

**ROBERTA BARBIZAN PETINARI**

**" Emprego de selante de fibrina combinado com células  
mononucleares de medula óssea no reparo de raízes  
motoras após a avulsão na interface do sistema nervoso  
central e periférico "**

**Campinas, 2014**







**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**ROBERTA BARBIZAN PETINARI**

**"Emprego de selante de fibrina combinado com células  
mononucleares de medula óssea no reparo de raízes  
motoras após a avulsão na interface do sistema nervoso  
central e periférico"**

Este exemplar corresponde à redação final  
da Tese defendida pela candidata

*Roberta Barbizan Petinari*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Estrutural do Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas  
para obtenção do Título de Doutora  
em Biologia Celular e Estrutural, na  
área de Anatomia.

Orientador: Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

**Campinas, 2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B234e Barbizan Petinari, Roberta, 1982-  
Emprego do selante de fibrina combinado com células mononucleares de medula óssea no reparo de raízes motoras após avulsão na interface do sistema nervoso central e periférico / Roberta Barbizan Petinari. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Raízes nervosas espinhais. 2. Células da medula óssea. 3. Selante de fibrina. 4. Regeneração nervosa. 5. Neurônios motores. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Use of fibrin sealant associated with mononuclear cells to repair motor roots at CNS/PNS interface

**Palavras-chave em inglês:**

Spinal nerve roots

Bone marrow cells

Fibrin sealant

Nerve regeneration

Motor neurons

**Área de concentração:** Anatomia

**Titulação:** Doutora em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira [Orientador]

Guilherme de Araújo Lucas

Marcondes Cavalcante Franca Junior

Valéria Paula Sassoli Fazan

João Damasceno Lopes Filho

**Data de defesa:** 14-03-2014

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

Campinas, 14 de março de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

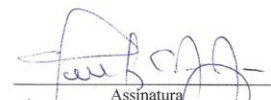
Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira (Orientador)

  
Assinatura

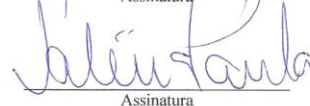
Dr. Guilherme de Araújo Lucas

  
Assinatura

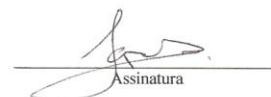
Dr. Marcondes Cavalcante Franca Junior

  
Assinatura

Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan

  
Assinatura

Dr. João Damasceno Lopes Filho

  
Assinatura

Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Dra. Cristina Pontes Vicente

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Dr. Edson Rosa Pimentel

\_\_\_\_\_  
Assinatura



*Todas as coisas foram feitas por intermédio dele;*

*sem ele, nada do que existe teria sido feito.*

*João 1:3 (NVI)*



## ABSTRACT

Ventral root avulsion (VRA) is an experimental model of proximal axonal injury at the central/peripheral nervous system interface that results in expressive neuronal death. In order to decrease neuronal degeneration, bone marrow stem cell (BMSC) has been proposed to treat such injuries. However, BMSC therapy is not effective without concurrent root replantation. In this sense, the use of a brasilian fibrin sealant, may be useful to facilitate the reconnection of avulsed roots at the spinal cord surface. The aim of the present work was to study the neuronal survival, synaptic plasticity, glial reaction and neurotrophic factor (BDNF and GDNF) production in the spinal motoneuron microenviroment and nerve regeneration after VRA and replantation with fibrin glue associated with BMSC therapy. Female Lewis rats (7 weeks old) were subjected to VRA and roots replantation. The animals were divided into the following groups (n=5 for each group): Group 1 – avulsion only; Group 2 – avulsion and DMEM injected; Group 3- the roots were replanted with fibrin sealant; Group 4 - the avulsed roots were repaired with fibrin sealant associated with BMSC; Group 5 – the avulsed roots were repaired with sealant and BMSC injected at the respective spinal cord segments. EGFP-Lewis rats were used as BMSC donors. Flow cytometry was used to characterize the BMSC. The rats were sacrificed (1, 4, 8 and 12 weeks after surgery) and their lumbar intumescences processed for motoneuron counting, immunohistochemistry (used antisera: GFAP- glial fibrillary acidic protein, an astroglial marker; Iba-1- ionized calcium binding adaptor molecule, a microglial marker; synaptophysin - a synaptic marker and BDNF - brain derived neurotrophic factor) and PCR (Iba-1, GFAP, BDNF, GDNF). Nerve regeneration was assessed by morphological analysis of the sciatic nerve (nerve size, number and morphology of myelinated fibers) and motor function recovery (walking track test). The results indicated preservation of synaptic covering of the lesioned motoneurons and neuronal survival in the groups repaired with sealant alone and SCT treated. The replanted groups did not show significant changes in microglial response as compared to VRA by immunohistochemistry although these changes were observed at lumbar by PCR. Replanted groups show changes in astrogliosis reaction at motoneuron vicinity 12 weeks after surgery. Additionally, the cell transplanted group showed increased neurotrophins expression by PCR analysis. Nerve regeneration results indicated that the replantation alone or associated with BMSC promoted improvement in motor recovery and the intensity of the pressure exerted by the paws. Moreover, the average number of myelinated axons was higher in treated group when compared to avulsion only. In addition to counting of axons, the morphometric analysis of different parameters namely the diameter of nerve fibers, diameter of axons, thickness of myelin sheath and ratio "g" were significantly improved after reimplantation of ventral roots. The present data suggest that the repair of avulsed roots with the fibrin sealant alone or associated with BMSC is neuroprotective and contributes to the maintenance of spinal cord circuits leading to regeneration and recovery of motor function.





## RESUMO

A avulsão de raízes motoras (ARV) tem se mostrado um modelo experimental reprodutível de degeneração de neurônios motores em ratos adultos. O emprego da ARV permite investigar degeneração/neuroproteção e plasticidade sináptica em motoneurônios, bem como testar a eficiência de diferentes tratamentos, devido à atual impossibilidade de reparo eficiente de lesões no sistema nervoso central (SNC). Os motoneurônios lesados têm potencial regenerativo após o reimplante de raízes nervosas, podendo servir como um modelo de regeneração no SNC. Contudo, na maioria das vezes, o reimplante das raízes não é suficiente para se obter retorno funcional, uma vez que a lesão causa grande perda neuronal. Há, portanto, necessidade do desenvolvimento de estratégias para diminuição da morte neuronal pós-lesão e direcionamento dos neuritos para seu alvo correto. O emprego de selante de fibrina pode auxiliar nesse processo e sua aplicação abre ainda a possibilidade de associação com células mononucleares de medula óssea (CMMO), as quais secretam fatores tróficos. Assim, o presente trabalho visa contribuir para o futuro emprego clínico desta abordagem terapêutica, preenchendo uma importante lacuna nos procedimentos reparativos após a avulsão. No presente trabalho, investigamos a eficácia do selante de fibrina, juntamente com o efeito neuroprotetor de CMMO de ratos Lewis-GFP, após avulsão e reimplante das raízes motoras. As intumescências lombares desses animais foram dissecadas e analisadas até 12 semanas após a AVR. Microscopia de luz foi empregada para a investigação da sobrevivência neuronal, quantificação das fibras nervosas e sua morfometria. Imunoistoquímica foi realizada para análise da estabilidade sináptica e da gliose reativa e RT-PCR foi utilizada para quantificação de transcritos gênicos para neurotrofinas, Iba-1 e GFAP. Microscopia eletrônica de transmissão foi usada para detectar possíveis alterações no equilíbrio de inputs excitatórios/inibitórios e avaliação motora foi realizada pelo *walking track test*. Os resultados do presente estudo indicam que ocorreu neuroproteção pelo reimplante com o selante de fibrina, com preservação parcial da cobertura sináptica dos motoneurônios resgatados. Não foram observadas diferenças na reatividade microglial na fase crônica pós-lesão, entre os grupos estudados por imunistoquímica. No entanto, mais transcritos gênicos de Iba-1 foram obtidos 1 semana pós-cirúrgica no grupo com CMMO. Já em relação à astrogliose reativa, foi vista maior reatividade no grupo somente avulsão, 12 semanas após a lesão. Foi observada, também, produção de BDNF e GDNF após 1 semana pelas CMMO. Há maior número de fibras nervosas nos grupos com reimplante e essas fibras apresentaram diâmetros e espessura da bainha de mielina mais próximas ao controle, em relação ao grupo somente avulsão. Ainda foi observado que os grupos com reimplante, utilizando selante de fibrina, apresentaram melhor recuperação motora, analisada pelo cálculo do índice funcional do nervo fibular e da pressão exercida pela pata traseira. Em conjunto, podemos afirmar que o reimplante das raízes ventrais com selante de fibrina, associado ou não às CMMO, resultou em melhora da capacidade regenerativa dos neurônios após lesão e, conseqüentemente, recuperação da capacidade motora.



## **Sumário**

Dedicatória.....	xiii
Agradecimentos.....	xix
Lista de Abreviaturas .....	xxi
Lista de Figuras.....	xxiii
Lista de Tabelas.....	xxxix
1- INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Medula e Nervos Espinais.....	1
1.2 Motoneurônios e Células da Glia medulares.....	3
1.3 Avulsão e resposta à lesão.....	7
1.4 Reimplante de raízes medulares.....	12
1.5 Selante de fibrina e seu uso no SN.....	14
1.6 Células Tronco Mononucleares de Medula Óssea.....	16
2- JUSTIFICATIVA.....	19
3- OBJETIVOS.....	21
3.1-Objetivos Gerais.....	21
3.2-Objetivos Específicos.....	21
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1-Grupos experimentais.....	23
4.2-Obtenção das Células Tronco Mononucleares.....	24
4.2.1- Animais GFP.....	24
4.2.1.1- Extração do DNA.....	24
4.2.1.2- PCR.....	24
4.2.2- Extração das células derivadas da medula óssea.....	25
4.2.3 - Análise quantitativa celular.....	26
4.2.4 - Análise da viabilidade celular.....	26
4.2.5 – Caracterização das CMMO.....	27

4.3- Avulsão das raízes motoras.....	29
4.4- Reimplante das raízes motoras.....	29
4.5-Transplante de células tronco mononucleares.....	30
4.6- Sacrifício dos animais.....	30
4.7- Sobrevivência neuronal.....	31
4.8- Imunoistoquímica.....	31
4.8.1- Análise quantitativa dos resultados.....	32
4.9 - Quantificação relativa dos transcritos gênicos in vivo.....	33
4.9.1 Extração do RNA total .....	33
4.9.2- Quantificação de RNA.....	33
4.9.3- Síntese do DNA complementar.....	34
4.9.4- Desenho dos primers .....	34
4.9.5- Padronizações.....	35
4.9.5.1- Especificidade de amplificação.....	35
4.9.5.2 Determinação da eficiência dos primers.....	35
4.9.6- Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real.....	36
4.9.7- Análise dos dados.....	38
4.10 -Processamento do material para MET .....	39
4.10.1 Análise da medula espinal nas secções ultra-finas.....	40
4.11- Análise morfométrica do nervo .....	41
4.12- Avaliação Motora da Recuperação Funcional .....	43
4.13- Análise estatística dos resultados .....	43
5- RESULTADOS.....	45
5.1- Enxerto das CMMO.....	45
5.2- Efeito neuroprotetor do selante de fibrina associado ao tratamento celular sobre os motoneurônios axotomizados .....	46
5.3 Redução do processo de eliminação sináptica, avaliada através da expressão de sinaptofisina .....	50
5.4 Reatividade glial .....	55

5.5 Neurofilamentos.....	64
5.6.1 Detecção de Fatores Neurotróficos.....	64
5.6.2 Produção de neurotrofinas e receptores após o transplante.....	65
5.6.3 Quantificação relativa dos transcritos gênicos para BDNF, GDNF, GFAP e Iba-1 .....	68
5.7 Análise ultraestrutural da medula espinal.....	73
5.7.1 Análise ultraestrutural dos tipos de terminais após avulsão.....	77
5.7.2 Padrão de distribuição dos terminais após avulsão.....	82
5.8 Regeneração Axonal.....	85
5.9 Parâmetros Morfométricos.....	86
5.9.1 Diâmetro dos Axônios Mielínicos (DAM).....	86
5.9.2 Diâmetro das Fibras Nervosas (DFN).....	87
5.9.3 Espessura da Bainha de Mielina (EBM).....	88
5.9.4 Razão “g” (RZG) .....	88
5.10- Recuperação da função motora dos animais que tiveram o implante das raízes .....	89
6- DISCUSSÃO.....	91
6.1 – Aumento da sobrevivência neuronal nos grupos com implante .....	92
6.2 Plasticidade sináptica.....	93
6.3- Reatividade Glial.....	95
6.4- Neurotrofinas e interleucinas.....	96
6.5- Regeneração axonal e recuperação funcional.....	97
7– CONCLUSÕES .....	103
8- REFERÊNCIAS.....	105



*Este trabalho é dedicado aos meus pais Bete e  
José Roberto e ao meu marido Leandro pela  
confiança e apoio incondicional.*





## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me dar forças e me guiar a cada dia.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem e incentivarem e pelo amor incondicional;

Ao Leandro, por ser essa pessoa maravilhosa e estar diariamente ao meu lado me motivando e ajudando;

Ao meu irmão e sua família por todo o carinho;

Ao meu orientador, Prof. Alexandre L. R. de Oliveira, por me acolher em seu laboratório. Obrigada por todo aprendizado, apoio e oportunidades. Obrigada pela confiança, paciência e tempo despendido com meu trabalho;

À UNICAMP, por permitir acesso ao conhecimento e por toda a estrutura em ensino e pesquisa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, sua coordenação e especialmente à secretária Líliam pela ajuda na parte burocrática;

À FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado, que propiciaram a execução deste trabalho;

Ao CEMIB e todos os animais que perderam a vida por esse trabalho.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas, Prof. Dr. Marcondes Cavalcante Franca Junior, Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan, Prof. Dr. João Damasceno Lopes Filho, Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr, Profa. Dra Cristina Pontes Vicente e Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel que aceitaram compor minha banca;

Aos professores Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes e Alfredo Miranda de Goes, sua aluna Juliana Lott Carvalho e à UFMG, pela concessão dos animais GFP e por toda a disponibilidade e auxílio para execução da citometria de fluxo e ao casal amigo Patrícia e Caique que me receberam em suas casa em Belo Horizonte;

Ao Marcus Corat e Ana Leda Longhini por toda ajuda e discussões científicas;

Aos professores Prof. Dr. Benedito Barraviera e Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior e ao CEVAP (Unesp-botucatu) por cederem o selante de fibrina.

Aos professores do departamento de Anatomia e do programa, por todos os ensinamentos e especialmente à professora Shirley por me ceder espaço em seu laboratório;

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, Nori e Marquinho pela ajuda na realização dos experimentos e técnicos Walter, Paulo e Tony pelo auxílio;

Às técnicas do laboratório de Microscopia Eletrônica, Antônia, Adriane e Stela pela ajuda no microscópio eletrônico e à secretária Ana Floriana por toda ajuda;

Aos amigos do departamento de Anatomia pelo convívio;

Aos amigos do Laboratório de Regeneração Nervosa: Aline, André, Camila, Carol, Elisa, Fabiana, Gabriela, Gleidy, Giuliana, Giuliano, Gustavo, Juliana, Luciana, Luiza, Kyl, Marta, Mateus, Matheus, Natália, Rafaela, Roberto, Rodrigo, Sérgio, Sergiy, Sheila, Suzana pela ajuda, discussão científica, diversão e cafézinhos.

Aos alunos de iniciação Lucas Buzeli e Mateus Vidigal que me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho, em especial ao Mateusinho no árduo trabalho de morfometria e por estar sempre presente ajudando;

À todos os amigos e familiares e ao meu cachorro, que fazem os fardos ficarem mais leves.



## **LISTA DE ABREVIATURAS:**

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro  
BSA - Albumina de soro bovino  
CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica  
CNTF - Fator neurotrófico ciliar  
CS – Célula de Schwann  
CMMO -: Células-tronco mononucleares de medula óssea  
DAM - Diâmetro dos axônios mielínicos  
DF - Diâmetro das fibras mielínicas  
DMEM - Meio de Eagle modificado pela Dubelco  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
EBM - Espessura da bainha de mielina  
EGFP - Proteína verde fluorescente potencializada  
GABA- Ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GDNF - Fator neurotrófico derivado da glia  
GFAP - Proteína fibrilar ácida glial  
IBA1- Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1)  
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina-1  
IH - Imunoistoquímica  
IL-1 - Interleucina-1  
IL-6 - Interleucina-6  
MET - microscopia eletrônica de transmissão  
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade  
NGF - Fator de crescimento do nervo  
NT-3 - Neurotrofina-3  
PBS - Tampão fosfato salino  
PCR - Reação em cadeia da polimerase  
PFI - Índice funcional do nervo fibular  
PL - Comprimento da pata  
RZG - Razão "g"  
SF- Selante de fibrina  
SN - Sistema nervoso  
SNC - Sistema nervoso central  
SNP - Sistema nervoso periférico  
TS - Largura da



## LISTA DE FIGURAS:

**Figura 1:** Esquema de hemi-medula espinal. A imagem representa um corte transversal da medula ao nível lombar, mostrando a formação do nervo espinal. 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.

**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. S: azul, C: roxo, F: verde e parte do motoneurônio em vermelho. Escala=2 µm  
Fonte: modificado de Sabha, 2008.

**Figura 3:** Esquema da medula espinal submetida à avulsão de raízes motoras no lado direito.

**Figura 4:** Genotipagem de ratos Lewis transgênicos EGFP. Observa-se, a partir da imagem obtida através de gel de agarose de um ensaio de PCR, a banda com 438 pb, relativa ao alelo selvagem (WT) e a banda de 129 pb do alelo transgênico EGFP.

**Figura 5:** Comparação da contagem de CMMO viáveis refrigeradas e mantidas na incubadora.

**Figura 6.** Análise por citometria de fluxo com histogramas da população de células-tronco mononucleares positivas para cada marcador de superfície. **A.** Marcação com anti-CD11b. **B.** Marcação com anti-CD3. **C.** Marcação com anti-CD45. **D.** Marcação com anti-CD34. A linha preta representa o controle em cada gráfico. Abaixo tem-se a tabela com a porcentagem de imunomarcação.

**Figura 7:** Procedimento da avulsão das raízes ventrais. Após identificação e isolamento, as raízes L4-L6 são desconectadas da medula espinal com a utilização de uma pinça. (modificado de De Freria et al., 2012). Vista látero-dorsal da intumescência lombar do rato.

**Figura 8:** Reimplante das raízes L4-L6 com o selante de fibrina. \* representa as raízes dorsais. Barra de escala = 1mm. (modificado de Barbizan et al., 2013 material suplementar).

**Figura 9:** Representação gráfica da temperatura de dissociação dos segmentos gênicos amplificados. Observa-se apenas uma temperatura de dissociação dos segmentos amplificados.

**Figura 10** Localização dos motoneurônios estudados e sua reconstrução. A-desenho esquemático de um segmento lombar da medula espinal demonstrando o núcleo motor lateral onde se encontram os motoneurônios estudados. B- Seqüência de eletromicrografias eletrônicas utilizadas para a reconstrução de um motoneurônio alfa medular. Na superfície celular foi obtido aumento de 13.000X por fotografias seqüenciais do motoneurônio.

**Fig. 11.** Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático. Em A, após a montagem das micrografias no aumento de 100 X, foi realizada a medida da área do nervo, note o contorno ao redor do mesmo. Barra de escala = 100  $\mu$ m. Em B, utilizou-se o aumento de 1000 X para realizar a quantificação das fibras que foram numeradas manualmente (exemplo da quantificação). Barra de escala = 10  $\mu$ m.

**Fig 12:** Procedimento para medida do diâmetro das fibras nervosas e axônios, empregando-se o software Adobe Photoshop CS4.

**Figura 13:** A) Esquema da medula espinal submetida à avulsão de raízes motoras e os diferentes tipos de locais onde as células são encontradas. Em B) pode-se observar a presença das células no sítio da injeção, enquanto que, em C) as células se agrupam na superfície ventro-lateral direita da medula espinal. Essas células, observadas em microscopia de fluorescência, são de doadores E-GFP, fluorescendo sem a utilização de anticorpo. Barra de escala = 50 $\mu$ m.

**Figura 14:** Efeito neuroprotetor do implante com selante de fibrina e tratamento com CMMO sobre os motoneurônios, 4 semanas após a lesão. Cortes histológicos corados com cresil violeta. **A)** Lado contralateral à avulsão da coluna anterior da medula espinal (controle). **(B-F)** Lados ipsilaterais à avulsão da coluna anterior da medula espinal. Fig **(B)** representa avulsão com injeção de DMEM e **(C)** representa animais apenas com avulsão. Observa-se redução do número de neurônios motores nesses grupos. **D)** Grupo onde, após a avulsão, as raízes foram implantadas. **E)** Grupo onde, no momento do implante, as CMMO foram adicionadas ao selante. **F)** Após a avulsão, seguida do implante, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50 $\mu$ m. **G)** Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, 4 semanas após a avulsão das raízes motoras. Observa-se um aumento na sobrevivência neuronal nos grupos com implante sendo, ainda mais evidente, no grupo onde o implante foi associado ao tratamento com CMMO adicionadas ao selante (Aa =  $p < 0,001$ , Bb =  $p < 0,01$ , n=5).

**Figura 15:** Efeito neuroprotetor do implante com selante de fibrina, 8 semanas após a lesão. Lados ipsilaterais à avulsão, na coluna anterior da medula espinal. Cortes histológicos corados com cresil violeta. Imagens representativas do grupo que **A)** sofreu avulsão e não recebeu tratamento (apenas avulsão), **B)** as raízes foram implantadas, **C)** as raízes foram implantadas com as CMMO adicionadas ao selante e **D)** após a avulsão, seguida do implante, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50µm. **E)** Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, 8 semanas após a avulsão das raízes motoras. Observa-se aumento na sobrevivência neuronal nos grupos com implante (Aa =  $p < 0,001$ , Bb =  $p < 0,01$  e Cc =  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ).

**Figura 16:** Efeito neuroprotetor do implante com selante de fibrina, 12 semanas após a lesão. Lados ipsilaterais à avulsão, na coluna anterior da medula espinal. Cortes histológicos corados com cresil violeta. Imagens representativas do grupo que **A)** sofreu avulsão e não recebeu tratamento (apenas avulsão), **B)** as raízes foram implantadas, **C)** as raízes foram implantadas com as CMMO adicionadas ao selante e **D)** sofreram avulsão, seguida do implante, sendo as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50µm. **E)** Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, 12 semanas após a avulsão das raízes motoras. Observa-se aumento na sobrevivência neuronal nos grupos com implante (Aa =  $p < 0,001$ , Bb =  $p < 0,01$  e Cc =  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ).

**Figura 17:** Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal 4, 8 e 12 semanas após a avulsão das raízes motoras. Observa-se uma diminuição no número de neurônios nos lados ipsilateral à lesão, nos grupos com CMMO homogenizadas (\* =  $p < 0,05$ ).

**Figura 18:** Análise imunoistoquímica do lado ipsilateral da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-sinaptofisina, 4 semanas após a lesão. **A)** Lado contralateral à avulsão da coluna anterior da medula espinal (controle). **(B-F)** Lados ipsilateral à avulsão da coluna anterior da medula espinal. **(B)** representa avulsão com injeção de DMEM e **(C)** representa animais apenas com avulsão. Note-se grande redução na expressão de sinaptofisina, resultado de pequena cobertura sináptica nestes neurônios. **D)** Grupo onde, após a avulsão, as raízes foram implantadas. **E)** Grupo onde, no momento do implante, as CMMO foram adicionadas ao selante. **F)** Após a avulsão, seguida do implante, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Nota-se uma relativa preservação de terminais sinápticos em aposição ao corpo celular dos motoneurônios, comparativamente aos grupos implante e implante associado a células (D, E e F). Contudo, não se observam diferenças no padrão da marcação entre estes dois grupos. Barra de escala = 100µm. **G)**

O gráfico indica a diferença da razão ipsi/contralateral da média da densidade integrada de pixels, dos lados ipsi e contralateral ( $p < 0,05$ ,  $n=5$  para cada grupo).

**Figura 19:** Imunomarcção anti- sinaptofisina na região do corno ventral, no lado ipsilateral à avulsão das raízes da medula espinal, 8 semanas pós operatórias. Note-se menor intensidade da marcação no grupo (A) avulsionado, em comparação aos grupos com (B) reimplante após a avulsão, (C) cujo o selante do reimplante foi adicionado com as CMMO e (D), após o implante da avulsão das raízes ventrais, onde as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Escala de 50  $\mu\text{m}$ . O gráfico (E) indica a diferença da média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels, dos lados ipsi e contralateral, nos grupos analisados. (\* $p < 0,05$ ,  $n=5$ ).

**Figura 20:** Imunomarcção anti- sinaptofisina na região do corno ventral, no lado ipsilateral à avulsão das raízes da medula espinal, 12 semanas pós operatório. Note-se menor intensidade da marcação no grupo (A) avulsionado em comparação aos grupos com (B) reimplante após a avulsão, (C) cujo o selante do reimplante foi adicionado com as CMMO e (D), após o implante da avulsão das raízes ventrais, onde as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Escala de 50  $\mu\text{m}$ . O gráfico (E) indica a diferença da média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels, dos lados ipsi e contralateral, nos grupos analisados. ( $p < 0,05$ ,  $n=5$ ).

**Figura 21:** Representação gráfica da quantificação da razão ipsi/contralateral da imunomarcção anti- sinaptofisina 4, 8 e 12 semanas após a avulsão das raízes motoras. Observa-se maior preservação dos inputs no grupo com implante e CMMO injetadas (\* =  $p < 0,05$ ).

**Figura 22:** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-GFAP, 4 semanas após a lesão. (A) Lado contralateral à avulsão da coluna anterior da medula espinal (controle). (B-F) Lados ipsilaterais, onde se observa a presença astrogliose reativa circunjacente aos motoneurônios. (B) representa avulsão com injeção de DMEM e (C) representa animais apenas com avulsão. Barra de escala = 100 $\mu\text{m}$ . (G) O gráfico indica a média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels, dos lados ipsi e contralateral, nos 4 grupos estudados. ( $n=5$ ).

**Figura 23:** Imunomarcção anti- GFAP na região do corno ventral da medula espinal, 8 semanas após a lesão. Lado ipsilateral onde se observa a presença astrogliose reativa circunjacente aos motoneurônios (A) no grupo somente avulsionado, (B) no grupo com reimplante após avulsão, (C) nos animais que o selante do reimplante foi homogeneizado com as CMMO e (D), no grupo onde, após o implante da avulsão das raízes ventrais, as



CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50 $\mu$ m. (E) Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa, 8 semanas após a lesão (n=5).

**Figura 24:** Imunomarcção para a proteína GFAP na região do corno ventral da medula espinal, 12 semanas após a lesão. Lado ipsilateral, onde se observa a presença astrogliose reativa circunjacente aos motoneurônios. (A) Grupo somente avulsionado, (B) grupo com reimplante após a avulsão, (C) nos animais que o selante do reimplante foi homogeneizado com as CMMO e (D), no grupo onde, após o reparo da avulsão das raízes ventrais, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50 $\mu$ m. (E) Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa, 12 semanas após a lesão (n=5; \*p<0,05; \*\* p<0,01).

**Figura 25:** Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa (razão ipsi/contralateral), 4, 8 e 12 semanas após a avulsão das raízes motoras.

**Figura 26:** Imunomarcção anti Iba-1, na região do corno ventral da medula espinal, no lado ipsilateral à avulsão, 4 semanas após a lesão. A) Lado contralateral à avulsão da coluna anterior da medula espinal (controle), (B-F) Lados ipsilaterais à avulsão. (B) representa avulsão com injeção de DMEM e (C) representa animais que sofreram apenas avulsão. Barra de escala = 100  $\mu$ m. (G) Média da razão ipsi/contralateral da densidade integrada de pixels, dos lados ipsi e contralateral, nos 5 grupos (n=5).

**Figura 27:** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal, marcada com anti-Iba-1, visualizando as células microgliais reativas, 8 semanas após a lesão. Lado ipsilateral, onde se observa a presença de microglia reativa, circunjacente aos motoneurônios, (A) no grupo somente avulsionado, (B) no grupo com reimplante após a avulsão, (C) nos animais onde o selante empregado para o reimplante foi homogeneizado com as CMMO e (D), no grupo onde, após o implante das raízes ventrais, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50 $\mu$ m. (E) Média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels dos lados ipsi e contralateral nos 4 grupos estudados. (n=5).

**Figura 28:** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal, marcada com anti-Iba-1, visualizando as células microgliais reativas, 12 semanas após a lesão. Lado ipsilateral, onde se observa a reatividade microglial circunjacente aos motoneurônios: (A) grupo somente avulsionado, (B) grupo com reimplante após a avulsão, (C) grupo que o selante do reimplante foi adicionado com as CMMO e (D), no grupo onde após o implante da das raízes ventrais avulsionadas, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra

de escala = 50µm. (E) Média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels nos 4 grupos experimentais. (n=5).

**Figura 29:** Representação gráfica da quantificação da intensidade integrada de pixels da microglia reativa (razão ipsi/contralateral), 4, 8 e 12 semanas após a avulsão das raízes motoras. Observa-se uma diminuição da reatividade nos grupos com implante e com implante onde as CMMO foram homogenizadas (\* =  $p < 0,05$ ).

**Figura 30:** Imunomarcção das secções transversais da coluna anterior da medula espinal e respectivas raízes ventrais marcadas com anti-neurofilamento, mostrando em (A) o grupo avulsão e em (B) o implante de raízes ventrais, com melhor organização morfológica e maior espessura da raiz (em evidência pela elipse tracejada). Em (A) esquema de hemimedula evidenciando a região ventral empregada na análise. Barra de escala = 50µm.

**Figura 31:** Fotomicrografias obtidas na coluna anterior da medula espinal, no lado ipsilateral à lesão, após imunomarcção anti-BDNF (vermelho), 4 semanas após a terapia celular. As células EGFP (verdes) mostram-se positivas para essa neurotrofina, tanto no caso daquelas que foram adicionadas ao selante de fibrina (A), quanto após a injeção no funículo lateral (B). Barra de escala = 50µm.

**Figura 32:** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos gênicos para BDNF, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH e  $\beta$ -actina, 1 e 4 semanas após a lesão. Observa-se quantidades significativamente maiores de transcritos para BDNF, no grupo que recebeu tratamento com CMMO, 1 semana após avulsão (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

**Figura 33:** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos gênicos para GDNF, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH e  $\beta$ -actina, 1 e 4 semanas após a lesão. Observa-se quantidades significativamente maiores de transcritos para GDNF no grupo que recebeu tratamento com CMMO, 1 semana após avulsão (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

**Figura 34:** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos gênicos para GFAP, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH e  $\beta$ -actina, 1 e 4 semanas após a lesão. Observa-se quantidades significativamente maiores de transcritos para GFAP entre os grupos somente avulsão e avulsão com implante, 4 semanas após cirurgia (\* =  $p < 0,05$ ).

**Figura 35:** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos gênicos para Iba-1, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH e  $\beta$ -actina, 1 e 4 semanas

após a lesão. Observa-se quantidades significativamente maiores de transcritos para Iba-1 no grupo que recebeu tratamento com CMMO, 1 semana após avulsão (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

**Figura 36:** 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 somente com avulsão (C e D). Os grupos com avulsão + implante (E e F), avulsão + implante + células homeogeneizadas (G e H) e avulsão + implante + células injetadas (I e J) encontram-se com a cobertura sináptica próximas ao normal. Em B, D, F, H e J os terminais estão coloridos em vermelho e o citoplasma dos motoneurônios em azul. Escala: 500 nm.

**Figura 37:** Análise quantitativa da ultraestrutura das sinapses e do número de terminais sinápticos/100 $\mu$ m de membrana, 4 semanas após AV. A- mostra, em porcentagem, redução da cobertura sináptica comparativamente ao controle. B- apresenta redução do número de terminais pré-sinápticos em aposição, normalizados para 100  $\mu$ m de membrana neuronal, no grupo avulsão. (\*\* =  $p < 0.01$  e; \*\*\* =  $p < 0.001$ ). Média $\pm$ erro padrão; n=5.

**Figura 38:** Análise quantitativa da ultraestrutura das sinapses e do número de terminais sinápticos/100 $\mu$ m de membrana, 12 semanas após AV. A- mostra, em porcentagem, a cobertura sináptica. B- apresenta redução no número de terminais pré-sinápticos, normalizados para 100  $\mu$ m de membrana neuronal, no grupo somente avulsão. (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$  e; \*\*\* =  $p < 0.001$ ). Média $\pm$ erro padrão; n=5.

**Figura 39:** Representação gráfica da análise quantitativa ultraestrutural dos tipos de terminais, após 4 semanas da lesão e reparo. A- porcentagem de cobertura das sinapses pelos terminais F, S e C, B- número de terminais sinápticos F, S e C em aposição/100  $\mu$ m e C- tamanho dos terminais. (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$  e; \*\*\* =  $p < 0.001$ ). Média $\pm$ erro padrão; n=5.

**Figura 40:** Representação gráfica da análise quantitativa ultraestrutural dos tipos de terminais, 12 semanas após lesão e reparo. A- porcentagem de cobertura das sinapses pelos terminais F, S e C, B- número de terminais sinápticos F, S e C em aposição/100  $\mu$ m e C- tamanho dos terminais. (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$  e; \*\*\* =  $p < 0.001$ ). Média $\pm$ erro padrão; n=5.

**Figura 41:** Distribuição dos espaços entre terminais sinápticos ao longo da membrana do corpo dos motoneurônios, 4 semanas após avulsão. A- distribuição normal dos intervalos entre os terminais pré-sinápticos, B- alteração da distribuição dos terminais pré-sinápticos

devido à retração (seta, indicando o maior intervalo encontrado), C , D e E- restauração dos intervalos ao longo da membrana dos motoneurônios.

**Figura 42:** 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 , D e E- restauração dos intervalos ao longo da membrana dos motoneurônios.

**Figura 43-** Imagens de cortes transversais do nervo isquiático, representativas dos diferentes grupos experimentais, corados com azul de toluidina. A- Controle (lado contralateral à lesão) B-E –lados ipsilaterais à lesão; B- Avulsão, C- Avulsão+implante, D- Avulsão+implante+células adicionadas ao selante e E- Avulsão+implante+células injetadas. F- Gráfico da quantificação do número de fibras mielínicas (\* =  $p < 0,05$ ;  $n=5$ ).

**Figura 44-** Distribuição de frequência do diâmetro dos axônios mielínicos.

**Figura 45-** Distribuição de frequência do diâmetro das fibras nervosas.

**Figura 46-** Distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina.

**Figura 47-** Distribuição de frequência da razão “g”.

**Figura 48.** Índice funcional do nervo fibular, até 12 semanas após a avulsão das raízes ventrais nos grupos: somente avulsão (vermelho), avulsão seguida do reimplante das raízes lesadas (azul), reimplante associado às células tronco (amarelo) e após o implante seguido de injeção das CMMO no funículo lateral (verde). ( $n=10$ ). Observa-se melhora motora nos grupos com implante, com ou sem tratamento com células.

**Figura 49.** Recuperação da capacidade de suporte de peso pela pata ipsilateral à lesão, seguida de reimplante de raízes com o selante de fibrina. Valores expressos pela razão ipsi/contralateral da pressão exercida pela pata do animal sobre a plataforma CatWalk ( $n=10$ ).

## LISTA DE TABELAS:

**Tabela 1.** Tempos de sobrevivência após a avulsão das raízes em cada grupo e técnicas utilizadas.

**Tabela 2:** Primers utilizados para genotipagem.

**Tabela 3:** Sequências *forward* e *reverse* dos primers utilizados para amplificação dos segmentos gênicos.

**Tabela 4:** Eficiência dos *primers* utilizados na PCR em tempo real.

**Tabela 5:** Resultado do RT-PCR no pool dos grupos analisados, 1 semana pós-operatória. Em negrito, os valores cuja razão ipsi/contralateral foram maiores, em relação ao grupo somente avulsionado.

**Tabela 6:** Resultado do RT-PCR no pool dos grupos analisados, 4 semanas pós-operatórias. Em negrito, os valores cuja razão ipsi/contralateral foram maiores, em relação ao grupo somente avulsionado.



## **1- INTRODUÇÃO**

### **1.1 Medula e Nervos Espinais**

A medula espinal é uma porção do Sistema Nervoso Central (SNC) situada no interior do canal vertebral. A medula apresenta forma aproximadamente cilíndrica, sendo ligeiramente achatada no sentido ântero-posterior. Seu calibre não é uniforme, pois apresenta duas dilatações denominadas intumescência cervical e intumescência lombar. Na medula, o tecido nervoso é morfológicamente dividido em substância branca, que é formada por fibras, principalmente mielínicas, agrupadas em funículos e substância cinzenta, que localiza-se internamente à branca e apresenta a forma de H, onde se situam os neurônios. Nesta distinguimos, de cada lado, três colunas: ventral (correspondente à parte motora), dorsal (correspondente à parte sensorial) e lateral (restrita aos segmentos torácicos e sacrais). No centro da substância cinzenta localiza-se o canal central (Machado, 2000).

Os neurônios medulares agrupam-se em núcleos na substância cinzenta, o que será melhor explicado no item 1.2. Rexed (1952), após estudos de citoarquitetura medular, propôs a divisão da mesma em lâminas, numeradas de I a X, no sentido dorso-ventral. A lâmina IX contém os núcleos motores da coluna anterior, que possuem diferentes dimensões, de acordo com o segmento medular, caracterizando o aparecimento das intumescências cervical e lombar, de onde partem os nervos espinais que compõem os plexos braquial e lombossacral, responsáveis pela inervação dos membros superiores e inferiores, respectivamente (Machado, 2000).

O nervo espinal é formado da união da raiz dorsal, sensitiva, com a raiz ventral, motora (Fig. 1). Conectado à raiz dorsal encontra-se o gânglio espinal, 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. A avulsão de raízes ventrais é o modelo experimental empregado no presente estudo.

Os nervos periféricos são formados por axônios, células não neurais e componentes da matriz extracelular. O axônio, juntamente com sua bainha de mielina, denomina-se fibra nervosa. Estas fibras são envoltas por três camadas de tecido conjuntivo que conferem grande resistência e certa elasticidade aos nervos. O epineuro é a camada fibrosa mais externa, constituída de tecido conjuntivo denso. A camada média de tecido conjuntivo, denominada de perineuro, é formada por várias camadas de células

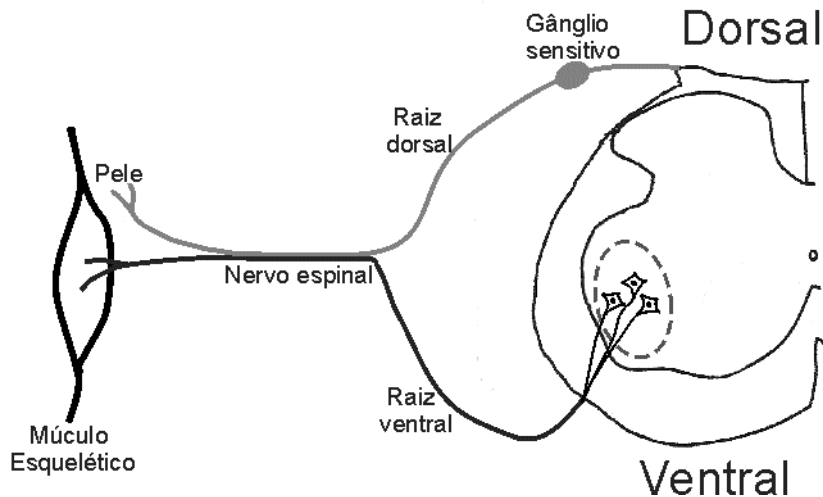
achatadas justapostas. Essas células unem-se por junções oclusivas, constituindo uma barreira à passagem de muitas macromoléculas e importante mecanismo de defesa contra agentes agressivos – barreira hemato-nervosa (Guth, 1956; Cajal, 1959; Lundborg, 1993). A camada mais interna de tecido conjuntivo é denominada endoneuro, apresenta íntimo contato com as fibras nervosas.

O axônio é uma extensão longa e delgada do corpo celular do neurônio, capaz de transportar o impulso nervoso a longas distâncias, sendo mielínico ou amielínico. Nos axônios mielínicos, as células de Schwann (CS) formam em seu redor, uma estrutura lipoprotéica tubular com múltiplas camadas, denominada bainha de mielina. As CS estão separadas umas das outras, ao longo destes axônios, por intervalos destituídos de mielina e parcialmente cobertos por digitações laterais do seu citoplasma. Estes espaços são denominados nodos de Ranvier (Landon e Halls, 1976; Peters *et al.*, 1976). Já nos axônios amielínicos, uma CS envolve, total ou parcialmente cerca de 5 a 25 axônios através de projeções citoplasmáticas, não havendo a formação da bainha de mielina. Como resultado, estes axônios encontram-se individualmente alocados no interior de sulcos ou canais formados pelas expansões do citoplasma das SC (Peters *et al.*, 1976).

Um exemplo de nervo (n.) periférico de origem medular é o n. Isquiático, que é estudado nesse trabalho. O n. isquiático do rato se origina dos segmentos espinais L4, L5 e L6. Esse nervo dá origem a quatro ramos terminais: nervos tibial, fibular, sural e cutâneo. Os n. tibial e fibular são os dois maiores que derivam da bifurcação do n. Isquiático no terço proximal da coxa e, em conjunto, inervam os compartimentos posterior da coxa e ventral e dorsal da perna (Hebel e Stromberg, 1986). A porcentagem motora no nervo tibial é de 22% e no fibular 31%; os outros ramos não apresentam componentes motores, possuindo apenas axônios sensitivos (Schmalbruch, 1986).

O axônio do neurônio motor e todas as fibras musculares por ele inervadas denomina-se Unidade Motora. Por ação do impulso nervoso, todas as fibras musculares da unidade motora se contraem aproximadamente ao mesmo tempo (Machado, 2000).





**Figura 1:** Esquema de hemi-medula espinal. A imagem representa um corte transversal da medula ao nível lombar, mostrando a formação do nervo espinal. 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 Motoneurônios e Células da Glia medulares

A substância cinzenta medular é composta por diferentes tipos celulares, dos quais se destacam os neurônios e as células da glia. As interações entre os motoneurônios, as células não neuronais e os componentes extracelulares são essenciais para a estabilidade sináptica e a homeostase (Boulanger *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004).

Na medula, os neurônios são classificados como neurônios internunciais (de axônio curto), cordonais e radiculares. Os neurônios radiculares ainda podem ser viscerais ou somáticos. Os neurônios radiculares somáticos são os motoneurônios (Machado, 2002). Esses constituem-se em um proeminente grupo de neurônios colinérgicos do SNC (Wendell-Smith *et al.*, 1966) e ainda podem ser alfa ou 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 apresentam grande corpo celular e inervam as fibras musculares extrafusais, controlando de fato a contração muscular voluntária (Kandel *et al.*, 2000). Possuem, como suas principais fontes de inputs, as aferências primárias dos gânglios da raiz dorsal, motoneurônios superiores provenientes do córtex motor e

interneurônios excitatórios ou inibitórios da medula espinal, estando estes últimos em maior proporção (Bear *et al.*, 2007).

Os corpos celulares dos neurônios motores medulares estão localizados na coluna anterior da substância cinzenta na medula espinal e organizados espacialmente sob critérios anatômicos e funcionais. Anatomicamente, os motoneurônios localizados medialmente inervam os músculos mais proximais, enquanto que os que se encontram lateralmente, inervam músculos mais distais. Ainda, o critério funcional separa os núcleos em porção ventral e dorsal. Na porção ventral encontram-se os motoneurônios que inervam os músculos extensores enquanto que a porção dorsal contém motoneurônios que inervam os músculos flexores (Kandel *et al.*, 2000). Assim, os motoneurônios alfa que inervam os músculos da região posterior da coxa, perna e pé, ou seja, que se encontram em posição dorso-lateral, foram considerados para análise no presente trabalho (Fig. 1).

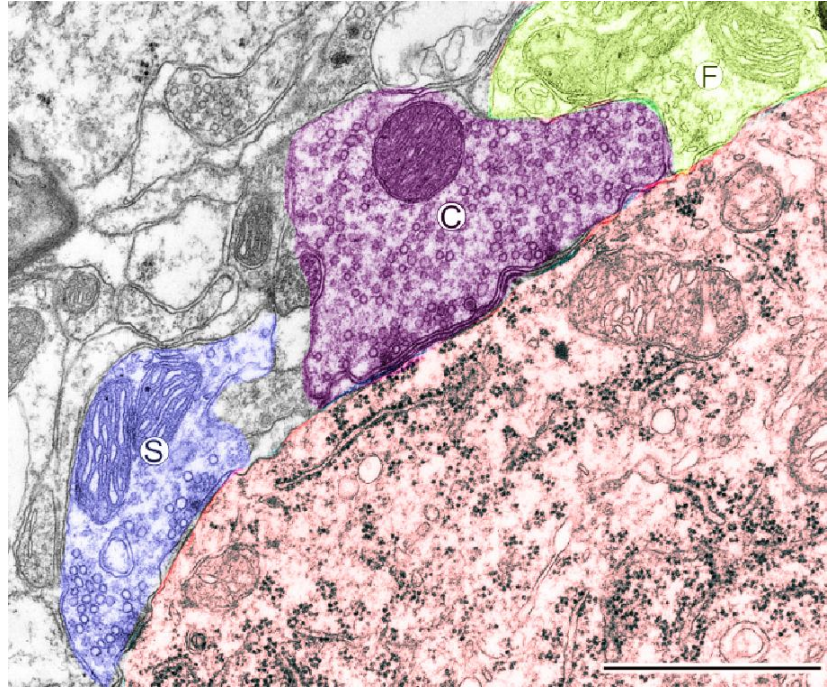
No microambiente medular, os motoneurônios apresentam contatos com projeções de células gliais, dendritos e terminais sinápticos. Recentemente, foi proposto o conceito de “sinapse tripartida” que postula que os astrócitos desempenham um papel direto, conjuntamente com neurônios, durante a atividade sináptica. Dessa forma, mostra-se essencial para o correto funcionamento dos circuitos neurais (Perea, 2009; Santello, 2012). Classicamente, o complexo sináptico se constitui em 1-) terminal pré-sináptico, um terminal axônico que transmite o potencial de ação, pela liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, 2-) terminal pós-sináptico, uma região na superfície do neurônio pós-sináptico, onde é gerada despolarização e 3-) fenda sináptica, um espaço muito delgado entre os elementos pré e pós-sinápticos (Junqueira e Carneiro, 2002). Os terminais pré-sinápticos, em contato com o corpo celular dos motoneurônios medulares, contém vesículas sinápticas com neurotransmissores e são classificados em S, F e C, 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. Seu neurotransmissor é o glutamato, um aminoácido excitatório, que pode, após uma lesão, promover exacerbada entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na célula pós-sináptica; este evento denomina-se excitotoxicidade glutamatérgica e pode causar neurodegeneração.

Os terminais do tipo F (Flattened) apresentam vesículas sinápticas achatadas, com presença dos neurotransmissores inibitórios glicina e 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 rugoso. 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, 1966), avaliado no presente trabalho.



**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. S: azul, C: roxo, F: verde e parte do motoneurônio em vermelho. Escala=2  $\mu$ m Fonte: modificado de Sabha, 2008.

Em certas circunstâncias, ligadas ao processo de lesão, pode ocorrer remodelação estrutural e funcional desses terminais pré-sinápticos em contato com o corpo do motoneurônio. Os astrócitos e a microglia participam dessa plasticidade sináptica (Aldskogius e Svensson, 1999), uma vez que ocorre comunicação bidirecional entre células da glia e neurônios (Perea e Araque, 2002; Oliet *et al.*, 2001) e, aproximadamente metade do corpo celular do motoneurônio, é recoberto por extensões gliais (Wendell-Smith *et al.*, 1966).

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 lhes confere posição de destaque nos processos de homeostase neuronal.

As células gliais podem ser divididas nas seguintes classes: células ependimárias, microglia e macroglia. As células ependimárias forram as paredes dos ventrículos

cerebrais, do aqueduto cerebral e do canal central da medula (Machado, 2000). As células da macroglia são subdivididas em oligodendrócitos, células NG2 (i.e. células precursoras de oligodendrócitos) (Wang e Bordey, 2008), células de Schwann e astrócitos (Kandel *et al.*, 2000).

A microglia possui características morfofuncionais de células fagocíticas do sistema imune (Rouach e Giaume, 2001). Em condições de repouso, a microglia apresenta projecções que se movem para monitorar microambiente local (Nimmerjahn *et al.* 2005; Davalos *et al.* 2005), desempenhando papel fundamental na manutenção da homeostase do SNC (Eggen *et al.*, 2013). Em adição ao controle da homeostase, a microglia desempenha diferentes papéis durante o desenvolvimento, infecção, envelhecimento, doenças neurodegenerativas, dentre outros processos específicos (Eggen *et al.*, 2013). Essa abrangência da microglia requer considerável plasticidade celular e fenotípica, permitindo assim, funções adaptativas específicas incluindo fagocitose, apresentação de antígeno e remodelação de sinapses (Eggen *et al.*, 2013). Seu fenótipo varia desde um perfil pró-inflamatório, denominado M1, ao anti-inflamatório, denominado M2. Ainda, vem sendo proposto um terceiro estado de ativação, a M3, envolvida na tolerância imunológica (Eggen *et al.*, 2013). A microglia torna-se ativada em resposta a lesões ou processos patológicos no SNC (Sanders e De Keyser, 2007), precedendo a reação astrogliar.

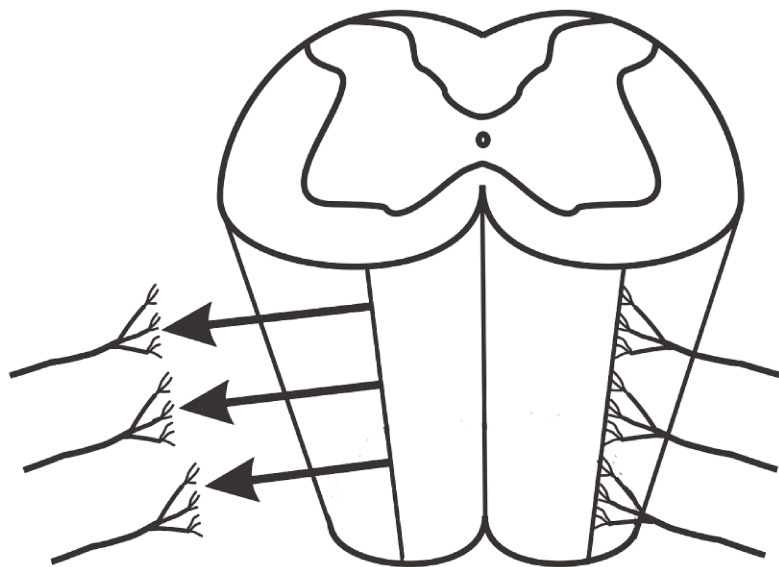
Os astrócitos foram classificados em dois subtipos principais: protoplasmático e fibroso (Sofroniew, 2010). Astrócitos fibrosos estão localizados na substância branca, adjacentes aos feixes de axônios onde fazem contato com os nós de Ranvier. Já os astrócitos protoplasmáticos estão presentes na substância cinzenta envolvendo as sinapses e fazendo contato com as células endoteliais. Possuem de 5 a 8 ramificações principais que derivam processos finos (Jensen, 2013) denominados processos astrocitários perivascularares. Esses processos astrocitários envolvem todas as sinapses, (Brown, 2007) exercendo funções essenciais na manutenção do pH e fluxo iônico, por controle do teor de carboxidase, que converte o dióxido de carbono e a água em íons de hidrogênio e bicarbonato (Maragakis e Rothstein, 2006). Também controlam o cálcio liberado na fenda sináptica. Parte desses processos astrocitários fazem contatos com vasos sanguíneos, regulando o fluxo sanguíneo local (Sofroniew, 2010) o que contribui para o estabelecimento da barreira hemato-encefálica, prevenindo que diferentes moléculas e substâncias tóxicas entrem no microambiente do SN (Kandel *et al.*, 2000). A barreira hematoencefálica também limita a infiltração de leucócitos periféricos e a ativação

da microglia residente. Os astrócitos modulam o fluxo sanguíneo pela liberação de vasoconstritores, regulando o diâmetro dos vasos sanguíneos. Como esses processos fazem contatos ao mesmo tempo com vasos sanguíneos e sinapses, os astrócitos podem mediar o fluxo sanguíneo em relação aos níveis de atividade sináptica (Sofroniew, 2010). A macroglia ainda sustenta a atividade neuronal durante hipoglicemia e durante os períodos de alta atividade neuronal, pois é o principal local de armazenamento de glicogênio no SNC (Brown e Ransom, 2007). São também responsáveis pela manutenção e homeostase do glutamato na fenda sináptica (Oliet *et al.*, 2001 e Wang e Bordey, 2009). O citoesqueleto dos astrócitos é formado por GFAP, vimentina (Dahl, 1981) e nestina; porém, em astrócitos maduros não há mais expressão de nestina. Elas desempenham funções na citoarquitetura celular, constituindo importante indicador da astrogliose reativa.

### **1.3 Avulsão e resposta à lesão**

Lesões axonais no SNC e no SNP resultam em degeneração retrógrada e morte celular. 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. Lesões próximas do SNC podem resultar na extensiva degeneração de motoneurônios adultos (Kishino, *et al.*, 1997; Novikov, *et al.*, 1995; Oliveira e Langone, 2000), enquanto neurônios localizados no SNP geralmente sobrevivem e regeneram após axotomia (Yan *et al.*, 1992).

Na avulsão, ocorre a ruptura de forma brusca da raiz espinal a partir da superfície da medula (Fig. 3), causando desconexão entre o corpo neuronal e o alvo muscular, com interrupção do fluxo anterógrado de fatores neurotróficos produzidos pelo órgão alvo. Geralmente ocorrem em lesões severas do plexo braquial, devido a um trauma de alta energia, onde ocorre o estiramento do pescoço em relação ao tronco como em acidentes de motocicleta, esportes radicais e tração severa durante partos complicados (lesão obstétrica) (Carlstedt, 2009). O efeito clínico dessa lesão é a perda da mobilidade e da sensibilidade no membro ipsilateral à lesão, gerando monoplegia, além de várias outras complicações clínicas posteriores, como cistos meníngeos, dor intratável, circulação sanguínea comprometida e herniação (Carlstedt, 2009).



**Figura 3:** Esquema da medula espinal submetida à avulsão de raízes motoras no lado direito.

Avulsão de raízes espinais ventrais em ratos é um modelo eficaz para estudar alterações degenerativas de neurônios motores e seus mecanismos subjacentes (Koliatsos et al,1994; He et al, 2000). É também um modelo confiável para testar a eficácia de fatores tróficos ou outros agentes terapêuticos (Koliatsos et al,1994; Watabe, 2005). A morte celular por apoptose induzida por lesão, que é característica neste modelo, também serve como uma ferramenta para o estudo de apoptose em motoneurônios em doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica (ALS) (Martin et al, 1999; Watabe et al, 2005). Nesse modelo experimental, as raízes motoras, na superfície da medula espinal, são arrancadas na interface entre o sistema nervoso central e periférico (Livesey e Fraher, 1992), sem interferência na integridade do tecido próximo à raiz lesada e seu sistema vascular (Berthold e Carlstedt, 1993).

A mudança mais perceptível após avulsão é a perda significativa de motoneurônios (Chu e Wu, 2009), com morte de aproximadamente 80% das células nervosas lesadas durante as 2 primeiras semanas pós lesão (Koliatsos *et al.*,1994). Provavelmente tanto a morte celular programada como a necrose contribuem para a morte dos motoneurônios (Li et al,1998; Martin et al, 1999; Park et al, 2007; Wu, 2009). Na fase inicial após a lesão, os motoneurônios avulsionados apresentam danos característicos de necrose, como desintegração da membrana celular, ativação de macrófagos e do sistema complemento (Li et al,1998; Martin et al, 1999; Park et al, 2007; Wu, 2000; Chu e Wu, 2009). Por outro lado, na fase mais tardia após a lesão, os

motoneurônios avulsionados apresentam características de apoptose, como fragmentação de DNA, cromatólise, encolhimento do núcleo, redução do volume do soma, dentre outras (Koliatsos et al, 1994; Martin et al, 1999; Wu, 2009; Chu e Wu, 2009).

Os motoneurônios que sobrevivem à avulsão, talvez representem um subgrupo resistente às reações da axotomia (Chu e Wu, 2009). Com isso, existe a perspectiva de reparo da lesão, que pode acontecer por reimplante das raízes. Nesses motoneurônios sobreviventes ocorre uma série de alterações no corpo celular, atribuídas a estratégias regenerativas (Barron, 1983, Aldskogius e Stevenson, 1999). Dentre essas alterações, o aumento da expressão de receptores para fatores neurotróficos, como o receptor de baixa afinidade para neurofinas – p75<sup>NGFR</sup> (Risling, *et al.*, 1992), o receptor trkB (tirosino-cinase B) de alta afinidade para BDNF (Brain derived neurotrophic factor) (Novikov, *et al.*, 1995, Kobayashi, *et al.*, 1997) e o receptor GRFa-1 para fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (Hammarberg, *et al.*, 2000; Lindå, *et al.*, 1992 e Piehl, *et al.*, 1998). Além disso, voltam a expressar RNAs mensageiros relacionados a componentes do citoesqueleto, bem como proteínas relacionadas ao alongamento axonal, tais como GAP-43 (*growth associated protein-43*), tubulina e actina. Contrariamente, a expressão de proteínas relacionadas à transmissão sináptica diminui acentuadamente (Piehl *et al.*, 1998).

Após lesão proximal ocorre, também, remodelação estrutural e funcional dos circuitos dos motoneurônios, denominada plasticidade sináptica. Os neurônios avulsionados apresentam uma perda significativa dos inputs, diminuindo ou mesmo abolindo a transmissão sináptica (Purves, 1978; Takata e Nagahama, 1983; Delgado-Garcia *et al.*, 1988). Esse efeito, o qual é mais pronunciado no corpo neuronal, pode tornar-se permanente, se o contato com o órgão alvo não for restabelecido (Brännström e Kellerth, 1998). No entanto, essa redução sináptica não ocorre de maneira equivalente para todos os tipos de botões sinápticos. Após a axotomia intramedular do funículo anterior da medula, por exemplo, os terminais glutamatérgicos (tipo S) são mais afetados durante a fase de eliminação dos terminais sinápticos. A eliminação preferencial de terminais glutamatérgicos pode ser interpretada como uma forma de se evitar a excitotoxicidade mediada por este neurotransmissor. Desta forma, há proporcionalmente uma maior eliminação de terminais excitatórios (Lindå *et al.*, 2000; Cullheim *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2004). Nesta condição, a célula lesada apresenta um domínio de *inputs* inibitórios. As alterações sinápticas observadas refletem uma reorganização ativa destas em resposta a lesão, o que leva a uma mudança metabólica de um estado de transmissão sináptica para um estado de recuperação dos axônios comprometidos pela lesão (Lindå *et*

*al.*, 1992; Piehl *et al.*, 1993; Piehl *et al.*, 1998; Lindå *et al.*, 2000). Além disso, há evidências de que os astrócitos participem da eliminação dos terminais pré-sinápticos, uma vez que a resposta glial coincide com a perda de sinapses em motoneurônios alfa medulares em cromatólise, desempenhando papel ativo na plasticidade do sistema nervoso (Aldskogius e Kozlova, 1998; Aldskogius *et al.*, 1999).

Os astrócitos também auxiliam na redução da excitotoxicidade, regulando a excitabilidade neural por rápida modificação de seu volume (Hanson, 1994; Hanson e Ronnback, 1995) e controlando a difusão de íons e neurotransmissores (Vandenbranden, 1996; Rusakov e Kullmann, 1998; Sykova e Chvatal, 2000; Verkhratsky e Steinhauser, 2000). Os astrócitos ativados aumentam os níveis de transportadores de glutamato (Krum, *et al.* 2002), o que permite captar o excesso de glutamato no espaço extracelular, fazendo com que a transmissão seja modulada (Jensen *et al.*, 2013). No citoplasma, o glutamato é convertido em glutamina pela glutamina sintase. A glutamina é então liberada pelos astrócitos e esta pode ser absorvida pelos neurônios e utilizada para renovar o estoque de glutamato (Caruso *et al.*, 2013). Além disso, produzem antioxidantes como a glutatona, uma importante defesa contra o estresse oxidativo (Karimi-Abdolrezaee e Billakanti, 2012).

No caso de lesão mecânica, os astrócitos se tornam hipertróficos nas margens do foco dessa lesão, estendem numerosos processos finos (Wu e Schwartz, 1998) e aumentam a produção de GFAP. Esses têm a capacidade de modular a transmissão sináptica, sendo considerado como “terceiro elemento” das mesmas (Araque *et al.*, 1999).

Os astrócitos produzem e secretam fatores neurotróficos e cercam o local da lesão, impedindo seu espalhamento para áreas não danificadas (Karimi-Abdolrezaee e Billakanti, 2012). No entanto, a cicatriz glial proveniente da astrogliose reativa, pode ser prejudicial para a regeneração axonal (Toy e Namgung, 2013), uma vez que atua como uma barreira física para os axônios em crescimento (Norton *et al.*, 1992; Fawcett, 1997; Ridet *et al.*, 1997; Norton, 1999; Eng *et al.*, 2000; Giménez e Ribotta *et al.*, 2001; Privat, 2003; Rogers *et al.*, 2003). A cicatriz glial também contém moléculas de matriz extracelular, como os proteoglicanos de condroitim sulfato, que contribuem para dificultar a regeneração axonal (McKeon *et al.*, 1991; Toy e Namgung, 2013). Os astrócitos ainda apresentam papel na imunidade do sistema nervoso, em resposta à danos nos neurônios (Jensen *et al.*, 2013). Ativam as células vizinhas e amplificam a resposta imune inata local e, ainda, modulam 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 o TGF $\beta$  (Shrikant e 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 reduzir o processo inflamatório. Foi visto que camundongos GFAP-/- são mais sensíveis à lesão mecânica no hipocampo, comparativamente aos respectivos camundongos selvagens (Otani, 2006), sugerindo neuroproteção astrocitária (Middeldorp e Hol, 2011). Também foi visto que astrócitos auxiliam no reparo tecidual, removendo os fragmentos de células apoptóticas (Griffiths, 2009). Tal função é classicamente atribuída à microglia, que apresenta características fagocíticas na fase crônica (Kreutzberg, 1996 e Colton, 2009) e durante os primeiros estágios após a lesão. Na situação aguda, a microglia responde rapidamente, passando a produzir moléculas neurotróficas (Kreutzberg, 1996 e Cullheim e Thams, 2007). Microglia e macrófagos ativados podem potencializar a liberação de substâncias neuroprotetoras, como CNTF, IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina-1) e neurotrofinas como NGF (fator de crescimento do nervo) e BDNF (Profyris *et al.*, 2004).

A microglia corresponde a células apresentadoras de antígenos, que apresentam moléculas co-estimulatórias às células T (Sanders e De Keyser, 2007) e fagocitárias, participando tanto da neuroproteção quanto da neurodegeneração. Promovem afastamento dos elementos pré e pós-sinápticos em neurônios lesados, o que é fundamental para a sobrevivência neuronal (Cullheim e Thams, 2007). Também estimulam a reparação de mielina, a remoção das toxinas do SNC, de células apoptóticas (Colton 2009) e previnem doenças neurodegenerativas (Glezer *et al.*, 2007). 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 I (Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I) 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). Kigerl *et al.* 2009 identificaram 2 tipos distintos de macrófagos, o M1 e M2. O macrófago M1 é considerado de ativação clássica (Eggen *et al.*, 2013) e é potencialmente neurotóxico quando super-ativado, sendo que, principalmente o INF $\gamma$ , promove sua diferenciação. A resposta M1 está envolvida no apoio da resposta Th1 (T helper tipo 1) e promove a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, exarcebando a inflamação (Mackaness, 1964; Gordon, 2003; O'Shea e Murray, 2008). Já as interleucinas 4, 10 e 13

promovem a diferenciação de macrófagos em M2, que é considerada a ativação alternativa e predominante na resposta Th2. A M2 seria neuroprotetora, promovendo a cicatrização e a reparação de tecidos e neutralizando a inflamação (Gordon 2003; Mosser e Edwards 2008), também auxiliando no crescimento axonal após lesão medular.

#### **1.4 Reimplante de raízes medulares**

Lesão no plexo braquial é uma das lesões mais devastadoras do ponto de vista do paciente, causando perda significativa da função dos membros superiores e capacidade de realizar tarefas do cotidiano (Thatte, 2013). Isso pode potencialmente levar ao desemprego, dificuldades econômicas, depressão e, em casos raros, até mesmo suicídio (Thatte, 2013). Os pacientes típicos são jovens que sofreram acidente de motocicleta e sofreram tração entre o pescoço e o ombro, com dano ao plexo braquial em graus variados. Por isso, é vital que este segmento muito importante da nossa população seja funcionalmente recuperado tão rápido quanto possível (Thatte, 2013).

A continuidade da raiz com a medula espinal é um determinante crítico para a escolha do tratamento. Lesões denominadas pós-ganglionares significam que as conexões com SNC frequentemente estão intactas e que o nervo pode ser usado como fonte de axônios (Giuffre, 2010), com significativo sucesso pós-cirúrgico. Já as lesões pré-ganglionares, como a avulsão das raízes sensitivas e autônomas, significam que as raízes ligadas ao nervo periférico ao SNC foram interrompidas (Giuffre, 2010). Este segundo caso tem prognóstico limitado, causando grande frustração para os cirurgiões de plexo braquial (Thatte, 2013). Pobre recuperação da função após lesão do plexo braquial pode ocorrer devido às distâncias consideráveis através da qual os axônios devem regenerar para reconectar-se com os músculos alvo (Eggers *et al.*, 2010; Hoke *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2003). Um tratamento promissor para esses acidentes é a reimplantação das raízes avulsionadas na medula espinal.

Os primeiros esforços para reparação das raízes foram realizados em ratos por Carlstedt *et al.* (1986) e em seguida por Cullheim *et al.* (1989) em gatos. Nesses trabalhos iniciais, as raízes avulsionadas foram reimplantadas na superfície do funículo lateral, e demonstraram que os motoneurônios foram capazes de regenerar seus axônios lesados e precisamente redirecionar esses axônios em direção ao SNP. Técnica similar foi aplicada à humanos com limitado sucesso (Carlstedt *et al.*, 2009), provavelmente devido ao local do implante não ser realizado ventralmente e sim lateralmente (Fournier, 2005).

Outras tentativas experimentais de implante de raízes foram realizadas com utilização de fios de sutura inabsorvíveis 9/0 (EthilonH) (Brunelli e Brunelli, 1988), tissue glue (TisseelH) (Brunelli e Brunelli, 1988; Gu *et al.*, 1989), cola de fibrina (TissueCol; Baxter B.V.Utrecht, the Netherlands) (Seddon, 1947), e enxerto de nervo (Gu *et al.*, 1992). Devido à delicada natureza da medula espinal, a utilização da cola (selante de fibrina nacional) seria aconselhável pela facilidade de sua utilização.

A reparação de tais lesões é particularmente difícil e incerta, devido à possibilidade de novos danos na medula espinal e das estruturas circunvizinhas. Portanto, apesar da cirurgia de reimplantação das raízes avulsionadas ser realizada na prática médica, ainda apresenta resultados limitados. Em 2001, na França, foi realizada uma extensa revisão da eficácia das modalidades cirúrgicas convencionais para lesão do plexo braquial na *Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé* (ANAES) e concluíram que resultados dessas abordagens cirúrgicas para lesões traumáticas do plexo braquial em geral são limitados (Fournier, 2005). Assim, há necessidade de aperfeiçoamento cirúrgico, do encontro de estratégias de diminuição da morte neuronal pós-lesão e direcionamento dos neuritos para repovoar as raízes reimplantadas (Cullheim, *et al.*, 1999).

A implantação cirúrgica de raízes ventrais lesadas e o reparo axonal podem servir como um modelo de regeneração no SNC (Cullheim *et al.*, 1999). O reimplante de raízes ventrais tem um caráter neuroprotetor, permitindo a regeneração axonal, além de resultar em reinervação anatômica e funcional dos músculos estriados esqueléticos e trato urinário (Hoang *et al.*, 2006, Cullheim *et al.*, 1989; Chang e Havton, 2008). Hallin and colaboradores (1999) observaram maior sobrevivência de motoneurônios medulares após reimplante ventral de C4-C5 em macacos e sugerem que a raiz reimplantada aumentou a produção de fatores neurotróficos e a persistente abertura da barreira hemato-encefálica permitiu que substâncias tróficas alcançassem motoneurônios lesados (Risling *et al.* 1989; Sjögren *et al.* 1991; Frisén *et al.* 1993). Esse experimento, dentre outros, nos mostra que os neurônios têm capacidade regenerativa no SNC adulto, apesar desta ser limitada (Fournier, 2005).

As células de Schwann não são capazes de produzir os principais fatores neurotróficos em quantidade suficiente para compensar a deficiência local desses mediadores-chave, em enxertos periféricos (Fournier, 2005). Dessa forma, uma solução seria fornecê-lo diretamente *in situ*. Foi mostrado, em outro experimento, que somente o implante não foi suficiente para aumentar a proteção aos motoneurônios lesados após avulsão em coelhos, mas que a associação do implante à fatores neurotróficos como

BDNF e CNTF resgatou os motoneurônios lesados (Lang, 2005). Ainda deve-se estudar a melhor forma de administração desse fatores tróficos. Uma das possibilidades seria o uso de células tronco no local do reimplante como, por exemplo, as CMMO. Foi mostrado que essas células auxiliam a regeneração nervosa com recuperação da função motora (Braga-Silva *et al.*, 2008; Goel *et al.*, 2009), possivelmente devido à expressão de fatores tróficos (Goel *et al.*, 2009).

### **1.5 Selante de fibrina e seu uso no SN**

Selante de Fibrina (SF) é uma substância líquida ou gelatinosa que adere elementos tissulares firmemente. No que se refere à reparação de nervos, o selante ideal deve possuir propriedades biológicas, mecânicas e técnicas específicas. Como propriedade biológica deve apresentar mínimo risco de transmissão de doenças, antigenicidade ou toxicidade. O selante não deve induzir fibrose, que pode levar à compressão do nervo e não deve agir como uma barreira para a regeneração axonal, preservando a arquitetura normal do mesmo. A adesão produzida pelo selante deve proporcionar adequada resistência mecânica para evitar a ruptura e não produzir alterações repentinas na reparação inicial ou durante o período pós-operatório. Por fim, deve ser de fácil utilização reduzindo assim tempo operatório (Tse, 2012).

A ação do SF consiste em mimetizar o efeito final dos passos da cascata de coagulação sanguínea. A trombina cliva o fibrinogênio em monômeros de fibrina formando um polímero de fibrina solúvel. A trombina também converte o fator XIII, na presença de cálcio, em um fator ativo formando assim o polímero de fibrina insolúvel. É essa malha de fibrina, formada ao final da cascata, que é importante para estabilizar e criar a homeostase do microambiente, bem como pode ser usada como carreador de moléculas neuroprotetoras ou ainda com ação reguladora da inflamação (Barros *et al.*, 2009).

O SF vem sendo largamente utilizado em neurocirurgia há mais de 20 anos e não induz danos ao sistema nervoso (de Vries, *et al.*, 2002). A aplicabilidade do selante de fibrina já foi demonstrada em 26 pacientes com vários problemas neurocirúrgicos como: reparo de extravasamento de fluído cérebro-espinhal, selante de locais de anastomoses vascular, reforço na contenção de aneurismas e hemostasia após dissecação de tumores cerebrais (Lee *et al.* 1991). Estes autores sugerem, ainda, a aplicação do selante de fibrina como valioso adjuvante em vários procedimentos microneurocirúrgicos (Lee *et al.* 1991).

Historicamente, em 1909 ocorreu o primeiro informe clínico do uso da fibrina como adesivo biológico. Nesse caso a fibrina humana foi utilizada no tratamento de problemas com hemostasia (Bergel, 1909). Em 1915 foi relatado o uso da fibrina em hemorragia cerebral e hepática (Grey, 1915; Barros, 2009). Uma das primeiras vezes que se utilizou a combinação de fibrinogênio autólogo e trombina para coaptação dos nervos periféricos foi em 1940 (Young e Medawar, 1940), contudo devido à rápida absorção e pouca resistência à tração os resultados foram insatisfatórios. Somente na década de 1970, o selante de fibrina voltou a despertar o interesse dos pesquisadores quando conseguiram produzir soluções de fibrinogênio em altas concentrações (Thomazini-Santos, 2001).

Matras e colaboradores (1973) demonstraram a aplicabilidade do selante de fibrina em nervo periférico de ratos com resultados similares à sutura (Tse, 2012). Em sequência o selante de fibrina começou a ser testado em modelos animais (Smahel *et al.*, 1987; Becker *et al.*, 1985; Menovsky, 2001; Farrag, 2007), cadáveres (Isaacs *et al.*, 2008) e humanos (Narakas, 1988). Sua eficácia foi reportada como similar à sutura (Becker *et al.*, 1985; Povlsen, 1994) ou até melhor (Faldini, 1984; Inalöz, 1997; Martins 2005), começando então a ser utilizada na prática clínica.

No entanto, esses selantes comerciais tem a desvantagem de utilizar sangue humano que pode levar a possibilidade da transmissão de doenças infecciosas, além de relatos de necrose e formação de seromas após uso de selantes comerciais (Barros *et al.*, 2009).

Em 1989, os pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da UNESP, campus de Botucatu, apresentaram uma proposta de um adesivo, composto por fibrinogênio de búfalo e uma enzima trombina-símile, obtida de veneno de serpente. Assim, a não utilização de selante derivado de sangue humano contorna o problema relacionado com a transmissão de doenças infecciosas como hepatite, AIDS, sífilis, etc.

Um fator interessante relacionado a utilização do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* é que este possui uma fração trombina-like ou trombina-símile demonstrada por Nahas *et al.*, (1964) e isolada por Raw *et al.* (1986). A fração trombina-símile demonstra habilidade de transformar o fibrinogênio diretamente em fibrina, produzindo afibrinogenemia em pacientes picados por estas serpentes, causando o aumento no tempo de coagulação. Assim, envenenamentos causados por serpentes deste gênero podem causar grandes desordens na coagulação sanguínea (Thomazini, *et al.*, 1991 e Pereira, *et al.*, 1995). Na prática médica, algumas desordens podem ser

minimizadas com a infusão de fatores de coagulação presentes no crioprecipitado sanguíneo, que é uma substância derivada do sangue e obtida a partir do plasma fresco, o qual é composto por fibrinogênio, fatores de von Willebrand's, fator XIII, fibronectina, entre outros específicos (Viterbo, 1993).

A possibilidade de se produzir uma cola de fibrina, cujo fator polimerizador é derivado do veneno de serpente, abre uma importante opção para utilização clínica, no reparo de nervos periféricos e de lesões medulares. Têm-se como vantagens à cola disponível no mercado, a possibilidade de formulação personalizada à necessidade da cirurgia, levando-se em conta o tempo de coagulação necessário, bem como o controle do tempo de degradação do selante. Adicionalmente, seu custo de produção é mais baixo, visto que a tecnologia é totalmente nacional. (Barros *et al.* 2009; Costa *et al.*, 2009).

Já foi observado que o SF, derivado do veneno de serpentes, produziu resultados similares à cola comercial convencional, propiciando aderência adequada e reparação do nervo isquiático após lesão dos mesmos em ratos Wistar (Iuan, 1995). Ainda, o SF derivado do veneno de serpente também propiciou regeneração do nervo fibular lesado. Entretanto, o padrão morfológico da regeneração foi inferior, quando comparado com o nervo fibular sem lesão (Vicente, 2007). Até onde sabemos, não há trabalhos mostrando a reação do SF derivado do veneno na reparação de raízes nervosas, na interface do SNC/SNP. Existe ainda, a possibilidade de obtenção de formulações com variadas características desse novo SF, o que abre a possibilidade da associação do selante ou o selante derivado do veneno com diferentes células potencialmente benéficas para o processo regenerativo do sistema nervoso. Um exemplo são as células mononucleares de medula óssea (CMMO).

## **1.6 Células Tronco Mononucleares de Medula Óssea**

As células tronco (CTs) são células indiferenciadas e têm a capacidade de dar origem a tipos celulares especializados. Esta propriedade faz com que elas sejam uma ferramenta promissora para o tratamento de um amplo espectro de lesões e doenças, atualmente tratadas de formas pouco satisfatórias pelos métodos tradicionais (Wobus e Boheler, 2005). As CTs se mostram promissoras para o reparo do SN, uma vez que o implante de células tronco diretamente na medula espinal promoveu melhora funcional em

diferentes modelos experimentais (Chopp *et al.*, 2000; Hofstetter *et al.*, 2002; Cizkova *et al.*, 2007, Hell *et al.*, 2009 e Spejo, 2013).

As células tronco adultas podem ser encontradas em diversos órgãos e tecidos, tais como pâncreas, córnea e retina, cérebro, músculos esqueléticos, polpa dental, fígado, pele, sangue e medula óssea. A medula óssea contém células tronco endoteliais e células tronco mononucleares. Essas últimas correspondem à totalidade das células tronco hematopoiéticas e mesenquimais.

As CMMO possuem vantagens clínicas em relação às outras células tronco, pois o procedimento para sua obtenção é minimamente invasivo na prática médica, com menor tempo e custo de processamento, dispensa a utilização de imunossupressores, possui baixo potencial oncogênico e não esbarra em problemas éticos (Goel, *et al.*, 2009) com similar potencial terapêutico na regeneração nervosa que outras CTs, como as mesenquimais (de Freitas, 2012).

Pesquisas com CMMO apontam resultados promissores para o tratamento do infarto do miocárdio (Guarita-Souza *et al.*, 2006; Mathieu *et al.*, 2009), isquemia sistêmica aguda (Brenneman *et al.*, 2009; Capiod *et al.*, 2009) insuficiência renal (Caldas *et al.*, 2008), recuperação da função motora e regeneração nervosa (Braga-Silva *et al.*, 2006; Goel *et al.*, 2009, Raheja, 2012 e de Freitas, 2012) e em lesões da medula espinal (Akiyama *et al.*, 2002; Sykova *et al.*, 2006). Não obstante, os mecanismos que explicam esses resultados ainda precisam ser determinados.

Uma possibilidade seria a transdiferenciação para linhagens neuronais e gliais, como sugerido por alguns pesquisadores após transplante no cérebro de ratos neonatos (Bonilla *et al.*, 2002) ou em lesões de medula espinal de embriões de galinha (Sigurjonsson *et al.*, 2005). No entanto, ainda há controvérsias sobre o assunto (Wright *et al.*, 2011) e há questionamentos se tal diferenciação realmente ocorre (Cabanès *et al.*, 2007). Outra possibilidade do efeito neuroprotetor promovido pelas CT, pode estar associado à produção de fatores neurotróficos localmente, capazes de ampliar e promover a regeneração de fibras nervosas no sítio da lesão (Li *et al.*, 2002; Mahmood *et al.*, 2004) e influenciar positivamente na sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica (Hell *et al.*, 2009).

Foi sugerido (Lopes-Filho *et al.*, 2011) que as CMMO auxiliam na regeneração nervosa após lesão do nervo isquiático, devido à expressão de fatores tróficos, como BDNF e GDNF. Também foi observado, em um modelo de doença que causa degeneração de motoneurônios (*mdf*, *muscle deficient mouse*), com tratamento

empregando CMMO, o aumento na produção de GDNF (Cabanés *et al.*, 2007). Ainda, em esmagamento de nervo óptico, as CMMO aumentaram a sobrevivência neuronal bem como a regeneração. Isso ocorreu provavelmente devido ao aumento de FGF- 2 (Zaverucha-do-Valle *et al.*, 2011).

Adicionalmente aos fatores neurotróficos, fatores de crescimento hematopoiéticos aumentam a proliferação celular, diferenciação e liberação de linhagens da medula óssea na circulação sanguínea. Interessantemente, essas mesmas substâncias podem influenciar a proliferação de células progenitoras neuronais (Sanchez-Ramos *et al.*, 2008). Como exemplo, a eritropoetina, uma substância importante na diferenciação de células do sangue, mas que também pode interferir na quantidade de brotamentos em placas motoras de músculos adjacentes, quando administrada em ratos. Ainda, o fator de estimulação de colônias granulocitárias (G-CSF) é um fator de crescimento hematopoiético importante na proliferação e diferenciação de células de linhagem mielóide (Schneider *et al.*, 2005). Também auxilia na sobrevivência neuronal e preservação sináptica, após avulsão de raízes medulares ventrais (De Freria *et al.*, 2012). Outros fatores liberados pelas células-tronco hematopoiéticas, como hematopietinas, fator- $\beta$  de transformação e crescimento, proteínas morfogênicas da medula e o fator de células-tronco (SCF) são também substâncias que têm ação positiva no SN (Sanchez-Ramos *et al.*, 2008).



## 2- JUSTIFICATIVA

A impossibilidade de reparo eficiente de lesões no SNC é um importante problema médico. Modelos experimentais de lesões têm sido estudados a fim de se melhor compreender os mecanismos envolvidos na sobrevivência neuronal e na plasticidade sináptica. A avulsão de raízes motoras tem se mostrado um modelo experimental reprodutível de degeneração de neurônios motores em ratos, onde se observa a morte de cerca de 80% dos motoneurônios, duas semanas após a lesão (Koliatsos *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1998). Os motoneurônios que sobrevivem a avulsão têm potencial regenerativo após o reimplante das raízes. Contudo, ainda existe a necessidade de aperfeiçoamento cirúrgico, do encontro de estratégias para diminuição da morte neuronal pós-lesão e direcionamento dos neuritos para seu alvo correto (Cullheim, 1999).

O transplante de células tronco diretamente na medula espinal promove uma melhora funcional de animais com lesões no SNC (Chopp *et al.*, 2000; Hofstetter *et al.*, 2002; Cizkova *et al.*, 2007; Chvátal e Sycová 2000) devido à produção de fatores tróficos (Li *et al.*, 2002; Mahmood *et al.*, 2004; Mahmood, *et al.*, 2006). Adicionalmente, a possibilidade de se associar a utilização das CMMO com o selante de fibrina produzido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, CEVAP – UNESP de Botucatu certamente abrirá uma nova perspectiva para futuros tratamentos eficazes após lesões proximais do SNC.

Este novo selante de fibrina, derivado de veneno de serpente e fibrinogênio animal, tem se tornado uma útil ferramenta na prática médica devido a seu rápido, fácil e barato processo de produção. Por ser um produto biológico biorreabsorvível, não causa reações adversas nos pacientes, não usa sangue humano em sua constituição, não transmite doenças infecciosas, não representa riscos toxicológicos para utilização interna, reduz o tempo cirúrgico e melhora o pós-operatório, é altamente adesivo e pode ser utilizado como adjuvante em procedimentos de sutura convencional e liberação de fármacos (Barros *et al.* 2009). Seus efeitos sobre o controle da gliose reativa, sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica em motoneurônios avulsionados devem ser investigados, incluindo-se o emprego de análises funcionais.

Certamente, este estudo contribuirá para o futuro emprego clínico desta abordagem terapêutica, preenchendo uma importante lacuna nos procedimentos reparativos após este tipo de lesão.



### 3-OBJETIVOS

#### 3.1-OBJETIVOS GERAIS

Investigar a eficácia do selante de fibrina, derivado do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus*, bem como o efeito neuroprotetor de células mononucleares de medula óssea (CMMO) de ratos LEW-Tg EGFP F455/Rrrc sobre motoneurônios alfa medulares em ratos LEW/HsdUnib submetidos à avulsão e reimplante de raízes motoras.

#### 3.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o método de aplicação das CMMO juntamente com o selante;
- Analisar a sobrevivência neuronal nos períodos agudo e crônico após avulsão e reimplante das raízes com selante de fibrina, juntamente com a terapia empregando-se CMMO;
- Avaliar a expressão de sinaptofisina e a reatividade glial nos animais submetidos à avulsão, avulsão seguida de reimplante com selante e reimplante conjuntamente com terapia utilizando CMMO;
- Investigar a produção dos transcritos gênicos BDNF, GDNF, GFAP e Iba-1 em ratos submetidos à avulsão, avulsão seguida de reimplante com selante e reimplante conjunto com CMMO;
- Analisar a disposição e comportamento dos *inputs* dos motoneurônios alfa medulares na intumescência lombar, através da microscopia eletrônica de transmissão, em ratos submetidos à avulsão e reimplante de raízes com selante, associadas ou não às CMMO;
- Avaliar o número de axônios e seus parâmetros morfométricos após avulsão, implante das raízes com selante e implante associado à terapia com CMMO;



## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1-Grupos experimentais

Para este estudo foram utilizadas fêmeas adultas de ratos LEW/HsdUnib com seis semanas de idade e peso corporal de aproximadamente 150g obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB). Os experimentos foram conduzidos seguindo-se as normas de ética na experimentação animal (proc. nº 2073-1). Todos os animais tiveram suas raízes nervosas ventrais, na região da intumescência lombar do lado direito avulsionadas (n=5, por grupo experimental) e analisados com 1, 4, 8 e 12 semanas após a cirurgia. O lado não avulsionado de cada animal foi utilizado como controle interno para análise dos resultados. Foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

1. Avulsão de raízes motoras, sem reimplante;
2. Avulsão de raízes motoras, sem reimplante e injeção de DMEM;
3. Avulsão e reimplante das raízes motoras com selante na interface da substância branca e cinzenta, na região da lâmina IX;
4. Avulsão e reimplante das raízes adicionando CMMO ao selante de fibrina no momento do reimplante;
5. Avulsão e reimplante das raízes motoras com selante juntamente com injeção de CMMO no funículo lateral.

	1 semana	4 semanas	8 semanas	12 semanas
Contagem neuronal		X	X	X
Imunoistoquímica		X	X	X
RT-PCR	X	X		
MET		X		X
Morfometria		X		X

**Tabela 1.** Tempos de sobrevivência após a avulsão das raízes em cada grupo e técnicas utilizadas.

Para o estudo com células marcadas endogenamente, foram utilizados como ratos doadores animais LEWIS transgênicos para a proteína verde fluorescente-GFP (LEW-Tg EGFP F455/Rrrc). Esses animais foram adquiridos da Universidade do Missouri (EUA), mantidos e criados no Laboratório de Regeneração Nervosa do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Unicamp.

## **4.2-Obtenção das Células Tronco Mononucleares**

### **4.2.1- Animais GFP**

Para a extração das células mononucleares da medula óssea foram utilizados ratos LEWIS transgênicos para a proteína verde fluorescente-GFP (LEW-Tg EGFP F455/Rrrc), com alterações genéticas que são caracterizadas pela presença do vetor lentivírus, contendo o gene EGFP sob controle do promotor da ubiquitina C.

#### **4.2.1.1- Extração do DNA**

Para a análise do genótipo dos animais LEWIS-GFP, os animais com 4 semanas de idade foram identificados e seu DNA extraído seguindo as orientações do Kit para extração de DNA (PureLink Genomic DNA Kits – Invitrogen). Assim, um fragmento da extremidade da cauda foi retirado e colocado em solução de digestão *overnight* à 55°C, sendo então centrifugada. O precipitado foi tratado com RNase e, após sucessivas lavagens e tratamentos com tampões específicos, a amostra de DNA genômico foi resfriada a -20 °C até o momento do uso.

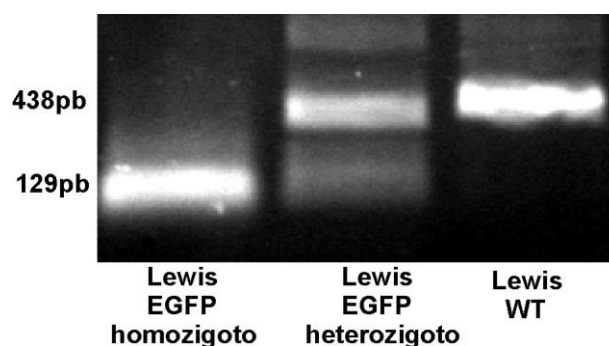
#### **4.2.1.2- PCR**

O PCR foi feito seguindo-se as orientações do Kit (Kit RTG-PCR beads - GE Healthcare), onde adicionou-se 25ng da amostra de DNA, 10 pM/μL dos 3 primers utilizados, completando-se com água ultrapura autoclavada até o volume de 25 μL. Em seguida colocou-se os tubos no Termociclador por 3min a 94 °C, 30 segundos 94°C, 30 segundos a 64 °C, 1 min 72 °C. Este ciclo foi repetido 34 vezes.

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

**Tabela 2:** Primers utilizados para genotipagem.

Ao final do PCR, verificou-se o produto da amplificação por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5% (Fig. 4). As CMMO usadas foram obtidas a partir de animais homozigotos para o gene EGFP.



**Fig 4:** Genotipagem de ratos Lewis transgênicos EGFP. Observa-se, a partir da imagem obtida através de gel de agarose de um ensaio de PCR, a banda com 438 pb relativa ao alelo selvagem (WT) e a banda de 129 pb do alelo transgênico EGFP

#### 4.2.2- Extração das células tronco derivadas da medula óssea

Os animais EGFP foram sacrificados com Halotano e o fêmur e a tíbia dissecados e liberados de todo tecido muscular e conectivo. Uma das epífises foi cortada expondo-se a medula óssea em fluxo laminar e os ossos foram inseridos em uma ponteira de 1 ml. Esse conjunto (osso + ponteira) foi colocado em um tubo falcon de 15ml e centrifugado a 1500 rpm por 2 minutos. A suspensão de medula óssea foi diluída em 5ml de DMEM e, em tubo falcon de 15 ml, colocada lentamente sobre o gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (densidade = 1.077 g/mL Amersham Biosciences®) na proporção Ficoll:suspensão celular de 1:1. O material foi centrifugado a 700 G por 30 minutos. Após a centrifugação, as hemácias e leucócitos atravessam a fase orgânica (Ficoll-Hystopaque) e sedimentam. As plaquetas e proteínas plasmáticas localizam-se na fase aquosa, enquanto que as CMMO localizam-se na interface entre a fase orgânica e a aquosa. O anel de células mononucleares foi cuidadosamente coletado e transferido para um tubo

cônico, contendo 5 mL de meio DMEM. As células foram lavadas 2x a 1500 rpm por 7 minutos e ressuspensas com meio DMEM.

#### 4.2.3 - Análise quantitativa celular:

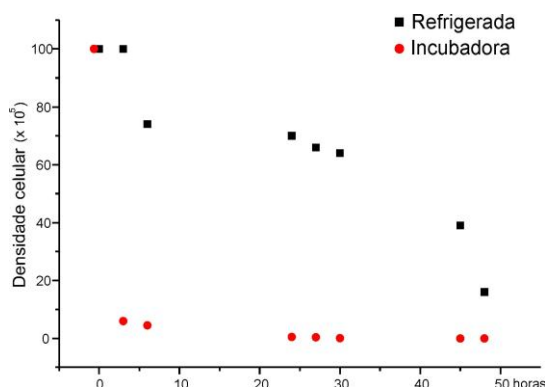
O cálculo numérico estimado de CMMO foi realizado em Câmara de *Neubauer*. A concentração celular na suspensão (número de células por ml) foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Concentração celular} = n \times \text{fator de diluição} \times \text{volume original da suspensão} \times 10^4$$

Onde o  $n$  é a média do número de células obtidas em todos os quadrantes.  $10^4$  representa o valor padrão de referência da câmara de *Neubauer*.

#### 4.2.4 - Análise da viabilidade celular:

Após o isolamento das CMMO, uma amostra das células ressuspensas em PBS foi submetida à coloração vital de *Azul de Tripán* (Reagentes Analíticos Dinâmica, Brasil) que penetra no interior das células que perderam a integridade da membrana plasmática. Para a estimativa da viabilidade celular foi utilizada câmara de *Neubauer* e a contagem realizada até 48h após a extração, em uma alíquota que permaneceu em incubadora a 37°C e outra alíquota que permaneceu -4°C (Fig. 5). Baseado nesses resultados, padronizamos o enxerto das células somente no dia da extração e sua manutenção em refrigeração até pouco antes do uso.



**Figura 5:** Comparação da contagem de CMMO viáveis refrigeradas e mantidas na incubadora.



#### 4.2.5 – Caracterização das CMMO

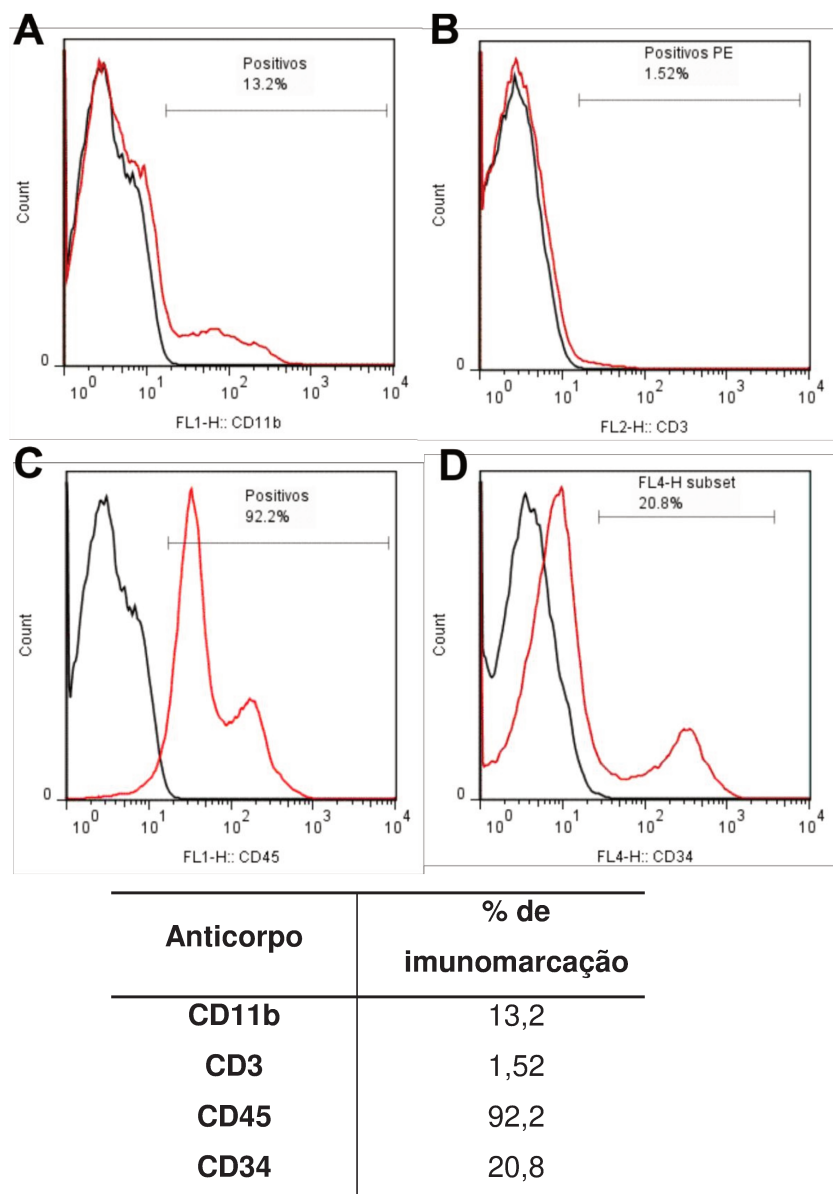
A análise das moléculas de superfície das células MO foi realizada por citometria de fluxo para caracterização da população celular através da presença das seguintes moléculas de superfície celular:

1. camundongo anti-CD3 (BD Pharmingen) conjugado com PE, marcador de linfócito T por marcar TCR;
2. camundongo anti-CD11b (BD Pharmingen) conjugado com FITC, marcador de macrófagos e neutrófilos;
3. camundongo anti-CD34 Sheep (R&D Systems), marcador de células tronco hematopoiética; com o secundário Anti-Sheep IgGNL637 (R&D Systems).
4. camundongo anti-CD45 (BD Pharmingen) conjugado com FITC, marcador de células hematopoiética (linfócito, monócito e granulócito);
5. camundongo anti-CD90 (BD Pharmingen) conjugado com PE marcador de células tronco hematopoiéticas .

Para a citometria de fluxo, aproximadamente  $1 \times 10^7$  células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com os anticorpos conjugados supra citados. As células foram lavadas com PBS e, nos casos onde não foram usados anticorpos primários conjugados, incubadas com anticorpo secundário (R&D Systems) por 30 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas em PBS, fixadas em paraformaldeído 1% e analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Como controle negativo de fluorescência, também se adicionou o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho versus granulosidade para estabelecer a população a ser analisada.

Aproximadamente 100.000 eventos foram adquiridos, utilizando Software de aquisição CELLQuest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os dados obtidos foram analisados pelo software de análise BD FACSDiva). Primeiramente, delimitou-se a população de células a ser estudada através das regiões definidas no gráfico de tamanho versus granulosidade gerado pela análise de células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação. Posteriormente, um gráfico de histograma foi utilizado para delimitarmos

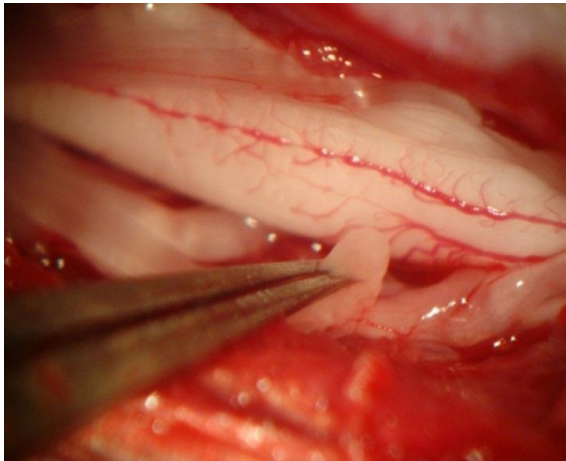
a região do controle negativo de fluorescência referente às células que foram incubadas apenas com o anticorpo marcado com AlexaFluor. A partir da definição destes parâmetros iniciamos a análise das células marcadas e os resultados foram apresentados na forma de histogramas e em percentual da população celular com reação positiva para cada anticorpo (Figura 6).



**Figura 6.** Análise por citometria de fluxo com histogramas da população de células-tronco mononucleares positivas para cada marcador de superfície. **A.** Marcação com anti-CD11b. **B.** Marcação com anti-CD3. **C.** Marcação com anti-CD45. **D.** Marcação com anti-CD34. A linha preta representa o controle em cada gráfico. Abaixo tem-se a tabela com a porcentagem de imunomarcção.

#### 4.3- Avulsão das raízes motoras

Os animais de todos os 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 afastada, para exposição das vértebras torácicas baixas e primeiras lombares. Foi feita a laminectomia de aproximadamente três vértebras, para que a intumescência lombar fosse exposta. A dura-máter foi aberta através de incisão longitudinal e, após dissecação do ligamento denticulado, a medula espinal foi cuidadosamente movimentada até que as raízes ventrais associadas à intumescência lombar fossem identificadas e avulsionadas. A avulsão foi realizada nas raízes lombares ventrais referentes aos segmentos espinais L4, L5 e L6 do lado direito, com o auxílio de uma pinça tipo relojoeiro (Nº4) (Figura 7). Após os procedimentos cirúrgicos, a medula espinal foi recolocada na posição original e a musculatura, a fáscia e a pele foram suturadas em camadas e os animais mantidos em biotério por até 12 semanas.

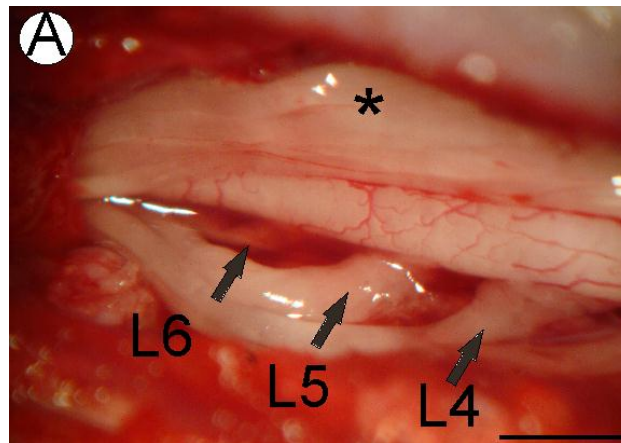


**Figura 7.** Procedimento da avulsão das raízes ventrais. Após identificação e isolamento, as raízes L4-L6 são desconectadas da medula espinal com a utilização de uma pinça. (modificado de De Freria *et al.*, 2012). Vista dorso-lateral da intumescência lombar do rato.

#### 4.4- Reimplante das raízes motoras

Os animais de três grupos experimentais tiveram as raízes lombares ventrais reimplantadas na medula espinal nos seus respectivos sítios de avulsão, com a utilização do selante de fibrina (figura 8). O selante, que está sob patente, é composto por 3 frações que são homogeneizadas no momento de sua utilização 1) fibrinogênio; 2) cloreto de cálcio e 3) giroxina.

No grupo experimental 3 foi realizado apenas o reimplante, já nos grupos experimentais 4 e 5 o reimplante foi associado às CMMO.



**Figura 8** Reimplante das raízes L4-L6 com o selante de fibrina. \* representa as raízes dorsais. Barra de escala = 1mm. (modificado de Barbizan *et al.*, 2013 material suplementar)

#### 4.5-Transplante de células tronco mononucleares

As células foram adicionadas ao selante de fibrina no grupo experimental 4 enquanto que, no grupo experimental 5, as CMMO foram colocadas diretamente na interface da substância branca e cinzenta, na região da lâmina IX, nos segmentos L4, L5 e L6 da medula espinal. Tal procedimento foi realizado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* de espessura capilar acoplada a uma seringa de Hamilton, em sequência ao reimplante das raízes. Em ambos os grupos, foram injetadas aproximadamente  $3 \times 10^6$  células, distribuídas em três pontos equidistantes ao longo dos segmentos lesados (Hell *et al.*, 2009).

#### 4.6- Sacrifício dos animais

Após os períodos de sobrevivência pré-determinados (Tabela 1), os animais foram sacrificados. Todos 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, os animais foram perfundidos com tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,38).

#### 4.7- Sobrevivência neuronal

Após perfusão com salina tamponada (Item 4.7), os animais foram perfundidos com formaldeído a 4% em tampão de sódio 0,1 M; pH 7,4. A intumescência lombar e as raízes reimplantadas foram dissecadas e pós-fixadas por 12 horas à 4°C. Em seguida, incluídas em Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e congeladas à temperatura de -35 a -40°C. Secções transversais da medula espinal e raízes, com 12 µm de espessura, foram obtidas em criostato e posteriormente armazenadas a -20 °C até o momento da utilização. Para contagem de motoneurônios, as secções transversais da intumescência lombar foram coradas com corante de Nissl. Os motoneurônios presentes no núcleo motor lateral do corno anterior no lado ipsilateral (lesado) e contralateral (não lesado) foram contados em cortes alternados, na área lesada da intumescência lombar, sendo o intervalo entre eles de 48 µm. 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 e 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 distância entre as secções contadas e *d* é o diâmetro médio do neurônio. Como a diferença no tamanho afeta significativamente o número de células, o valor de *d* foi calculado especificamente para cada grupo experimental (ipsilateral e contralateral). Neste sentido, o diâmetro de 15 motoneurônios para cada grupo foi mensurado (Image Tool software, versão 3.00) e a média calculada.

#### 4.8- Imunoistoquímica

Após perfusão com salina tamponada (Item 4.7), os animais foram perfundidos com formaldeído a 4% em tampão de sódio 0,1 M; pH 7,4. A intumescência lombar e as raízes reimplantadas foram dissecadas e pós-fixadas por 12 horas à 4°C. Em seguida, foram incluídas em Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e congeladas à temperatura de -35 a -40°C. Secções transversais da medula espinal e raízes com 12 µm de espessura foram obtidas em criostato e posteriormente armazenadas a -20 °C até o momento da utilização.

Para a realização da imunoistoquímica, as lâminas foram inicialmente climatizadas, lavadas com TBS-T e tratadas com BSA (albumina de soro bovino) 3% no

mesmo tampão por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários:

1. camundongo anti-Sinaptofisina (1:600, Dako) para detectar e quantificar a cobertura sináptica, pois esta proteína é encontrada no interior de todos os terminais sinápticos ativos;
2. cabra anti-GFAP (1:900, Dako) para detectar e quantificar a astrogliose reativa, sendo que esta proteína tem sua expressão aumentada após inúmeros tipos de lesões do SN;
3. coelho anti-Iba1 (Wako, 1:600) com intuito de detectar e quantificar microglia reativa, pois também apresenta expressão aumentada após inúmeros tipos de lesão do SN.

A seguir, as secções foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em TBS 2% tween. Em seqüência à primeira incubação, as lâminas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados com CY-3 (Jackson Lab., USA 1:250) por 45 minutos. Os espécimes foram lavados em TBS 2% tween, montados em glicerol/PBS 0,01M (3:1) e observados em microscópio de fluorescência, utilizando-se os filtros para fluoresceína (CY-2) e rodamina (CY-3). As células de animais Lewis-GFP foram observadas com o filtro para fluoresceína (CY-2).

#### **4.8.1- Análise quantitativa dos resultados**

Foram capturadas três imagens representativas de cada lado (lesado e não lesado) da coluna ventral da medula espinal para cada animal, utilizando-se uma câmera de alta sensibilidade (Nikon, DXM 1200F). A densidade integrada de pixels, que representa a intensidade da imunomarcacão das proteínas foi medida nas áreas ao redor de dois motoneurônios, por secção, utilizando-se o software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institutes of Health, USA). A proporção de densidade integrada de pixels foi calculada para cada animal e feita a razão entre os lados ipisi e contralateral à lesão e então estabelecida a média das proporções para cada grupo  $\pm$  erro padrão.

## **4.9 - Quantificação relativa dos transcritos gênicos *in vivo*.**

### **4.9.1 Extração do RNA total**

Após o sacrifício dos animais (item 4.7), a intumescência lombar foi cuidadosamente dissecada sob lupa cirúrgica e retirada a região avulsionada, sendo separados os lados ipsi e contralateral. Cada hemi-medula foi colocada em 500µL de Ribozol (Amresco, USA), rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidos à -80°C até o momento propício para continuar o procedimento. O material foi submetido à homogeneização com o auxílio de um ultrasonicador de ponta (modelo 100; Fisher Scientific), operado em velocidade 3, por 30 segundos. Após a maceração completa do tecido, adicionou-se mais 500µL do reagente Ribozol e, a seguir, a solução foi incubada por 5min, à temperatura ambiente. Adicionou-se 200µL de clorofórmio, seguindo-se agitação vigorosa. Outra incubação foi realizada por 5min, à temperatura ambiente, seguida por centrifugação (12000 ×G, 15min, 4°C). A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500µL de álcool isopropílico gelado. A amostra foi novamente incubada por 10 minutos, à temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugada (12000 ×G, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi retirado por inversão cuidadosa do tubo e o RNA precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75%. Após centrifugação (7500 ×G, 5min, 4°C) e descarte do sobrenadante, o RNA foi solubilizado em 20µL de água livre de RNase e DNase. O material foi purificado utilizando o kit RNeasy (Quiagen) que se baseia em sucessivas centrifugações em colunas e tratamentos com tampões específicos. A amostra de RNA foi mantida a -20 °C até o momento do uso.

### **4.9.2- Quantificação de RNA**

A quantificação do RNA foi efetuada em espectrofotômetro Nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific) por meio da avaliação das absorbâncias a 260 nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280nm e 260/230nm.

#### 4.9.3- Síntese do DNA complementar

As amostras de RNA foram submetidas à síntese de pool por grupo de DNA complementar (cDNA), utilizando-se o kit AffinityScripts QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, La Jolla, CA, EUA), conforme descrito a seguir. O cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 µg de pool de RNA total por grupo. A cada amostra foram adicionados: 10 µL de Master mix, 0,5 µL de primer randômico, 2,5 µL de oligo DT, 1 µL da transcriptase reversa. A reação ocorreu por 5 minutos a 25°C, 42 minutos a 15°C, seguindo-se 5 minutos a 95°C.

#### 4.9.4- Desenho dos *primers*

O primer  $\beta$ -actina foi baseado em Yao L., (2012). Os demais primers foram desenhados com o uso do programa *Primer Express* (Applied Biosystems), analisados no programa Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) para verificação de sua especificidade e do programa *GeneRunner* (Hastings Software) para verificação das condições de formação de estruturas como *hairpins* e *dimers*. Sempre que possível, os primers *forward* e *reverse* foram desenhados em éxons separados.

BDNF	(F) 5' CCACAATGTTCCACCAGGTG 3'
	(R) 5' TGGGCGCAGCCTTCAT 3'
GDNF	(F) 5' GCCACCATCAAAAGACTGAAAAG 3'
	(R) 5' CGGTTCTCTCTCTTCGAGGA 3'
Iba-1	(F) 5' CCCCACCTAAGGCCACCAGC 3'
	(R) 5' TCCTGTTGGGCTTTCAGCAGTCC 3'
GFAP	(F) 5' TGCTGGAGGGCGAAGAAAACCG 3'
	(R) 5' CCAGGCTGGTTTCTCGGATCTGG 3'
GAPDH	(F) 5' GGCTCTCTGCTCCTCCCTGTTCT 3'
	(R) 5' CCGTTCACACCGACCTTCACCATC 3'
$\beta$ -actina	(F) 5'GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA3'
	(R) 5' GACTCAICGTACTCCTGCTTGCTG 3'

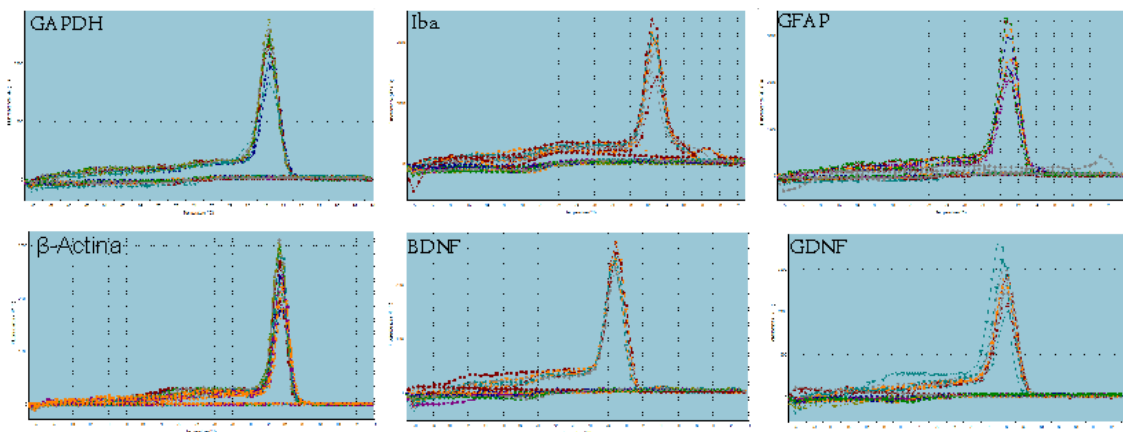
**Tabela 3:** Sequências *forward* e *reverse* dos primers utilizados para amplificação dos segmentos gênicos.



#### 4.9.5- Padronizações

##### 4.9.5.1- Especificidade de amplificação

A especificidade pôde ser verificada pela temperatura de desnaturação do produto amplificado, que depende de seu tamanho e constituição de nucleotídeos. A temperatura de desnaturação foi determinada ao final do programa de amplificação, em protocolo de dissociação, que consistiu em aumento gradativo de temperatura de 60°C a 95°C. A temperatura de desnaturação é aquela em que se observa queda brusca da fluorescência, ocasionada pela separação das duas fitas e liberação do intercalante (*Sybr Green*). Assim, a especificidade da amplificação foi verificada a partir de uma única temperatura de dissociação para cada segmento gênico amplificado em todas as amostras testadas (Figura 5).



**Figura 9:** Representação gráfica da temperatura de dissociação dos segmentos gênicos amplificados. Observa-se apenas uma temperatura de dissociação dos segmentos amplificados.

##### 4.9.5.2 Determinação da eficiência dos primers

Em condições ideais, o número de *amplicons* dobra a cada ciclo de amplificação em uma PCR, o que equivale dizer que a eficiência (*E*) desta reação é igual a 1 ou 100%. Para análises relativas, a eficiência de amplificação pode ser determinada através do declive (*slope*) da porção log-linear da curva de calibração (Pfaffl 2001; Schefe *et al.* 2006; Bustin *et al.* 2009). Assim, um aumento ou uma diminuição de 10 vezes em relação ao número inicial de cópias de um gene alvo produz uma variação de 3,32 Ct em condições teoricamente perfeitas.

A determinação da eficiência de amplificação de cada gene foi feita pelo método de diluição seriada de amostra. Foram feitas cinco diluições seriadas de uma amostra de cDNA (foi utilizada a amostra controle), sendo a concentração da diluição inicial igual a 100ng e a final igual a 3,125ng. Nestas condições, foram utilizados 250 pMol de cada *primer* (mínima concentração associada ao menor Ct).

A eficiência de cada par de *primers* foi calculada de acordo com o *slope* apresentado em cada gráfico, sendo  $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ . A eficiência de amplificação foi então utilizada no cálculo de quantificação da expressão relativa.

Nome	Eficiência %	Sloop	Rsq
GAPDH	98	-3.37	0.99
Iba-1	102	-3.27	0.98
GFAP	111.6	-3.07	0.99
BDNF	97	-3.4	0.98
GDNF	104.9	-3.21	0.99
$\beta$ -actina	100	-3.32	0.98

**Tabela 4:** Eficiência dos *primers* utilizados na PCR em tempo real.

#### 4.9.6- Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real

O cDNA produzido como descrito no **item 4.1.3** foi utilizado como molde para as reações de PCR em tempo real. Esta técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR, através da ligação de uma sonda específica ou de um corante fluorescente na fita recém-sintetizada.

As reações, feitas em triplicata, foram realizadas utilizando-se os cDNAs produzidos, primers específicos para cada gene analisado e o KIT 2X SYBR Green PCR master mix (Agilent Technologies), contendo o corante SYBRGreen, componente intercalante de dupla fita na seguinte solução: 12.5  $\mu$ L de Master mix, 0.5  $\mu$ M de cada primer forward e reverse e 500 ng de cDNA template, em um volume de reação final de 25  $\mu$ L. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água livre de DNase e RNase em substituição à amostra. Todo o procedimento para a PCR quantitativa foi

feito na plataforma de instrumentação *SYBR Green RT-PCR system* num sistema *Mx3005P QPCR* (Agilent Technologies, La Jolla, CA, EUA). As reações foram realizadas após 10 minutos a 95°C utilizando-se 40 ciclos de 30 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 55°C para anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão. Os resultados foram apresentados pelo programa *MxPro-Mx 3005P 4.10* (Agilent Technologies) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) é denominado *ciclo de threshold* ou *Ct*. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, conseqüentemente, menor é o *Ct*.

Além disso, a expressão de 84 genes foram avaliados utilizando-se PCR array para neurotrofinas e receptores (**RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Rat Neurotrophins and Receptor PARN-031, SuperArray Bioscience Corp., Frederick, MD, EUA**) onde foram adicionados 500 ng cDNA, SYBR Green e ROX fornecidos pelo fabricante nos wells que já possuíam os primers. As reações foram realizadas utilizando-se 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 60°C para anelamento e 1 minuto a 95°C para extensão, seguido de mais 30 minutos a 55°C e 30 minutos a 95°C para o término da reação, conforme recomendações do fabricante. Nesse experimento foram analisados apenas 3 grupos (avulsão, avulsão com implante e avulsão com implante e células adicionadas ao selante).

Os genes estão funcionalmente agrupados como abaixo ([http://www.sabiosciences.com/rt\\_pcr\\_product/HTML/PARN-031A.html](http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PARN-031A.html)):

**Neurotrofinas e receptores:** Adcyap1r1, Artn, Bdnf, Cntf, Cntfr, Crh, Crhbp, Crhr1, Crhr2, Frs2, Frs3, Gdnf, Gfra1, Gfra2, Gfra3, Gmfb, Gmfg, Hcrtr1, Hcrtr2, Mt3, Ngfb, Ngfr, Ngfrap1, Nr1i2, Nrg1, Nrg2, Ntf3, Ntf4, Ntrk1, Ntrk2, Pspn, Ptger2, Tfg, Cd40, Fas, Ucn, Vgf, Zfp110, Zfp91.

**Neuropeptídeos e receptores:** *Bombesin Receptors:* Grpr. *Cholecystokinin Receptors:* Cckar. *Galanin Receptors:* Galr1, Galr2. *Neuropeptide Y Receptors:* Npy1r, Npy2r, Ppyr1. *Tachykinin and Receptors:* Tacr1. *Outros:* Npffr2 (Gpr74), Hcrt, Mc2r, Npy, Nrg1.

**Desenvolvimento do sistema nervoso central:** Cxcr4, Fgfr1, Ngfr, Ntf3.

**Desenvolvimento do sistema nervoso periférico:** Artn, Gdnf, Gfra3, Ngfb, Nrg1, Ntf3.

**Direcionadores de axonio:** Artn, Gfra3, Ngfr.

**Gliogenese:** Fgf2, Nrg1, Ntf3.

**Morfogêneses de dendrito:** Bdnf, Mt3.

**Outros genes de Neurogenese:** Bax, Fos, Galr2, Gfra1, Gfra2, Nell1, Ntf4, Ntrk1, Ntrk2.

**Tranmissão sináptica:** Cbln1.

**Diferenciação e crescimento celular:**

**Fatores de crescimento e receptores:** Artn, Bdnf, Fgf2, Fgf9, Fgfr1, Gdnf, Gmfb, Gmfg, Il10, Il1b, Il6, Lif, Mt3, Ngfb, Nrg2, Ntf3, Ntf4, Pspn, Tgfa, Tgfb1, Tgfb1i1, Tp53, Vgf.

**Ciclo celular:** Fgf2, Fgf9, Il1b, Ntrk1, Tgfa, Tgfb1, Tp53.

**Proliferação celular:** Bax, Cxcr4, Fgf2, Fgf9, Grpr, Il10, Il1b, Myc, Stat4, Tgfa, Tgfb1, Tp53.

**Diferenciação celular:** Cntf, Fgf2, Fgf9, Nf1, Nrg1, Stat3, Tp53, Zfp91.

**Citocinas e receptores:** Cx3cr1, Cxcr4, Il10, Il10ra, Il1b, Il1r1, Il6, Il6r, Il6st, Lif, Lifr, Nrg1, Stat4.

**Apoptose:**

**Anti-apoptose:** Bcl2, Bdnf, Il10.

**Ativação de caspase:** Bax, Myc, Tp53.

**Indução de apoptose:** Bax, Myc, Ngfr, Ngfrap1, Fas, Tp53.

**Outros genes de apoptose:** Hspb1, Il6, Cd40.

**Resposta Imune:**

**Resposta à fase aguda:** Il6, Stat3.

**Resposta inflamatória:** Il10, Il1b, Tgfb1.

**Ativação de linfócitos:** Il10, Cd40.

**Outros genes envolvidos na resposta Imune:** Lif, Fas.

**Fatores e reguladores da transcrição:**

**Reguladores positivos da transcrição:** Fus, Ntf3, Tgfb1i1.

**Ativação de co-ativador transcricional:** Maged1, Tgfb1i1.

**Outros genes da Ativação de co-ativador transcricional:** Fos, Myc, Nr1i2, LOC685671 (Mef2c), Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Tp53, Zfp110.

#### **4.9.7- Análise dos dados**

A quantificação dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, sendo normalizada com relação a genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. Assim, os níveis de expressão relativos do

RNAm alvo foram normalizados de acordo com o controle endógeno GAPDH e  $\beta$ -actina. A expressão foi avaliada com base no constitutivo (GAPDH ou  $\beta$ -actina) e no calibrador (lado contralateral da lesão para cada grupo), a partir do Ct destes grupos para cada gene testado. A análise foi feita a partir da média aritmética do Ct de cada triplicata, utilizando-se o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001), onde  $\Delta\Delta Ct = [Ct(\text{calibrador}) - Ct(\text{GAPDH})] - [Ct(\text{gene}) - Ct(\text{GAPDH})]$ .

A quantificação da placa de PCR array também foi normalizada de acordo com o controle endógeno e feita a razão entre o lado contralateral/ipsilateral.

#### **4.10 -Processamento do material para MET:**

Após sacrifício, (item 4.7) os animais foram fixados por subsequente perfusão vascular com solução fixadora de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 1% em tampão fosfato de sódio 1M pH 7,38.

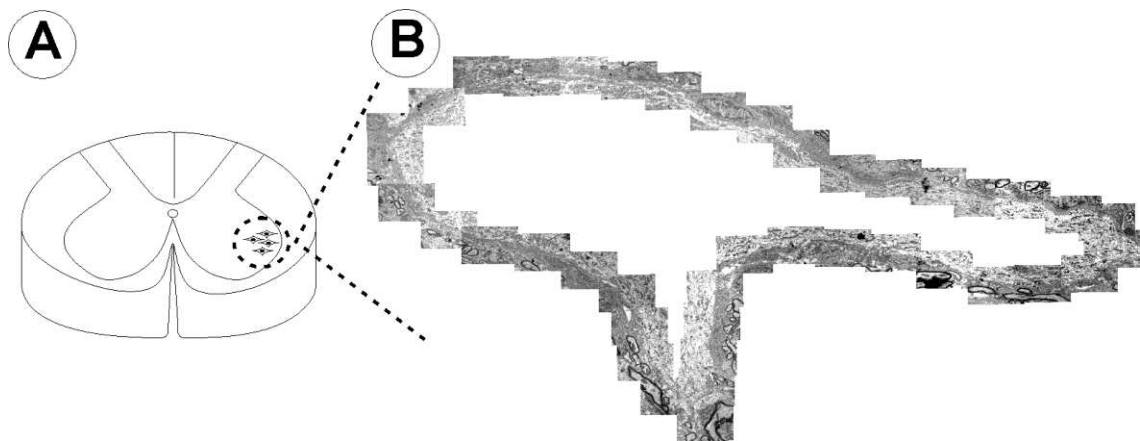
Seguindo a perfusão, os nervos isquiáticos e a intumescência lombar foram dissecados e pós-fixados por 12 horas, imersos na solução fixadora à 4°C e então lavados em tampão fosfato 0,1M pH 7,38. As medulas foram seccionadas longitudinalmente, através da fissura mediana anterior. Os nervos e os fragmentos correspondentes ao lado ipsilateral e contralateral dos espécimes 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 0,1M, 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  $\mu$ m) obtidas e analisadas após coloração com azul de toluidina 0,25%, a fim de observar os nervos e 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 2% durante 20 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos, e analisadas ao microscópio eletrônico Tecnai G<sup>2</sup> Spirit Twin, FEI, operado à 120KV.

Esse procedimento foi realizado em todos os grupos, nos animais com 12 semanas pós-operatórias.

#### 4.10.1 Análise da medula espinal nas secções ultra-finas:

Neurônios com grandes corpos celulares ( $>35\text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro) encontrados no grupo motor lateral da coluna ventral da medula espinal e seccionados ao nível do plano nuclear foram identificados como motoneurônios alfa medulares pela presença de pelo menos um terminal do tipo C (Conradi, 1969). 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 13.000X, empregando-se uma vídeocâmara (Eagle) conectada a um sistema computadorizado (Fei Company, Holanda). As imagens foram montadas sequencialmente em programa vetorial (Fig. 10) o perímetro total dos neurônios foi medido pelo uso do programa Image J.

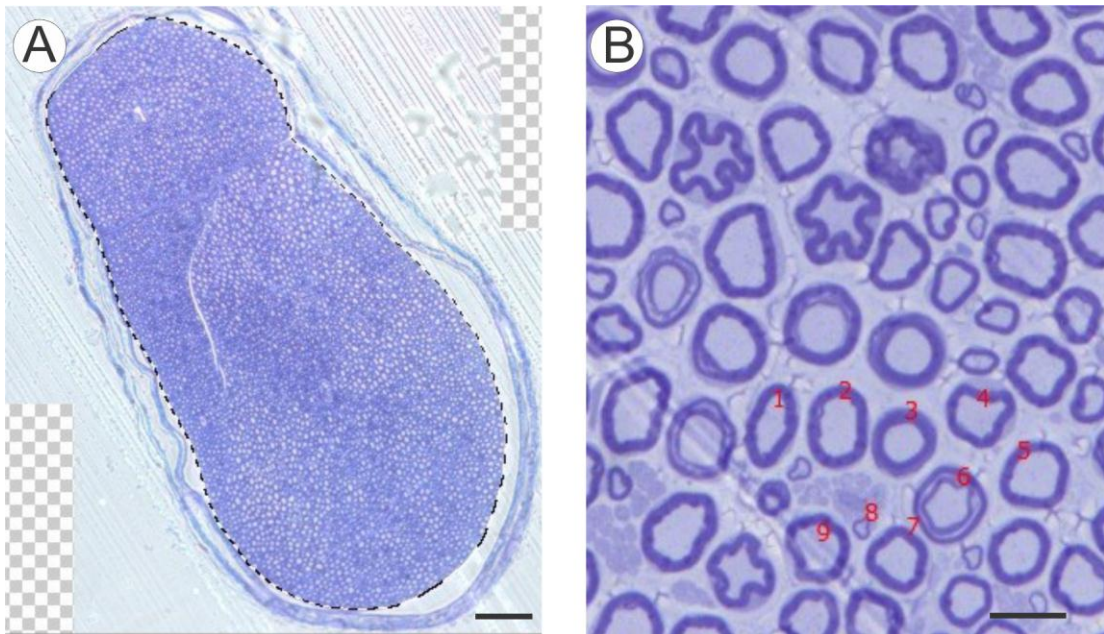


**Figura 10** Localização dos motoneurônios estudados e sua reconstrução. A-desenho esquemático de um segmento lombar da medula espinal demonstrando o núcleo motor lateral onde se encontram os motoneurônios estudados. B- Seqüência de eletromicrografias eletrônicas utilizadas para a reconstrução de um motoneurônio alfa medular. Na superfície celular foi obtido aumento de 13.000X por fotografias seqüenciais do motoneurônio.

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 J, quantificados por  $100\text{ }\mu\text{m}$  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 cobrindo os motoneurônios (GAPs).

#### 4.11- Análise morfométrica do nervo.

Foram obtidas secções semifinas (0,5  $\mu\text{m}$ ) dos nervos isquiáticos e corados com azul de toluidina 0,5% dos lados ipsi e contralaterais. Foi analisado um corte histológico por animal de cada grupo (n=5 por grupo) em microscópio óptico (NIKON DXM 1200C), sendo empregado aumento de 100x para observação da totalidade do nervo (Fig. 11A) e determinação da área do mesmo utilizando-se a ferramenta laço poligonal do software Adobe Photoshop CS4 extended.



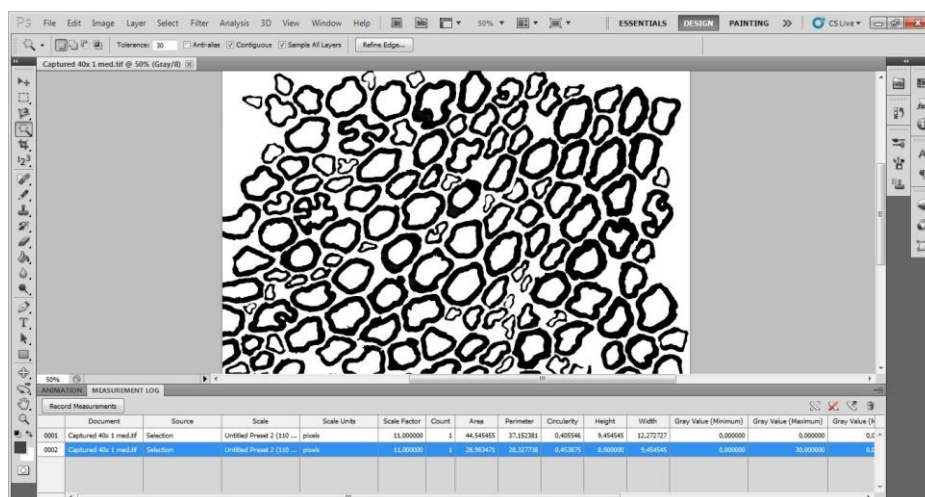
**Fig. 11.** Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático. Em A, após a montagem das micrografias no aumento de 100 X, foi realizada a medida da área do nervo, note o contorno ao redor do mesmo. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ . Em B, utilizou-se o aumento de 1000 X para realizar a quantificação das fibras que foram numeradas manualmente (exemplo da quantificação). Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .

Com o aumento de 1.000x, em imersão (Fig. 11B), foram digitalizadas imagens para análise quantitativa e morfométrica, a fim de se obter o número de axônios mielínicos, a espessura da bainha de mielina (EBM), o diâmetro das fibras nervosas (DFN) e o diâmetro dos axônios mielínicos (DAM).

Para a análise quantitativa, cada nervo teve, no mínimo, 30% de sua área digitalizada em aumento de 1.000X, totalizando aproximadamente 15 fotos. O número total de axônios em cada nervo foi calculado a partir da somatória do número de axônios obtidos no total dos campos descrito acima. Para isso foi estabelecida uma proporção entre este

valor e a área total do nervo. Essas imagens foram utilizadas para a contagem e morfometria de fibras mielínicas.

Já para a análise morfométrica, três campos amostrados em cada nervo, em aumento de 1.000X, foram empregados utilizando-se o programa Adobe Photoshop. As imagens foram transformadas em preto e branco e então foi aplicada a ferramenta “limiar”. O background que não seria medido, bem como as fibras que não apareciam inteiras na figura foram apagados (Fig 12). Os axônios foram selecionados um por vez e as medidas foram feitas automaticamente pelo programa, após calibração do mesmo.



**Fig 12:** Procedimento para medida do diâmetro das fibras nervosas e do axônio, no software Adobe Photoshop CS4.

A espessura da bainha de mielina (EBM) foi determinada pela fórmula:

$$EBM = [(diâmetro da fibra nervosa) - (diâmetro do axônio)]/2$$

Enquanto que a Razão "g" (RZG) foi obtida a partir do quociente do diâmetro do axônio mielínico (DAM) com o diâmetro da fibra nervosa (DFN). O menor diâmetro da fibra (menor distância perpendicular ao maior eixo da fibra mielínica) foi o escolhido para a medida das fibras mielínicas com perímetro elíptico ou irregular. Os valores referentes à medida de cada fibra nervosa foram transferidos para o programa Excel e constituíram uma lista de dados. Para uma melhor comparação dos dados, foi feita a distribuição em intervalos de frequência, através do programa Microcal Origin e, posteriormente, os intervalos foram transformados em porcentagem.



#### **4.12- Avaliação Motora da Recuperação Funcional**

Foram realizadas avaliações motoras, semanalmente, em todos os animais dos cinco grupos experimentais, antes da avulsão e até 4 semanas pós-avulsão. Após a quarta semana pós cirurgia, os animais foram avaliados duas vezes por semana até 12 semanas, através do “walking track test” (CatWalk).

Os animais foram colocados para andar ao longo de uma plataforma com um assoalho de vidro (100 cm comprimento x 15 cm largura x 0.6 cm espessura) localizada em uma sala escura. Uma lâmpada fluorescente marcou somente onde havia pontos de contato no assoalho de vidro, ou seja, a pressão das patas dos animais caminhando. A intensidade do sinal variou de acordo com a pressão aplicada pela pata do animal. Quanto maior a pressão exercida pela pata do animal, maior foi o contato da pele com o assoalho e, então, maior foi o brilho dos pixels. O programa CatWalk adquiriu, armazenou e analisou os vídeos dos animais caminhando pelo corredor. As medições foram feitas de acordo com a intensidade da pressão exercida pela pegada. Para isso, utilizou-se os valores da média das razões dos lados ipsi/contralateral das impressões plantares. Já para o índice de recuperação motora do nervo fibular, as medições foram feitas de acordo com dois parâmetros: a distância entre o primeiro e o quinto dedos (toe spread, TS) e a distância entre o terceiro dedo e o calcanhar (print length, PL). Estes parâmetros foram utilizados para a medição das pegadas das patas posterior direita (lesada) e posterior esquerda (normal) e os valores aplicados na seguinte fórmula, descrita por Bain *et al* (1989):

$$PFI=174.9 \text{ (ETS-NTS/NTS)} - 80.3 \times \text{(ELP-NLP/NLP)} - 13.4 \text{ (E= lado lesionado, N=lado normal)}.$$

#### **4.13- Análise estatística dos resultados**

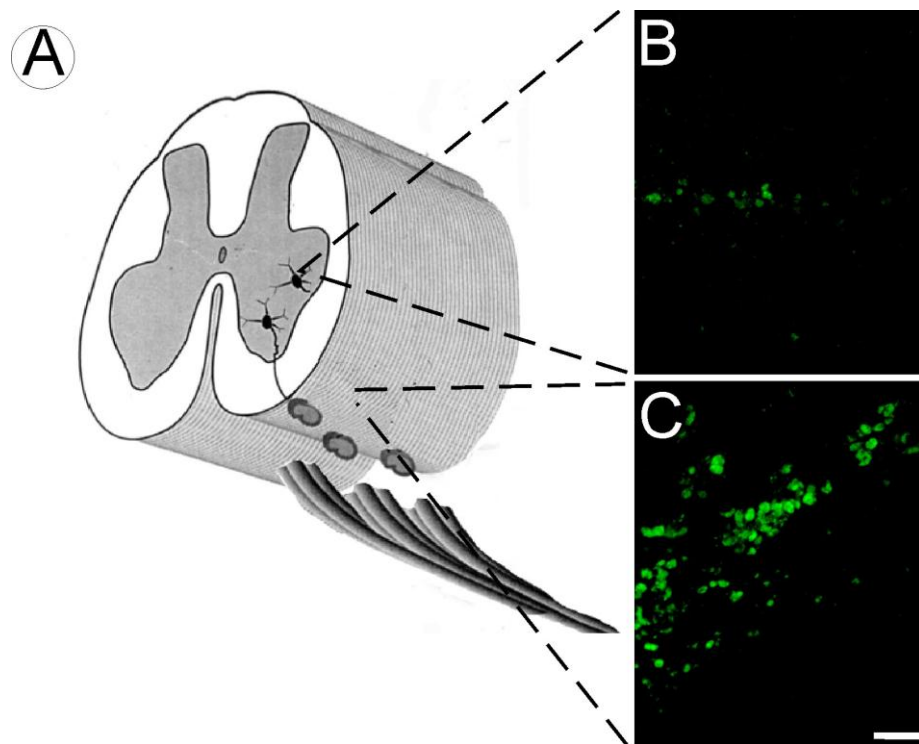
Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via e os dados da análise funcional (walking track test) foi avaliado pelo método da análise da variância – ANOVA de duas vias. Nos dois casos foi realizado o pós-teste Bonferroni. Assumiu-se um nível de significância igual a \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.



## 5- RESULTADOS

### 5.1 Enxerto das CMMO

As CMMO foram adicionadas conjuntamente com o selante de fibrina, no grupo 4. No grupo 5, foram injetadas no funículo lateral da medula espinal. Em ambos os grupos, após 4 semanas, ainda foi possível encontrar um número significativo de células. No grupo onde as células foram adicionadas com selante, as CMMO foram preferencialmente encontradas na superfície ventro-lateral ipsilateral à lesão (fig 13C), bem como na musculatura e tecido conectivo, frequentemente em maior número, ao se comparar com o grupo 5. No grupo 5, onde as células foram injetadas, percebe-se a presença das mesmas no sítio de injeção (Fig 13B). No momento da injeção ocorreu certo extravasamento do volume de células para o meio extramedular, por capilaridade.



**Figura 13:** A) Esquema da medula espinal submetida à avulsão de raízes motoras e os diferentes tipos de locais onde as células são encontradas. Em B) pode-se observar a presença das células no sítio da injeção, enquanto que, em C) as células se agrupam na superfície ventro-lateral direita da medula espinal. Essas células, observadas em microscopia de fluorescência, são de doadores E-GFP, fluorescendo sem a utilização de anticorpo. Barra de escala = 50µm.

## 5.2- Efeito neuroprotetor do selante de fibrina associado ao tratamento celular sobre os motoneurônios axotomizados

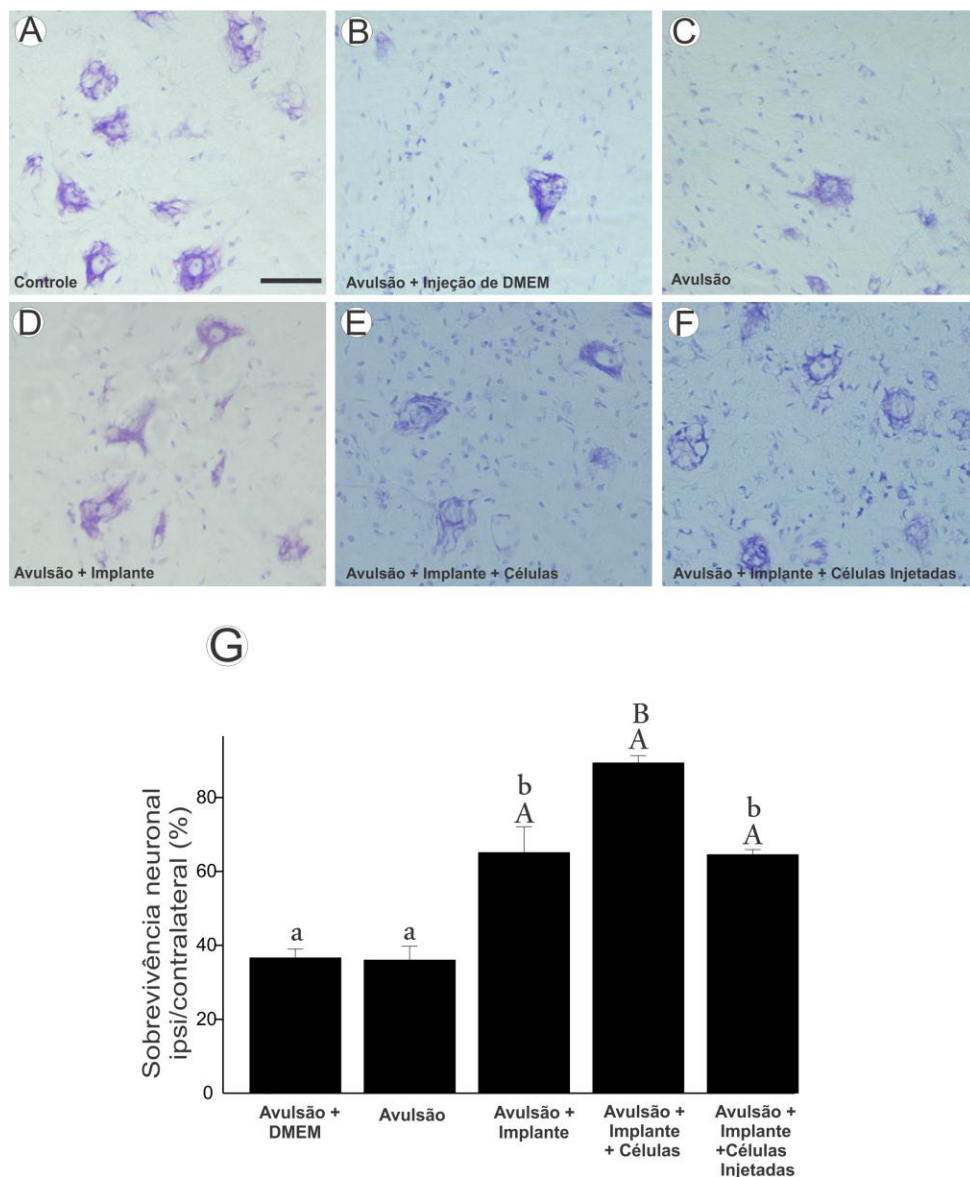
O efeito do implante e tratamento com CMMO foi analisado determinando-se a porcentagem de sobrevivência neuronal, sendo esta taxa a razão percentual entre o número de motoneurônios ipsilateral (**Fig. 14 A**) e contralateral, para cada período de sobrevivência (4, 8 e 12 semanas após a avulsão).

Após quatro semanas, ocorreu uma intensa perda dos motoneurônios lesados no núcleo motor, nos animais dos grupos avulsão (**Fig. 14 B e C**). Por outro lado, o implante, associado ou não ao tratamento celular, resultou em número estatisticamente maior de neurônios sobreviventes. (**Fig. 14 D, E e F**), sendo ainda mais significativo no grupo associado ao tratamento celular adicionado ao selante. Calculou-se a razão percentual entre o número de motoneurônios presentes no lado ipsilateral e contralateral, obtendo-se os seguintes resultados: avulsão e injeção de DMEM -  $36,68\% \pm 2,28\%$  (média  $\pm$  EP), avulsão -  $36,09\% \pm 3,67\%$ ; avulsão com implante -  $65,19\% \pm 6,93\%$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $89,44\% \pm 1,89\%$ ; implante com células injetadas -  $64,60\% \pm 1,33\%$ ;  $p < 0,001$ .

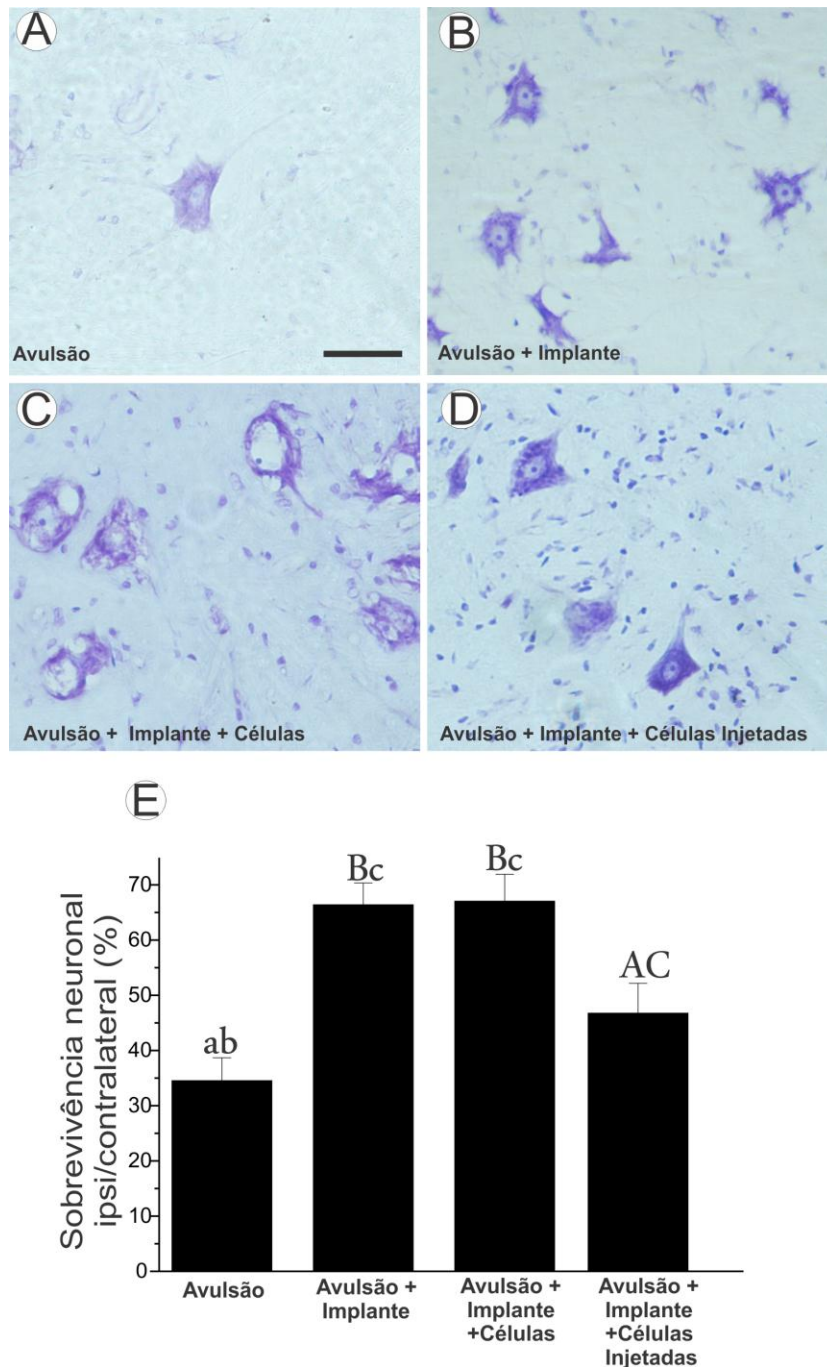
Oito semanas após a lesão, notou-se a presença de vários neurônios no núcleo motor dos grupos onde foi realizado o implante (**Fig. 15 B, C e D**), apresentando número estatisticamente maior de neurônios sobreviventes, quando comparado ao grupo avulsão. (**Fig. 15 A**): avulsão -  $34,58\% \pm 4,12\%$  (média  $\pm$  EP); avulsão com implante -  $66,46\% \pm 3,88\%$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $67,11\% \pm 4,83\%$ ; implante com células injetadas -  $46,81\% \pm 5,87\%$  ( $p < 0,001$ ).

Esse padrão neuroprotetor se manteve inclusive após 12 semanas da avulsão (**Fig. 16 B, C e D**), onde ainda observou-se resgate neuronal estatisticamente superior, quando comparado ao grupo avulsão (**Fig. 16 A**); Avulsão -  $29,70\% \pm 2,55\%$  (média  $\pm$  EP); avulsão com implante -  $66,46\% \pm 6,09\%$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $60,72\% \pm 5,99\%$ ; implante com células injetadas -  $50,10\% \pm 2,95\%$ ;  $p < 0,001$ ).

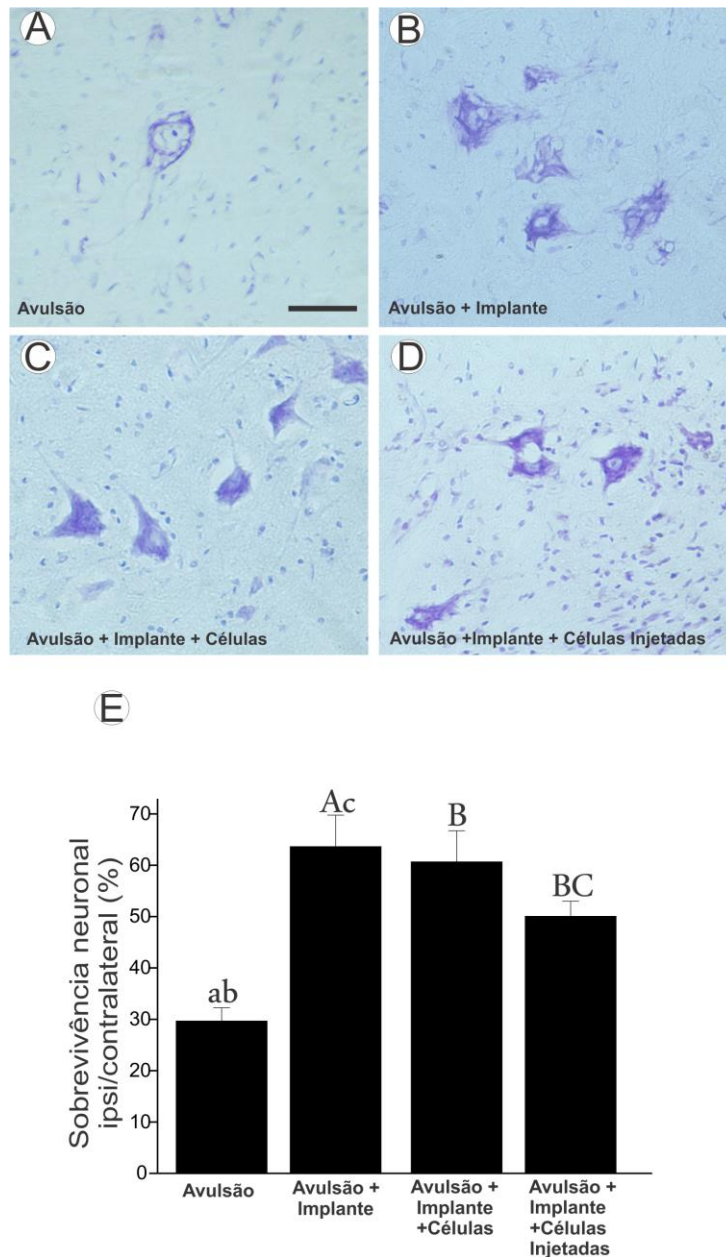
Ao se comparar a sobrevivência neuronal nos grupos sacrificados 4, 8 e 12 semanas após a lesão, observou-se uma diminuição significativa no número de motoneurônios no lado ipsilateral à lesão do grupo que, após avulsão e implante, recebeu células tronco mononucleares conjuntamente com o selante de fibrina ( $p < 0,05$ ; **Fig 17**).



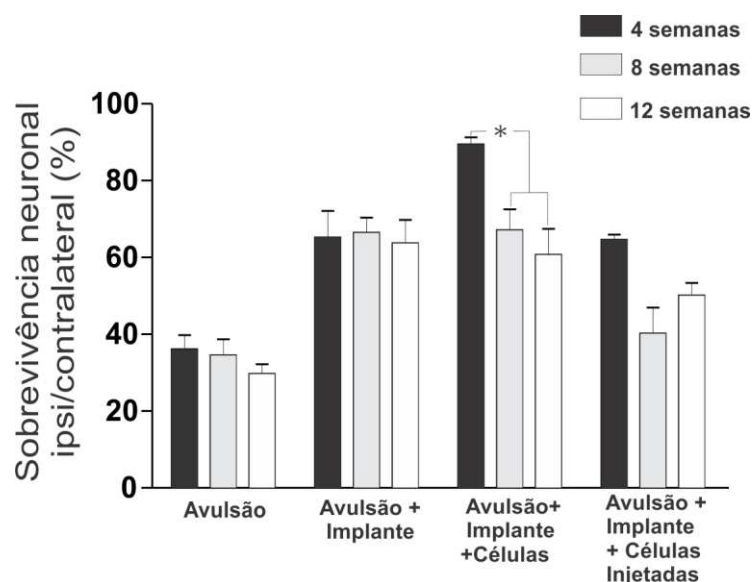
**Figura 14:** Efeito neuroprotetor do implante com selante de fibrina e tratamento com CMMO sobre os motoneurônios, 4 semanas após a lesão. Cortes histológicos corados com cresil violeta. A) Lado contralateral à avulsão da coluna anterior da medula espinal (controle). (B-F) Lados ipsilaterais à avulsão da coluna anterior da medula espinal. Fig (B) representa avulsão com injeção de DMEM e (C) representa animais apenas com avulsão. Observa-se redução do número de neurônios motores nesses grupos. D) Grupo onde, após a avulsão, as raízes foram implantadas. E) Grupo onde, no momento do implante, as CMMO foram adicionadas ao selante. F) Após a avulsão, seguida do implante, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50µm. G) Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, 4 semanas após a avulsão das raízes motoras. Observa-se um aumento na sobrevivência neuronal nos grupos com implante sendo, ainda mais evidente, no grupo onde o implante foi associado ao tratamento com CMMO adicionadas ao selante (Aa =  $p < 0,001$ , Bb =  $p < 0,01$ , n=5).



**Figura 15:** Efeito neuroprotetor do implante com selante de fibrina, 8 semanas após a lesão. Lados ipsilaterais à avulsão, na coluna anterior da medula espinal. Cortes histológicos corados com cresil violeta. Imagens representativas do grupo que A) sofreu avulsão e não recebeu tratamento (apenas avulsão), B) as raízes foram implantadas, C) as raízes foram implantadas com as CMMO adicionadas ao selante e D) após a avulsão, seguida do implante, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50 $\mu$ m. E) Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, 8 semanas após a avulsão das raízes motoras. Observa-se aumento na sobrevivência neuronal nos grupos com implante (Aa =  $p < 0,001$ , Bb =  $p < 0,01$  e Cc =  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ).



**Figura 16:** Efeito neuroprotetor do implante com selante de fibrina, 12 semanas após a lesão. Lados ipsilaterais à avulsão, na coluna anterior da medula espinal. Cortes histológicos corados com cresil violeta. Imagens representativas do grupo que A) sofreu avulsão e não recebeu tratamento (apenas avulsão), B) as raízes foram implantadas, C) as raízes foram implantadas com as CMMO adicionadas ao selante e D) sofreram avulsão, seguida do implante, sendo as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50µm. E) Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, 12 semanas após a avulsão das raízes motoras. Observa-se aumento na sobrevivência neuronal nos grupos com implante (Aa =  $p < 0,001$ , Bb =  $p < 0,01$  e Cc =  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ).



**Figura 17:** Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal 4, 8 e 12 semanas após a avulsão das raízes motoras. Observa-se uma diminuição no número de neurônios nos lados ipsilateral à lesão, nos grupos com CMMO homogenizadas (\* =  $p < 0,05$ ).

### 5.3 Redução do processo de eliminação sináptica, avaliada através da expressão de sinaptofisina

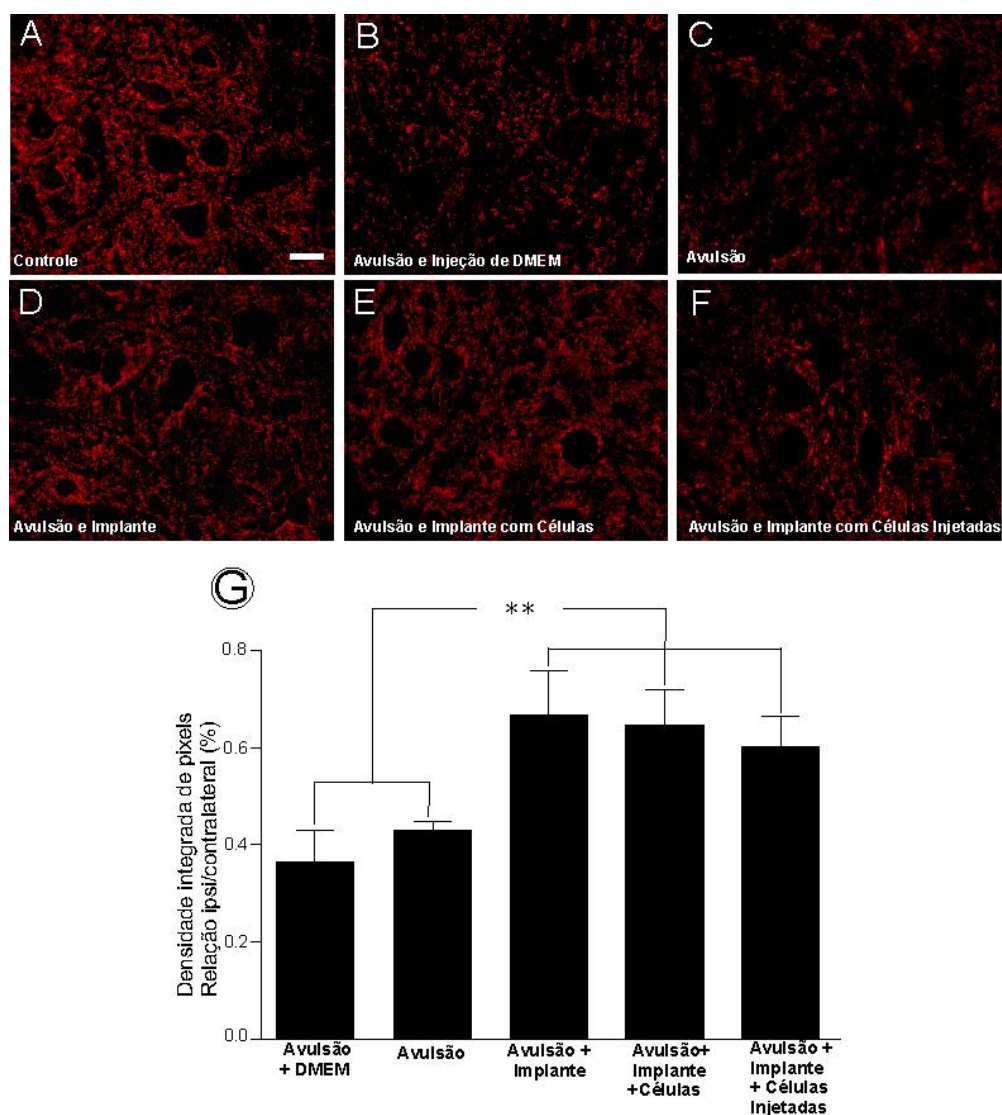
Para avaliar as alterações na atividade sináptica, após avulsão das raízes motoras com o implante e o tratamento com CMMO, foi feita análise imunoistoquímica da presença da proteína sinaptofisina, no núcleo motor lateral da coluna ventral da medula espinal 4, 8 e 12 semanas após a lesão. A imunomarcagem revelou maior densidade 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 uma intensa reatividade nessa área, a qual foi atribuída ao grande número de inputs aos motoneurônios não lesados (contralaterais) em relação aos lesados. Em contraste ao lado contralateral, a intensidade da expressão de sinaptofisina foi drasticamente reduzida na superfície dos motoneurônios axotomizados dos animais sem implante e não tratados, indicando uma grande diminuição do número de terminais em aposição a estes neurônios, bem como nos animais tratados somente com DMEM (**Figs 18 A e B, 19 A e 20 A**). Porém, após 4 semanas, observou-se significativa diferença na expressão de sinaptofisina entre os lados ipsilateral dos grupos



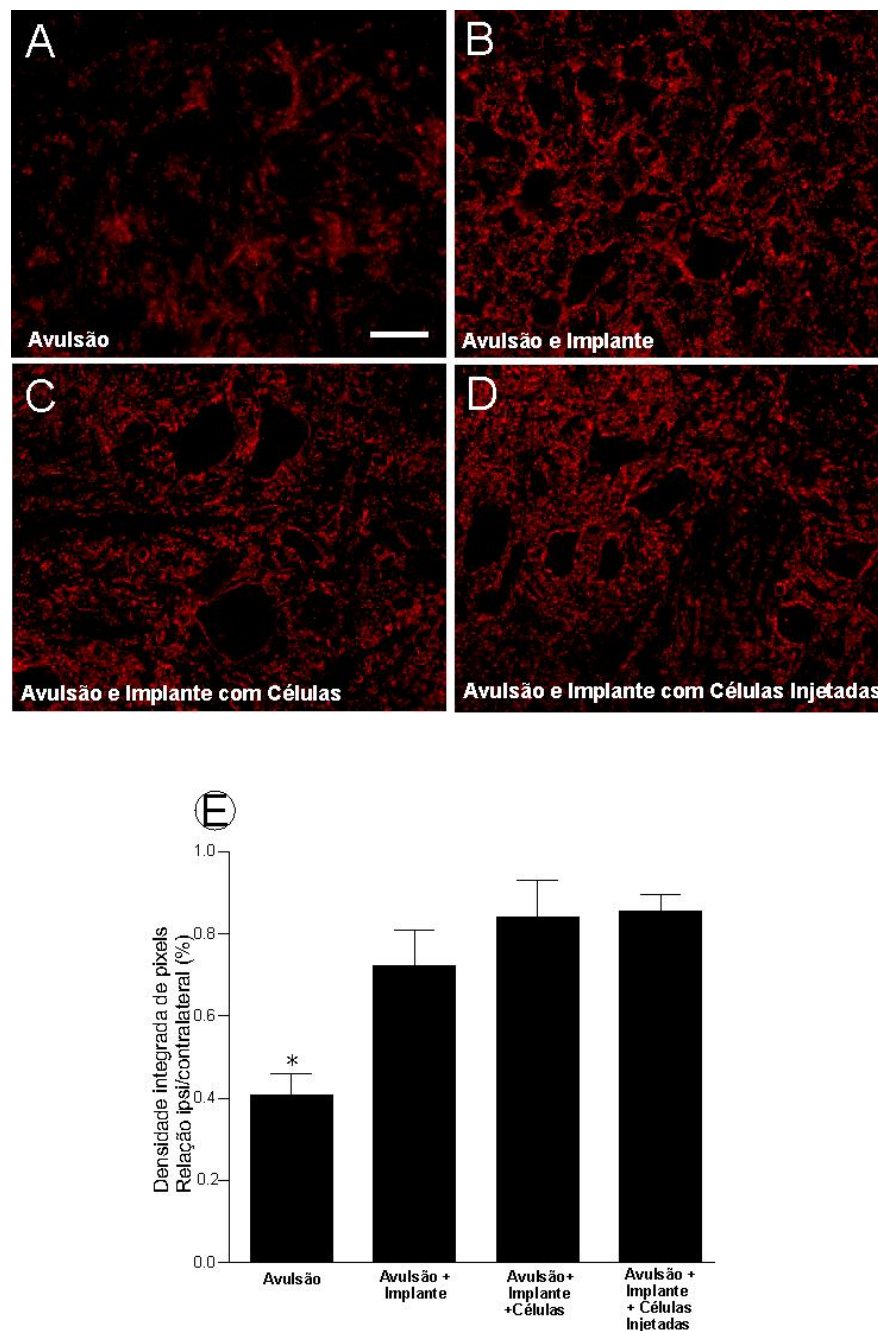
que tiveram a raiz avulsionada reimplantada com ou sem tratamento com as células MO, quando comparados aos grupos avulsão (**Figs .18 B, C e D**). Esses resultados se mantiveram após 8 (**Fig.19 C, D e E**) e 12 (**Fig.20 C, D e E**) semanas da avulsão, nos grupos onde o implante com selante de fibrina foi realizado. Nota-se que os grupos avulsionados que receberam o implante, tratados ou não com as células tronco, apresentaram menor redução de terminais em aposição ao corpo celular, refletindo uma possível diminuição do processo de eliminação sináptica. Esta observação baseou-se em avaliação quantitativa da cobertura sináptica através da densidade integrada de pixels, que reflete a intensidade da imunomarcacão. Foi calculada a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo (**Fig. 18**).

**Avaliação 4 semanas** pós-lesão: avulsão -  $0,43 \pm 0,01$  (média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão  $\pm$  erro padrão); avulsão + DMEM -  $0,36 \pm 0,05$ ; avulsão com implante -  $0,66 \pm 0,09$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $0,65 \pm 0,07$ ; implante com células injetadas -  $0,60 \pm 0,01$ ;  $p < 0,01$ . **Fig.19.**

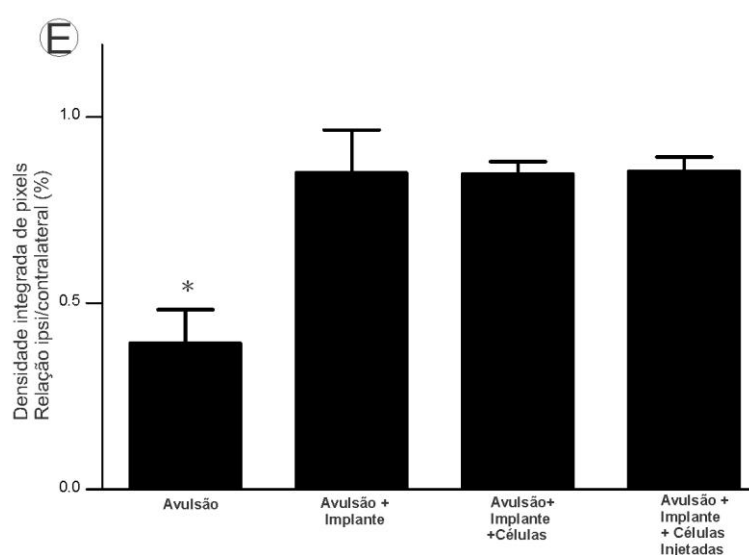
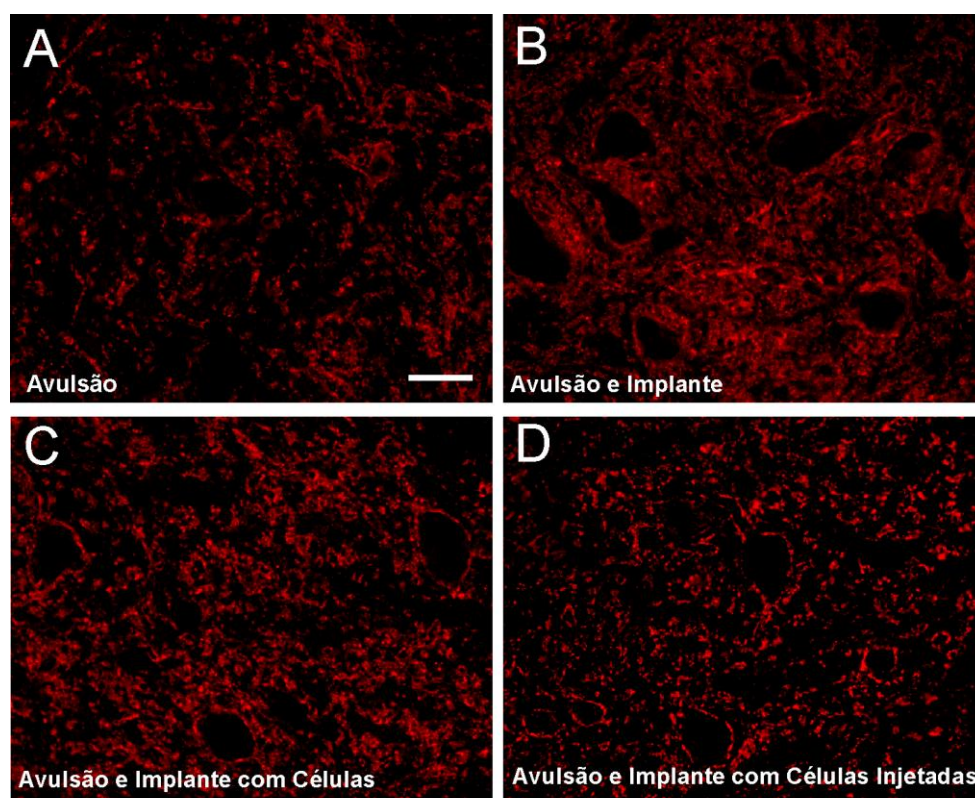
**Avaliação 8 semanas** pós-lesão: avulsão -  $0,40 \pm 0,05$  (média da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão  $\pm$  erro padrão); avulsão com implante -  $0,72 \pm 0,05$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $0,84 \pm 0,07$ ; implante com células injetadas  $0,86 \pm 0,03$ ;  $p < 0,05$ . **Avaliação 12 semanas** pós-lesão (**Fig.20**): avulsão  $0,39 \pm 0,08$  (média da razão ipsi/contralateral da densidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão  $\pm$  erro padrão); avulsão com implante -  $0,85 \pm 0,11$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $0,84 \pm 0,03$ ; implante com células injetadas -  $0,85 \pm 0,01$  ( $p < 0,003$ ).



**Figura 18:** Análise imunoistoquímica do lado ipsilateral da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-sinaptofisina, 4 semanas após a lesão. A) Lado contralateral à avulsão da coluna anterior da medula espinal (controle). (B-F) Lados ipsilateral à avulsão da coluna anterior da medula espinal. (B) representa avulsão com injeção de DMEM e (C) representa animais apenas com avulsão. Note-se grande redução na expressão de sinaptofisina, resultado de pequena cobertura sináptica nestes neurônios. D) Grupo onde, após a avulsão, as raízes foram implantadas. E) Grupo onde, no momento do implante, as CMMO foram adicionadas ao selante. F) Após a avulsão, seguida do implante, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Nota-se uma relativa preservação de terminais sinápticos em aposição ao corpo celular dos motoneurônios, comparativamente aos grupos implante e implante associado a células (D, E e F). Contudo, não se observam diferenças no padrão da marcação entre estes dois grupos. Barra de escala = 100µm. G) O gráfico indica a diferença da razão ipsi/contralateral da média da densidade integrada de pixels, dos lados ipsi e contralateral ( $p < 0,05$ ,  $n = 5$  para cada grupo).

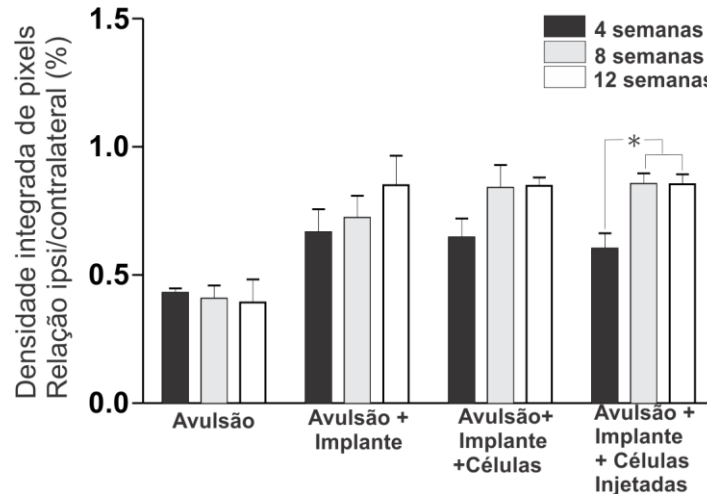


**Figura 19:** Imunomarcção anti- sinaptofisina na região do corno ventral, no lado ipsilateral à avulsão das raízes da medula espinal, 8 semanas pós operatórias. Note-se menor intensidade da marcação no grupo (A) avulsionado, em comparação aos grupos com (B) reimplante após a avulsão, (C) cujo o selante do reimplante foi adicionado com as CMMO e (D), após o implante da avulsão das raízes ventrais, onde as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Escala de 50  $\mu$ m. O gráfico (E) indica a diferença da média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels, dos lados ipsi e contralateral, nos grupos analisados. (\* $p < 0,05$ ,  $n=5$ ).



**Figura 20:** Imunomarcção anti- sinaptofisina na região do corno ventral, no lado ipsilateral à avulsão das raízes da medula espinal, 12 semanas pós operatório. Note-se menor intensidade da marcação no grupo (A) avulsionado em comparação aos grupos com (B) reimplante após a avulsão, (C) cujo o selante do reimplante foi adicionado com as CMMO e (D), após o implante da avulsão das raízes ventrais, onde as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Escala de 50  $\mu$ m. O gráfico (E) indica a diferença da média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels, dos lados ipsi e contralateral, nos grupos analisados. ( $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ).

Ao se comparar os grupos 4, 8 e 12 semanas após a avulsão, observou-se diferenças significativas na cobertura sináptica no decorrer do tempo apenas no grupo onde as células mononucleares foram injetadas ( $p<0,05$ ). (**Fig.21**)



**Figura 21:** Representação gráfica da quantificação razão ipsi/contralateral da imunomarcagem de sinaptofisina 4, 8 e 12 semanas após a avulsão das raízes motoras. Observa-se aumento dos inputs sinápticos no grupo com implante e CMMO injetada (\* =  $p<0,05$ ).

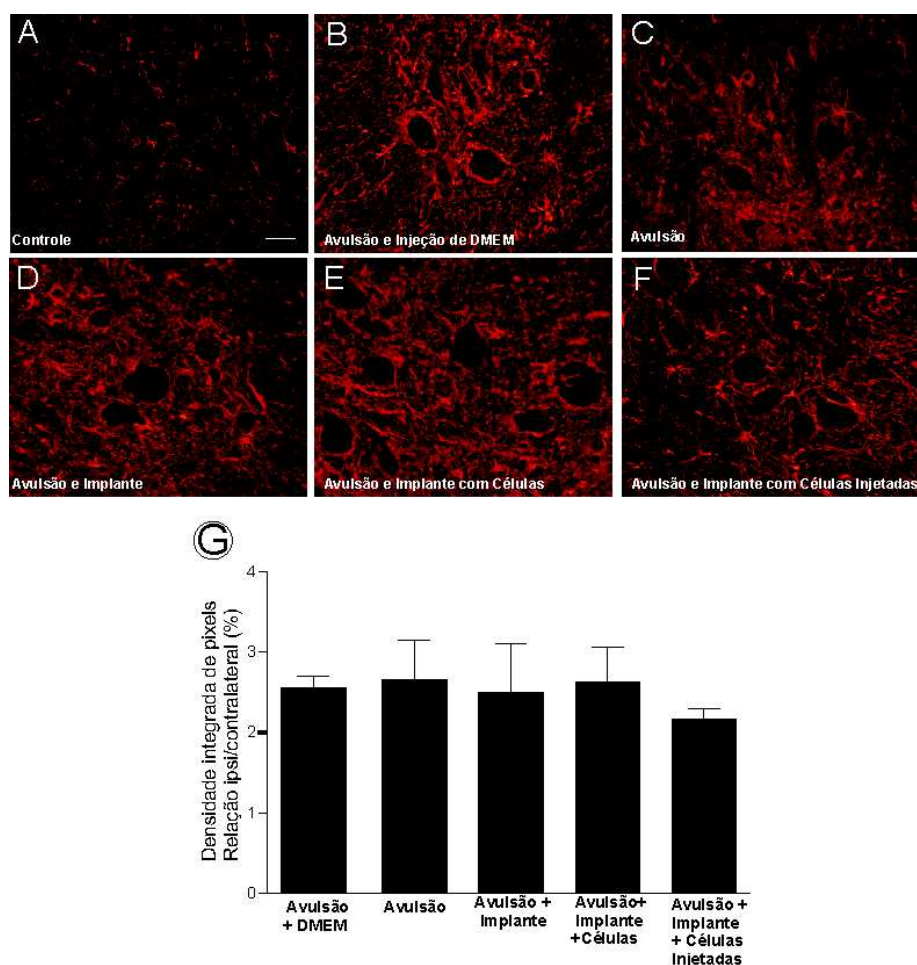
#### 5.4 Reatividade glial

Para avaliação da reatividade glial após 4, 8 e 12 semanas do reimplante, foram utilizados anticorpos anti-GFAP (**Figs. 22, 23 e 24**) para análise da astrogliose reativa bem como anti-Iba-1 (**Figs. 26, 27 e 28**) para análise da reatividade microglial. A imunomarcagem revelou reatividade basal para o lado contralateral de ambos os grupos.

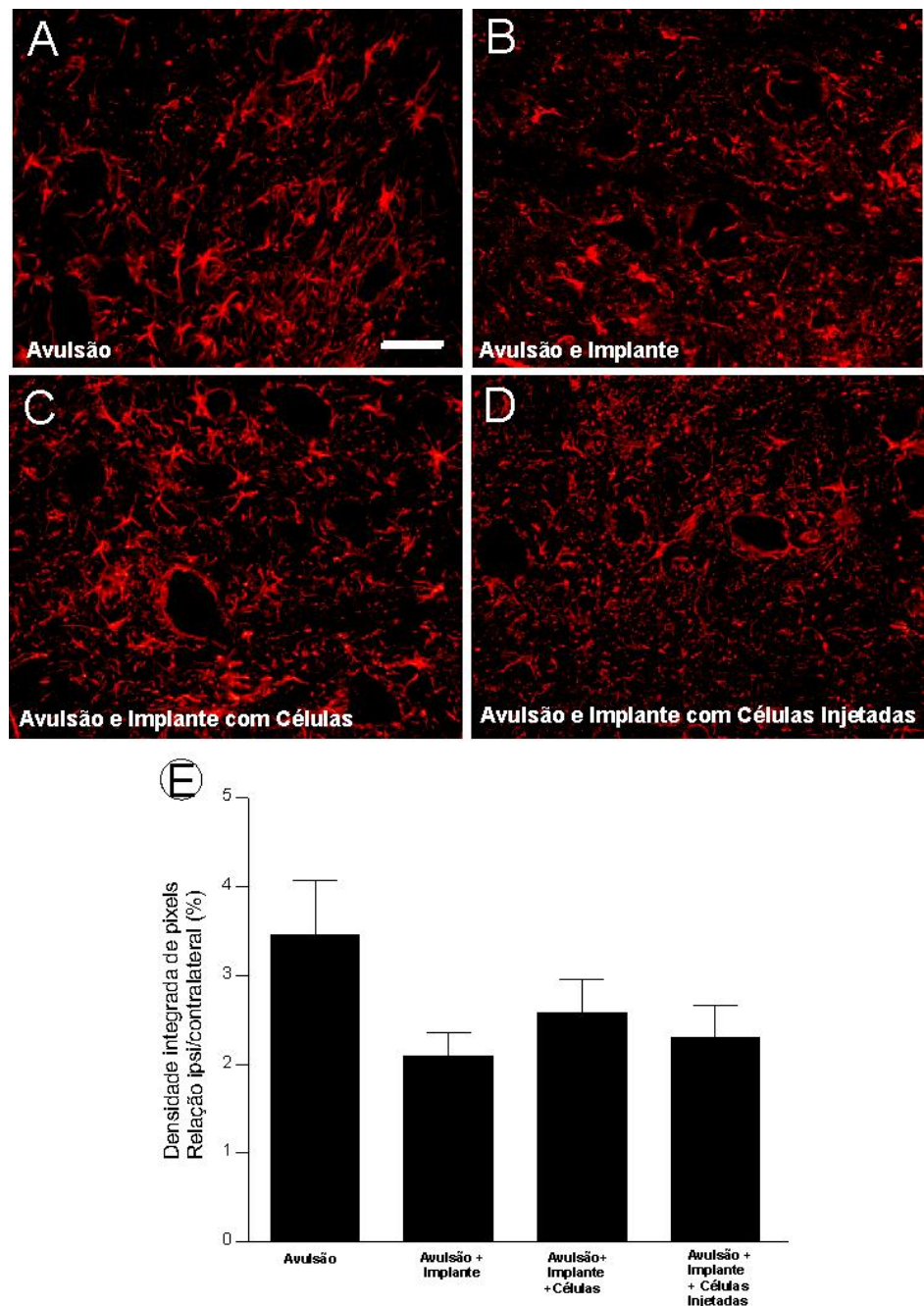
A marcação com GFAP demonstrou aumento significativo na atividade dos astrócitos após avulsão, visto pela presença de astrogliose reativa e pelo incremento de GFAP concentrada, particularmente, ao redor dos neurônios avulsionados, 12 semanas após a lesão. Foi feita uma avaliação quantitativa, onde se calculou a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo (**Fig. 22**) - avaliação **4 semanas** pós-lesão: avulsão -  $2,65 \pm 0,48$  (média da razão ipsi/contralateral da densidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcagem  $\pm$  erro padrão); avulsão + DMEM -  $2,55 \pm 0,11$ ; avulsão com implante -  $2,49 \pm 0,60$ ; implante com CMMO adicionadas



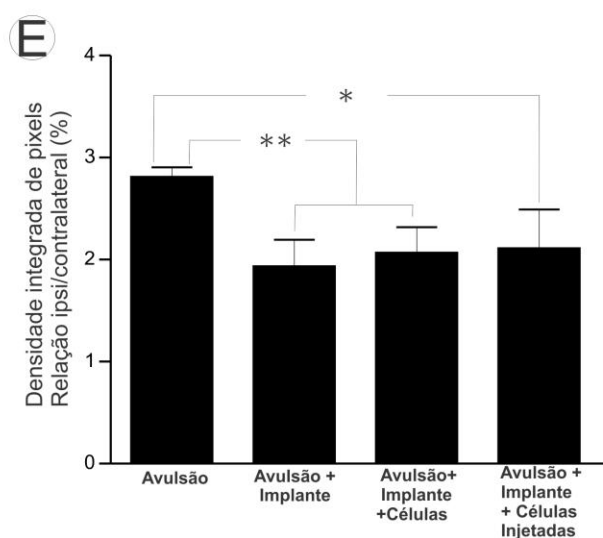
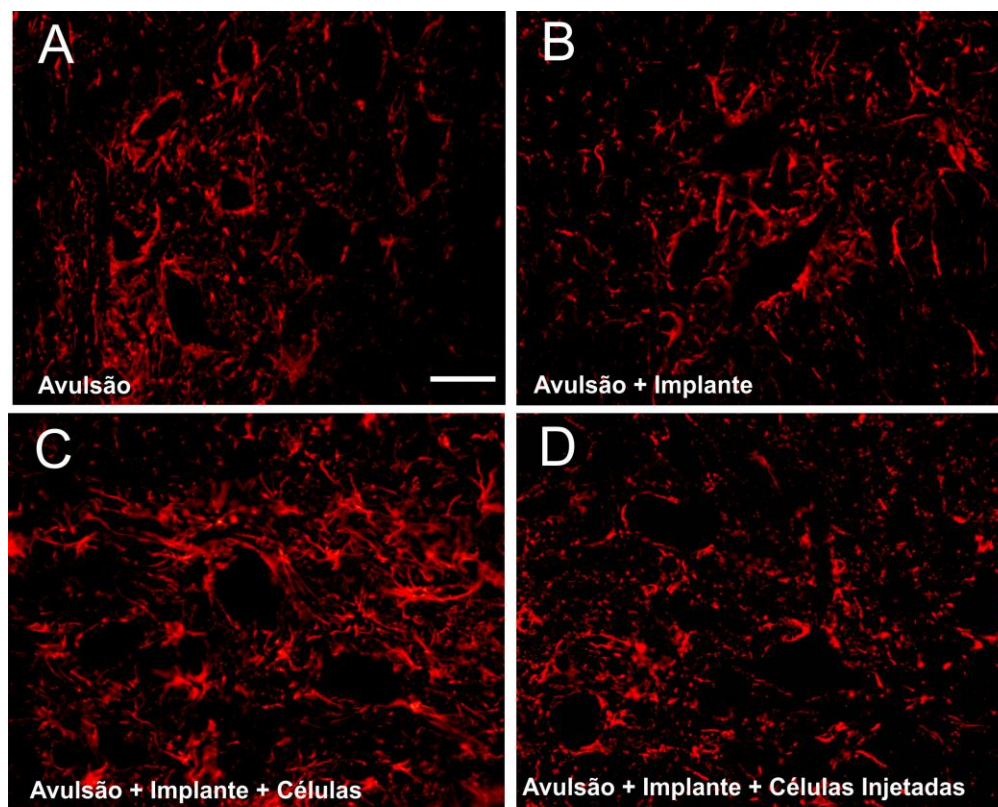
ao selante -  $2,62 \pm 0,43$ ; implante com células injetadas -  $2,17 \pm 0,12$ . (**Fig.23**) - Avaliação **8 semanas** pós-lesão: avulsão -  $3,45 \pm 0,61$  (média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels/intensidade de imunomarcacão  $\pm$  erro padrão); avulsão com implante -  $2,09 \pm 0,26$ ; implante com CMMO adicionada ao selante -  $2,58 \pm 0,37$ ; implante com células injetadas -  $2,30 \pm 0,32$ . Avaliação **12 semanas** pós-lesão (**Fig.24**): avulsão -  $2,81 \pm 0,09$  (média da razão ipsi/contralateral da densidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão  $\pm$  erro padrão); avulsão com implante -  $1,93 \pm 0,25$ ; implante com CMMO adicionada ao selante -  $2,06 \pm 0,24$ ; implante com células injetadas -  $2,11 \pm 0,38$  (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).



**Figura 22:** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-GFAP, 4 semanas após a lesão. A) Lado contralateral à avulsão da coluna anterior da medula espinal (controle). (B-F) Lados ipsilaterais, onde se observa a presença astrogliose reativa circunjacente aos motoneurônios. (B) representa avulsão com injeção de DMEM e (C) representa animais apenas com avulsão. Barra de escala = 100 $\mu$ m. (G) O gráfico indica a média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels, dos lados ipsi e contralateral, nos 4 grupos estudados. (n=5).



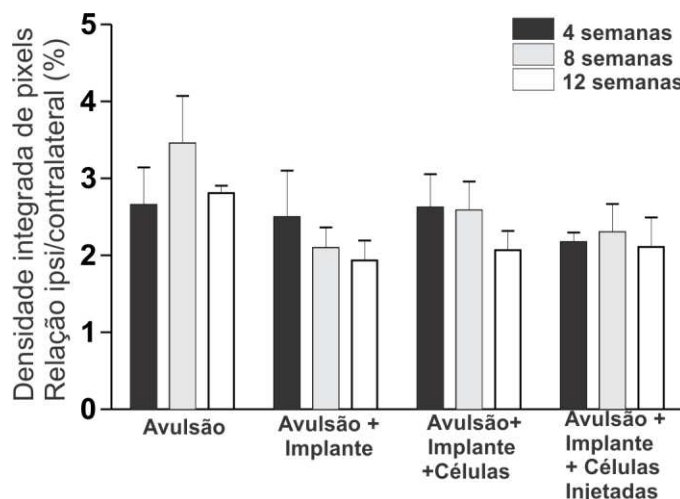
**Figura 23:** Imunomarcção anti- GFAP na região do corno ventral da medula espinal, 8 semanas após a lesão. Lado ipsilateral onde se observa a presença astrogliose reativa circunjacente aos motoneurônios (A) no grupo somente avulsionado, (B) no grupo com reimplante após avulsão, (C) nos animais que o selante do reimplante foi homogeneizado com as CMMO e (D), no grupo onde, após o implante da avulsão das raízes ventrais, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50 $\mu$ m. (E) Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa, 8 semanas após a lesão (n=5).



**Figura 24:** Imunomarcacão para a proteína GFAP na região do corno ventral da medula espinal, 12 semanas após a lesão. Lado ipsilateral, onde se observa a presença astrogliose reativa circunjacente aos motoneurônios. (A) Grupo somente avulsionado, (B) grupo com reimplante após a avulsão, (C) nos animais que o selante do reimplante foi homogeneizado com as CMMO e (D), no grupo onde, após o reparo da avulsão das raízes ventrais, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50 $\mu$ m. (E) Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa, 12 semanas após a lesão (n=5; \*p<0,05; \*\* p<0,01).

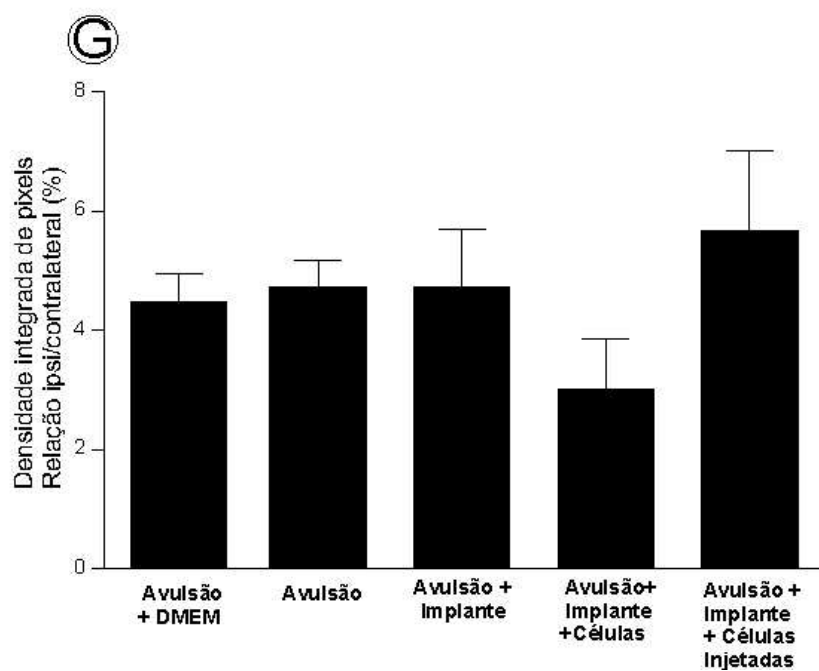
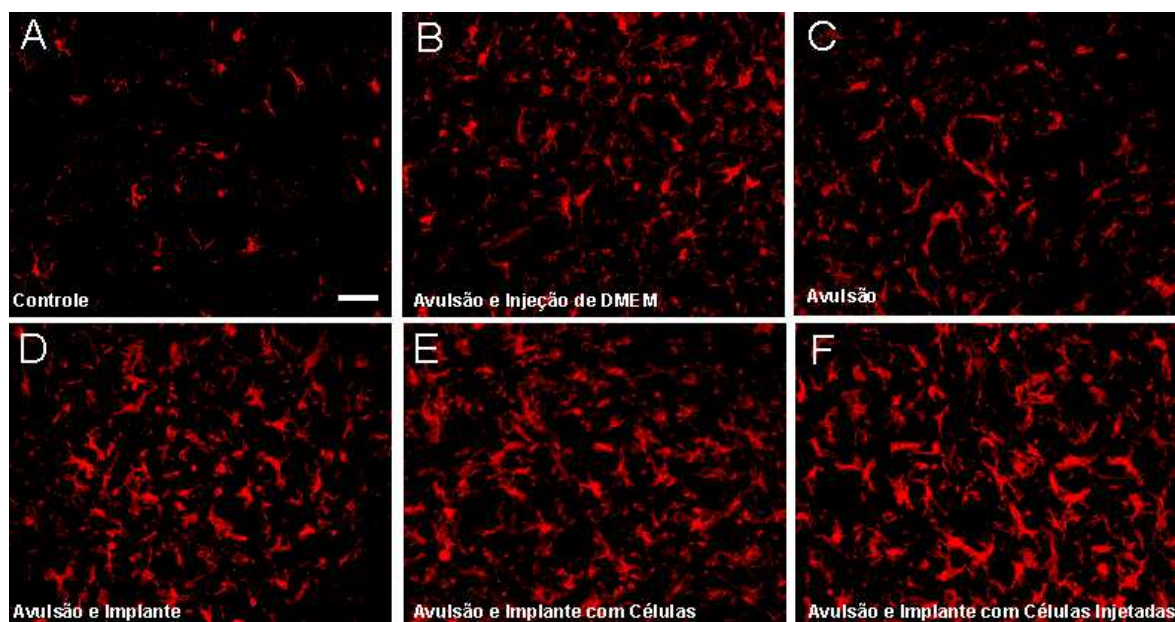


Não foi observada diferença estatística da astrogliose reativa ao redor do motoneurônios entre grupos ao longo do tempo. (**Fig.25**)

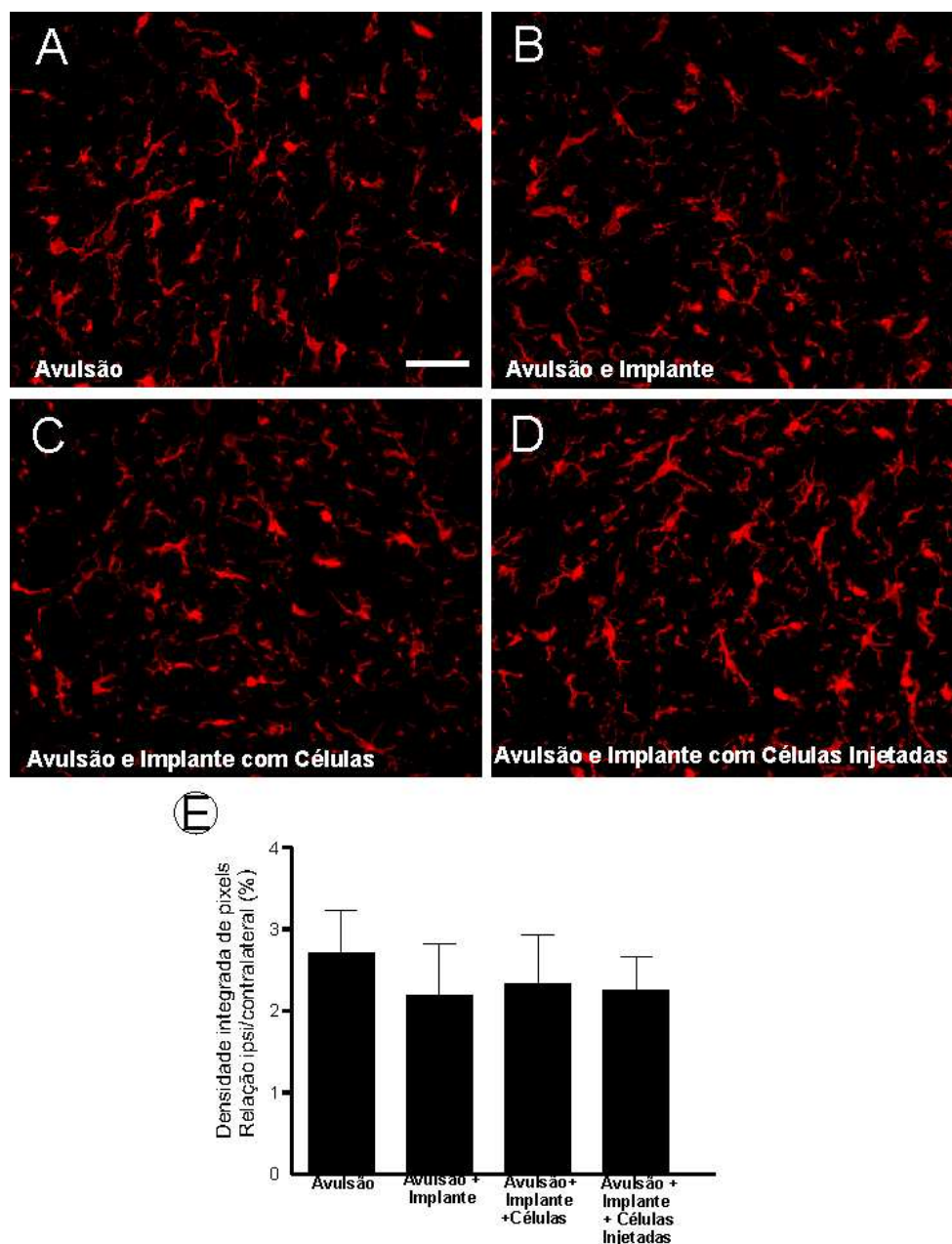


**Figura 25:** Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa (razão ipsi/contralateral), 4, 8 e 12 semanas após a avulsão das raízes motoras.

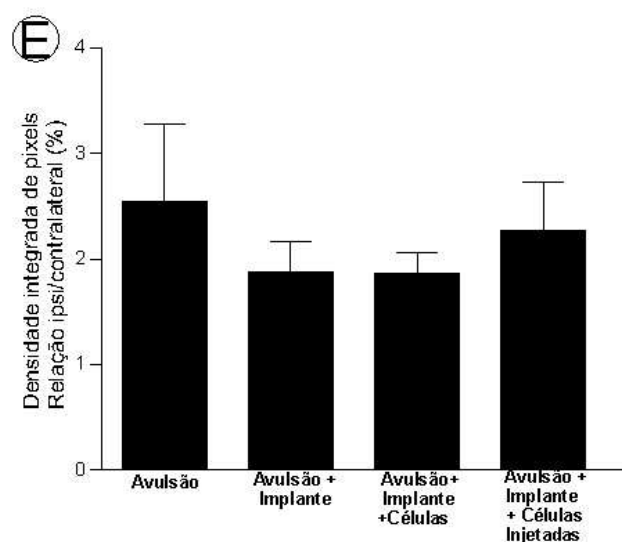
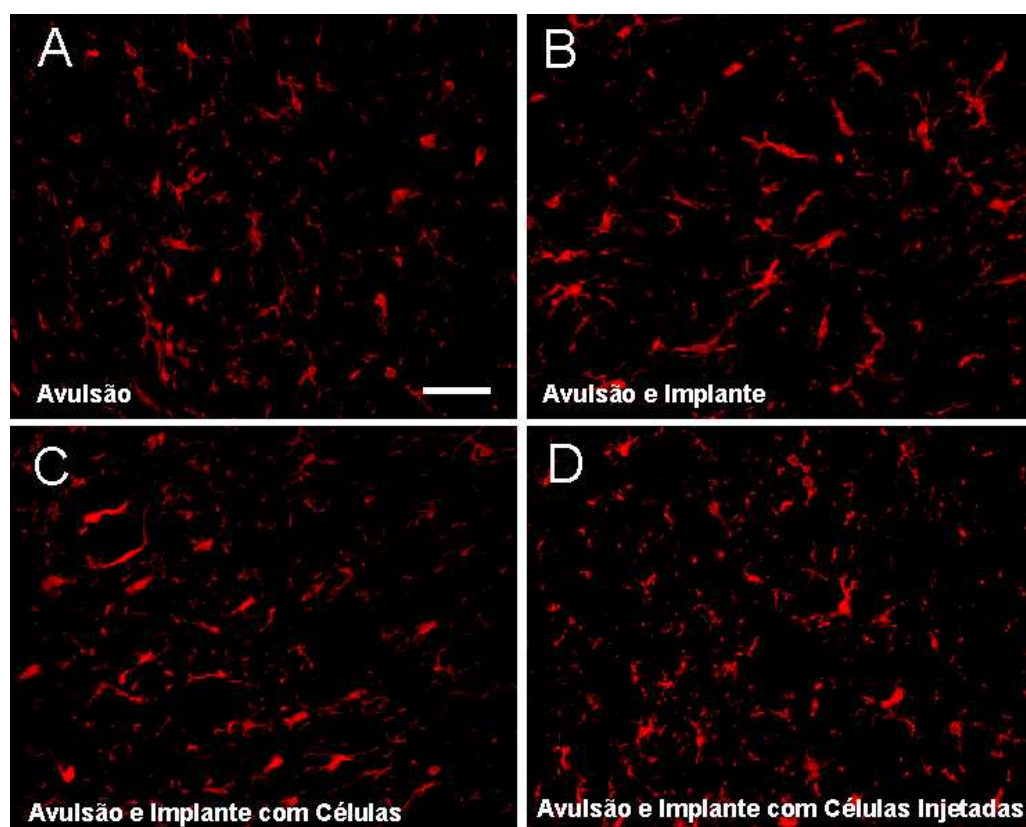
A reatividade da microglia mostrou aumento da imunomarcacão para anti-Iba-1 no lado lesado, mostrando células microgliais reativas em íntimo contato com motoneurônios avulsionados (**Figs. 26, 27 e 28**). Foi feita avaliação quantitativa, onde calculou-se a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo (**Fig. 26**) Avaliação **4 semanas** pós-lesão: avulsão -  $4,71 \pm 0,41$  (média da razão ipsi/contralateral da densidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão  $\pm$  erro padrão); avulsão com DMEM -  $4,48 \pm 0,36$ ; avulsão com implante -  $4,73 \pm 0,94$ ; implante com CMMO adicionada ao selante -  $2,90 \pm 0,64$ ; implante com células injetadas -  $5,67 \pm 1,34$ . (**Fig.27**) - Avaliação **8 semanas** pós-lesão: avulsão -  $2,70 \pm 0,51$  (média da razão ipsi/contralateral da densidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão  $\pm$  erro padrão); avulsão com implante -  $2,32 \pm 0,59$ ; implante com CMMO adicionada ao selante -  $2,32 \pm 0,59$ ; implante com células injetadas -  $2,25 \pm 0,35$ . Avaliação **12 semanas** pós-lesão (**Fig.28**) – avulsão -  $2,54 \pm 0,74$  (média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão  $\pm$  erro padrão); avulsão com implante -  $1,87 \pm 0,29$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,86 \pm 0,19$ ; implante com células injetadas -  $2,27 \pm 0,45$ . A análise estatística não revelou diferenças entre os grupos analisados.



**Figura 26:** Imunomarcção anti Iba-1, na região do corno ventral da medula espinal, no lado ipsilateral à avulsão, 4 semanas após a lesão. A) Lado contralateral à avulsão da coluna anterior da medula espinal (controle), (B-F) Lados ipsilaterais à avulsão. (B) representa avulsão com injeção de DMEM e (C) representa animais que sofreram apenas avulsão. Barra de escala = 100  $\mu$ m. (G) Média da razão ipsi/contralateral da densidade integrada de pixels, dos lados ipsi e contralateral, nos 5 grupos (n=5).

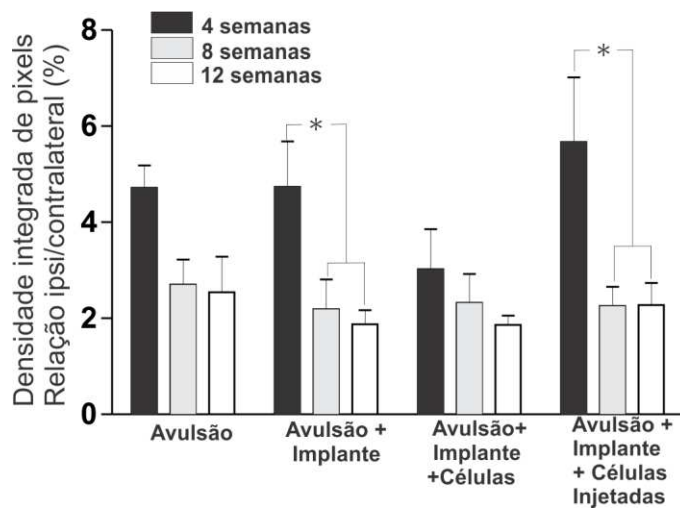


**Figura 27:** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal, marcada com anti-Iba-1, visualizando as células microgлияis reativas, 8 semanas após a lesão. Lado ipsilateral, onde se observa a presença de microglia reativa, circunjacente aos motoneurônios, (A) no grupo somente avulsionado, (B) no grupo com reimplante após a avulsão, (C) nos animais onde o selante empregado para o reimplante foi homogeneizado com as CMMO e (D), no grupo onde, após o implante das raízes ventrais, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50µm. (E) Média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels dos lados ipsi e contralateral nos 4 grupos estudados. (n=5).



**Figura 28:** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal, marcada com anti-Iba-1, visualizando as células microgliais reativas, 12 semanas após a lesão. Lado ipsilateral, onde se observa a reatividade microglial circunjacente aos motoneurônios: (A) grupo somente avulsionado, (B) grupo com reimplante após a avulsão, (C) grupo que o selante do reimplante foi adicionado com as CMMO e (D), no grupo onde após o implante da das raízes ventrais avulsionadas, as CMMO foram injetadas no funículo lateral. Barra de escala = 50µm. (E) Média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels nos 4 grupos experimentais. (n=5).

Ao se comparar os grupos 4, 8 e 12 semanas após a lesão, observa-se diferenças significativas na microglia reativa nos grupos avulsão com implante e com implante seguida da injeção de células tronco mononucleares ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 29**).

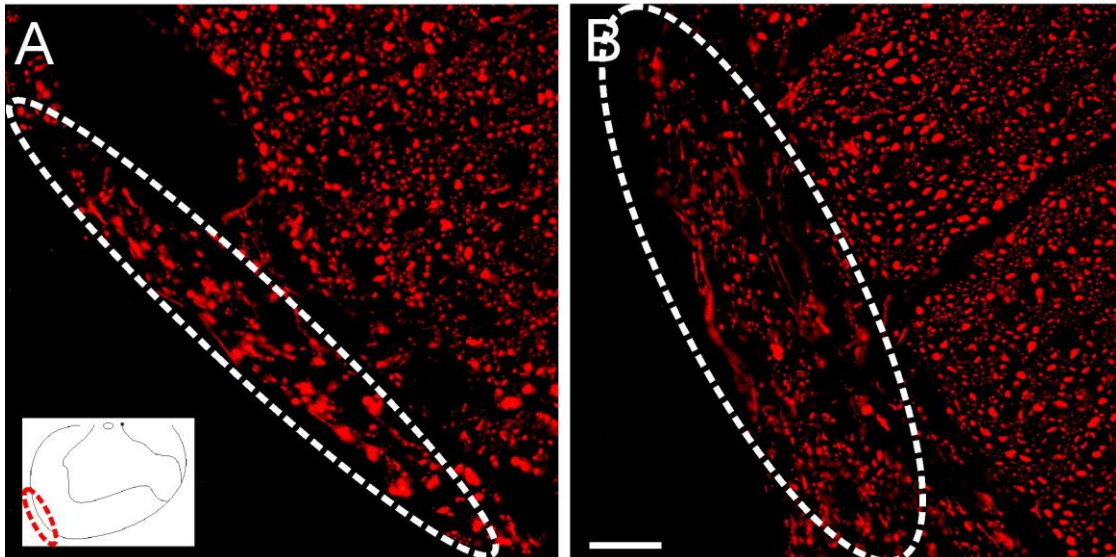


**Figura 29:** Representação gráfica da quantificação da intensidade integrada de pixels da microglia reativa (razão ipsi/contralateral), 4, 8 e 12 semanas após a avulsão das raízes motoras. Observa-se uma diminuição da reatividade nos grupos com implante e com implante onde as CMMO foram homogenizadas (\* =  $p < 0,05$ ).



## 5.5 Neurofilamentos

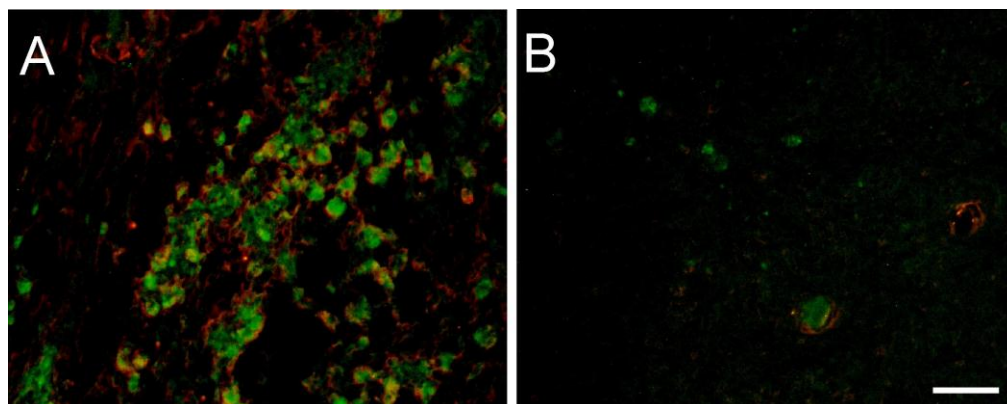
Os resultados qualitativos da imunomarcção anti-neurofilamentos demonstrou menor expressão dessa proteína nas raízes do grupo somente avulsionado (Fig 30). Tal fato pode ser relacionado com o possível menor repovoamento axonal, uma vez que não há reimplante permitindo o processo regenerativo.



**Figura 30:** Imunomarcção das secções transversais da coluna anterior da medula espinal e respectivas raízes ventrais marcadas com anti-neurofilamento, mostrando em (A) o grupo avulsão e em (B) o implante de raízes ventrais, com melhor organização morfológica e maior espessura da raiz (em evidência pela elipse tracejada). Em (A) esquema de hemimedula evidenciando a região ventral empregada na análise. Barra de escala = 50µm.

### 5.6.1 Detecção de Fatores Neurotróficos

Foram feitas análises imunoistoquímicas, 4 semanas após a lesão, com o objetivo verificar se as CMMO contribuiriam para produção de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Para isto, foram feitas imunomarcações empregando-se anticorpo anti-BDNF, sendo estas avaliadas, tanto no sítio de injeção quanto no funículo lateral. Observou-se que ascélulas GFP positivas expressavam BDNF (**Fig. 31**).



**Figura 31:** Fotomicrografias obtidas na coluna anterior da medula espinal, no lado ipsilateral à lesão, após imunomarcação anti-BDNF (vermelho), 4 semanas após a terapia celular. As células EGFP (verdes) mostram-se positivas para essa neurotrofina, tanto no caso daquelas que foram adicionadas ao selante de fibrina (A), quanto após a injeção no funículo lateral (B). Barra de escala = 50µm.

### 5.6.2 Produção de neurotrofinas e receptores após o transplante

A quantificação de 84 transcritos gênicos para neurotrofinas e receptores foi determinada por placa de PCR em tempo real (RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Rat Neurotrophins and Receptor PARN-031, SuperArray Bioscience Corp, Frederick, MD, USA). A reação foi realizada 1 e 4 semanas após a lesão nos grupos avulsão, avulsão + implante e avulsão + implante + células adicionadas e analisada a razão entre os lados ipsilateral/contralateral à lesão.

**Tabela 5:** Resultado do RT-PCR no pool dos grupos analisados, 1 semana pós-operatória. Em negrito, os valores cuja razão ipsi/contralateral foram maiores, em relação ao grupo somente avulsionado.

GENE	Avulsão	Avulsão + Implante	Avulsão + Implante +Células	GENE	Avulsão	Avulsão + Implante	Avulsão + Implante +Células
Adcyap1r1	2.06	1.82	<b>12.82</b>	Maged1	-1.83	<b>-1.21</b>	<b>1.10</b>
Artn	2.66	2.03	1.09	Mc2r	2.73	1.39	1.14
Bax	2.06	1.59	1.75	Mt3	-1.08	<b>1.84</b>	<b>1.88</b>
Bcl2	-3.20	<b>1.20</b>	<b>1.84</b>	Myc	2.30	1.38	-1.78
Bdnf	-1.01	<b>2.81</b>	<b>1.91</b>	Nell1	-1.75	<b>-1.13</b>	<b>3.25</b>
Cckar	-1.12	<b>2.20</b>	<b>1.58</b>	Nf1	1.46	1.30	<b>1.89</b>
Cntf	1.16	-1.21	<b>2.60</b>	Ngf	2.31	1.54	-2.81
Cntfr	1.80	-1.14	<b>2.31</b>	Ngfr	3.48	-1.03	-2.28
Crh	1.52	<b>1.74</b>	1.49	Ngfrap1	-1.01	1.13	<b>2.11</b>
Crhbp	1.21	<b>4.53</b>	<b>4.29</b>	Npy	-1.25	<b>1.56</b>	<b>4.14</b>
Crhr1	-1.07	<b>1.20</b>	<b>1.54</b>	Npy1r	1.53	1.06	1.01
Crhr2	1.01	<b>1.68</b>	-1.41	Npy2r	5.46	-1.09	N/A
Cx3cr1	2.64	1.53	-1.16	Nr1i2	1.05	1.22	-1.00
Cxcr4	1.16	<b>1.57</b>	1.04	Nrg1	-1.16	-1.42	<b>2.99</b>
Fgf2	1.39	<b>2.38</b>	-1.20	Nrg2	1.04	1.83	1.84
Fgf9	-1.52	<b>1.25</b>	<b>2.97</b>	Ntf3	1.28	<b>1.45</b>	<b>8.11</b>
Fgfr1	2.39	<b>1.55</b>	<b>1.82</b>	Ntf4	1.31	<b>1.95</b>	1.08
Fos	3.53	1.23	-1.30	Ntrk1	3.71	1.04	N/A
Frs2	1.55	-1.43	1.37	Ntrk2	-1.05	<b>1.22</b>	<b>2.35</b>
Frs3	-1.51	-1.28	<b>1.80</b>	Ppyr1	-1.32	-1.16	1.92
Fus	1.21	<b>1.65</b>	<b>1.85</b>	Pspn	-1.09	<b>1.39</b>	<b>1.61</b>
Galr1	1.04	1.05	<b>1.84</b>	Ptger2	1.06	<b>1.65</b>	-1.38
Galr2	6.68	1.56	-1.16	LOC68567	-1.30	<b>1.38</b>	<b>1.33</b>
Gdnf	-1.11	<b>1.71</b>	<b>1.21</b>	Stat1	2.51	2.58	1.85
Gfra1	1.87	<b>1.75</b>	-2.33	Stat2	-1.52	<b>-1.06</b>	<b>1.41</b>
Gfra2	-1.06	-1.22	<b>2.30</b>	Stat3	2.22	1.39	-1.23
Gfra3	2.19	<b>1.99</b>	-1.47	Stat4	3.01	1.96	-1.15
Gmfb	3.23	1.30	2.43	Tacr1	4.69	1.99	2.60
Gmfg	2.81	2.50	-1.09	Tfg	-3.67	<b>1.14</b>	<b>1.69</b>
Npffr2	2.14	1.74	-1.23	Tgfa	1.58	-1.01	<b>1.97</b>
Grpr	1.49	1.41	1.71	Tgfb1	2.57	2.53	1.52
HcRt	1.46	<b>1.52</b>	1.19	Tgfb1i1	1.44	1.18	1.25
Hcrtr1	-1.37	<b>1.58</b>	<b>2.06</b>	Cd40	2.95	1.89	-1.66
Hcrtr2	2.64	1.51	1.66	Fas	2.51	1.69	1.01
Hspb1	5.31	1.37	1.95	Tp53	2.43	1.48	1.05
Il10	1.19	<b>3.20</b>	-1.48	Ucn	8.06	2.07	-3.66
Il10ra	2.22	1.24	1.04	Vgf	1.65	-1.27	1.25
Il1b	3.61	2.27	-1.29	Zfp110	-1.27	-1.03	1.31
Il1r1	2.51	2.11	1.47	Zfp91	-1.80	<b>1.95</b>	<b>1.44</b>
Il6	2.25	<b>2.97</b>	N/A	Rplp1	2.50	1.65	1.25
Il6r	3.73	2.41	2.85	Hprt1	1.43	<b>2.03</b>	<b>3.36</b>
Il6st	1.39	-1.03	1.38	Rpl13a	-1.09	-1.16	<b>1.12</b>
Lif	-1.18	<b>1.82</b>	-1.48	Ldha	2.87	2.07	1.06
Lifr	1.97	1.12	1.47	Actb	1.59	1.54	1.47
Cbln1	-2.07	-1.65	<b>2.00</b>				



**Tabela 6:** Resultado do RT-PCR no pool dos grupos analisados, 4 semanas pós-operatórias. Em negrito, os valores cuja razão ipsi/contralateral foram maiores, em relação ao grupo somente avulsionado.

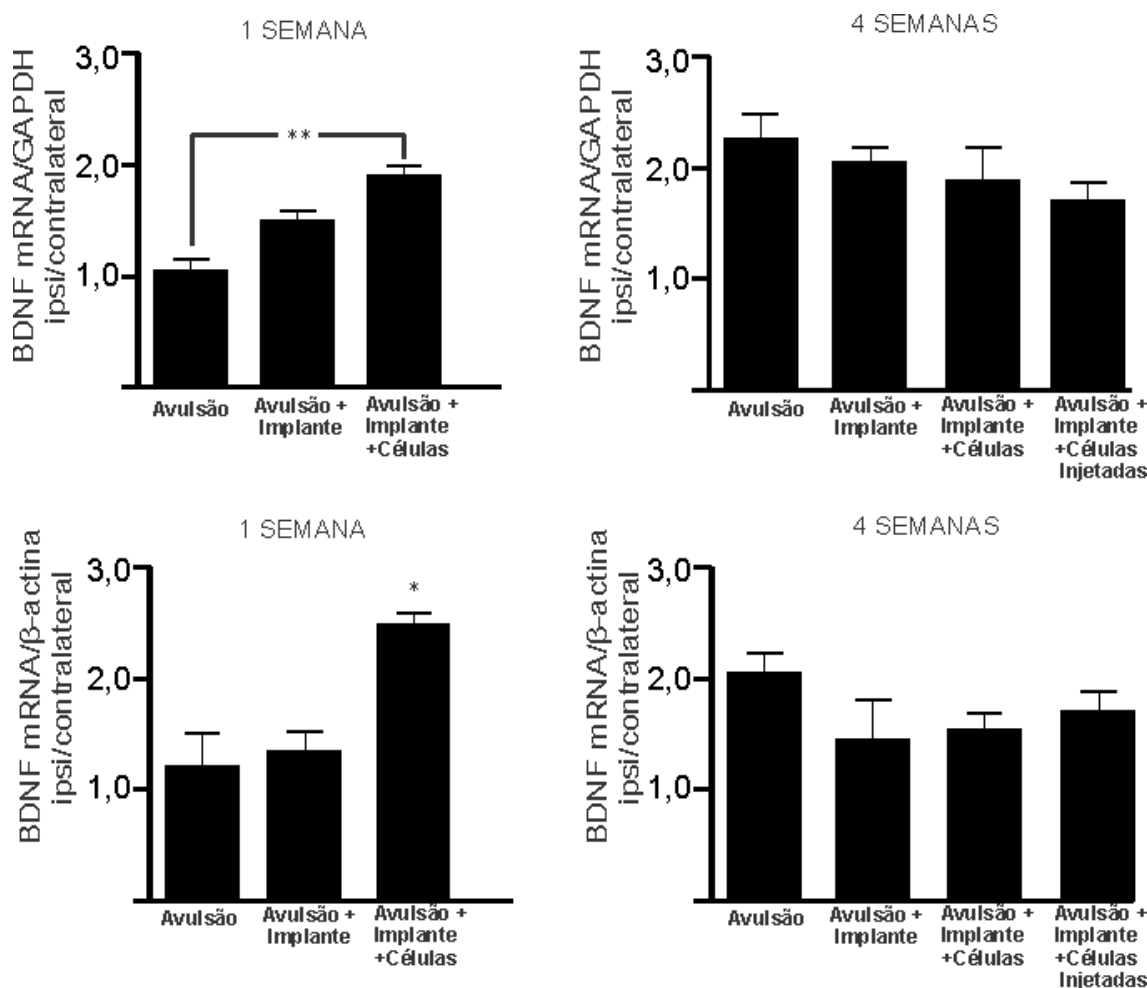
GENE	Avulsão	Avulsão + Implante	Avulsão + Implante +Células	GENE	Avulsão	Avulsão + Implante	Avulsão + Implante +Células
Adcyap1r1	-2.37	<b>1.60</b>	<b>-2.12</b>	Maged1	1.75	<b>3.63</b>	1.30
Artn	1.05	<b>1.26</b>	-1.84	Mc2r	1.21	<b>2.69</b>	-1.09
Bax	-1.04	<b>1.27</b>	-1.13	Mt3	-1.50	<b>-1.10</b>	<b>-1.27</b>
Bcl2	1.33	<b>2.07</b>	-2.15	Myc	1.45	<b>3.58</b>	-1.66
Bdnf	1.94	<b>2.73</b>	-1.66	Nell1	-1.03	-1.55	-1.77
Cckar	-1.23	<b>2.41</b>	-1.41	Nf1	1.65	-1.04	-1.32
Cntf	1.35	<b>1.96</b>	-1.00	Ngf	1.31	<b>1.85</b>	-2.07
Cntfr	-1.50	<b>1.80</b>	-1.49	Ngfr	2.41	<b>3.91</b>	-1.07
Crh	1.50	<b>1.88</b>	-1.47	Ngfrap1	-1.34	<b>1.29</b>	-1.54
Crhbp	-1.89	<b>-1.30</b>	-3.44	Npy	-1.34	<b>-1.04</b>	-2.64
Crhr1	-1.16	<b>2.19</b>	-1.71	Npy1r	1.31	<b>3.05</b>	-1.95
Crhr2	1.10	<b>1.86</b>	-1.81	Npy2r	1.72	<b>3.73</b>	-1.92
Cx3cr1	1.82	<b>2.75</b>	1.16	Nr1i2	1.01	<b>2.20</b>	-2.81
Cxcr4	2.50	<b>2.04</b>	-1.30	Nrg1	-1.43	<b>1.34</b>	-2.15
Fgf2	1.71	<b>2.34</b>	-1.92	Nrg2	-2.44	<b>2.13</b>	<b>-1.66</b>
Fgf9	-1.07	<b>2.60</b>	-1.48	Ntf3	-1.39	<b>1.21</b>	-4.03
Fgfr1	1.07	<b>3.55</b>	<b>2.04</b>	Ntf4	1.23	<b>1.52</b>	-1.57
Fos	1.62	<b>2.99</b>	1.59	Ntrk1	-1.79	<b>2.28</b>	<b>1.03</b>
Frs2	1.46	1.31	-1.13	Ntrk2	-1.95	<b>-1.18</b>	<b>-1.60</b>
Frs3	1.58	<b>3.89</b>	-1.89	Ppyr1	1.53	<b>2.94</b>	-2.03
Fus	1.25	<b>1.57</b>	-1.29	Pspn	1.47	<b>2.49</b>	-2.35
Galr1	1.24	<b>1.86</b>	-2.00	Ptger2	1.03	<b>2.67</b>	-1.86
Galr2	2.05	<b>2.28</b>	1.03	LOC685671	1.58	<b>2.39</b>	-1.56
Gdnf	1.10	<b>2.71</b>	-1.64	Stat1	1.03	<b>1.76</b>	-1.24
Gfra1	3.70	<b>5.38</b>	1.17	Stat2	1.88	<b>2.28</b>	-1.53
Gfra2	1.42	1.01	-1.37	Stat3	1.29	<b>2.51</b>	1.28
Gfra3	1.27	<b>1.67</b>	-1.43	Stat4	-1.65	<b>1.75</b>	<b>-1.54</b>
Gmfb	-1.06	-1.44	-1.38	Tacr1	1.69	1.19	1.12
Gmfg	1.10	<b>1.83</b>	-1.65	Tfg	1.25	1.13	-1.14
Npffr2	-1.00	<b>2.36</b>	-1.35	Tgfa	-1.12	<b>1.08</b>	-1.66
Grpr	1.21	1.13	-1.86	Tgfb1	1.25	<b>1.44</b>	<b>1.27</b>
HcRt	-1.69	<b>2.17</b>	-1.88	Tgfb1i1	1.19	<b>1.89</b>	-1.55
Hcrt1	2.61	1.73	-2.74	Cd40	-1.26	<b>1.97</b>	-1.54
Hcrt2	-1.62	<b>1.83</b>	-1.22	Fas	-1.40	<b>2.58</b>	<b>-1.31</b>
Hspb1	-1.58	1.37	1.20	Tp53	-1.29	<b>2.16</b>	<b>1.49</b>
Il10	1.02	<b>2.77</b>	-2.03	Ucn	1.69	<b>2.28</b>	1.43
Il10ra	1.07	<b>3.83</b>	-1.60	Vgf	1.10	<b>2.28</b>	-1.14
Il1b	1.28	<b>-1.65</b>	<b>-2.21</b>	Zfp110	-1.05	<b>2.49</b>	-1.34
Il1r1	-1.13	-1.29	-1.77	Zfp91	-16.99	<b>2.86</b>	<b>-1.65</b>
Il6	-1.39	<b>-1.03</b>	-1.58	Rplp1	-1.13	-1.17	<b>1.74</b>
Il6r	-1.15	<b>1.44</b>	-2.47	Hprt1	-2.05	-3.46	<b>-1.76</b>
Il6st	1.58	<b>4.37</b>	1.67	Rpl13a	1.90	-1.43	-1.07
Lif	-1.03	<b>2.77</b>	-1.82	Ldha	1.07	<b>2.29</b>	-1.42
Lifr	1.85	<b>2.22</b>	-1.78	Actb	1.14	<b>2.51</b>	<b>1.53</b>
Cbln1	1.41	<b>2.17</b>	-2.40				

### 5.6.3 Quantificação relativa dos transcritos gênicos para BDNF, GDNF, GFAP e Iba-1.

A quantificação dos transcritos gênicos para GFAP, Iba-1, BDNF e GDNF foi determinada por PCR em tempo real. Primeiramente, foram realizadas reações para a determinação das concentrações ótimas de *primer*. Foram utilizados os menores valores destas concentrações capazes de gerar os menores valores de  $C_t$ . A especificidade da amplificação foi verificada pela temperatura de desnaturação específica do produto amplificado.

A quantificação dos transcritos foi normalizada em relação à média do calibrador endógeno GAPDH e  $\beta$ -actina para comparação. Como controle, foi utilizado o pool de cDNA do lado contralateral à lesão de cada grupo. Nas figuras, estão apresentados os gráficos com a quantificação normalizada de cada gene, obtida em unidades arbitrárias.

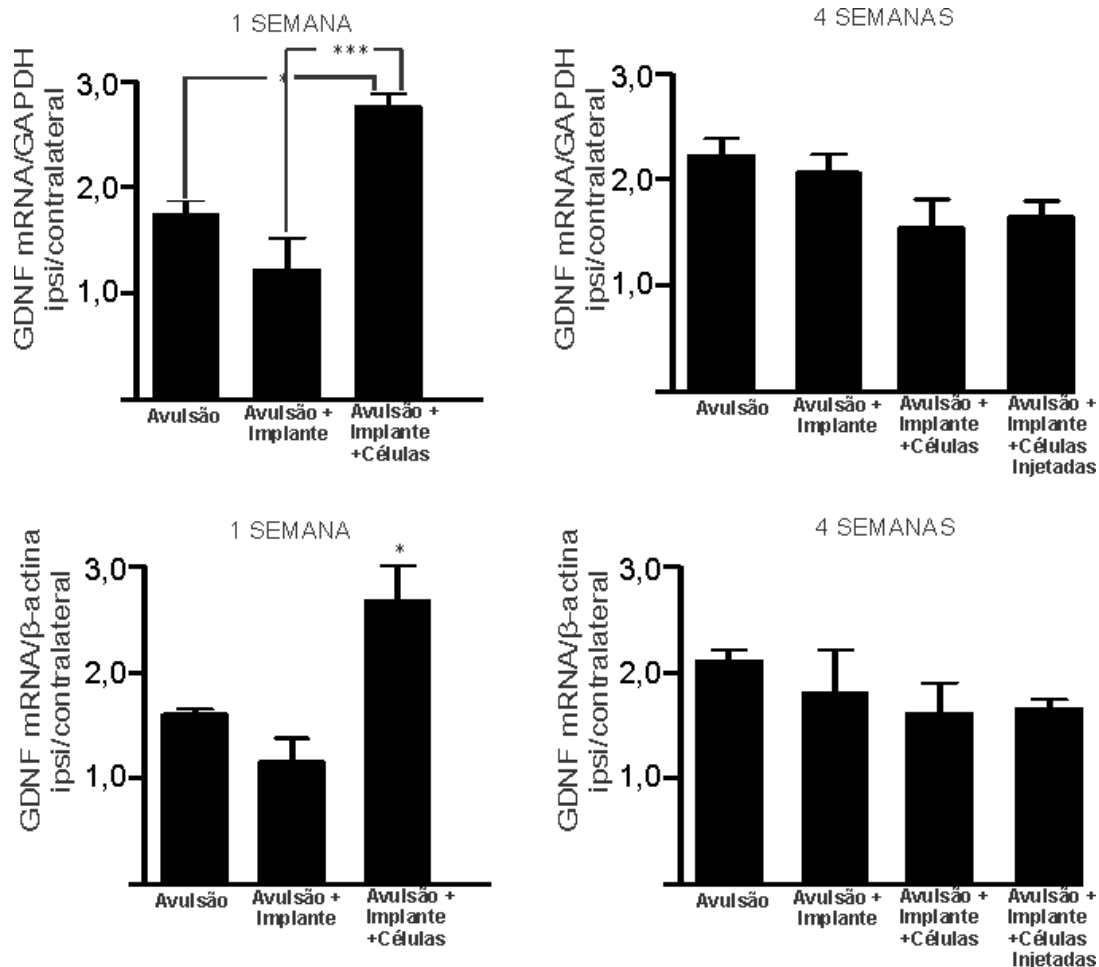
Após 1 semana, a quantidade de transcritos para **BDNF** (Fig. 32), no grupo que recebeu células tronco, foi significativamente maior que nos grupos avulsão ou avulsão com implante (**GAPDH**: avulsão -  $1,05 \pm 1,10$  (média da razão ipsi/contralateral  $\pm$  erro padrão); avulsão com implante -  $1,49 \pm 0,09$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,89 \pm 0,10$ ;  $p < 0,01$ ;  **$\beta$ -actina**: avulsão -  $1,20 \pm 0,29$ ; avulsão com implante -  $1,33 \pm 0,18$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $2,48 \pm 0,10$ ;  $p < 0,05$ . Por outro lado, não houve um significativo aumento da quantidade de transcritos para **BDNF** nos grupos analisados, 4 semanas após a avulsão (**GAPDH**: avulsão -  $2,24 \pm 0,23$ ; avulsão com implante -  $2,05 \pm 0,12$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,88 \pm 0,29$ ; implante com células injetadas -  $1,69 \pm 0,17$ ;  **$\beta$ -actina**: avulsão -  $2,04 \pm 0,18$ ; avulsão com implante -  $1,45 \pm 0,35$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,53 \pm 0,16$ ; implante com células injetadas -  $1,70 \pm 0,17$ ).



**Figura 32:** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos gênicos para BDNF, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH e  $\beta$ -actina, 1 e 4 semanas após a lesão. Observa-se quantidades significativamente maiores de transcritos para BDNF, no grupo que recebeu tratamento com CMMO, 1 semana após avulsão (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

Em relação ao fator neurotrófico **GDNF** (Fig. 33), também houve maior produção de transcritos no grupo tratado com células em comparação aos outros grupos, 1 semana após a cirurgia (**GAPDH**: avulsão -  $1,86 \pm 0,02$  (média da razão ipsi/contralateral  $\pm$  erro padrão); avulsão com implante -  $1,30 \pm 0,36$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $2,94 \pm 0,15$ ; \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ;  **$\beta$ -actina**: avulsão -  $1,71 \pm 0,56$ ; avulsão com implante -  $1,24 \pm 0,23$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $2,86 \pm 0,34$ ; \*  $p < 0,05$ . Quatro semanas após a avulsão, não houve diferença entre os grupos (**GAPDH**: avulsão -  $2,37 \pm 0,16$ ; avulsão com implante -  $2,20 \pm 0,18$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,65 \pm 0,28$ ; implante com células injetadas -  $1,76 \pm 0,16$ ;  **$\beta$ -**

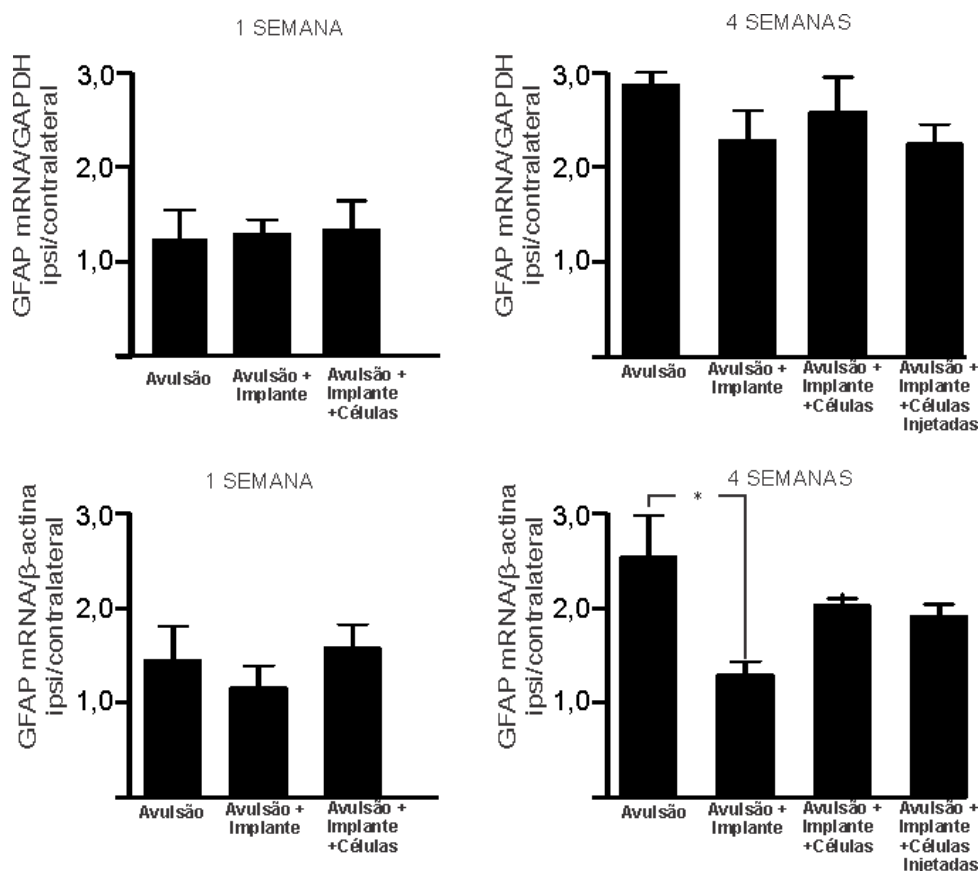
**actina:** avulsão -  $2,25 \pm 0,10$ ; avulsão com implante -  $1,92 \pm 0,43$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,72 \pm 0,30$ ; implante com células injetadas -  $1,77 \pm 0,01$ ).



**Figura 33:** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos gênicos para GDNF, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH e  $\beta$ -actina, 1 e 4 semanas após a lesão. Observa-se quantidades significativamente maiores de transcritos para GDNF no grupo que recebeu tratamento com CMMO, 1 semana após avulsão (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Foi realizada a quantificação de transcritos gênicos para **GFAP** após 1 e 4 semanas após a cirurgia e só houve diferença entre os grupos avulsão e avulsão implante, 4 semanas após a avulsão, quando empregou-se a  $\beta$ -actina como gene endógeno (Fig. 34). Uma semana após a cirurgia: (**GAPDH**: avulsão -  $1,31 \pm 0,28$ , (média da razão ipsi/contralateral  $\pm$  erro padrão); avulsão com implante -  $1,34 \pm 0,15$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,39 \pm 0,32$ ;  **$\beta$ -actina**: avulsão -  $1,51 \pm 0,38$ ; avulsão com implante -  $1,20 \pm 0,24$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,65 \pm 0,26$ ).

Quatro semanas após a cirurgia: (**GAPDH**: avulsão -  $2,99 \pm 0,13$  (média da razão ipsi/contralateral  $\pm$  erro padrão); avulsão com implante -  $2,38 \pm 0,32$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $2,69 \pm 0,38$ ; implante com células injetadas -  $2,34 \pm 0,21$ ;  **$\beta$ -actina**: avulsão -  $2,64 \pm 0,45$ ; avulsão com implante -  $1,35 \pm 0,14$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $2,11 \pm 0,12$ ; implante com células injetadas -  $2,00 \pm 0,12$ ).



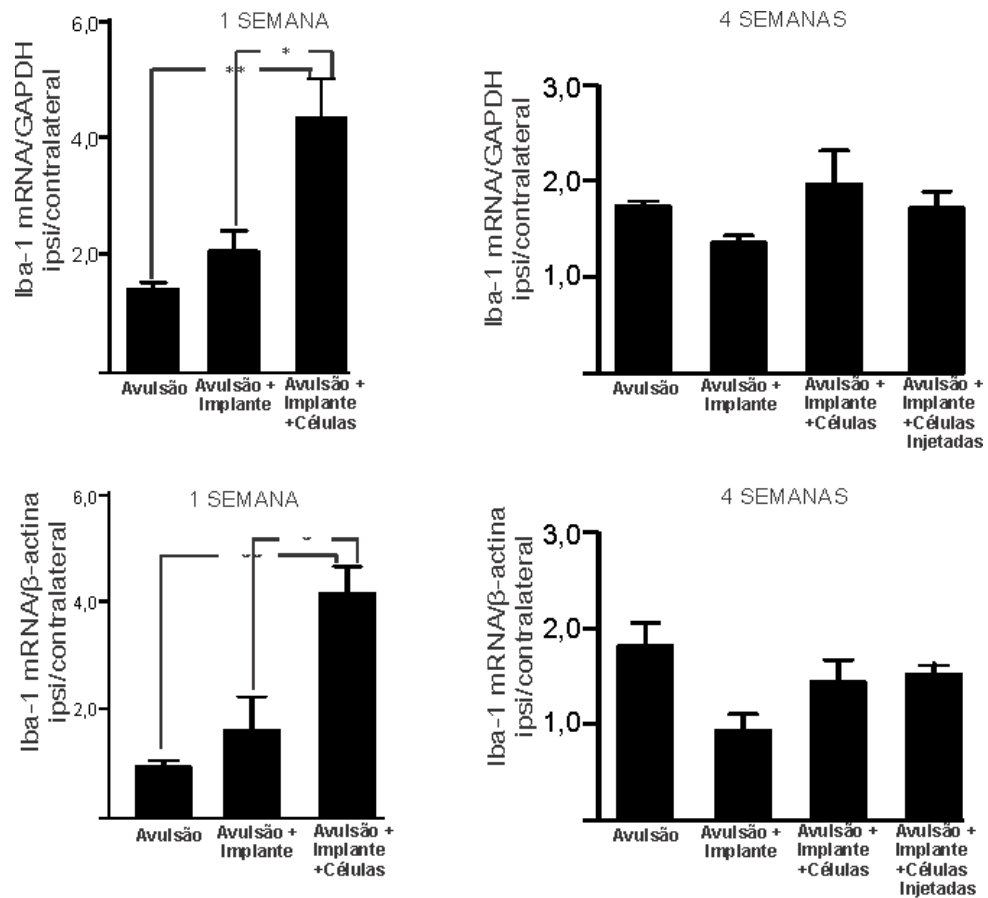
**Figura 34:** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos gênicos para GFAP, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH e  $\beta$ -actina, 1 e 4 semanas após a lesão. Observa-se quantidades significativamente maiores de transcritos para GFAP entre os grupos somente avulsão e avulsão com implante, 4 semanas após cirurgia (\* =  $p < 0,05$ ).

Foi realizada a quantificação de transcritos gênicos para **Iba-1** (Fig. 35) após 1 e 4 semanas após a cirurgia e houve maior produção de RNAm no grupo tratado com células, em comparação aos outros grupos, 1 semana após a cirurgia.

Uma semana após a cirurgia: (**GAPDH**: avulsão -  $1,43 \pm 0,10$  (média da razão ipsi/contralateral  $\pm$  erro padrão); avulsão com implante -  $2,07 \pm 0,34$ ; implante com CMMO

adicionadas ao selante -  $4,39 \pm 0,66$ ;  **$\beta$ -actina**: avulsão -  $0,95 \pm 0,30$ ; avulsão com implante  $1,63 \pm 0,60$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $4,15 \pm 0,48$ ).

Quatro semanas após a cirurgia: (**GAPDH**: avulsão -  $1,98 \pm 0,05$ ; avulsão com implante -  $1,55 \pm 0,08$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $2,24 \pm 0,39$ ; implante com células injetadas -  $1,96 \pm 0,19$ ;  **$\beta$ -actina**: avulsão -  $2,07 \pm 0,26$ ; avulsão com implante -  $1,07 \pm 0,18$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,64 \pm 0,26$ ; implante com células injetadas -  $1,73 \pm 0,03$ ).

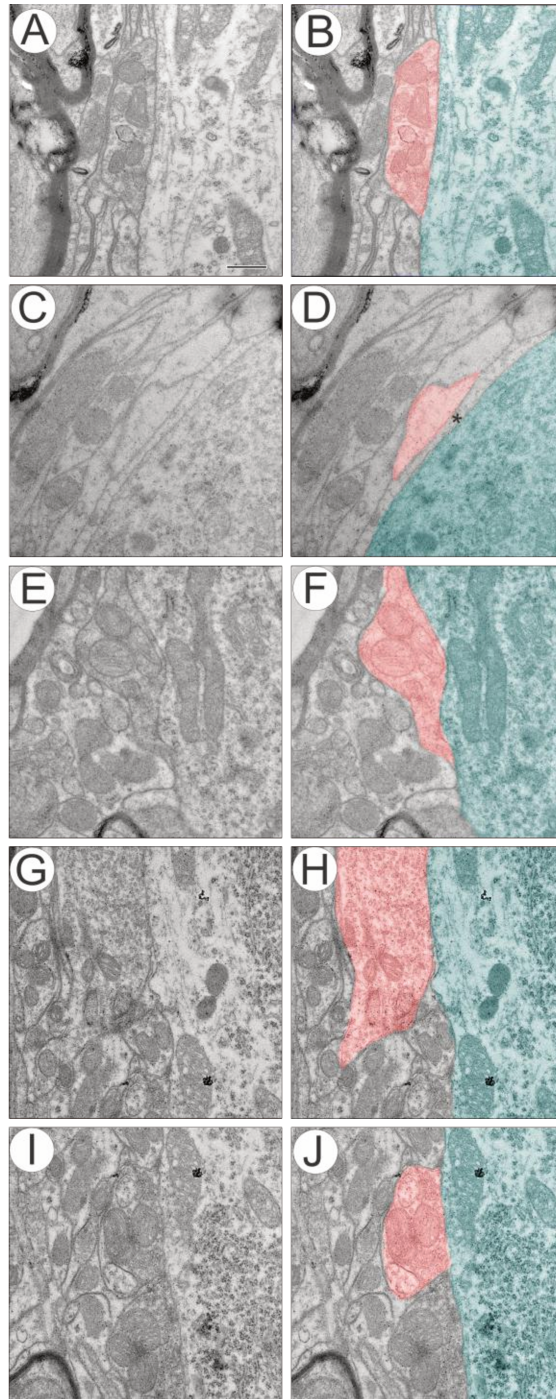


**Figura 35:** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos gênicos para Iba-1 normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH e  $\beta$ -actina 1 e 4 semanas após a lesão. Observa-se quantidades significativamente maiores de transcritos para Iba-1 no grupo que recebeu tratamento com CMMO 1 semana após avulsão (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

## 5.7 Análise ultraestrutural da medula espinal

As fotomicrografias eletrônicas referentes a cada motoneurônio estudado, encontrados no grupo dorsolateral da coluna anterior da medula, foram montadas sequencialmente nos grupos com 4 e 12 semanas após a cirurgia. 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.

A análise ultraestrutural dos espécimes provenientes do controle (lado contralateral do animal avulsionado revelou ampla cobertura sináptica da membrana neuronal (Fig. 36 A e B). Nos grupos com animais avulsionados foram observadas alterações estruturais ao redor dos motoneurônios alfa medulares (Fig. 36 C e D), onde os inputs (terminais pré-sinápticos) mostraram-se parcialmente ou, frequentemente, totalmente retraídos. Projeções gliais também foram comumente observadas em contato com a membrana pós-sináptica (Fig 36 D,\*), preenchendo o espaço entre terminais sinápticos e a membrana pós-sináptica. Essas estruturas foram identificadas como astrócitos devido a sua baixa eletrondensidade. Os grupos com implante, com ou sem tratamento com células mononucleares, apresentam padrão da cobertura sináptica mais próximas ao normal.

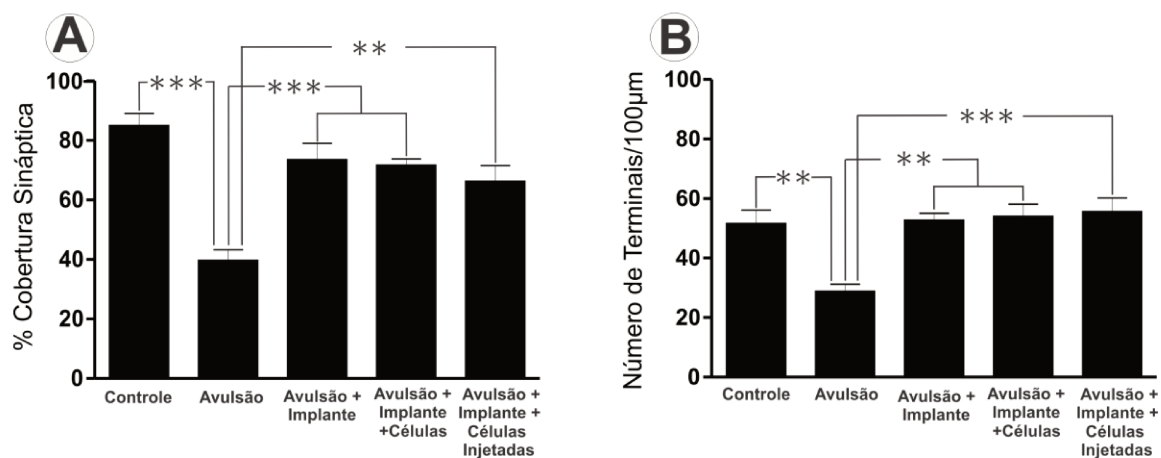


**Figura 36:** Ultraestrutura da superfície de motoneurônios alfa medulares na região dorso lateral da medula, mostrando a cobertura sináptica normal (A e B). Cobertura sináptica com terminais retraídos e projeções astrocitárias (\*) no grupo somente com avulsão (C e D). Os grupos com avulsão + implante (E e F), avulsão + implante + células homeogeneizadas (G e H) e avulsão + implante + células injetadas (I e J) encontram-se com a cobertura sináptica próximas ao normal. Em B, D, F, H e J os terminais estão coloridos em vermelho e o citoplasma dos motoneurônios em azul. Escala: 500 nm.

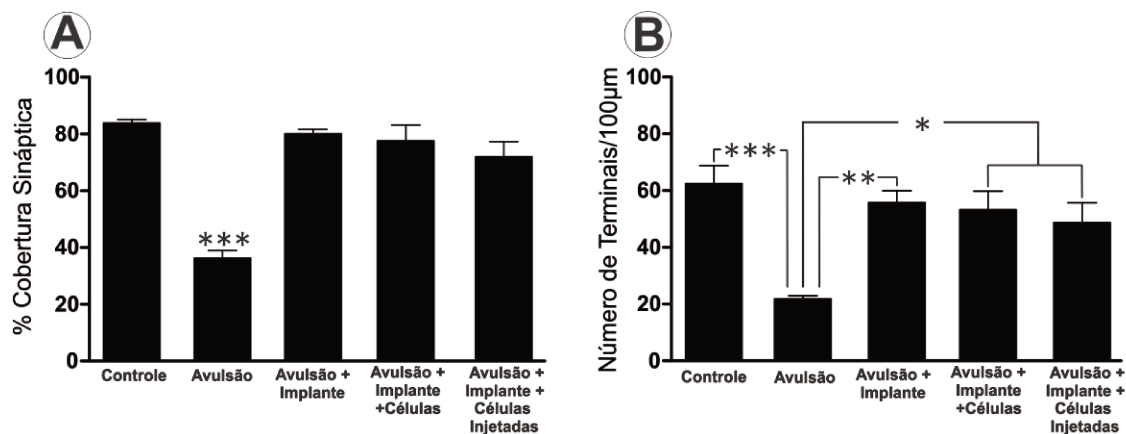


A análise quantitativa (Fig. 37 A) mostrou redução da cobertura sináptica nos grupos avulsionados tanto com 4 ou 12 semanas, em comparação aos demais grupos. Não houve, no entanto, diferença entre o mesmo grupo no decorrer do tempo. As diferenças foram mais expressivas para o grupo somente avulsão em relação a todos os outros grupos, resultando em decréscimo de 52,95% (com 4 semanas) e 55,8% (com 12 semanas) na cobertura sináptica, em relação ao controle. No grupo com implante e células injetadas, a perda de cobertura sináptica, em relação ao controle, foi de 22% ,com 4 semanas e 8,61%, com 12 semanas. Obteve-se maior cobertura sináptica nos grupos com implante e implante com células adicionadas ao selante, após 4 semanas a perda foi de 13,54% e 12 semanas foi de 8,60%, comparativamente ao controle. No grupo só implantado a perda, em comparação ao controle, foi de 13.53%, após 4 semanas e de 7,13%, após 12 semanas. Avaliação **4 semanas** pós-lesão **Fig.37 A**: controle -  $85,02 \pm 6,26$  (média  $\pm$  erro padrão); avulsão -  $40,00 \pm 4,00$ ; avulsão com implante  $73,51 \pm 5,44$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $72,39 \pm 3,61$ ; implante com células injetadas -  $66,26 \pm 5,34$  (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Avaliação **12 semanas** pós-lesão **Fig.38A**: controle -  $85,31 \pm 4,23$ ; avulsão -  $37,67 \pm 4,53$ ; avulsão com implante -  $79,22 \pm 2,35$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $77,96 \pm 12,48$ ; implante com células injetadas -  $72,26 \pm 6,22$  (\* $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

O valor de terminais sinápticos/100 $\mu$ m, em aposição com a membrana neuronal, no grupo avulsão foi menor em relação aos outros grupos, tanto com 4 como com 12 semanas. Avaliação **4 semanas** pós-lesão - **Fig.37 B**: controle -  $56,68 \pm 2,20$  (média  $\pm$  erro padrão); avulsão -  $28,86 \pm 2,36$ , avulsão com implante -  $52,77 \pm 2,26$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $50,15 \pm 4,09$ ; implante com células injetadas -  $55,56 \pm 4,56$  (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ). Avaliação **12 semanas** pós-lesão - **Fig.38 B**: controle -  $61,46 \pm 5,00$ , média  $\pm$  erro padrão; avulsão -  $23,47 \pm 1,85$ , avulsão com implante -  $55,03 \pm 3,31$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $57,03 \pm 13,70$ ; implante com células injetadas -  $49,99 \pm 5,54$  (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Figura 37:** Análise quantitativa da ultraestrutura das sinapses e do número de terminais sinápticos/100µm de membrana, 4 semanas após AV. A- mostra, em porcentagem, redução da cobertura sináptica comparativamente ao controle. B- apresenta redução do número de terminais pré-sinápticos em aposição, normalizados para 100 µm de membrana neuronal, no grupo avulsão. (\*\*=  $p<0.01$  e; \*\*\*=  $p<0.001$ ). Média±erro padrão; n=5.



**Figura 38:** Análise quantitativa da ultraestrutura das sinapses e do número de terminais sinápticos/100µm de membrana, 12 semanas após AV. A- mostra, em porcentagem, a cobertura sináptica. B- apresenta redução no número de terminais pré-sinápticos, normalizados para 100 µm de membrana neuronal, no grupo somente avulsão. (\*=  $p<0.05$ ; \*\*=  $p<0.01$  e; \*\*\*=  $p<0.001$ ). Média±erro padrão; n=5.

### 5.7.1 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, normalizado para 100µm de membrana neuronal foram calculados e estão representados nas Figs. 39 e 40.

Houve predomínio de perda de cobertura sináptica entre os terminais **S**, excitatórios, em todos os grupos analisados. Com **4 semanas** após a cirurgia houve 72,12% menos cobertura deste tipo de input no grupo avulsão, em relação ao controle, 35,72% após avulsão com implante, 38,75% após implante com CMMO adicionadas ao selante e 44,60% seguindo-se ao implante com células injetadas. Já em relação aos terminais inibitórios do tipo **F**, a perda de cobertura sináptica do grupo avulsão foi de 44%, 1,93% após avulsão com implante, 4,80% após implante com CMMO adicionadas ao selante e 10,00% após implante com células injetadas. Após **12 semanas** a análise quantitativa da porcentagem da cobertura sináptica revelou significativa redução de terminais **F** no grupo somente avulsionado, em relação aos outros grupos, no que diz respeito aos terminais **S**, com 51,63% menos cobertura do grupo avulsão, em relação ao controle, 15,64% após avulsão com implante, 20,52% após implante com CMMO adicionadas ao selante e 31% seguindo-se ao implante com células injetadas. Já em relação aos terminais inibitórios, a perda de cobertura sináptica do grupo avulsão foi de 67%. Após avulsão com implante tal perda foi de apenas 2,72%, 4% após implante com CMMO adicionadas ao selante e 12% após implante com células injetadas. Com **12 semanas** percebe-se maior cobertura sináptica de terminais inibitórios nos grupos avulsão submetidos ao implante ao compará-los ao grupo somente avulsão e ao controle não lesado. No entanto, não houve diferenças entre os grupos com implante e controle.

A análise quantitativa da porcentagem da cobertura sináptica revelou significativa redução de terminais **F** no grupo somente avulsionado, em relação aos outros grupos (Fig. 39 A). Após **4 semanas**, foi observada maior cobertura sináptica dos terminais inibitórios nos grupos avulsão submetidos ao implante ao compará-los ao grupo somente avulsão (controle esquerdo -  $49,75\% \pm 3,13\%$  (média  $\pm$  erro padrão); avulsão -  $27,62\% \pm 5,12\%$ , avulsão com implante -  $48,79\% \pm 3,09\%$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $47,36\% \pm 1,85\%$ ; implante com células injetadas -  $44,76\% \pm 3,10\%$  (\* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ). Percebe-se, após **12 semanas** (Fig. 38 A), maior cobertura sináptica dos terminais inibitórios nos grupos avulsão submetidos ao implante ao compará-los ao grupo somente avulsão e ao controle esquerdo, no entanto não há diferença entre os grupos com implante e o controle (contralateral -  $55,84\% \pm 1,65\%$

(média  $\pm$  erro padrão); avulsão -  $18,79\% \pm 1,98\%$ , avulsão com implante -  $54,32\% \pm 1,19\%$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $53,61\% \pm 4,43\%$ ; implante com células injetadas -  $49,11\% \pm 3,47\%$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

A análise quantitativa do número de terminais F pré-sinápticos, normalizada por 100  $\mu\text{m}$  de membrana neuronal (Fig. 39 B), mostrou diferença dos grupos com avulsão, em comparação aos demais grupos (**4 semanas**: contralateral -  $34,74 \pm 1,52$  (média  $\pm$  erro padrão); avulsão -  $20,27 \pm 1,49$ , avulsão com implante -  $39,42 \pm 3,44$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $39,69 \pm 2,70$ ; implante com células injetadas -  $38,07 \pm 2,84$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . **12 semanas** (Fig. 40 B): controle esquerdo -  $41,72 \pm 4,41$ , média  $\pm$  erro padrão; avulsão -  $12,37 \pm 1,56$ , avulsão com implante -  $37,82 \pm 3,32$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $39,56 \pm 6,27$ ; implante com células injetadas -  $34,16 \pm 5,31$  (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ).

A análise quantitativa da superfície de aposição dos terminais F não demonstrou diferença estatística entre os grupos (Fig. 39 C). **4 semanas**: contralateral -  $1,49\mu\text{m} \pm 0,11$ , média  $\pm$  erro padrão; avulsão -  $1,39\mu\text{m} \pm 0,14$ , avulsão com implante -  $1,23\mu\text{m} \pm 0,08$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,37\mu\text{m} \pm 0,11$ ; implante com células injetadas -  $1,22\mu\text{m} \pm 0,09$ . **12 semanas** (Fig. 40 C): contralateral:  $1,36\mu\text{m} \pm 0,10$ ; avulsão -  $1,60\mu\text{m} \pm 0,10$ , avulsão com implante -  $1,48\mu\text{m} \pm 0,11$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,40\mu\text{m} \pm 0,09$ ; implante com células injetadas -  $1,44\mu\text{m} \pm 0,11$ ).

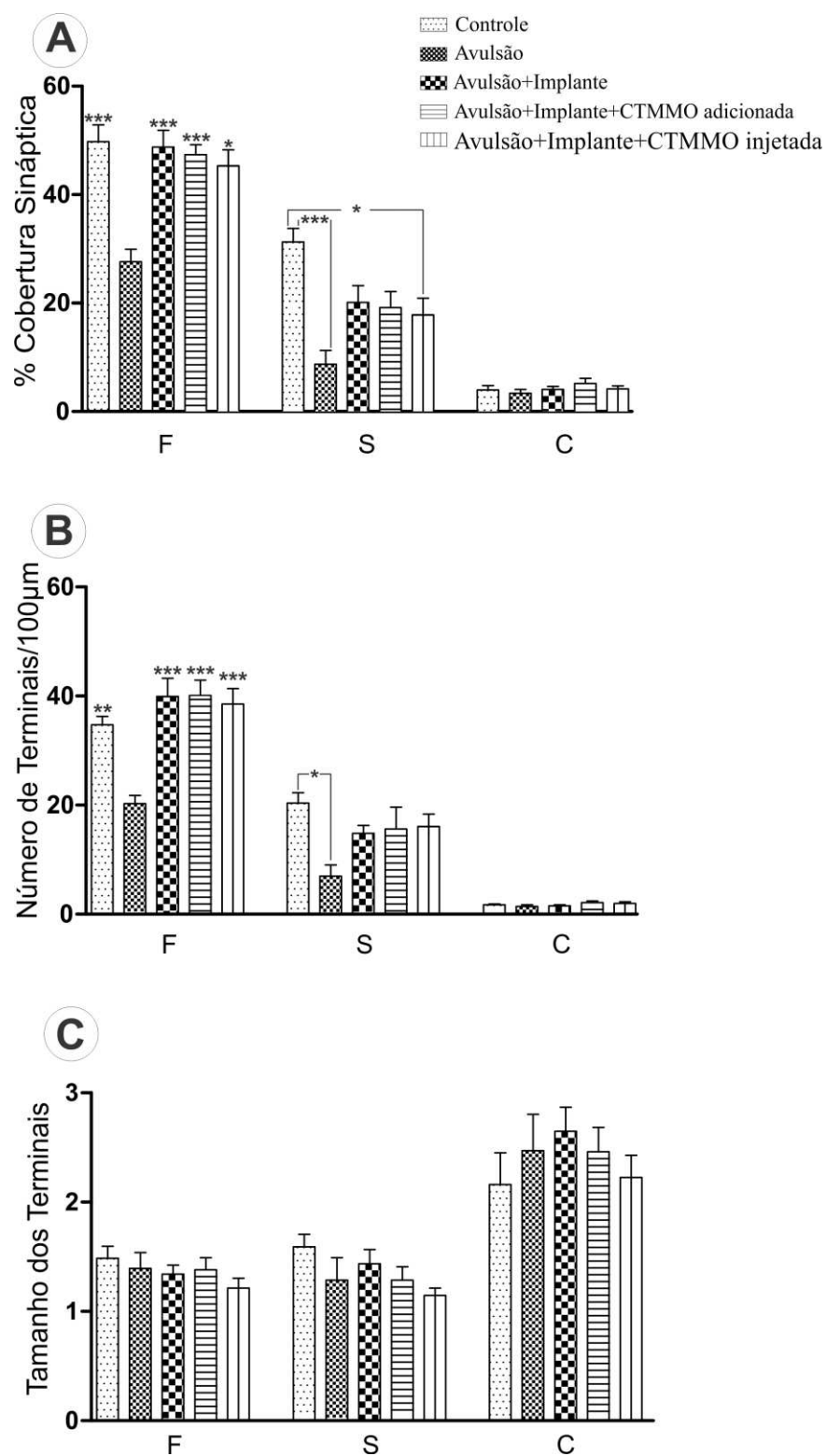
A análise quantitativa da porcentagem da cobertura sináptica de terminais do tipo S foi reduzida no grupo somente avulsão. **Quatro semanas** após a avulsão, observou-se redução de porcentagem de aposição sináptica nos grupos avulsão e avulsão com implante associado com injeção de células (contralateral -  $31,3\% \pm 2,50$  (média  $\pm$  erro padrão); avulsão -  $8,72\% \pm 2,57$ , avulsão com implante -  $20,12\% \pm 3,11$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $19,17\% \pm 2,95$ ; implante com células injetadas -  $17,33\% \pm 3,21$  (\* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ). Após **12 semanas** houve diferença significativa entre os grupos somente avulsão e implante com células injetadas. Também houve diferença entre o grupo somente avulsão e os grupos implante e implante com célula adicionadas ao selante. (contralateral -  $27,48\% \pm 3,12$ , média  $\pm$  erro padrão; avulsão -  $13,29\% \pm 0,88$ , avulsão com implante -  $23,18\% \pm 0,99$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $21,84\% \pm 7,17$ ; implante com células injetadas -  $18,97\% \pm 1,82$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Na análise quantitativa do número de terminais excitatórios do tipo S, normalizada por 100 $\mu\text{m}$  de membrana neuronal, foi observada diferença entre os grupos controle e

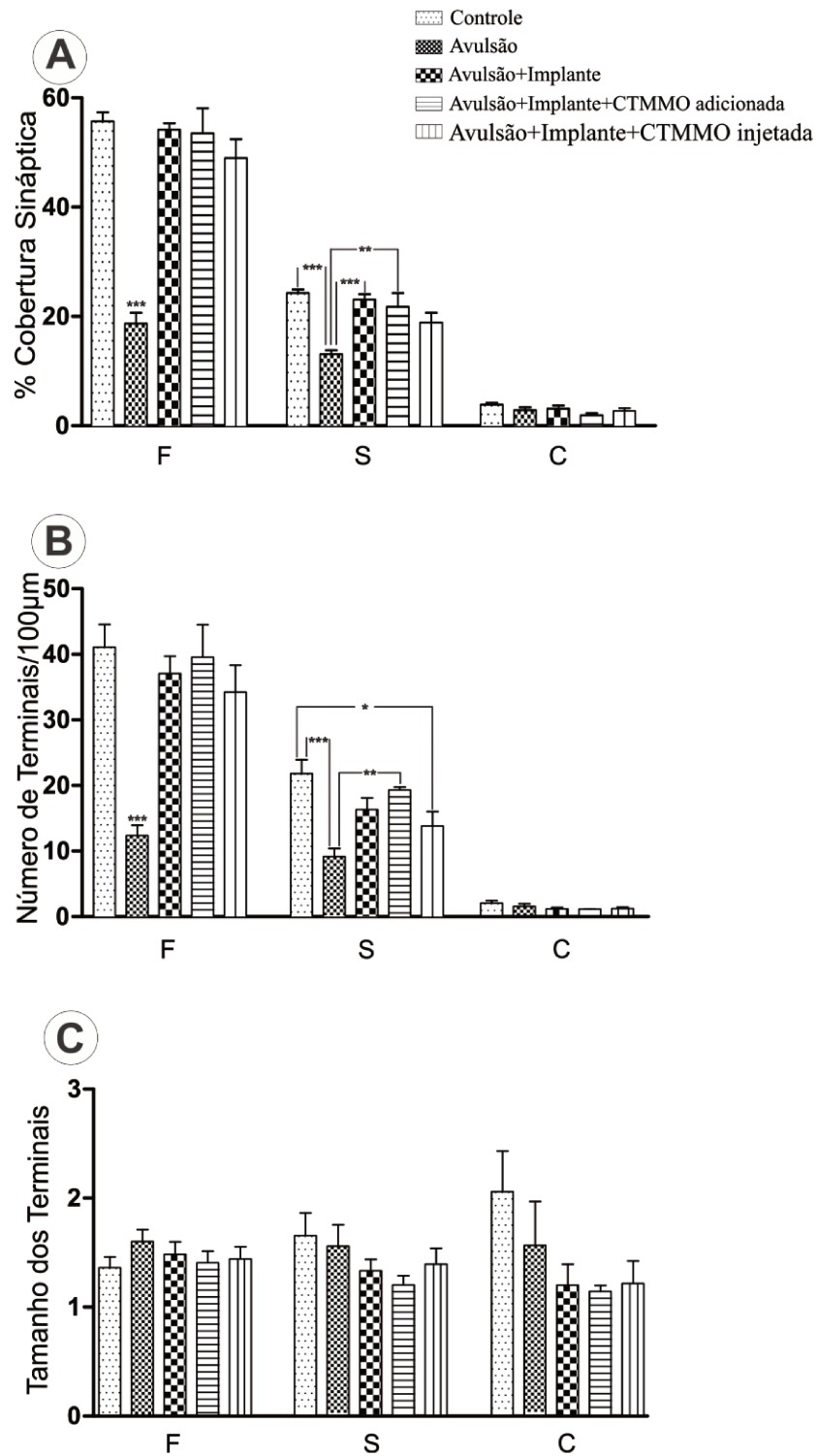
avulsão com **4 semanas** (contralateral -  $20,39 \pm 1,90$  (média  $\pm$  erro padrão); avulsão -  $7,07 \pm 2,05$ , avulsão com implante -  $14,82 \pm 1,45$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $15,61 \pm 4,04$ ; implante com células injetadas -  $16,16 \pm 2,46$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Após **12 semanas** observou-se diferença significativa entre o controle e os grupos somente avulsão e implante com células injetadas. (contralateral -  $21,82 \pm 2,13$  (média  $\pm$  erro padrão); avulsão -  $9,13 \pm 1,23$ , avulsão com implante -  $16,31 \pm 1,80$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $19,30 \pm 7,32$ ; implante com células injetadas -  $13,80 \pm 2,21$ ; \* $p < 0,05$ ).

A análise do tamanho dos terminais S não demonstrou diferença estatística em relação aos outros grupos analisados (**4 semanas**: contralateral -  $1,59 \mu\text{m} \pm 0,12$ , média  $\pm$  erro padrão; avulsão -  $1,29 \mu\text{m} \pm 0,21$ , avulsão com implante -  $1,43 \mu\text{m} \pm 0,13$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,29 \mu\text{m} \pm 0,12$ ; implante com células injetadas -  $1,14 \mu\text{m} \pm 0,07$ . **12 semanas**: contralateral -  $1,65 \mu\text{m} \pm 0,22$ ; avulsão -  $1,56 \mu\text{m} \pm 0,21$ , avulsão com implante -  $1,33 \mu\text{m} \pm 0,12$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $1,20 \mu\text{m} \pm 0,07$ ; implante com células injetadas -  $1,39 \mu\text{m} \pm 0,15$ ).

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 desses terminais, tanto normalizados por  $100 \mu\text{m}$  de membrana neuronal, quanto em relação ao tamanho dos terminais.



**Figura 39:** Representação gráfica da análise quantitativa ultraestrutural dos tipos de terminais, após 4 semanas da lesão e reparo. A- porcentagem de cobertura das sinapses pelos terminais F, S e C, B- número de terminais sinápticos F, S e C em aposição/100 μm e C- tamanho dos terminais. (\*=  $p<0.05$ ; \*\*=  $p<0.01$  e; \*\*\*=  $p<0.001$ ). Média±erro padrão; n=5.

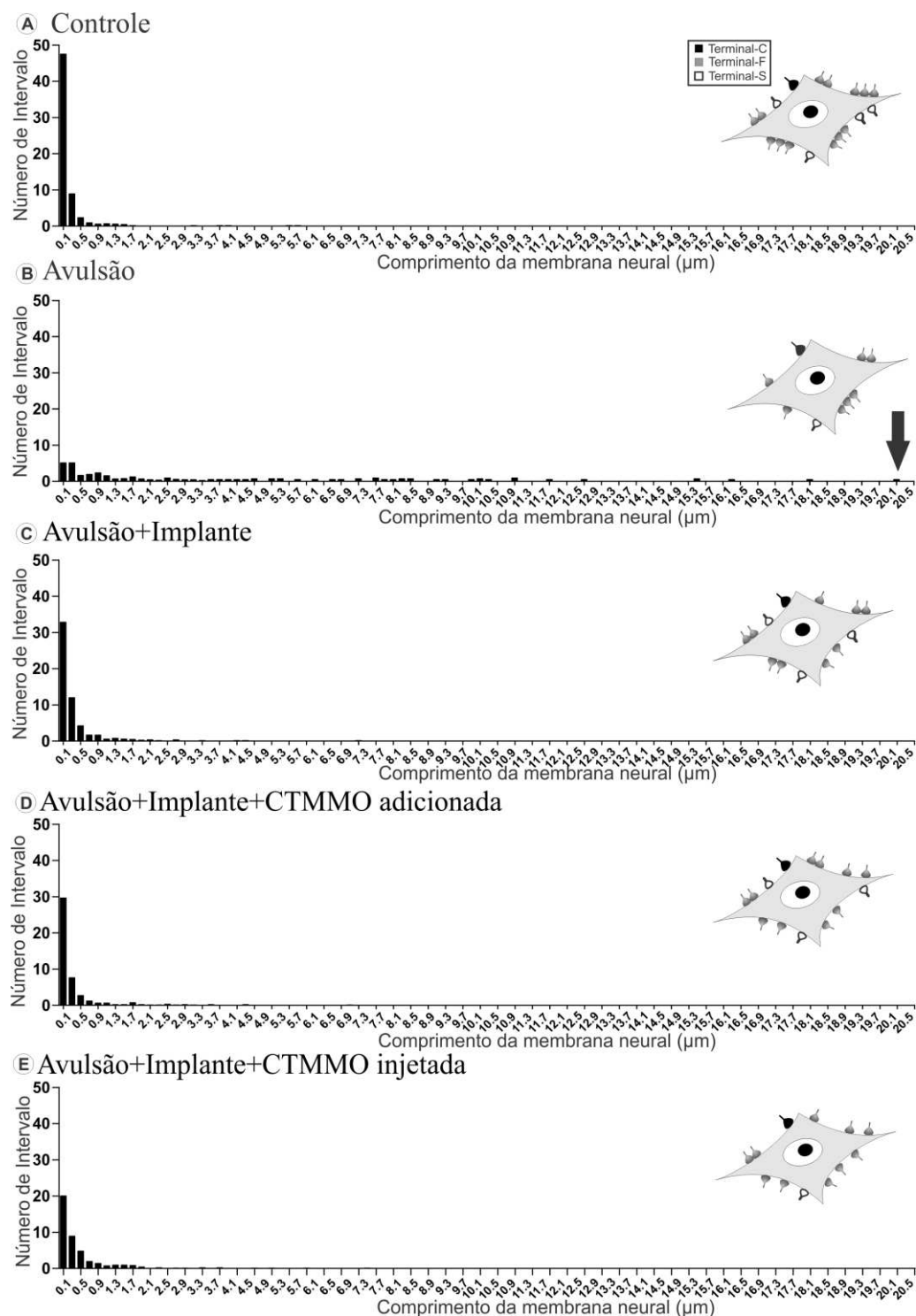


**Figura 40:** Representação gráfica da análise quantitativa ultraestrutural dos tipos de terminais, 12 semanas após lesão e reparo. A- porcentagem de cobertura das sinapses pelos terminais F, S e C, B- número de terminais sinápticos F, S e C em aposição/100  $\mu\text{m}$  e C- tamanho dos terminais. (\*=  $p<0.05$ ; \*\*=  $p<0.01$  e; \*\*\*=  $p<0.001$ ). Média $\pm$ erro padrão;  $n=5$ .

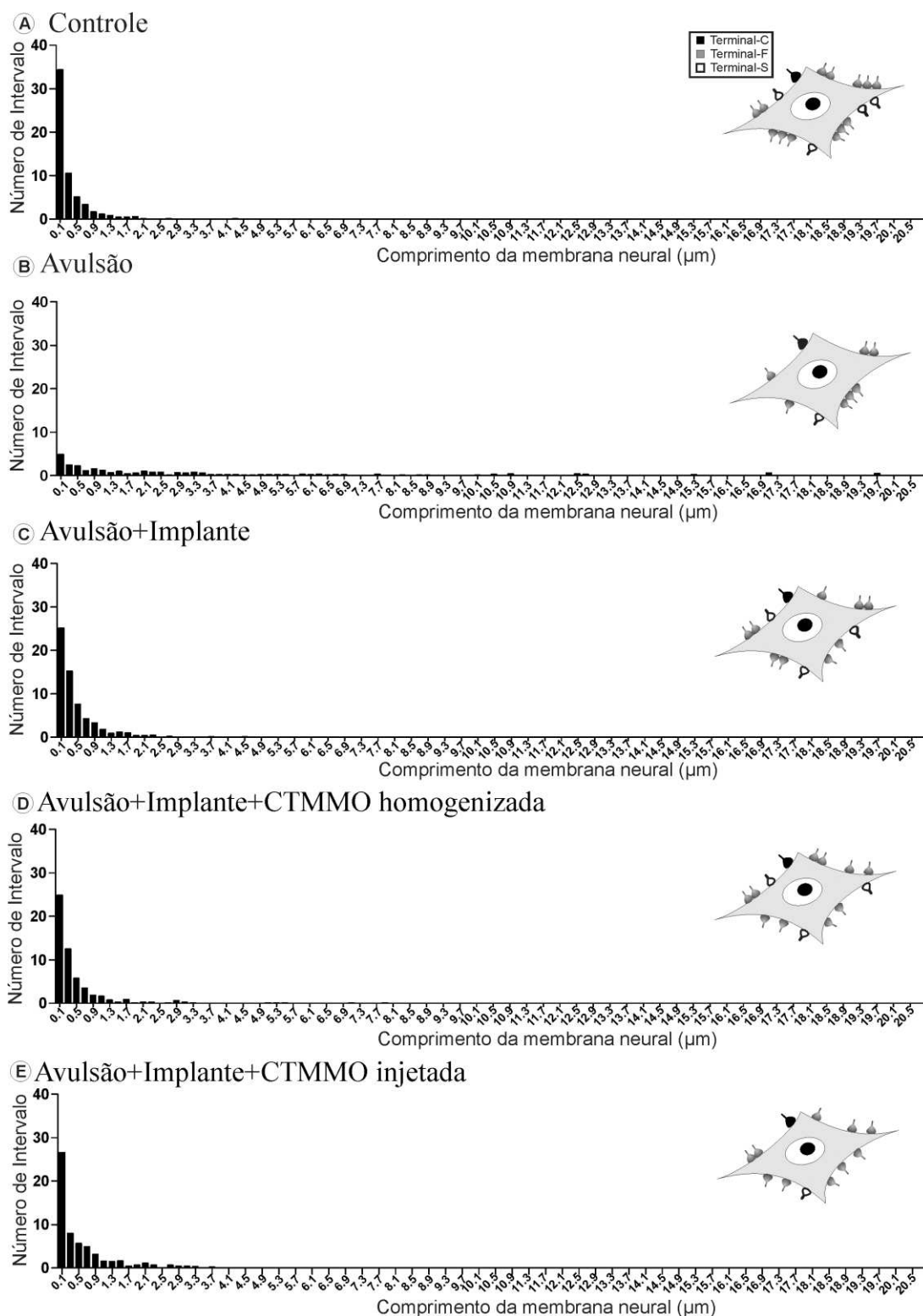
### **5.7.2 Padrão de distribuição dos terminais após avulsão**

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 0,2  $\mu\text{m}$ . Esses intervalos foram identificados na avaliação estrutural como sendo projeções citoplasmáticas dos astrócitos e microglia. Em neurônios normais, os terminais mostram-se agrupados, havendo número menor de intervalos entre os inputs. Entretanto, no grupo avulsionado, observou-se aumento da frequência de intervalos entre terminais, bem como de suas dimensões, as quais atingiram até 20,1  $\mu\text{m}$  após 4 semanas (Fig. 41 B) e 19,7  $\mu\text{m}$  com 12 semanas (Fig. 42 B). Os grupos onde realizou-se o implante mostraram padrão intermediário entre esses dois extremos, com maior similaridade ao controle (Fig. 41 e 42).





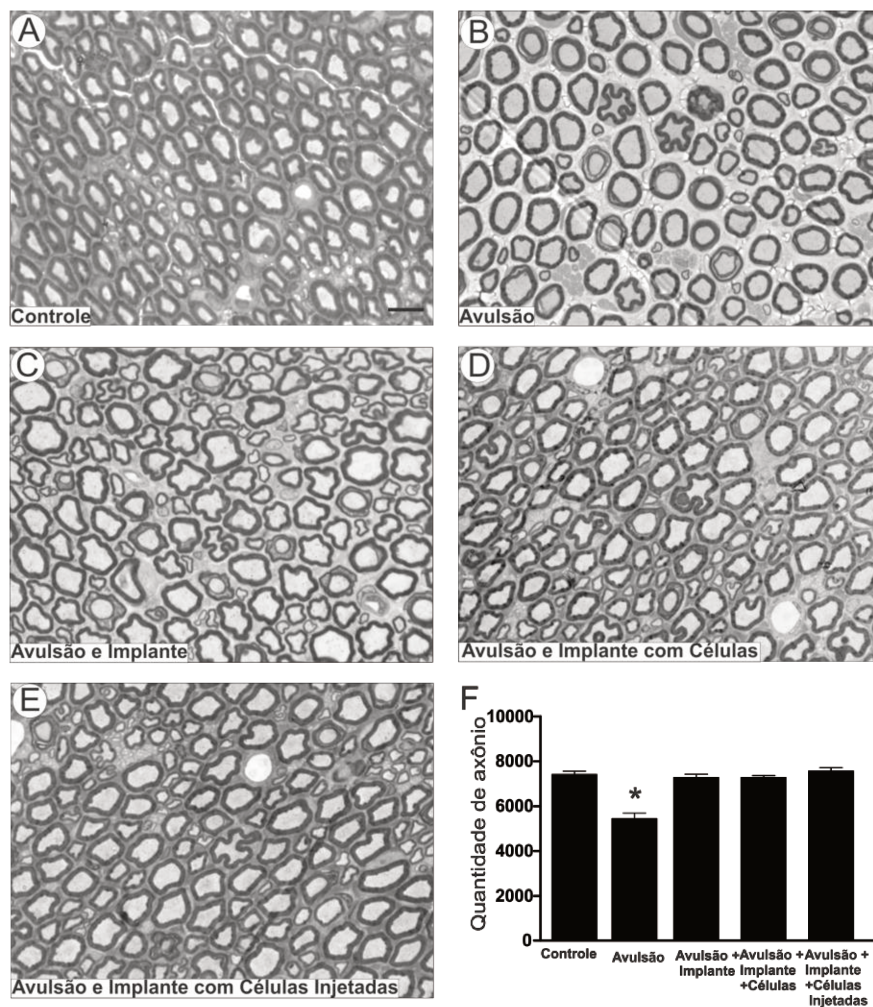
**Figura 41:** Distribuição dos espaços entre terminais sinápticos ao longo da membrana do corpo dos motoneurônios, 4 semanas após avulsão. A- distribuição normal dos intervalos entre os terminais pré-sinápticos, B- alteração da distribuição dos terminais pré-sinápticos devido à retração (seta, indicando o maior intervalo encontrado), C , D e E- restauração dos intervalos ao longo da membrana dos motoneurônios.



**Figura 42:** 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 , D e E- restauração dos intervalos ao longo da membrana dos motoneurônios.

## 5.8 Regeneração Axonal:

Imagens representativas de cortes transversais de nervos isquiáticos, corados com azul de toluidina (luz transmitida), dos diferentes grupos experimentais, 12 semanas após a cirurgia, estão representadas na Fig 43. A contagem do número de axônios mielínicos está representada pelo gráfico Fig. 43 F. O número de axônios mielínicos foi maior nos grupos tratados, quando comparados ao grupo somente avulsão (controle -  $7.415 \pm 262$ ; avulsão -  $5.434 \pm 251$ ; avulsão com implante -  $7.267 \pm 193$ ; implante com CMMO adicionadas ao selante -  $7.271 \pm 91$ ; implante com células injetadas -  $7.564 \pm 148$ ; número de axônios mielínicos  $\pm$ erro padrão).



**Fig. 43-** Imagens de cortes transversais do nervo isquiático, representativas dos diferentes grupos experimentais, corados com azul de toluidina. A- Controle (lado contralateral à lesão) B-E –lados ipsilaterais à lesão; B- Avulsão, C- Avulsão+implante, D- Avulsão+implante+células adicionadas ao selante e E- Avulsão+implante+células injetadas. F- Gráfico da quantificação do número de fibras mielínicas (\* =  $p < 0,05$ ;  $n=5$ ).

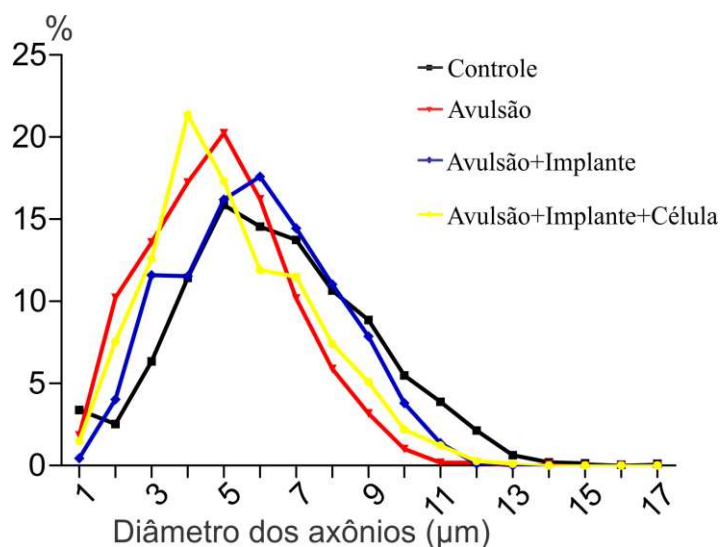
## **5.9 Parâmetros Morfométricos**

No estudo morfométrico dos axônios mielínicos, presentes no nervo isquiático, foram considerados os seguintes parâmetros: Diâmetro das Fibras Nervosas (DFN), o qual corresponde ao axônio e a sua bainha de mielina; Diâmetro dos Axônios Mielínicos (DAM), correspondendo ao axônio sem a sua bainha de mielina; Espessura da Bainha de Mielina (EBM) e Razão "g" (RZG), a qual foi obtida a partir do quociente DAM/DFM.

Nota-se que, no modelo de lesão utilizado nesse trabalho, somente as fibras motoras do nervo isquiático são lesadas. No entanto, para as análises morfométricas não havia como distinguir as fibras motoras das fibras sensitivas do nervo isquiático, diminuindo a diferença entre os grupos, uma vez que todas as fibras sensitivas estão intactas. Portanto, a distribuição de frequência foi essencial para análise dos resultados, porque pudemos distinguir as fibras de maior calibre (motoras), das fibras de menor calibre (sensitivas - não lesadas). O estudo das distribuições de frequência dos parâmetros acima mencionados, suas médias e respectivos desvios-padrão foram obtidos a partir dos dados amostrados em cada grupo.

### **5.9.1 Diâmetro dos Axônios Mielínicos (DAM)**

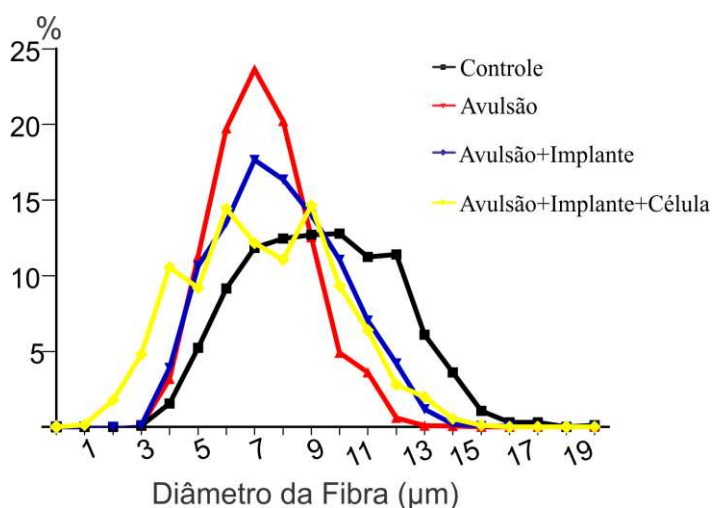
Os animais do grupo controle apresentaram axônios com diâmetros variando de 1  $\mu\text{m}$  a 17  $\mu\text{m}$ . Nota-se que o grupo somente avulsão possui poucas fibras acima de 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, enquanto que nos grupos com implante, o padrão dos gráficos se aproxima do grupo controle (Fig. 44). Adicionalmente, no grupo com implante + células há maior número de fibras com maior diâmetro de axônio, quando comparado com o grupo implante e somente avulsão.



**Fig. 44-** Distribuição de frequência do diâmetro dos axônios mielínicos.

### 5.9.2 Diâmetro das Fibras Nervosas (DFN)

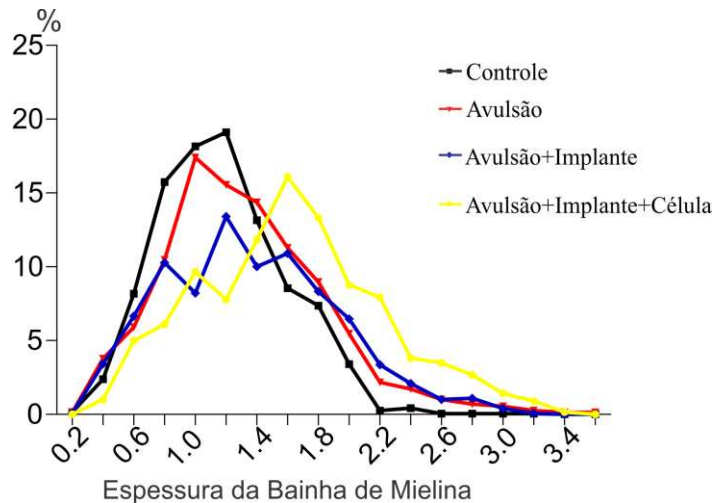
O grupo somente avulsão apresentou distribuição de frequência do DFN claramente diferente do grupo controle (Fig 45). Os animais do grupo controle apresentaram DFN variando de 4μm a 20μm, com distribuição normal. Já o grupo somente avulsão mostrou predominância nas fibras menores 6 a 10 μm de diâmetro. Nos grupos com implante com ou sem células, o padrão dos gráficos se aproximou ao padrão do grupo controle. Sendo que, no grupo com implante e células adicionadas, houve ainda mais fibras com maior diâmetro de axônio, chegando a apresentar fibras com 16 μm de diâmetro.



**Figura 45-** Distribuição de frequência do diâmetro das fibras nervosas.

### 5.9.3 Espessura da Bainha de Mielina (EBM)

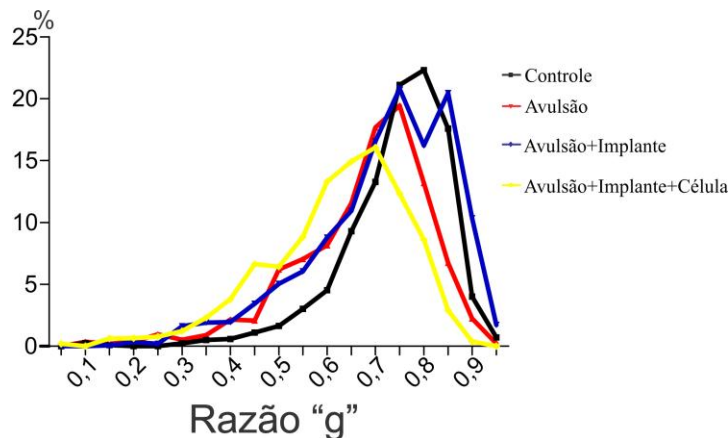
O grupo somente avulsão apresentou distribuição de frequência do EBM claramente diferente do grupo controle (Fig 46). Os animais do grupo controle apresentaram EBM variando de 0,2 $\mu$ m a 4 $\mu$ m, com distribuição normal. Similarmente, os grupos com implante mostraram um similar ao do grupo controle.



**Fig. 46-** Distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina.

### 5.9.4 Razão “g” (RZG)

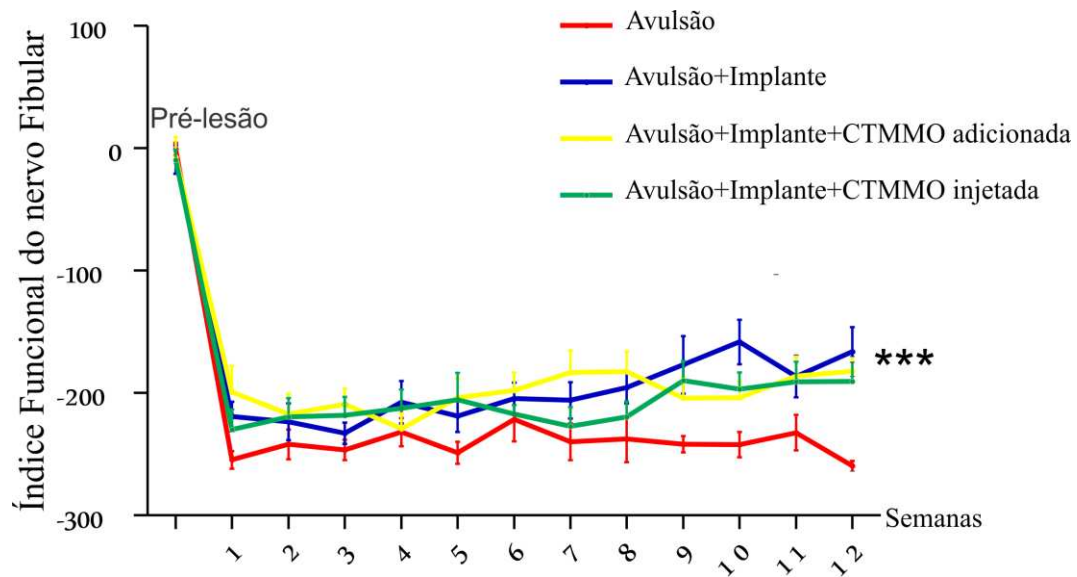
A razão “g” é um parâmetro morfométrico que expressa a regeneração funcional do nervo (Smith e Koles, 1970). Na distribuição de frequência (Fig 47) percebemos que o grupo com com implante apresenta valores próximos aos do controle. Por outro lado, o grupo que sofreu avulsão, apresentou deslocamento da distribuição para a esquerda, indicando a perda das fibras motoras, mais mielinizadas.



**Fig. 47-** Distribuição de frequência da razão “g”.

### 5.10- Recuperação da função motora dos animais que tiveram o implante das raízes.

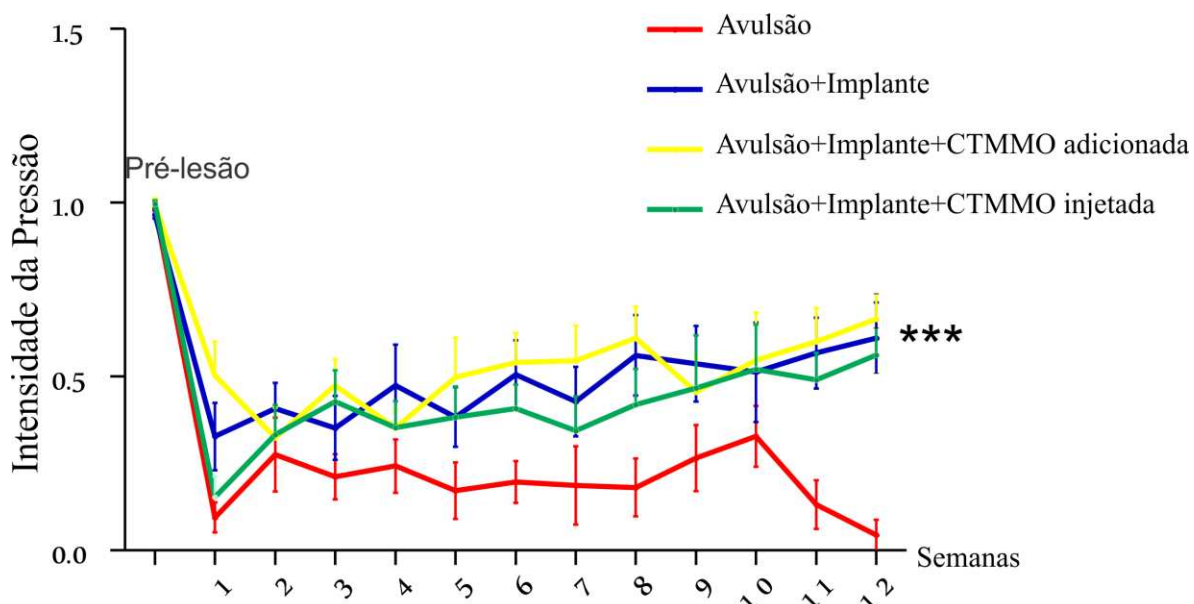
Foi investigada a recuperação motora dos grupos experimentais utilizando-se o aparelho CatWalk. Para o cálculo do índice funcional do nervo fibular (Fig 48) utilizamos dois parâmetros: a distância entre o primeiro e o quinto dedo, bem como entre o terceiro dedo e o calcanhar. Na décima segunda semana pós operatória, pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos com implante, em relação ao grupo somente avulsionado.



**Fig 48.** Índice funcional do nervo fibular, até 12 semanas após a avulsão das raízes ventrais nos grupos: somente avulsão (vermelho), avulsão seguida do reimplante das raízes lesadas (azul), reimplante associado às células tronco (amarelo) e após o implante seguido de injeção das CMMO no funículo lateral (verde). (n=10). Observa-se melhora motora nos grupos com implante, com ou sem tratamento com células.



A análise da pressão exercida pelas patas posteriores, durante a marcha, está representada pela razão entre os lados ipsi/contralateral (Figura 49). Após 12 semanas, os grupos com reimplante conseguiram suportar melhor o peso corpóreo sobre a pata lesada, em comparação ao grupo somente avulsionado.



**Fig 49.** Recuperação da capacidade de suporte de peso pela pata onde a raiz nervosa foi avulsionada e reimplantada com o selante de fibrina. Valores expressos pela razão ipsi/contralateral da pressão exercida pela pata do animal sobre a plataforma CatWalk. (n=10).



## 6- DISCUSSÃO

Lesões próximas da interface SNC/SNP desencadeiam uma extensiva degeneração de motoneurônios medulares, mesmo em indivíduos adultos (Kishino, *et al.*, 1997; Novikov, *et al.*, 1995; Oliveira e Langone, 2000), acarretando permanente perda da função motora e sensitiva. Os neurônios motores afetados apresentam, no período agudo pós-lesão, uma perda significativa de sinapses, (Kuno e Llina's, 1970; Purves, 1975; Takata e Nagahama, 1983; Delgado-Garcia *et al.*, 1988), dentre outras alterações no microambiente medular. Experimentalmente, essa degeneração neuronal e alterações medulares podem ser induzidas através da avulsão das raízes ventrais, onde ocorre abrupta separação dessas raízes da medula espinal. O plexo braquial é frequentemente acometido por essa grave lesão (Carlstedt, 2008 e 2009) e nosso trabalho busca possíveis alternativas para resgatar os motoneurônios lesados, com vistas à recuperação da função motora.

Recentes estudos sugerem a viabilidade do transplante de células para o tratamento de lesões medulares ou doenças neurodegenerativas (Cummings *et al.*, 2005 e 2008; Suzuki *et al.*, 2007; Hell *et al.*, 2009; Brock *et al.*, 2010; Salazar *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Spejo, 2013), no intuito de diminuir a morte neuronal. No entanto, esse tratamento não é funcional sem concomitantes estratégias para a recuperação da unidade motora (Suzuki *et al.*, 2007). Nesse contexto, o presente trabalho propõe o uso de células tronco mononucleares e o implante, com selante de fibrina, para o tratamento da avulsão de raízes ventrais. Outras formas de implante utilizam-se de sutura (Calrsted, 2009), enxerto de outros nervos ou ainda, fazendo-se uma pequena abertura na medula, com forceps do tipo relojoeiro (Pintér *et al.*, 2010). Neste contexto, é importante ressaltar que, além do selante de fibrina causar menos danos ao tecido saudável, em comparação aos demais métodos propostos, também possibilita a adição de células tronco durante o processo adesivo.

Existem relatos da boa perspectiva da utilização terapêutica das CMMO. Os primeiros estudos surgiram em cardiologia e mostraram resultados promissores (Guarita-Souza *et al.*, 2005), incentivando a utilização dessas células como forma de tratamento em outras situações clínicas. Foi também observado seu potencial neuroprotetor em lesão do sistema nervoso periférico (Goel *et al.*, 2009; Lopes-Filho *et al.*, 2011) e medular (Yoshihara T, 2001). Além disso, a fração mononuclear é mais facilmente obtida, com

baixos custos e menor tempo de processamento, quando comparada a outros tipos celulares (Fernandes *et al.*, 2008; Goel *et al.*, 2009).

Alguns pesquisadores têm buscado o melhor momento para se fazer o transplante celular pós-lesão. Assim, há casos onde é sugerido que a melhor abordagem seria o transplante celular tardio, ou seja, passada a fase aguda pós-lesão (Okada *et al.*, 2005). No entanto, Lang *et al.* (2005), mostraram que a administração celular imediata aumenta a sobrevivência dos motoneurônios, após avulsão de raízes nervosas. Em nosso trabalho verificamos que as células produzem fatores neurotróficos no início da terapia celular (Figs 32 e 33). Porém, com 4 semanas não há diferença na produção desses fatores, em comparação aos outros grupos. Acreditamos que tal produção inicial de neurotrofinas contribuiu para a grande sobrevivência neuronal no grupo com transplante celular nas primeiras semanas e que isso não perdurou até 8 e 12 semanas. Tendo em vista a ação aguda das CMMO, seria interessante repetir o transplante de células semanalmente, por exemplo, no sentido de manter os estímulos neuroprotetores, em projetos futuros. Já foi demonstrado efeito neuroprotetor no período agudo após avulsão de raízes ventrais por células tronco, pela produção de fatores neurotróficos (Su *et al.*, 2009; Hell *et al.*, 2009). Também foi sugerido que, além da produção de neurotrofinas, as células tronco de medula óssea também promovam neuroproteção pela produção de moléculas de matriz extracelular (Ide *et al.*, 2010).

### **6.1 – Aumento da sobrevida neuronal nos grupos com implante:**

Segundo Koliatsos *et al.* (1991) e Piehl *et al.* (1995 e 1998), a avulsão das raízes ventrais na superfície da medula espinal resulta em perda de aproximadamente 80% dos motoneurônios durante as primeiras duas semanas pós lesão. Nossos resultados mostraram que o implante e a administração de CMMO preservou um número significativo de motoneurônios quando comparado ao grupo sem tratamento (apenas avulsão) (Figs 11-13). O efeito neuroprotetor observado demonstra que a associação do implante à terapia celular favoreceu a sobrevivência dos motoneurônios lesados, uma vez que a relação entre o tempo e a degeneração é bem conhecida neste modelo experimental. Sendo assim, a maior parte dos motoneurônios havia degenerado no grupo avulsão, o que não ocorreu nos outros grupos experimentais. O resgate neuronal foi mais elevado no grupo com implante onde as células tronco foram adicionadas ao selante. Sabe-se que fatores neurotróficos, quando aplicados precocemente, aumentam a sobrevivência dos motoneurônios após avulsão de raízes nervosas (Lang, 2005). Neste sentido, células

tronco demonstraram efeito neuroprotetor no período agudo após AVR, pela provável produção de fatores neurotróficos (Su *et al.*, 2009; Hell *et al.*, 2009).

Em nosso trabalho podemos concluir que o implante teve grande importância na neuroproteção, especialmente até 12 semanas. Esse dado é corroborado por Vejsada *et al.* (1995) que demonstraram que, caso a conexão entre o corpo celular e o alvo não seja restabelecida em animal adulto, os fatores neurotróficos não são capazes de manter a sobrevivência de motoneurônios lesados por longos períodos. Em modelo de esclerose lateral amiotrófica foi demonstrado que o transplante de células tronco de medula óssea em humanos (Blanquer, 2011), bem como de células gliais que produzem GDNF em camundongos (Suzuki, 2007), ajudou na sobrevivência de motoneurônios. No entanto, não houve manutenção ou reconexão da comunicação neuromuscular (Suzuki, 2007). Vários estudos têm demonstrando o efeito neuroprotetor da utilização de fatores neurotróficos, como o BDNF (Yan, Q., 1992; Koliatsos, 1993; Kishino, 1997), após lesão medular (Bregman, 2002). Essa neuroproteção ocorreu inclusive em neonatos (Sendtner, 1992), onde os efeitos de axotomia são mais drásticos que em adultos.

A expressão de BDNF e GDNF pelas CMMO pôde ser observada por RT-PCR no presente trabalho, bem como por Lopes-Filho (2009), em lesão do SNP. Sugerimos que essas células são capazes de manter a sobrevivência neuronal no período agudo pós-lesão, quando ocorre grande morte neuronal, proporcionando tempo hábil para os motoneurônios regenerarem seus axônios após reimplante das raízes.

## **6.2 Plasticidade sináptica:**

Uma das modificações mais significativas após uma lesão que resulte na interrupção do contato entre o motoneurônio e as fibras musculares é a retração de botões sinápticos da superfície da célula axotomizada (Purves e Lichtman, 1978; Brännström e Kellerth, 1998). Essa perda significativa dos botões sinápticos em neurônios axotomizados, no período agudo pós-lesão, diminui ou mesmo extingue a transmissão sináptica (Purves, 1975; Takata & Nagahama, 1983; Delgado-Garcia *et al.*, 1988). No caso da reinervação com o órgão alvo não ocorrer, tais alterações sinápticas podem se tornar irreversíveis (Brännström e Kellerth, 1998). Nossos resultados (Fig 15-17 e 34,35) vão de encontro com a literatura, pois foi notada perda de sinapses após avulsão no grupo sem intervenção após a lesão. Os animais que receberam implante com ou sem CMMO apresentaram uma significativa redução do destacamento dos terminais pre-sinápticos presentes no corpo celular dos motoneurônios.

No grupo submetido somente à avulsão, houve drástica diminuição da cobertura sináptica, vista tanto pela porcentagem sináptica quanto pela redução do número de terminais, em análise de MET. Foi observado, nos grupos com implante e implante com células adicionadas ao selante, predomínio de perda de terminais S (excitatórios – glutamatérgicos), mantendo-se a seletividade do processo de retração sináptica, com manutenção dos terminais F, inibitórios, após 4 semanas (Fig 36). Essa diferença entre a perda de cobertura sináptica dos terminais F e S minimizou a exposição aos efeitos tóxicos do glutamato em excesso e, provavelmente contribuiu para 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 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 dentrícos/axônicos (Carlsted, 2009). Pintér *et al.* (2010) propuseram que a droga Riluzole (2-amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole) leva à redução considerável da excitabilidade dos neurônios lesados, pois é um componente que age no bloqueio de canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de voltagem, para ativar canais de  $\text{K}^+$ , inibindo a liberação de glutamato pré-sináptico (Doble, 1996 ; Duprat *et al.*, 2000). A droga Riluzole foi capaz de efetivamente reduzir o dano neuronal isquêmico na medula espinal (Lang *et al.*, 1999) e prevenir a morte de motoneurônios *in vitro*, após exposição a agonistas glutamatérgicos (Estevez *et al.*, 1995).

Houve também maior espaçamento entre os terminais sinápticos no grupo somente lesado (Fig 38 e 39), esse intervalo sináptico estava preenchido por projeções micro e macrogliais, corroborando com os dados mostrados pela imunomarcção, com aumento da proteína GFAP no grupo avulsão sem implante após 12 semanas à cirurgia. Os intervalos entre os terminais dos grupos lesados com implante, mostraram-se menores em relação ao grupo somente lesado.

### 6.3- Reatividade Glial:

Juntamente às alterações sinápticas observadas no corpo dos motoneurônios, as células da 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 microglial (Privat *et al.*, 1981; Norton *et al.*, 1992; Eng *et al.*, 2000).

Já é bem conhecido que astrócitos e microglia atuam efetivamente na manutenção da homeostase necessária à transmissão e plasticidade sináptica (Araque e Perea, 2004; Aldskogius e Svensson, 1999). Assim, diante de danos axonais do neurônio, as células circunjacentes aos motoneurônios alteram seu comportamento e reatividade (Kreutzberg *et al.*, 1996). A literatura entra em desacordo se reatividade da microglia pode ser danosa (Ekdahl *et al.*, 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 à ativação da microglia se tornar benéfica ou nociva. Durante os primeiros estágios da lesão, a microglia responde rapidamente, passando a produzir moléculas neurotróficas (Kreutzberg *et al.* 1996; Cullheim e Thams, 2007) e num segundo momento, apresenta características fagocíticas importantes para o reparo tecidual (Kreutzberg 1996, Colton 2009), removendo também fragmentos de células apoptóticas ou necróticas. A microglia é o principal tipo celular com essa função, no entanto, agora sabe-se que outras células, como os astrócitos, também auxiliam nesse processo (Griffiths *et al.*, 2009). Não foram observadas, em nossos resultados, diferenças significativas entre os grupos, no que diz respeito à reatividade morfológica das células gliais. Isso pode ser explicado pela análise ter sido realizada a partir de 4 semanas após a lesão (4, 8 e 12 semanas) e não no período agudo (aproximadamente 2 semanas). Já na análise por RT-PCR após 1 semana, notamos maior quantidade de transcritos gênicos no grupo com CMMO.

Em relação à astrogliose, Olier *et al.*, 2001 demonstraram que os astrócitos são capazes de retrair sinapses de forma reversível, mostrando que estes são capazes de responder às alterações no seu microambiente (Wang & Bordey, 2008), como em lesões do sistema nervoso. Esse destacamento sináptico, pelo aumento de reatividade astrogliosa (indiretamente analisado pela expressão de GFAP), foi observado no grupo somente avulsão, 12 semanas após a lesão. Diferença similar, em relação à astrogliose, foi vista por Penas *et al.* (2011) após avulsão de raízes ventrais e dorsais.

#### 6.4- Neurotrofinas e interleucinas:

Está estabelecido que fatores neurotróficos são expressos por células tronco mesenquimais (Chen *et al.*, 2002) no sítio de lesões do SN (Hell *et al.* 2009; Spejo 2013). Estudos prévios revelaram que CMMO expressam BDNF e GDNF (Lopes-Filho 2011) em lesão do SNP. Em nosso trabalho foi evidenciada a produção dessas neurotrofinas, uma semana após o transplante, empregando-se qRT-PCR. A aplicação, via intratecal, de GDNF, após avulsão e reimplante de raízes nervosas lombares, promoveu sobrevivência neuronal e regeneração (Bergerot *et al.*, 2004; Chu e Wu, 2009). Já o BDNF, além de promover a mielinização *in vitro* (Yamauchi *et al.*, 2004; Chu e Wu, 2009) aumentou o diâmetro de axônio mielínicos e a recuperação funcional após transecção periférica do nervo isquiático (Lewin *et al.*, 1997; Lang *et al.*, 2008). A neutralização do BDNF endógeno reduz o comprimento de axônios regenerados bem como de axônios mielinizados, após esmagamento do nervo isquiático (Zhang *et al.*, 2000; Chu e Wu, 2009). A aplicação exógena de BDNF sustenta regeneração de axônios motores à longo prazo, em especial com a administração contínua (Boyd e Gordon, 2003; Chu e Wu, 2009).

Neurotrofinas como BDNF e NT-3, promovem brotamento e alongação axonal após lesão nervosa periférica e durante o desenvolvimento (Mendell *et al.*, 2001), estão exacerbadas no grupo com implante nos dois tempos analisados e no grupo com transplante de células com uma semana. A NT-3 também promove recuperação motora após isquemia cerebral (Zhang 2008). Ainda, no arranjo de PCR, observamos que os genes que auxiliam no direcionamento dos axônios (Artn, Gfra3, Ngfr) estavam mais expressos nos grupos com implante e com células (1 semana), bem como os genes que auxiliam no desenvolvimento do sistema nervoso periférico (Artn, Gfra3, GDNF, Ngfb, Nrg1, Ntf3). Foi mostrado em ratos (Kishino *et al.*, 1997) e primatas (Brock *et al.*, 2010) que, após lesão medular seguida da administração de fatores neurotróficos, ocorre regeneração axonal. Assim, foi observada maior expressão de neurofilamentos nas raízes dos animais com implante, em comparação aos animais que sofreram avulsão sem implante ou tratamento. O fator neurotrófico ciliar (CNTF) e seu receptor (CNTFr), que apresentaram maior expressão no grupo com implante e com transplante celular, foram demonstrados como capazes de reduzir a perda neuronal após axotomia periférica em animais neonatos e aumentar em 60% a sobrevivência de neurônios em cultura (Sendtner *et al.*, 1991). Isso, em conjunto, está de acordo com a melhora motora analisada pelo índice

funcional do nervo fibular, bem como da pressão exercida pela pata do lado lesado (Fig 45 e 46).

Os genes relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso central (Fgfr1, Ngfr, Ntf3) também foram mais expressos nos grupos com implante e implante com células. No entanto, com 4 semanas o grupo com células já não expressou esses genes indicando que a influência das CMMO no reparo após 4 semanas já havia, provavelmente, cessado. O VGF (fator de crescimento de nervo induzível), novamente mais expresso somente no grupo com implante, protegeu células nervosas em modelo de camundongos para ALS (Shimazawa, 2010).

A produção de IL-6 e seu receptor, que apresentaram maior expressão no grupo com implante, promove a sobrevivência neuronal após excitotoxicidade (Hama et, 1991; Toulmond *et al.*, 1992; Loddick *et al.* 1998). Além dessas, diversas outras moléculas e substâncias atuam protegendo as células nervosas e contribuindo com o processo regenerativo tecidual, como as proteínas de choque térmico (Kalmar *et al.*, 2002) que, possivelmente, auxiliaram no resgate de motoneurônios após axotomia. Uma dessas chaperonas (Hspb1) está superexpressada nos grupos com reimplante e reimplante com células tronco adicionadas ao selante. O grupo somente implante também demonstrou maior expressão da IL-10 e seu receptor. Essa interleucina, juntamente com IL4 e IL13 promove a diferenciação de macrófagos em M2, sendo esses neuroprotetores e auxiliares do crescimento axonal (Kigerl *et al.* 2009).

#### **6.5- Regeneração axonal e recuperação funcional:**

O SNP possui grande capacidade regenerativa. Após lesão de um nervo periférico, vários eventos começam a ocorrer no intuito de reparo desses axônios. O coto distal desenvolve a degeneração Walleriana, com degeneração da bainha de mielina e dos axônios lesados. Os macrófagos e as células de Schwann auxiliam nessa etapa, além de produzirem interleucinas, fatores neurotróficos (Taniuchi *et al.*, 1986; Lewin *et al.*, 1997; Zochodne, 2000) e matriz extracelular (Tona *et al.*, 1993), que são fundamentais ao processo regenerativo. Isso contrasta com a regeneração de axônios lesados no SNC ou na interface entre SNC/SNP onde quase não ocorre regeneração nervosa. No caso de avulsão de raízes nervosas ventrais, os axônios devem regenerar inicialmente dentro do SNC, atravessando a cicatriz glial formada na borda da medula, regenerar seu axônio rumo à reinervação do alvo, através do SNP.

No SNC a regeneração até pode ocorrer sem intervenção externa, porém com número muito reduzido de motoneurônios sobreviventes. Após a transecção experimental no gato, alguns destes axônios se regeneraram através da cicatriz glial, no SNC e repovoaram raízes ventrais (Risling *et al.* 1983, 1992, 1993; Carlstedt *et al.* 1988; Fraher, 1998). Ainda assim, os axônios motores têm que transcorrer uma longa distância para reinervar seu alvo. Portanto, a sobrevivência à longo prazo é essencial. Assim, é crucial para a sobrevivência do motoneurônio, durante a regeneração, manter o nível de fatores tróficos. Os fatores neurotróficos podem melhorar o brotamento axonal e aumentar a probabilidade de um axônio se associar com células de Schwann na periferia. Idealmente, os fatores que proporcionam efeitos quimiotáticos ou neurotróficos para os axônios podem orientá-los para regenerar em direção ao alvo (Chu e Wu, 2009). Nesse sentido, a produção de BDNF e GDNF pelas CMMO pode ter efetivamente contribuído para a regeneração observada no presente estudo.

Foi mostrado em ratos (Kishino *et al.*, 1997) e primatas (Brock *et al.*, 2010) que, após lesão medular seguida da administração de fatores neurotróficos, ocorreu regeneração axonal. Tal fato baseia-se na imunoistoquímica anti-neurofilamentos, pois são proteínas do citoesqueleto do axônio, essenciais para o alongamento das fibras, possibilitando o prolongamento dos brotos axonais (Kobayashi *et al.*, 1988). Assim, foi observada maior expressão de neurofilamentos nas raízes dos animais com implante, em comparação com animais que sofreram avulsão sem implante ou tratamento (Fig 27). No presente estudo nós observamos maior número de fibras nervosas nos grupos com implante, após análise da quantidade de fibras no nervo isquiático (Fig 40). A análise da distribuição de frequência do DA e DFN, permitiu concluir que o grupo que, além do implante, também recebeu a terapia celular apresentou padrão de distribuição de frequência mais próximo ao do lado normal/contralateral (Figs 41 e 42). Foi importante analisar principalmente as fibras de maior calibre, devido ao nosso modelo de lesão, a avulsão, somente acometer as raízes ventrais, que contém os axônios motores (de grande diâmetro). Neste sentido os grupos com implante mostraram-se intermediários entre o normal e o grupo somente avulsão sendo que este último grupo apresentou o padrão mais destoante em relação ao contralateral.

Podemos sugerir que as CMMO, bem como as células de Schwann, contribuem para a produção de fatores neurotróficos no microambiente da interface SNC/SNP, auxiliando a regeneração nervosa. Esses fatores são, normalmente, produzidos em maiores níveis, após axotomia periférica. Como visto por Funakoshi *et al.* (1993), houve



aumento de expressão de transcritos gênicos para NGF, algumas horas após a axotomia e 2 a 3 dias após a lesão. Já em relação ao BDNF, Meyer *et al.* (1992) observaram aumento a partir do terceiro dia após axotomia de nervo periférico até 4 semanas, onde o pico de produção foi atingido. As células de Schwann são as maiores responsáveis pela produção desses fatores tróficos no SNP e também auxiliam na formação das bandas de Büngner após sua proliferação (Ide, 1996), que irão direcionar os axônios em crescimento no nervo em direção ao músculo/órgão alvo. No entanto, tais células perdem essa habilidade de promover o crescimento axonal, no coto distal cronicamente desnervado, impedindo a regeneração do axônio a longas distâncias em seres humanos (Gaudet *et al.*, 2011). Com o implante e o tratamento celular esperamos talvez reverter esse quadro.

O implante promoveu melhora na espessura da bainha de mielina (Fig 44), indicando ambiente favorável para regeneração nervosa periférica e, ao mesmo tempo, atuando positivamente na atividade das células de Schwann. A espessura da bainha de mielina é uma indicação direta da recuperação funcional do nervo, já que está relacionada com o nível de atividade fisiológica das células de Schwann. Esse parâmetro tem sido utilizado em vários estudos para avaliar a evolução do processo regenerativo axonal (Levi e Bunge, 1994; Oliveira, 2000; Pierucci *et al.*, 2008).

A RZG é estabelecida pelo quociente entre o diâmetro dos axônios e o diâmetro da fibra de mielina. Essa razão é utilizada como parâmetro morfométrico que expressa a relação da célula de Schwann e o axônio durante a regeneração funcional do nervo (Rushton, 1951; Smith e Koles, 1970; Waxman, 1980). Apesar de haver diferenças entre os grupos implantados, ao se comparar com o lado controle, essas diferenças estão respectivamente menores com o grupo implante, implante + células e somente avulsão. Isso sugere que o implante auxiliou a regeneração das fibras nervosas, visto o “pico” em 0,85, que demonstra que há maior quantidade de axônios com bainha recém formada, ao se comparar com o grupo somente avulsão. Após a lesão nervosa, as células de Schwann são fundamentais para o processo regenerativo. Estas entram em processo mitótico acelerado durante o processo da degeneração Walleriana, devido à desconexão com os axônios em degeneração, bem como pela liberação de citocinas pelos macrófagos. Juntamente com os macrófagos, as SC participam da fagocitose dos axônios e das bainhas de mielina em processo degenerativo. As SC produzem fatores neurotróficos, como NGF, BDNF, CNTF, e GDNF (Yoshii *et al.*, 1987; Bruck *et al.*, 1995; Jessen e Mirsky, 1999; Son & Thompson, 1995; Bruck, 1997; Zochodne, 2000) e regulam a expressão de receptores de alta e baixa afinidade para as neurotrofinas (Taniuchi *et*

*al.*,1986; Raivich e Kreutzberg, 1987; Funakoshi *et al.*,1993; Madison e Archibald, 1994). Além disso, a membrana basal das SC serve como substrato para orientação axonal, através das bandas de Büngner (Polits *et al.*,1982).

Ainda, a associação entre a SC com o axônio, induz a síntese da bainha de mielina, fundamental para os axônios mielínicos, pois a sua composição lipídica aumenta a velocidade de propagação do impulso nervoso (Ide, 1996; Garbay *et al.*,2000). A lâmina basal produzida pelas SC contém diversas moléculas da MEC, tais como o condroitim sulfato proteoglicano, a laminina, a fibronectina, o colágeno IV e o heparam sulfato proteoglicano. Logo após a lesão nervosa ela permanece como tubos, dando suporte ao crescimento axonal, migração e proliferação celular (Son e Thompson, 1995; Ide, 1996).

Até onde temos conhecimento, nunca foi realizada análise nervosa periférica, de curto ou longo prazo, após avulsão de raízes nervosas e reimplante das mesmas, de forma que nossos resultados indicam fortemente que a neuroproteção, seguida de regeneração axonal, é uma estratégia viável de rizoterapia. Tal estratégia é ainda reforçada, principalmente, pela recuperação motora (Figs 46 e 46) aferida nos animais com implante. A análise do índice funcional do nervo fibular, bem como da pressão exercida pela pata, referente ao lado lesado, nos fornece dados confiáveis sobre a recuperação funcional de animais com problemas motores (Dijkstra *et al.*, 2000) e é um método não invasivo, de baixo custo e quantitativo (Varejão *et al.* 2001, Dijkstra *et al.*, 2000, Monte-Raso *et al.*, 2006). Os animais onde houve implante, sem transplante celular, analisados até 12 semanas pós-operatórias, apresentaram melhora motora estatisticamente significativa em comparação aos animais somente avulsionados.

Nos dois grupos onde foram adicionadas células tronco ao implante observou-se, após 12 semanas da cirurgia, tanto para análise do índice do nervo fibular como pressão corporal suportada pela pata lesada, melhora da função motora. Lang *et al.* (2005) demonstraram, em avulsão das raízes medulares de coelhos, que somente o implante não foi suficiente para aumentar a proteção aos motoneurônios lesados 1 ou 3 semanas após avulsão, mas que a associação do implante à fatores neurotróficos como o BDNF e CNTF apresentaria potencial neuroprotetor. Curiosamente, o reimplante da raiz levou a melhora do índice funcional do fibular já a partir da primeira semana, quando os músculos alvo ainda estavam desnervados. Isso pode refletir a melhor preservação do microambiente em torno dos motoneurônios lesionados, bem como dos segmentos medulares craniais e caudais à lesão. A perda aguda da função foi menos intensa nos grupos com a reparação de raiz, o que indica que os outros grupos musculares foram

mais funcionais, pois os nervos femoral (L3-L4) e obturador (L2-L4) são parcialmente preservados, após avulsão de L4-L6 (Molander e Grant, 1985), o que parcialmente compensou a perda de postura após a lesão.

A melhora motora observada nos animais tem grande relevância, pois a marcha exige restabelecimento da unidade motora, da sensibilidade e do controle do córtex cerebral (Monte-Raso, 2006). Além disso, nos evidencia que a estratégia de reimplante foi bem sucedida, promovendo condições para o retorno do contato com o músculo esquelético. Bregman *et al.* (2002), sugeriram que a recuperação motora após reimplante em transecção de medula é devido ao estabelecimento de sinapses supra-espinais e a partir de fibras serotoninérgicas como do tronco encefálico. No entanto, em nosso trabalho houve manutenção das sinapses nos motoneurônios lesados após o implante, o que indica preservação dos inputs de aferências primárias suprasegmentares e de aferências sensitivas.

Não encontramos na literatura, estudos enfocando análises de nervos periféricos após avulsão de raízes nervosas. Assim sendo, os presentes resultados são inéditos e promissores, pois nos auxiliam no entendimento global da recuperação após rizoterapia por reimplante, já utilizado (de forma muito limitada) na prática médica. Além disso, os resultados aqui apresentados dão embasamento para uma possível futura utilização do selante de fibrina derivado do veneno de serpente para o reparo desse tipo de lesão proximal do sistema nervoso.



## 7.0- CONCLUSÕES:

Os resultados apresentados indicam o possível uso médico/cirúrgico do selante de fibrina, produzido pelo CEVAP (Unesp – Botucatu), em lesões proximais de raízes nervosas medulares, associado ou não com o tratamento empregando células tronco mononucleares. Em conjunto, tal estratégia reparativa resultou em:

- Permanência das CMMO no local do transplante;
- Neuroproteção, observada pela sobrevivência neuronal;
- Manutenção de cobertura sináptica, majoritariamente de inputs inibitórios, observada por imunoistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão;
- Diminuição morfológica da astrogliose reativa 12 semanas após a lesão;
- Modificação da resposta microglial, com aumento de transcritos gênicos para Iba-1 sem, contudo, resultar em retração de terminais sinápticos nem tampuco modificar a imunoreatividade para essa proteína;
- Produção de diferentes fatores neurotróficos (e.g. BDNF, GDNF) pelas CMMO, 1 semana após o transplante;
- Maior número de fibras nervosas regeneradas, presentes no nervo isquiático ipsilateral à lesão;
- Recuperação funcional motora observada pelo walking track test;



## 8- REFERÊNCIAS:

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

Akiyama, Y.; Radtke, C.; Honmou, O.; Kocsis, J.; 2002. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia*. 39(3): 229-236.

Aldskogius, H.; Kozlova, E. N., 1998. Central neuron-glial and glial-glial interactions following axon injury. *Prog. Neurobiol.* 55(1): 1-26.

Aldskogius, H.; Liu, L.; Svensson, M., 1999. Glial responses to synaptic damage and plasticity. *J Neurosci Res.* 58(1): 33-41.

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., Haydon, P. G. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.*22: 208-215.

Araque, A., Perea, G., 2004. Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia*. 47, 241-248.

Bain, J. R., S. E. Mackinnon e D. A. Hunter. 1989. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*, v.83, n.1, Jan, p.129-38.

Barbizan, R., Castro, M.V., Rodrigues, A.C., Barraviera, B., Ferreira, R.S., and Oliveira, A.L. 2013. Motor recovery and synaptic preservation after ventral root avulsion and repair with a fibrin sealant derived from snake venom. *PLoS One*. 8, e63260.

Barron, K.D., 1983. Comparative observations on the cytologic reactions of central and peripheral nerve cells to axotomy. New York: Haven Press, pp.7-39.

Barros, L.C., Ferreira Junior, R.S., Barraviera, S.R.C.S., Stolf, H.O., Thomazini-Santos, I.A., Mendes-Giannini, M.J.S., Toscano, E., Barraviera, B. 2009. A new fibrin

sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. *J Toxicol Environ Health*. 12(8):553-71.

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

Becker, C.M., Gueuning, C.O., Graff, G.L. 1985. Sutures or fibrin glue for divided rat nerves: Schwann cell and muscle metabolism. *Microsurgery*. 6:1-10.

Benveniste E. N. 1997. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol.*;69:31-75.

Bergel, S. 1909. Über Wirkungen des Fibrins. *Dtsch Med Wochenschr*. 35:633-665.

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

Berthold, C. H.; Carlstedt, T. Observations in 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

Blanquer, M.; Pérez Espejo, M.A.; Iniesta, F.; Gómez Espuch, J.; Meca, J.; Villaverde, R.; Izura, V.; de Mingo, P.; Martínez-Lage, J.; Martínez, S.; Moraleda, J.M. 2010. Bone marrow stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: technical aspects and preliminary results from a clinical trial. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 32 Suppl A:31-7.

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

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



Bonilla, S., P. Alarcon, R. Villaverde, P. Aparicio, A. Silva e S. Martinez. 2002. Haematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into cells that express oligodendroglial antigens in the neonatal mouse brain. *Eur J Neurosci*, v.15, n.3, Feb, p.575-82.

Braga-Silva, J.; Gehlen, D.; Padoin, A. V.; Machado, D. C.; Garicochea, B.; da Costa, J.; 2008. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves? *J Hand Surg Eur*. 33(4):488-493.

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

Bregman, B.S.; Coumans, J.V.; Dai, H.N.; Kuhn, P.L.; Lynskey, J.; McAtee, M.; Sandhu, 2002. Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury. *Prog Brain Res*.;137:257-73.

Brock, J.H.; Rosenzweig, E.S.; Blesch, A.; Moseanko, R.; Havton, L.A.; Edgerton, V.R.; . Tuszynski, M.H. 2010. Local and Remote Growth Factor Effects After Primate Spinal Cord Injury. *J Neurosci*. 21; 30(29): 9728–9737.

Brown, A.M., Ransom, B.R., 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*. 55(12):1263-71.

Bruck, W.; Bruck, C.; Marushak, B.; Fried, R. L. 1995. Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol.*, V.89, p.363- 367.

Bruck, W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol.*, v.7,p.741-752, 1997.

Brunelli, G., Brunelli, F. 1988. Use of anterior nerves of cervical plexus to partially neurotize the avulsed brachial plexus. In: Brunelli G, ed. *Textbook of Microsurgery*. Milano: Masson; p. 803-807.

Boulanger, L. M., Huh, G. S., Shatz, C. J., 2001. Neuronal plasticity and cellular immunity: shared molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*. 11, 568-578.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.*, vol. 55, pp.611-622.

Cabanes, C., S. Bonilla, L. Tabares e S. Martinez. 2007. Neuroprotective effect of adult hematopoietic stem cells in a mouse model of motoneuron degeneration. *Neurobiol Dis*, v.26, n.2, p.408-18.

Caldas, H. C.; Fernandes, I. M. M.; Gerbi, F.; Souza, A. C.; Baptista, M. A. S. F.; Ramalho, H. J.; Oyama, R. S. K.; Bertolo, E. M. G.; Bertelli, E. C. P.; Braile, D. M.; Abbud-Filho, M., 2008. Effect of Whole Bone Marrow Cell Infusion in the Progression of Experimental Chronic Renal Failure. *Transplant Proceed.* (40):853-855.

Cajal, S. R. 1959. Degeneration and regeneration of the nervous system. New York, Hafner, p.469.

Carlstedt, T., Linda, H., Cullheim, S., Risling, M. 1986. Reinnervation of hind limb muscles after ventral root avulsion and implantation in the lumbar spinal cord of the adult rat. *Acta Physiol Scand* 128: 645–646.

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

Carlstedt, T., 2008 Root repair review: basic science background and clinical outcome. *Restor Neurol Neurosci.* 26(2-3):225-41.

Carlstedt, T., 2009. Nerve root replantation. *Neurosurg Clin.* 20:39-50.

Caruso, C., Carniglia, L., Durand, D., Scimonelli, T.N., Lasaga, M. 2013. Astrocytes: new targets of melanocortin 4 receptor actions. *J Mol Endocrinol.* Sep 11;51(2):R33-50.

- Chang H.Y., Havton L.A. 2008. Surgical implantation of avulsed lumbosacral ventral roots promotes restoration of bladder morphology in rats. *Exp Neurol*. 214(1):117-24.
- Chen, X.; Katakowski, M.; Li, Y.; Lu, D.; Wang, L.; Zhang, L.; Chen, J.; Xu, Y.; Gautam, S.; Mahmood, A.; Chopp, M.; 2002. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J Neurosci Res*. 69, 687-691.
- Chvátal, A.; Syková, E., 2000. Glial influence on neuronal signaling. *Prog. Brain Res*. 125: 199-216.
- Chu, T., Wu, W., 2009. Neurotrophic factor treatment after spinal root avulsion injury. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 9: 40-55.
- Cizkova, D.; Kakinohana, O.; Kucharova, K.; Marsala, S.; Johe, K.; Hazel, T.; Hefferan, M.P.; Marsala, M., 2007. Functional recovery in rats with ischemic paraplegia after spinal grafting of human spinal stem cells. *Neurosci*. 147(2):546-60.
- Colton, C. A. 2009. Heterogeneity of Microglial Activation in the Innate Immune Response in the Brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 4:399–418
- Conradi, S. 1969 Ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in lumbosacral spinal cord of the adult cat. *Acta Physiol Scand Suppl*. 332:5-48.
- Costa, F. L. S.; Rodrigues, R. S.; Izidoro, L. F. M.; Menaldo, D. L.; Hamaguchi, A.; Homsí- Brandeburgo, M. I.; Fuly, A. L.; Soares, S. G.; Selistre-de-Araújo, H. S.; Barraviera, B.; Soares, A. M.; and Rodrigues, V. M., 2009. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*. 54:725-735.
- Chopp, M., Zhang, X. H., Li, Y., Wang, L., Chen, J., Lu, D., Lu, M., Rosenblum, M., 2000. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*. 11, 3001-3005.

Cullheim, S.; Carlstedt, T.; Lindå, H.; Risling, M.; Ulfhake, B., 1989. Motoneurons reinnervation skeletal muscle after ventral root implantation into the spinal cord of the cat. *Neurosci.* 29:725-733.

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

Cullheim, S.; Wallquist, W.; Hammarberg, H.; Linda, H.; Piehl, F.; Carlstedt, T.; Risling, M., 2002. Properties of motoneurons underlying their regenerative capacity after axon lesions in the ventral funiculus or at the surface of the spinal cord. *Brain Res.* 40: 309-316.

Cullheim, S.; Thams, S. 2007. The microglial networks of brain and their role in neural network plasticity after lesion. *Brain Res Rev.* 55(1):89-96.

Cummings, B. J'; Uchida, N.; Tamaki S.J.; Salazar, D.L.; Hooshmand, M.; *et al.* 2005. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14069–14074.

Dahl, D. 1981. The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *J Neurosci Res.* 6: 741-748.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB 2005. ATP mediates rapid microglial re-sponse to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752–758

De Vries, J.; Menovisky, T.; Gulik, S.; Wesseling, P., 2002. Histological effects of fibrin glue on nervous tissue.. A safety study in rats. *Surg Neurol.* 57: 415-22

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

Diez, M.; Abdelmagid, N.; Harnesk, K.; Ström, M.; Lidman., Swanberg, M. 2009. Identification of gene regions regulating inflammatory microglial response in the rat CNS after injury. *J Neuroimmunol.* 212: 82-92.

Dijkstra, J.R.; Meek, M.F.; Robinson, P.H.; Gramsbergen. A. 2000. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods.* 15;96(2):89-96.

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

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

Eggen, B.J., Raj, D., Hanisch, U.K., Boddeke, H.W. 2013 Microglial phenotype and adaptation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 8(4):807-23.

Eggers, R., Tannemaat, M.R., Ehlert, E.M., Verhaagen, J. 2010. A spatio-temporal analysis of motoneuron survival, axonal regeneration and neurotrophic factor expression after lumbar ventral root avulsion and implantation. *Exp Neurol* 223(1): 207–220.

Ekdahl, C. T.; Kokaia, Z.; Lindvall, O. 2009. Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia. *Neurosci* 158:1021–1029.

Eng, L. F.; Ghirnikar, R. S.; Lee Y. L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 25:1439-1451.

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

Faldini, A., Puntoni, P., Magherini, P.C. *et al.* 1984. Comparative neurophysiological assessments of nerve sutures performed by microsurgical methods and with fibrin glue: experimental study. *Ital J Orthop. Traumatol* 10(4):527–32.

Farina, C.; Aloisi, F.; Meinel, E.. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28:138–145.

Farrag ,T.Y., Lehar, M., Verhaegen, P. *et al.* 2007 . Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *Laryngoscope* 117(1):157–65.

Fawcett, J. W., 1997. Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system. *Cell Tissue Res.* 290(2): 371-377.

Fernandes, M.; Valente, S.G.; Fernandes, M.J.S.; Felix, E.P.V.; Mazzacoratti M.G.N. *et al.*, 2008. Bone marrow cells are able to increase vessels number during repair of sciatic nerve lesion. *J Neurosci Methods* 170:16–24.

Fournier, H.D., Mercier, P., Menei, P. 2005. Repair of Avulsed Ventral Nerve Roots by Direct Ventral Intraspinal Implantation after Brachial Plexus Injury. *Hand Clin*21:109-18.

Fraher, J. P. 1998. The transitional zone and CNS regeneration. *J Anat* 194: 161-182.

De Freria, C. M., Barbizan R.; De Oliveira. A. L. 2012. Granulocyte colony stimulating factor neuroprotective effects on spinal motoneurons after ventral root avulsion. *Synapse*, v.66, n.2, p.128-41.

Frisén, J.; Fried, K.; Sjögren, A-M.; Risling, M. 1993. Growth of ascending spinal axons in CNS scar tissue. *Int J Dev Neurosci* 11:461–475

Funakoshi, H.; Frisen, J.; Barbany G.; Timmusk T, Zachrisson, O.; Verge, V.M.; Persson, H. 1993. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol.* 123: 455-465.

de Freitas, H.T., da Silva, V.G., Giral-di-Guimarães, A. 2012. Comparative study between bone marrow mononuclear fraction and mesenchymal stem cells treatment in sensorimotor recovery after focal cortical ablation in rats. *Behav Brain Funct.* 13;8:58.

Garbay, B.; Heape, A. M.; Sargueil, F.; Cassagne, C. 2000. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Progress in Neurobiology*, v.61, p.267-304.

Gaudet, A.D., Popovich, P.G., Ramer, M.S. 2011. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.* 8:110-123.

Giuffre, J.L., Kakar, S., Bishop, A.T., Spinner, R.J., Shin, A.Y. 2010. Current concepts of the treatment of adult brachial plexus injuries. *J Hand Surg Am.* 35(4):678-88.

Glezer, I.; Simard, A. R.; Rivest, S. Neuroprotective role of innate immune system by microglia. 2007. *Neurosci*; 147(4):867-883.

Goel, R. K.; Suri V.; Suri, A.; Sarkar, C.; Mohanty, S.; Sharma, M. C.; Yadav, P. K.; Srivastava, A., 2009. Effect of bone marrow-derived mononuclear cells on nerve regeneration in the transection model of the rat sciatic nerve. *J Clin Neurosci.* 16(9):1211-1227.

Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23–35.

Gray, E. G.; Guillery, R.W. 1966. Synaptic morphology in the normal and degenerating nervous system. *Int Rev Cytol.* 19:111-182.

Grey, E. G. 1915. Fibrin as a hemostatic in cerebral surgery. *Surg Gynecol Obstet.*; 21:452-4.

Griffiths, M.R.; Gasque, P.; Neal, J.W. 2009. The multiple roles of the innate immune system in the regulation of apoptosis and inflammation in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:217– 226.

Gu, Y.D., Wu, M.M., Zhen, Y.L., Zhao, J.A., Zhang, G.M., Chen, D.S., *et al.* 1989. Phrenic nerve transfer for brachial plexus motor neurotization. *Microsurgery.* 10:287-9.

Gu, Y.D, Zhang, G.M., Chen, D.S., Yan, J.G., Cheng, X.M., Chen, L. 1992. Seventh cervical nerve root transfer from the contralateral healthy side for treatment of brachial plexus root avulsion. J Hand Surg;17:518-21.

Guarita-Souza, L. C. G.; Carvalho, K. A. T.; Rebelatto, C.; Senegaglia, A. Hansen, P.; Furuta, M.; *et al.* 2005. A comparação entre o transplante de célula tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. Rev Bras Cir Cardiovasc 20:270–278.

Guarita-Souza, L. C.; Carvalho, K. A.; Simeone, B. R.; Francisco, J. C.; Miyague, N.; Olandoski, M., 2006. Functional outcome of bone marrow stem cells: mononuclear versus mesenchymal stem cells after cellular therapy in myocardial scar in Wistar rats. Transplant Proc. 38(6):1953-1964.

Guth, L. 1956. Regeneration in the mammalian peripheral nervous system. Peripheral Nervous System Regeneration, v.36, p.441-478.

Hallin, R.G; Carlstedt, T.; Nilsson-Remahl, I.; Risling, M. 1999 Spinal cord implantation of avulsed ventral roots in primates;correlation between restored motor function and morphology Exp Brain Res 124:304–310.

Hama, T.; Kushima, Y.; Miyamoto, M.; Kubota, M.; Takei, N.; Hatanaka, H.; 1991 Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. Neuroscience 40(2):445-52.

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., 2000, Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. J Neurosci. 20: 5283-5291.

Hanson, E. 1994. Metabotropic glutamate receptor activation induces astroglial swelling. J Biol Chem. 269:21955-21961.



Hanson, E.; Rönnbäck, L. 1995. Astrocytes in glutamate neurotransmission. *Faseb J.* 9:343-350.

He, J. W.; Hirata, K.; Kuraoka, A.; Kawabuchi, M.; 2000. An improved method for avulsion of lumbar nerve roots as an experimental model of nitric oxide-mediated neuronal degeneration. *Brain Res. Protoc.* 5(3), 223-230.

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

Hebel, R.; Stromberg, M.W., 1986. *Anatomy and Embriology of the Laboratory Rat.* BioMed Verlag, Nervous System 182-183.

Hoang, T. X.; Nieto, J. H.; Dobkin, B.H.; Tillakaratne, N. J.; Havton, L. A., 2006. Acute implantation of an avulsed lumbosacral ventral root in to the rat conus medullaris promotes neuroprotection and graft reinnervation by autonomic and motor neurons. *Neurosci.* 138: 1149-1160.

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

Hoke, A. 2006. Mechanisms of disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nat Clin Pract Neurol* 2(8): 448–454.

Ide, C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosc Res.* 1996; 25:101-121.

Ide C, Nakai Y, Nakano N, *et al.* Nakatani T, 2010. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat. *Brain research* 1332 ( 2010) 32–47.

Inalöz, S.S., Ak, H.E., Vayla, V., *et al.* 1997. Comparison of microsuturing to the use of tissue adhesives in anastomosing sciatic nerve cuts in rats. *Neurosurg Rev.*;20(4):250–8.

Isaacs, J.E., McDaniel, C.O., Owen, J.R. *et al.* 2008. Comparative analysis of biomechanical performance of available “nerve glues.” *J Hand Surg*;33(6):893–9.

Iuan, F. C. , Thomazini, I. A. *et al.* 1995. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom – Preliminary results. *Rev Paul Med* 113:1000-1002.

Jensen, C.J., Massie, A., De Keyser, J. 2013. Immune Players in the CNS: The Astrocyte. *J Neuroimmune Pharmacol.* 8(4):824-39.

Jessen, K. R.; Mirsky, R. 1999. Schwann cells their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends of Neurosc.*, v.22, n.9, p.402-410.

Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. 10ª Edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan. 2002.

Kalmar, B., Burnstock, G., Vrbova, G., Urbanics, R., Csermely, P. and Greensmith, L. 2002 Upregulation of heat shock proteins rescues motoneurons from axotomy-induced cell death in neonatal rats. *Exp Neurol* 176, pp. 87-97.

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

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

Kigerl, K.A., Gensel, J.C., Ankeny, D.P., Alexander, J.K., Donnelly, D.J., Popovich, P.G., 2009. Identification of Two Distinct Macrophage Subsets with Divergent Effects Causing either Neurotoxicity or Regeneration in the Injured Mouse Spinal Cord. *J Neurosci.* 29(43), 13435-13444.

Kim, B. J.; Kim, M.; Park, J.; Lee, S.; Kim, Y.; Ryu, S.; Kim Y. H.; Yoon, B. 2009. Reduced neurogenesis after suppressed inflammation by minocycline in transient cerebral ischemia in rat. *J Neurol Scienc*, 279:70-75.

Kishino, Y.; Ishige, T.; Tatsuno, C.; Nakayama, H.; Nogushi, 1997. BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth. *Exp Neurol*.144:273-286.

Kobayashi, N.R.; Fan, D.P.; Giehl, K.M.; Bedard, A.M.; Wiegand, S.J.; Tetzlaff, W., 1997. BDNF and NT4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and Talpha1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci*. 17: 9583-9595.

Koliatsos, V.E., Clatterbuck, R.E., Winslow, J.W., Cayouette, M.H., Price, D.L., 1993. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron* 10(3):359-67.

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

Koliatsos VE, Clatterbuck RE, Nauta HJ, Knüsel B, Burton LE, Hefti FF, Mobley WC, Price DL. 1991 Human nerve growth factor prevents degeneration of basal forebrain cholinergic neurons in primates. *Ann Neurol*. 30(6):831-40.

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

Krum, J.M., Mani, N., Rosenstein, J.M. 2002. Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain. *Neuroscience*.;110(4):589-604.

Kuno, M.; Llina´s, R.; 1970. Alterations of synaptic action in chromatolysed motoneurons of the cat. *J Physiol*. 210: 823–828.

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

Lang, E. M.; Asan, E.; Plesnila, N.; Hofmann, G.O.; Sendtner, M.; 2005. Motoneuron survival after C7 nerve root avulsion and replantation in the adult rabbit: effects of local ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor application. 115(7):2042-50.

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

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

Lee, K. C.; Park, S. K.; Lee, K. S., 1991. Neurosurgical application of fibrin tissue. Yon Med J. 32:53-57.

Ledeboer, A.; Breve, J. J.; Wierinckx, A.; Van der Jagt, S.; Bristow, A. F.; Leysen J. E. 2002. Expression and regulation of interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. Eur J Neurosci. 16(7):1175-85.

Lent, R.; 2008 A estrutura do sistema nervoso. In: Roberto Lent. (Org.). Neurociência da Mente e do Comportamento. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, v. 1, p. 19-42.

Levi, A.D.O.; Bunge M. 1994. Studies of myelin formation after transplantation of human Schwann cells in vitro the severe combined immunodeficient mouse. Exp.Neurol., 130:41-52.

Lewin, S. L., Uteley, D. S., Cheng, E. T., Verity, A. N., Terris, D. J. 1997. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances

rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope* 107: 992–999.

Li, Y.; Chen, J.; Chen, X.G.; Wang, L.; Gautam, S.C.; Xu, Y.X.; Katakowski, M.; Zhang, L.J.; Lu, M.; Janakiraman, N.; Chopp, M.; 2002. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 59: 514–23.

Li L, Houenou LJ, Wu W, Lei M, Prevette DM, Oppenheim RW. 1998. Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice. *J Comp Neurol.* 29;396(2):158-68.

Lindå, H.; Risling, M.; Cullheim, S. 1985 “Dendraxons” in regenerating motoneurons in the cat: do dendrites generate new axons after central axotomy? *Brain Res*; 358:329–333.

Lindå, A. H.; Piehl, F.; Dagerlind, A.; Verge, V.M.; Arvidsson, U.; Cullheim, S.; Risling, M.; Ulfhake, B.; Hökfelt, T.; 1992. Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons. *Exp Brain Res.* 91(2): 284-295.

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

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*, vol. 25, pp.402–408.

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

Loddick, S.A.; Turnbull, A.V.; Rothwell, N.J. 1998 Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:176 –179.

Lopes-Filho, J.D.; Caldas, H.C.; Santos, F.C.; Mazzer, N.; Simões, G.F.; *et al.* 2011. Microscopic evidences that bone marrow mononuclear cell treatment improves sciatic nerve regeneration after neurorrhaphy. *Microsc Res Tech.* 74:4, p355–363.

Lundborg, G. 1993. Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and strategies for treatment. *Journal of Hand Therapy*, v.6, n.3, p.179-188.

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

Mackaness, G.B. 1964. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J Exp Med* 120:105.

Madison, R. D.; Archibald, S. J. 1994. Point sources of Schwann cells result in growth into a nerve entubulation repair site in the absence of axons- Effects of freeze thawing. *Exp. Neurol.*, v.128, n.2, p.266-275.

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

Mahmood, A.; Lu, D.; Qu, C., Goussev, A., Chopp, M., 2006. Long-term recovery after bone marrow stromal cell treatment of traumatic brain injury in rats. *J Neurosurg.* 104:272-277.

Maragakis, N.; Rothstein, J. D. 2006 Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 12(2): 679-689.

Martin, L. J.; Kaiser A.; Price A. C. 1999. Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. *J.Neurobiol.* 40(2), 185-201.

Martins, R.S., Siqueira, M.G., Silva, C.F., *et al.* 2005. Electro-physiologic assessment of regeneration in rat sciatic nerve repair using suture, fibrin glue or a combination of both techniques. *Arq Neuropsiquiatr.* 63(3A):601–4.

Mathieu, M.; Bartunek, J. E.I.; Oumeiri, B.; Touihri, K.; Hadad, I.; Thoma, P.; Metens, T.; da Costa, A. M.; Mahmoudabady, M.; Egrise, D.; Blocklet, D.; Mazouz, N.; Naeije, R.; Heyndrickx, G.; McEntee, K., 2009. Cell therapy with autologous bone marrow mononuclear stem cells is associated with superior cardiac recovery compared with use of nonmodified mesenchymal stem cells in a canine model of chronic myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 138(3):646-653.

Matras, H. 1985. Fibrin Seal: the state of art. *J Oral Maxillofac Surg.* 43:605-611.

McKeon, R.J., Schreiber, R.C., Rudge, J.S., Silver, J. 1991. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* 11:3398-3411.

Mendell, L. M.; Munson, J. B; Arvanian, V. L. 2001 Neurotrophins and synaptic plasticity in the mammalian spinal cord. In *J Physiol*, vol. 533, pp. 91-7.

Menovsky, T., Beek, J.F. 2001 Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves: a comparative functional, histological, and morphometric study in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg*;95(4):694–9.

Meyer, M.; Matsuoka, I.; Wetmore, C.; Olsson, L.; Thoenen, H. 1992. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol.* 119: 45-54.

Middeldorp, J.; Hol, E.M.; 2011 GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 93(3):421-43.

Molander C, Grant G 1985. Cutaneous projections from the rat hindlimb foot to the substantia gelatinosa of the spinal cord studied by transganglionic transport of WGA-HRP conjugate. *J Comp Neurol* 237 (4): 476-484.

Monte-Raso, V.V.; Barbieri, C.H.; Mazzer, N. 2006. Índice funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. Avaliação de reprodutibilidade do método entre examinadores. *Acta OrtopBras* 14:133–136.

Mosser, D.M., Edwards, J.P. 2008. Exploring the full spectrum of macro-phage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958–969.

Nahas, L.; Denson, K. W. E.; Macfarlane, R. G., 1964. A study of the coagulant action of eight snake venoms. *Thromb Diath Haemorrh.* 12: 355.

Narakas, A. 1988. The use of fibrin glue in repair of peripheral nerves. *Orthop Clin North Am.*19(1):187–99.

Nimmerjahn, A. Kirchhoff, F. Helmchen, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314–1318.

Norton, W. T.; Aquino D. A.; Hozumi, I.; Chiu F.C.; Brosnan C. F., 1992. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res.* 17(9):877-885.

Norton, W. T.; 1999. Cell reactions following acute brain injury: a review. *Neurochem. Res.* 24(2): 213-218.

Novikov, L.; Novikova, L.; Kellerth, J. O., 1995. Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and blocks nitric oxide synthase expression in adult rat spinal motoneurons after ventral root avulsion. *Neurosci Lett.* 200: 45-48.

Okada, S.; Ishii, K., Yamane, J. *et al.*, 2005. vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *Te FASEB Journal express article* 10. 10-20.

Oliveira, A. L. R.; Langone, F., 2000. GM-1 ganglioside treatment reduces motoneuron death after ventral root avulsion in adult rats. *Neurosci Lett.* 293:131-134.



Oliveira, A.L.; Thams, S.; Lidman, O.; Piehl, F.; Hökfelt, T.; Kärre, K.; Linda, H.; Cullheim S., 2004. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc Natl Acad Sci.* 101(51): 17843-17848.

Oliet, S. H.; Piet, R.; Poulain, D. A. 2001 Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292: 923-926.

O'Shea, J.J., Murray, P.J. 2008. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28:477–487

Otani, N; Nawashiro, H.; Fukui, S.; Ooigawa, H.; Ohsumi, A.; Toyooka, T.; Shima, K.; Gomi, H.; Brenner, M.; 2006. Enhanced hippocampal neurodegeneration after traumatic or kainate excitotoxicity in GFAP-null mice. *J. Clin. Neurosci.* 13, 934–938.

Park, O. H.; Lee, K. J.; Rhyu, I. J.; Geum, D.; Kim, H.; Buss, R.; Oppenheim, R. W.; Sun, W. 2007. Bax-dependent and -independent death of motoneurons after facial nerve injury in adult mice. *Eur.J.Neuro-sci.*, 26(6), 1421-1432.

Perea, G.; Araque, A. 2002. Communication between astrocytes and neurons: a complex language *J Physiol.*; 47: 241-248.

Perea G, Navarrete M, Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32(8):421-31.

Pereira, P. C. M.; Barraviera, B., 1995. Evaluation of platelet number and function and fibrinogen level in patients bitten by snakes of the *Bothrops* genus. *Rev Soc Bras Med Trop.*28:, 13-18.

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

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-timeRT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, pp. 2002-2007.

Piehl, F.; Arvidsson, U.; Johnson, H.; Cullheim, S.; Dagerlind, A.; Ulfhake, B.; Cao, Y.; Elde, R.; Pettersson, R. F.; Terenius, L. 1993. Gap-3, aFGF, CCK and alpha- and beta-CGRP in rat spinal motoneurons subjected to axotomy and/or dorsal root severance. *Eur J Neurosci.* 5: 1327-1333.

Piehl, F., Cullheim, S., 1995. Expression of NMDA receptor mRNAs in rat motoneurons is down-regulated after axotomy. *Eur J Neurosci.* 7(10): 2101-2110

Piehl, F; Hammarberg, H.; Hokfelt, T.; Cullheim, S., 1998. Regulatory effects of trophic factors on expression and distribution of CGRP and GAP-43 in rat motoneurons. *J Neurosci Res.* 51:1-14.

Pintér, S.; Gloviczki, B.; Szabó, A.; Márton, G.; Nógrádi, A. 2010. Increased Survival and Reinnervation of Cervical Motoneurons by Riluzole after Avulsion of the C7 Ventral Root. *J Neurotrauma* 27(12):2273-82.

Privat, A., Valat, J., Fulcrand, J., 1981. Proliferation of neuroglial cell lines in the degenerating optic nerve of young rats. A radioautographic study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 40, 46-60.

Privat, A., 2003. Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals. *Glia.* 43(1): 91-93.

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

Pierucci, A., Duek, E.A.R., Olivera, A.L.R., 2008. Peripheral nerve regeneration through biodegradable conduits prepared using solvent evaporation. *Tissue Engineering*, 14(5):595-606.

Polits, M. J.; Ederle, K.; Spencer, P. S. 1992. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regeneration axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Research*, v.253, p.1-12.

Povlsen, B. 1994. A new fibrin seal in primary repair of peripheral nerves. J Hand Surg Br 19(1):43–7.

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

Raheja, A., Suri, V., Suri, A., Sarkar, C., Srivastava, A., Mohanty, S., Jain, K.G., Sharma, M.C. *et al.* 2012. Dose-dependent facilitation of peripheral nerve regeneration by bone marrow-derived mononuclear cells: a randomized controlled study: laboratory investigation. J Neurosurg. 117(6):1170-81.

Raivich, G.; Kreutzberg, G. W. 1987. Expression of growth factor receptors in injured nervous tissue: I. Axotomy leads to a shift in the cellular distribution of specific beta 92 nerve growth factor binding in the injured and regeneration PNS. J. Neurocytol., v.16, n.5, p.689-700.

Raw, I.; Rocha, M. C.; Esteves, M. I.; Kamiguti, A. S., 1986. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from *Crotalus durissus terrificus*. Braz J Med Biol Res. 19:333.

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

Rho, M. B.; Wesselingh, S.; Glass, J. D.; McArthur, J. C.; Choi, S.; Griffin, J.; 1995. A potential role for interferon-alpha in the pathogenesis of HIV-associated dementia. Brain Behav Immun. 9(4):366-377.

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

Risling, M.; Lindå, H.; Cullheim, S.; Fransson, P. 1989. A persistent defect in the blood-brain barrier after ventral funiculus lesion in adult cats – implication for CNS regeneration. Brain Res 494:13–21.

Risling, M.; Fried, K.; Linda, H.; Cullheim, S.; Deckner, M., 1992. Changes in nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in the spinal cord after ventral funiculus lesion in adult cats. *J Neurocytol.* 21: 70-93.

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

Rouach, N.; Giaume, C. 2001. Connexins and gap junctional communication in astrocytes are targets of neuroglial interaction. *Prog Brain Res.* 132: 203-214.

Rusakov, D. A.; Kullmann, D.M.; 1998. Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *J. Neurosci.* 18(9): 3158-3170.

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

Salazar D. L.; Uchida, N. Hamers, F. P. T.; Cummings. B. J.; Anderson, A. J. 2010. Human Neural Stem Cells Differentiate and Promote Locomotor Recovery in an Early Chronic Spinal cord Injury NOD-scid Mouse Model. *PLoS ONE* 5(8): e12272.

Sanders, P.; De Keyser, J. 2007 Faces of microglia in multiple sclerosis. *Brain Res Rev* 54:274-285.

Santello M, Calì C, Bezzi P. 2012. Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv Exp Med Biol.*;970:307-31.

Sanchez-Ramos, J., S. Song, C. Cao e G. Arendash. . 2008.The potential of hematopoietic growth factors for treatment of Alzheimer's disease: a mini-review. *BMC Neurosci*, v.9 Suppl 2, p.S3

Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med.*, vol. 84, pp.901-910.

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

Seddon, H.J. 1947. The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. *Br J Surg.* 35:151-67.

Sendtner, M., Arakawa, Y., Stockli, K. A., Kreutzberg, G. W. and Thoenen, H. 1991 Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. *J Cell Sci Suppl* vol. 15, pp. 103-9.

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

Shimazawa, M.; Tanaka, H.; Ito, Y.; Morimoto, N.; Tsuruma, K.; Kadokura, M.; Tamura, S.; Inoue, T.; Yamada, M.; Takahashi, H.; Warita, H.; Aoki, M.; Hara, H.; 2010 An inducer of VGF protects cells against ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD1 animal models of familial ALS. *PLoS One* 9;5(12):e15307.

Shrikant P.; Benveniste E.N. 1996. The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J Immunol.* 157(5):1819-22.

Sigurjonsson, O. E., M. C. Perreault, T. Egeland e J. C. Glover. 2005. Adult human hematopoietic stem cells produce neurons efficiently in the regenerating chicken embryo spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.102, n.14, 5, p.5227-32.

Sjögren, A. M.; Thelestam, M.; Blomqvist, L.; Lindå, H.; Remahl, S.; Risling, M. 1991 Extravasation of staphylococcal  $\alpha$ -toxin in normal and injured CNS regions lacking blood-brain barrier function: observations after ventral root replantation. *Brain Res* 559: 276–282.

Sofroniew, M.V., Vinters, H.V. 2010 Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7–35.

Son, Y.J.; Thompson, W. J. 1995. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron*, 14, p.125-132.

Spejo, A.B., Carvalho, J.L., Goes, A.M., Oliveira, A.L., 2013. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells on spinal motoneurons following ventral root axotomy: Synapse stability and axonal regeneration. *Neuroscience*. 10;250:715-32.

Smahel, J., Meyer, V.E., Bachem, U. 1987. Glueing of peripheral nerves with fibrin: experimental studies. *J Reconstr Microsurg* 3:211-20.

Smith, R.S., Koles, Z.J. 1970. Myelinated nerve fibers – computed effect of myelin thickness on conduction velocity. *Am J Physiol.*, 219: 1256-1260.

Schneider, A; Kuger, C; Steigleder, T; Weber, D; Pitzer, C; Laage, R; Aronowski, J; Maurer, MH; Gassler, N; Mier, W; Hasselblatt, M; Kollmar, R; Schwab, S; Sommer, C; Bach, A; Kuhn, HG; Schabitz, WR. 2005. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J. Clin. Invest.*115:2083-2098.

Sykova, E.; Chvatal, A., 2000. Glial cells and volume transmission in the CNS. *Neurochem Int.* 36:397-409.

Sykova, E.; Jendelova, P.; Urdziková, L.; Lesny, P.; Hejcl, A., 2006. Bone marrow stem cell and polymer hydrogels- two strategies for spinal cord injury repair. *Cell Mol Neurobiol.* 26: 1113-1129.

Su, H.; Zhang, W.; Guo, J.; Guo, A.; Yuan, Q.; Wu, W. 2009. Neural progenitor cells enhance the survival and axonal regeneration of injured motoneurons after transplantation into the avulsed ventral horn of adult rats. *J Neurotrauma.* 26(1):67-80.

Suzuki, M.; McHugh, J.; Tork, C.; Shelley, B.; Klein, S.M.; *et al.* 2007. GDNF Secreting Human Neural Progenitor Cells Protect Dying Motor Neurons, but Not Their Projection to Muscle, in a Rat Model of Familial ALS. *PLoS ONE* 2(8): e689.

Tse, R., Ko, J.H., 2012 Nerve glue for upper extremity reconstruction. *Hand Clin.* Nov;28(4):529-40.

Taniuchi, M.; Clark, H. B.; Johnson, J. R., E. M. 1986. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.83, p.4094-4098.

Takata, M.; Nagahama, T., 1983. Synaptic efficacy of inhibitory synapses in hypoglossal motoneurons after transection of the hypoglossal nerves. *Neuros.* 10: 23–29.

Thatte MR, Babhulkar S, Hiremath A. 2013. Brachial plexus injury in adults: Diagnosis and surgical treatment strategies. *Ann Indian Acad Neurol.* 16(1):26-33.

Thomazini, I. A.; Iuan, F. C.; Carvalho, I.; Hernandez, D.; Amaral, I. F.; Pereira, P. C. M.; Barraviera, B., 1991. Evaluation of platelet function and serum fibrinogen levels in patients bitten by snakes of the genus *Crotalus*. *Rev Inst Med Trop. São Paulo*,33: 51-52.

Thomazini-Santos, I. A. 2001. Fibrin adhesive from snake venom: the effect of adding epsilon-aminocaproic acid, tranexamic acid and apronitinin for coaptation of wound in rat skin incisions. *J Venoms Anim Toxins.* 7:148-149.

Toy, D., Namgung, U. 2013. Role of glial cells in axonal regeneration. *Exp Neurobiol.* 22(2):68-76.

Tona, A.; Perides, G.; Rahemtulla, F. *et al.* 1993. Extracellular Matrix in regeneration rat sciatic nerve. A comparative study on the localization of laminin, hialuronic acid, and chondroitin sulfate proteoglycans, including versican. *J. Histochemcytochem.*, 41:593-599.

Toulmond, S.; Vige, X.; Fage, D.; Benavides, J. 1992 Local infusion of interleukin-6 attenuates the neurotoxic effects of NMDA on rat striatal cholinergic neurons. *Neurosci Lett* 144:49 –52.

Yao, L., Chen X, Tian Y, Lu H, Zhang P, Shi Q, Zhang J, Liu Y. 1012. 2 Selection of housekeeping genes for normalization of RT-PCR in hypoxic neural stem cells of rat in vitro. Mol Biol Rep. 39(1):569-76

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

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

Yoshihara, T.; Ohta, M.; Itokazu, Y.; Matsumoto, N.; Dezawa, M.; Suzuki, Y.; Taguchi, A.; Watanabe, Y.; *et al.* 2001. Neuroprotective effect of bone marrow-derived mononuclear cells promoting functional recovery from spinal cord injury. J Neurotrauma. 24(6):1026-36.

Yoshii S, Yamamuro T, Ito S, Hayashi M. 1987. In vivo guidance of regenerating nerve by laminin-coated filaments. Exp. Neurol. 95: 469-473.

Young, J. Z., and Medawar, P. B. 1940. Fibrin suture of peripheral nerves. Lancet. 2:126-128.

Vandenbranden, C. A.; Verweij, J.; Kamermans, M.; Müller, L. J.; Ruijter, J. M.; Vrensen, G. F.; Spekrijse, H.; 1996. Clearance of neurotransmitter from the cone synaptic cleft in goldfish retina. Vision Res. 36(24): 3859-3874.

Varejão, A.S.; Meek, M.F.; Ferreira, A.J.; Patrício, J.A.; Cabrita, A.M.. 2001. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. J Neurosci Methods 15;108(1):1-9.

Vejsada, R.; Sagot, Y.; Kato, A. C.; 1995. Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo. Eur.J. Neurosci. 7: 108



Verkhatsky, A.; Steinhäuser, C.; 2000. Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev.* 32(2-3): 380-412.

Vicente, E. J. D., Rodrigues, A. C., Vicente, P. C., Mármora, C. H. C., *et al.* 2007. Regeneração do nervo periférico por meio de coaptação com cola de fibrina. *H U Rev.* 33:53-56.

Viterbo, F.; Thomazini, I. A.; Gianinni, M. J. S. M., 1993. Reparação de nervos periféricos com cola de fibrina derivada de veneno de cobra. Resultados Preliminares. *Acta Cirurg Bras.*,2 (supl.): 85.

Wang, D. D.; Bordey, A. 2008 The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86(4): 342–367.

Watabe, K.; Hayashi, Y.; Kawazoe, Y. 2005. Peripheral nerve avulsion injuries as experimental models for adult motoneuron degeneration. *Neuropathology.* 25(4), 371-380.

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

Wendell-Smith, C. P.; Blunt, M. J.; Baldwin, F. 1966 The ultrastructural characterization of macroglial cell types. *J Comp Neurol.*; 127(2): 219-240.

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

Wright, K. T., W. El Masri, A. Osman, J. Chowdhury e W. E. Johnson. 2011. Concise review: Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications. *Stem Cells*, v.29, n.2, p.169-78.

Wu, V. W.; Schwartz, J. P. 1998 Cell culture models for reactive gliosis: new perspectives. *J Neurosci Res* 51(6):675-81.

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

Zaverucha-do-Valle, C., Gubert, F., Bargas-Rega, M., Coronel, J.L. *et al.*. 2011. Bone marrow mononuclear cells increase retinal ganglion cell survival and axon regeneration in the adult rat. Cell Transplant.;20(3):391-406.

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

Zhang ZH, Wang RZ, Li GL, Wei JJ, Li ZJ, Feng M, Kang J, Du WC, Ma WB, Li YN, Yang Y, Kong YG 2008. Transplantation of neural stem cells modified by human neurotrophin-3 promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in rats. Neurosci Lett 444 (3): 227-230.

Zhang, S. Huang, F.; Gates, M.; White, J.; Holmberg, E. G. 2011 Histological repair of damaged spinal cord tissue from chronic contusion injury of rat: A LM observation Histol Histopathol 26: 45-58

Zochodne, D. W. 2000. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. Muscle & Nerve. Supplement 9, p.S33-S38.