turn mean that any trophic influences through this route may malfunction and provoke interneurons to die before any death among the afferent neurons themselves are detected.

Effects of CNTF and NGF on axotomized neurons

It is well known that by the application of neurotrophic factors to the proximal stump of the transected nerve in the lesion model studied here, it is possible to rescue directly affected motoneurons and DRG neurons. Among such neurotrophic substances, NGF has been reported to save DRG neurons after axotomy (Yip et al., 1984), while no trophic effects by NGF have been found on axotomized motoneurons in the neonatal rat (Yan et al., 1993), which is consistent with the lack of the high affinity NGF receptor, trkA, in these cells. Still, in the neonatal mouse some beneficial effect of NGF on motoneuron survival after axotomy has been reported (Li et al., 1994). With regard to CNTF, it has been repeatedly reported to, at least transiently, prevent death of motoneurons after neonatal axotomy (Sendtner et al., 1991; Oppenheim et al., 1991; Vejsada et al., 1995; Ikeda et al., 1996; Tan et al., 1996; Ulenkate et al., 1996). CNTF has also been claimed to counteract apoptotic death of DRG neurons following neonatal axotomy in the chick and mouse (Lo et al., 1995). In our hands and at the time interval studied (24 h after lesion), NGF had no effect on the TUNEL labeling frequency of motoneurons, while there was a pronounced reduction of TUNEL labeling of DRG neurons. With regard to CNTF, some reduction of TUNEL labeling frequency was indeed seen in the DRG, but the effect on the motoneurons was much more significant. Thus, we have concluded that the use of NGF and CNTF in our lesion model allows us to study in a reasonably selective way the relative contribution of the afferent input and target of the interneurons for their survival.

Contribution of afferent input and target neurons on interneuron survival

After NGF treatment, which thus rescues a large part of the sensory DRG neurons, the number of TUNEL labeled interneurons decreased, particularly so in the superficial laminae of the dorsal horn, i.e. in those parts of the spinal cord which are most densely innervated by primary afferent fibers (Brown, 1991). Also CNTF rescued interneurons, but in this case the predominant effects were seen in deeper parts of the dorsal horn and in the ventral horn, where it can be anticipated that premotor interneurons are located (Burke, 1990; Brown, 1991; Jankowska 1992). The combined effect of CNTF and NGF was most clearly

demonstrated in the medial parts of laminae IV-VI, which is the location for type Ia and Ib interneurons, mediating disynaptic activity from primary afferent fibers to motoneurons (Jankowska, 1992).

Our findings give strong support to the idea that the sources for trophic support of a neuron should not only be restricted to the target of the neuron or to the environment of its axonal pathway, but also include the afferent input to the neuron. This has previously been most clearly demonstrated in studies where peripheral sense organs have been removed. For example, removal of the eye in newborn mice is followed by a massive degeneration of the superior colliculus (DeLong and Sidman, 1962) and lateral geniculate (Heumann and Rabinowicz, 1980). Thus, when studying the mechanisms underlying cell death among neurons as a consequence of normal development or after early lesions, it seems necessary to consider an interaction between the target and the afferent input in the control of the cell death process (see e.g. Linden, 1994). The impact of the afferent input in this sense should be of particular interest when studying neurons with an elaborately developed dendritic system, which allows a large number of inputs to exert their effects.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Swedish Medical Research Council (projects 6815 and 8657), Karolinska Institute, Marcus and Amalia Wallenbergs Stiftelse, Konung Gustaf V:s 80-årsfond, and a scholarship from CAPES (Brazil) to A.L.R.O. (proj. BEX737/96-8).

References

- Adams, J.M. & Cory, Z. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-1326.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-1308.
- Brown, A.G. (1991) Functional organization in groups of neurons. In: *Nerve Cells and Nervous Systems. An Introduction to Neuroscience*. London: Springer-Verlag, pp. 159-175.
- Burke, R.E. (1990) Spinal cord: Ventral horn. In G.M. Shepherd (ed): *The Synaptic Organization of the Brain*. New York: Oxford University Press, pp. 88-132.
- Coggeshall, R.E., Pover, C.M. & Fitzgerald, M. (1994) Dorsal root ganglion cell death and surviving cell numbers in relation to the development of sensory innervation in the rat hindlimb. *Dev. Brain Res.*, 82, 193-212.
- DeLong G.R. & Sidman R.L. (1962) Effects of eye removal at birth on histogenesis of the mouse superior colliculus: An autoradiographic analysis with tritiated thymidine. *J. comp. Neurol.*, 118, 205-219.
- Dumoulin, F.L., Raivich, G., Streit, W.J. & Kreutzberg, G.W. (1991) Differential regulation of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in regenerating rat facial nucleus and dorsal root ganglion. *Eur. J. Neurosci.*, 3, 338-342.
- Ernfors, P., Rosario, C.M., Merlio, J.P., Grant, G., Aldskogius, H. & Persson, H. (1993) Expression of mRNAs for neurotrophin receptors in the dorsal root ganglion and spinal cord during development and following peripheral or central axotomy. *Mol. Brain Res.*, 17, 217-226.
- Fawcett, J. W. (1992) Intrinsic neuronal determinants of regeneration. *TINS*, 15, 5-8.
- Gavrieli Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.*, 119, 493-501.

- Hamburger, V. (1958) Regression versus peripheral control of differentiation on motor hypoplasia. *Am. J. Anat.*, 102, 365-409.
- Harris A.J. & McCaig, C.D. (1984) Motoneuron death and motor unit size during embryonic development of the rat. *J. Neurosci.*, 4, 13-24.
- Heumann D. & Rabinowicz T. (1980) Postnatal development of the dorsal lateral geniculate nucleus in the normal and enucleated albino mouse. *Exp. Brain Res.*, 38, 75-85.
- Höskfelt, T., Zhang, X. & Wiesenfeld-Hallin, Z. (1994) Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *TINS*, 17, 22-30.
- Ikeda, K., Iwasaki, Y., Shiojima, T. & Kinoshita, M. (1996) Neuroprotective effect of various cytokines on developing spinal motoneurons following axotomy. *J. Neurol. Sci.*, 135, 109-113.
- Ip, N.Y. & Yancopoulos, G.D. (1995) Neurotrophic factors and their receptors. *Prog. Brain Res.*, 105, 189-195.
- Jankowska E. (1992) Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors. *Prog. Neurobiol.*, 38, 335-378.
- Jessel, T., Tsunoo, A., Kanazawa, I. & Otsuka, M. (1979) Substance P: depletion in the dorsal horn of the rat spinal cord after section of the peripheral process of primary sensory neurons. *Brain Res.*, 168, 247-259.
- Kashiba, H., Senba, E., Ueda, Y. & Tohyama, M. (1992) Co-localized but target-unrelated expression of vasoactive intestinal polypeptide and galanin in rat dorsal root ganglion neurons after peripheral nerve crush injury. *Brain Res.*, 582, 47-57.
- Kashihara, Y., Kuno, M. & Miyata, Y. (1987) Cell death of axotomized motoneurons in neonatal rats and its prevention by peripheral reinnervation. *J. Physiol.*, 386, 135-148.
- Lawson, S.J., Davis, H.J., Bennett, J.P. & Lowrie, M.B. (1997) Evidence that spinal interneurons undergo programmed cell death postnatally in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 9, 794-799.

- Lawson, S.J. & Lowrie, M.B. (1998) The role of apoptosis and excitotoxicity in the death of spinal motoneurons and interneurons after neonatal nerve injury. *Neuroscience*, 87, 337-348.
- Levi-Montalcini, R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 237, 1154-1162.
- Lewin, G.R. & Barde, Y.-A. (1996) Physiology of the neurotrophins. *Ann. Rev. Neurosci.*, 19, 289-317.
- Li, L., Oppenheim, R.W., Lei, M. & Houenou, L.J. (1994) Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. *J. Neurobiol.*, 25, 759-766.
- Li, L., Houenou L.J., Wu, W., Lei, M., Prevette, D.M. & Oppenheim R.W. (1998) Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice. *J. comp. Neurol.*, 396, 158-168.
- Linden R. (1994) The survival of developing neurons: a review of afferent control. *Neuroscience*. 58:671-682.
- Lo, A.C., Li, L., Oppenheim, R.W., Prevette, D. & Houenou L.J. (1995) Ciliary neurotrophic factor promotes the survival of spinal sensory neurons following axotomy but not during the period of programmed cell death. *Exp. Neurol.*, 134, 49-55.
- Lowrie, M.B. & Vrbová G. (1992) Dependence of postnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. *TINS*, 15, 80-84.
- Lowrie, M.B., Lavalette, D. & Davis, C.E. (1994) Time course of motoneurons death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. *Dev. Neurosci.*, 16, 279-284.
- Nielsen, U., Bisby, M.A. & Keen, P. (1987) Effect of cutting or crushing the rat sciatic nerve on synthesis of substance P by isolated L5 dorsal root ganglia. *Neuropeptides*, 10, 137-145.
- Oliveira, A.L.R., Risling, M., Deckner, M., Lindholm, T., Langone, F. & Cullheim, S. (1997) Neonatal sciatic nerve transection induces TUNEL labeling of neurons in the rat spinal cord and DRG. *Neuroreport*, 8, 2837-2840.

- Oppenheim, R.W. (1991) Cell death during the development of the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.*, 14, 453-501.
- Oppenheim, R.W., Prevet, D., Qin-Wei, Y., Collins, F. & Macdonald, J. (1991) Control of embryonic motoneurons survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science*, 251, 1616-1618.
- Oppenheim, R.W., Qin-Wei, Y., Prevet, D. & Yan, Q. (1992) Brain derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature*, 360, 755-757.
- Pettmann B. & Henderson, C.E. (1998) Neuronal cell death. *Neuron*, 20, 633-647.
- Romanes, G. (1946) Motor localisation and the effects of nerve injury on the ventral horn cells of the spinal cord. *J. Anat.*, 80, 117-131.
- Schmalbruch, H. (1987) Loss of sensory neurons after sciatic nerve section in the rat. *Anat. Rec.*, 219, 323-329.
- Schmalbruch, H. (1988) The effect of peripheral nerve injury on immature motor and sensory neurons and on muscle fibres. Possible relation to the histogenesis of Werdnig-Hoffmann disease. *Rev. Neurol.*, 144, 721-729.
- Sendtner, M., Holtmann, R., 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.
- Sendtner, M., Kreutzberg, G.W., Thoenen, H. (1990) Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature*, 345, 440-441.
- Tan, S.A., Deglon, N., Zurn, A.D., Baetge, E.E., Bamber, B., Kato, A.C. & Aebischer, P. (1996) Rescue of motoneurons from axotomy-induced cell death by polymer encapsulated cells genetically engineered to release CNTF. *Cell Transplant.*, 5, 577-587.
- Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-1316.

- Ulenkate, H.J.L.M., Gispen, W.-H. & Jennekens, F.G.I. (1996) Effects of ciliary neurotrophic factor on retrograde cell reaction after facial nerve crush in young adult rats. *Brain Res.*, 717, 29-37.
- Vejsada, R., Sagot, Y. & Kato, A.C. (1995) Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, 7, 108-115.
- Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobe, G.C. & Kerr, J.F. (1988) Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.*, 13, 18-54.
- Whiteside, G., Doyle, C.A., Hunt, S.P., Munglani, R. (1998) Differential time course of neuronal and glial apoptosis in neonatal rat dorsal root ganglia after sciatic nerve axotomy. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 3400-3408.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. & Currie, A.R. (1980) Celldeath: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251-306.
- Xu, X.-J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Villar, M.J., Fahrenkrug, J. & Hökfelt, T. (1990) On the role of galanin, substance P and other neuropeptides in primary sensory neurons of the rat: studies on spinal reflex excitability and peripheral axotomy. *Eur. J. Neurosci.*, 2, 733-743.
- Yan, Q., Elliott, J.C., Matheson, C., Sun, J., Zhang, L., Mu, X., Rex, K.L. & Snider, W.D. (1993) Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons in vivo. *J. Neurobiol.*, 24, 1555-1577.
- Yan, Q., Elliot, J.L. & Snider, W.D. (1992) Brain derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature*, 360, 753-755.
- Yip, H.K., Rich, K.M., Lampe, P.A. & Johnson, E.M.Jr. (1984) The effects of nerve growth factor and its antiserum on the postnatal development and survival after injury of sensory neurons in rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci.*, 4, 2986-2992.

Legends

Figure 1 Photomicrographs of transverse sections through the L5 spinal cord segment showing TUNEL-labeled interneurons in an unoperated P2 rat (A) and after sciatic nerve transection in P2 rats at 8h (B), 12h (C), 24h (D), 48h (E), 72h (F) and 7 days (G) postoperatively. H shows the same area in an unoperated P9 rat. DF=dorsal funiculus; CL=contralateral; IL=ipsilateral. Bar=200 μ m. (ver figura 8)

Figure 2 Distribution of TUNEL-labeled interneurons (circles) and motoneurons (triangles) after sciatic nerve transection in P2 neonatal rats at survival times of 8, 12, 24, 48 hours and 7 days. All TUNEL-positive neurons found at the lumbar intumescence level (L4-L6) are plotted in a schematic drawing of a representative transverse section. The distribution of TUNEL-labeling displayed by unoperated rats of the same ages as the operated animals is also shown. CL=contralateral; IL=ipsilateral. (ver figuras 10 e 11)

Figure 3 Photomicrographs of transverse sections through the L5 dorsal root ganglia showing the TUNEL-labeled sensory neurons in an unoperated P2 rat (A) and after sciatic nerve transection in P2 rats at 8h (B), 12h (C), 24h (D), 48h (E), 72h (F) and 7 days (G) postoperatively. H shows the same area in an unoperated P9 rat. Bar=50 μ m. (ver figura 9)

Figure 4 A. Graph showing the time course for TUNEL-labeling of motoneurons after neonatal (P2) sciatic nerve transection. The number of motoneurons found on the contralateral side of the spinal cord in operated animals and on the left and right sides of unoperated rats are also shown.
B. Graph showing the time course for TUNEL-labeling of DRG sensory neurons after neonatal sciatic nerve transection. The number of sensory neurons found on the contralateral side of the spinal cord in operated animals and on the left and right sides of unoperated rats are also plotted. Asterisks denote values in operated animals that are significantly ($p < 0.05$) different from normal values. (ver figura 12)

Figure 5 Graphs showing the time courses for TUNEL-labeling of interneurons after neonatal sciatic nerve transection. The number of interneurons found on the contralateral side of the spinal cord in operated animals and on the left and right sides of unoperated rats are also plotted. In A are shown all labeled neurons outside the lateral motor column, while the other graphs show interneurons in the superficial dorsal horn, approximately covering laminae I-III (B), the medial part of the deep dorsal horn, approximately corresponding to medial laminae IV-VI (C) and all other parts of the grey matter outside the lateral motor column (D). Asterisks denote values that are significantly ($p < 0.05$) different from normal values. (ver figura 13)

Figure 6 A. Graph showing the number of TUNEL-positive motoneurons 24 hours after neonatal sciatic nerve transection and treatment with PBS, CNTF, NGF and a mixture of NGF+CNTF.
B. Graph showing the number of TUNEL-positive L5 dorsal root ganglia sensory neurons 24 hours after sciatic nerve transection and treatment with PBS, CNTF, NGF and a mixture of NGF+CNTF. (ver figura 18)

Figure 7 A. Graph showing the effects of PBS, CNTF, NGF and a mixture of CNTF and NGF on the induction of TUNEL-labeling of interneurons after sciatic nerve lesion. The bars represent ratios between the number of interneurons on the ipsi- versus the contralateral sides of the spinal cord.
B-D. Graphs as in (A), but selecting TUNEL-labeled interneurons with a location in the superficial dorsal horn (B), the medial deep part of the dorsal horn (C) and all other parts of the grey matter outside the lateral motor column (D). The respective areas are shown in Fig. 5. (ver figura 19)