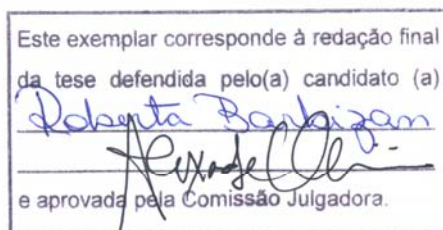




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**ROBERTA BARBIZAN**

**“IMPACTO DA INFLAMAÇÃO AGUDA SOBRE A  
PLASTICIDADE SINÁPTICA DE MOTONEURÔNIOS  
ESPINHAIS APÓS AVULSÃO DAS RAÍZES NERVOSAS”**



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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

**Campinas, 2010**

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

**B234i**

Barbizan, Roberta

Impacto da inflamação aguda sobre a plasticidade sináptica de motoneurônios espinhais após avulsão das raízes nervosas / Roberta Barbizan. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

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

1. Radiculopatia. 2. Encefalomielite auto-imune experimental. 3. Inflamação. 4. Neuroplasticidade. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rc dt/ib)

**Título em inglês:** Impact of acute inflammation on spinal motoneuron synaptic plasticity following ventral root avulsion.

**Palavras-chave em inglês:** Radiculopathy; Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; Inflammation; Neuroplasticity.

**Área de concentração:** Anatomia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Maria Alice da Cruz-Höfling, Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães.

**Data da defesa:** 22/03/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 22 de março de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

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

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling

  
Assinatura

Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Julia Marques

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

\_\_\_\_\_  
Assinatura

“A ciência sem a religião é  
manca, a religião sem a ciência  
é cega”.  
(Albert Einstein)

***Dedicatória:***

*Este trabalho é dedicado aos  
meus pais e ao meu marido por  
sempre acreditarem em mim,  
me apoiando e ajudando  
incondicionalmente,  
principalmente quando eu  
mesmo não acredito.*

## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus por me guiar a cada dia.

Aos meus pais, meu irmão e minha avó (in memorian) por todo amor, apoio, incentivo e confiança;

Ao meu marido, por todo amor, paciência e ajuda;

Aos meus padrinhos tios e primos que sempre me deram suporte;

Ao meu orientador, Prof. Alexandre L. R. de Oliveira pela oportunidade de cursar o mestrado, me aceitando em seu laboratório e ensinando pesquisa. Pelo bom exemplo profissional e pessoal meu muito obrigada;

Á UNICAMP, por permitir acesso ao conhecimento;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia e sua coordenação, em especial à Profa. Dra. Laurecir Gomes;

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, que propiciaram a execução deste trabalho;

Ao CEMIB e todos os animais que perderam a vida por essa pesquisa.

Aos membros da pré-banca: Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling, Profa. Dra. Maria Inês Nogueira e Prof. Dr. Lício Augusto Velloso pelas sugestões feitas na análise prévia deste trabalho;

Aos professores do departamento de Anatomia e Biologia Celular, por todos os ensinamentos;

Aos funcionários do Departamento de Anatomia: Nori e Marquinho pelo auxílio na realização dos experimentos; bioterista/porteira Marlene; porteiro Carlão; técnicos Paulo, Paulo e Tony pelo auxílio constante;

Às técnicas do laboratório de Microscopia Eletrônica: Antônia, Adriane e Loló pela ajuda no microcópio eletrônico;

Á secretária Liliam pela ajuda na parte burocrática;

Á secretária do departamento de Anatomia/Microscopia Eletrônica Ana Floriana por toda ajuda;

Aos amigos do departamento de Anatomia pelo convívio e estudos.

Aos amigos do Laboratório de Regeneração Nervosa Aline, Amauri, Amanda, André, Camila, Camila IC, Juliana, Gabriela, Gabriel, Gustavo, Karina, Luciana, Rafaela, Renata, Rodrigo, Marília, Mateus, Sheila, Suzana por toda ajuda e grande paciência;

Aos amigos de graduação, estudo bíblico e tênis, em especial João, Elaine, Martinha e Karina que sempre fizeram da minha vida em Campinas muito mais alegre.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas .....	9
Lista de Figuras.....	10
Resumo.....	11
Abstract.....	12
1. Introdução.....	13
1.1 Sistema Nervoso e Medula Espinhal.....	13
1.2 Células do Sistema Nervoso .....	14
1.3 Motoneurônios medulares.....	15
1.4 Interação Neurônio-glia .....	17
1.5 Plasticidade sináptica.....	20
1.6 Avulsão e neurodegeneração .....	21
1.7 Esclerose Múltipla (EM) .....	23
1.8 Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) .....	24
1.9 Papel neuroprotetor da inflamação.....	25
2. Justificativa.....	27
3. Objetivos.....	28
3.1 Objetivos Gerais.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. Materiais e Métodos.....	29
4.1 Animais.....	29
4.2 Grupos experimentais.....	29
4.3 Avulsão das raízes motoras.....	30
4.4 Indução da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE).....	30

4.5 Eutanásia dos animais e processamento da medula espinhal para imunoistoquímica.....	31
4.6 Imunoistoquímica .....	32
4.7 Avaliação da Sobrevivência dos Motoneurônios medulares.....	33
4.8 Eutanásia dos animais e processamento da medula espinhal para MET.....	34
4.9 Análise das secções ultra-finas.....	35
4.10 Análise Estatística.....	36
5.Resultados.....	37
5.1 Efeito neuroprotetor da inflamação da EAE sobre os motoneurônios.....	37
5.2 Expressão de Sinaptofisina - análise imunoistoquímica.....	39
5.3 Reatividade glial - análise imunoistoquímica.....	41
5.4 Análise ultraestrutural da medula espinhal.....	44
5.5 Análise ultraestrutural dos tipos de terminais após avulsão.....	46
5.6 Padrão de distribuição dos terminais após avulsão.....	50
6. Discussão.....	52
7. Conclusões.....	56
8. Referências Bibliográficas.....	57
9. ANEXO: Artigo Publicado.....	64



## LISTA DE ABREVIATURAS

APC- Células apresentadoras de antígeno  
ARV- Avulsão das raízes ventrais  
AT- azul de toluidina  
BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro  
BHE- Barreira hemato-encefálica  
BSA- Albumina de soro bovino  
CNS- Sistema Nervoso Central  
EAE- Encefalomielite Autoimune Experimental  
EM- Esclerose Múltipla  
GABA- Ácido gama-aminobutírico  
GDNF- Fator derivado de células gliais  
GFAP- Proteína ácida fibrilar glial  
Iba-1- Proteína adaptadora de ligação de cálcio ionizado  
IH- Imunoistoquímica  
IL- Interleucina  
IFN- Interferon  
MBP- Proteína básica de mielina  
MET- Microscopia eletrônica de transmissão  
MHC- Complexo de histocompatibilidade principal  
MOG- Glicoproteína de mielina de oligodendrócitos  
MS- Esclerose múltipla  
NK- Célula *Natural Killer*  
NO- Óxido nítrico  
PB- Tampão fosfato  
PBS- Salina tamponada  
SI- Sistema Imune  
SN- Sistema Nervoso  
SNP- Sistema Nervoso Periférico  
TGF- Fator de crescimento de transformação  
TLRs- Receptor *toll-like*  
Th1- Células T auxiliaries  
TNF- Fator de necrose tumoral

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema de hemi-medula espinhal.....	14
Figura 2- Fotomicrografia mostrando os tipos de terminais pré-sinápticos .....	16
Figura 3- Esquema da medula espinhal submetida à avulsão de raízes motoras.....	22
Figura 4- Ratos Lewis submetidos à avulsão e EAE.....	31
Figura 5- Eletromicrografias obtidas na região dorso lateral da medula coradas com corante de Nissl, representando a sobrevivência neuronal.....	38
Figura 6- Imunomarcção para sinaptofisina na região do corno ventral da medula.....	40
Figura 7- Imunomarcção para GFAP na região do corno ventral da medula espinhal..	42
Figura 8- Imunomarcção para Iba-1 na região do corno ventral da medula espinhal....	43
Figura 9- Desenho esquemático da medula espinhal e seqüência de micrografias eletrônicas utilizadas para a reconstrução de um motoneurônio alfa medular. ....	44
Figura 10- Ultraestrutura da superfície de motoneurônios alfa medulares.....	45
Figura 11- Análise quantitativa da ultraestrutura das sinapses e do número de terminais sinápticos/100µm.....	47
Figura 12- Análise quantitativa da ultraestrutura das sinapses e do número de terminais sinápticos/100µm de cada terminal.....	48
Figura 13- Distribuição dos espaços entre terminais sinápticos ao longo da membrana do corpo dos motoneurônios.....	51

## RESUMO:

A avulsão das raízes nervosas ventrais (ARV) promove a axotomia dos motoneurônios na interface entre o sistema nervoso central e periférico. Sabe-se que apesar da intensa reação inflamatória, esta lesão, quando realizada durante o curso da encefalomielite autoimune experimental (EAE), resgata um significativo número de motoneurônios. A interpretação para tal evento seria a produção de fatores neurotróficos produzidos pelas células T. O presente trabalho teve por objetivo estudar a sobrevivência neuronal, bem como o processo de eliminação sináptica e a reatividade dos astrócitos e da microglia em relação aos motoneurônios axotomizados através de ARV, durante as fases de surto e remissão da EAE. Ratos Lewis fêmeas (n=30) com 7 semanas de idade foram submetidos à avulsão das raízes ventrais L4-L6. Esses animais foram divididos em 3 grupos: o GRUPO1 – não sofreu indução da doença. Dois grupos foram imunizados com proteína básica de mielina (MBP) associada à *Mycobacterium tuberculosis* (MT) para a indução da EAE, trinta minutos após a lesão nervosa, sendo o GRUPO2 - investigado na fase de surto e o GRUPO3 - na fase de remissão. As intumescências lombares foram dissecadas para a realização de imunoistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão. Adicionalmente, a sobrevivência dos motoneurônios foi avaliada pela contagem dos motoneurônios presentes no núcleo motor dorsolateral da medula lombar na região da lesão corados com Nissl. Os resultados do presente estudo indicam que os animais axotomizados com EAE apresentaram menor reatividade da glia, tanto de astrócitos, quanto da microglia, maior cobertura sináptica e sobrevivência neuronal, em comparação aos animais somente avulsionados. Apesar da visão tradicional de que a resposta imune no SNC possa atuar negativamente na delicada rede neuronal, os presentes resultados apontam para um papel neuroprotetor do processo inflamatório durante o surto EAE.

## **ABSTRACT**

Ventral root avulsion is a proximal lesion of motoneurons in which the motor rootlets are torn out at the surface of the spinal cord resulting in extensive neuronal death. It has been previously shown that, if such lesion is performed during the course of the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a significant number of motoneurons can be rescued in spite of the intense inflammatory reaction. The interpretation for that is that the influx of T cells results in the production of a number of neurotrophic factors. Synaptological changes may be involved in neuronal degeneration and the better understanding of its role may be of importance for developing new strategies leading to neuronal survival. In this sense, the objective of the present work was to evaluate neuronal survival, astroglial reaction and synaptic inputs changes within the motor nucleus after ventral root avulsion during peak disease and after EAE remission. Lewis rats were subjected to unilateral avulsion of lumbar ventral roots (VRA) which were divided into three groups: only VRA, VRA at peak of EAE and VRA during EAE remission. The animals were sacrificed and their lumbar spinal cords processed for immunohistochemistry, transmission electron microscopy (TEM) and motoneuron counting. The results indicated a reduction in glial reaction, increase in the synaptic covering of the motoneurons and neuronal survival in VRA+EAE compared to VRA alone. The present findings indicate that CNS inflammation may influence positively the synaptic plasticity as well as the stability of neuronal networks. This may in turn positively influence the survival of lesioned neurons.

# 1. INTRODUÇÃO

## *1.1 Sistema Nervoso e Medula Espinhal*

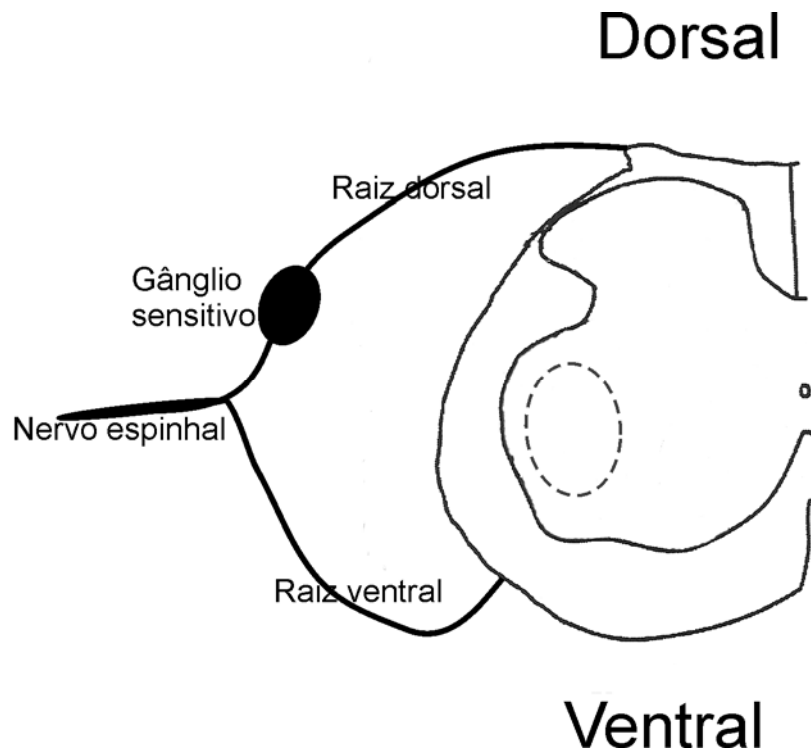
O sistema nervoso (SN) é uma extensa e complicada organização de estruturas pelas quais as reações internas do indivíduo são correlacionadas e integradas e pelo qual são controlados seus ajustamentos ao meio ambiente (Goss, 1977). Possui a função de controlar respostas motoras, interpretar informações sensoriais, mediar funções autonômicas, promover ajustes homeostáticos, além de organizar comportamentos pelo aprendizado e memória (Testut & Latarjet, 1986).

O SN é dividido anatomicamente em Sistema Nervoso Central (SNC) e Periférico (SNP). O SNC localiza-se dentro do esqueleto axial (cavidade craniana e canal vertebral), composto pelo encéfalo e a medula espinhal. O SNP localiza-se fora do esqueleto axial sendo composto por alguns nervos cranianos e espinhais, gânglios periféricos e terminações nervosas. (Machado, 2002).

A medula é uma porção do SNC situada no interior do canal vertebral. Apresenta as intumescências cervical e lombar, de onde partem os nervos espinhais que compõem os plexos braquial e lombossacral, responsáveis pela inervação dos membros superiores e inferiores, respectivamente.

O nervo espinhal é formado da união da raiz dorsal, sensitiva, com a raiz ventral, motora (Fig. 1). Conectado à raiz dorsal encontra-se o gânglio espinhal, onde estão os corpos dos neurônios sensitivos. A raiz ventral é formada por axônios que se originam em neurônios situados nas colunas lateral e anterior da medula. Na coluna anterior da medula encontram-se axônios de neurônios motores responsáveis pela inervação dos músculos esqueléticos, os motoneurônios. Na coluna intermédio lateral estão localizados de T1 a L2

ou de S2 a S4, os corpos dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo, os quais inervam as vísceras torácicas e abdominais.



**Figura 1:** Esquema de hemi-medula espinhal. A imagem representa um corte transversal da medula ao nível lombar, mostrando a formação do nervo espinhal. A área delimitada pelo círculo tracejado representa a região dos motoneurônios em posição dorsolateral, que inervam músculos da região posterior da coxa, perna e pé.

### ***1.2 Células do Sistema Nervoso***

O sistema nervoso é composto por diferentes tipos celulares, dos quais se destacam os neurônios e as células da glia.

Os neurônios são células especializadas na condução do impulso nervoso, sendo constituídos de corpo (soma), dendritos e axônio. Apresentam contatos com terminais ou botões sinápticos de outros neurônios, formando as sinapses. Funcionalmente os neurônios podem ser sensitivos, motores ou interneurônios. Os neurônios motores ou motoneurônios podem ser primários ou secundários, os motoneurônios primários estão localizados na área

motora do córtex cerebral e projetam fibras nervosas que fazem conexões em níveis caudais com os motoneurônios secundários, localizados nos núcleos da base, no tronco encefálico e na coluna ventral da medula espinhal (Kandel *et al.*, 2000).

As células gliais ocupam metade do volume do tecido nervoso, na proporção de dez células para cada neurônio (Lent, 2008) com função de suporte, produção de mielina, fagocitose e manutenção de sinapses neurais que lhe confere posição de destaque nos processos de homeostase neuronal.

As células gliais dividem-se em classes: células endoteliais, microglia e macroglia. As células endoteliais forram as paredes dos ventrículos cerebrais, do aqueduto cerebral e do canal central da medula (Machado, 2002). A microglia possui características morfofuncionais de células fagocíticas do sistema imune (Rouach & Giaume, 2001). Já as células da macroglia são os oligodendrócitos, as células NG2 (i.e. Células precursoras de oligodendrócitos) (Wang e Bordey, 2008), as células de Schwann e os astrócitos (Kandel *et al.*, 2000).

### ***1.3 Motoneurônios medulares***

Os motoneurônios constituem-se em um proeminente grupo de neurônios colinérgicos do SNC (Wendell-Smith *et al.*, 1966). Os corpos celulares dos neurônios motores medulares estão localizados na coluna anterior da substância cinzenta na medula espinhal. Estes motoneurônios são classificados em alfa e gama quanto a sua morfologia e funcionalidade. Os motoneurônios gama são menores e inervam as fibras intrafusais dos fusos musculares, contribuindo para a manutenção do tônus muscular. Os motoneurônios alfa são maiores, apresentam grande corpo celular circular ou ovóide e inervam as fibras musculares extrafusais controlando de fato a contração muscular voluntária (Kandel *et al.*, 2000).

A organização espacial dos diferentes neurônios presentes nos núcleos motores obedece a critérios anatômicos e funcionais. Os motoneurônios que inervam os músculos mais proximais estão localizados medialmente em relação aos que inervam músculos mais distais que por sua vez são laterais. Por outro lado, o critério funcional, divide os núcleos em porção ventral, contendo motoneurônios que inervam os músculos extensores e porção dorsal que contém motoneurônios que inervam os músculos flexores (Kandel *et al.*, 2000). Assim, os motoneurônios alfa, em posição dorso-lateral, que inervam os músculos da região posterior da coxa, perna e pé, foram considerados para análise no presente trabalho (Fig. 1).

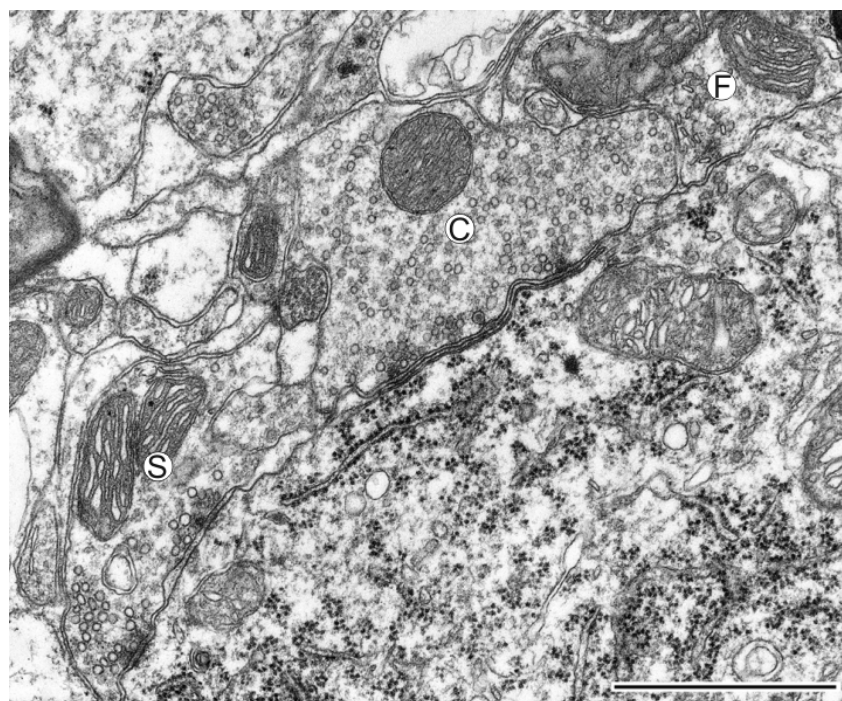


Figura 2: Eletromicrografia do microambiente sináptico mostrando os três tipos de terminais pré-sinápticos (S, F e C) em aposição à membrana de um motoneurônio alfa medular. Escala=2  $\mu$ m Fonte: Sabha, 2008.

No microambiente medular, os motoneurônios apresentam contatos com projeções de células gliais, dendritos e terminais sinápticos, sendo que aproximadamente metade do



soma é recoberto por extensões gliais (Wendell-Smith *et al.*, 1966). O complexo sináptico é a junção especializada entre o terminal pré-sináptico que possui vesículas sinápticas e a membrana pós-sináptica com material eletrondenso. Os terminais sinápticos em contato com o corpo celular dos motoneurônios medulares são classificados em terminais em vários tipos de acordo com a morfologia e tamanho de suas vesículas sinápticas (Conradi, 1969) (Fig. 2).

Os terminais do tipo S (Spherical) contêm vesículas sinápticas esféricas com diâmetro entre 35-50  $\mu\text{m}$  com neurotransmissor glutamato, um aminoácido excitatório. Os terminais do tipo F apresentam vesículas sinápticas achatadas, com predominância do neurotransmissor inibitório glicina (GABA) (Conradi, 1969, Brännström e Kellerth, 1998).

Os terminais sinápticos do tipo C são excitatórios e colinérgicos. Apresentam cisterna localizada sob a membrana pós-sináptica denominada de cisterna subsináptica que mantém continuidade com o retículo endoplasmático granular. A presença do terminal C na célula nervosa é um critério fundamental para classificá-la em motoneurônio alfa (Bodian, 1964; Conradi, 1969 e Gray e Guillery, 1996).

#### ***1.4 Interação Neurônio-glia***

A interação entre os motoneurônios, as células não neuronais e os componentes extra celulares é essencial para a estabilidade sináptica e a homeostase (Boulanger *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004). A glia, que até recentemente era considerada como elemento estrutural passivo na homeostasia do sistema nervoso, exibe uma variedade de funções que lhe confere posição de destaque nos processos de transmissão e plasticidade sináptica (Derouiche *et al.*, 2002 e Araque & Perea, 2004), bem como na interação entre sistema imune e SNC.

A microglia é de origem hematopoética fazendo parte do sistema fagocitário mononuclear. É sensível a alterações em seu microambiente, tornando-se ativada em resposta a lesões ou processos patológicos no SNC (Sanders & De Keyser., 2007), precedendo a reação astrogliar. São células apresentadoras de antígenos e fagocitárias, participando da neuroproteção. Promovem afastamento dos elementos pré e pós-sinápticos em neurônios lesados, que é fundamental para a sobrevivência neuronal (Cullheim & Thams, 2007). Também estimulam a reparação de mielina, a remoção das toxinas do SNC e a prevenção de doenças neurodegenerativas (Glezer *et al.*, 2005 e 2007). A microglia apresenta moléculas co-estimulatórias às células T (Sanders *et al.*, 2007) e receptores toll like (TLRs). Podem, no entanto, demonstrar potencial neurotóxico ao produzirem radicais livres, óxido nítrico (NO), receptores N-metil D-aspartato (NMDA), proteases e quimiocinas. Ainda, em resposta à lesão nervosa, as células da glia expressam MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) que promove redução significativa dos terminais pré-sinápticos após lesão. A expressão do MHC pela microglia, em animais avulsionados, deve-se a um controle poligenético regulado por variações em diferentes loci (Diez *et al.*, 2009).

Os astrócitos apresentam projeções citoplasmáticas que representam 70-80% de sua superfície de membrana. Parte dessas projeções, denominadas processos astrocitários perivasculares, ajudam a constituir a barreira hemato-encefálica, prevenindo que diferentes moléculas e substâncias tóxicas entrem no microambiente do SN (Kandel *et al.*, 2000). Os processos astrocitários são também abundantes ao redor das terminações nervosas (Wolf, 1970). No caso de lesão mecânica, os astrócitos se tornam hipertróficos nas margens do foco dessa lesão e estendem numerosos processos finos (Wu & Schwartz, 1998). Esses têm a capacidade de modular a transmissão sináptica, regulando a excitabilidade neural por

rápida modificação de seu volume (Hansson, 1994; Hansson & Ronnback, 1995) e controlando a difusão de íons e neurotransmissores (Vandenbranden, 1996; Rusakov & Kullmann, 1998; Sykova & Chvatal, 2000; Verkhratsky & Steinhauser, 2000), sendo considerado como “terceiro elemento” das sinapses (Araque *et al.*, 1999).

Os astrócitos regulam o balanço ácido-base por controle do teor de carboxidase que converte o dióxido de carbono e a água em íons de hidrogênio e bicarbonato (Maragakis & Rothstein, 2006). São também responsáveis pela manutenção e homeostase do glutamato na fenda sináptica (Oliet *et al.*, 2001 e Wang & Bordey, 2009), através de transportadores de glutamato (Rothstein *et al.*, 1994; Derouiche & Rauen, 1995) e glutamina sintetase (Derouiche & Frotscher, 2001) prevenindo ou minimizando a ação excitotóxica do glutamato durante a resposta à lesão. Através da síntese e liberação de fatores neurotróficos, podem também restaurar a integridade da barreira hematoencefálica, facilitar a revascularização, a remielinização e a sobrevivência neuronal (Liberto *et al.*, 2004). Os astrócitos têm a capacidade de ativar as células vizinhas e amplificar a resposta imune inata local e, ainda, modular a permeabilidade da barreira hematoencefálica, permitindo resposta imune adaptativa no SNC (Farina *et al.*, 2007). Apresentam também função relacionada à diminuição da intensidade de respostas pró-inflamatórias, pois produzem várias citocinas imunossupressoras, incluindo-se oTGF $\beta$  (Shrikant & Benveniste, 1996), a IL-10 (Ledeboer *et al.*, 2002), o IFN $\alpha$  (Rho, 1995) e o IFN $\beta$  (Benveniste, 1997) que quando secretadas após lesão têm a função de reparar o processo inflamatório.

As células da astro e micro-glia tornam-se reativas diante de lesões no SNC. Essa gliose reativa é caracterizada pela hipertrofia do corpo e processos celulares dos astrócitos e pela hiperplasia de ambos os tipos celulares (Privat *et al.*, 1981; Norton *et al.*, 1992; Eng *et al.*, 2000).

Os astrócitos apresentam importante papel na formação da cicatriz glial após lesão do SNC ou morte celular devido ao aumento da GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Esta proteína é membro da família de proteínas do citoesqueleto, constituindo importante indicador da astrogliose reativa. Outras proteínas também fazem parte do citoesqueleto como a vimentina (Dahl, 1981) e nestina (Cullenhein, 2009), porém, em astrócitos maduros, enquanto a expressão de nestina cessa e de vimentina diminui, a de GFAP é estimulada (Lendahl *et al.*, 1990) pois promove a estabilidade estrutural dos processos astrocitários.

As células da glia também participam ativamente de respostas imunes, atuando como células apresentadoras de antígenos (Hickey & Kimura, 1988) e secundariamente no recrutamento de células T, granulócitos e macrófagos.

### ***1.5 Plasticidade sináptica***

O funcionamento dos circuitos neuronais no SNC depende da estabilização ou eliminação das conexões neurais quando necessário. A ocorrência de um refinamento sináptico, como demonstrado por Huh *et al.*, (2000) depende da atividade neural e sinais provenientes das moléculas do MHC I são de fundamental importância para a remoção de conexões sinápticas exuberantes durante o desenvolvimento.

Uma modificação significativa, após lesão que resulte na interrupção do contato entre motoneurônios e as fibras musculares, é a retração de botões pré-sinápticos presentes na superfície da célula axotomizada (Purves & Lichtman, 1978; Brännström & Kellerth, 1998) com envolvimento de moléculas de adesão, como por exemplo SynCAM1 (Zellano, 2009). A retração de botões pré-sinápticos afetam principalmente os terminais excitatórios, do tipo glutamatérgicos (Lindå *et al.*, 2000). As alterações sinápticas observadas refletem

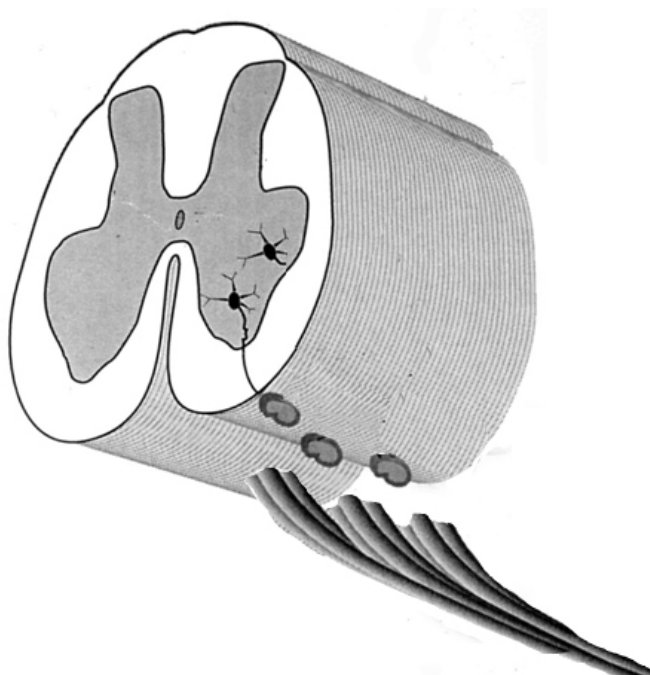
sua reorganização em resposta a uma lesão (como, por exemplo, a avulsão) gerando alterações metabólicas de um estado de transmissão sináptica para um estado de recuperação dos axônios comprometidos pela lesão (Lindå *et al.*, 1992 e 1998; Piehl, 1993 e 1998).

### **1.6 Neurodegeneração e avulsão**

Degeneração nervosa é um processo onde estruturas e funções são progressivamente afetadas, podendo ser perdidas parcial ou totalmente. A neurodegeneração envolve alterações estruturais complexas, modificando a atividade das células nervosas, podendo resultar em eventual morte celular (Przedborski *et al.*, 2003). Lesões axonais no SNC e no SNP resultam em degeneração retrógrada e morte celular. Assim alguns fatores podem influenciar a evolução e severidade desse processo, como a localização dos neurônios axotomizados, a idade do animal e a distância entre o sítio da lesão e o corpo do neurônio. A maioria dos neurônios localizados no SNC degenera após uma axotomia proximal, enquanto neurônios localizados no SNP geralmente sobrevivem e regeneram (Snider *et al.*, 1992). Já lesões próximas do SNC podem resultar na extensiva degeneração de motoneurônios adultos (Kishino, *et al.*, 1997; Novikov, *et al.*, 1995; Oliveira & Langone, 2000). Um modelo experimental para investigar a degeneração neuronal adulta na interface do SNC e do SNP é a avulsão das raízes nervosas.

Na avulsão da raiz ventral as raízes motoras na superfície da medula espinhal são arrancadas na interface entre o sistema nervoso central e periférico, (Fig. 3) (Livesey & Fraher, 1992) causando desconexão entre o corpo neuronal e o alvo muscular sem interferência na integridade do tecido próximo à raiz lesada e seu sistema vascular (Bertold & Carlsted, 1993). Na proximidade da lesão e na sua localização ocorrem alterações

metabólicas e morfológicas denominadas cromatólise e até a perda de aproximadamente 80% das células nervosas lesadas durante as 2 primeiras semanas pós lesão (Koliatsus *et al.*, 1994). As causas mais comuns da avulsão das raízes nervosas são acidentes de moto e tração severa durante partos complicados, resultando em perdas motoras, sensitivas e autônomas da extremidade afetada (Carlstedt, 2009).



**Figura 3:** Esquema da medula espinhal submetida à avulsão de raízes motoras. O lado ipsilateral demonstra a avulsão das raízes ventrais.

Nesse tipo de lesão, quando realizada durante um surto da encefalomielite autoimune experimental (EAE), um número significativamente menor de motoneurônios medulares morrem (Hammarberg, *et al.*, 2000). Foi demonstrada ativação da glia residente e um pico de expressão de citocinas pró-inflamatórias no início da morte dos motoneurônios, sugerindo que a inflamação está relacionada com esse tipo particular de

processo neurodegenerativo. No entanto, poucas células T foram recrutadas nesse evento inflamatório (Piehl *et al.*, 1999).

### **1.7 Esclerose Múltipla (EM)**

A EM é uma doença neurodegenerativa de caráter inflamatório e desmielinizante. Constitui-se em processo autoimune do sistema nervoso central (Achiron & Gurevich, 2006) no qual as células T CD4<sup>+</sup> do subtipo Th1 reagem contra os antígenos próprios da mielina. A reação de hipersensibilidade tardia resulta na ativação de macrófagos ao redor dos nervos cranianos e da medula espinhal, destruição da mielina, anormalidades na condução nervosa e deficiências neurológicas (Abbas & Lichtman, 2000). As citocinas pró-inflamatórias, como o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), são alguns dos principais fatores que promovem o dano mielínico do SNC (Rogez-Kreuz *et al.*, 2005)

A ocorrência dessa doença se dá em adultos jovens entre 20 e 45 anos (Holoshitz *et al.*, 1983), atingindo duas vezes mais mulheres que homens. Afeta predominantemente norte europeus, sendo que 80% dos pacientes apresentam doença do tipo remitente/recorrente e 20% dos pacientes, a forma progressiva, afetando a medula, o nervo óptico, o cérebro, e o cerebelo. O prognóstico é relativamente bom quando a perda da sensibilidade ou alterações do sistema visual dominam o curso da doença. Porém, o prognóstico é menos positivo quando o padrão de afecção motora está envolvido afetando a coordenação ou o balanço (Compston & Coles, 2002).

Por ser uma doença de caráter polimórfico, seu desenvolvimento é muito variável. Identificam-se dois cursos bem distintos da EM: o primeiro é denominado curso

remitente/recorrente, mais comum no adulto jovem, onde os sintomas e sinais neurológicos são transitórios. O segundo é denominado curso progressivo, no qual os sintomas e sinais neurológicos instalados se intensificam, sem que ocorram remissões, sendo o quadro neurológico mais agudo, geralmente com comprometimento motor (sistema piramidal e/ou cerebelar) (Carvalho *et al*, 2003; Holoshitz *et al.*, 1983).

### ***1.8 Encefalomyelitis Autoimmune Experimental (EAE)***

Um modelo experimental para estudo da esclerose múltipla é a encefalomyelitis autoimmune experimental (EAE), que pode ser induzida em camundongos, ratos, porcos e primatas pela imunização com proteínas antigênicas da mielina do sistema nervoso central, como a proteína básica de mielina, a proteína de proteolípídeo e a glicoproteína da mielina do oligodendrócito, com adjuvante contendo *Micobacterium tuberculosis* inativada (Abbas & Lichtman, 2000).

A doença pode se apresentar de forma aguda monofásica ou crônica com surtos e remissões, dependendo do animal utilizado. Os ratos Lewis (que são imunizados com MBP) desenvolvem a forma aguda e monofásica da doença, enquanto os camundongos (imunizados com MOG) desenvolvem preferencialmente a forma crônica. Na EAE observam-se os seguintes sinais clínicos: hipotonia distal da cauda evoluindo rapidamente para uma paraplegia completa com hipoestesia das patas dianteiras e incontinência urinária. Após um platô de 2 a 3 dias, os sinais clínicos desaparecem espontânea e progressivamente. O quadro clínico completo evolui em 20 dias. Na transferência passiva de linfócitos auto-reativos, o quadro clínico evolui em uma semana (Lider *et al.*, 1989). A EAE, induzida em ratos, reproduz clinicamente um episódio de exacerbação da EM e uma melhora



relativamente rápida sendo evidenciada no 3° ao 5° dia do período de remissão (Zhu *et al.*, 2003).

A EAE leva a uma resposta autoimune de linfócitos T contra a mielina. Como resultado da imunização, ocorre desmielinização e os episódios de paralisia são associados com infiltração de células Th1 CD4<sup>+</sup> no SNC (Butterfield, *et al.*, 1999 e Huseby *et al.*, 2001). Além das células T, células B, astrócitos e microglia também estão envolvidas na inflamação (Bruck, 2005). A microglia ativada secreta fatores citotóxicos como a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral (TNF), que induzem a degeneração neural (Srinivasan *et al.*, 2004) contribuindo diretamente para o déficit funcional observado durante as crises da doença. Entretanto, as células T e NK promovem alto nível de fatores neurotróficos durante a EAE em lesões do SN (Hammarberg, 2000).

### ***1.9 Papel neuroprotetor da inflamação***

Por décadas o cérebro foi considerado um órgão imunoprivilegiado. No entanto, hoje sabe-se que SNC não está isolado como também responde ativamente ao sistema imune (Carson *et al.*, 2006). Estudos bioquímicos do sistema nervoso em diversas circunstâncias patológicas e fisiológicas revelaram que a inflamação no SNC constitui um mecanismo de defesa contra lesões (Carson *et al.*, 2006 e Tilleux & Hermans., 2007).

Após transsecção do nervo facial em ratos combinada com imunodeficiência grave ocorre exacerbação da perda de motoneurônios faciais. Isso nos sugere que células imune, associadas com imunidade adquirida, desempenhe papel na regulação da sobrevivência do motoneurônio após lesão (Serpe, *et al.*, 1999, 2000 e 2002). Posteriormente, foi demonstrado que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> promoveram a neuroproteção desses motoneurônios

lesados (Serpe, *et al.*, 2003) através da microglia residente e das células apresentadoras de antígenos da medula óssea (Byram *et al.*, 2009) e que tanto as células T CD4<sup>+</sup> pró-inflamatórias e ant-inflamatórias desenvolvem essa neuroproteção (Xin *et al.*, 2008).

É interessante notar que as citocinas produzidas pelas células imunes não atravessam a barreira hematoencefálica (Furlan *et al.*, 2003), as células T precisam cruzar essa barreira e instalarem-se no parênquima do SNC (Engelhardt & Ransohoff, 2005). Para as células T atravessarem a barreira hematoencefálica é necessário que elas estejam ativadas e essa ativação ocorre após algumas lesões nervosas (Olsson *et al.*, 1992; Raivich *et al.*, 1998; Ha *et al.*, 2006), no entanto, a inflamação que ocorre na avulsão das raízes ventrais somente ativa astro e microglia, ocorrendo ausência ou muito pouca ativação de linfócitos (Hammarberg, *et al.*, 2000).

Células T, decorrentes da EAE, foram capazes de proteger neurônios da degeneração após avulsão no SNC, aumentando significativamente sua sobrevivência (Hammarberg, *et al.*, 2000). Isso pode decorrer do fato de as células imunes serem capazes de produzir fatores de crescimento neuronal como BDNF e GDNF (Ehrhard *et al.*, 1993; Santambrogio *et al.*, 1994; Hammarberg, *et al.*, 2000) e suprimindo fatores neurotóxicos como TNF- $\alpha$  e NOX2 (isoforma da NADPH oxidase) (Beers *et al.*, 2008).

Apesar da expressão de citocinas e fatores neurotróficos estarem envolvidos, é também possível que eventos de plasticidade sináptica possam ser influenciados pelo curso da doença na presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e “naive” no tecido nervoso. Alterações nas sinapses podem também estar envolvidas na degeneração neuronal e seu melhor entendimento pode ser uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novas estratégias visando a melhor sobrevivência neuronal após lesões proximais.

## **2. JUSTIFICATIVA:**

Associada à perda axonal e provavelmente à presença de infiltrado no tecido nervoso, acredita-se que a ocorrência de plasticidade sináptica, incluindo-se a retração de terminais nervosos, seja um evento relevante para os sintomas evidenciados durante os surtos da EAE. Paradoxalmente, o microambiente medular sujeito a esse quadro inflamatório mostrou-se capaz de resgatar neurônios medulares após lesões proximais, na superfície da medula. Tais lesões ocorrem normalmente em acidentes de moto e quedas onde o pescoço é vigorosamente afastado do ombro, resultando arrancamento de raízes nervosas do plexo braquial. Atualmente, o único tratamento possível é o reimplante cirúrgico de tais raízes, sem se conhecer propriamente os eventos relacionados à sobrevivência e regeneração dos motoneurônios axotomizados.

Levando-se em conta a expressão de citocinas e de fatores neurotróficos durante a exacerbação da EAE, é possível que eventos da plasticidade sináptica após avulsão possam ser influenciados pelo curso da doença, associados à presença de linfócitos T autoagressivos no sistema nervoso. Alterações sinápticas podem também estar envolvidas na degeneração neuronal após lesões das raízes nervosas nos limites entre o SNC e SNP. Assim, o melhor conhecimento do papel da inflamação aguda e crônica pode ser uma importante ferramenta no desenvolvimento de novas estratégias visando à otimização da sobrevivência neuronal após axotomia proximal, podendo reverter em futuras terapias visando à recuperação do tecido nervoso lesado.

### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

O objetivo desse estudo foi analisar a sobrevivência neuronal e a dinâmica das sinapses em aposição ao corpo celular e dendritos proximais de motoneurônios alfa medulares, após a avulsão de raízes ventrais sincronizada com o surto e a remissão da EAE .

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

- Analisar a sobrevivência neuronal após avulsão de raízes motoras, relacionando-a com a inflamação.
- Verificar a astrogliose reativa nas adjacências dos motoneurônios através da expressão de GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein);
- Analisar a reatividade microglial através da imunomarcção anti-IBA-1;
- Analisar a densidade sináptica nos motoneurônios pela imunorreatividade para sinaptofisina;
- Realizar estudo ultraestrutural quantitativo da organização das sinapses relacionadas ao corpo celular e dendritos proximais de motoneurônios alfa medulares.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS:

##### 4.1 Animais:

Foram utilizadas para a presente pesquisa, fêmeas adultas de ratos Lewis com sete semanas de idade e peso corporal de aproximadamente 250g, provenientes do CEMIB/UNICAMP e mantidas em biotério apropriado sob ciclo de 12 horas claro/escuro e recebendo ração e água *ad libitum*. Os experimentos foram desenvolvidos seguindo-se as Normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovados pelo CEUA - Unicamp (proc. nº 1494-1).

##### 4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 3 grupos. Em cada grupo a intumescência lombar dos animais foram submetidas à análise por imunoistoquímica e à análise por microscopia eletrônica de transmissão conforme a tabela que se segue:

<b>Grupo</b>	<b>Imunoistoquímica (n)</b>	<b>MET (n)</b>
Avulsão	5	4
Avulsão e EAE no surto	5	4
Avulsão e EAE na remissão	5	4

No grupo avulsão, os animais foram sacrificados após duas semanas da cirurgia. No grupo avulsão e EAE no surto os animais foram sacrificados no grau 3 da doença enquanto

que o grupo avulsão na remissão da EAE os animais foram analisados duas semanas após o surto da doença, já sem os sinais clínicos. Na imunomarcação foi analisada a razão ipsi e contra-lateral entre os grupos. Já na microscopia eletrônica, o lado contralateral do grupo avulsão controle e os lados ipisilateral de todos os grupos foram analisados.

#### **4.3 Avulsão das raízes motoras:**

Os animais dos três grupos experimentais foram anestesiados (60mg/Kg de quetamina e 10mg/Kg de xilasina) e tricotomizados na região média do dorso. Uma incisão dorsal paralela à coluna vertebral foi realizada na região torácica. A musculatura eretora da coluna vertebral foi removida para exposição das últimas vértebras torácicas. Foi feita a laminectomia de aproximadamente três vértebras para que a intumescência lombar fosse exposta. A dura-máter foi aberta por incisão longitudinal e, após dissecção do ligamento denticulado, a medula espinhal foi cuidadosamente movimentada até que as raízes ventrais associadas à intumescência lombar fossem identificadas e avulsionadas. A avulsão foi realizada nas raízes lombares ventrais dos segmentos espinhais L4, L5 e L6 do lado direito, com o auxílio de pinça tipo relojoeiro (№4). Após os procedimentos cirúrgicos, a medula espinhal foi recolocada na posição original e a musculatura, a fáscia e a pele foram suturadas em camadas e os animais mantidos em biotério até a eutanásia (Fig. 4A).

#### **4.4 Indução da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)**

Trinta minutos após a cirurgia de avulsão das raízes motoras, os grupos 2 e 3 foram imunizados com uma injeção de 100µl de proteína básica de mielina (MBP) associada a *Mycobacterium tuberculosis* (MT), empregando-se o adjuvante completo de Freund. Essa solução foi injetada na planta das patas traseiras dos animais. Diariamente realizou-se a

análise e classificação dos sinais e sintomas clínicos, com o propósito de identificar o período de surto (que ocorre entre 9 à 14 dias após a indução). Os primeiros sinais da doença são evidenciados com a flacidez da cauda do animal (que ocorre normalmente no 9º dia após a indução – grau 1), depois ocorre a paralisia parcial dos membros posteriores (aproximadamente 11º dia após a indução – grau 2), paralisia total dos membros posteriores (aproximadamente 13º dia após a indução – grau 3) e paralisia total dos membros anteriores e posteriores (aproximadamente 14º dia após a indução – grau 4). Após a exacerbação da doença, o animal se recupera e não apresenta nenhum sinal clínico da doença, entrando na fase de remissão.

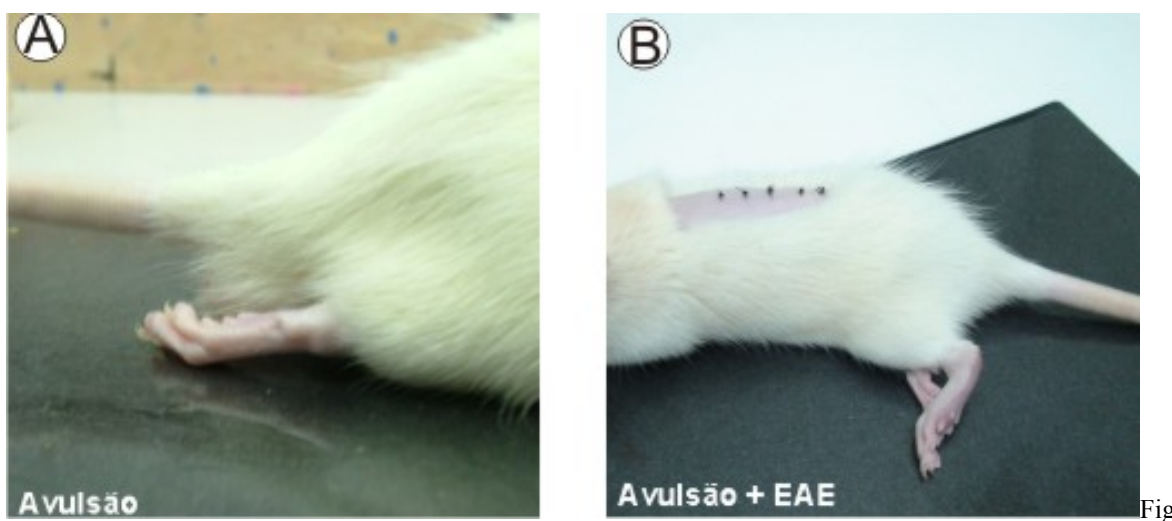


Figura 4. Ratos Lewis submetidos à avulsão e EAE. A- Animal submetido à avulsão B- Paralisia completa dos membros posteriores e flacidez na cauda devido à EAE juntamente com avulsão.

#### **4.5 Eutanásia dos animais e processamento da medula espinhal para imunoistoquímica:**

Após os períodos de sobrevivência pré-determinados, os animais foram sacrificados. Cinco animais de cada grupo foram anestesiados com uma combinação de Kensol (Xylasin 10mg/Kg, Koning, Argentina) e Vetaset (Ketamin, 50mg/Kg, Fort Dodge, USA) e em

seguida submetidos à toracotomia. Visando a lavagem total dos vasos e órgãos, o sistema vascular foi perfundido transcárdicamente com tampão fosfato de Sódio (pH 7,38) utilizando bomba perfusora do tipo peristáltica. Os animais foram fixados por perfusão vascular com formalina 10% em tampão fosfato de sódio pH 7,38. A intumescência lombar foi dissecada e pós-fixada por 12 horas à 4°C. Em seguida, foram incluídas em Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e congeladas à -35 a -40°C. Secções (12 µm de espessura) transversais da medula espinhal foram obtidas em criostato e posteriormente transferidas para lâminas gelatinizadas, que foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos e posteriormente armazenadas a -20°C até o momento da utilização.

#### **4.6 Imunoistoquímica**

Para a realização da imunoistoquímica, as lâminas climatizadas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS 5% Triton. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com solução PBS 5% Triton a 3% BSA por 60 minutos. Após este período as lâminas foram incubadas em câmara úmida com anticorpo primário e TBS 5% Triton a 1% BSA por 18 horas à 4°C. Após enxágue, o anticorpo secundário foi aplicado e incubado por 45 minutos de acordo com a afinidade do anticorpo primário (CY-2 e CY-3, Jackson Immunoresearch; 1:250). Os cortes foram lavados 3 vezes por 5 minutos em PBS 5% Triton e, em sequência à primeira incubação, as lâminas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados com cianina 2 (CY-2) ou 3 (CY-3) (1:250, Jackson Lab., USA) por 60 minutos, lavados em PBS 5% Triton, montados em mistura de glicerol/PBS 0,01M (3:1). Os espécimes foram observados em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TS100) utilizando-se os filtros para fluoresceína (CY-2) e



rodamina (CY-3). As imagens da imunomarcação foram digitalizadas a partir de uma câmera digital (DXM1200F, Nikon).

As análises imunoistoquímica foram feitas com os objetivos de:

- Detectar e quantificar a cobertura sináptica dos motoneurônios alfa medulares: foi utilizado o anticorpo primário anti-sinaptofisina (Dako, 1:100), sendo essa proteína encontrada em todos os terminais sinápticos ativos.
- Detectar e quantificar a astrogliose reativa: foi utilizado o anticorpo primário anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Santa Cruz, 1:100), sendo que essa proteína tem sua expressão aumentada após inúmeros tipos de lesão do SN.
- Detectar e quantificar microglia reativa: foi utilizado o anticorpo primário Iba-1 (Wako, 1:1200), sendo que o Iba-1 também apresenta expressão aumentada após inúmeros tipos de lesão do SN.

#### **4.7 Avaliação da Sobrevivência dos Motoneurônios Medulares:**

Para contagem de motoneurônios, secções transversais da intumescência lombar foram coradas com corante de Nissl por 3 minutos, desidratadas, diafanizadas e, em seguida, montadas com bálsamo e lamínula. Assim, motoneurônios presentes no núcleo motor lateral do corno anterior no lado ipsilateral (lesado) e contralateral (não lesado) foram contados em cortes alternados de cada espécime em aproximadamente 20 secções, na área lesada da intumescência lombar, sendo o intervalo entre eles de 48µm. Apenas as células com núcleo e nucléolo visíveis foram contadas. Para corrigir contagens duplas de neurônios, devido ao fato da mesma célula poder estar presente em duas secções, foi utilizada a fórmula de Abercrombie (Abercrombie & Johnson, 1946):

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

Onde  $N$  é o número corrigido de neurônios contados,  $n$  é o número de células contadas,  $t$  é a espessura das secções ( $48\mu\text{m}$ ) e  $d$  é o diâmetro médio do neurônio. Como a diferença no tamanho significativamente afeta o número de células, o valor de  $d$  foi calculado especificamente para cada grupo experimental (ipsilateral e contralateral). Neste sentido, o diâmetro de 15 motoneurônios para cada grupo foi mensurado (Image Tool software, versão 3.00) e a média calculada.

#### **4.8 Eutanásia dos animais e processamento da medula espinhal para MET:**

Os animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia após os períodos de sobrevivência pré-determinados com uma combinação de Kensol (Xylasin 10mg/Kg, Koning, Argentina) e Vetaset (Ketamin, 50mg/Kg, Fort Dodge, USA) e em seguida submetidos à toracotomia. O sistema vascular foi perfundido transcárdicamente utilizando uma bomba perfusora do tipo peristáltica. Visando a lavagem total dos vasos e órgãos, os animais foram perfundidos com tampão fosfato de Sódio (pH 7,38). Os animais foram fixados por subsequente perfusão vascular com solução fixadora de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 1% em tampão fosfato de sódio pH 7,38.

Seguindo a perfusão, a intumescência lombar foi dissecada e pós-fixada por 12 horas imersa na solução fixadora à 4°C. Estas medulas foram lavadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,38 e seccionadas longitudinalmente, através da fissura mediana anterior. Os fragmentos correspondentes ao lado ipsilateral e contralateral foram colocados individualmente em frascos contendo tampão fosfato de sódio, e então pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1% diluído em tampão fosfato de sódio 2M, pH 7,38 por 3 horas. Seguindo-se a pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e

desidratados em série crescente de álcool e acetona, sendo incluídos em resina (Durcupan ACM, Fluka).

Os blocos foram desbastados e secções semifinas (0,5  $\mu\text{m}$ ) de medula foram obtidas e analisadas após coloração com azul de toluidina 0,25%, a fim de encontrar os neurônios do grupo motor lateral da coluna ventral da medula ao microscópio óptico. Localizados estes neurônios, os blocos foram retrimados para o isolamento da região contendo os motoneurônios a serem analisados. Em seguida, secções ultra-finas com 50nm de espessura (500Å; ultramicrotomo Leica Ultracut- UCT) foram realizadas, coletadas em grids de cobre (“single slot grids”) revestidos com formvar, contrastadas com acetato de uranila 4% durante 30 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos, e analisadas ao microscópio eletrônico Leo 906, operando a 60KV.

#### **4.9 Análise das secções ultra-finas:**

Neurônios com grandes corpos celulares (>35  $\mu\text{m}$  de diâmetro) encontrados no grupo motor lateral da coluna ventral da medula espinhal e seccionados ao nível do plano nuclear foram identificados como motoneurônios alfa medulares pela presença de pelo menos um terminal do tipo C (Conradi, 1999). Os neurônios foram identificados como lesados baseando-se na ocorrência de modificações cromatolíticas no corpo celular e a superfície das células foi então digitalizada sequencialmente em aumento de 16.400X empregando-se uma vídeo câmera (Morada) conectada a um sistema computadorizado (Zeiss). As imagens foram montadas sequencialmente em programa vetorial (Fig. 8 B) e o perímetro total dos neurônios foi medido pelo uso do programa Image tool (versão 3.0; The University of Texas Health Center in Santo Antonio).

Os terminais sinápticos em contato com o corpo celular dos motoneurônios bem como dos dentritos proximais foram identificados em: F- com vesículas achatadas, S- com vesículas esféricas e C- com cisterna sub-sináptica, de acordo com a nomenclatura de Conradi (1969). Após a identificação, os terminais foram medidos com o uso do programa Image tool, quantificados por 100  $\mu\text{m}$  de membrana e pela porcentagem de cobertura sináptica (medindo-se a extensão dos terminais em contato com o motoneurônio). Também foi quantificada a distância entre os terminais nervosos que cobrem os motoneurônios

#### **4.10 Análise Estatística:**

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Os resultados foram analisados através de teste t de Student para dados paramétricos e teste Mann-Whitney para dados não paramétricos com nível de significância  $p<0.05$  (\*),  $p<0.01$  (\*\*) e  $p<0.001$  (\*\*\*)

## 5. RESULTADOS :

### 5.1 Efeito neuroprotetor da inflamação da EAE sobre os motoneurônios

O efeito da inflamação foi analisado determinando-se a porcentagem de sobrevivência neuronal, sendo esta taxa a razão percentual entre o número de motoneurônios ipsilateral e contralateral à lesão, utilizando-se a fórmula de Abercrombie & Johnson (1946) (Tabela 1). Na Figura 5 é possível observar qualitativamente de A-D os motoneurônios do grupo dorsolateral da medula, em animais com avulsão. Em E está representada quantitativamente a razão dos lados ipsi e contralateral de animais avulsionados sem EAE, com EAE durante o surto da doença e com EAE durante a remissão. Foi possível observar efeito neuroprotetor nos animais axotomizados submetidos à EAE, refletindo uma significativamente menor perda neuronal em relação ao grupo somente avulsionado, apesar de existir degeneração neuronal decorrente da lesão. Calculou-se então a razão percentual, obtendo-se os seguintes resultados: avulsão 34,12%  $\pm$  6,58; avulsão + EAE-surto 81,87%  $\pm$  8,03; avulsão + EAE-rem 77,37%  $\pm$  13,72. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão. Nota-se também aumento do infiltrado inflamatório com células T no grupo com EAE.

**Tabela 1:** Contagem neuronal após avulsão e indução da EAE.

	Avulsão		Surto		Remissão	
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
Número de neurônios	1.74 $\pm$ 0.55	4.88 $\pm$ 0.98	4.64 $\pm$ 1.01	5.32 $\pm$ 0.65	3.64 $\pm$ 1.26	5.22 $\pm$ 1.03
Fórmula de Abercrombie	0.90 $\pm$ 0.26	2.41 $\pm$ 0.44	2.39 $\pm$ 0.46	2.90 $\pm$ 0.31	2.14 $\pm$ 0.66	2.72 $\pm$ 0.48

A primeira linha representa a média absoluta do número de neurônios por secção nos lados ipsilateral e contralateral da medula dos grupos somente avulsionados, avulsionados com EAE no surto e na remissão . A segunda linha representa os valores de sobrevivência neuronal após a aplicação da fórmula de Abercrombie.

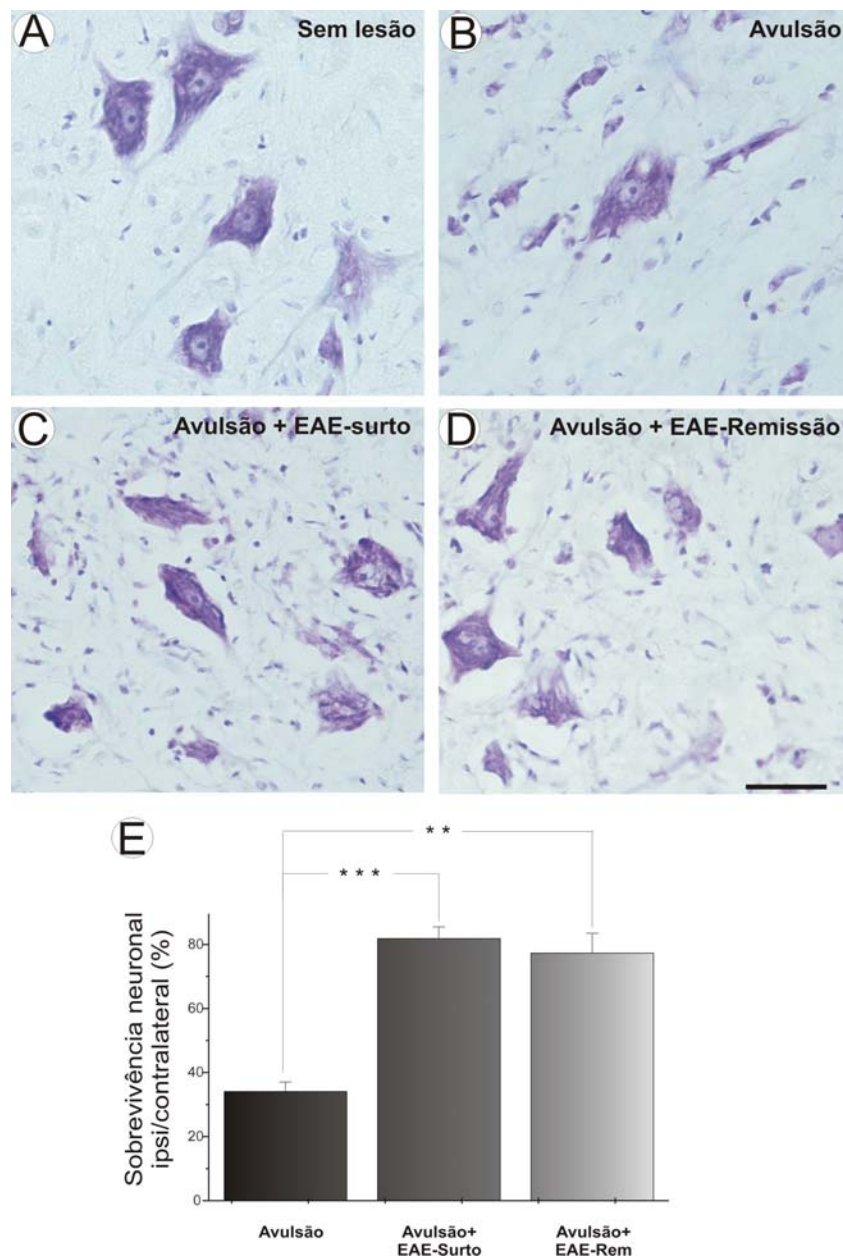


Figura 5: Fotomicrografias obtidas na região dorsolateral da medula coradas com corante de Nissl, representando a sobrevivência neuronal. (A)-lado contralateral do animal avulsão controle, (B)- Lado ipsilateral do grupo com avulsão controle, (C)- Lado ipsilateral do animal com avulsão no surto da EAE, (D) Lado ipsilateral do grupo com avulsão na remissão da EAE. (E) Gráfico da razão percentual ipsi e contralateral da sobrevivência dos motoneurônios medulares após avulsão. Nota-se uma maior sobrevivência neuronal após avulsão das raízes nervosas em animais com EAE (\*\*=  $p < 0.01$ ; \*\*\*=  $p < 0.001$ ). Média  $\pm$  erro padrão;  $n=5$ . Barra =  $50\mu\text{m}$ .

## ***5.2 Expressão de Sinaptofisina - análise imunoistoquímica***

A imunomarcção revelou maior intensidade na atividade sináptica no lado contralateral dos animais avulsionados em relação ao ipsilateral. Destaca-se a marcação adjacente à superfície celular dos grandes motoneurônios que compõem o núcleo motor. Observou-se intensa reatividade nessa área, a qual é atribuída ao grande número de inputs aos motoneurônios não lesados (contralaterais) em relação aos lesados (Fig 6 A). Adicionalmente, a intensidade da expressão da sinaptofisina foi drasticamente reduzida na superfície dos motoneurônios dos animais avulsão controle (Fig 6 B). Apesar da axotomia, nos animais lesados e submetidos à EAE no surto (Fig. 6 C), a imunomarcção foi maior que o grupo somente avulsionado. Nos animais lesados com EAE na remissão (Fig. 6 D), a imunomarcção também foi maior que o grupo avulsão controle, porém sem relevância estatística. Pode-se observar na figura 6-E, diferença estatística da razão ipsi e contra-lateral da imunomarcção entre os grupos (avulsão,  $0,29 \pm 0,02$  média da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcção  $\pm$  erro padrão; avulsão + EAE-surto,  $0,51 \pm 0,11$ ; avulsão + EAE-REM,  $0,34 \pm 0,06$ ;  $n=5$ ;  $p<0,05$ ).

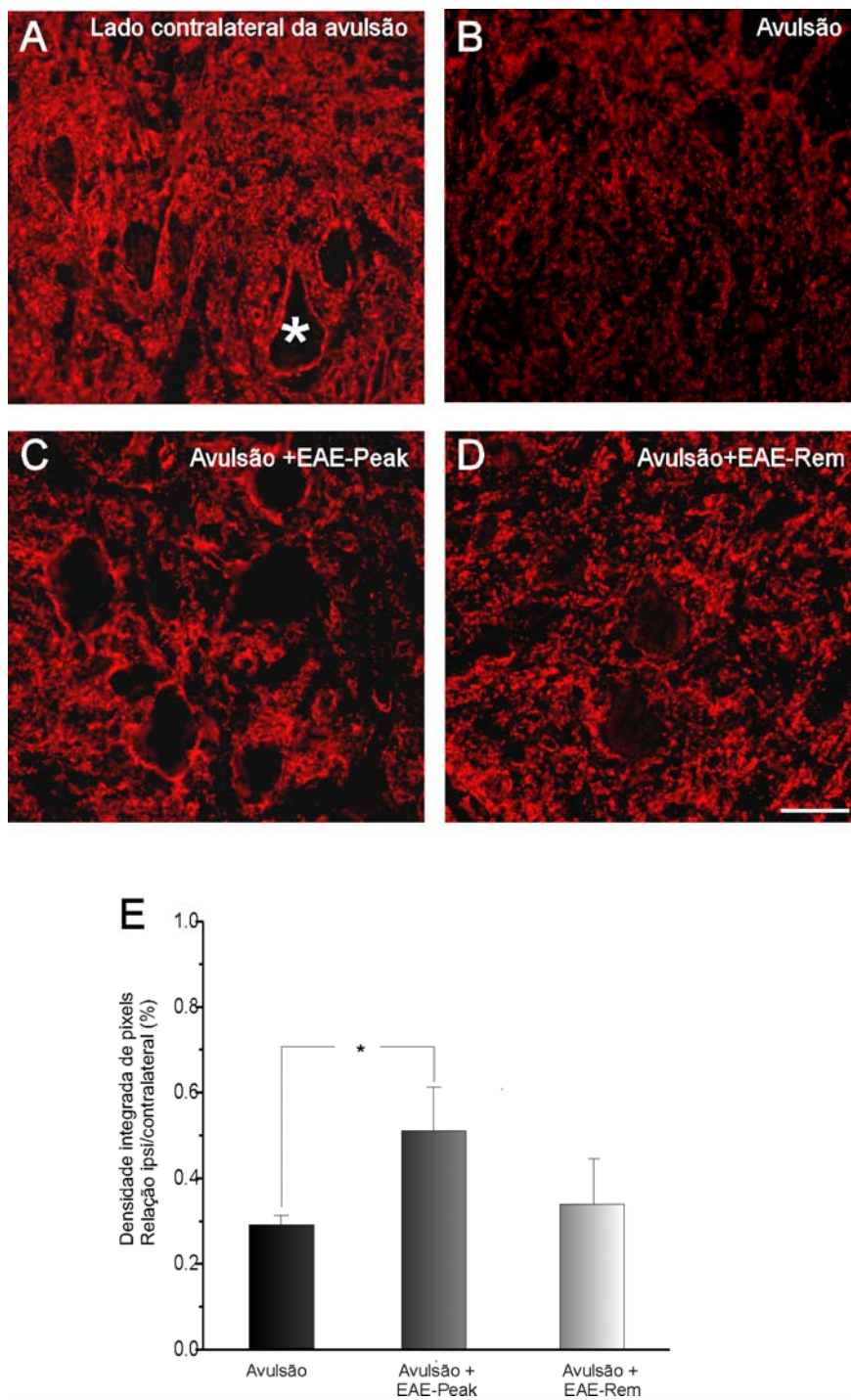


Figura 6. Imunomarcacão para sinaptofisina na região do corno ventral da medula espinhal, A) lado contralateral do animal com avulsão (controle), nota-se uma menor intensidade no lado ipsilateral dos animais avulsionados, porém na EAE a atividade sináptica   maior (C) e (D) que somente na avulsão (B). O gráfico indica a diferença da média da intensidade integrada de pixels dos lados ipsi e contralateral nos 3 grupos (Figura 3-E) ( asterisco representa um motoneurônio). (\*=  $p < 0.05$ ). M dia erro padrão;  $n=5$ . Barra =  $50\mu\text{m}$ .



### **5.3 Reatividade glial - análise imunoistoquímica**

Para avaliação da reatividade glial, foram utilizados anticorpos anti-GFAP e anti-Iba-1. A imunomarcacão revelou reatividade basal para o lado contralateral (Figs. 7 e 8 A). Houve aumento significativo na atividade dos astrócitos e microglia após a avulsão, porém os animais avulsionados com EAE no surto bem como na remissão apresentam atividade astrogliar menos intensa quando comparado ao grupo somente avulsionado (Fig. 7 e 8 B, C e D). A figura 7-E indica diferença estatística da razão ipsi e contra-lateral da astroglia entre os grupos (avulsão,  $1,56 \pm 0,06$  média da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão  $\pm$  erro padrão; avulsão + EAE-surto,  $0,98 \pm 0,10$ ; avulsão + EAE-REM,  $1,00 \pm 0,11$ ;  $n=5$ ;  $p<0,05$ ). A figura 8-E indica diferença estatística da razão ipsi e contra-lateral da reatividade microglial entre os diferentes grupos (avulsão,  $5,54 \pm 0,96$  média da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão  $\pm$  erro padrão; avulsão + EAE-surto,  $2,53 \pm 0,19$ ; avulsão + EAE-REM,  $2,41 \pm 0,25$ ;  $n=5$ ;  $p<0,05$ ).

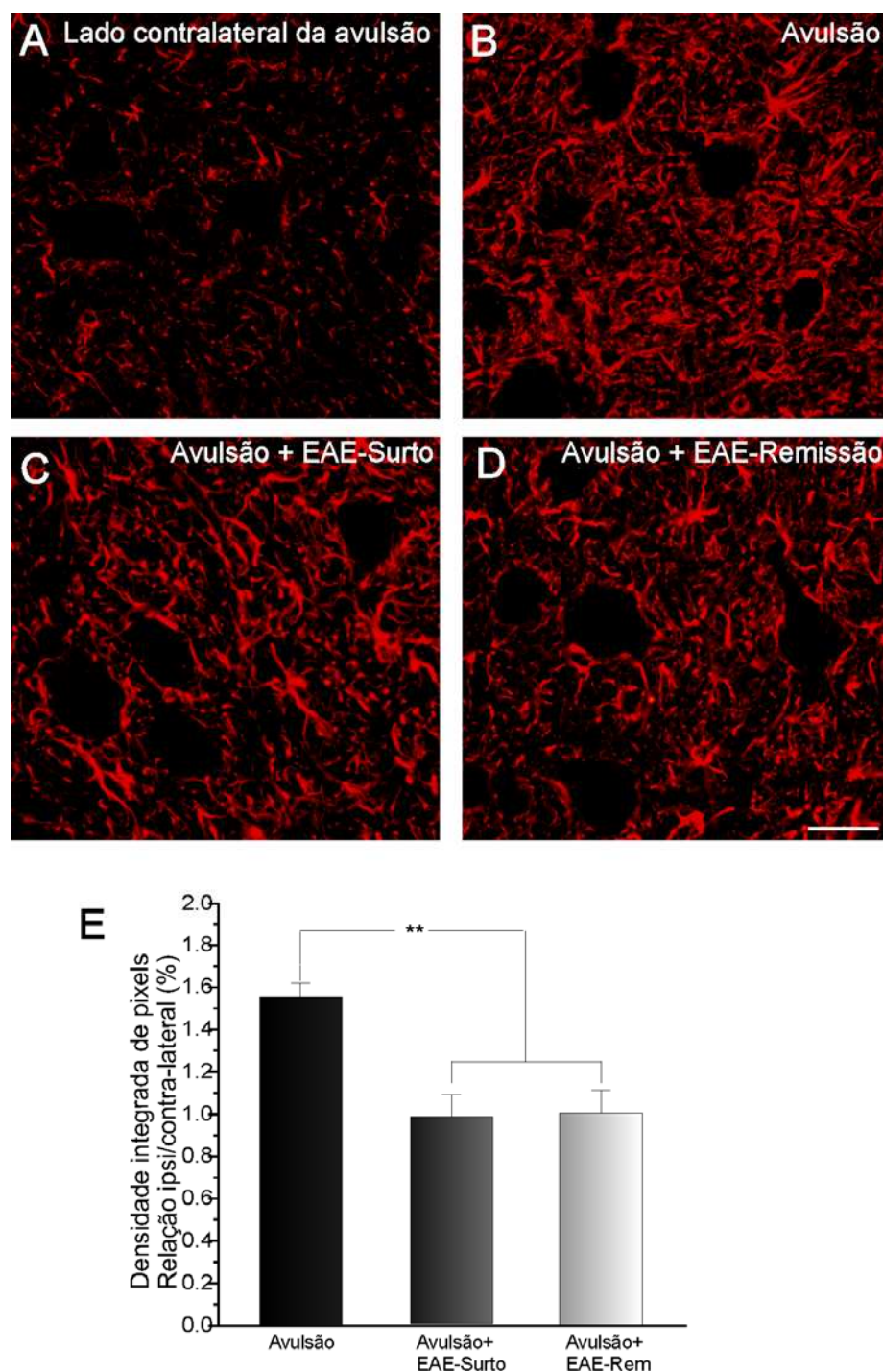


Figura 7. Imunomarcacão para a proteína GFAP na região do corno ventral da medula espinhal. A) lado contralateral do animal com avulsão (controle), nota-se uma maior intensidade no lado ipsilateral dos animais avulsionados, porém na EAE a astrogliose reativa é menor (C) e (D) que somente na avulsão (B). O gráfico indica a diferença da média da intensidade integrada de pixels dos lados ipsi e contralateral nos 3 grupos (Figura 3-E). (\*\*=  $p < 0.01$ ). Média  $\pm$  erro padrão;  $n = 5$ . Barra =  $50 \mu\text{m}$ .

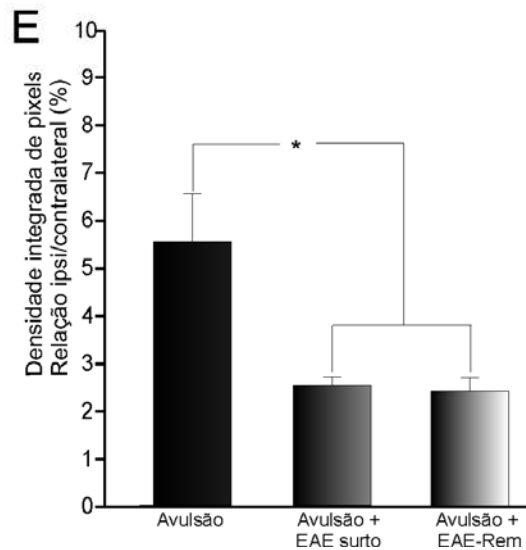
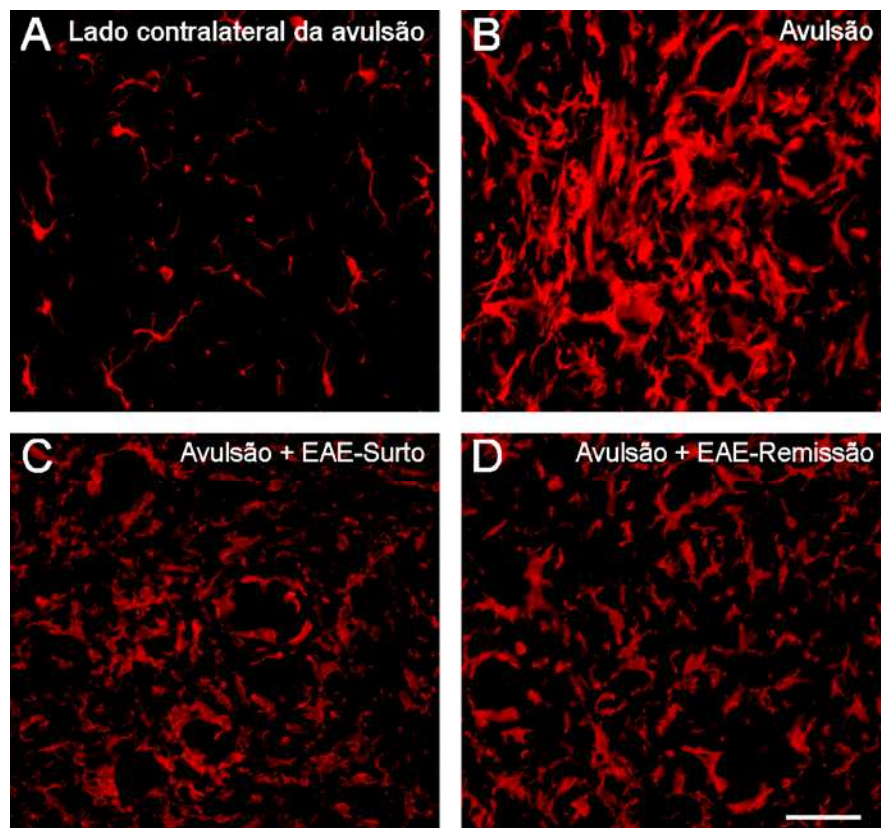


Figura 8. Imunomarcção anti IBA I na região do corno ventral da medula espinhal. A) lado contralateral do animal com avulsão (controle), nota-se uma maior intensidade no lado ipsilateral dos animais avulsionados, porém na EAE a astrogliose reativa é menor (C) e (D) que somente na avulsão (B). O gráfico indica a diferença da média da intensidade integrada de pixels dos lados ipsi e contralateral nos 3 grupos (Figura 3-E). (\*\*=  $p < 0.01$ ). Média  $\pm$  erro padrão;  $n=5$ . Barra =  $50\mu\text{m}$ .

#### 5.4 Análise ultraestrutural da medula espinhal

As eletromicrografias eletrônicas relativas a cada motoneurônio estudado encontrados no grupo dorso-lateral da coluna anterior da medula foram montadas sequencialmente, conforme mostra a fig.9. Após a reconstrução dos motoneurônios, os seus terminais pré-sinápticos foram classificados (botões tipo F, S ou C). Foram considerados para o estudo, apenas os motoneurônios identificados como alfa pela presença de pelo menos um terminal pré-sináptico colinérgico (tipo C) em aposição à superfície da membrana neuronal.

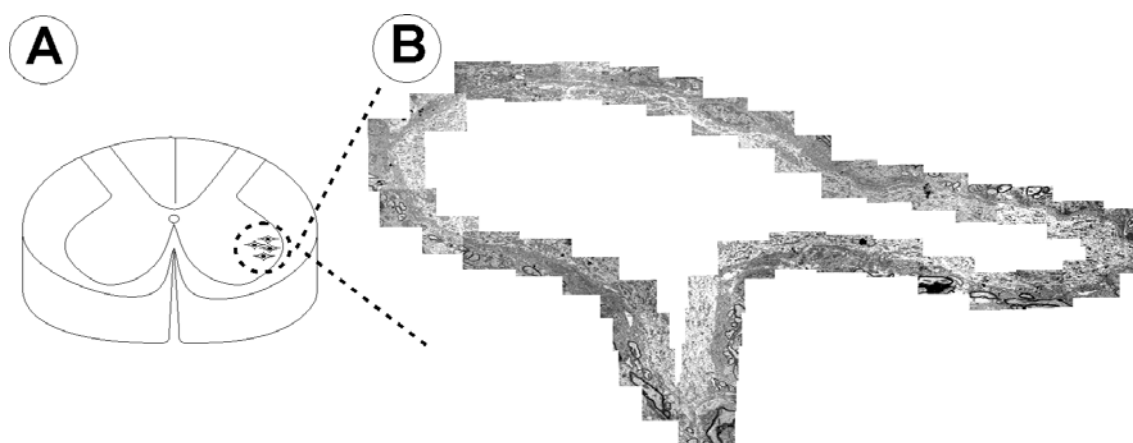


Figura 9. Localização dos motoneurônios estudados e sua reconstrução. A-desenho esquemático de um segmento lombar da medula espinhal demonstrando o núcleo motor lateral onde se encontram os motoneurônios estudados. B- Sequência de eletromicrografias eletrônicas utilizadas para a reconstrução de um motoneurônio alfa medular. Na superfície celular foi obtido aumento de 16.400X por fotografias seqüenciais do motoneurônio.

A análise ultraestrutural dos espécimes provenientes dos animais controle (lado contralateral do animal avulsionado) revelou ampla cobertura sináptica da membrana neuronal (Fig. 10 A e B). Nos grupos com animais avulsionados foram observadas alterações estruturais ao redor dos motoneurônios alfa medulares (Fig. 10 C - H), onde os

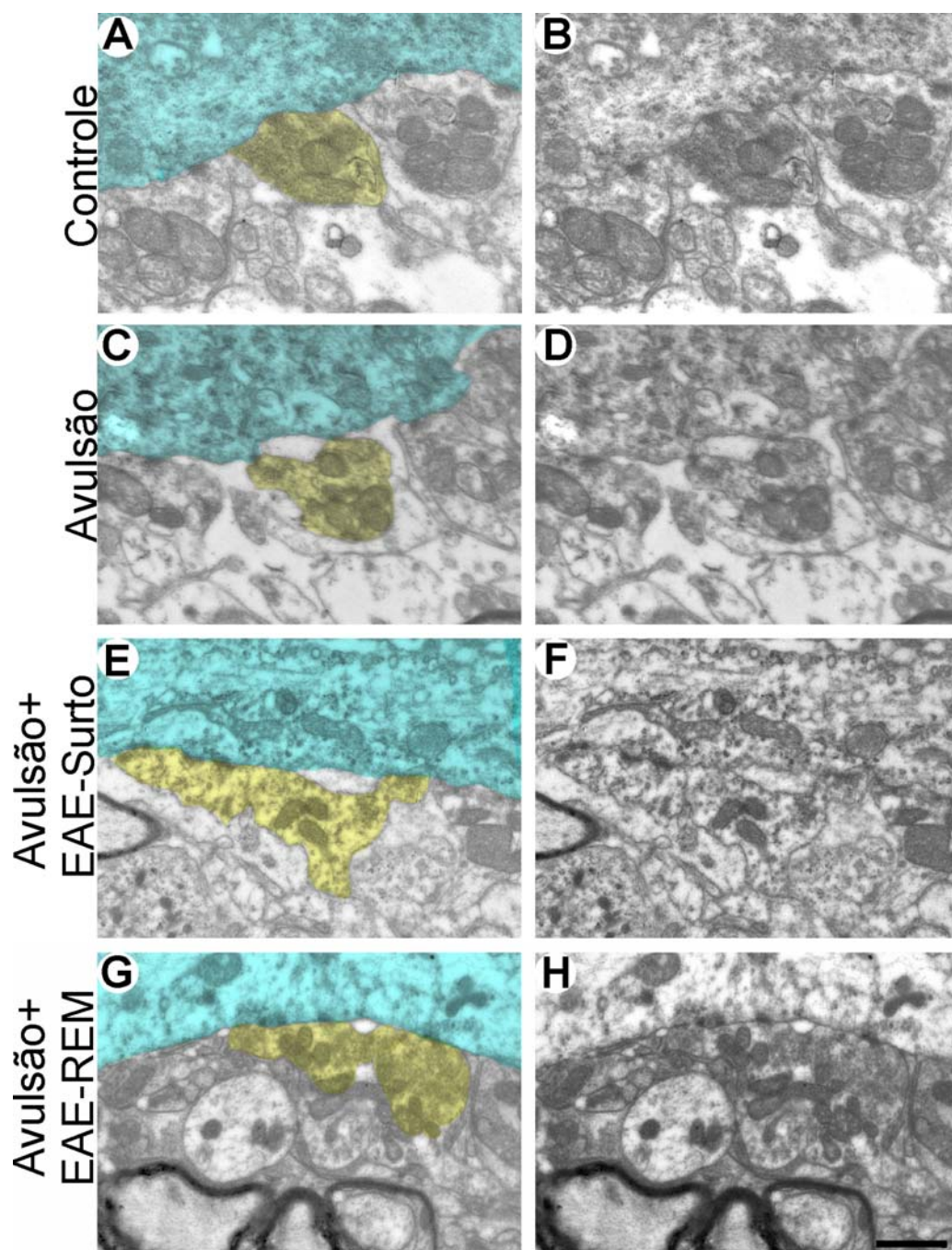


Figura 10: Ultraestrutura da superfície de motoneurônios alfa medulares na região dorso lateral da medula mostrando a cobertura sináptica normal (A e B). Cobertura sináptica com terminais retraídos e projeções astrocitárias no grupo avulsão controle (C e D), do grupo com avulsão no surto da EAE (E e F) e do grupo avulsionado na remissão (G e H) que encontram-se aumentadas de forma significativa no grupo somente com avulsão. Em A, C, E e G os terminais estão coloridos em amarelo e o citoplasma do motoneurônio em azul.

Escala: 1  $\mu$ m



motoneurônios estavam parcialmente ou totalmente retraídos. No entanto as alterações foram mais evidentes no grupo avulsão controle, evidenciando o papel neuroprotetor da inflamação. Projeções gliais também foram frequentemente observadas em contato com a membrana pós-sináptica, preenchendo o espaço entre terminais sinápticos e a membrana pós-sináptica. Essas estruturas foram identificadas como astrócitos devido a sua baixa eletrondensidade.

A análise quantitativa (Fig. 11 A) mostrou redução da cobertura sináptica nos grupos avulsionados. As diferenças foram mais expressivas para o grupo somente avulsão em relação ao controle, resultando 68% menor cobertura sináptica. Nos grupos da avulsão com EAE, a perda de cobertura sináptica em relação ao controle foi de 26% no surto e 21% na remissão. Nota-se maior cobertura sináptica nos grupos lesados juntamente com inflamação em comparação ao grupo somente lesado, com diferença estatística entre os grupos (controle  $73,40 \pm 13,54$  média  $\pm$  erro padrão, avulsão controle  $23,65 \pm 0,05$ ; avulsão + EAE-surto,  $50,47 \pm 5,06$ ; avulsão + EAE-REM,  $55,11 \pm 5,41$  n=4;  $p < 0,05$ ).

O valor de terminais sinápticos/100 $\mu$ m em aposição com a membrana neuronal no grupo avulsão controle foi menor em relação aos outros grupos (Fig. 11 B), no entanto não houve diferença estatística dos grupos avulsão em relação aos grupos avulsão com inflamação (controle  $38,48 \pm 1,52$  média  $\pm$  erro padrão, avulsão controle  $19,22 \pm 1,14$ ; avulsão + EAE-surto,  $25,5 \pm 3,92$ ; avulsão + EAE-REM,  $24,73 \pm 1,37$  n=4;  $p < 0,05$ ).

### ***5.5 Análise ultraestrutural dos tipos de terminais após avulsão***

A cobertura sináptica de cada tipo de terminal e o número de terminais (F, S e C) pré-sinápticos em aposição em 100 $\mu$ m de membrana neuronal foram calculados e estão representados na Fig. 12.

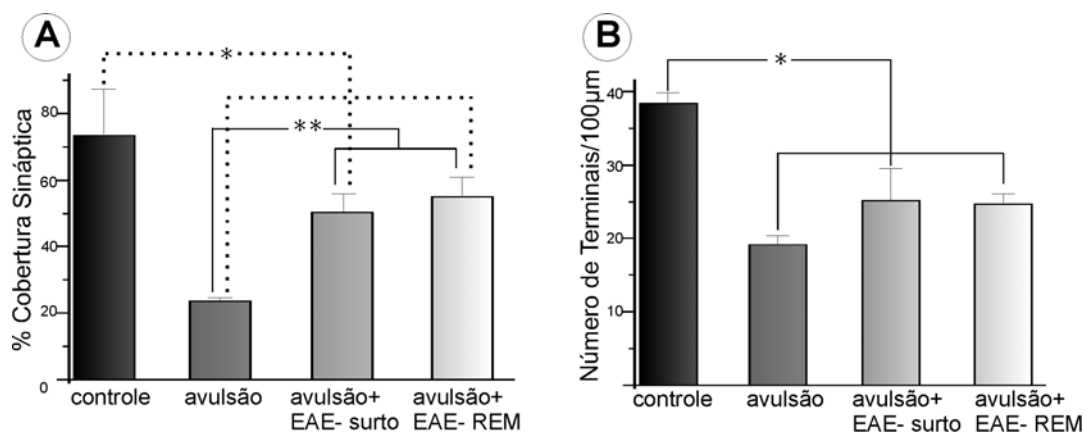


Figura 11: Análise quantitativa da ultraestrutura das sinapses e do número de terminais sinápticos/100µm. A- mostra em porcentagem, redução da cobertura sináptica nos grupos com lesão bem como o efeito neuroprotetor da inflamação. B- apresenta o número de terminais pré-sinápticos em aposição em 100 µm de membrana neuronal entre os grupos sem diferença entre os grupos com avulsão. (\*=  $p<0.05$ ; \*\*=  $p<0.01$ ). Média±erro padrão; n=4.

A análise quantitativa da porcentagem da cobertura sináptica foi significativamente menor de terminais F no grupo somente avulsionado em relação aos outros grupos (Fig. 12A). Percebe-se maior cobertura sináptica dos terminais inibitórios nos grupos avulsão submetidos à EAE ao compará-los ao grupo avulsão controle (controle  $48,82 \pm 2,65$  média  $\pm$  erro padrão; avulsão controle  $15,46 \pm 2,42$ ; avulsão + EAE-surto  $36,01 \pm 2,95$ ; avulsão + EAE-REM,  $39,24 \pm 4$  n=4;  $p<0,05$ ).

A análise quantitativa do número de terminais F pré-sinápticos em aposição por 100 µm de membrana neuronal (Fig. 12B) mostrou diferença dos grupos com avulsão em comparação ao controle (controle  $26,46 \pm 2,88$  média  $\pm$  erro padrão; avulsão controle  $12,63 \pm 1,10$ ; avulsão + EAE-surto  $17,96 \pm 2,62$ ; avulsão + EAE-REM  $17,96 \pm 1,09$  n=4;  $p<0,05$ ).

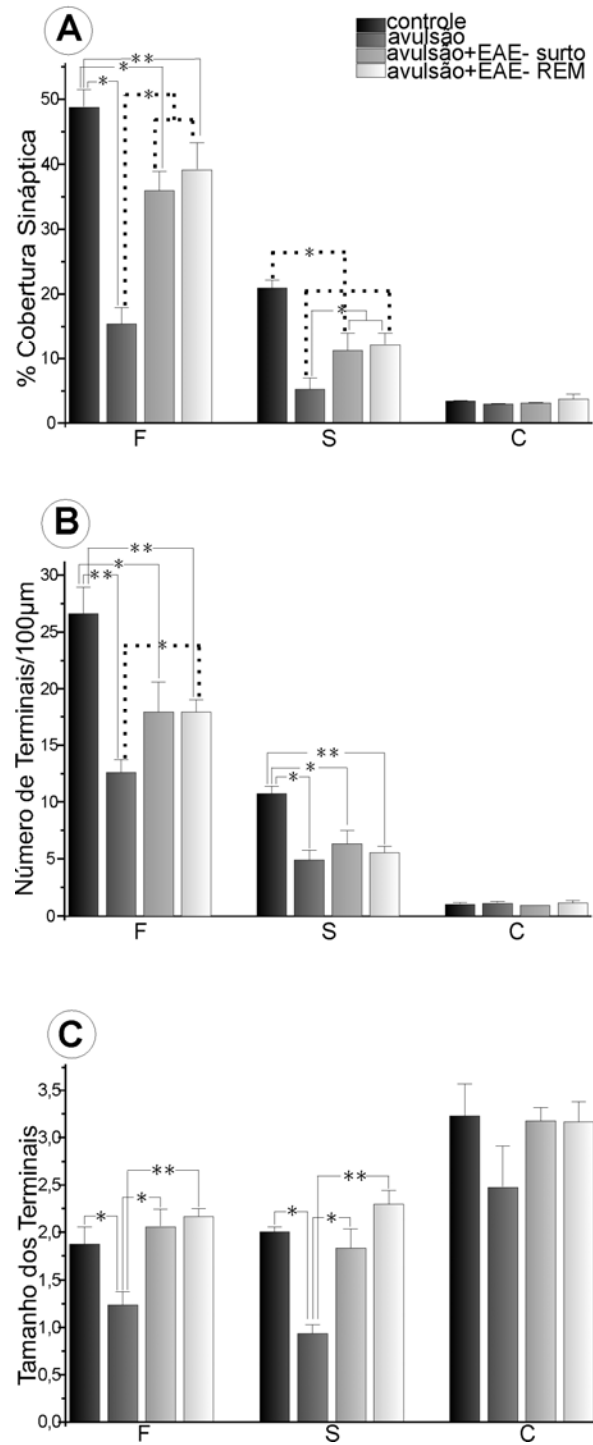


Figura 12: Representação A- da análise ultraestrutural quantitativa da porcentagem de cobertura das sinapses pelos terminais F, S e C, B- da análise quantitativa da ultraestrutura do número de terminais sinápticos F, S e C em aposição/100 µm e C- da análise quantitativa da ultraestrutura do tamanho dos terminais. (\*=  $p < 0.05$ ; \*\*=  $p < 0.01$ ). Média  $\pm$  erro padrão; n=4.



A análise quantitativa do tamanho dos terminais F demonstrou diferença estatística do grupo somente avulsionado em relação aos outros grupos (Fig. 12 C). O tamanho dos terminais do controle estava pouco menor que os terminais dos grupos avulsão com inflamação, porém sem diferença estatística (controle  $1,88 \pm 0,18$  média  $\pm$  erro padrão; avulsão controle  $1,24 \pm 1,40$ ; avulsão + EAE-surto  $2,06 \pm 0,18$ ; avulsão + EAE-REM  $2,17 \pm 0,08$  n=4;  $p < 0,05$ ).

A análise quantitativa da porcentagem da cobertura sináptica de terminais do tipo S foi reduzida nos grupos lesados, com redução ainda mais drástica no grupo avulsão controle, sem a inflamação. Houve diferença significativa entre todos os grupos (controle  $21,01 \pm 1,88$  média  $\pm$  erro padrão; avulsão controle  $5,25 \pm 1,75$ ; avulsão + EAE-surto  $11,46 \pm 2,89$ ; avulsão + EAE-REM,  $13,11 \pm 2,05$  n=4;  $p < 0,05$ ).

Na análise quantitativa do número de terminais excitatórios do tipo S pré-sinápticos em aposição em  $100\mu\text{m}$  de membrana neuronal mostrou diferença significativa entre o controle e os demais grupos (controle  $11,86 \pm 7,1$  média  $\pm$  erro padrão; avulsão controle  $4,91 \pm 0,83$ ; avulsão + EAE-surto  $7,63 \pm 1,82$ ; avulsão + EAE-REM  $5,90 \pm 0,66$  n=4;  $p < 0,05$ ).

A análise do tamanho dos terminais S demonstrou diferença estatística do grupo avulsão controle em relação aos outros grupos. (controle  $2,01 \pm 0,05$  média  $\pm$  erro padrão; avulsão controle  $0,94 \pm 0,09$ ; avulsão + EAE-surto  $1,83 \pm 0,19$ ; avulsão + EAE-REM  $2,30 \pm 0,14$  n=4;  $p < 0,05$ ).

Houve, portanto, predomínio de perda de cobertura sináptica entre os terminais S, excitatórios com 75% menos cobertura do grupo avulsão controle em relação ao controle e do grupo avulsão junto com inflamação a perda foi de 37%. Ao comparar o grupo somente avulsionado com o grupo avulsão seguido da EAE, percebe-se perda de 54% (surto) e 59% (remissão) dos terminais S.

Já em relação ao terminal inibitório, a perda de cobertura sináptica do grupo avulsão controle, avulsão no surto da inflamação e avulsão na remissão foi respectivamente 68%, 23% e 16% em relação ao grupo controle. No grupo com avulsão a perda do terminal inibitório foi de 58% em relação à avulsão no surto da EAE e 60% na remissão.

A análise quantitativa da porcentagem da cobertura sináptica de terminais do tipo C se manteve constante entre os grupos, bem como a análise quantitativa do número desse terminal em aposição em 100 $\mu$ m de membrana neuronal e no tamanho dos terminais.

### ***5.6 Padrão de distribuição dos terminais após avulsão***

Os espaços entre os terminais que se mantiveram em aposição à membrana pré-sináptica foram medidos, calculando-se a sua distribuição de frequência em intervalos de 1,0  $\mu$ m. Esses intervalos foram identificados na avaliação estrutural como sendo projeções citoplasmáticas dos astrócitos. Em neurônios normais, os terminais mostram-se agrupados, havendo número menor de intervalos entre os inputs. Entretanto, no grupo avulsionado controle, observou-se aumento da frequência de intervalos entre terminais, bem como de suas dimensões, as quais atingiram até 29  $\mu$ m. Os grupos lesados com a inflamação mostraram padrão intermediário entre esses dois extremos (Fig. 13).

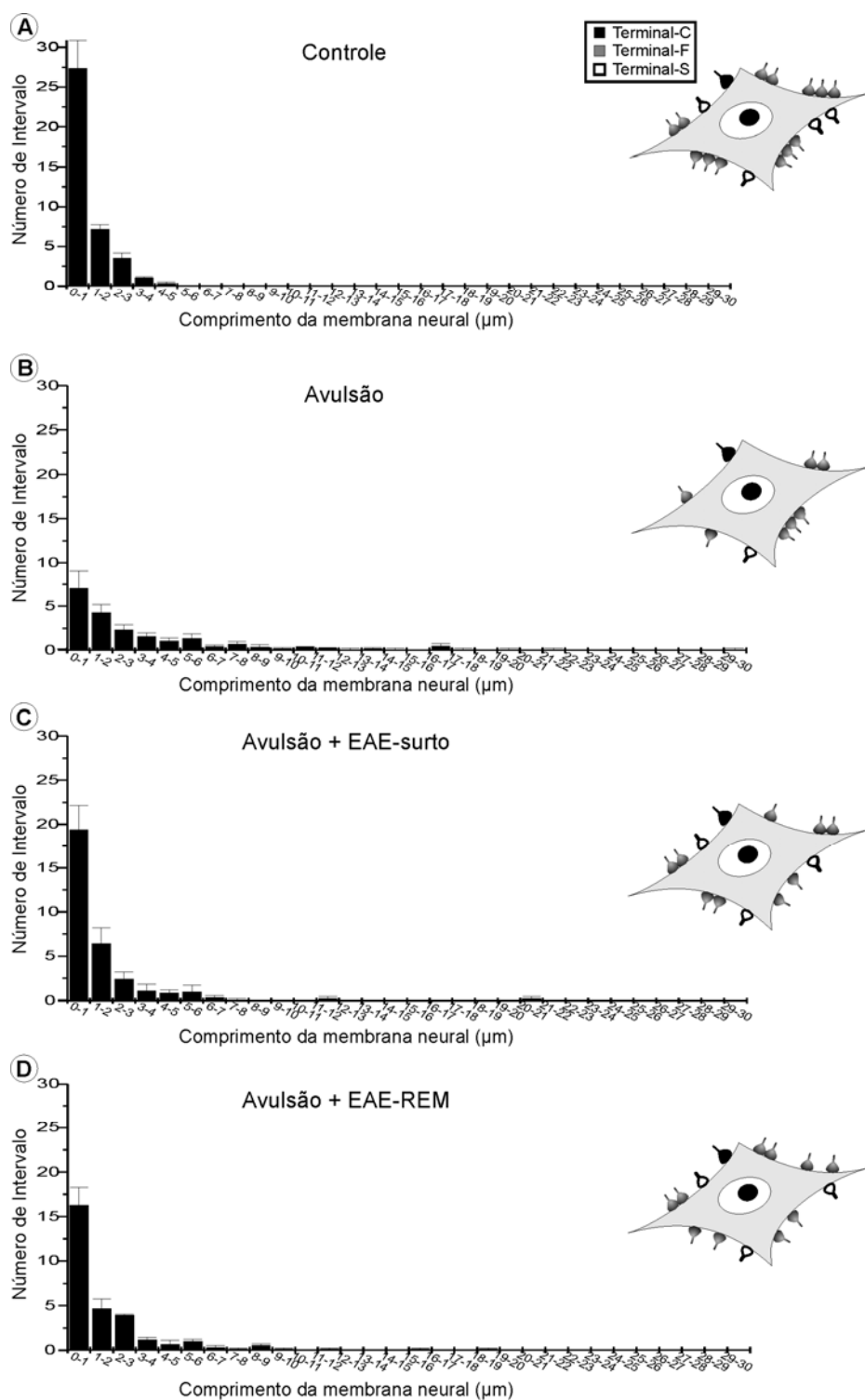


Figura 13: Distribuição dos espaços entre terminais sinápticos ao longo da membrana do corpo dos motoneurônios. A- distribuição normal dos intervalos entre os terminais nervosos, B- alteração da distribuição dos terminais devido à retração, C e D- restauração dos intervalos ao longo da membrana dos motoneurônios.

## 6. DISCUSSÃO

Apesar da visão tradicional de que a resposta imune no SNC (Hickey, 1991 e Knopf, 1995) possa perturbar a delicada rede neuronal, os resultados do presente estudo indicam ação neuroprotetora após lesão proximal, diretamente relacionada à inflamação provida pela EAE.

Lesão próxima do SNC desencadeia extensiva degeneração de motoneurônios adultos (Kishino *et al.*, 1997; Novikov *et al.*, 1995; Oliveira & Langone, 2000) que apresentam, no período agudo pós lesão, perda significativa de sinapses, diminuindo, ou mesmo bloqueando sua funcionalidade (Kuno e Lliná's, 1970; Purves, 1975; Takata e Nagahama, 1983; Delgado-Garcia *et al.*, 1988). Segundo Koliatsos *et al.*, (1991) e Piehl *et al.*, (1995 e 1998), avulsão das raízes ventrais na superfície da medula espinhal resulta em perda de aproximadamente 80% dos motoneurônios durante as primeiras duas semanas, devido provavelmente à diminuição de fatores neurotróficos como BDNF e NT3 (Novikov *et al.*, 1995 e Kishino *et al.*, 1997). Esta perda neuronal resultante da lesão por avulsão foi por nós observada pela contagem de motoneurônios dos animais controle. Por outro lado, a contagem neuronal dos animais lesados e submetidos à EAE mostrou menor perda neuronal, indicando o efeito neuroprotetor da inflamação resultante da evolução da doença.

A análise imunoistoquímica em animais com EAE demonstrou perda sináptica coincidente com aumento da reatividade macro e microglial (Marques *et al.*; 2006). Comparando-se os lados ipsi e contralateral, nos animais lesados com e sem EAE, percebe-se na astro e microglia, um aumento na reatividade por imunoistoquímica, enquanto que a reatividade das sinapses diminui. Esses resultados estão de acordo com dados já presentes na literatura que demonstram uma comunicação bidirecional entre células da glia e

neurônios (Perea & Araque, 2002 e Oliet *et al.*, 2001) e segundo Aldskogius & Svensson, (1999), os astrócitos e microglia participam da plasticidade sináptica.

Nomura *et al.* (2002) demonstraram vigoroso aumento dos processos astrocitários em tração do plexo nervoso também demonstrado nos animais somente axotomizados, onde houve aumento da reatividade da astro e da microglia acompanhada por diminuição da imunomarcacão para sinapses. Já nos animais com avulsão+EAE, notamos a neuroproteção da inflamação devido ao aumento da reatividade sináptica e diminuição de marcação para astrócito e microglia.

Há controvérsias se a reatividade da microglia pode ser danosa (Ekdahl, 2009) ou benéfica (Kim, 2009 e Glezer *et al.*, 2007) ao sistema nervoso. Diez *et al.* (2009) sugerem que deve-se estudar as sinalizações celulares que levam a ativação da microglia se tornar benéfica ou maléfica. Oliet *et al.* (2001) demonstraram que os astrócitos são capazes de retrair sinapses de forma reversível, mostrando que estes são capazes de responder as alterações no seu microambiente (Wang & Bordey, 2008) como em lesões do sistema nervoso. Esse aumento de sinapses no grupo com lesão associada com EAE, em comparação ao grupo somente avulsão, também foi verificado na presente análise ultraestrutural.

Houve diminuição na quantidade de sinapses em todos os grupos lesados ao comparar com o controle, pois a EAE promove diminuição das sinapses como verificado anteriormente em animais com EAE (Marques *et al.*, 2006 e Freria *et al.*, 2009). Porém, no grupo submetido somente à avulsão, a diminuição sináptica foi ainda mais drástica ao compará-lo aos animais lesados com inflamação (pico da EAE). No entanto, o número de terminais se manteve aproximadamente constante entre os grupos avulsionados.

Atribuímos, portanto, essa melhora da porcentagem sináptica ao aumento do tamanho dos terminais no surto e remissão, juntamente com a lesão.

Ocorreu perda de terminais sinápticos, que foi menor no grupo com inflamação do que no somente avulsionado. Foi observado predomínio de perda do terminal S excitatórios mantendo-se a seletividade do processo de retração sináptica, com manutenção dos terminais F, inibitórios. Essa diferença entre a perda de cobertura sináptica dos terminais F e S nos grupos somente lesados leva à uma mudança neuronal de um estado funcional de transmissão sináptica para um modo regenerativo, como mostrado por Lindå *et al.* (1985 e 2000).

Lindå *et al.* (2000) descreveram que na secção proximal dos axônios motores do funículo ventral da medula ocorre uma grande retração de terminais pré-sinápticos preferencialmente glutamatérgicos. Essa seletividade para terminais glutamatérgicos é provavelmente controlada pelo próprio motoneurônio como ação de remodelamento, já que o glutamato exerce efeito excitotóxico no neurônio, ou seja, ocorre uma mudança metabólica de um estado de transmissão sináptica para um estado de recuperação (Barron, 1983; Lindå *et al.*, 2000), com objetivo de sobrevivência celular e produção de novos brotamentos dentrítricos/axônicos (Carlsted, 2009).

Houve maior espaçamento entre os terminais sinápticos no grupo somente lesado, esse intervalo sináptico estava preenchido por micro e macro glia, corroborando com os dados mostrados pela imunomarcção. O intervalo entre os terminais dos grupos lesados com inflamação mostraram-se menores em relação ao grupo somente lesado, porém haviam alguns maiores que os encontrados no controle, o que vem de encontro com a literatura (Marques *et al.*, 2006 e Freria *et al.*, 2009).

Em conjunto, esses dados mostram o papel neuroprotetor da inflamação após lesão dos motoneurônios, como sugerido por Hauben *et al.* (2000) que realizaram injeção de células T autoimunes contra proteína de mielina do sistema nervoso central, obtendo resultados neuroprotetivos após contusão severa da medula espinhal em ratos e que células T CD4<sup>+</sup> promoveram neuroproteção por atenuarem ativação glial e suprimindo fatores citotóxicos em modelo de esclerose lateral amiotrófica (Beers *et al.*, 2009). Essas células T também promoveram a sobrevivência de motoneurônios após transecção do nervo facial (Serpe, 2003).

Foi também demonstrado por Hammarbeg *et al.* (2000) que a reação das células T autoimunes, após lesão mecânica de nervo, levou à sobrevivência neuronal e que essas células T e NK expressaram alto nível de fatores neurotróficos como NT-3, BDNF e GDNF. Moalen *et al.* (1999) sugeriram que as células T autoimunes contra proteína básica de mielina protegem os neurônios do sistema nervoso central da degeneração secundária após lesão do nervo óptico de ratos. Isso deve à redução da atividade eletrofisiológica do nervo lesado por curto período reduzindo a necessidade metabólica das células afetadas, permitindo maior gasto energético no processo regenerativo.

Em resumo, nossos resultados indicam que a inflamação estabiliza os circuitos neuronais na medula espinhal, com aumento da sobrevivência neuronal após lesão no SNC. Essa hipótese pode ser uma promissora ferramenta a ser utilizada como parte do tratamento de lesões proximais da medula espinhal, por exemplo, controlando o uso de anti-inflamatórios em pacientes com esse tipo de lesão.

## 7. CONCLUSÕES

- A inflamação associada à EAE auxiliou na sobrevivência neuronal pois houve maior perda neuronal no grupo avulsionado controle;
- No grupo avulsão controle pôde-se perceber aumento da imunorreatividade tanto da macro e microglia demonstrando maior intensidade da gliose no grupo sem EAE;
- No grupo lesado juntamente com EAE ocorreu preservação de sinapses, observada pela análise ultraestrutural e da expressão de sinaptofisina;
- No grupo avulsão com EAE ocorreu predomínio de terminais inibitórios em relação ao grupo avulsão controle, bem como diminuição da frequência de intervalos entre os terminais, o que foi interpretado como uma resposta positiva e pró-regenerativa;
- Ocorreu neuroproteção pela inflamação da EAE, após avulsão de raízes ventrais.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, A.; Lichtman, A. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: Ed Saunders, 2000. pg 422.
2. Abercrombie, M; Johnson, M. L.; Quantitative histology of wallerian degeneration: Nuclear population in rabbit sciatic nerve. **J Anat.** 1946; 80: 37-50.
3. Achiron, A.; Gurevich, M. Peripheral blood gene expression signature mirrors central nervous system disease: The model of multiple sclerosis. **Autoim Rev.** 2006; 5: 517-522.
4. Aldskogius, H.; Svensson, M. Glial responses to synaptic damage and plasticity. **J Neurosci Res.** 1999; 58: 33-41.
5. Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., Haydon, P. G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends Neurosci.** 1999; 22: 208-215.
6. Araque, A.; Perea, G. Glial modulation of synaptic transmission in culture. **Glia.** 2004; 47: 241-248.
7. Beers, D. R.; Henkel, J. S.; Zhao, W.; Wang, J.; Appel, S. H. Cd4-t cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. **PNAS.** 2008; 105(40):15558–15563.
8. Byram, S. C.; Carson, M. J.; DeBoy, C. A.; Serpe, C. J.; Sanders, M. V.; Jones, K. J. CD4- positive T cell mediated neuroprotection requires dual compartment antigen presentation. **J Neurosci.** 2004; 24(18): 4333–4339.
9. Benveniste E. N. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. **Chem Immunol.** 1997;69:31-75.
10. Berthold, C. H.; Carlsted, T. Observations on the morphology at transition between the peripheral and the central nervous system in the cat. II. General organization of the transitional region in S1 dorsal rootlets. **Acta Physiol Scand Suppl.** 1993; 446: 23-42
11. Bodian, D. An electron-microscopic study in the monkey spinal cord. **Bull Hopk Hosp.** 1964; 114: 13-119.
12. Boulanger, L. M.; Hug, G. S.; Shatz C. J. Neuronal plasticity and cellular immunity: shared molecular mechanisms. **Curr Op Neurobiol.** 2001; 11: 568-578.
13. Brännström, T.; Kellerth, J. O. Changes in synaptology of adult cat spinal alpha-motoneurons after axotomy. **Exp Brain Res.** 1998; 118: 1-13
14. Bruck, W. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. **J Neurol.** 2005; 5002-5007.
15. Butterfield, R. J.; Blankenhorn, E. P; Roper, R. J.; Zachary, J. F.; Doerge, R. W.; Sudweeks J.; Rose, J.; Teuscher, C. Genetic analysis of disease subtypes and sexual dimorphisms in mouse experimental allergic encephalomyelitis (EAE): relapsing/remitting and monophasic relapsing/nonrelapsing EAE are immunogenetically distinct. **J Immunol.** 1999; 162: 3096–3102.
16. Carson, M. J.; Doose, J. M.; Melchior, B.; Schmid, C. D.; Ploix, C. C. CNS immune privilege: hiding in plain sight. **Immunol Rev.** 2006; 213: 48–65.

17. Carlstedt, T. Nerve root replantation. **Neurosurg Clin N Am.** 2009; 20:39–50.
18. Carvalho, A.; Sant'anna, G.; Santos, C. C.; Frugulhetti, I. P.; Leon, S. A.; Santos, T. Q. Determinação de autoanticorpos para antígenos da mielina no soro de pacientes HLA-DQB1\*0602 com Esclerose Múltipla. **Arq Neuropsiquiatr.** 2003; 61 (4): 968-973.
19. Compston, A.; Coles, A. Multiple Sclerosis. **The Lancet** 2002; 359: 1221-1231.
20. Conradi, S. Ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in lumbosacral spinal cord of the adult cat. **Acta Physiol Scand Suppl.** 1969; 332:5-48.
21. Cullheim, S.; Thams, S. The microglial networks of brain and their role in neural network plasticity after lesion. **Brain Res Rev.** 2007; 55(1):89-96.
22. Dahl, D. The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. **J Neurosci Res.**, 1981; 6: 741-748
23. Delgado-Garcia, J. M.; Del Pozo, F.; Spencer, R. F.; Baker, R. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat--III. **Axotomized motoneurons.** 1988; 24:143-160.
24. Derouiche, A.; Frotscher, M. Peripheral astrocyte processes: monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. **Glia.** 2001; 36, 330-341.
25. Deouiche, A.; Anlauf, E.; Aumann, G.; Muhlstädt, B.; Lavialle, M. Anatomical aspects of glia-synapse interaction: the perisynaptic glial sheath consists of specialized astrocyte compartment. **J Physiol.** 2002; 96:177-182.
26. Diez, M.; Abdelmagid, N.; Harnesk, K.; Ström, M.; Lidman, M.; Swanberg, M. Identification of gene regions regulating inflammatory microglial response in the rat CNS after injury. **J Neuroimmunol.** 2009; 212: 82-92.
27. Ekdahl, C. T.; Kokaia, Z.; Lindvall, O. Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia. **Neuroscience** 2009; 158:1021–1029.
28. Eng, L. F.; Ghimikar, R. S.; Lee, Y. L. Glial fibrillary acid protein:GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem Res.** 2000; 25: 1439-1451.
29. Engelhardt, B.; Ransohoff, R. M. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. **Trends Immunol.** 2005; 26(9):485-495
30. Farina, C.; Aloisi, F.; Meinl, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends Immunol.** 2007; 28(3): 138-145
31. Freria, C. M.; Zanon, R.G.; Santos, L. M. B.; Oliveira A. L. R. Major histocompatibility complex class I expression and glial reaction influence spinal motoneuron synaptic plasticity during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Comp Neurol.** 2009; **518**(7):990-1007.
32. Furlan, R.; Pluchino, S.; Marconi, P.C.; Martino, G. Cytokine gene delivery into the central nervous system using intrathecally injected nonreplicative viral vectors. **Methods Mol Biol.** 2003;215:279–289.
33. Glezer, I.; Simard, A. R.; Rivest, S. Neuroprotective role of innate immune system by microglia. **Neuroscience** 2007; 147(4):867-883.
34. Goss, C. M. Gray Anatomia, 29ª Edição: 1977; *Guanabara Koogan*.

35. Gray, E. G.; Guillery, R.W. Synaptic morphology in the normal and degenerating nervous system. **Int Rev Cytol.** 1966; 19:111-182.
36. Ha, G.K.; Huang, Z.; Streit, W.J.; Petitto, J.M. Endogenous T lymphocytes and microglial reactivity in the axotomized facial motor nucleus of mice: effect of genetic background and the RAG2 gene. **J Neuroimmunol** 2006; 172:1-8.
37. Hammarberg, H.; Lidman, O.; Lundberg, C.; Eltayeb, S. Y.; Gielen, A. W.; Muhallab, S.; Svenningsson, A.; Lindå, H.; van Der Meide, P. H.; Cullheim, S.; Olsson, T.; Piehl, F. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. **J Neurosci.** 2000; 20: 5283-5291.
38. Hanson, E. Metabotropic glutamate receptor activation induces astroglial swelling. **J Biol Chem.** 1994; 269:21955-21961.
39. Hanson, E.; Rönnbäck, L. Astrocytes in glutamate neurotransmission. **Faseb J.** 1995; 9:343-350.
40. Hauben, E.; Yoles, E.; Moalem, G.; Agranov, E.; Mor, F.; Akselrd, S.; Neeman, M.; Cohen, I. R.; Schwartz, M. Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. **The Lancet.** 2000; 354: 286-287.
41. Hickey, W. F.; Hsu, B. L.; Kimura, H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. **J Neurosci Res.** 1991; 354 (28): 254-260.
42. Hickey WF, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are derived and present antigen in vivo. **Science.** 1988 Jan 15;239(4837):290-2.
43. Holoshitz J.; Frenkel A.; Frenkel A.; Ben-Nun A.; Cohen I.R. Autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated or prevented by T lymphocyte lines directed against diverse antigenic determinants of myelin basic protein. Vaccination is determinant specific. **J Immunol.** 1983;131(6): 2810-2813.
44. Huh, G. S.; Boulanger, L. M.; Du, H.; Riquelme, P. A.; Brotz, T. M.; Shatz, C. J. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. **Science** 2000; 290: 2155-2158.
45. Huseby, E. S.; Liggitt, D.; Brabb, T.; Schnabel, B.; Öhlén, C.; Goverman, J. A pathogenic role for myelin-specific CD8<sup>+</sup> T cells in a model for multiple sclerosis **J Exp Med.** 2001; 194(5): 669–676.
46. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. 2000 **Principles of Neural Science**, 4<sup>th</sup> Edition: *McGraw-Hill*.
47. Kim, B. J.; Kim, M.; Park, J.; Lee, S.; Kim, Y.; Ryu, S.; Kim Y. H.; Yoon, B. Reduced neurogenesis after suppressed inflammation by minocycline in transient cerebral ischemia in rat. **J Neurol Scienc,** 2009; 279:70-75.
48. Kishino, Y.; Ishige, T.; Tatsuno, C.; Nakayama, H.; Nogushi BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth, **Exp Neurol.** 1997; 144:273-286.
49. Knopf, P. M.; Cserr, S. C.; Nolan, T. Y.; Wu, C. J. Harling-Berg; Physiology and immunology of lymphatic drainage of interstitial and cerebrospinal fluid from the brain. **Neuropathol Appll Neurobiol.** 1995; 21: 175-180.
50. Koliatsos, V. E.; Price, W. L.; Pardo, C. A.; Price, D. L. Ventral root avulsion: An experimental model of death of adult motor neurons. **J Comp Neurol.** 1994; 342: 35-44.

51. Kuno, M.; Llina's, R.; Alterations of synaptic action in chromatolysed motoneurons of the cat. **J Physiol** 1970; 210: 823–828.
52. Ledebøer, A.; Breve, J. J.; Wierinckx, A.; Van der Jagt, S.; Bristow, A. F.; Leysen J. E. Expression and regulation of interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. **Eur J Neurosci.** 2002;16(7):1175-85.
53. Lendahl, U.; Zimmerman, L.B., McKay, R.D. CNS stem cells express a new class of intermediated filament protein. **Cell.** 1990; 60:585-595.
54. Lent, R.; A estrutura do sistema nervoso. In: Roberto Lent. (Org.). **Neurociência da Mente e do Comportamento.** 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008, v. 1, p. 19-42.
55. Liberto, C. M.; Albrecht, P. J.; Herx, L. M.; Yong, V. W.; Lesion, S. W. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. **J Neurochem.** 2004; 89: 1092-1100.
56. Lider, O.; Santos, L. M.; Lee, C. S.; Higgins, P. J.; Weiner, H. L. - Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen-specific CD8+ T lymphocytes. **J Immunol.** 1989;142: 748-752.
57. Lindå, H.; Risling, M.; Cullheim, S. “Dendraxons” in regenerating motoneurons in the cat: do dendrites generate new axons after central axotomy? **Brain Res** 1985; 358:329–333.
58. Lindå, H.; Piehl, F.; Dagerlind, A.; Verge, V. M.; Arvidson, U.; Cullheim, S.; Risling, M.; Ulfhake, B.; Hokfelt, T.; Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons. **Exp Brain Res.** 1992; 91:284-295
59. Lindå, H.; Shupliakov, O.; Ornung, G.; Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., Risling, M., Cullheim, S. Ultrastructural evidence for a preferential elimination of glutamate-immunoreactive synaptic terminals from spinal motoneurons after intramedullary axotomy. **J Comp Neurol.** 2000; 425: 10-23.
60. Livesey, F. J.; Fraher, J. F. Experimental traction injuries of cervical spinal nerve roots; a scanning EM study of rupture patterns in fresh tissue. **Neuropathol Appl Neurobiol.** 1992; 18: 376-386.
61. Machado, A. **Neuroanatomia Funcional**, 2ª Edição: 2002; *Atheneu*.
62. Marques, K. B.; Santos, L. M. B.; Oliveira, A. L. R. Spinal motoneuron synaptic plasticity during the course of an animal model of multiple sclerosis. **Europ J of Neurosc.** 2006; 24: 3053-3062.
63. Maragakis, N. Rothstein, J. D.; Mechanisms of diseases: astrocytes in neurodegenerative disease. **Nat Clin Pract Neurol.** 2006; 12(2): 679-189
64. Moalem, G.; Leibowitz-Amit, R.; Yoles, E.; Mor, F.; Cohen, I. R.; Schwartz, M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. **Nature America.** 1999; 5: 49-55.
65. Nomura, H., Furuta, A., & Iwaki, T. (2002). Dorsal root rupture injury induces extension of astrocytic processes into the peripheral nervous system and expression of GDNF in astrocytes. **Brain Res**, 950, 21-30.
66. Norton, W. T.; Aquino, D. A.; Hozumi, I.; Chiu, F. C.; Brosnan, C. F. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. **Neurochem Res.** 1992; 17: 877-885.

67. Novikov, L.; Novikova, L.; Kellerth, J. O.; Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and blocks nitric oxide synthase expression in adult rat spinal motoneurons after ventral root avulsion. **Neurosci Lett.** 1995; 200: 45-48.
68. Oliet, S. H.; Piet, R.; Poulain, D. A. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. **Science.** 2001; 292: 923-926.
69. Oliveira, A. L. R.; Langone, F. GM-1 ganglioside treatment reduces motoneuron death after ventral root avulsion in adult rats. **Neurosci Lett.** 2000; 293:131-134.
70. Oliveira, A. L. R.; Thams, S.; Lidman, O.; Piehl, F.; Hökfelt, T.; Kärre, Lindå, H.; Cullhem, S. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. **PNAS.** 2004; 101(51): 17843-17848.
71. Olson, T.; Diener, P.; Ljungdahl, A.; Hojeberg, B.; van der Meide, P.; Kristensson, K. Facial nerve transection causes expansion of myelin autoreactive T cells in regional lymph nodes and T cell homing to the facial nucleus. **Autoimmunity.** 1992; 13:117-126.
72. Perea, G.; Araque, A. Communication between astrocytes and neurons: a complex language **J Physiol.** 2002; 47: 241-248.
73. Piehl, F.; Arvidsson, U.; Johnson, H.; Cullheim, S.; Dagerlind, A.; Ulfhake, B.; Cao, Y.; Elde, R.; Pettersson, R. F.; Terenius, L. Gap-3, aFGF, CCK and alpha- and beta-CGRP in rat spinal motoneurons subjected to axotomy and/or dorsal root severance. **Eur J Neurosci.** 1993; 5: 1327-1333.
74. Piehl, F.; Tabar, G.; Cullheim, S. Expression of NMDA receptor mRNAs in rat motoneurons is down-regulated after axotomy. **Eur J Neurosci.** 1995; 7: 101-2110.
75. Piehl, F.; Hammarberg, H.; Tabar, G.; Hökfelt, T.; Cullheim, S. Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat motoneurons depends on age and type of injury. **Exp Brain Res.** 1998, 119:191-204.
76. Piehl, F.; Lundberg, C.; Khademi, M.; Bucht, A.; Dahlman, I.; Lorentzen, J.; Olson, T. Non-MHC gene regulation of nerve root injury-induced spinal cord inflammation and neuron death. **J Neuroimmunol.** 1999; 101:87-97.
77. Privat, A.; Valat, J.; Fulcrand, J. Proliferation of neuroglial cell lines in the degenerating optic nerve of young rats. A radioautographic study. **J. Neuropathol Exp Neurol.** 1981, 40: 46-60.
78. Przedborski, S.; Vila. M.; Jackson-Lewis, V. Neurodegeneration: what is it and where are we? **J Clin Invest.** 2003; 111(1):3-10.
79. Purves, D.; Lichman, J. W. Formation and maintenance of synaptic connections in autonomic ganglia. **Physiol Ver.** 1978; 58: 821-862.
80. Rogez-Kreuz, C.; Maneglier, B.; Dereuddre-Bosquet, N.; Doront, D.; Clayette, P. Lack of IFN-gamma production in response to antigenic stimulation in human IFN-treated lymphocytes. **J Interf Cytok Res.** 2005; 25(8):444-452 .
81. Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncel, R. W., Localization of neuronal and glial glutamate transporters. **Neuron.** 1994; 13, 713-725.
82. Rouach, N.; Giaume, C. Connexins and gap junctional communication in astrocytes are targets of neuroglial interaction. **Prog Brain Res.** 2001; 132: 203-214.

83. Rho, M. B.; Wesselingh, S.; Glass, J. D.; McArthur, J. C.; Choi, S.; Griffin, J.; A potential role for interferon-alpha in the pathogenesis of HIV-associated dementia. **Brain Behav Immun.** 1995; 9(4):366-377.
84. Rusakov, D. A.; Kullmann, D. M. Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. **J Neurosci.** 1998; 18: 3158-3170.
85. Sabha, M. Jr.; Emirandetti, A.; Cullheim, S., Oliveira, A.L.R. MHCI expression and synaptic plasticity in different mice strains after axotomy. **Synapse** 2008, 62: 137-148.
86. Sanders, P.; De Keyser, J. Faces of microglia in multiple sclerosis. **Brain Res Rev.** 2007; 54:274-285.
87. Serpe, C. J.; Kohm, A. P.; Huppenbauer, B. C.; Sanders, V. S.; Jones, K. J. Exacerbation of facial motoneurons loss after facial nerve transection in severe combined immunodeficient (scid) mice. **J Neurosci.** 1999; 19:1-5.
88. Serpe, C. J. Sanders, V.M.; Jones, K.J. Kinetics of facial motoneuron loss following facial nerve transection in severe combined immunodeficient mice. **J Neurosci Res.** 2000; 62:273-278
89. Serpe, C. J; Tetzlaff J. E.; Coers S.; Sanders, V. M.; Jones K. J. Functional recovery after facial nerve crush is delayed in severe combined immunodeficient mice. **Brain Behav Immunol.** 2002; 16:808-812.
90. Serpe, C. J.; Coers, S.; Sanders, V.M.; Jones, K.J. CD4+ T, but not CD8+ or B, lymphocytes mediate facial motoneuron survival after facial nerve transection. **Brain Behav Immunol.** 2003; 17:393-402.
91. Snider, W.D.; Elliott, J.L.; Yan, Q. Axotomy-induced neuronal death during development. **J Neurobiol.** 1992; 23(9):1231-46.
92. Srinivasan, B.; Roque, C.H.; Hempstead, B. L.; Al-Ubaidi, R.; Roque, R. S. Microglia-derived pronerve growth factor promotes photoreceptor cell death via p75 neurotrophin receptor. **J Biol Chemist.** 2004; 279 (40): 41839-41845.
93. Shrikant P.; Benveniste E.N. The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. **J Immunol.** 1996; 157(5):1819-22.
94. Sykova, E.; Chvatal, A. Glial cells and volume transmission in the CNS. **Neurochem Int.** 2000; 36: 397-409.
95. Takata, M.; Nagahama, T. Synaptic efficacy of inhibitory synapses in hypoglossal motoneurons after transection of the hypoglossal nerves. **Neuroscience.** 1983; 10: 23-29.
96. Testut, L.; Latarjet, A. 1986. **Tratado de Anatomia Humana.** Tomo Segundo. 2ª Reimpresión Barcelona- Espanha, Salvat Editores S.A.
97. Tilleux, S.; Hermans, E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. **J Neurosci Res.** 2007; 85: 2059-2070.

98. Vandenbranden, C. A., Verweij, J., Kamermans, M., Muller, L. J., Ruijter, J. M., Vrensen, G. F., Spekrijse, H. Clearance of neurotransmitter from the cone synaptic cleft in goldfish retina. **Vision Res.** 1996; 36: 3859-3874.
99. Verkhratsky, A., Steinhauser, C. Ion channels in glial cells. **Brain Res Rev.** 2000; 32:380-412.
100. Wang, D. D.; Bordey, A. The astrocyte odyssey. **Prog Neurobiol.** 2008; 86(4): 342–367.
101. Wendell-Smith, C. P.; Blunt, M. J.; Baldwin, F. The ultrastructural characterization of macroglial cell types. **J Comp Neurol.** 1966; 127(2): 219-240.
102. Wolf, J. R. Quantitative aspects of astroglia. In. Proceedings of the sixth international congress of neuropathology. **Paris: Masson.** 1970; 327-352.
103. Wu VW, Schwartz JP. Cell culture models for reactive gliosis: new perspectives. **J Neurosci Res.** 1998; 51(6):675-81.
104. Xin, J.; Wainwright, D. A.; Serpe, C. J.; Sanders, V. M.; Jones, K. J. Phenotype of CD4+T cell subsets that develop following mouse facial nerve axotomy. **Brain Behav Immun.** 2008; 22(4): 528–537.
105. Zelano, J.; Berg, A.; Thams, S.; Hailer, N. P.; Cullheim, S. SynCAM1 expression correlates with restoration of central synapses on spinal motoneurons after two different models of peripheral nerve injury. **J Comp Neurol** 2009; 517:670-682.
106. Zhu, B.; Luo, L.; Moore, G. R.; Paty, D. W.; Cynader, M. S. Dendritic and synaptic pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Am J Pathol.** 2003; 162:1639-1650.

**9. ANEXO- Artigo Publicado (Journal of Neuroinflammation):**

# **Impact of acute inflammation on spinal motoneuron synaptic plasticity following ventral root avulsion**

Roberta Barbizan<sup>1</sup> and Alexandre LR Oliveira<sup>1§</sup>

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

<sup>§</sup>Corresponding author

Email addresses:

RB: [r011189@dac.unicamp.br](mailto:r011189@dac.unicamp.br)

ALRO: [alroliv@unicamp.br](mailto:alroliv@unicamp.br)



## Abstract

**Background:** Ventral root avulsion is a proximal nerve root lesion in which ventral motor nerve rootlets are torn from surface of the spinal cord, resulting in extensive death of motoneurons. It has been previously shown that if such lesioning is performed in an animal with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a significant number of motoneurons can be rescued despite an intense inflammatory reaction. This rescue effect has been attributed to production of a number of neurotrophic factors by invading T cells. Synaptological changes may be involved in neuronal degeneration, and a better understanding of the role of these changes may be of importance for developing new strategies to promote neuronal survival. The objective of the present work was to evaluate neuronal survival, astroglial reaction and synaptic input changes in spinal cord anterior horn motor nuclei after ventral root avulsion in animals with EAE, both during peak disease and after remission.

**Methods:** Lewis rats were subjected to unilateral avulsion of lumbar ventral roots (VRA) and divided into three groups: VRA control, VRA at peak of EAE, and VRA during EAE remission. The animals were sacrificed and their lumbar spinal cords processed for immunohistochemistry, transmission electron microscopy, and motoneuron counting.

**Results:** The results indicate a reduction in astroglial reaction, a maintenance of microglial reactivity, and increases in synaptic covering of, and survival of, motoneurons in the VRA+EAE group as compared to VRA alone.

**Conclusion:** The present findings indicate that CNS inflammation may directly influence synaptic plasticity as well as the stability of neuronal networks, positively influencing the survival of lesioned neurons.

## Background

Traumatic lesions to the spinal cord, which involve neuronal death, convey devastating and permanent loss of function. Alterations also develop in response to the consequent local hemorrhage and ischemia [1]. Among these alterations, upregulation of receptors for neurotrophic factors such as the low affinity neurotrophin receptor p75NTR [2], the high affinity trkB receptor for BDNF [3], and the GFRa-1 receptor for glial derived neurotrophic factor (GDNF) [4], are well established examples. Additionally, upregulation of proteins such as growth associated protein-43 (GAP-43) [5, 6] and calcitonin gene-related peptide (CGRP), and down-regulation of receptors and enzymes involved in neurotransmission, including choline acetyltransferase (ChAT) and NMDA receptors [6], may be cited as important responses to injury that are related to a regenerative strategy [5-8] in the cell body.

In adults, such a physiological shift is more related to cell repair than to survival [8]. However, lesions close to the surface of the spinal cord may result in extensive degeneration of adult motoneurons, as is the case after avulsion of ventral roots (VRA), an experimental model used to investigate adult neuronal degeneration [6, 9, 10]. Koliatsos et al. [9] have demonstrated that such lesions result in retrograde death of 80% of motoneurons within the first 2 weeks. Piehl et al. [11] have shown a peak of expression of pro-inflammatory cytokines at the onset of motoneuron death, suggesting that inflammation is related to this particular type of neurodegenerative process.

Although inflammation may be harmful to the survival of lesioned neurons, the exacerbation of facial motoneuron loss after nerve transection in severe combined immunodeficient (scid) mice suggests that immune cells associated with acquired immunity

play a role in regulating motoneuron survival after neuronal lesion [12]. This hypothesis is strengthened by the fact that autoimmune T cells are able to protect neurons from degeneration after axotomy within the CNS, as demonstrated by the fact that avulsed neurons survive, at a strikingly greater ratio, if the lesion is performed during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis [4]. However, although expression of cytokines and neurotrophic factors may be involved, it is possible that synaptic plasticity events may also be influenced by the course of the disease and by the presence of T cells in nervous tissue. Synaptological changes may also be involved in neuronal degeneration. It is possible that a better understanding of the degree of input alterations in this scenario may be an important tool for developing new strategies aiming at increasing neuronal survival after proximal nerve root injuries. With this in mind, the objective of the present work was to perform a detailed analysis of synaptological changes in motoneuron synapses after VRA associated with progression of EAE.

## **Methods**

### **Animals**

Adult female Lewis rats (7 weeks old, 250 g body weight) were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB/UNICAMP) and housed using a 12-hour light/dark cycle with free access to food and water. The study was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEUA/IB/UNICAMP, proc. n° 1494-1.), and the experiments were performed in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation. The animals were subjected to unilateral avulsion of the L4-L6 lumbar ventral roots and divided into 3 groups: Group 1 was considered a positive control, with no EAE immunization; these

animals were sacrificed 2 weeks after avulsion. Groups 2 and 3 were subjected to EAE induction thirty minutes after avulsion. Animals in Group 2 were analyzed at the peak of exacerbation of EAE (degree 3) and animals in group 3 were analyzed at the remission stage of EAE, in which there is recovery from clinical signs of disease; these animals were sacrificed 2 weeks after peak disease. The animals were sacrificed and their lumbar spinal cords were processed for immunohistochemistry (n=5 for each group), transmission electron microscopy (n=4 for each group) and for neuronal survival counting (n=5 for each group).

### **Ventral root avulsion (VRA) and EAE induction**

All reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St, Louis, MO) unless otherwise specifically mentioned. The rats were subjected to unilateral avulsion of the lumbar ventral roots as previously described [13]. In brief, a unilateral laminectomy was performed on the L4-L6 spinal segments. The dural sac was opened by a longitudinal incision and, after dissection of the denticulate ligament, the spinal cord was gently twisted so that the ventral roots associated with lumbar enlargement were identified and avulsed. Finally, the spinal cord was replaced in its original position and the musculature, fascia and skin sutured in layers.

After lesioning, EAE was induced in groups 2 and 3. The rats were immunized with an emulsion containing guinea pig myelin basic protein (MBP, 25µg) and complete Freund's adjuvant emulsion (CFA) supplemented with 2 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI). This solution (100µl) was injected subcutaneously in the footpad of animals' hind limbs. The animals were monitored daily, and neurological impairment was classified as follows: grade 0, no clinical signs; grade 1, tail weakness or paralysis; grade 2, hind limb paraparesis (peak disease); grade 3, hind limb paralysis (this

occurred 13 days after immunization, at which time the animals in group 2 were sacrificed); grade 4, complete paralysis (tetraplegy). One group of animals (group 3) was kept alive after peak exacerbation of disease, and sacrificed 2 weeks later, after entering the remission phase.

### **Specimen preparation**

At the predetermined times, animals were anaesthetized with a mixture of Kensol (xylazine, Köning, Argentina, 10 mg/Kg) and Vetaset (Cetamine, Fort Dodge, USA, 50 mg/Kg) and the vascular system was rinsed by transcardial perfusion with phosphate buffer (pH 7.4). For the counting of surviving neurons and immunohistochemical detection of synaptophysin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Iba1; rats were fixed by vascular perfusion with 10% formaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4). Thereafter, the lumbar intumescence was dissected out, post-fixed overnight and then washed in phosphate buffer and stored in sucrose (20%) for 8 hours before freezing. Transverse cryostat sections (12 µm thick) of spinal cords were obtained and transferred to gelatin-coated slides, dried at room temperature for 30 min and stored at -20°C until analyzed. For electron microscopy, 100 ml of a fixative containing 2.5% glutaraldehyde and 0.5% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4) was perfused through the ascending aorta. The lumbar spinal cord was removed and stored overnight in the same fixative at 4°C. The specimens were then trimmed and osmicated, dehydrated, and embedded in Durcupan ACM (Fluka, Steinheim, Switzerland). Ultrathin sections from the L4–L6 segments were collected on formvar-coated copper grids, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Leo 906 transmission electron microscope operating at 60 kV.

### **Counting of motoneurons surviving two weeks after ventral root avulsion**

Cell counts were performed in double blind fashion on sections from the lumbar enlargement ( $n=5$ ). The animals were fixed by vascular perfusion with 10% formaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4). The lumbar enlargement was then dissected out, post-fixed overnight in the same fixative and then frozen. Transverse cryostat sections (12 $\mu$ m) of the spinal cords were obtained and transferred to silane-coated slides, which were stained for 3 minutes in aqueous 1% cresyl fast violet solution. The sections were then dehydrated and mounted with Entellan (Merck).

The motoneurons were identified based on their morphology and location in the ventral horn (dorsolateral lamina IX). Only cells with a visible nucleus and nucleolus were counted. The counts were made on 20 sections (every fourth section) along the lumbar enlargement both on the ipsilateral and contralateral sides of each spinal cord. The absolute numbers of motoneurons per section on the lesioned and non-lesioned sides were used to calculate the percentage of surviving cells in each specimen. To correct for double counting of neurons, the Abercrombie's [14] formula was used:

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

Where  $N$  is the corrected number of counted neurons,  $n$  is the counted number of cells,  $t$  is the thickness of the sections (12 $\mu$ m) and  $d$  is the average diameter of the cells. Because differences in cell size significantly affect cell counts, the value of  $d$  was calculated specifically for each experimental group, for both ipsilateral and contralateral neurons. For this, the diameters of 15 randomly chosen neurons from each group were measured (ImageTool software, version 3.00, The University of Texas Health Science Center in Santo Antonio, USA) and the mean values calculated, as shown in Table 2.

## **Immunohistochemistry**

Transverse sections of spinal cord (12 $\mu$ m) were cut ( $n=5$ ) in a cryostat (Microm) and incubated with the following primary antibodies: rabbit anti-synaptophysin (Dako, 1:100), goat anti-GFAP (Chemicon, 1:200), rabbit anti-Iba1 (Wako, 1:1400), mouse anti-CD4<sup>+</sup> (Serotec, 1:100), mouse anti-CD8<sup>+</sup> (Serotec, 1:100) and rat anti-CD11b (BD Pharmingen, 1:100). With regard to specificity, the anti-human synaptophysin antibody reacts with a single band of 38 kDa on immunoblotting, corresponding to the protein P38 as described previously [15, 16]. The immunolabeling pattern observed here was similar to that in other studies of mouse neurons, providing a characteristic punctate labeling [17; 18]. The antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP), which is an intermediate filament (IF) protein belonging to the type III subclass of IF proteins, reacts with a single band of 52 kDa on immunoblotting [19]. The antibody used here showed a typical immunostaining pattern for astroglial cells, comparable to that described previously for mouse brain [20]. The Iba1 (a calcium-binding protein) antiserum has been previously characterized in rat brain as a marker for microglia by comparing it with staining for OX42 and B4-isolectin from *Griffonia simplicifolia*, all of which show typical microglial staining patterns [21]. CD4 protein is expressed on membrane surfaces of CD4<sup>+</sup> T cells (helper), while CD8<sup>+</sup> T cells (cytotoxic) express CD8 glycoprotein on their surfaces. CD11b is expressed by mature monocytes, natural killer cells, and a subset of lymphocytes. Sections were incubated overnight in a moist chamber at 4°C. The primary antisera were diluted in a solution containing BSA and Triton X in 0.01M PBS. After rinsing, the secondary antibodies were applied and incubated for 45 minutes, according to the primary antibody hosts (CY-2 and CY-3, Jackson ImmunoResearch; 1:250). The sections were then rinsed in PBS, mounted in a mixture of glycerol/PBS (3:1), and examined using a fluorescence microscope (TS-100, Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a CCD camera (DMX1200, Nikon). For quantitative

measurements, 3 representative images of the ipsi- and contralateral ventral horn were captured from each animal for all experimental groups, totaling 15 sampled images from each side per group. Quantification was performed with the enhance contrast and density slicing features of IMAGEJ software (version 1.33u, National Institutes of Health, USA). The integrated density of pixels (sum of the gray values of each pixel in a determined area) around each motoneuron identified in the lateral motor nucleus was measured in six circular areas of 100  $\mu\text{m}^2$  from each side, as shown in Figure 3F. This quantification method measures the intensity of fluorescence in a given image, and has been used in previous studies [22-25]. For synaptophysin immunolabeling, a lesioned/unlesioned ratio for the integrated density of pixels was calculated for each section (axotomy groups) and then as a mean value for each spinal cord. The data are represented as mean  $\pm$  SE.

### **Analysis of the ultrathin sections**

Neurons with large cell bodies (35  $\mu\text{m}$  in diameter), found in the sciatic motoneuron pool and cut in the nuclear plane, were identified as alpha motoneurons by the presence of C-type nerve terminals. The surfaces of these cells were then sequentially digitized at a magnification of 16,400 $\times$  using a video camera connected to a computerized system, plus the acquisition feature of the Kontron KS300 software (Zeiss, Jena, Germany). The images were then mounted together in vectorial software, and the total perimeter of the neurons (in micrometers) was measured. Synaptic terminals apposing the motoneuron somata were identified, and their numbers per 100  $\mu\text{m}$  of cell membrane and length of apposition as a percentage of membrane length were calculated using the measurement tool of the image tool software (version 3.0; The University of Texas Health Center in Santo Antonio). The terminals were typed under high magnification (at least 25,000 $\times$ ) as F (with flattened synaptic vesicles, inhibitory inputs), S (with spherical synaptic vesicles, excitatory inputs),



or C (cholinergic inputs), according to the nomenclature of Conradi [26]. The distance between consecutive nerve terminals covering the motoneurons was also determined. The data are represented as mean  $\pm$  SE. In total, three neurons per animal in each of 3 groups of four animals were examined (n=12 neurons for each of 3 groups: VRA, VRA at peak of EAE and VRA during EAE remission).

### **Statistical analysis**

The data were analyzed by ANOVA and two-tailed Student's *t*-test for parametric data, or by a two-tailed Mann–Whitney U test for nonparametric data.  $p < 0.05$  (\*), and values with  $p < 0.01$  (\*\*) were considered statistically significant.

## **Results**

### **EAE increases T cell influx**

In order to monitor the presence of immune cells in the spinal cord microenvironment during the peak of EAE, immunohistochemistry for CD4+ and CD8+ lymphocytes, as well as CD11b+ macrophages, was performed. As seen in Figure 1, during peak disease a significant accumulation of T cells occurs, with a predominance of CD4+ T cells. In contrast, during remission and after avulsion alone, such influx of T cells is diminished or absent. Note the macrophage immunoreactivity in all studied groups.

### **EAE influences neuronal survival after VRA**

To quantify the effect of acute immune cell influx on survival of motoneurons, numbers of motoneurons were counted on lesioned and unlesioned sides. The raw data were subjected to Abercrombie's formula in order to avoid double counting (Table 1).

Figure 2 represents the percentage of surviving neurons in the different experimental groups. A neuroprotective effect of inflammation is present, which was statistically significant at  $p < 0.05$ , reflecting an approximately 50% increase in neuronal survival (VRA  $34.12\% \pm 6.58$ ; VRA+EAE-peak  $81.87\% \pm 8.03$ ; VRA+EAE-rem  $77.37\% \pm 13.72$  mean ratio ipsilateral/contralateral  $\pm$ SE). The absolute number of surviving motoneurons is presented in Table 1.

### **Reduction of synaptic elimination and decreased astroglial reaction after inflammation and ventral root avulsion (Figures 3, 4 and 5)**

In order to evaluate changes in VRA synaptophysin labeling after EAE, we performed quantitative measurements of synaptophysin immunoreactivity in sciatic motor nuclei of animals after avulsion alone, or after avulsion plus EAE induction at either exacerbation or remission stages. As shown in Figure 3, VRA alone led to a significant decrease in synaptophysin expression. In contrast, VRA plus EAE at exacerbation resulted in preservation of synaptophysin immunoreactivity, especially in the immediate vicinity of motoneurons, indicating a decreased loss of inputs, putatively in apposition to the alpha motoneurons. These results show that the preservation of inputs after avulsion combined with exacerbation of EAE is statistically different from VRA alone (VRA -  $0.29 \pm 0.02$ ; VRA+EAE-peak -  $0.51 \pm 0.11$ ; VRA+EAE-rem -  $0.34 \pm 0.06$ ; mean ratio ipsilateral/contralateral  $\pm$ SE).

Immunoreactivity against GFAP was used to analyze the degree of astroglial reactivity after avulsion and immunization (Figure 4). Figure 4A shows GFAP immunoreactivity in the spinal cord contralateral to the lesion in avulsed animals without EAE. This demonstrates the presence of GFAP-positive astrocytic processes in the microenvironment

close to large motoneurons. There was no additional GFAP immunolabeling in the contralateral spinal cord of animals with avulsion lesions + EAE (VRA -  $8.82 \times 10^3 \pm 7.5 \times 10^2$ ; VRA+EAE-peak -  $6.32 \times 10^3 \pm 6.6 \times 10^2$ ; VRA+EAE-rem -  $6.78 \times 10^3 \pm 7.8 \times 10^2$ ; integrated density of pixels  $\pm$ SE; Figure 4E). On the side ipsilateral to lesioning, there was a significant increase in astrocyte reactivity after ventral root avulsion as demonstrated by the presence of reactive gliosis in the affected segments of the spinal cord. Increased GFAP labeling was particularly concentrated in the vicinity of the avulsed motoneurons, suggesting a possible communication between lesioned neurons and glia (Figure 4B). However, the association of VRA with EAE resulted in less intense astrogliosis in the ipsilateral lesioned side both at peak disease and during remission (VRA -  $13.32 \times 10^3 \pm 7.4 \times 10^2$ ; VRA+EAE-peak -  $7.70 \times 10^3 \pm 9.8 \times 10^2$ ; VRA+EAE-rem -  $6.58 \times 10^3 \pm 7.3 \times 10^2$ ; integrated density of pixels  $\pm$ SE).

In contrast to the GFAP results, Iba1 immunolabeling in the contralateral sides of the three experimental groups showed increases in microglial reactivity with the association of EAE+VRA (VRA -  $1.69 \times 10^3 \pm 3.1 \times 10^2$ ; VRA+EAE-peak -  $3.86 \times 10^3 \pm 3.6 \times 10^2$ ; VRA+EAE-rem -  $4.76 \times 10^3 \pm 5.1 \times 10^2$ ; integrated density of pixels  $\pm$  SE; Figure 5E). However, the increases in microglial reactivity were not statistically different from the control group in the ipsilateral analysis, indicating that the combination of EAE+VRA did not result in further activation of microglial cells (VRA -  $8.25 \times 10^3 \pm 7.4 \times 10^2$ ; VRA+EAE-peak -  $10.34 \times 10^3 \pm 3.4 \times 10^2$ ; VRA+EAE-rem -  $11.11 \times 10^3 \pm 7.8 \times 10^2$ ; integrated density of pixels  $\pm$  SE).

### **VRA decreases synaptic elimination during the induction phase of EAE**

A series of synaptic changes were identified at the ultrastructural level after VRA through a detailed analysis of synaptic coverings of, as well as of numbers of inputs in apposition to, large motoneurons. Figure 6 shows normal neurons on the contralateral side of VRA-only spinal cords, and the process of synaptic retraction (on the ipsilateral side) that occurs following VRA. Such changes were most evident in the avulsed-alone group, with a 68% decrease in overall synaptic covering of ipsilateral, compared to contralateral, neurons (Figure 7) (normal contralateral neurons -  $73.40 \pm 13.54$ ; ipsilateral neurons after VRA -  $23.65 \pm 0.05$ ; VRA + EAE-peak -  $50.47 \pm 5.06$ ; VRA+EAE-rem -  $55.11 \pm 5.41$ ; mean ratio  $\pm$  SD). The number of inputs/100 $\mu$ m in apposition to the neuronal membranes after avulsion only was lower when compared to other groups. However, there was no statistical difference when comparing the avulsion alone to the immunized groups (contralateral side -  $39.49 \pm 3.37$ ; VRA -  $19.22 \pm 1.14$ ; VRA+EAE-peak -  $25.5 \pm 3.92$ ; VRA+EAE-rem -  $24.73 \pm 1.37$  mean ratio  $\pm$  SE).

Synapse types (F-terminals, representing inhibitory inputs; S-terminals, representing excitatory inputs; and C-terminals, representing cholinergic inputs) in apposition to the cell bodies were also studied (Figure 8). In this regard, there was a more prominent loss of both excitatory (S terminals) and inhibitory inputs after VRA only as compared to the other groups.

### **Patterns of terminal distribution after induction of EAE**

Figure 9 represents the pattern of synaptic terminal distributions along motoneuron surfaces in the different experimental groups. In normal neurons (on the contralateral side of VRA-only spinal cords) the interval between terminals was usually short, from 1 to 3  $\mu$ m, so that clusters of synapses could be identified. However, after VRA alone, the size of such intervals on the ipsilateral side increased up to 29  $\mu$ m, resulting in a decreased

frequency of short gaps. The immunized groups showed an intermediate pattern demonstrating partial retention of input clusters.

## **Discussion**

The present work indicates that active EAE may have a neuroprotective potential, demonstrable after a severe proximal nerve root lesion, namely ventral root avulsion (VRA). It has been shown that only a few T cells are recruited into the lesion site after this type of lesion [7]. In contrast, the course of EAE induces a substantial influx of CD4+ and CD8+ T cells to the spinal cord microenvironment, resulting in local upregulation of neurotrophic factors and cytokines. Such T lymphocyte migration into the CNS after lesioning or during the course of an autoimmune disease such as the EAE may play a role in regulating motoneuron survival [27, 28].

The neuroprotective role of inflammation has been addressed in some instances in the literature, and the presence of activated T cells and the subsequent release of cytokines and neurotrophic factors is thought to directly influence neuronal responses to injury. In fact, Serpe et al. [12] have shown a neuroprotective role for inflammation after injury resulting in increased survival of motoneurons following transection of the facial nerve. In this regard, involvement of the potent neurotrophic factor BDNF and two anti-inflammatory cytokines, namely IL-10 and transforming growth factor, have been demonstrated previously [29, 30]. This is in line with the work of Hammarberg et al. [4], who described rescue of a significant number of avulsed motoneurons in animals receiving MBP immunization leading to a monophasic form of EAE. Such neuroprotection was associated with the presence of elevated levels of NT-3, BDNF and GDNF, possibly produced by T and NK cells.

Our immunohistochemical data, as well as counts of motoneurons after VRA+EAE and avulsion alone, are in agreement with previous reports, and indicate that such a proximal nerve root lesion leads to a significant decrease of motoneuron-associated synaptic activity as manifested by decreased synaptophysin immunoreactivity. Also, both astrocytes and microglia became significantly reactive. The induction of EAE in VRA-lesioned animals resulted in partial preservation of synaptophysin labeling and rescue of lesioned motoneurons, indicating a neuroprotective role for T cell influx into the spinal cord. Also, this inflammatory process may have influenced glial responses to injury. This was particularly strong for astroglial reactions, which were milder when VRA was associated with EAE. Microglial cells, on the other hand, showed increased reactivity on the side ipsilateral to the lesion, but these changes were not statistically significant, indicating that the association of VRA+EAE did not significantly contribute to further activation of microglial cells.

The immunolabeling findings described herein are in agreement with our ultrastructural findings. Ultrastructural analysis has not been, to our knowledge, performed after the combination of VRA and exacerbation of EAE. Thus the present work aimed to give a detailed analysis of the synaptological changes induced by the evolution of EAE when associated with a proximal lesion that induces motoneuron degeneration. Compared to the contralateral side, there was synaptic loss on the side ipsilateral to VRA lesioning in the EAE-induced group, which is in agreement with previous findings [31 - 33]. However, the present results indicate that the combination of EAE and VRA results in statistically significant preservation of total synaptic coverings of motoneurons, in comparison to avulsion alone. To better understand whether there is a qualitative difference in pattern of synaptic detachment between the VRA+EAE and avulsion-alone situations, the fate of

various types of synapses was investigated, in a manner similar to described by Oliveira et al. [34]. Classification of synaptic terminals was based on the shape of vesicles within synaptic boutons, according to Conradi [26]. Interestingly, the greater synaptic covering found in VRA+EAE material was mainly associated with F terminals, which are more numerous than S inputs. Preferential elimination of glutamatergic inputs after a lesion to the spinal cord has been described previously [35]. In that study, a longitudinal incision in the ventral funiculus of the spinal cord, thus cutting motor axons very proximally, led to an extensive retraction of presynaptic terminals in apposition to the axotomized motoneurons. Such an input elimination is possibly controlled by the motoneuron itself, so that terminals using glutamate as neurotransmitter are disconnected to a larger extent than nerve terminals with inhibitory amino acids. This indicates that lesioned neurons avoid a process of excitotoxicity that could ultimately result in cell loss. In this way, it is possible that the upregulation of trophic factors described earlier by others may have a positive effect on motoneurons afferents, resulting in a greater survival ratio.

## **Conclusions:**

The present findings indicate that CNS inflammation may directly influence synaptic plasticity as well as stability of neuronal networks, increasing survival of lesioned neurons. Such events are possibly linked to the influx of lymphocytes and the production of various neurotrophic molecules that is associated with peak exacerbation of EAE.

## **List of abbreviations:**

VRA: Avulsion of lumbar ventral roots; BDNF: Brain derived neurotrophic factor; CGRP: Calcitonin gene-related peptide; CNS: Central nervous system; ChAT: Choline

acetyltransferase; GABA: Gamma-aminobutyric acid; MBP: Guinea pig myelin basic protein; GDNF: Glial derived neurotrophic factor; EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; EAE-peak: Peak of EAE; EAE-rem: Remission of EAE.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

ALRO provided the study concept, design and supervision. RB participated on the experimental design and acquisition of data. Both authors provided analysis and interpretation and participated in drafting of the manuscript. Both authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements:

This work was supported by CAPES, CNPq and Fapesp. Barbizan, R. received a scholarship from CAPES (Brazil). Oliveira, A.L.R. receives a fellowship from CNPq (Brazil).

## References

107. Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ: **Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity.** *Science* 2000, **290**: 2155-2158.
108. Risling M, Fried K, Lindå H, Cullheim S, Meier M: **Changes in nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in the spinal cord after ventral funiculus lesion in adult cats.** *J Neurocytol* 1992, **21(2)**:79-93.



109. Kobayashi NR, Fan DP, Giehl KM, Bedard AM, Wiegand SJ, Tetzlaff W: **BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and  $\alpha$ -tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration.** *Neurosci* 1997, **17**(24):9583-9595.
110. Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Lindå H, Van Der Meide PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F: **Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells.** *J Neurosci* 2000, **20**:5283-5291.
111. Lindå H, Piehl F, Dagerlind A, Verge VM, Arvidson U, Cullheim S, Risling M, Ulfhake B, Hokfelt T: **Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons.** *Exp Brain Res* 1992, **91**:284-295.
112. Piehl F, Hammarberg H, Tabar G, Hokfelt T, Cullheim S: **Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat motoneurons depends on age and type of injury.** *Exp Brain Res* 1998, **119**:191-204.
113. Piehl F, Arvidsson U, Johnson H, Cullheim S, Dagerlind A, Ulfhake B, Cao Y, Elde R, Pettersson RF, Terenius L: **Gap-3, aFGF, CCK and  $\alpha$ - and  $\beta$ -CGRP in rat spinal motoneurons subjected to axotomy and/or dorsal root severance.** *Eur J Neurosci* 1993, **5**: 1327-1333.
114. Aldskogius H, Svensson M: **Glial responses to synaptic damage and plasticity.** *J Neurosci Res* 1999, **58**:33-41.
115. Koliatsos VE, Price WL, Pardo CA, Price DL: **Ventral root avulsion: An experimental model of death of adult motor neurons.** *J Comp Neurol* 1994, **342**:35-44.
116. Oliveira ALR, Langone F: **GM-1 ganglioside treatment reduces motoneuron death after ventral root avulsion in adult rats.** *Neurosci Lett* 2000, **293**:131-134.
117. Piehl F, Lundberg C, Khademi M, Bucht A, Dahlman I, Lorentzen JC, Olson T: **Non-MHC gene regulation of nerve root injury-induced spinal cord inflammation and neuron death.** *J Neuroimmunol* 1999, **101**:87-97.
118. Serpe CJ, Kohm AP, Huppenbauer BC, Sanders VS, Jones KJ: **Exacerbation of facial motoneurons loss after facial nerve transection in severe combined immunodeficient (scid) mice.** *J Neurosci* 1999, **19**:1-5.
119. Piehl F, Lundberg C, Khademi M, Bucht A, Dahlman I, Lorentzen J, Olson T: **Non-MHC gene regulation of nerve root injury-induced spinal cord inflammation and neuron death.** *J Neuroimmunol* 1999, **101**:87-97.
120. Abercrombie M, Johnson ML: **Quantitative histology of wallerian degeneration: Nuclear population in rabbit sciatic nerve.** *J Anat* 1946, **80**:37-50.
121. Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P: **Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells.** *J Cell Biol* 1986, **103**:2511-2527.
122. Buffa R, Rindi G, Sessa F, Gini A, Capella C, Jahn R: **Synaptophysin immunoreactivity and small clear vesicles in neuroendocrine cells and related tumours.** *Mol Cell Probes* 1988, **2**:367-381.

123. Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B: **Postsynaptic clustering of major GABA<sub>A</sub> receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin.** *Nat Neurosci* 1998, **1**:563–571.
124. King AE, Chung RS, Vickers JC, Dickson TC: **Localization of glutamate receptors in developing cortical neurons in culture and relationship to susceptibility to excitotoxicity.** *J Comp Neurol* 2006, **498**:277–294.
125. Farjo R, Fliesler SJ, Naash MI: **Effect of Rds abundance on cone outer segment morphogenesis, photoreceptor gene expression, and outer limiting membrane integrity.** *J Comp Neurol* 2007, **504**:619–630.
126. Bulloch K, Miller MM, Gal-Toth J, Milner TA, Gottfried-Blackmore A, Waters EM, Kaunzner UW, Liu K, Lindquist R, Nussenzweig MC, Steinman RM, McEwen BS: **CD11c/EYFP transgene illuminates a discrete network of dendritic cells within the embryonic, neonatal, adult, and injured mouse brain.** *J Comp Neurol* 2008, **508**:687–710.
127. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. **Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1.** *Brain Res Mol Brain Res* 1998, **57**:1–9.
128. Oliveira AL, Lidman O, Piehl F, Hökfelt T, Kärre K, Lindå H, Cullheim S. **A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy.** *Proc Natl Acad Sci* 2004, **101**:17843–17848.
129. Zanon RG, Oliveira AL: **MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transection.** *Exp Neurol* 2006, **200**:521–531.
130. Emirandetti A, Zanon RG, Sahba M Jr, De Oliveira AL: **Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy.** *Brain Res* 2006, **1095**:35–42.
131. Sabha M Jr, , Emirandetti A, Cullheim S, Oliveira ALR: **MHC I expression and synaptic plasticity in different mice strains after axotomy.** *Synapse* 2008, **62**: 137–148.
132. Conradi S: **Ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in lumbosacral spinal cord of the adult cat.** *Acta Physiol Scand Suppl* 1969, **332**:5–48.
133. Aharoni R, Eilam R, Domev H, Labunskay G, Sela M, Arnon R: **The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice.** *Proc Natl Acad Sci* 2005, **102**:19045–19050.
134. Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Sela M, Cohen IR, Schwartz M: **T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damage optic nerve: possible therapy for optic neuropathies.** *Proc Natl Acad Sci* 2000, **97**: 7446–7451.
135. Aharoni R, Kayhan B, Eilam R, Sela M, Arnon R: **Glatiramer acetate specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ.** *Proc Natl Acad Sci* 2003, **100**:14157–14162.
136. Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Appel SH: **Cd4-t cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS.** *PNAS* 2008, **105(40)**:15558–15563.

137. Gehrman J, Gold R, Linington C, Lannes-Vieira J, Wekerle H, Kreutzberg GW: **Microglial involvement in experimental autoimmune inflammation of the central and peripheral nervous system.** *Glia* 1993, **7**: 50-59.
138. Marques KB, Santos LMB, Oliveira ALR: **Spinal motoneuron synaptic plasticity during the course of an animal model of multiple sclerosis.** *Europ J of Neurosc* 2006, **24**: 3053-3062.
139. Freria CM, Zanon RG, Santos LMB, Oliveira ALR: **Major histocompatibility complex class I expression and glial reaction influence spinal motoneuron synaptic plasticity during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Comp Neurol* 2009, **518**(7):990-1007.
140. Oliveira ALR, Thams S, Lidman O, Piehl F, Hökfelt T, Kärre K, Lindå H, Cullhem S: **A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy.** *PNAS* 2004, **101**(51): 17843-17848.
141. Lindå H, Shupliakov O, Ornung G, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Risling M, Cullheim S: **Ultrastructural evidence for a preferential elimination of glutamate-immunoreactive synaptic terminals from spinal motoneurons after intramedullary axotomy.** *J Comp Neurol* 2000, **425**: 10-23.

## Figure legends

### **Figure 1 – Immune cells in spinal cord ventral horn after VRA and EAE induction.**

Representative images of the sciatic nerve motor nucleus ipsilateral to the ventral root avulsion (VRA) in the studied groups. (A-C) CD4<sup>+</sup> T cell immunolabeling. (D-F) CD8<sup>+</sup> T cell immunolabeling. (G-I) CD11b-positive cell immunolabeling. A, D and G are ipsilateral to the VRA. B, E and H are ipsilateral to the VRA+EAE at peak disease. Observe the increased presence of T cells. C, F and I are ipsilateral to VRA+EAE during remission. (J) Graph representing the evolution of EAE in Lewis rats after immunization with MBP. Scale bar = 50  $\mu$ m.

### **Figure 2 – Motoneuron survival after avulsion is increased in EAE-induced groups.**

Motoneuron cell bodies of the normal (contralateral to lesion) side (A), VRA, ipsilateral side (B), VRA+EAE at peak disease, ipsilateral side (C), AVR+EAE-remission phase, ipsilateral side (D). Percentage of spinal motoneurons surviving after ventral root avulsion and immunization (E). Note a significant rescue of lesioned neurons in the EAE-induced groups (\* =  $p < 0.05$ ). Scale bar = 50  $\mu$ m.

### **Figure 3 - Synaptophysin immunolabeling in spinal cord ventral horn.**

Normal synaptophysin immunoreactivity on the side contralateral to the lesion (A). Observe the less intense labeling in the ipsilateral side after the avulsion alone (B); synaptic labeling is greater if avulsion is combined with EAE (C and D). (E) Graph representing quantification of immunolabeling for all groups. (F) Schematic representation of sciatic nerve motoneurons in ventral horn of spinal cord after ventral root avulsion. One motoneuron is shown in detail with apposed presynaptic terminals. The dashed circles

represent areas where measurements of the integrated density of pixels were performed. (\* =  $p < 0.05$ ). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

#### **Figure 4 - Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunolabeling in spinal cord ventral horn.**

Normal GFAP immunolabeling on the side contralateral to the lesion (A). Observe the increase in labeling on the ipsilateral side after avulsion alone (B). The combination of VRA and EAE (C and D) resulted in decreased astroglial reaction. E) Graph representing quantification of immunolabeling for all groups (ipsi and contralateral sides shown separately). (\*\* =  $p < 0.01$ ). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

#### **Figure 5 - Iba1 immunolabeling in spinal cord ventral horn.**

Normal immunolabeling for Iba1 on the side contralateral to the lesion (A). Avulsed side (B) showing a marked increase in Iba-1 labeling, which was comparable in both lesioned and EAE-induced groups (C and D). (E) Graph representing quantification of immunolabeling for all groups. (ipsi and contralateral sides shown separately) (\* =  $p < 0.05$ ). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$

#### **Figure 6 – Ultrastructure of synapses apposed to alpha motoneurons.**

Normal input coverings of the surface of an alpha motoneuron (A-B). Synaptic covering with partially detached terminals intermingled with astrocytes in VRA alone (C and D), VRA-EAE-peak (E and F) and VRA-EAE-rem groups (G and H). In A, C, E and G, one of the terminals is highlighted in yellow and the motoneuron cytoplasm is colorized in cyan. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$

#### **Figure 7 – Ultrastructural analysis of alpha motoneuron synaptic coverings.**

Quantitative ultrastructural analysis of synaptic coverings and number of boutons/100 $\mu\text{m}$  of motoneuron membrane. (A) Percentage reduction in synaptic covering in the experimental

groups after injury as well as a protective effect of inflammation. (B) Number of boutons/100µm of membrane; there were no statistically significant differences between the lesioned groups. Bars marked with different letters are statistically different at  $p<0.05$ .

**Figure 8 - Synaptic terminal analysis based on the morphology of synaptic vesicles.**

Detailed quantitative analysis of F, S and C terminals. (A) Synaptic coverings, (B) Number of boutons/100 µm of motoneuron membrane and (C) Bouton length. Bars marked with different letters are statistically different at  $p<0.05$ .

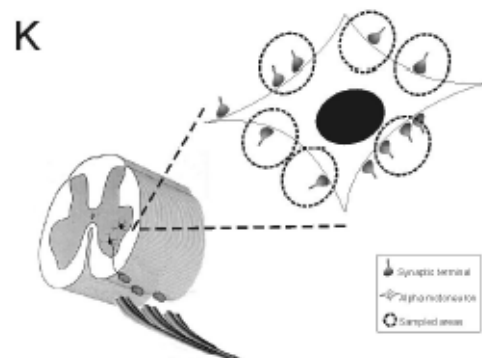
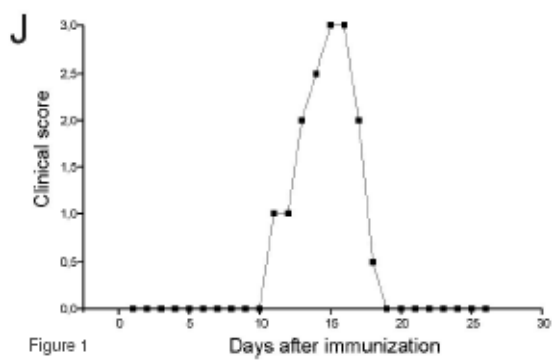
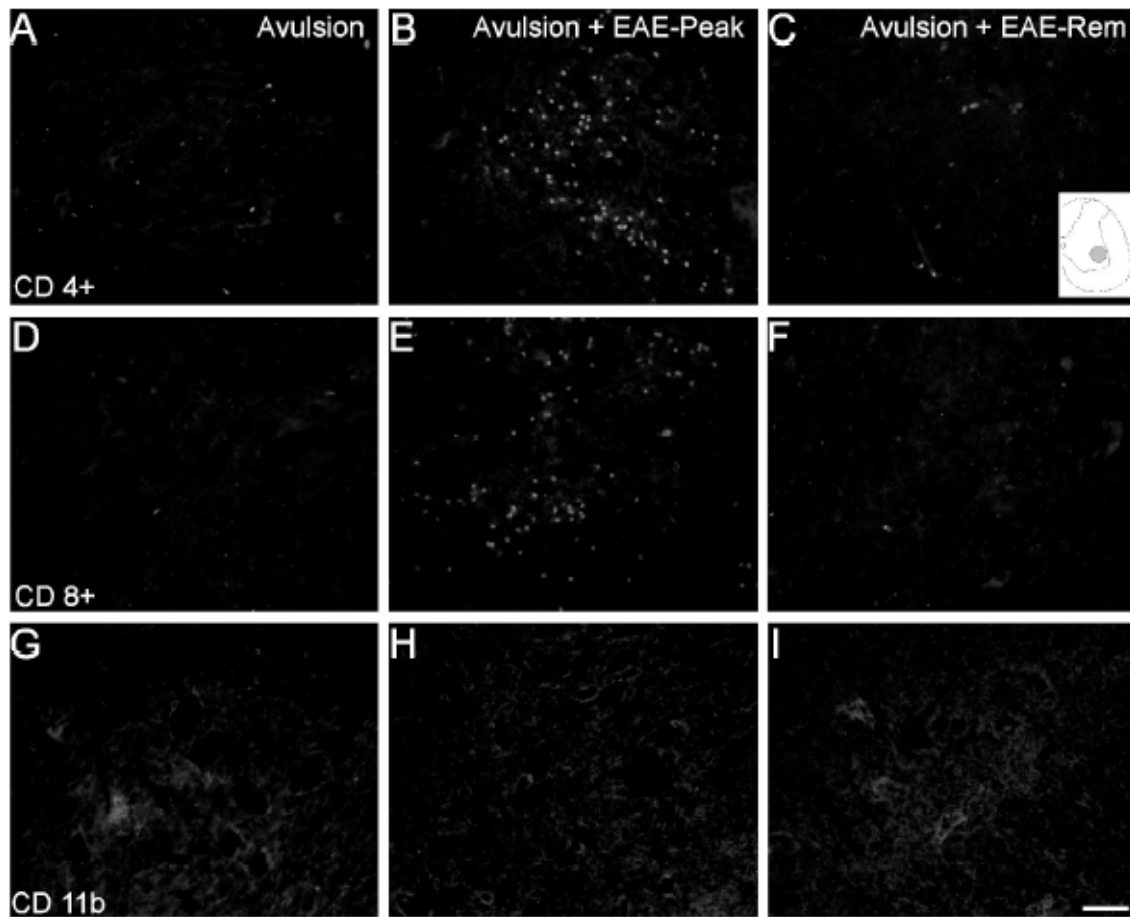
**Figure 9 - Clustering of terminals on the surfaces of motoneurons after VRA and EAE induction.**

Distribution of gap lengths between clusters of terminals apposing motoneuron soma cell membranes. (A) Normal distribution of intervals between nerve terminals showing that boutons are organized in clusters of inputs. (B) Distribution in VRA-only animals showing alteration by extensive retraction of terminals. (C and D) Decreased presence of large gaps between terminals after the combination of EAE and VRA.

## **Table**

**Table 1 - Motoneuron counts after avulsion and EAE induction.** The first row contains the absolute mean number of neurons sampled per section on the ipsilateral and contralateral sides of the spinal cord in the different experimental groups. The second row contains the mean number of surviving neurons after correction using Abercrombie's formula.

	Avulsion		Avulsion + EAE-peak		Avulsion + EAE-rem	
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
Number of neurons per section	1.76±0.55	4.88±0.98	4.64±1.01	5.32±0.65	3.64±1.26	5.22±1.03
Abercrombie's formula	0.90±0.26	2.41±0.44	2.39±0.46	2.90±0.31	2.14±0.66	2.72±0.48



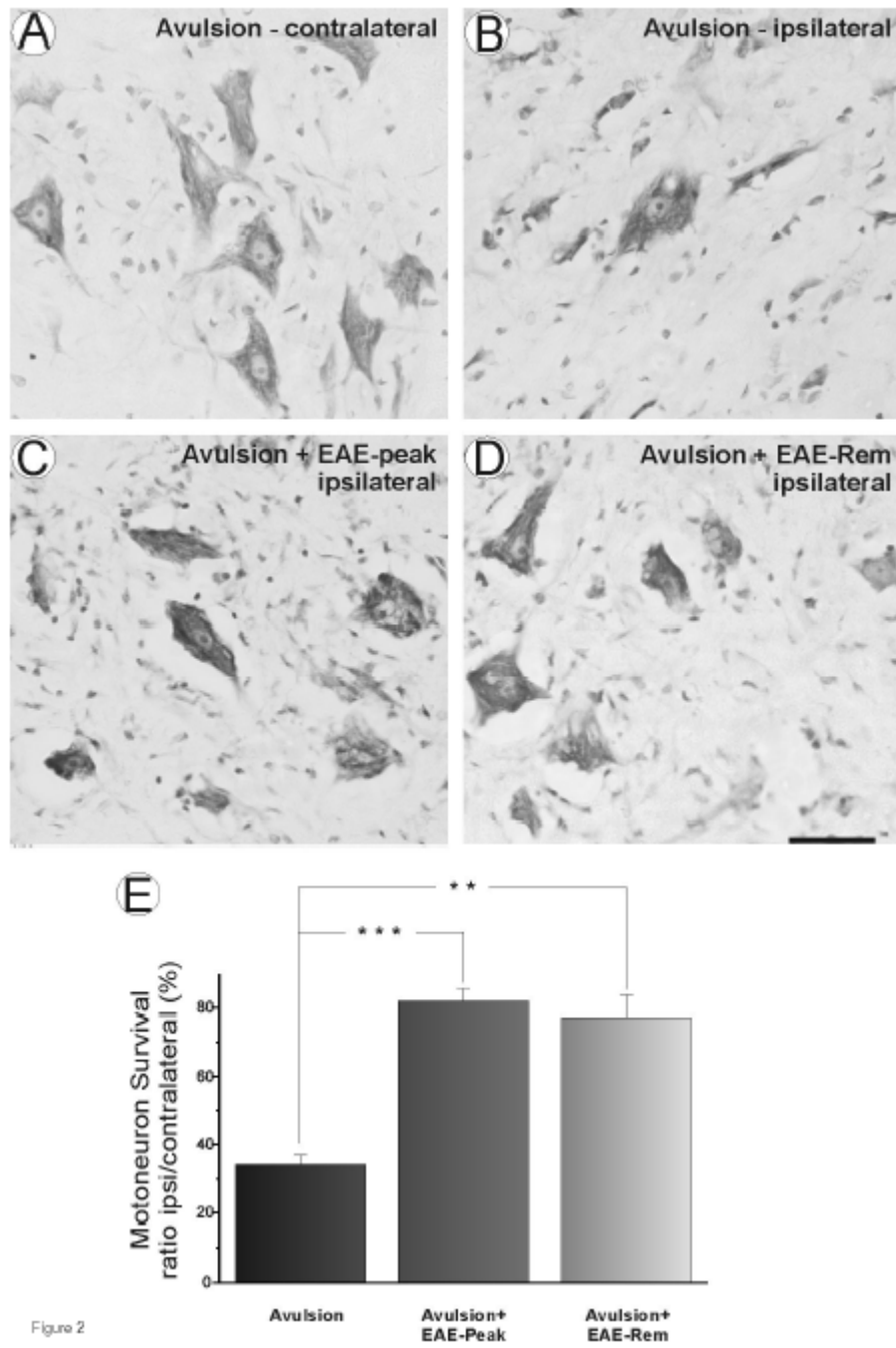


Figure 2



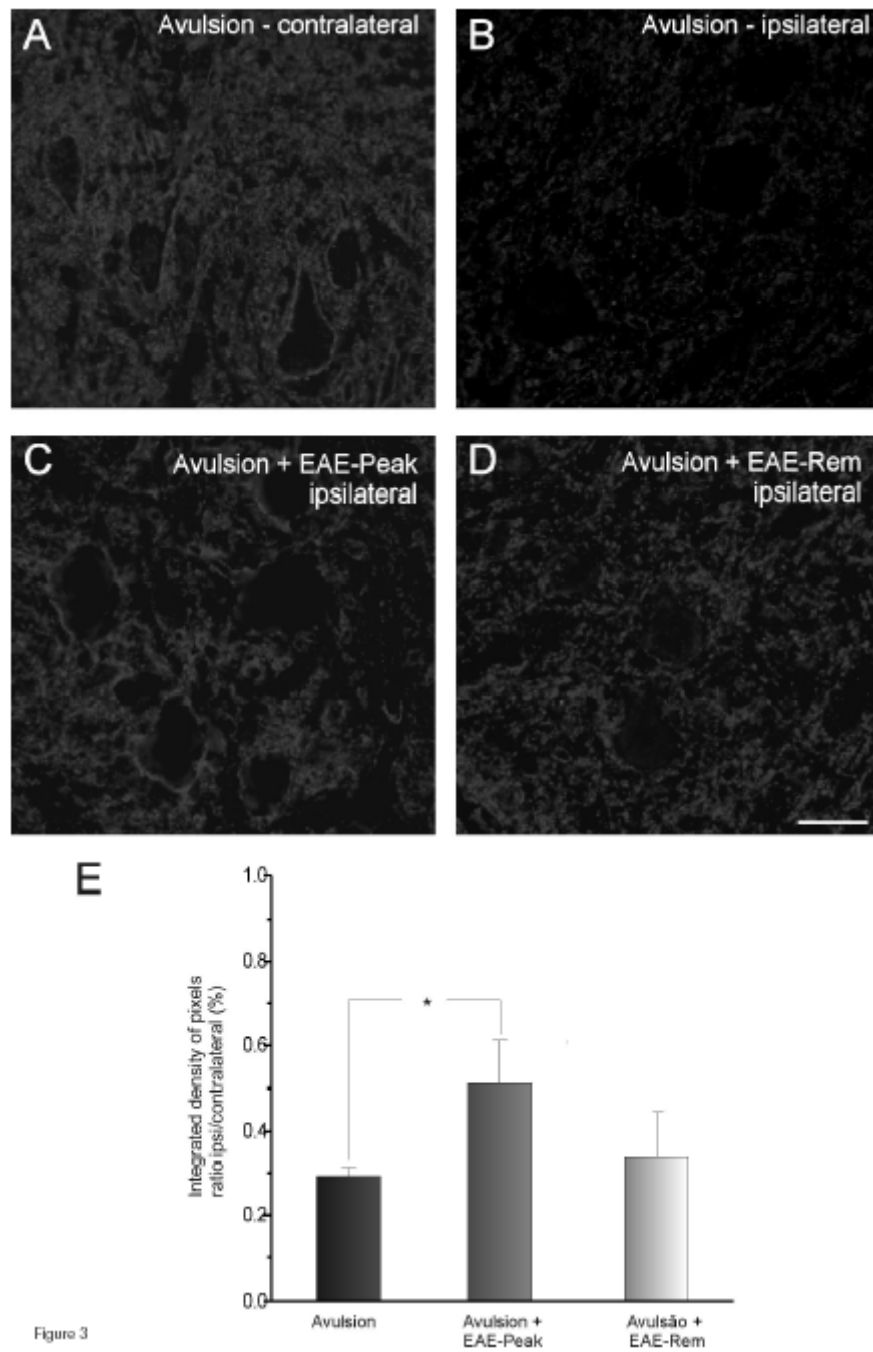


Figure 3

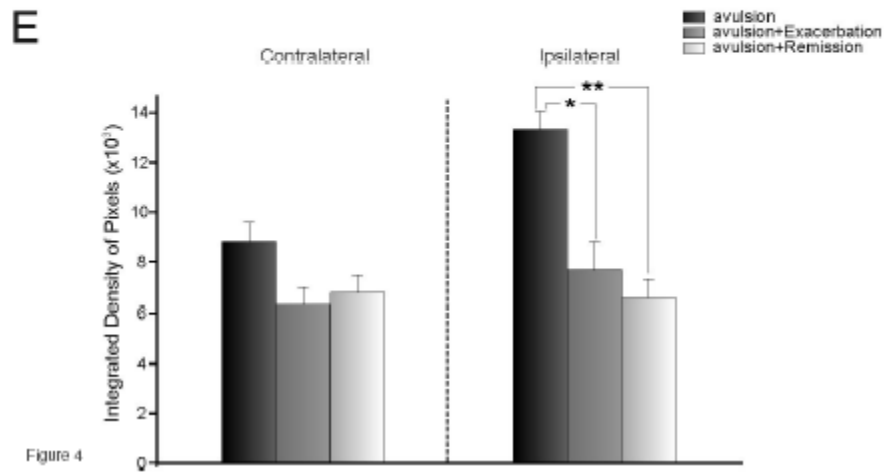
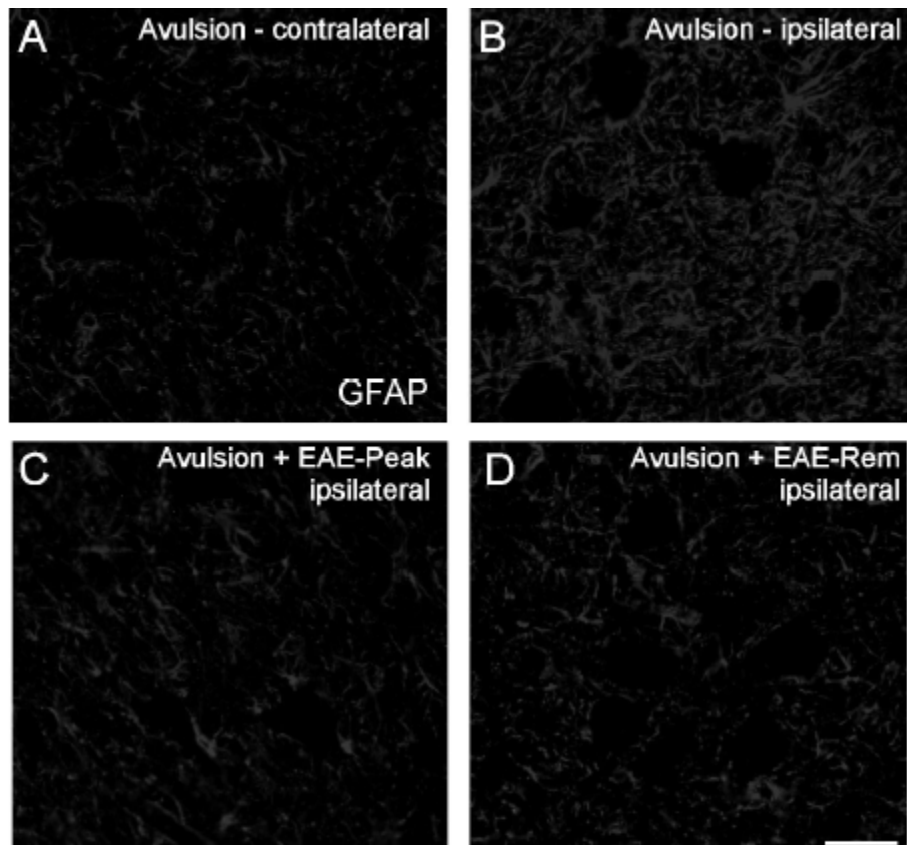
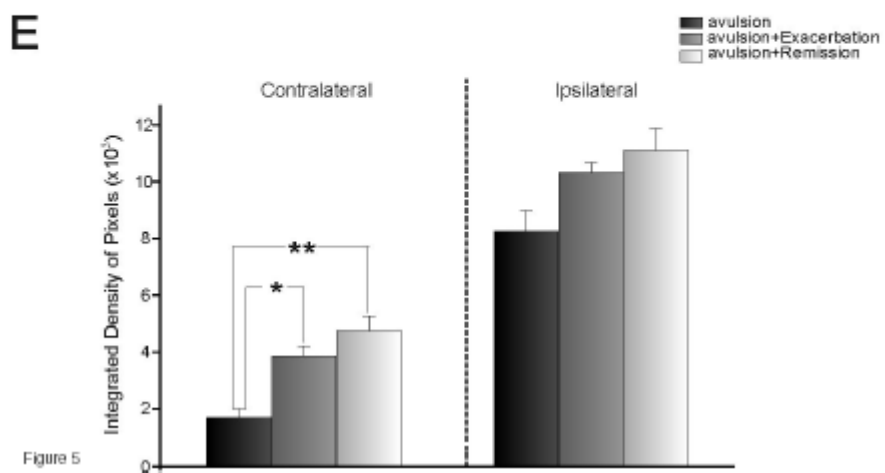
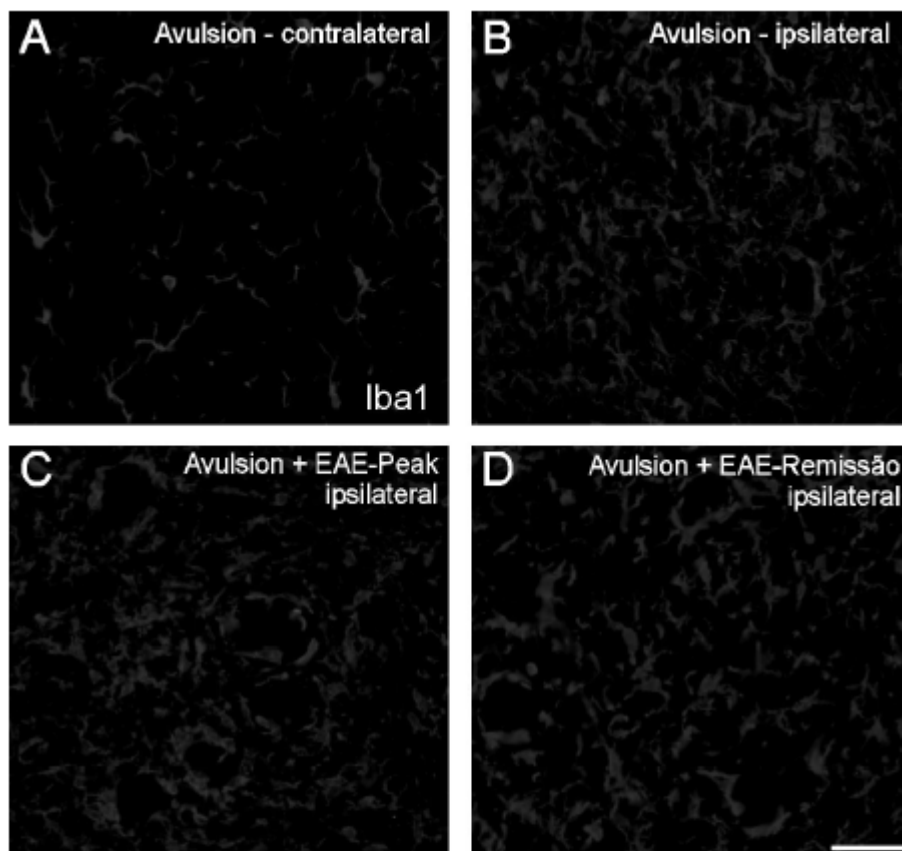
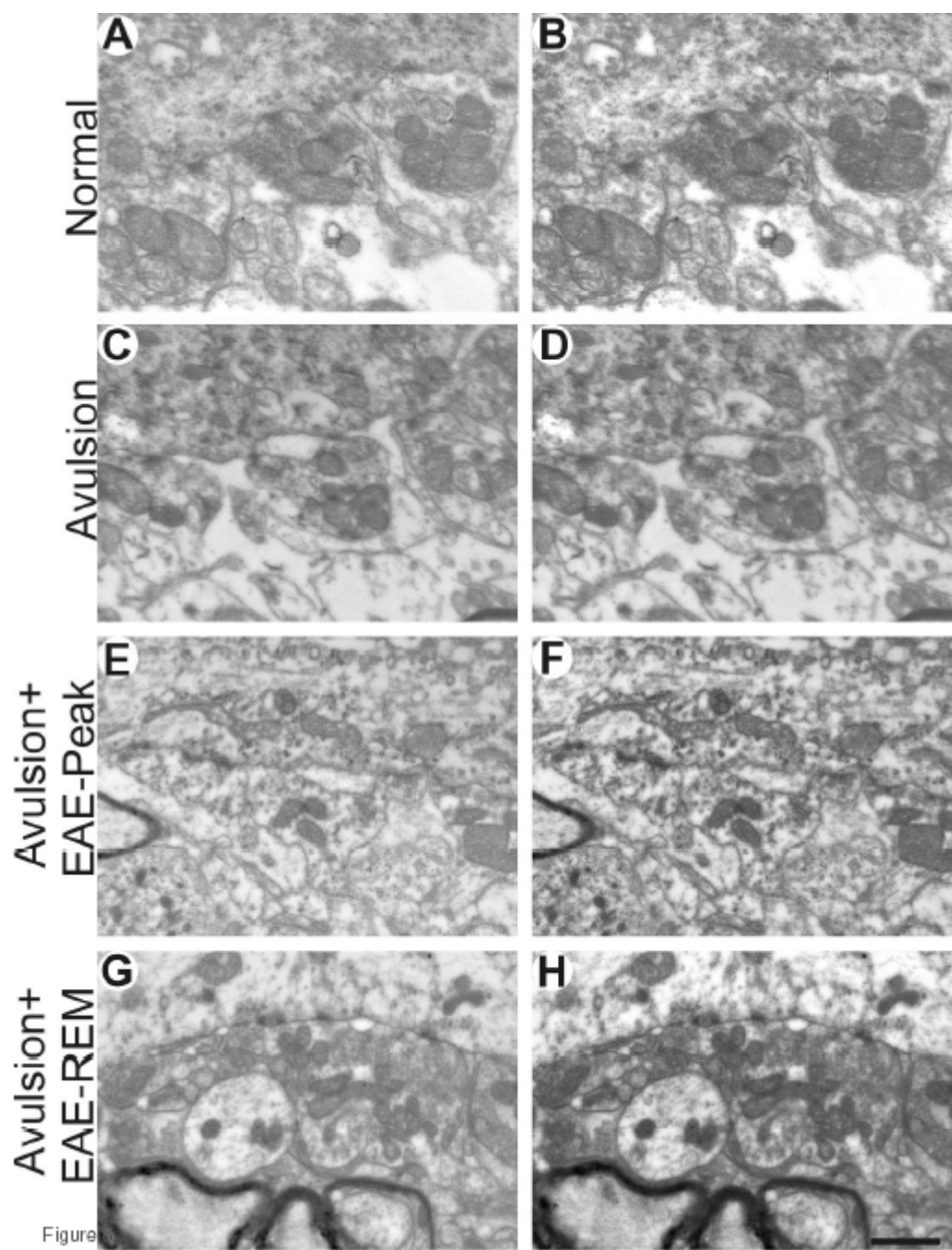
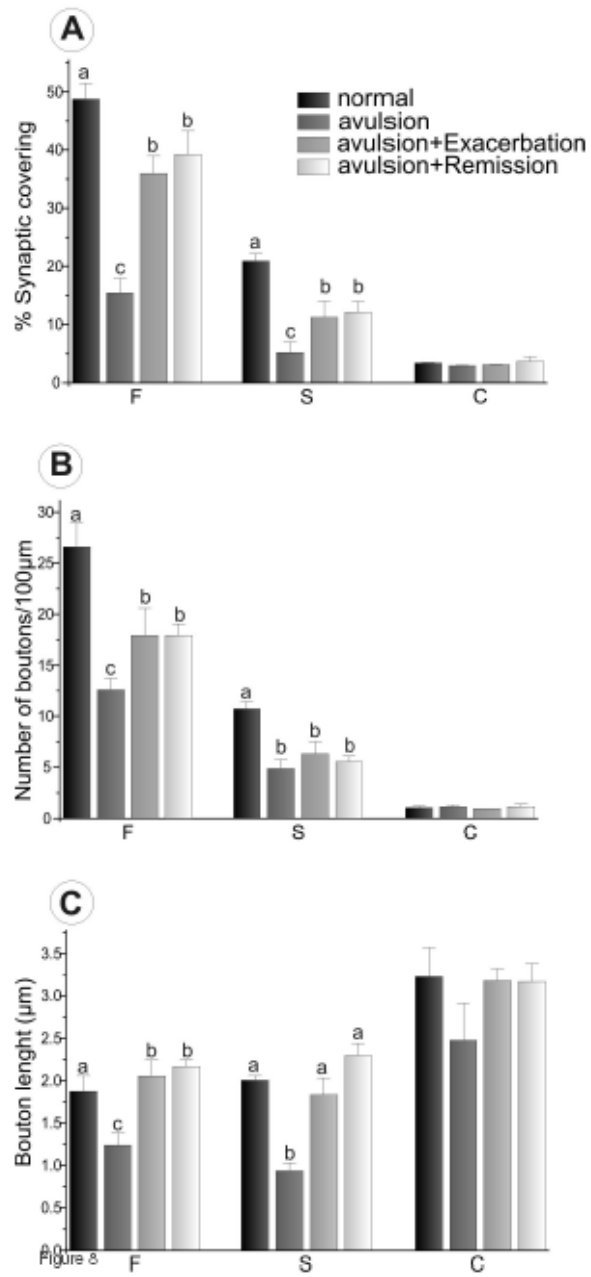
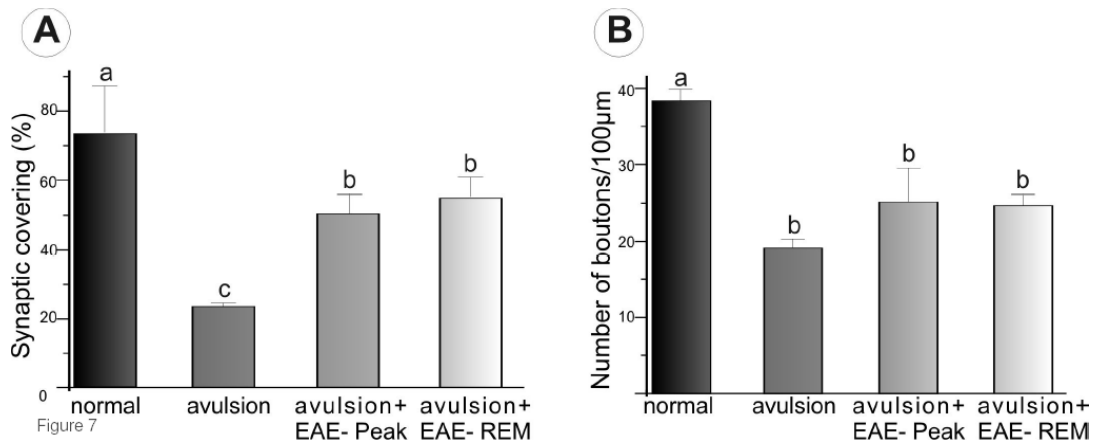
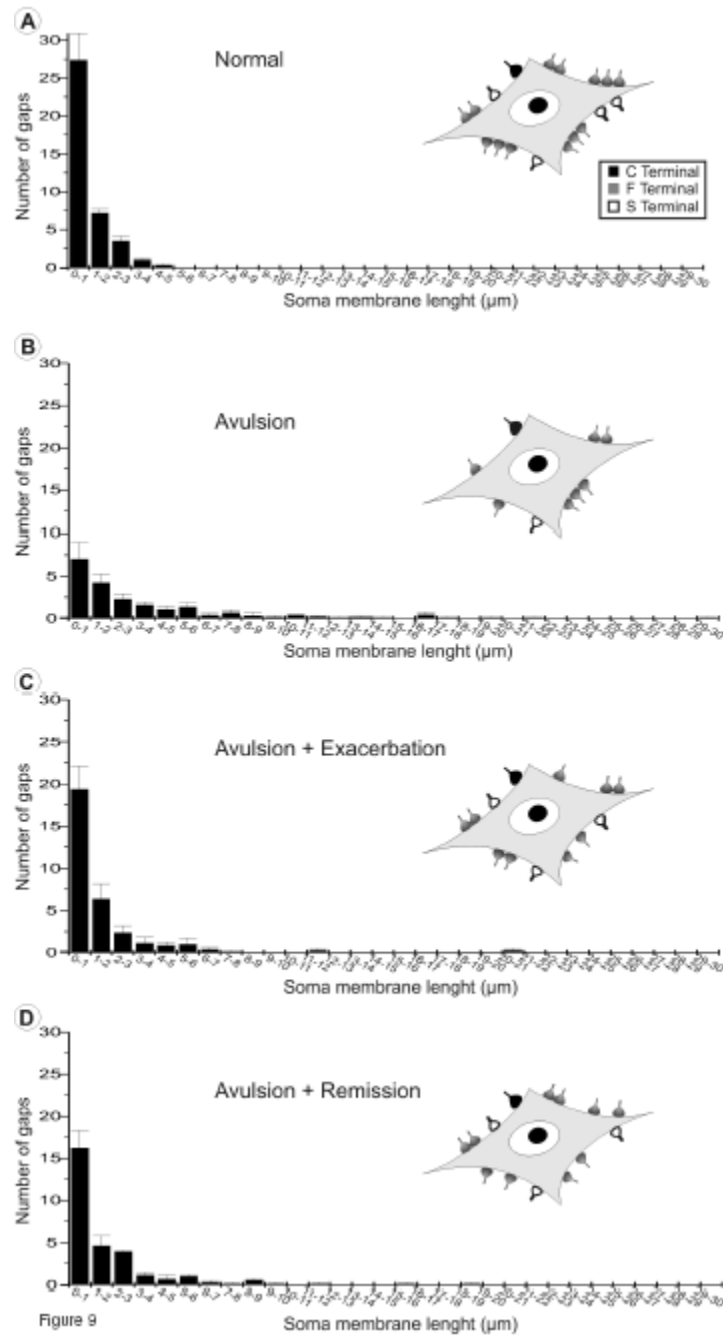


Figure 4









## DECLARAÇÃO

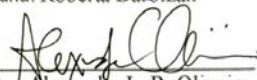
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada "Impacto da inflamação aguda em motoneurônios após avulsão das raízes nervosas.":

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

(X) tem autorização da seguinte Comissão de Bioética ou Biossegurança\*: Comissão de Ética em Experimentação Animal, sob Protocolo nº proc. nº 1494-1.

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

  
Aluna: Roberta Barbizan

  
Orientador: Alexandre L. R. Oliveira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:  
(X) Deferido ( ) Indeferido

  
Nome: \_\_\_\_\_  
Função: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO  
Presidente  
Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEa/IB - UNICAMP



CEEAA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEAA/Unicamp**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 1494-1, sobre "Impacto da inflamação aguda sobre a plasticidade sináptica de motoneurônios espinhais após avulsão das raízes nervosas", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira / Roberta Barbizan, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em 31 de março de 2008.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 1494-1, entitled "Impact of acute inflammation on spinal motoneuron synaptic plasticity following ventral root avulsion", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 31, 2008.

Campinas, 31 de março de 2008.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Afonso  
Secretária Executiva