



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

BRUNO HENRIQUE DE MELO LIMA

MHC-I E PirB NA PLASTICIDADE SINÁPTICA MEDULAR EM  
CAMUNDONGOS COM DIFERENTES RESPOSTAS  
REGENERATIVAS APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

ROLE OF MHC-I AND PirB FOR SPINAL CORD SYNAPTIC  
PLASTICITY IN MICE WITH DIFFERENT REGENERATIVE  
RESPONSES AFTER PERIPHERAL NERVOUS INJURY

CAMPINAS  
2019

**BRUNO HENRIQUE DE MELO LIMA**

**MHC-I E PirB NA PLASTICIDADE SINÁPTICA MEDULAR EM  
CAMUNDONGOS COM DIFERENTES RESPOSTAS  
REGENERATIVAS APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

**ROLE OF MHC-I AND PirB FOR SPINAL CORD SYNAPTIC  
PLASTICITY IN MICE WITH DIFFERENT REGENERATIVE  
RESPONSES AFTER PERIPHERAL NERVOUS INJURY**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Celular e Estrutural  
com área de concentração em Anatomia.*

*Dissertation presented to the Institute of  
Biology of the University of Campinas in  
partial fulfillment of the requirements for the  
degree of Master in Cellular and Structural  
Biology with concentration area in  
Anatomy.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL  
CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO  
BRUNO HENRIQUE DE MELO LIMA E  
ORIENTADA PELO PROF. DR. ANDRÉ LUIS  
BOMBEIRO.

*Orientador: PROF. DR. ANDRÉ LUIS BOMBEIRO*

*Co-Orientador: PROF. DR. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA*

**CAMPINAS  
2019**

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

L628m Lima, Bruno Henrique de Melo, 1993-  
MHC-I e PirB na plasticidade sináptica medular em camundongos com diferentes respostas regenerativas após lesão nervosa periférica / Bruno Henrique de Melo Lima. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

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

1. Neurociências. 2. Plasticidade neuronal. 3. Neuroimunologia. I. Bombeiro, André Luis. II. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de, 1971-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Role of MFC-I and PirB in the spinal cord synaptic plasticity in mice with different regenerative responses after peripheral nervous injury

**Palavras-chave em inglês:**

Neurosciences  
Neuronal plasticity  
Neuroimmunology

**Área de concentração:** Anatomia

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

**Banca examinadora:**

André Luis Bombeiro [Orientador]  
Catarina Rapôso Dias Carneiro  
Michele Schultz Ramos

**Data de defesa:** 17-04-2019

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

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-1232-2694>  
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1269053229341650>

Campinas, 17/04/2019

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof.(a) Dr.(a). André Luis Bombeiro

Prof.(a). Dr.(a) Catarina Rapôso Dias Carneiro

Prof.(a) Dr(a). Michele Schultz Ramos

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

***“Mas o destino inexorável deu-lhe o poder e a grandeza de servir a humanidade que por ele passou indiferente.”***

Oração ao Cadáver Desconhecido  
Karl Rokitansky (1876)

**AO VOVÔ JOÃO.**

## **AGRADECIMENTOS**

Inicio esses agradecimentos me desculpando com aqueles que talvez não sejam aqui mencionados. Com toda certeza, todos aqueles que passaram por mim tiveram, de alguma forma, contribuição na minha formação profissional e social. Não aparecer em folhas como esta, com certeza, não desqualifica sua importância na minha existência. Ainda, irei dispor aqui os agradecimentos em ordem temporal, pois é assim que eles estão armazenados em minha memória. Todos têm a mesma importância.

Posto isso, gostaria, primeiramente, de agradecer ao meu Avô João, que já não divide sua presença conosco nessa existência terrena. Este foi, até seus últimos dias, um homem de bom coração. A valia pela justiça, a facilidade em transmitir afeto e o valor na educado, são atributos vindouros dele. Talvez por ser muito novo, na época, não havia por mim, entendimento na importância dessas qualidades, e meu avô, sem nunca se cansar e com toda paciência do mundo, fazia o possível para despertar essa consciência em todos os seus netos. Obrigado, meu avô, sem você, nada seria como é.

Aproveito para agradecer a minha avó Nadege. Lembro-me, como se fosse ontem, dos meses que passei estudando para o vestibular em sua casa. Volta e meia, essa brava senhora ia ao meu quarto, levava-me comida, conversava sobre coisas mundanas para me distrair ou me aconselhava a descansar um pouco junto a ela no quintal. Diferente de mim, Dona Nadege não teve o privilégio de poder estudar quando mais nova, mesmo assim, nunca desistiu do seu sonho e alfabetizou-se na terceira idade. Palavras não fazem jus ao quão inspiradora essa mulher é.

Gostaria de agradecer, também, a minha mãe, Cristiane. Pernambucana e mãe solteira de três filhos. Sempre lutou contra as adversidades da vida, que não foram poucas, afim de manter seus filhos na escola. Tomou as rédeas da sua vida e proveu comida e teto àqueles que não sozinha tinha obrigação de cuidar. Mesmo assim, não recuou diante das dificuldades. Todas as desventuras da minha vida ficam pequenas quando me lembro dos problemas que essa mulher teve que resolver. Obrigado por me mostrar o que é ser forte.

Ainda sobre mulheres fortes, gostaria de agradecer a minha irmã, Regiane. Mais do que uma irmã, ela é minha amiga, confidente e psicóloga. Essa mulher, ainda quando criança, assumiu a responsabilidade de ajudar a criar outras duas. Sem dúvidas, enquanto outras meninas da mesma idade se divertindo, minha irmã cozinhava para os irmãos, trabalhava, estudava e nos dava amor. Você sem dúvidas, minha irmã, merece o mundo e um pouco mais. Não sei explicar por qual motivo fui digno de ter-lhe em minha vida, mas gostaria que soubesse que agradeço todos os dias por isso. Espero poder, o quanto antes, retribuir-lhe tudo que fez/faz por mim.

Agradeço também ao meu irmão, Brian, que apesar de todas as dificuldades que encontra em si, quando a noite íamos dormir, rezávamos juntos e filosofávamos sobre o quão inexorável é a vida, contudo, sempre chegávamos a conclusão do quão privilegiados somos por vivermos. Sigo acreditando nisso.

Agradeço a minha Tia Gê por me ensinar a ser amoroso e bom, sem nunca esperar nada em troca. Ainda hoje, consigo ouvi-la em meus pensamentos dizer: “Seja uma pessoa do bem”. Baseio minha vida nessa frase, minha Tia. Você é um ser de luz, e certamente iluminou minha vida. Agradeço também ao Flávio, e aos meus primos, Daniel, André, Flávia e Marcelo. Minhas férias com vocês são lembranças que guardo com muito amor.

A cidade de Goiânia também teve sua contribuição na minha vida, em especial o tempo do meu ensino médio vivido no Instituto Federal de Goiás. Essa instituição me deu novos irmãos: Tarciso, Laura e Gabriela. Eu sou o maior torcedor da vitória de vocês, e sei que vocês emanam só o melhor para mim. Obrigado por cuidarem desse aquariano, por me acolherem e por me fazerem, pela primeira vez, sentir que fazia parte de algum lugar. Vocês me ensinaram o significado de pertencer. Quando me aventurei pelo estado de São Paulo, para estudar na UFSCar, mal sabia o quanto aprenderia. Gostaria de agradecer ao Samuel (Barba), pessoa essa que me recebeu na moradia da UFSCar e que se tornou um grande amigo. Sem dúvidas, umas das pessoas mais inteligentes que já conheci. Conversar com você sempre era uma aula para mim. Acho que nunca tive a oportunidade de lhe dizer isso. Obrigado.

Gostaria de agradecer a minha turma de Fisioterapia (013) da UFSCar. Somos parte de um mesmo livro, e eu não poderia ter mais orgulho. Em especial, gostaria de agradecer a Isabela Rossetto, que acalentou meu coração e ressignificou para mim o conceito de estudar e ensinar. Obrigado por estar comigo na graduação, no estágio, no mestrado e agora no doutorado. Você sempre será meu porto seguro. Ainda, obrigado ao Victor Mattiuzzo por ser alguém tão próximo e uma das pessoas com maior aptidão para anatomia que já conheci; sentimos sua falta todos os dias.

Sobre Professores, existem vários, mas sem dúvidas, as minhas maiores inspirações se chamam Maíra Stefanini e Salete Viotto. Sempre que vou explicar algo sobre anatomia, lembro-me do brilho no olhar de ambas enquanto ensinavam. Vocês transpassaram o significado de ensinar/educador. O Laboratório de Anatomia da UFSCar tem um perfil tão acolhedor por conta de vocês. Eu sou um filho de vocês, e tudo que eu fizer nessa área será para trazer-lhes orgulho. Obrigado por me incentivarem, por acreditarem em mim, mesmo em momentos que eu mesmo duvidava. Ficar longe de vocês é uma das partes mais difíceis de seguir o sonho de ser um grande anatomista. Não menos importante, agradeço ao Luiz Takase, nossas conversas e suas camisas de super-heróis são memoráveis.

Finalmente na UNICAMP, gostaria de agradecer ao meu orientador, André Bombeiro, imunologista mais apaixonado pela área que já conheci, pessoa essa que teve a paciência de me ensinar desde o que era uma pipeta até análise minuciosa de resultados obtidos. Mais do que isso, obrigado por confiar no meu trabalho, na minha índole e no meu conhecimento. Obrigado por me ensinar e por me dar voz. Nunca se esqueça que sempre poderá contar comigo. Serei o seu primeiro orientando de pós-graduação e farei jus a essa posição.

Ainda, agradeço ao meu coorientador Alexandre Oliveira, por abrir as portas do Laboratório de Regeneração Nervosa a mim. Tudo que foi feito aqui só foi possível por conta das ferramentas providas por ele. Um grande exemplo de pesquisador e administrador. Além de tudo, divide o grande apreço pelo estudo do sistema nervoso, que é, nas palavras de Blumenfeld, “provavelmente, o mais bonito, elegante e, complexo sistema do corpo”. Espero continuar fazendo valer o investimento feito em meu trabalho.

Também gostaria de agradecer a Luciana Cartarozzi, por me ajudar a ser resiliente diante das falhas; ao Alex Dias, pela convivência e por dividir as experiências de vida; Matheus Perez pelo respeito profissional; Nahanna Carvalho, Gabriela Chiarotto, Pedro Augusto e todos aqueles que fazem parte (ou já fizeram) do time do Laboratório de Regeneração Nervosa. Não poderia deixar de fora, também, Marcos Maciel, Catharina Nucci e Paula A. Saenz, seres humanos que tornam meu dia melhor só em vê-los.

Ainda, gostaria de agradecer aos técnicos da Anatomia: Walter Ferreira, por toda solicitude e respeito que demonstra pelas peças anatômicas; Roberto, por sempre ser alguém com quem se pode contar; e ao Sr. Paulo, pela serenidade e humildade que transmite.

Agradeço a Professora Valéria Quitete e Elaine Minatel pela oportunidade de dividir meu conhecimento com a graduação da UNICAMP, e por me mostrarem o dia-a-dia e as responsabilidades de um professor de anatomia.

Agradeço ao Laboratório de Genética Molecular, chefiado pela Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes, por tornarem possível a microdissecção a laser, realizada neste trabalho.

Também agradeço as meninas do Restaurante Universitário (RU) da UNICAMP, em especial a Letícia Campos, Graça Cardoso, Ana Paula de Oliveira e Josiane. Sem vocês, todos os dias, alimentando essa humilde alma, nada seria possível. Vocês tonam esse agradecimento pequeno diante do serviço que prestam. Minha eterna gratidão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 169675/2017-3), órgão de fomento que possibilitou a minha dedicação exclusiva ao trabalho aqui apresentado.

## RESUMO

Lesões no Sistema Nervoso causam rearranjo sináptico às redes neurais afetadas, com as células da glia atuando diretamente nesse processo. Dadas as diferenças interindividuais, o potencial neuroregenerativo varia entre pacientes, sendo possivelmente influenciado por aspectos intrínsecos do sistema nervoso. Similarmente, em modelos animais, o potencial regenerativo também varia de acordo com a linhagem em estudo. Nesse sentido, camundongos C57BL/6J apresentam maior dificuldade em recuperar danos axonais, comparativamente à linhagem A/J. Tal atraso no processo de regeneração está relacionado à plasticidade sináptica central e ao microambiente periférico, envolvendo diferentes moléculas, como as do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), que atuam na manutenção de sinapses inibitórias e, possivelmente, um de seus ligantes, o receptor pareado semelhante à imunoglobulina B (PirB). Tendo isso em vista, avaliamos, temporalmente, a reatividade glial e a expressão de MHC-I e PirB na medula espinal de camundongos C57BL/6J e A/J após o esmagamento do nervo isquiático, bem como a expressão gênica de componentes da cascata de sinalização intracelular de PirB em motoneurônios, no momento de maior retração sináptica. Por meio de análises histológicas, constatamos que ambas as linhagens apresentam maior retração sináptica ao sétimo dia após lesão, mesmo período em que houve maior expressão de MHC-I e Iba-1 (marcador de microglia). Na linhagem A/J houve aumento na expressão de GFAP (marcador de astrócitos) no quinto dia após lesão, concomitantemente à maior expressão de PirB, ao passo que nos animais C57BL/6J a expressão de GFAP não se alterou significativamente ao longo do tempo, havendo maior expressão de PirB no terceiro dia após a lesão. A análise da expressão gênica por qRT-PCR em motoneurônios microdissecados revelou que, aos sete dias após a lesão, houve aumento na expressão de *crmp2*, *cofilina* e *shp2* nos animais C57BL/6J e queda de *trkb* nos camundongos A/J. Na análise sensório-motora não observamos diferença no reestabelecimento da marcha entre as linhagens, tampouco no limiar nociceptivo, com exceção do 21º dia após a lesão, quando os animais A/J apresentaram um pico de hiperalgesia. Em conjunto, nossos dados reforçam a participação do MHC-I na plasticidade sináptica e sugerem que PirB esteja atuando no processo de astrogliose.

Palavras-chave: Neurociências. Plasticidade Neuronal. Neuroimunologia.

## ABSTRACT

Lesions to the Nervous System cause synaptic rearrangement related to the affected neural networks, where glial cells are directly involved in this process. Because of the interindividual differences, neuroregenerative potential changes among patients, possibly being influenced by intrinsic aspects of the nervous system. Similarly, in animal models the regenerative potential also varies according to the strains. It is known that C57BL/6J mice present greater difficulty in recovering axonal damages, compared to the A/J strain. Such a delay in the regeneration process is related to central synaptic plasticity and the peripheral microenvironment, involving different molecules, such as those of the major histocompatibility complex class I (MHC-I), which act on the maintenance of inhibitory synapses, and possibly one of its ligands, the paired immunoglobulin-like receptor B (PirB). Based on that, we evaluated the glial reactivity and the expression of MHC-I and PirB in the spinal cord of C57BL/6J and A/J mice following sciatic nerve crushing at different time points, as well the gene expression of components of the intracellular signaling pathway of PirB in motorneurons of both strains, during the period of greatest synaptic retraction. By histological analysis, we observed in both strains higher synaptic retraction on the seventh day after injury, concurrent with a greater expression of MHC-I and Iba-1 (microglial marker). In the A/J strain there was an increase in the expression of GFAP (astrocyte marker) on the fifth day after injury, concomitantly with higher expression of PirB, whereas in the C57BL/6J animals GFAP expression did not change significantly over time, with higher expression of PirB on the third day after injury. Analysis of the gene expression by qRT-PCR in microdissected motorneurons revealed that at seven days post-injury there was an increase in the expression of *crmp2*, *cofilin*, and *shp2* in C57BL/6J animals and a decrease in *trkb* expression in A/J mice. In the sensory-motor analysis, there was no difference in the reestablishment of gait or nociceptive threshold between the strains, except for the 21st day after injury, when A/J animals presented a peak of hyperalgesia. Together, our data reinforce the participation of MHC-I in synaptic plasticity and suggest that PirB is acting in the process of astrogliosis.

Keywords: Neurosciences. Neuronal Plasticity. Neuroimmunology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.** ORGANOGRAMA DO SISTEMA NERVOSO E SUAS SUBDIVISÕES.....22
- FIGURA 2.** REPRESENTAÇÃO DE UM NEURÔNIO GENÉRICO E SUAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS. É POSSÍVEL OBSERVAR A ARBORIZAÇÃO DENDRÍTICA ESPESSANDO À MEDIDA QUE SE APROXIMA DO CORPO CELULAR. ....24
- FIGURA 3.** BEER CLAMP. **A)** FERRAMENTA PARA ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO COM MOLA MÉDIA E UM ANEL. **B)** USO DA FERRAMENTA PARA ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO EM CAMUNDONGOS. ....43
- FIGURA 4.** SISTEMA "CATWALK" (WALKING TRACK TEST). **A)** IMAGEM DA PLATAFORMA DE CAMINHADA COM A PARTE SUPERIOR ABERTA. **B)** EQUIPAMENTO LIGADO, VISTA ANTERIOR. **C)** IMAGEM DA PLATAFORMA DE CAMINHADA COM A PARTE SUPERIOR FECHADA. **D)** EQUIPAMENTO LIGADO, VISTA LATERAL. **E)** CÂMERA LOCALIZADA NA REGIÃO INFERIOR DA PLATAFORMA, PARA CAPTURA DAS CAMINHADAS. **F)** VISÃO INFERIOR DA PLATAFORMA COM UM ANIMAL. **G)** IMAGEM DO ANIMAL CAMINHANDO SOBRE A PLATAFORMA VISTA PELO SOFTWARE. ....45
- FIGURA 5.** PLANO DE CORTE E DISPOSIÇÃO DO MATERIAL NA LÂMINA. ESQUEMA DO PLANO DE CORTE UTILIZADO PARA COLETA DAS AMOSTRAS DAS REGIÕES L4, L5 E L6 DA INTUMESCÊNCIA LOMBAR, DOS ANIMAIS C57BL/6J E A/J.....48
- FIGURA 6.** IMAGEM ILUSTRATIVA DA QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO ANTI-SINAPTOFISINA. ANALISOU-SE, EM IMAGENS COM AUMENTO DE 40X, OITO PONTOS EQUIDISTANTES AO REDOR DO CORPO DE MOTONEURÔNIOS DA COLUNA ANTERIOR DA MEDULA ESPINAL...50
- FIGURA 7.** COMPARAÇÃO DA COBERTURA SINÁPTICA, ATRAVÉS DA IMUNOMARCAÇÃO DE SINAPTOFISINA, NAS LINHAGENS C57BL/6J E A/J, AO LONGO DO TEMPO. **(A)** IMAGENS REPRESENTATIVAS DA COBERTURA SINÁPTICA NA MEDULA ESPINAL. OBSERVA-SE UMA DIMINUIÇÃO PROGRESSIVA DA COBERTURA SINÁPTICA, ATÉ O SÉTIMO DIA APÓS A LESÃO (7 DAL), COM RECUPERAÇÃO AO 28º DAL, EM AMBAS AS LINHAGENS. É POSSÍVEL OBSERVAR COM MAIOR DETALHAMENTO ESSAS DIFERENÇAS TANTO NOS CAMUNDONGOS C57BL/6J **(B)** QUANTO NOS A/J **(C)**. NÃO SE OBSERVOU DIFERENÇA ENTRE AS LINHAGENS **(D)**. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; \*\*\*\*P<0,0001. ....55
- FIGURA 8.** EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE MHC-I NAS LINHAGENS C57BL/6J E A/J, AO LONGO DO TEMPO. **(A)** IMAGENS REPRESENTATIVAS DA IMUNOMARCAÇÃO DE MHC-I NA MEDULA ESPINAL. OBSERVA-SE DIFERENÇA NA EXPRESSÃO DE MHC-I AO LONGO DO TEMPO, EM QUE A LINHAGEM C57BL/6J **(B)** APRESENTA UM AUMENTO PROGRESSIVO,

COM PICO NO 7 DAL, AO PASSO QUE A LINHAGEM A/J (C) APRESENTA UM AUMENTO SÚBITO NA MARCAÇÃO NO 7 DAL. AS LINHAGENS SÓ APRESENTAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $P < 0,05$ ) NO 5 DAL (D). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

.....57

**FIGURA 9.** REATIVIDADE MICROGLIAL NAS LINHAGENS C57BL/6J E A/J, APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA. (A) IMAGENS REPRESENTATIVAS DA IMUNOMARCAÇÃO DE IBA-1 NA MEDULA ESPINAL. AS SETAS INDICAM CÉLULAS HIPERTRÓFICAS. A LINHAGEM C57BL6J (B) APRESENTA AUMENTO PROGRESSIVO NA EXPRESSÃO DE IBA-1, ATINGINDO O PICO DE IMUNOMARCAÇÃO NO DIA 7 APÓS A LESÃO. A LINHAGEM A/J (C) TAMBÉM APRESENTA AUMENTO GRADUAL DA REATIVIDADE MICROGLIAL, COM PICO NO DIA 7., MESMO DIA EM QUE SE DIFERE DA LINHAGEM C57BL/6J (D). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .....59

**FIGURA 10.** COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE ASTROGLIAL NAS LINHAGENS C57BL/6J E A/J APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA. (A) IMAGENS REPRESENTATIVAS DA IMUNOMARCAÇÃO DE GFAP NA MEDULA ESPINAL. OBSERVAM-SE VARIAÇÕES NA EXPRESSÃO DE GFAP AO LONGO DO TEMPO EM AMBAS AS LINHAGENS, CONTUDO, NA LINHAGEM C57BL/6J ESSA VARIAÇÃO NÃO É SIGNIFICATIVA. (B) A LINHAGEM A/J APRESENTA PICO DE ASTROGLOSE NO QUINTO DIA APÓS A LESÃO, MESMO DIA EM QUE SE DIFERENCIA DO GRUPO C57BL/6 J PELO AUMENTO DA IMUNOMARCAÇÃO (C). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ . .....61

**FIGURA 11.** EXPRESSÃO DE PIRB NAS LINHAGENS C57BL/6J E A/J, APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA. (A) IMAGENS REPRESENTATIVAS DA IMUNOMARCAÇÃO DE PIRB NA MEDULA ESPINAL. AS PONTAS DE SETAS E SETAS INDICAM CORPOS DE NEURÔNIOS NÃO MARCADOS E MARCADOS, RESPECTIVAMENTE. A LINHAGEM C57BL6J (B) APRESENTOU PICO DE EXPRESSÃO DE PIRB NO TERCEIRO DIA APÓS A LESÃO, ENQUANTO QUE OS ANIMAIS A/J (C) ALCANÇAM O PICO NO QUINTO DIA APÓS LESÃO. (D) AS LINHAGENS APRESENTAM DIFERENÇA ENTRE SI NO PRIMEIRO, TERCEIRO E QUINTO DIA APÓS A LESÃO. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .....63

**FIGURA 12.** EXPRESSÃO RELATIVA DE BETA-2 MICROGLOBULINA (*B2M*) E DOS GENES ENVOLVIDOS NA CASCATA DE SINALIZAÇÃO DE PIRB (*TRKB*, *COFILINA*, *CRMP2* E *SHP2*) EM MOTONEURÔNIOS DA MEDULA ESPINAL. NO DIA 7 APÓS A LESÃO (7 DAL), NÃO OBSERVAMOS DIFERENÇA NA EXPRESSÃO DE *B2M* ENTRE AS LINHAGENS (A), CONTUDO, CONSTATAMOS MAIOR EXPRESSÃO DE *CRMP2* (C), *COFILINA* (D), *SHP2* (E) E *TRKB* (F)

NOS ANIMAIS C57BL/6J EM COMPARAÇÃO AOS A/J. AINDA, A EXPRESSÃO DESSES GENES NÃO SE ALTEROU ENTRE OS ANIMAIS A/J (B-F), AO PASSO QUE NOS CAMUNDONGOS C57BL/6J, A LESÃO ESTIMULOU A EXPRESSÃO DE *CRMP2* (C), *COFILINA* (D) E *SHP2* (E). DAL = DIAS APÓS LESÃO/ CN = CONTROLE NEGATIVO. \*P<0,05; \*\*P<0,01. ....65

**FIGURA 13.** RECUPERAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA. ÍNDICE FUNCIONAL DO ISQUIÁTICO, AO LONGO DO TEMPO, DAS LINHAGENS (A) C57BL/6J E (B) A/J.  $\phi = P<0,001$ ;  $\lambda = P<0,01$ ; \* =  $P<0,05$  EM RELAÇÃO AO CONTROLE NEGATIVO (CN). (C) CAPTURA DAS PEGADAS DA LINHAGEM C57BL/6J, REALIZADA PELO SISTEMA CATWALK, EM DIFERENTES DIAS. AS SETAS BRANCAS APONTAM PARA A PATA POSTERIOR ESQUERDA (LH), QUE ESTÁ AUSENTE NO 3º DIA APÓS A LESÃO (DAL). RF, RIGHT FRONT (PATA ANTERIOR DIREITA); RH, RIGHT HIND (PATA POSTERIOR DIREITA); LF (PATA ANTERIOR ESQUERDA). ....67

**FIGURA 14.** INTENSIDADE MÁXIMA DE PRESSÃO NA FASE DE APOIO. MÉDIA DA INTENSIDADE MÁXIMA DE PRESSÃO AO LONGO DO TEMPO, DOS ANIMAIS DA LINHAGEM (A) C57BL/6J, (B) A/J OU (C) AMBAS.  $\gamma$ ,  $P<0,0001$ ;  $\phi$ ,  $P<0,001$ ;  $\lambda$ ,  $P<0,01$  EM COMPARAÇÃO AO BASAL (ANOVA DE UMA VIA, SEGUIDA DO PÓS-TESTE DE BONFERRONI). ....69

**FIGURA 15.** INTENSIDADE MÁXIMA DE PRESSÃO NA FASE DE APOIO. MÉDIA DA INTENSIDADE MÁXIMA DE PRESSÃO NA FASE DE APOIO AO LONGO DO TEMPO, DOS ANIMAIS DA LINHAGEM (A) C57BL/6J, (B) A/J OU (C) AMBAS.  $\gamma$ ,  $P<0,0001$ ;  $\phi$ ,  $P<0,001$ ;  $\lambda$ ,  $P<0,01$ ; \*,  $P<0,05$  EM COMPARAÇÃO AO BASAL (ANOVA DE UMA VIA, SEGUIDA DO PÓS-TESTE DE BONFERRONI). ....71

**FIGURA 16.** TESTE DE VON FREY PARA O LIMIAR NOCICEPTIVO. MÉDIA DO PESO DE RETIRADA (G) DEPOIS DA CIRURGIA SUBTRAÍDO DO VALOR PRÉ-CIRURGICO, DOS ANIMAIS DA LINHAGEM (A) C57BL/6J, (B) A/J OU (C) AMBAS.  $\phi$ ,  $P<0,001$ ;  $\lambda$ ,  $P<0,01$  EM COMPARAÇÃO AO BASAL (ANOVA DE UMA VIA, SEGUIDA DO PÓS-TESTE DE BONFERRONI). \*,  $P<0,05$ , C57BL/6 J vs A/J (ANOVA DE DUAS VIAS, SEGUIDA DO PÓS-TESTE DE BONFERRONI). ....73

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> ANTICORPOS UTILIZADOS NAS IMUNOMARCAÇÕES .....	49
<b>TABELA 2.</b> RELAÇÃO DE ENSAIOS TAQMAN ( <i>LIFE TECHNOLOGIES</i> ) UTILIZADOS NA QRT-PCR .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\beta$ 2m	Beta 2 Microglobulina
CN	Controle Negativo
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
ITAM	Sequência de Ativação de Imuno-Receptor Baseada em Tirosina
ITIM	Sequência de Inibição de Imuno-Receptor Baseada em Tirosina
LILR	Receptores de Leucócitos com Domínio Tipo Imunoglobulina
MAG	Glicoproteína Associada à Mielina
MHC-I	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I
NK	Células <i>Natural Killer</i>
OMgp	Glicoproteína da Mielina do Oligodendrócito
PirB	Receptores Pareados Semelhantes à Imunoglobulina B
REG	Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA	Ácido Ribonucleico
SHP 1/ 2	Proteínas Tirosina Fosfatases 1/ 2
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TrkB	Receptor de proteína-tirosina quinase B
TCR	Receptor de Células T

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>21</b>
1.1 O SISTEMA NERVOSO E SUAS DIVISÕES	21
1.2 AS CÉLULAS QUE COMPÕEM O SISTEMA NERVOSO	22
1.2.1 Neurônios.....	22
1.2.2 Células da Glia.....	24
1.2.2.1 Astrócitos.....	24
1.2.2.2 Oligodendrócitos.....	25
1.2.2.3 Microglia.....	26
1.2.3 Células de Schwann, macrófagos e células satélites.....	27
1.3 Medula Espinal	28
1.4 ESTRUTURA DOS NERVOS ESPINAIS	29
1.5 Lesão Nervosa Periférica	30
1.5.1 Etiologia básica das lesões nervosas periféricas.....	30
1.5.2 Classificação anatomofisiológica da lesão nervosa periférica.....	31
1.5.3 Alterações celulares após lesão nervosa periférica.....	32
1.6 MHC-I e PirB em processos neuroregenerativos	34
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>39</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 GERAIS	40
3.2 ESPECÍFICOS	40
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 Abordagens experimentais	41
4.2 Animais	41
4.3 Procedimentos cirúrgicos	42
4.4 Análise da função motora, via sistema “CatWalk”	43
4.5 Análise do limiar nociceptivo – Teste de Von Frey ELETRÔNICO	45

4.6	Obtenção de material para análise histológica	46
4.6.1	Procedimento de eutanásia.....	46
4.6.2	Procedimento de dissecação e congelamento .....	46
4.6.3	Criotomia.....	47
4.7	Imunofluorescência	48
4.8	Quantificação da imunofluorescência	49
4.9	PCR EM TEMPO REAL (qrt-pcr)	50
4.10	Análise estatística	52
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
5.1	Cobertura sináptica	54
5.2	Expressão de MHC-I	56
5.3	Reatividade microglial	58
5.4	Reatividade astrogliar	60
5.5	Expressão de PirB	62
5.6	RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)	64
5.7	Recuperação da função motora	66
5.8	Intensidade Máxima de pressão durante a propulsão	67
5.9	Intensidade máxima de pressão na fase de apoio	70
5.10	Análise do Limiar Nociceptivo	72
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>
	CERTIFICADO CEUA/UNICAMP	90
	DECLARAÇÃO REFERENTE A DIREITOS AUTORAIS	91

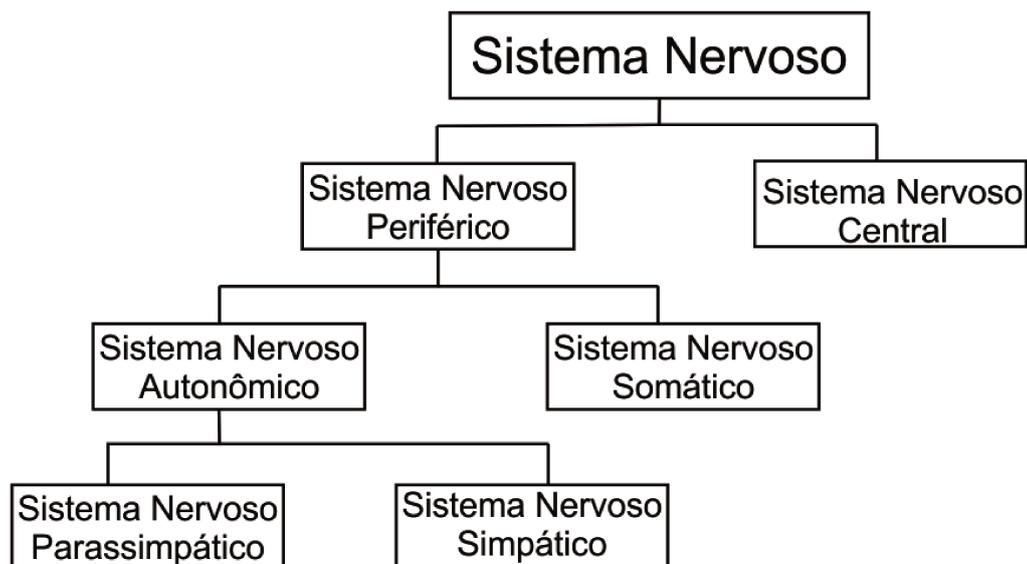
# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 O SISTEMA NERVOSO E SUAS DIVISÕES

O sistema nervoso (SN) pode ser dividido, anatomicamente/ didaticamente, em Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP), controlando as funções somáticas (sensoriomotoras ou voluntárias) e autonômicas (involuntárias) do corpo humano (SNYDER et al., 2018). As estruturas que compõem o SNC incluem o encéfalo e a medula espinal, enquanto no SNP têm-se os nervos periféricos e gânglios, nervos cranianos e as estruturas autonômicas. Essas estruturas trabalham permitindo o envio, recebimento e o processamento de informações provenientes das mais diferentes regiões corpóreas (FRANKLIN, 2016)

O SNC é uma rede de aproximadamente 100 bilhões de células nervosas individuais, tendo características anatômicas e fisiológicas únicas, como: 1) o fato de serem protegidas por estruturas ósseas (crânio e vértebras); 2) são separadas da circulação sistêmica pelas junções oclusivas das células endoteliais, que servem de barreira para diferentes moléculas, inclusive certas toxinas e 3) a limitada capacidade de autorreparação, apesar da presença de células tronco endógenas no encéfalo e na medula espinal (FARINA et al., 2018).

O SNP, por sua vez, é dividido em sistema nervoso somático e autonômico, sendo o último subdividido em componentes simpáticos e parassimpáticos (**Figura 1**). Alguns autores consideram haver uma terceira subdivisão do sistema nervoso autonômico, o sistema nervoso entérico, responsável pela regulação da função do trato gastrointestinal (CUEVAS, 2015).



**Figura 1.** Organograma do Sistema Nervoso e suas subdivisões.

## 1.2 AS CÉLULAS QUE COMPÕEM O SISTEMA NERVOSO

As células que compõem do Sistema Nervoso podem ser divididas em duas grandes categorias: neurônios e glia. As células da glia incluem, no SNC, astrócitos, oligodendrócitos, a microglia e as células endoteliais, ao passo que no SNP há células de Schwann, macrófagos e células satélites nos gânglios das raízes dorsais. Juntos, as células da glia e os neurônios desempenham papel importante, formando a unidade funcional do SN. (WILLERTH, 2017).

### 1.2.1 *Neurônios*

Os neurônios são responsáveis pela geração e propagação de potenciais de ação, que envolvem mudanças bioelétricas ou bioquímicas na célula, através de um alto gasto energético (MIHAIOFF; HAINES, 2018). Para transmitir informação de forma bem-sucedida, os neurônios produzem sinais químicos específicos, iniciados através da liberação de neurotransmissores em uma região conhecida como fenda sináptica (sinapse química). Os neurotransmissores liberados pelos neurônios (pré-sinápticos) cruzam a fenda sináptica para alcançar um segundo neurônio (pós-sináptico) que os absorve (WILLERTH, 2017).

Embora a arquitetura do neurônio seja especialmente diversa, um neurônio arquetípico é constituído por uma membrana plasmática contínua que forma o corpo

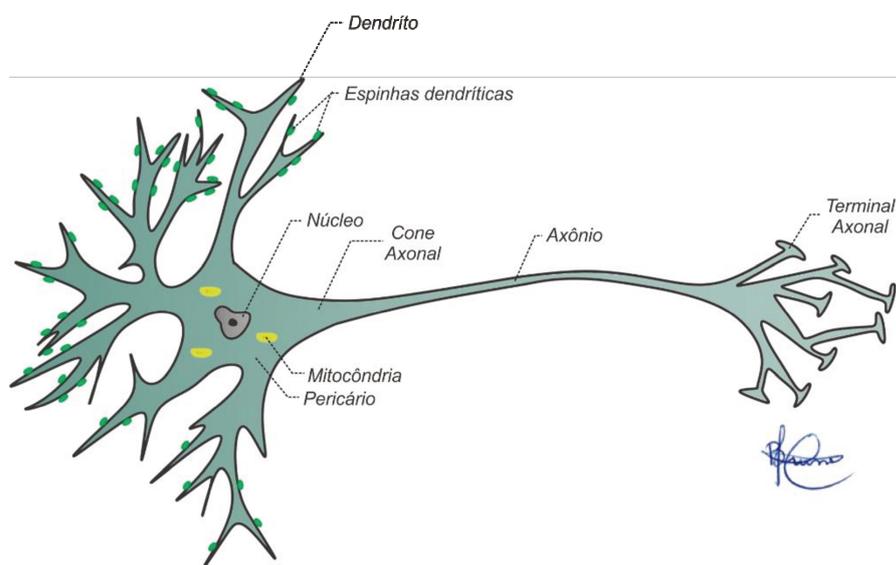
celular (ou soma), do qual tem origem o axônio e os dendritos (MIHAILOFF; HAINES, 2018). Uma das funções do soma é garantir a síntese de alguns componentes necessários para a estrutura e função de neurônios. Ademais, o soma contém todas as organelas responsáveis pela síntese de macromoléculas e ainda recebe inúmeras sinapses de outros neurônios, sendo, juntamente com os dendritos, a principal área de contato dos neurônios (HAMMOND, 2015).

Os dendritos, por sua vez, apresentam-se como inúmeras ramificações partindo do corpo celular, semelhante a “galhos de árvores”. Pequenos brotos (espinhas dendríticas), de diferentes formatos, são frequentemente vistos nos dendritos mais distais, constituindo a principal área de sinapse, enquanto que a arborização dendrítica é mais robusta na sua origem, ou seja, nas proximidades do corpo celular (MIHAILOFF; HAINES, 2018) (**Figura 2**). Alterações na árvore dendrítica podem contribuir para o desenvolvimento de doenças neurológicas como o autismo (MARTÍNEZ-CERDEÑO, 2017).

Em contraste aos dendritos, o axônio estende-se por longas distâncias (MIHAILOFF; HAINES, 2018), tendo origem no corpo neuronal, em uma região de intensa síntese proteica denominada cone de implantação (WILLERTH, 2017). Alguns axônios desenvolvem uma relação próxima com células de Schwann ou oligodendrócitos, que emitem projeções da sua membrana plasmática a fim de se associar aos axônios, formando as bainhas de mielina. Entre dois segmentos de mielina, também chamados de internodos, há espaços sem mielinização denominados de nós/ nódulos de Ranvier. A mielina associada ao axônio tem como função o isolamento elétrico do último, visando a otimização da condução do impulso nervoso (ALVITES et al., 2018). Os axônios mielinizados são referidos como fibras nervosas, o que inclui o componente nervoso e o envoltório glial (MIHAILOFF; HAINES, 2018).

É importante ressaltar que o transporte axonal pode ocorrer no sentido anterógrado e na direção retrógrada. No primeiro caso, movimento de estruturas intracelulares (tais como vesículas, mitocôndrias, etc) e proteínas (tais como as do citoesqueleto) ocorre do corpo celular em direção a sítios axonais (nódulos de Ranvier, vesículas pré-sinápticas, etc.) e para o seguimento mais distal ao corpo

celular de um neurônio, o terminal axonal (HAMMOND, 2015). No sentido retrógrado, os mesmos elementos transitam da periferia em direção ao corpo celular.



**Figura 2.** Representação de um neurônio genérico e suas principais estruturas. É possível observar a arborização dendrítica se tornando mais delgada à medida que se afasta do corpo celular.

### 1.2.2 Células da Glia

A glia compõe o maior número de células do sistema nervoso, sendo fundamental para o seu funcionamento adequado. A maioria dessas células, no SNC, são astrócitos e oligodendrócitos, derivados da neuroectoderme, e a microglia, derivada do saco vitelínico (GINHOUX et al., 2013) que, por sua vez, é formado a partir da endoderme e da mesoderme. Analogamente, no SNP são encontradas células de Schwann, além de células satélites, nos gânglios das raízes dorsais, e os macrófagos (MIHAILOFF; HAINES, 2018).

#### 1.2.2.1 Astrócitos

Os astrócitos atuam na manutenção do funcionamento próprio do SNC. São classificados como protoplasmáticos e fibrosos, de acordo com sua morfologia (em estado basal) e sua localização anatômica. Os astrócitos protoplasmáticos são encontrados na substância cinzenta, apresentam prolongamentos espessados que dão origem a finos processos distribuídos uniformemente. Astrócitos fibrosos, por sua vez, são encontrados por toda substância branca e apresentam muitos

processos longos, semelhantes a filamentos. Análises por microscopia eletrônica mostraram que os processos dos astrócitos protoplasmáticos envelopam as sinapses, ao passo que os prolongamentos dos astrócitos fibrosos se relacionam aos nós de Ranvier. Ambos formam junções oclusivas com os processos distais dos astrócitos circunjacentes (SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Os astrócitos realizam contato bidirecional com vasos sanguíneos, através de seus prolongamentos, regulando, por exemplo, o fluxo sanguíneo local. Produzem e secretam vários mediadores moleculares como proteoglicanos, ácido araquidônico e óxido nítrico, sendo que o último pode atuar na vasodilatação, influenciando, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo.

Atualmente, há evidências de que os astrócitos desempenham papel direto na transmissão sináptica por meio da liberação regulada de moléculas sinápticas ativas, incluindo glutamato e GABA. A liberação desses gliotransmissores ocorre em resposta às mudanças na atividade sináptica neuronal e envolve a excitabilidade dos astrócitos, como resposta ao aumento nos seus níveis de  $[Ca^{2+}]_i$ , podendo alterar a excitabilidade neuronal (SHIGETOMI et al., 2008). Essa evidência sustenta a hipótese da “sinapse tripartite”, em que os astrócitos desempenham influência direta e interativa com neurônios durante a atividade sináptica, de forma que é essencial para o processamento das informações pelos circuitos neuronais (HALASSA; FELLIN; HAYDON, 2007; PEREA; NAVARRETE; ARAQUE, 2009).

Além disso, os astrócitos são responsáveis por secretar fatores tróficos que servem de suporte aos neurônios, regulando os níveis extracelulares de íons e neurotransmissores e provendo defesa antioxidante (BARRETO et al., 2011; CHUNG; ALLEN; EROGLU, 2015).

#### 1.2.2.2 Oligodendrócitos

Os oligodendrócitos têm um papel importante no suporte do SNC. Morfologicamente, apresentam inúmeros prolongamentos que partem do corpo celular, estando esses em íntimo contato com os axônios dos neurônios, diferentemente dos astrócitos (WILLERTH, 2017). Uma das principais funções dessas células é a formação e a manutenção das bainhas de mielina (BAUMANN;

PHAM-DINH, 2001), que provê isolamento eletroquímico ao redor de todos os axônios da substância branca.

A bainha de mielina é um envoltório membranoso lipoprotéico, que se dispõem ao redor de um axônio, aumentando a velocidade de condução dos potenciais de ação ao longo do axônio. Os axônios de grande diâmetro têm espessas bainhas de mielina e apresentam velocidade de condução maior que a dos axônios com diâmetro menor e com bainhas de mielina mais finas. Além disso, os axônios menos espessos não são mielinizados (amielínicos) e apresentam baixa velocidade de condução (MIHAILOFF; HAINES, 2018).

A bainha de mielina é formada por uma interação célula-célula, na qual um axônio destinado à mielinização é reconhecido por proteínas presentes na superfície do oligodendrócito. Ainda, oligodendrócitos em desenvolvimento também recebem sinais eletroquímicos de axônios ativos e respondem gerando um processo que envolve repetidamente o axônio. À medida que as camadas de mielina se acumulam, quase todo o citoplasma é excluído (permanecendo apenas nas voltas mais internas e externas do processo do oligodendrócito), de modo que a bainha de mielina madura consiste em camadas concêntricas de membrana plasmática de oligodendrócitos justapostas (MIHAILOFF; HAINES, 2018). Um único oligodendrócito pode prover suporte para mais de cinquenta neurônios. (WILLERTH, 2017; MIHAILOFF; HAINES, 2018).

### 1.2.2.3 Microglia

As células da microglia são macrófagos residentes do SNC (GINHOUX et al., 2010). Encontram-se amplamente distribuídas em todo o cérebro e na medula espinal (LAWSON et al., 1990) e representam 5-20% da população total de células gliais dentro do parênquima nervoso (LAWSON et al., 1990).

Existem dois principais aspectos funcionais da microglia: defesa imunológica e sustentação ao SNC. Como células do sistema imunológico, elas atuam como sentinelas, detectando os primeiros sinais de invasão patogênica ou dano tecidual no microambiente neuronal, definido como imunoprivilegiado (protegido pela barreira hematoencefálica) (DANEMAN, 2012). Sob condições inflamatórias de uma resposta

imune ativa, entretanto, a microglia também deve moderar o potencial dano ao SNC e apoiar a reparação e remodelação tecidual. A ativação microglial desregulada e a inflamação induzida por ela são observadas praticamente em todas as patologias do SNC. Evidências sugerem que a microglia exerce efeitos diretos sobre os neurônios, contribuindo para a progressão de doenças no sistema nervoso (PERRY; NICOLL; HOLMES, 2010; IANNACCONE et al., 2013).

Além das suas funções imunológicas, papéis novos e fundamentais vêm sendo atribuídos à microglia, como influência no controle da proliferação e diferenciação neuronal e na formação de conexões sinápticas (GRAEBER, 2010). Sob condições basais, as células da microglia examinam constantemente o microambiente local, estendendo seus processos móveis e realizando contato transitório com sinapses neuronais, contribuindo para a modificação e a eliminação de estruturas sinápticas (GRAEBER, 2010). A microglia também contribui para a remodelação de circuitos neurais no período pós-natal, a exemplo da eliminação sináptica demonstrada em camundongos (PAOLICELLI et al., 2011).

### *1.2.3 Células de Schwann, macrófagos e células satélites*

No SNP, assim como no SNC, axônios de grande e médio diâmetro apresentam bainhas de mielina, ao passo que os axônios de pequeno diâmetro são desmielinizados. As células de Schwann, como dito anteriormente, produzem essas bainhas de mielina, além de envolverem os axônios amielínicos no SNP. Além dessas funções, sabe-se que diante de um distúrbio, seja genético ou adquirido, as células de Schwann têm a habilidade de iniciar a degradação da própria mielina (desmielinização) (GOMEZ-SANCHEZ et al., 2015).

Os macrófagos, células do sistema imune, pertencem à família dos leucócitos mononucleares e são vastamente distribuídos em grande parte dos tecidos. Apresentam fenótipo consideravelmente variável e dependente do microambiente em que se encontram. Estão envolvidos na remoção de células, patógenos e moléculas através de fagocitose e endocitose, além de secretarem substâncias que induzem o movimento, crescimento, diferenciação e morte celular. Os macrófagos nos tecidos contribuem de forma vital por meio das respostas imunes e inflamatórias (TOEWS, 2009).

As células satélites são análogas aos astrócitos, sendo, contudo, pertencentes ao SNP e estão localizadas ao redor dos corpos neuronais de gânglios sensoriais e autonômicos.

### 1.3 MEDULA ESPINAL

A medula espinal é a mais importante conexão entre o corpo e o encéfalo (HAINES; MIHAILOFF; YEZIERSKI, 2018). Ela atua como uma via que carrega informações que entram (vias neurais aferentes/ascendentes) e saem (vias neurais eferentes/descendentes) de diferentes segmentos, de acordo com a região do corpo que está enviando ou recebendo sinalização (WILLERTH, 2017). Apresenta-se como uma estrutura de forma cilíndrica, localizada dentro do canal vertebral que, em adultos humanos, inicia-se na região mais caudal do bulbo do tronco encefálico (a qual é contínua), ao nível do forame magno do osso occipital, e termina entre a primeira e a segunda vértebras lombares (REA, 2015). Apesar de não apresentar segmentação em sua estrutura, é dividida de acordo com o nível em que se encontra no canal vertebral, sendo 7 vértebras cervicais, 12 torácicas, 5 lombares, 5 sacrais e 4 coccígeas. Além disso, há pontos de maior alargamento, chamados de intumescência cervical (C4 à T1) e lombosacral (L1 à S2) que inervam os membros superiores e inferiores, respectivamente (HAINES; MIHAILOFF; YEZIERSKI, 2018).

É composta por uma área central, em formato de borboleta, onde se localizam os corpos celulares dos neurônios, a chamada substância cinzenta; ao redor dela há fibras mielínicas e amielínicas, as quais compõem a substância branca. Embora a cavidade do tubo neural seja proeminente durante o desenvolvimento, apresenta-se na medula espinal do adulto como uma pequena linha endimária, a qual forma o canal central (HAINES; MIHAILOFF; YEZIERSKI, 2018).

Diferente dos humanos, a medula espinal dos roedores apresenta a intumescência cervical do segmento C5 - T1, ao passo que a intumescência lombosacral se estende de L2 à L6. Há diferenças, também, no número de vértebras da coluna vertebral, tendo-se nos roedores: 7 cervicais 13 torácicas, 6 lombares, 4 sacrais, e 27-30 caudais (cauda). O número de vértebras lombares pode variar entre as linhagens de camundongos (SNYDER et al., 2018).

Ademais, a substância cinzenta da medula espinal (H medular) pode ser dividida em camadas, classificadas como lâminas (Lâminas de Rexed), numeradas de I a IX e uma área X, ao redor do canal central. Essas lâminas são caracterizadas pelas estruturas celulares que apresentam (ex: grandes motoneurônios na lâmina IX que contribuem para a formação da intumescência cervical e lombosacral), o *input* que recebem e a trajetória dos axônios oriundos de cada lâmina (HAINES; MIHAILOFF; YEZIERSKI, 2017).

#### 1.4 ESTRUTURA DOS NERVOS ESPINAIS

Os axônios dos nervos periféricos são processos de neurônios, cujos corpos celulares podem estar localizados nos gânglios das raízes dorsais, para função somatossensorial geral, ou na coluna anterior da medula espinal, para função somática geral (KERNS, 2008). Cada segmento medular dá origem às raízes espinais, que formam pares de nervos espinais que emergem através do forame intervertebral.

Nervos espinais são nervos mistos do SNP que permitem a comunicação com o SNC. Eles contêm axônios que carregam informação sensorial para a medula espinal (fibras aferentes) e fibras motoras que carregam comandos motores da medula espinal para a periferia (fibras eferentes)(FRANKLIN, 2016).

Diferentes tecidos dão suporte ao nervo. Imediatamente ao redor da fibra axonal, tem-se o endoneuro, tecido conjuntivo frouxo, composto principalmente por células endoneurais e fibras colágenas, além de outros elementos da matriz extracelular.

O perineuro, por sua vez, circunda feixes de fibras e seus elementos endoneurais, sendo o conjunto dessas estruturas denominado fascículo nervoso. Vale ressaltar que a maioria dos nervos tem mais de um fascículo. Ademais, o perineuro é rico em células robustas e achatadas (células perineurais) dispostas em múltiplas camadas, unidas por junções oclusivas e interpostas por lâmina basal. O perineuro é uma das camadas da barreira hematonervosa, que previne a passagem de moléculas com alto peso molecular para o microambiente endoneural.

A camada de tecido conectivo mais externa é chamada de epineuro e é responsável por envolver o conjunto de fascículos. O epineuro possui um arranjo mais espaçado de fibras colágenas e inclui tecido adiposo (KERNS, 2008).

## 1.5 LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

As raízes nervosas anterior e posterior, de um determinado nível da medula espinal, juntam-se para formar um único nervo espinal, o qual se combina com outros nervos espinais para formar os nervos periféricos do corpo. Sendo assim, de acordo com o local de lesão nervosa, é possível o aparecimento de déficits motores, sensoriais ou uma combinação de ambos (BRUSHART, 2011; HAINES; MIHAIOFF; YEZIERSKI, 2018).

O nervo pode ser dito unissegmentar ou plurissegmentar, de acordo com sua característica de inervação do território corpóreo (dermatomo). O nervo plurissegmentar, por definição, contribui com fibras sensoriais de várias raízes. Sendo assim, conhecendo-se o território cutâneo de distribuição dos nervos periféricos e o mapa dos dermatomos, pode-se, em caso de perda de sensibilidade cutânea, determinar se a lesão foi em um nervo, na medula ou nas raízes espinais (MACHADO; MACHADO HAERTEL, 2013).

Um exemplo de nervo plurissegmentar é o nervo isquiático, que é responsável por suprir os flexores do joelho e todos os músculos abaixo desta articulação, o que significa que uma paralisia completa do nervo isquiático resulta em um pé com mobilidade anormal e dificuldade severa na deambulação (ADLER, 2010).

### *1.5.1 Etiologia básica das lesões nervosas periféricas*

Uma forma conhecida de lesões nervosas periféricas são aquelas relacionadas à tração. Por conta da matriz extracelular e das camadas de tecido conectivo, nervos periféricos são elásticos e às vezes resilientes às distensões (NADI; MIDHA, 2018). A lesão ocorre quando a força de tração ultrapassa a capacidade de distensibilidade do nervo (SUNDERLAND, 1990). Embora a continuidade permaneça em muitas situações, algumas vezes o alongamento é forte o suficiente para ocasionar ruptura

completa do nervo. Um exemplo disso é a avulsão do plexo braquial, onde há completa descontinuidade do elemento nervoso (NADI; MIDHA, 2018).

Objetos afiados também são grande causa de lesões por laceração, constituindo cerca de 30% das lesões graves e sendo, portanto, outra forma recorrente de lesões (NADI; MIDHA, 2018). Apesar disso, a continuidade nervosa é geralmente preservada, sendo a transecção completa menos frequente (SECKEL, 1990).

Na compressão, embora a continuidade seja mantida, perda completa da função motora e sensorial pode ocorrer (BURNETT et al., 2004). Causas iatrogênicas de compressão são possíveis, como no caso da posição mantida durante uma anestesia para um procedimento médico, no qual o mecanismo de lesão é usualmente a combinação de contusão e isquemia (NADI; MIDHA, 2018).

### *1.5.2 Classificação anatomofisiológica da lesão nervosa periférica*

Seddon, em 1943, classificou as lesões nervosas em três grandes grupos, de acordo com o grau de severidade da lesão, sendo chamados, do mais ameno ao mais grave de: neuropraxia, axonotmese e neurotmeze (SEDDON, 1943). Em 1951, Sunderland propôs um novo sistema de classificação consistindo, porém, em cinco categorias (SUNDERLAND, 1951).

A neuropraxia é classificada como a mais leve das alterações nervosas, na qual há manutenção da continuidade nervosa e axonal, com disfunção decorrente do bloqueio transitório da condução nervosa. Ainda assim, é possível observar súbitas mudanças na estrutura mielínica nas formas mais severas de neuropraxia, que podem levar dias para sua recuperação plena. A neuropraxia é equivalente ao primeiro grau de lesão no sistema de classificação de Sunderland (SUNDERLAND, 1951; ALVITES et al., 2018).

Na axonotmese, há completa interrupção dos axônios do nervo e da mielina em volta, ao passo que o perineuro e o epineuro são preservados. A degeneração axonal e mielínica ocorre distalmente ao local da lesão, resultando em uma desnervação total. Contudo, a recuperação plena também é esperada nesse grupo, uma vez que o perineuro e o epineuro intactos provêm um caminho preciso para os

brotamentos axonais reinervarem seu órgão alvo, no processo de regeneração (SEDDON, 1943).

Para Sunderland (SUNDERLAND, 1951; ALVITES et al., 2018), o segundo, terceiro e quarto grau correspondem às subdivisões da axonotmese. No segundo grau de lesão, há interrupção axonal com preservação da estrutura endoneural, mantendo o alinhamento fascicular e a integridade do perineuro e do epineuro. Lesões no endoneuro podem ser parciais, e o prognóstico depende do grau de conservação dessa camada. No terceiro grau, os axônios, bainhas de mielina, e o endoneuro são rompidos, porém o alinhamento fascicular e a integridade das outras camadas de colágeno são mantidas. A recuperação talvez ocorra muitos meses depois, através de tratamento conservador ou intervenções cirúrgicas para resolver áreas de aprisionamento, com ou sem a realização de neurólise. No quarto grau, todas as camadas, exceto o epineuro, são rompidas. A ocorrência de hemorragia dentro do nervo e a presença de tecido fibroso associado com descontinuidade fascicular aprisionam e dificultam o crescimento de novos brotos axonais, promovendo a formação de neuomas em continuidade.

Por fim, a neurotmese, que caracteriza o grau mais severo de lesão, envolve a interrupção completa do nervo com perda funcional total. A regeneração, nesse caso, não é plena sem intervenção cirúrgica, havendo grande formação de cicatriz glial (SEDDON, 1943). Essa categoria é equivalente ao quinto grau de lesão proposto por Sunderland, uma vez que há também transecção do nervo, incluindo o epineuro, sendo comum a formação de neuroma em bulbo na extremidade (SUNDERLAND, 1951; ALVITES et al., 2018).

Em camundongos já é bem registrado que a regeneração do nervo após axotomia por compressão é plena e, portanto, esse é um modelo amplamente usado para se investigar alterações nos corpos dos neurônios danificados e seu envolvimento no processo de regeneração (GEUNA, 2015).

### *1.5.3 Alterações celulares após lesão nervosa periférica*

Frente a uma perturbação, como em casos de lesões mecânicas nos nervos periféricos, mudanças ocorrem no corpo neural e nas fibras nervosas próximas ao

local danificado, que variam em intensidade de acordo com a gravidade, bem como da proximidade do segmento lesionado ao corpo neuronal. No SNP, a bainha de mielina e o axônio inevitavelmente se degradam ao longo do segmento distal do local da lesão, um fenômeno conhecido como degeneração Walleriana. A degeneração proximal à lesão pode ser mínima (variando do local da lesão até o segundo ou terceiro nó de Ranvier) ou pode se estender até o corpo do neurônio. No caso de haver degeneração do corpo celular, como pode ocorrer em lesões severas, o segmento proximal também sofre degeneração Walleriana e é fagocitado (BURNETT et al., 2004).

Após um dano axonal, o corpo celular do neurônio passa por alterações, tornando-se, por exemplo, intumescido e sofrendo cromatólise, um processo em que os grânulos de Nissl (polirribossomos) se dispersam e o núcleo celular é deslocado para a periferia. Isso reflete a mudança na prioridade metabólica que, passa da produção de neurotransmissores para a síntese de moléculas necessárias para o crescimento e reparo axonal, como RNA mensageiro, lipídios, actina, tubulina e proteínas associadas ao crescimento (LEE; WOLFE, 1981).

Um estímulo lesivo também desencadeia alterações morfofisiológicas nas células da glia, que nos astrócitos são conjuntamente denominadas astrogliose. Nesse processo, ocorre aumento significativo da expressão de filamentos intermediários, em especial do GFAP (*glial fibrillary acid protein*), acompanhado de hiperplasia dos prolongamentos e hipertrofia do corpo celular e prolongamentos (PEKNY; PEKNA, 2014). Em muitos casos, a astrogliose desempenha papel dúbio no cenário da regeneração tecidual, que pode ser influenciado pela intensidade do estímulo lesivo. Nesse sentido, é benéfica aos neurônios quando há produção de fatores tróficos, fornecendo um microambiente favorável à regeneração nervosa. No entanto, pode haver a formação de um tecido cicatricial, rico em substâncias que impedem o crescimento axonal ou dificultam o rearranjo das conexões, dentre elas os proteoglicanos de condroitin sulfato e proteoglicanos de queratan sulfato (SILVER; MILLER, 2004)

Ainda, na região medular, os botões sinápticos excitatórios, do tipo glutamatérgico, têm suas conexões largamente desfeitas, tanto no corpo neuronal, como nos dendritos. Essa diminuição no número de sinapses também está ligada à

astroglíose, visto que os astrócitos participam do destacamento sináptico através da interposição de seus prolongamentos entre os terminais pré e pós-sinápticos, impedindo a interação dos neurônios pré e pós-sinápticos (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000). Dentre as sinapses remanescentes, a maioria é do tipo inibitória (OLIVEIRA et al., 2004).

## 1.6 MHC-I E PIRB EM PROCESSOS NEURORREGENERATIVOS

O entendimento dos mecanismos de eliminação das sinapses inapropriadas ou em excesso, tanto durante o desenvolvimento, quanto após uma lesão, ainda não está totalmente claro. Nas últimas décadas, um número crescente de estudos vêm explorando o papel de componentes do sistema imune em processos neurorregenerativos (THAMS; OLIVEIRA; CULLHEIM, 2008; KIPNIS, 2016), dentre eles, as moléculas do MHC-I.

As moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I (MHC-I) são muito bem estudadas do ponto de vista imunológico, por apresentarem antígenos aos linfócitos T CD8 (T citotóxicos, CTL) durante o processo de imunovigilância. No Homem, são conhecidas como antígeno leucocitário humano (HLA) e, nos camundongos, como moléculas de histocompatibilidade (H). São heterodímeros formados por uma cadeia alfa polimórfica inserida na membrana plasmática, associada à cadeia  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m). Na cadeia alfa existe uma fenda que acomoda um peptídeo de 8 a 11 aminoácidos, o qual é essencial para garantir a estabilidade da molécula do MHC-I, pois, sem ele, a molécula torna-se instável na membrana celular. Oriundos da degradação proteica realizada pelo proteossomo, no citoplasma, os fragmentos peptídicos são transportados à luz do retículo endoplasmático granular (REG), onde se complexam às moléculas do MHC-I. Em seguida, o complexo MHC-I (cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$ 2m e antígeno) é endereçado à superfície celular, onde interage com o linfócito T CD8 por meio do receptor de células T (TCR). Caso a célula T CD8 reconheça o antígeno como não-próprio ao organismo, ele desenvolve mecanismos efetores que culminam na lise ou apoptose da célula-alvo (ABUL; LICHTMAN; PILLAI, 2014). Esse mecanismo é muito eficiente frente às infecções virais e mutações celulares.

Virtualmente, as moléculas do MHC-I são expressas em todas as células nucleadas. Contudo, sabe-se que o nível basal das mesmas nos neurônios e células da glia é extremamente baixo ou até mesmo nulo, fato esse que corroborou o conceito do SNC ser um sítio imunoprivilegiado, ou seja, livre da ação do sistema imune (ARCK et al., 2008). Entretanto, estudos de meados da década de 1990 demonstraram que era possível induzir a expressão de MHC-I em neurônios (NEUMANN et al., 1995, 1997), a qual foi, nos anos seguintes, constatada durante diferentes etapas do desenvolvimento (HUH et al., 2000), envelhecimento (EDSTRÖM et al., 2004) e até mesmo após lesões (ZANON; OLIVEIRA, 2006; ZANON et al., 2010; BOMBEIRO et al., 2016b). Nesse último caso, vale ressaltar que Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2004) atribuíram ao MHC-I uma função não imune, a preservação de sinapses inibitórias em processos neurorregenerativos. Ao analisarem a medula espinal de camundongos submetidos à transecção do nervo isquiático, Oliveira *et al.* (OLIVEIRA et al., 2004) observaram que animais deficientes em MHC-I apresentavam maior destacamento de *inputs* sinápticos em comparação ao grupo selvagem. Tal fato poderia ser benéfico, visto que um neurônio axotomizado não seria capaz de transmitir informações adiante. Porém, embora a cobertura sináptica fosse maior nos animais imunocompetentes, os autores constataram que a maioria dos inputs preservados era do tipo inibitório, o que, de fato, viria a assegurar que o neurônio danificado não transmita o impulso nervoso adiante, devendo, assim, voltar seu gasto energético aos mecanismos de reparo celular (OLIVEIRA et al., 2004; THAMS; OLIVEIRA; CULLHEIM, 2008). Desse modo, o MHC-I estaria atuando na manutenção seletiva de inputs inibitórios, contribuindo com a habilidade dos neurônios em regenerar seus axônios. Até o presente, os mecanismos envolvidos nesse processo permanecem desconhecidos.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado para a compreensão do papel das moléculas do MHC-I em processos neurorregenerativos. Nesse sentido, demonstramos que o aumento da expressão de MHC-I no SNC correlaciona-se ao aumento da astrogliose e, concomitantemente, à diminuição da cobertura sináptica após axotomia do nervo isquiático (ZANON; OLIVEIRA, 2006; SABHA et al., 2008; ZANON et al., 2010). O mesmo pode ser observado durante a encefalomielite autoimune experimental (EAE) (FRERIA et al., 2010). Contrariamente, a diminuição de MHC-I, seja pela administração de acetato de

glatiramer em animais acometidos pela EAE (SCORISA et al., 2011), ou pelo silenciamento gênico via RNA de interferência, em co-culturas de neurônios e astrócitos (BOMBEIRO et al., 2017), previne a diminuição da cobertura sináptica. Nesse último exemplo, também constatamos que o silenciamento da  $\beta 2m$  causou redução da reatividade astrocitária, evidenciada pela marcação de GFAP (BOMBEIRO et al., 2017), sugerindo que o MHC-I seja importante para tal processo.

Outras moléculas que vêm ganhando atenção no cenário da neuroregeneração são os receptores pareados semelhantes à imunoglobulina (PIR). Presentes em camundongos, os PIRs são ortólogos aos receptores de leucócitos semelhantes à imunoglobulina (LILR), encontrados em humanos (TAKAI, 2005) e podem se ligar às moléculas do MHC-I, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TAKAI, 2005). Até o presente, são conhecidos o PIR-A e o PIR-B, ambos expressos em várias células hematopoiéticas, incluindo linfócitos B, mastócitos, granulócitos, células dendríticas e macrófagos; contudo, não estão presentes em células T e nem células *natural killer* (NK) (TAKAI, 2005). Os PIRs são proteínas transmembrana com seis domínios extracelulares do tipo imunoglobulina. PIR-B apresenta um segmento transmembrana hidrofóbico e uma porção intracelular com quatro sequências de inibição de imunorreceptor baseadas em tirosina (ITIMs), ao passo que o PIR-A apresenta uma porção pré-transmembrana, um segmento transmembrana e uma cauda citoplasmática pequena desprovida de ITIMs. Contudo, PIR-A está associado à proteína  $Fc\gamma R$ , a qual possui duas sequências de ativação de imunorreceptor baseadas em tirosina (ITAMs), formando, assim, uma unidade sinalizadora de ativação celular (KUBAGAWA et al., 1999; TAKAI, 2005). Em suma, quando ligado ao MHC-I, PIR-A delibera mecanismos de sinalização intracelular culminantes na ativação da própria célula que o apresenta em sua superfície, ao passo que o PIR-B, contrariamente, silencia a célula. Estudos constataram que a ação de PIR-B é predominante sobre PIR-A em várias células da linhagem hematopoiética, sugerindo, assim, um papel fisiológico na manutenção do estado de repouso da célula através da interação contínua com o MHC-I (TAKAI, 2005).

Expresso por dendritos e axônios de diferentes subpopulações de neurônios (SYKEN, 2006; STARKEY et al., 2012; BOMBEIRO et al., 2016b), PirB também foi visualizado no cone de crescimento axonal, próximo ou até mesmo nas zonas de sinapse (SYKEN, 2006). Além disso, Syken e colaboradores (SYKEN, 2006)

demonstraram que PirB é capaz de se ligar aos neurônios de forma dependente de MHC-I, possivelmente estabilizando circuitos neuronais, pois, na sua ausência, constataram dominância ocular mais robusta no córtex visual. Liga-se também à proteína  $\beta$ -amiloide, mediando perda da plasticidade sináptica, em um modelo murino da doença de Alzheimer (KIM et al., 2013). Ainda, por estar presente na membrana celular, PirB, quando excitado por moléculas do meio extracelulares, desencadeia respostas intracelulares dependentes de moléculas como CRMP2, cofilina, Shp1 e TrkB, que através de diferentes vias atuam na neuroplasticidade (ATWAL et al., 2008; FUJITA et al., 2011; LLORENS; GIL; DEL RÍO, 2011). Exemplo disso é a ativação de PirB, em neurônios, por moléculas presentes da mielina, como MAG, OMgp e Nogo-A. Essas moléculas desencadeiam uma cascata intracelular que impede a despolarização de microtúbulos e F-actina, através de CRMP2 e cofilina, respectivamente, gerando estabilidade neuronal (LLORENS; GIL; DEL RÍO, 2011). Ao se ligar à MAG, PirB também pode se complexar ao receptor de neurotrofinas TrkB, o qual, por sua vez, é desfosforilado pelas fosfatases SHP1 e SHP2, inibindo o crescimento de neuritos (FUJITA et al., 2011).

Sendo assim, no que diz respeito ao estabelecimento de redes neurais decorrentes da plasticidade sináptica, PirB, em conjunto ao MHC-I, parece ser um elemento chave nesse processo. Apesar das diversas funções de PirB no SNC, conforme mencionado anteriormente, vale ressaltar que PirB também está envolvido no controle da motilidade celular. Macrófagos deficientes em PirB são hiperadesivos e se dispersam mais rapidamente *in vitro*, em função da maior fosforilação e ativação das integrinas (NIMMERJAHN, 2005). Em um estudo recente (BOMBEIRO et al., 2016b) observamos que macrófagos do nervo isquiático e microglias da medula espinal não apresentam PirB em condições de homeostasia tecidual, sendo essas células ramificadas e extremamente móveis (NIMMERJAHN, 2005; WALTER; NEUMANN, 2009). Entretanto, esses fagócitos passam a expressar PirB quando perdem suas ramificações, em função da ativação celular ou do cultivo *in vitro*. Ainda, nesse mesmo estudo (BOMBEIRO et al., 2016b), observamos que uma semana após a transecção do nervo isquiático, a expressão de PirB eleva-se na medula espinal, concentrando-se, majoritariamente, no neurópilo. Curiosamente, a presença de PirB em astrócitos da substância cinzenta é muito baixa ou nula, sendo essas células altamente móveis em função da plasticidade sináptica, enquanto que

os astrócitos da substância branca, pouco móveis, apresentam mais PirB (BOMBEIRO et al., 2016b). Cabe ressaltar que, naquele mesmo período, a expressão de MHC-I também estava elevada (BOMBEIRO et al., 2016b).

O estudo da dinâmica da expressão de PirB e MHC-I no processo de plasticidade sináptica medular, após lesão periférica, mostra-se muito promissor, especialmente se compararmos linhagens com potenciais regenerativos distintos, como é o caso de camundongos A/J e C57BL6/J (DE LA HOZ et al., 2003; EMIRANDETTI et al., 2006; SABHA et al., 2008). Em estudos prévios, demonstramos que camundongos A/J apresentam menor cobertura sináptica, maior reatividade astrogliar (EMIRANDETTI et al., 2006; SABHA et al., 2008) e expressão elevada de MHC-I (SABHA et al., 2008) quando comparados aos camundongos C57BL6/J, uma semana após lesão periférica. Xin e colaboradores (XIN et al., 1990) quantificaram as fibras neuronais de diferentes linhagens de camundongos, 11 e 14 dias após axotomia, e contabilizaram menos axônios nos animais C57BL/6J, em relação aos A/J. Em um estudo subsequente, o mesmo grupo observou que essa diferença regenerativa não estava relacionada às diferenças genéticas entre as linhagens (LU; SKAMENE; RICHARDSON, 1994).

## 2. JUSTIFICATIVA

As lesões nervosas periféricas são há muito estudadas, uma vez que a baixa capacidade regenerativa do sistema nervoso continua sendo fator limitante para recuperação plena após uma lesão. Apesar dos esforços para se encontrar terapias celulares e farmacológicas que corrijam essa limitação biológica, o entendimento dos mecanismos celulares e as interações moleculares, no SNC, após uma lesão nervosa, ainda não são totalmente compreendidos.

Sabemos que lesões nervosas periféricas afetam, retrogradamente, o microambiente neuronal no SNC, causando, muitas vezes, alterações sinápticas que se correlacionam às moléculas do MHC-I e, possivelmente, à PirB. Além disso, diferenças interindividuais podem alterar a magnitude das respostas centrais frente àquelas lesões, impactando, diretamente, a recuperação do paciente. Com base nisso, avaliamos, histologicamente, a cobertura sináptica, a reatividade glial e a expressão de moléculas do MHC-I e PirB na medula espinal de camundongos de C57BL/6J e A/J, após esmagamento do nervo isquiático, além de avaliarmos a recuperação da marcha e do limiar nociceptivo.

Ainda, visando compreender os possíveis efeitos da interação de MHC-I e PirB no processo de plasticidade sináptica, avaliamos, em motoneurônios, a expressão gênica de moléculas envolvidas na cascata de sinalização intracelular de PirB, as quais também estão relacionadas à motilidade celular. Dentro dessa proposta, avaliamos a expressão gênica de cofilinas e CRMP2 que, uma vez ativadas, bloqueiam a despolimerização de filamentos de actina, bem como a mobilização de microtúbulos, o que leva à estabilização do citoesqueleto neuronal (LLORENS; GIL; DEL RÍO, 2011). Além dessas moléculas, também analisamos a expressão de SHP1, SHP2 e TrkB, as quais sofrem modulação de acordo com as ligações envolvendo PirB na membrana celular e que podem, quando ativadas, influenciar no bloqueio do crescimento de neurito (FUJITA et al., 2011). Para isso, técnicas refinadas de microdissecção a laser de motoneurônios, seguidas de RT-PCR em tempo real foram empregadas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAIS**

Avaliar a participação das moléculas do MHC-I e PirB no processo de plasticidade sináptica medular em camundongos com perfis regenerativos axonais distintos (C57BL/6J e A/J), após axotomia periférica.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

- Avaliar a cobertura sináptica, a reatividade astrogliar e microglial e a expressão de MHC-I e PirB na medula espinal de camundongos C57BL/6J e A/J durante a degeneração Walleriana, bem como após recuperação funcional plena;

- Analisar, no período de maior retração sináptica, a expressão dos genes envolvidos na cascata de sinalização intracelular de PirB em motoneurônios isolados por microdissecção a laser;

- Avaliar a recuperação funcional motora e o limiar nociceptivo dos camundongos durante a regeneração nervosa.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ABORDAGENS EXPERIMENTAIS

Camundongos das linhagens C57BL/6J Unib e A/J Unib foram submetidos ao esmagamento do nervo isquiático esquerdo e avaliados quanto à recuperação da marcha (diariamente, de 3 a 28 dias após a lesão), bem como do limiar nociceptivo (duas vezes por semana). Nos dias 1, 3, 5, 7 e 28 após o esmagamento, os animais (n=5/grupo/tempo) foram submetidos à eutanásia e a medula espinal lombar (de L4 a L6) foi dissecada para análise da reatividade astrogliar, microglial, cobertura sináptica e expressão de moléculas do MHC-I e PirB (histologia por imunofluorescência). Camundongos não lesionados foram usados como controle negativo (n=5/grupo).

Complementarmente, camundongos C57BL/6J Unib e A/J Unib foram submetidos ao esmagamento unilateral do nervo isquiático (n=3/linhagem) e, sete dias após a cirurgia, foram eutanasiados e a medula lombar foi dissecada, congelada e seccionada. Os motoneurônios da região ipsilateral à lesão foram microdissecados para avaliação da expressão gênica de componentes da cascata de sinalização intracelular de PirB, via qRT-PCR. Camundongos não lesionados foram usados como controle (C57BL/6 J Unib, n=4; A/J, n=3).

### 4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos das linhagens C57BL/6J Unib e A/J Unib, machos, de 6-8 semanas de idade, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB / UNICAMP). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Regeneração Nervosa do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, acomodados em microisoladores, sob condições ambientais controladas de temperatura e umidade, em ciclo de luz alternado (12h claro / 12h escuro), com ração e à água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo de número 4558-1 e conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### 4.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os camundongos foram pré-anestesiados com cetamina (50mg/Kg) e xilasina (10mg/Kg) diluídas em água ultrapura, sendo mantidos durante o procedimento cirúrgico em isoflurano (1% em ar medicinal). A fim de se evitar hipotermia durante a cirurgia, foram posicionados sobre um colchonete aquecido por infravermelho (45°C).

Primeiramente, o campo cirúrgico foi tricotomizado e higienizado com álcool 70%. O acesso cirúrgico se deu no membro posterior esquerdo, na face lateral da coxa. Foi feita uma incisão longitudinal, com bisturi, desde a região proximal do fêmur até seu terço médio. Ao se rebater pele e tecido subcutâneo, o músculo bíceps femoral e suas fáscias foram expostos e divulsionados para que se tornasse visível o nervo isquiático, o qual se encontra paralelo e posterior ao fêmur. O esmagamento do nervo foi realizado proximalmente, na altura de sua emergência a partir da incisura isquiática maior. O esmagamento foi realizado com uma ferramenta apropriada (Beer clamp, Honer-Medizin, Alemanha, **Figura 3**) (BEER; STEURER; MEYER, 2001), exercendo-se uma pressão constante de 14 Mpa durante 30 segundos. Os músculos da coxa foram reposicionados e o local da incisão foi suturado com linha monofilamento de náilon. Durante o pós-operatório, os animais foram alocados em um microisolador e aquecidos por um foco de luz incandescente. Três horas após a cirurgia, os animais receberam analgésico (cloridrato de tramadol, 60mg/Kg, via oral, dose única).

## Beer Clamp



**Figura 3.** Beer Clamp. **A)** Ferramenta para esmagamento do nervo isquiático com mola média e um anel. **B)** Uso da ferramenta para esmagamento do nervo isquiático em camundongos.

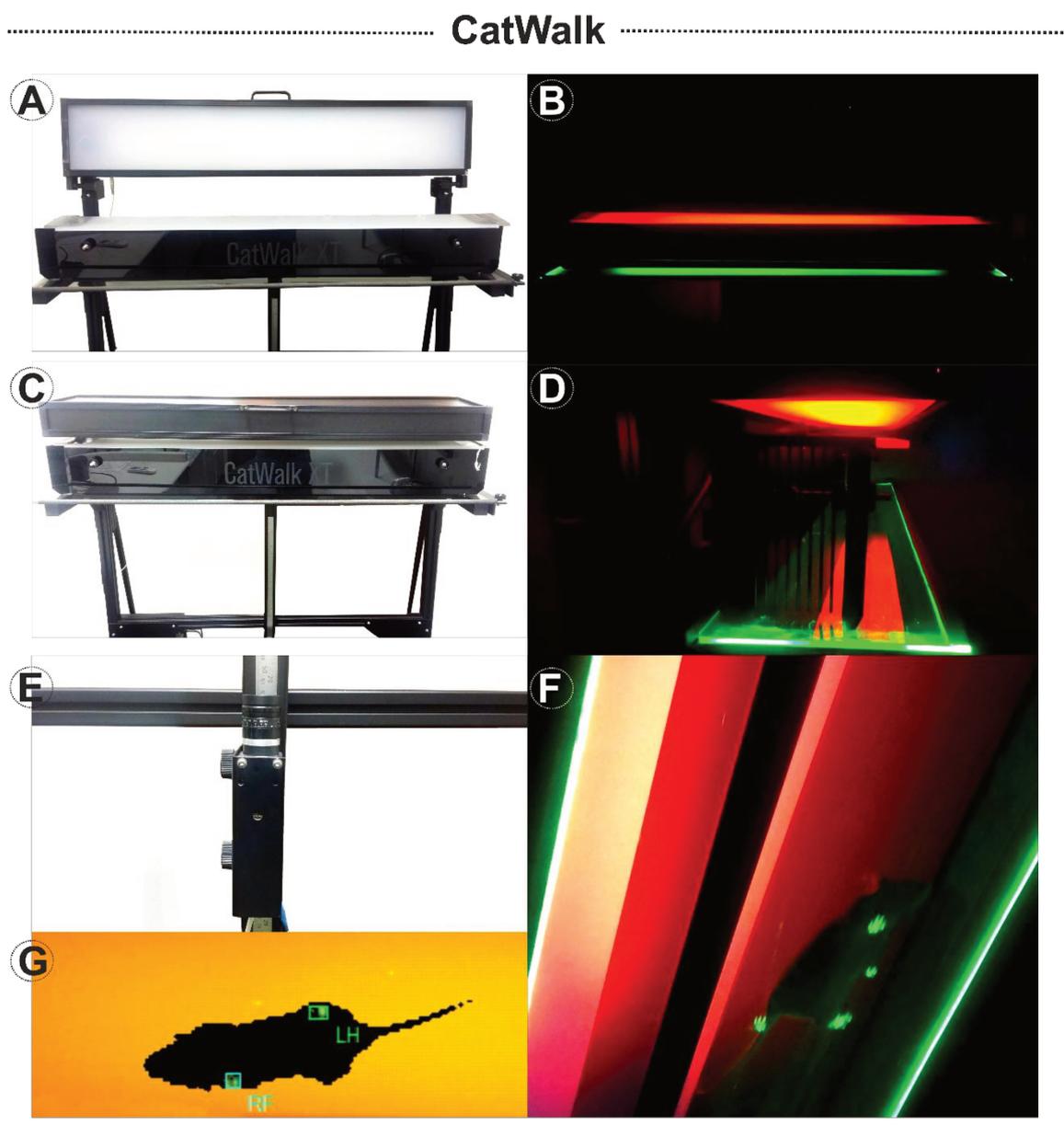
### 4.4 ANÁLISE DA FUNÇÃO MOTORA, VIA SISTEMA “CATWALK”

Para a avaliação da função motora, utilizamos o sistema automatizado CatWalk (Noldus Inc., Holanda, **Figura 4**), conforme descrito anteriormente (DE MEDINACELI; FREED; WYATT, 1982; BOMBEIRO et al., 2016a). Ao ser colocado na plataforma, o animal deambula sobre uma placa de vidro iluminada internamente com leds verdes, que realçam suas pegadas durante a marcha. Uma câmera de alta velocidade, localizada em baixo da plataforma, registra as pegadas e transfere as imagens para um computador. Com o auxílio de um software (CatWalk XT 10.5), dados referentes à largura e comprimento das patas são obtidos e aplicados à fórmula do Índice Funcional do Isquiático (SFI) (BAIN; MACKINNON; HUNTER, 1989; BARBIZAN et al., 2013),  $SFI = 118,9((ETS - NTS)/NTS) - 51,2((EPL - NPL)/NPL) - 7,5$ ; na qual N é o lado normal ou não operado; E, lado experimental ou

esmagado; PL, comprimento da pegada e TS, distância entre o primeiro e o quinto dedo da pata ou largura total da pata. Os valores do SFI foram normalizados em função daqueles obtidos no pré-operatório, sendo expressos em porcentagem.

Para análise da função sensório-motora, foram avaliados dois parâmetros gerados pelo CatWalk XT: 1) Max Intensity At (%), que representa a intensidade máxima aplicada pela pata do camundongo, na plataforma de vidro, durante a fase de apoio da marcha. É um indicativo de impulsão; 2) Max Contact Max Intensity, que é a medida da maior intensidade da pata, na maior área de contato com a plataforma. Pode ser empregada como uma medida de dor neuropática.

Como forma de adaptação, antes da cirurgia, os camundongos andaram livremente no sistema por três vezes, durante 5 minutos cada. O teste iniciou-se antes do esmagamento do nervo, para a obtenção dos valores basais (pré-operatório) e então foi realizado conforme descrito na abordagem experimental.



**Figura 4.** Sistema "CatWalk" (Walking Track Test). **A)** Imagem da plataforma de caminhada com a parte superior aberta. **B)** Equipamento ligado, vista anterior. **C)** Imagem da plataforma de caminhada com a parte superior fechada. **D)** Equipamento ligado, vista lateral. **E)** Câmera localizada na região inferior da plataforma, para captura das caminhadas. **F)** Visão inferior da plataforma com um animal. **G)** Imagem do animal caminhando sobre a plataforma vista pelo software.

#### 4.5 ANÁLISE DO LIMIAR NOCICEPTIVO – TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO

Os camundongos foram colocados, individualmente, em caixas de acrílico sem fundo (10 x 10 x 20 cm, L, P, A), acomodadas sobre uma grade de metal. Um espelho inclinado foi posicionado embaixo do aparato, para a visualização da região plantar das patas. Após ambientação (20 min, temperatura ambiente controlada e

sem ruídos), com uma ponteira de polipropileno acoplada ao transdutor de força manual (anestesiômetro eletrônico, modelo EFF 301, Insight, Ribeirão Preto, Brasil), aplicamos uma força crescente no centro da pata lesionada, a fim de se gerar o reflexo de flexão plantar associado à retirada da pata. A intensidade da pressão aplicada foi demonstrada no visor do equipamento. Foram realizadas três medidas por animal, com intervalos aproximados de 10 min entre cada uma. Para que não houvesse risco de lesão tecidual, o limite da pressão empregada foi de 8g. Os camundongos foram avaliados antes da cirurgia, a fim de se obter o valor basal e, então, do terceiro ao vigésimo oitavo dia pós-operatório, com intervalos de três dias entre os testes. Os valores obtidos foram normalizados pela média da intensidade da pressão basal.

#### 4.6 OBTENÇÃO DE MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

##### 4.6.1 *Procedimento de eutanásia*

Meia hora antes do início do procedimento de eutanásia, foi administrado cloridrato de tramadol aos animais (60mg/Kg). Após overdose de anestésico (cetamina, 400mg/Kg e xilasina, 80mg/Kg, intraperitoneal), os animais foram apoiados sobre uma superfície, onde foi realizada a laparotomia, seguida da toracotomia. Ao se expor a cavidade torácica, ainda com o coração realizando seus movimentos, foi realizada uma pequena incisão no átrio direito e o camundongo foi imediatamente submetido à perfusão transcardíaca com salina tamponada (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,4), seguida de fixador (paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio, pH 7,4). As vísceras foram retiradas e o tronco, juntamente com a região proximal dos membros superiores e inferiores foram mantidos no mesmo fixador (4°C) até o momento da dissecação medular.

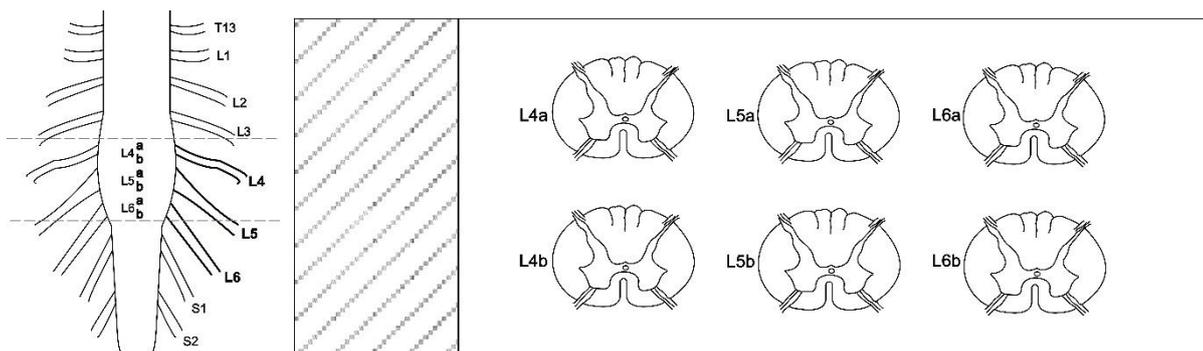
##### 4.6.2 *Procedimento de dissecação e congelamento*

Pós-fixadas (overnight, 4°C), as amostras foram dissecadas com auxílio de uma lupa cirúrgica. Para expor a medula espinal, localizada dentro do canal vertebral, a musculatura do dorso foi rebatida com o auxílio de um bisturi até a região dos processos espinhosos. As vértebras foram cuidadosamente rompidas,

preferencialmente na região entre a lâmina e o pedículo do arco vertebral, com uma pinça nº 4, no sentido crânio-caudal. Em seguida, as raízes nervosas foram cortadas, bilateralmente, assim como a cauda equina e o filamento terminal, com uma microtesoura, para que a medula espinal fosse desprendida do canal vertebral. Por fim, com o uso de uma navalha, a intumescência lombar foi isolada e incubada em solução de sacarose 10%, 20% e 30% (24h cada, 4°C). Ao final, os espécimes foram congelados em meio de congelamento tecidual (-37°C) e armazenados (-20°C) até o momento do uso.

#### 4.6.3 *Criotomia*

Os cortes histológicos (12µm) foram obtidos em um criostato a -25°C (Microm GmbH, HM 525, Ser. No. 39035, Germany), montados em lâminas de vidro previamente gelatinizadas e mantidos a -20°C até o uso. Para cada animal, foram preparadas trinta lâminas e, em cada uma, fixados seis cortes da medula espinal. As seções contemplam duas regiões de cada segmento (L4, L5 e L6), conforme esquematizado na **Figura 5**. Ao se identificar o início de L4, a partir de sua morfologia, foram coletados trinta cortes seguidos desta região (um para cada lâmina de vidro). Feito isso, o material foi desbastado até a metade de L4, identificada com base na morfologia para que se capturassem novamente mais trinta cortes adjacentes. O mesmo foi feito para L5 e L6, a fim de se amostrar duas regiões de cada segmento medular por animal. Vale lembrar que, durante a criotomia, a morfologia da região coletada foi periodicamente verificada em uma lâmina teste, sendo comparada com o atlas da medula espinal de camundongos (HEISE; KAYALIOGLU, 2009).



**Figura 5.** Plano de Corte e disposição do material na lâmina. Esquema do plano de corte utilizado para coleta das amostras das regiões L4, L5 e L6 da intumescência lombar, dos animais C57BL/6J e A/J.

#### 4.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Após climatização em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em PB 0,1M e incubadas com solução de bloqueio (BSA 3% em PB 0,1M; 1h, temperatura ambiente). Em seguida, o material foi incubado em câmara úmida, com os anticorpos primários (**Tabela 1**) diluídos em solução de incubação (BSA 1,5% e triton X-100 0,2% em PB 0,1M), overnight, 4°C. Após lavagens, os anticorpos secundários (**Tabela 1**), específicos aos primários e conjugados a fluoróforos foram diluídos conforme acima e incubados (45min, temperatura ambiente). Após lavagens, a lamínula de vidro foi posicionada sobre o material em glicerol (3:1 glicerina:PB), contendo DAPI (corante fluorescente que evidencia núcleo, 1:1000). As secções foram analisadas e fotografadas ao microscópio de fluorescência (Leica DM5500B, com câmera digital Leica DFC345 FX).

**Tabela 1.** Anticorpos utilizados nas imunomarcações

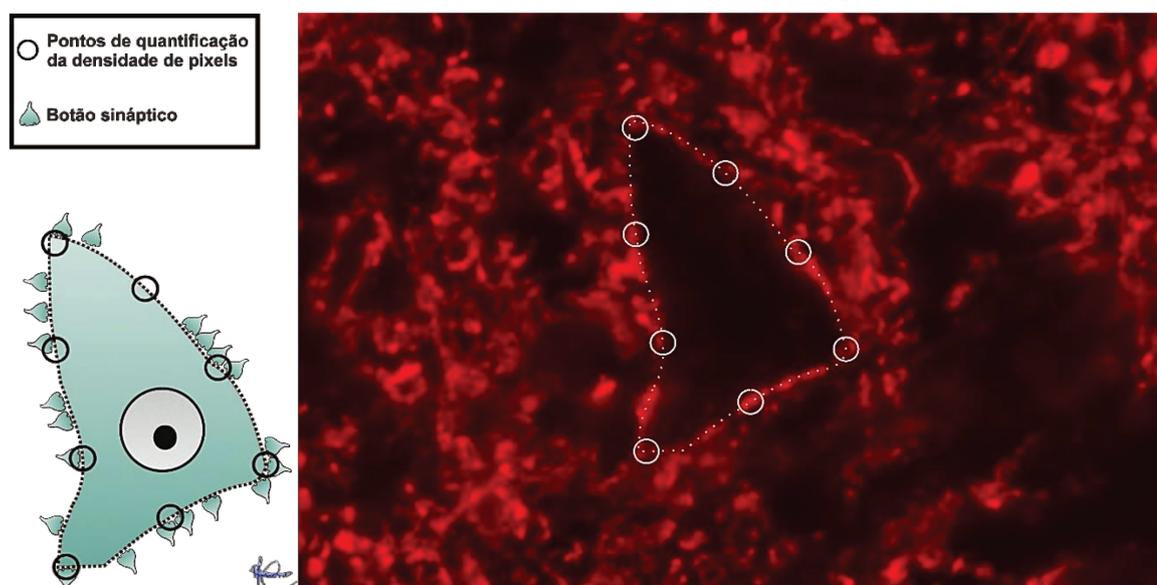
Alvo	Hospedeiro	Conjugado	Diluição	Marca	Código
Sinaptofisina*	Coelho	-	1:1000	Novus Biologicals	NBP2-25170
Iba-1*	Coelho	-	1:750	Wako	019-19741
GFAP*	Coelho	-	1:750	Abcam	AB7260
MHC Class I*	Rato	-	1:100	BMA Biomedicals	T-2105
LILRB2*	Coelho	-	1:400	Bioss Antibodies	bs-7349R
IgG de Coelho**	Macaco	Alexa Fluor® 488	1:350	Jackson ImmunoResearch	711-545-152
IgG de Coelho**	Macaco	Cy2	1:250	Jackson ImmunoResearch	711-225-152
IgG de Coelho**	Macaco	Cy3	1:500	Jackson ImmunoResearch	711-165-152
IgG de rato**	Macaco	Cy3	1:200	Jackson ImmunoResearch	712-165-153

Anticorpos primários\* e secundários\*\*

#### 4.8 QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA

As imagens capturadas e salvas com auxílio do microscópio de fluorescência foram quantificadas posteriormente, em densidade integrada de pixels, utilizando-se software específico (*ImageJ 1.48v Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA*). A lâmina IX de Rexed, da coluna anterior da medula espinal, ipsilateral à lesão nervosa periférica, em um aumento de 20x, foi a área quantificada para os anticorpos Iba-1, GFAP, MHC-I e PirB. Os dados foram expressos como a média da razão do lado ipsilateral pelo controle negativo de cada linhagem (GFAP, MHC-I e PirB) ou como a média dos valores absolutos da densidade integrada de pixels (unidade arbitrária), quando constatamos diferença entre os controles negativos de ambas as linhagens (Iba-1).

Já para sinaptofisina, as imagens foram capturadas em aumento de 40x e realizou-se a quantificação da densidade integrada de pixels em oito pontos equidistantes (e com o mesmo diâmetro) ao redor do motoneurônio avaliado, na Lâmina IX de Rexed (**Figura 6**). Os dados foram expressos como a média da razão do lado ipsilateral pelo contralateral, de cada secção.



**Figura 6.** Imagem ilustrativa da quantificação da marcação anti-sinaptofisina. Analisou-se, em imagens com aumento de 40x, oito pontos equidistantes ao redor do corpo de motoneurônios da coluna anterior da medula espinal.

#### 4.9 PCR EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

Os animais C57BL/6J e A/J foram submetidos ao esmagamento do nervo isquiático (n=3 por linhagem), em ambiente adequado, e aqueles que não sofreram lesão (C57BL/6J, n=4; A/J, n=3) foram utilizados como controle negativo. No sétimo dia após a lesão (período de maior retração sináptica) os camundongos sofreram eutanásia por overdose anestésica (quetamina e xilasina – dopalen e anasedan, respectivamente) e foram perfundidos transcardicamente com sacarose (30%, 4°C) através do ventrículo esquerdo. A medula espinal desses animais, na altura da intumescência lombar, foi coletada e em seguida congelada em meio de congelamento tecidual (*Tissue-Tek, Sakura-4583*) em n-hexano PA (*Synth*) gelado (-35°C).

Dissecções com 12 µm de espessura foram obtidas em criostato e dispostas em lâminas *RNAse free*, sendo, em seguida armazenadas em biofreezer (-80°C) para posterior microdissecção (*Laser Microdissection (PALM)*) no *Laboratory Of Multiuser Equipment* do *Laboratory of Molecular Genetics* na Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp).

Para que fosse possível visualizar os motoneurônios da lâmina IX de Rexed, para microdissecção, realizou-se coloração para a técnica com kit específico (*Arcturus® HistoGene® LCM Frozen Section Staining Kit, ThermoFisher, KIT 0401*), que, em resumo, trata-se de banhos de etanol 75%, 95% e 100%, água destilada e xilol, além do corante contido no kit. O RNA das amostras coletadas foi isolado com kit específico (*Arcturus® PicoPure® RNA Isolation Kit, ThermoFisher, KIT 0204*), utilizando-se tampão de extração, condicionamento, água, etanol 70% e passando por colunas de purificação. Vale ressaltar que durante o isolamento do RNA, realizou-se tratamento com DNase, também descrito pelo fabricante.

Em seguida, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 20ng de RNA, usando-se um kit específico e seguindo-se as instruções do fabricante (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, número do catálogo: 4374966*). Ao RNA isolado (10µL) foi acrescentado um volume igual de uma mistura de reagentes, contendo tampão de reação, dNTP, primers, inibidor de RNase, transcriptase reversa e água. As amostras foram levadas ao termociclador, onde o cDNA foi sintetizado (a 37°C, 120min).

Em vista da baixa quantidade de RNA previamente obtido, realizou-se a pré-amplificação do cDNA referente aos genes de interesse (**Tabela 2**), a partir de um kit específico (*TaqMan™ PreAmp Master Mix Kit, catalog number: 4384267*). Em resumo, para cada amostra de cDNA (12,5µL), foi acrescentada uma mistura de igual volume, contendo todos os primers (ensaios TaqMan) diluídos em água, à concentração final de 0,05x cada. Em seguida, foram adicionados 25µL de *TaqMan PreAmp Master Mix* (2x) e as amostras foram amplificadas (1º ciclo: 10min, 95°C; seguido de 10 ciclos: 15s, 95°C, 4min, 60°C).

Por fim, as amostras (em triplicatas) foram amplificadas por meio da reação de RT-PCR em tempo real. Para cada uniplicata, foi adicionado o produto da pré-amplificação (1/2,5 diluído em água; 5µL), o ensaio TaqMan (primer mais sonda,

20x; 1µL; Tabela 2), água (4µL) e o reagente *TaqMan Gene Expression Master Mix 2x* (*TaqMan™ Gene Expression Master Mix, catalog number: 4369016*; 10µL). A reação se deu no termociclador, da seguinte maneira: 1º ciclo, 10min, 95°C; 45 ciclos seguintes, 10s, 95°C, 1min, 60°C. Após análise pelo plug in “*Best Keeper*” (*Biotechnology Letters, 26:509-512*), o gene GAPDH foi escolhido como o endógeno apropriado. A expressão dos demais genes, normalizados pelo GAPDH, foi obtida aplicando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , em que cada linhagem teve como calibrador seu respectivo controle negativo.

**Tabela 2.** Relação de ensaios TaqMan (*Life Technologies*) utilizados na qRT-PCR

Gene	Código
<i>b2m</i>	Mm00437762_m1
<i>pirb</i>	Mm01700366_m1
<i>crmp2</i>	Mm00515559_m1
<i>cofilina</i>	Mm03057591_g1
<i>trkb</i>	Mm00435422_m1
<i>shp2</i>	Mm00448434_m1
<i>gapdh</i>	Mm99999915_g1
<i>hprt1</i>	Mm01545399_m1

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados comportamentais e histológicos (imunofluorescência), realizou-se ANOVA de uma via nas análises individuais (dentro da mesma linhagem), seguido do pós-teste Turkey de comparações múltiplas. Quanto às análises interlinhagens, realizou-se ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Sidak's de comparações múltiplas. Ademais, utilizou-se o teste t de Student nos controles negativos, a fim de se identificar possíveis diferenças no estado basal das imunomarcações entre as linhagens. Com relação aos dados de expressão gênica

(qRT-PCR), aplicou-se o teste t de Student nas comparações entre as linhagens, sete dias após a lesão.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 COBERTURA SINÁPTICA

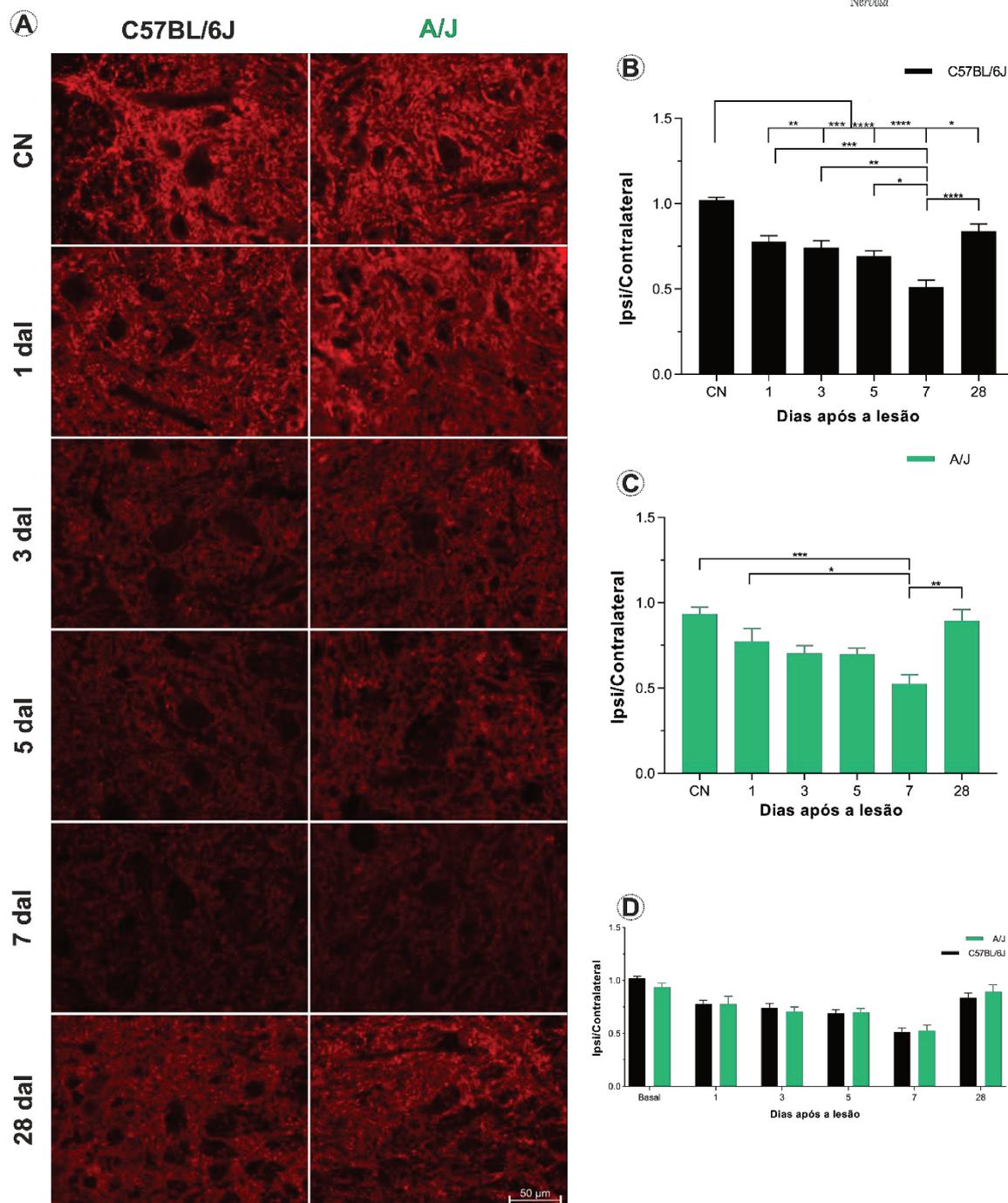
Realizou-se imunofluorescência para sinaptofisina em animais de todos os grupos experimentais, pois se trata de uma proteína presente nas vesículas dos terminais pré-sinápticos. Mudanças na expressão desse marcador na medula espinal foram vistas ao longo do tempo, após o esmagamento do nervo isquiático esquerdo (**Figura 7A**).

Os animais C57BL/6J apresentaram uma diminuição progressiva na expressão de sinaptofisina até o sétimo dia após a lesão (7 dal), quando há maior retração sináptica (**Figura 7B**). No primeiro dia após a lesão, já se observa uma redução de cerca de 24% da cobertura sináptica (CN x 1 dal,  $p < 0,01$ ), a qual diminui em 50% no sétimo dia após a lesão (CN x 7 dal,  $p < 0,0001$ ). No vigésimo oitavo dia após a lesão, observa-se uma recuperação da cobertura sináptica, contudo, ainda inferior àquela do grupo intacto (CN x 28 dal,  $p < 0,05$ ).

Os camundongos A/J também apresentaram uma diminuição progressiva na cobertura sináptica ao longo do tempo (**Figura 7C**), porém, o controle negativo se diferencia estatisticamente dos demais grupos apenas no dia 7, quando há queda de aproximadamente 50% da imunomarcagem de sinaptofisina (CN x 7 dal,  $p < 0,001$ , **Figura 7C**). É interessante notar que ao vigésimo oitavo dia, a cobertura sináptica volta a se equiparar ao controle negativo (1dal x 28 dal,  $p > 0,05$ ).

Por fim, ao compararmos as linhagens entre si, não observamos diferenças pontuais na expressão de sinaptofisina (**Figura 7D**).

## Sinaptofisina

Laboratório de  
Regeneração  
Nervosa

**Figura 7.** Comparação da cobertura sináptica, através da imunomarcagem de sinaptofisina, nas linhagens C57BL/6J e A/J, ao longo do tempo. **(A)** Imagens representativas da cobertura sináptica na medula espinal. Observa-se uma diminuição progressiva da cobertura sináptica, até o sétimo dia após a lesão (7 dal), com recuperação ao 28º dal, em ambas as linhagens. É possível observar com maior detalhamento essas diferenças tanto nos camundongos C57BL/6J **(B)** quanto nos A/J **(C)**. Não se observou diferença entre as linhagens **(D)**. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

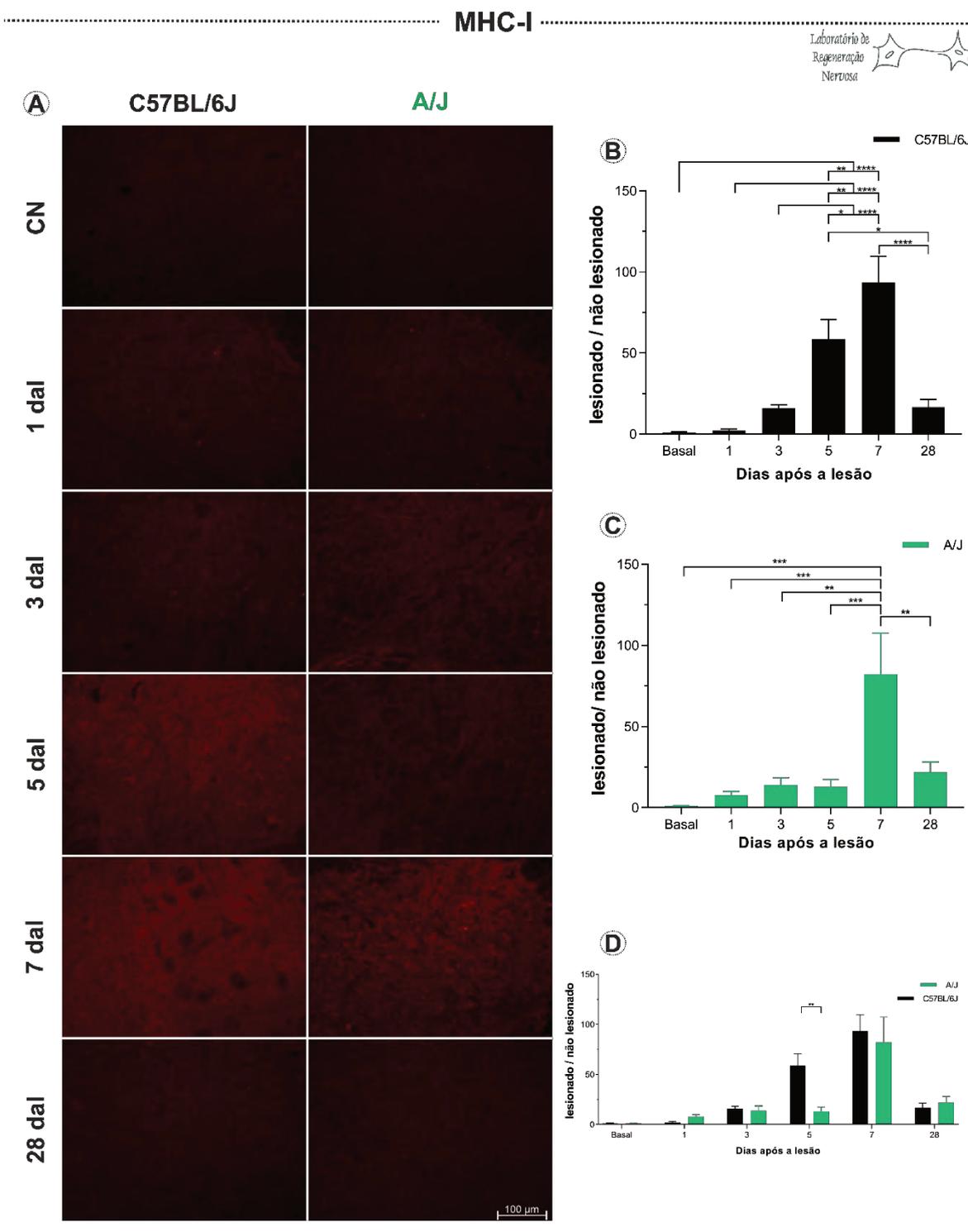
## 5.2 EXPRESSÃO DE MHC-I

Analisou-se, ao longo do tempo, a reatividade da molécula de MHC-I na medula espinal dos camundongos C57BL/6J e A/J, após lesão nervosa periférica (**Figura 8A**). Em ambas as linhagens, a imunomarcacão é menos intensa no controle negativo, elevando-se após a lesão, com predomínio na região da glia e dendritos (**Figura 8A**).

Nos animais C57BL/6J observamos aumento progressivo da expressão de moléculas do MHC-I após o esmagamento do nervo isquiático (**Figura 8B**), o qual passa a ser estatisticamente significativo no quinto dia após a lesão (CN x 5 dal,  $p < 0,01$ ), atingindo o pico no sétimo dia (aumento de 92 vezes, CN x 7 dal,  $p < 0,0001$ ; **Figura 8B**). Vale observar que não há diferença entre o quinto e o sétimo dia após lesão (5 dal x 7 dal,  $p > 0,05$ ) e, no vigésimo oitavo dia, os valores decaem, se aproximando àqueles do controle negativo (CN x 28 dal,  $p > 0,05$ ).

Similarmente aos camundongos C57BL/6J Unib, os animais A/J apresentaram pico de marcação no sétimo dia após a lesão (aumento de 81 vezes, CN x 7 dal,  $p = 0,0001$ ; **Figura 8C**). Contudo, o aumento da expressão de moléculas do MHC-I não foi progressivo, ou seja, não constatamos diferenças entre o controle negativo e outro grupo intermediário ao dia 7. Ao vigésimo oitavo dia, os valores da imunomarcacão de MHC-I diminuem, se equiparando ao basal (CN x 28 dal,  $p > 0,05$ ).

Quando realizada a comparação entre as linhagens C57BL/6J e A/J, observou-se maior expressão de MHC-I nos animais C57BL/6J no quinto dia após a lesão ( $p < 0,005$ , **Figura 8D**).



**Figura 8.** Expressão de moléculas de MHC-I nas linhagens C57BL/6J e A/J, ao longo do tempo. **(A)** Imagens representativas da imunomarcagem de MHC-I na medula espinal. Observa-se diferença na expressão de MHC-I ao longo do tempo, em que a linhagem C57BL/6J **(B)** apresenta um aumento progressivo, com pico no 7 dal, ao passo que a linhagem A/J **(C)** apresenta um aumento súbito na marcação no 7 dal. As linhagens só apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no 5 dal **(D)**. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

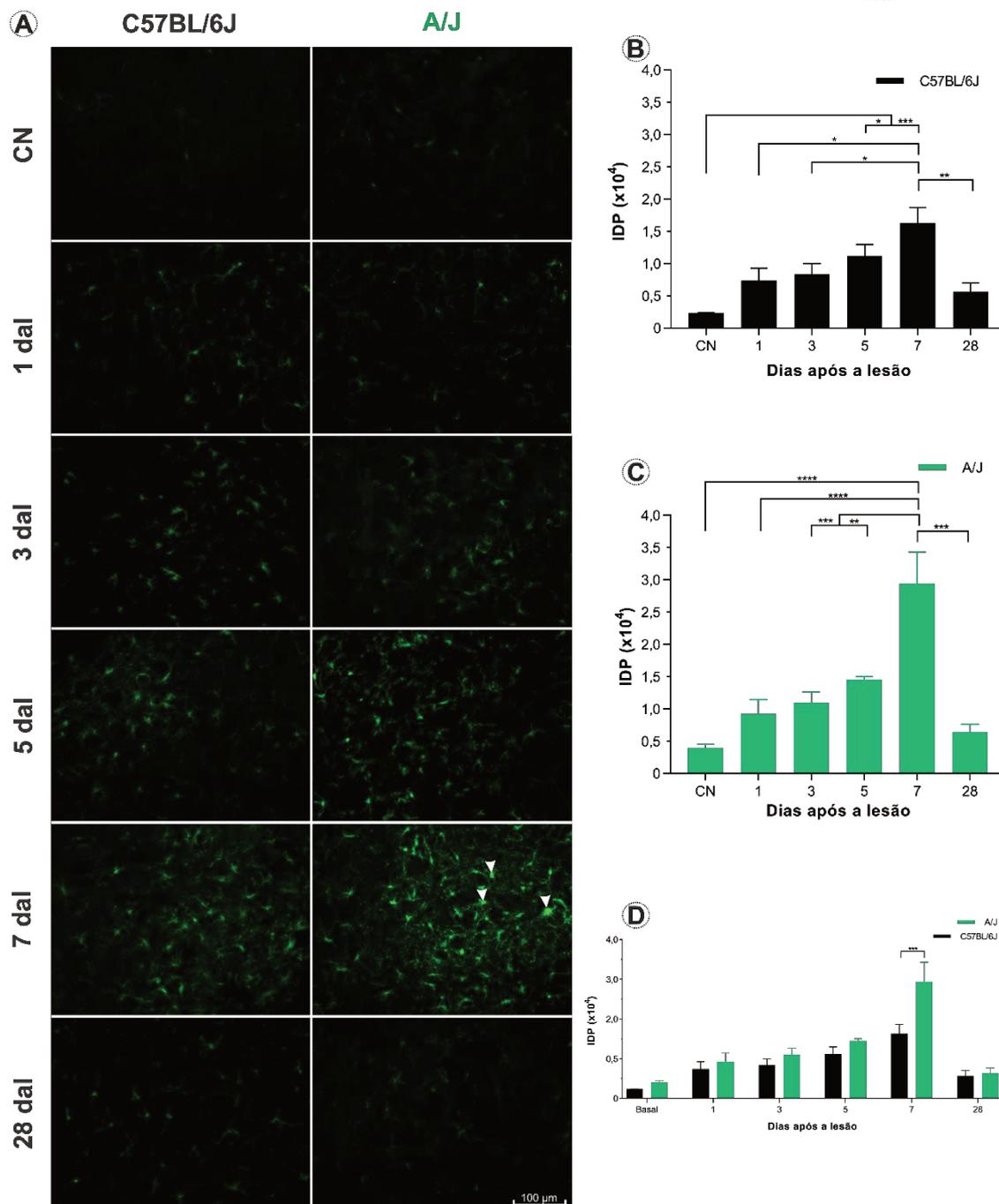
### 5.3 REATIVIDADE MICROGLIAL

A reatividade microglial foi avaliada com base na imunomarcção de Iba-1, uma proteína ligante de cálcio característica de macrófagos. Em ambas as linhagens, observamos que as células se tornam mais hipertróficas após a lesão, ou seja, há um intumescimento do corpo celular, acompanhado por retração dos prolongamentos (**Figura 9A**, setas). Além disso, na primeira semana após a lesão observamos maior quantidade de células na região ipsilateral da medula, característica de hiperplasia (**Figura 9A**).

Os animais C57BL/6J apresentam aumento crescente de imunomarcção até o dia sete após a lesão, quando se deu um pico de expressão de Iba-1 (**Figura 9B**). Ao compararmos o controle negativo (basal) com os demais grupos, observamos maior reatividade microglial nos dias 5 (CN x 5 dal,  $p < 0,05$ ) e sete após a lesão (CN x 7dal,  $p = 0,001$ ), sendo que no dia 28 os valores decaem (7 x 28 dal,  $p < 0,01$ ) e se aproximam do basal (CN x 28 dal,  $p > 0,05$ ).

Nos camundongos A/J observamos uma dinâmica parecida, com pico de marcação no dia 7 (CN x 7dal,  $p < 0,0001$ ) e queda no dia 28 (7 x 28 dal,  $p < 0,001$ ), quando os valores se aproximam do nível basal (CN x 28 dal,  $p > 0,05$ ) (**Figura 9C**).

Por meio da análise de variância de duas vias, constatamos que a linhagem A/J apresentou aproximadamente o dobro de reatividade microglial que os animais C57BL/6J no dia 7 ( $p < 0,001$ ; **Figura 9D**), não diferindo nos demais dias após a lesão. Contudo, vale destacar que a comparação entre os controles de ambas as linhagens nos revelou que os animais A/J apresentam, em condições basais, aproximadamente 65% mais Iba-1 que os C57BL/6 J ( $p < 0,05$ , teste t de Student).



**Figura 9.** Reatividade microglial nas linhagens C57BL/6J e A/J, após lesão nervosa periférica. **(A)** Imagens representativas da imunomarcagem de Iba-1 na medula espinal. As setas indicam células hipertróficas. A linhagem C57BL/6J **(B)** apresenta aumento progressivo na expressão de Iba-1, atingindo o pico de imunomarcagem no dia 7 após a lesão. A linhagem A/J **(C)** também apresenta aumento gradual da reatividade microglial, com pico no dia 7., mesmo dia em que se difere da linhagem C57BL/6J **(D)**. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

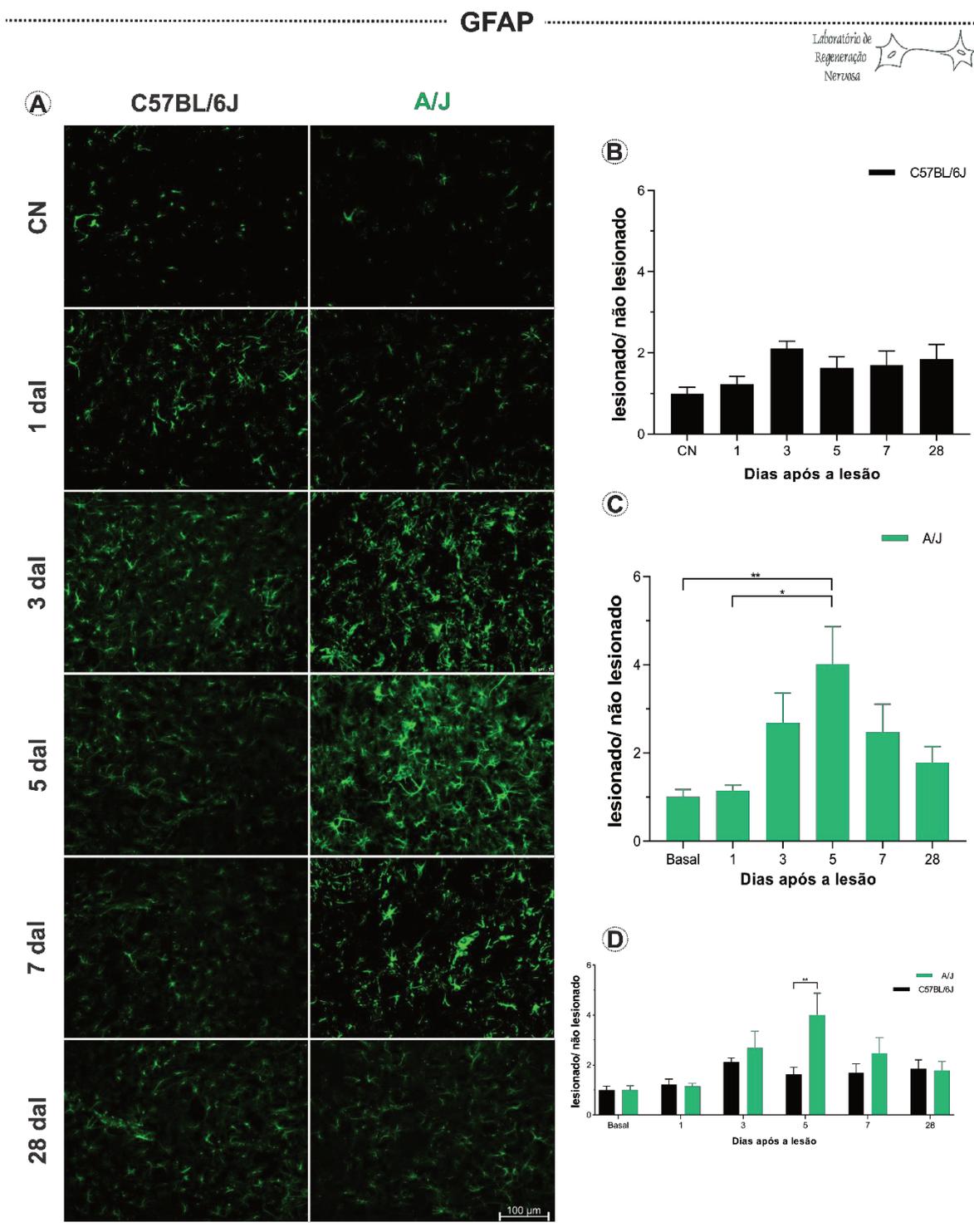
#### 5.4 REATIVIDADE ASTROGLIAL

A reatividade astroglial foi analisada por meio da imunomarcacão de GFAP, uma proteína do citoesqueleto que, no SNC, é expressa apenas por astrócitos. Em ambas as linhagens  possível observar que, após a lesão, ocorre um aumento na quantidade dessas células na região ipsilateral  lesão, muitas das quais se encontram claramente hipertróficas (**Figura 10A**).

A linhagem C57BL6/J não apresenta alteraces significativas na quantificaco de GFAP ao longo do tempo (**Figura 10B**), todavia, existe uma tendência de aumento da imunomarcacão no terceiro dia, quando os níveis de GFAP passam a ser aproximadamente o dobro em comparaco  aqueles do controle negativo (CN x 3 dal,  $p=0,06$ ; **Figura 10B**).

Na linhagem A/J (**Figura 10C**), observa-se um aumento crescente até o quinto dia após lesão, quando há o quádruplo de marcação, em comparaco ao controle negativo (CN X 5 dal,  $p<0,01$ ).

Entre as linhagens, há diferença apenas no quinto dia após lesão ( $p=0,001$ ), como mostra a **Figura 10D**.



**Figura 10.** Comparação da reatividade astrogliar nas linhagens C57BL/6J e A/J após lesão nervosa periférica. **(A)** Imagens representativas da imunomarcção de GFAP na medula espinal. Observam-se variações na expressão de GFAP ao longo do tempo em ambas as linhagens, contudo, na linhagem C57BL/6J essa variação não é significativa. **(B)** A linhagem A/J apresenta pico de astrogliose no quinto dia após a lesão, mesmo dia em que se diferencia do grupo C57BL/6 J pelo aumento da imunomarcção **(C)**. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

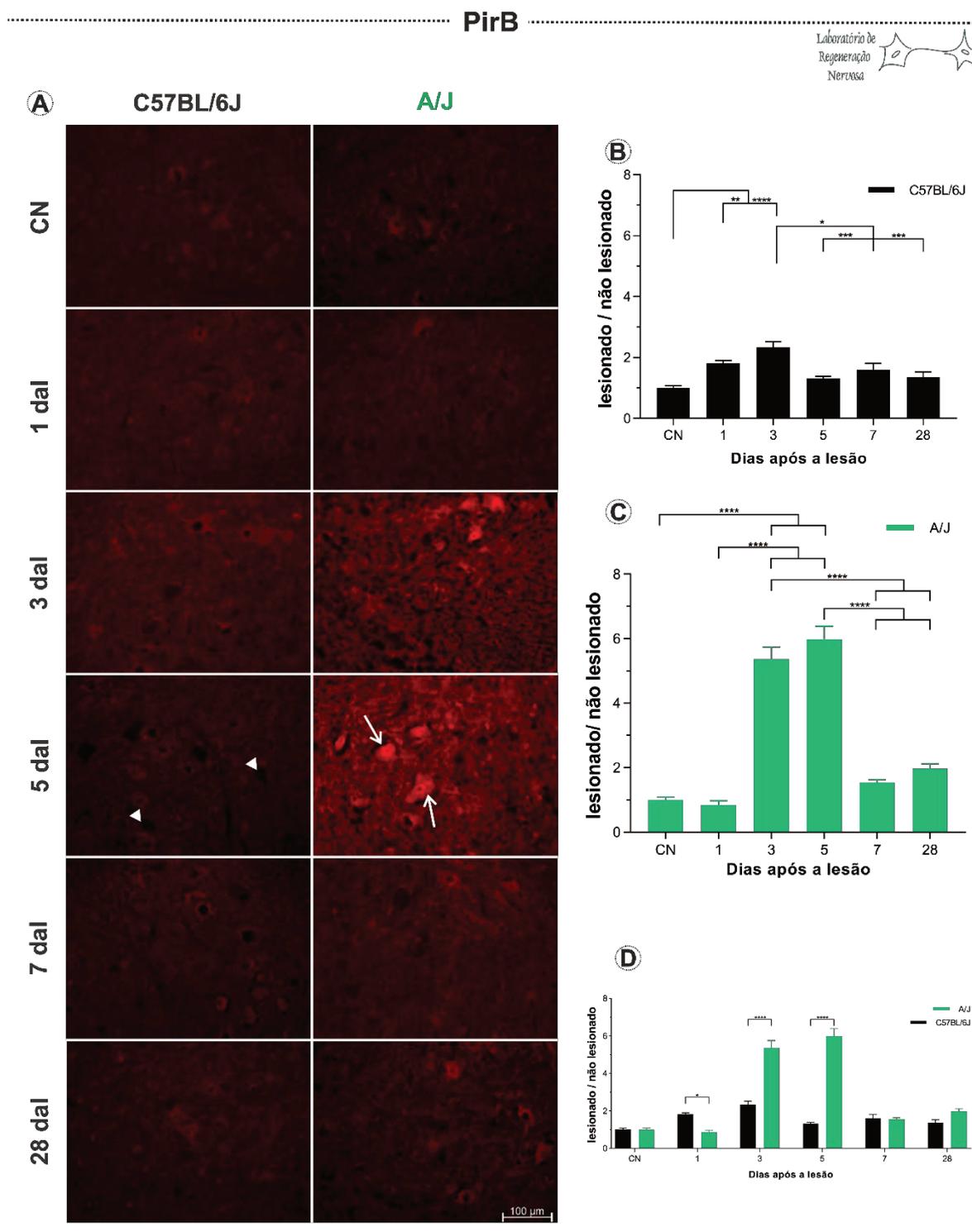
## 5.5 EXPRESSÃO DE PIRB

A imunomarcção de PirB foi observada tanto no controle negativo, quanto em todos os demais grupos após a lesão, em ambas as linhagens (**Figura 11A**). É interessante notar que, em todos os grupos, há neurônios imunomarcados para PirB, porém, à medida que a marcação se intensifica no tecido, ela torna-se mais evidente na glia e nos dendritos (neurópilo) (**Figura 11A**). Não é regra que todos os neurônios de uma mesma região estejam marcados, pois observamos a imagem negativa de motoneurônios em regiões marcadas com PirB (**Figura 11A**).

Na linhagem C57BL/6J se observa um pequeno aumento na expressão de PirB no primeiro dia após lesão, quando comparado ao controle negativo, (CN x 1 dal,  $p < 0,01$ ; **Figura 11B**). Contudo, o pico de expressão de PirB se deu no terceiro dia após lesão (CN x 3 dal,  $p < 0,0001$ ), decaindo no quinto dia (3dal x 5dal,  $p < 0,001$ ), a partir de quando se aproxima do basal (**Figura 11B**).

Na linhagem A/J, observa-se que a expressão de PirB é aproximadamente cinco vezes maior no terceiro e quinto dia após lesão, em comparação ao controle negativo (CN x 3 dal,  $p < 0,0001$ ; CN x 7 dal,  $p < 0,0001$ ; **Figura 11C**). No sétimo dia há queda na expressão de PirB, com valores próximos ao basal, que se mantêm até o dia 28 (Figura 11C).

Quando comparadas as linhagens entre si, observa-se que no primeiro dia após a lesão, a expressão de PirB é maior no grupo C57BL/6J ( $p < 0,05$ ), ao passo nos dias 3 e 5 esse cenário se inverte, ou seja, os animais A/J apresentam mais PirB ( $p < 0,0001$  nos dois tempos; **Figura 11D**). Entre os grupos controle negativo, sete e 28 dias, não observamos diferenças (**Figura 11D**).

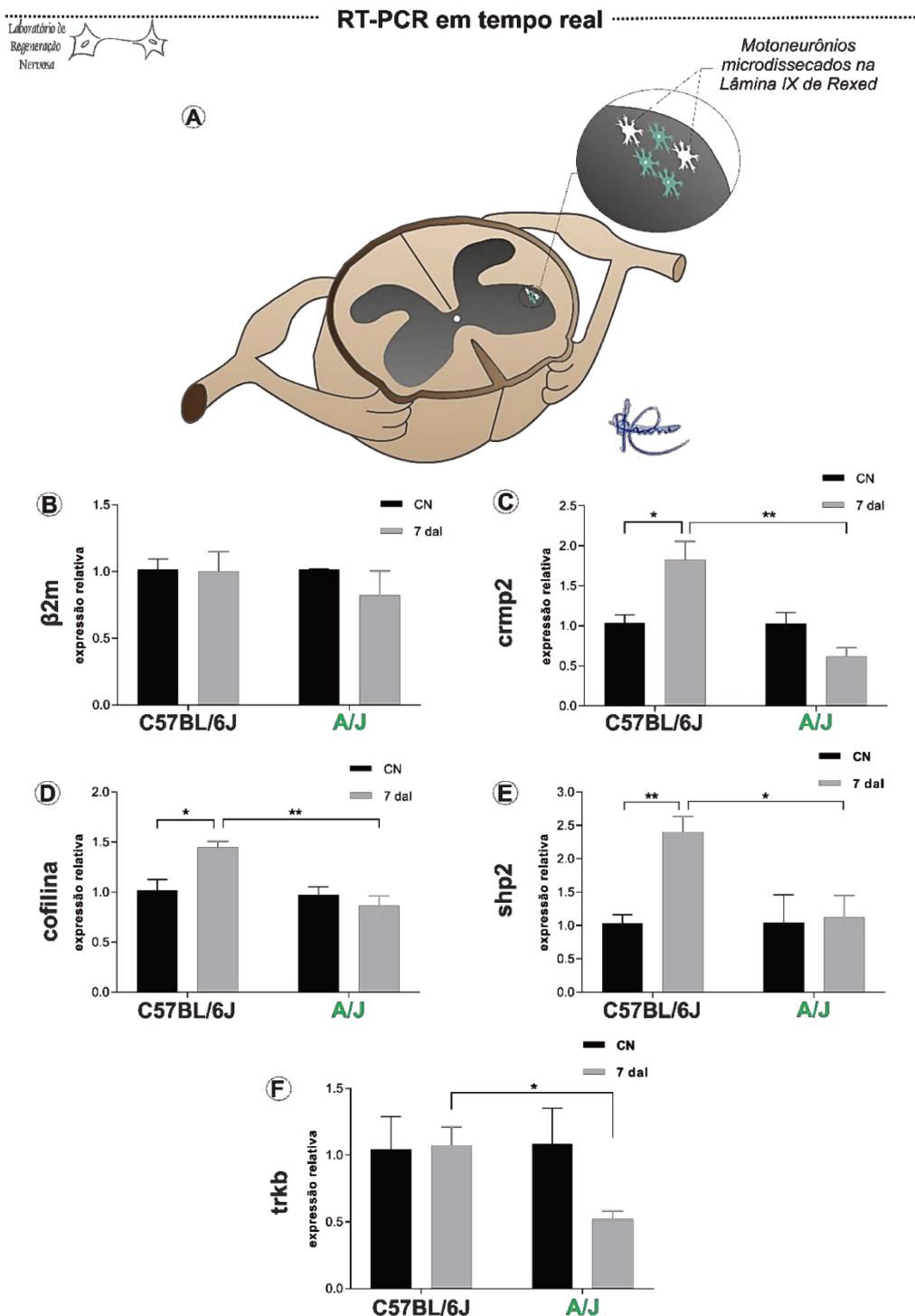


**Figura 11.** Expressão de PirB nas linhagens C57BL/6J e A/J, após lesão nervosa periférica. **(A)** Imagens representativas da imunomarcação de PirB na medula espinal. As pontas de setas e setas indicam corpos de neurônios não marcados e marcados, respectivamente. A linhagem C57BL6J **(B)** apresentou pico de expressão de PirB no terceiro dia após a lesão, enquanto que os animais A/J **(C)** alcançam o pico no quinto dia após lesão. **(D)** As linhagens apresentam diferenç a entre si no primeiro, terceiro e quinto dia após a lesão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## 5.6 RT-PCR EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

Com base na quantificação da sinaptofisina, demos sequência à análise da expressão gênica de beta-2 microglobulina (subunidade da molécula de MHC-I), PirB e componentes da cascata de sinalização de PirB (*crmp2*, *cofilina*, *trkb* e *shp2*). Então, motoneurônios foram microdissecados da lâmina IX de Rexed da medula espinal de camundongos de ambas as linhagens, no período em que houve maior retração sináptica (7 dias após lesão), bem como em condições basais (**Figura 12A**).

Nenhuma diferença foi observada quanto à expressão de *b2m* nos animais C57BL/6J e A/J (**Figura 12B**). Curiosamente, não houve amplificação de *pirb*, tanto em condições basais, quanto 7 dias após a lesão em ambas as linhagens. Com relação às demais moléculas, observamos que a lesão periférica estimulou aumento da expressão de *crmp2*, *cofilina* e *shp2* nos animais C57BL/6J, porém, manteve inalterada a expressão dos mesmos genes na linhagem A/J (**Figura 12C – E**). Ao compararmos as linhagens entre si, vemos que no sétimo dia, a expressão de *crmp2*, *cofilina*, *shp2* e *trkb* é maior nos animais C57BL/6J (**Figura 12C – F**).



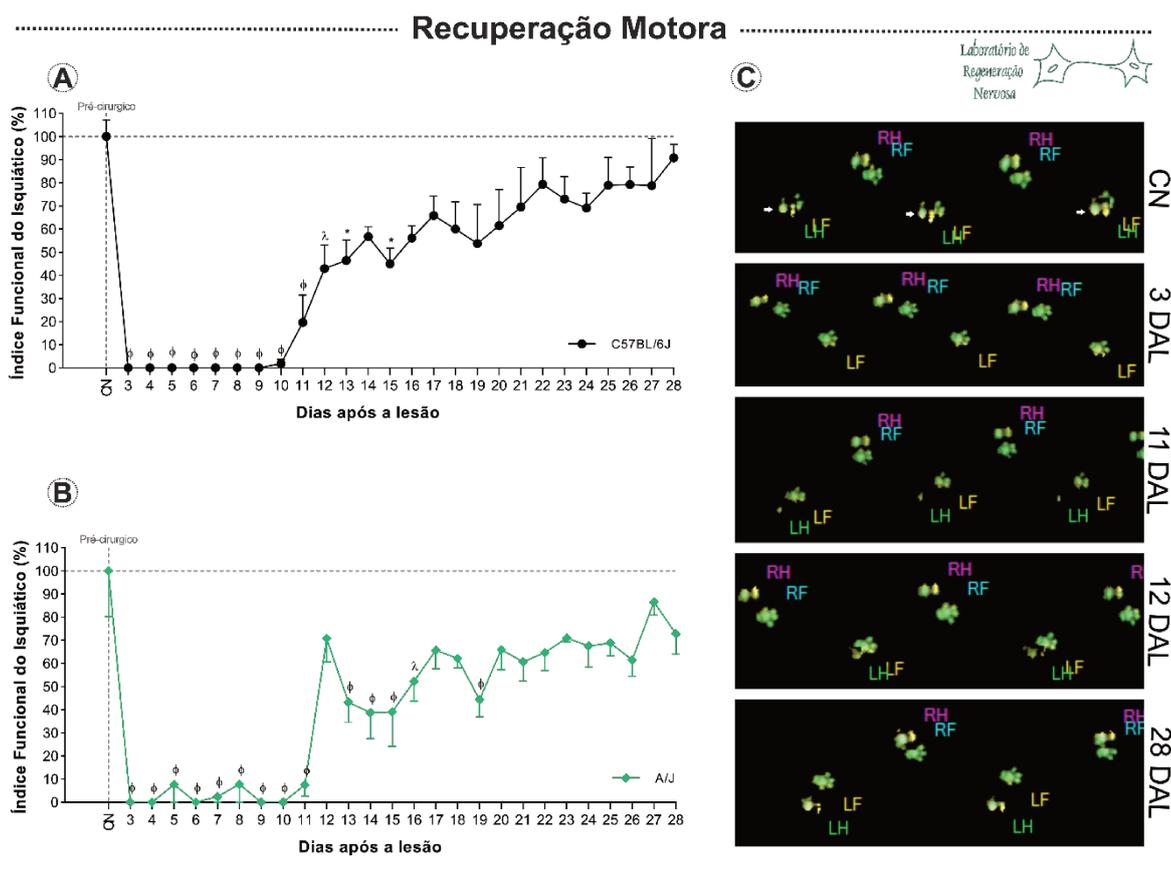
**Figura 12.** Expressão relativa de beta-2 microglobulina ( $\beta 2m$ ) e dos genes envolvidos na cascata de sinalização de PirB (*trkb*, *cofilina*, *crmp2* e *shp2*) em motoneurônios da medula espinal. No dia 7 após a lesão (7 dal), não observamos diferença na expressão gênica de  $\beta 2m$  entre as linhagens (A), contudo, constatamos maior expressão de *crmp2* (C), *cofilina* (D), *shp2* (E) e *trkb* (F) nos animais C57BL/6J em comparação aos A/J. Ainda, a expressão desses genes não se alterou entre os animais A/J (B-F), ao passo que nos camundongos C57BL/6J, a lesão estimulou a expressão de *crmp2* (C), *cofilina* (D) e *shp2* (E). dal = dias após lesão/ CN = Controle Negativo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

## 5.7 RECUPERAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA

Não foram encontradas diferenças significativas no índice funcional do isquiático (SFI), ao longo do tempo, entre as linhagens estudadas (ANOVA de duas vias,  $P>0,05$ ). Porém, quando analisados isoladamente, notam-se algumas diferenças no padrão de recuperação da marcha.

Nos camundongos C57BL/6J (**Figura 13A**), observa-se que o SFI diminui para zero aos 3 dias após a lesão, indicando perda total dos movimentos. Valores nulos ou próximos a zero são observados até o 10º dia, a partir de quando os animais voltam a recuperar gradativamente os movimentos. Durante a recuperação da marcha, pequenas oscilações nos valores do SFI são observadas. Observamos que, no 14º dia, o SFI foi próximo a 57%, sem que houvesse diferença significativa em relação ao pré-operatório (basal, equivalente a 100%, ANOVA de uma via,  $p>0,05$ ). Contudo, ocorreu uma pequena queda no 15º dia (basal vs 15d:  $P<0,05$ ), que foi revertida no 16º dia, a partir de quando não observamos mais diferenças em relação ao pré-operatório. Cabe ressaltar que aos 28 dias o valor do SFI corresponde a aproximadamente 91% do basal.

Para a linhagem A/J (**Figura 13B**), observa-se um comportamento semelhante ao da linhagem C57BL/6J nos primeiros dias, quando os valores do SFI permaneceram próximos a zero, com uma pequena variação até o 11º dia (-1d vs 3 a 11d,  $P<0,001$ ). Contudo, no 12º dia os animais A/J apresentaram melhora substancial, com a média do SFI próxima a 70%, não havendo mais diferença estatística quando comparado ao pré-operatório ( $P>0,05$ ). Curiosamente, no dia seguinte (13º) há uma regressão notável no SFI, que permanece em queda até o 16º dia ( $P<0,01$ ). A partir desse ponto os animais melhoram progressivamente, contudo, ocorrendo uma queda transitória no 19º dia (-1d vs 19d,  $P<0,001$ ). Ao fim do experimento (28º dia), a média do SFI é de aproximadamente 73% em relação ao basal.



**Figura 13.** Recuperação da Função Motora. Índice Funcional do Isquiático, ao longo do tempo, das linhagens (a) C57BL/6J e (b) A/J.  $\phi = P < 0,001$ ;  $\lambda = P < 0,01$ ;  $* = P < 0,05$  em relação ao controle negativo (CN). (c) Captura das pegadas da linhagem C57BL/6J, realizada pelo sistema CatWalk, em diferentes dias. As setas brancas apontam para a pata posterior esquerda (LH), que está ausente no 3º dia após a lesão (DAL). RF, right front (pata anterior direita); RH, right hind (pata posterior direita); LF (pata anterior esquerda).

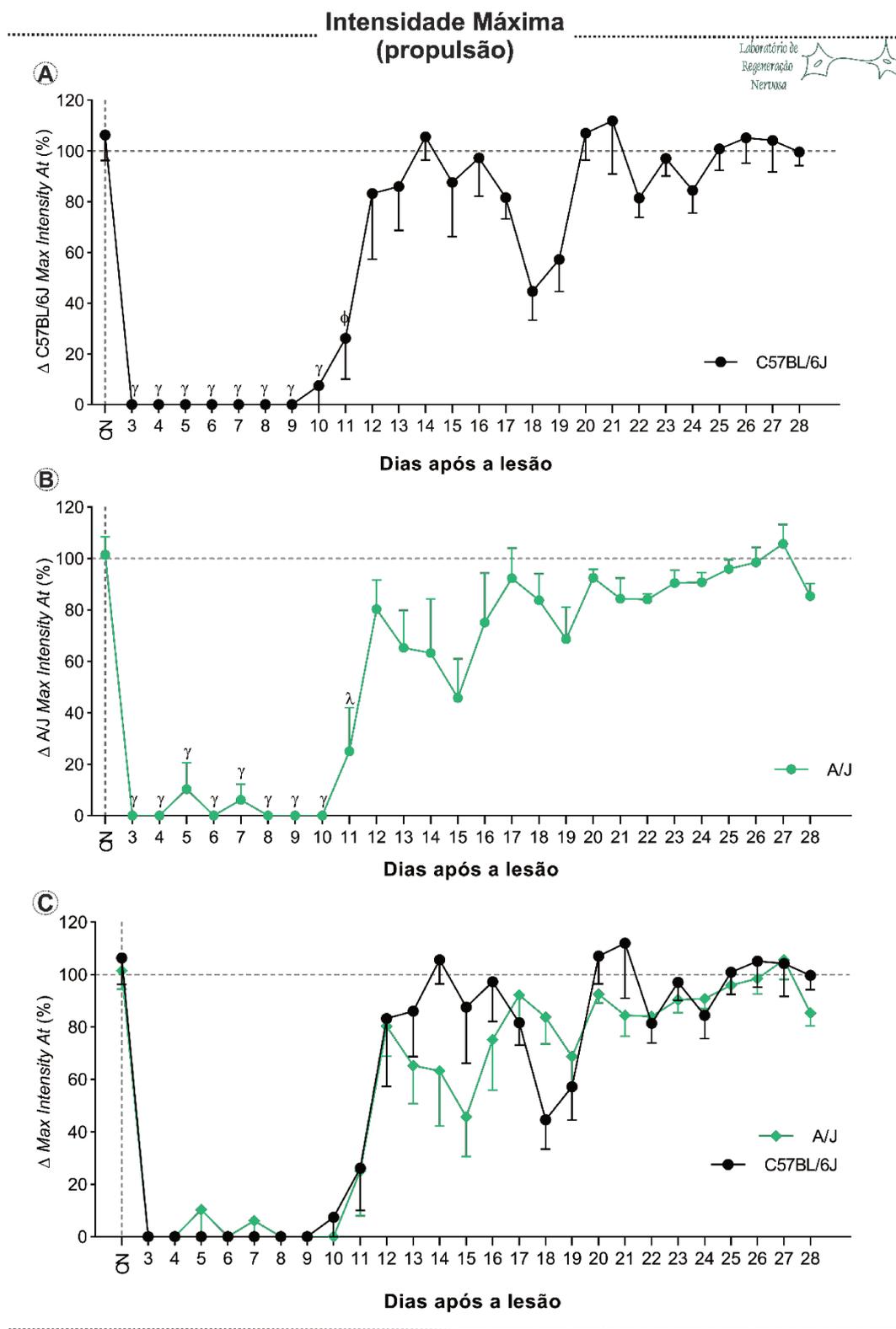
## 5.8 INTENSIDADE MÁXIMA DE PRESSÃO DURANTE A PROPULSÃO

A intensidade máxima de pressão exercida pela pata durante a fase de apoio é uma medida que, indiretamente, está relacionada à propulsão. Sua diminuição pode sugerir aumento da sensibilidade ou desuso do membro.

Valores nulos ou próximos a zero foram vistos do terceiro ao décimo dia após a cirurgia em ambas as linhagens, ocorrendo uma pequena melhora no 11º dia (Figura 14). Contudo, apenas no 12º dia há um aumento relevante na intensidade aplicada pela pata lesionada, de 83% para os animais C57BL/6J (Figura 14A) e 80% para os A/J (Figura 14B) quando comparados ao valor basal.

A partir do 12º dia, não observamos mais diferenças significativas em relação ao pré-operatório para ambas as linhagens. Contudo, nos chama atenção a ocorrência de duas quedas nos valores da máxima intensidade no grupo C57BL/6 J no restante do experimento. A primeira delas, mais marcante, ao 18º dia e a segunda, menos evidente, ao 22º dia. Em ambos os casos não houve diferença em comparação ao pré-operatório (**Figura 14A**). O mesmo padrão foi constatado para o grupo A/J, porém, houve uma queda marcante no 15º dia e uma segunda, mais sutil, no 19º dia. Novamente, não observamos diferenças em relação ao pré-operatório (**Figura 14B**). Ao 28º dia os animais C57BL/6J recuperaram 99,6% da intensidade em relação ao pré-operatório, ao passo que os A/J apresentam 85,3%.

De acordo com a ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni, não houve diferença entre as linhagens ao longo do tempo.



**Figura 14.** Intensidade Máxima de pressão na fase de apoio. Média da intensidade máxima de pressão ao longo do tempo, dos animais da linhagem (A) C57BL/6J, (B) A/J ou (C) ambas.  $\gamma$ ,  $P < 0,0001$ ;  $\phi$ ,  $P < 0,001$ ;  $\lambda$ ,  $P < 0,01$  em comparação ao basal (ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni).

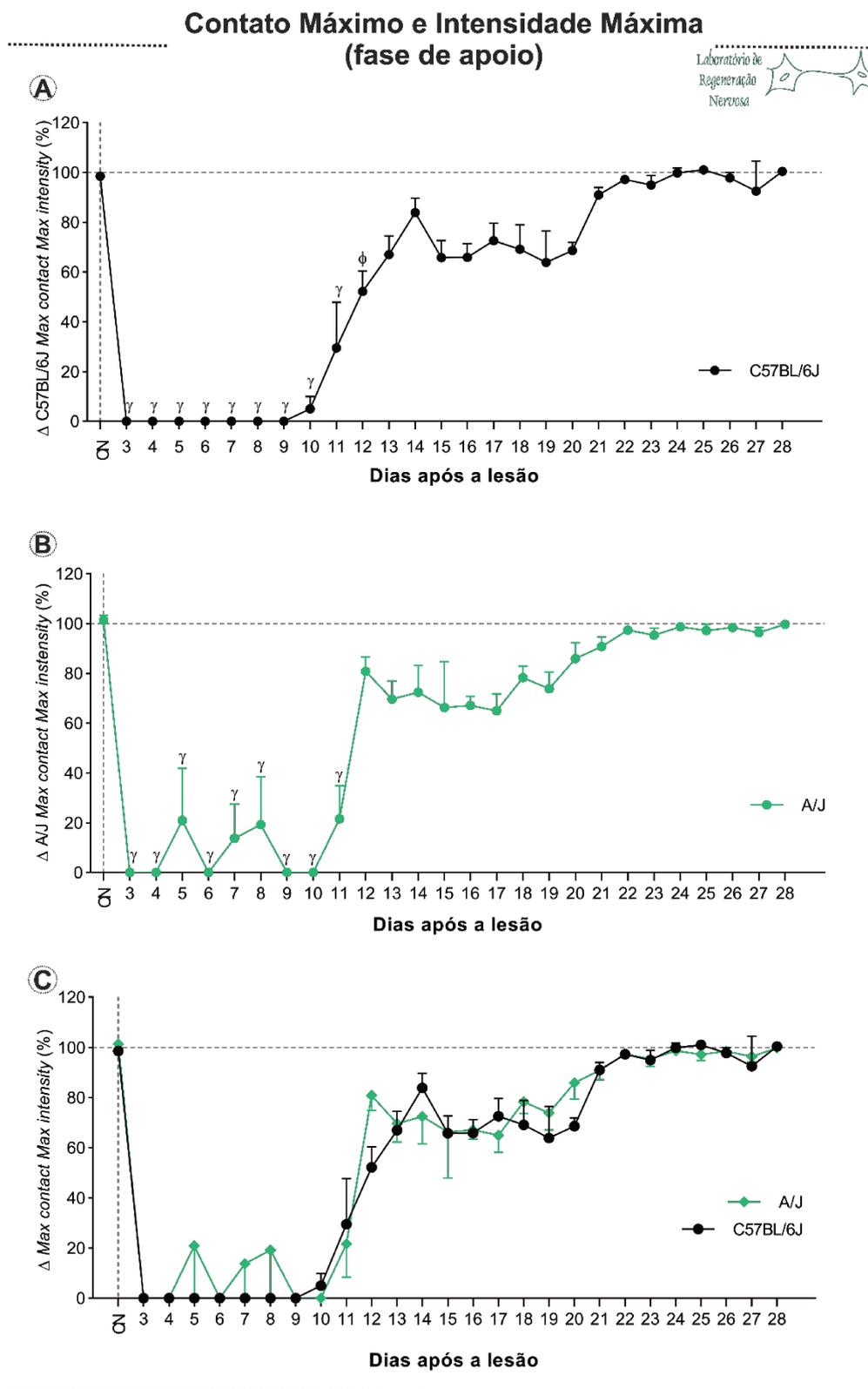
## 5.9 INTENSIDADE MÁXIMA DE PRESSÃO NA FASE DE APOIO

A avaliação da *Max contact Max Intensity* é o valor da máxima intensidade no maior contato da pata com a plataforma de vidro e pode ser considerada como uma medida indireta de dor neuropática.

Em relação à linhagem C57BL/6J, fica evidente que os animais não apoiam a pata lesionada até o dia 9. A partir daí os valores da intensidade máxima de pressão na fase de apoio começam a aumentar, atingindo o pico no 14º dia, momento este em que há aproximadamente 84% da recuperação quando comparado ao valor basal (**Figura 15A**). Contudo, no 15º dia há uma pequena queda (estatisticamente não significativa) que se prolonga até o 19º dia. Valores próximos a 100% foram observados a partir do dia 21.

Os animais da linhagem A/J apresentam uma dinâmica parecida (**Figura 15B**), ou seja, nos 10 primeiros dias após a lesão apresentam valores nulos ou próximos à zero, o que evidencia o desuso do membro afetado. Contudo, o pico da intensidade máxima de pressão na fase de apoio foi ligeiramente antecipado, para o 12º dia (83%). Novamente, observamos uma discreta queda, que se mantém até o 17º dia e, a partir do 21º dia, também observamos valores próximos a 100%.

Através do teste ANOVA de duas vias, não encontramos diferença entre as linhagens ao longo do tempo (**Figura 15B**)



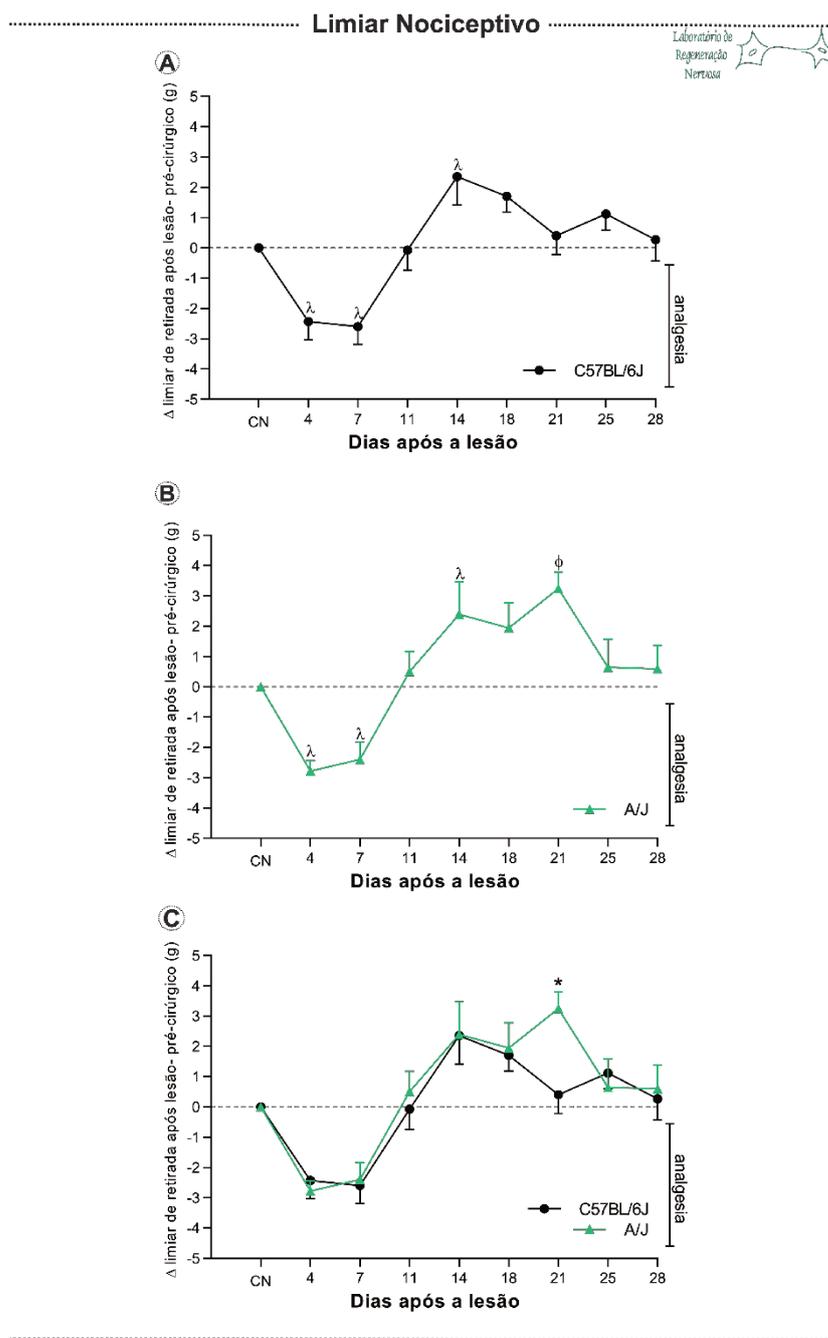
**Figura 15.** Intensidade máxima de pressão na fase de apoio. Média da intensidade máxima de pressão na fase de apoio ao longo do tempo, dos animais da linhagem **(A)** C57BL/6J, **(B)** A/J ou **(C)** ambas.  $\gamma$ ,  $P < 0,0001$ ;  $\phi$ ,  $P < 0,001$ ;  $\lambda$ ,  $P < 0,01$ ; \*,  $P < 0,05$  em comparação ao basal (ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni).

## 5.10 ANÁLISE DO LIMIAR NOCICEPTIVO

O Teste de Von Frey, utilizado para análise da intensidade do limiar nociceptivo, foi aplicado em ambas as linhagens C57BL/6J e A/J. Os dados apresentados estão normalizados em função do pré-operatório (basal), que corresponde a zero. Valores positivos são diretamente proporcionais à hiperalgesia, enquanto que valores negativos indicam, também proporcionalmente, analgesia.

De acordo com a **Figura 16A**, observamos que os animais C57BL/6J apresentam estado de analgesia no 4º e 7º dia após a cirurgia. Do dia 7 ao 14, observamos uma inversão no gráfico, quando os animais passam para um estado de hiperalgesia aos 14 dias, cruzando o ponto “zero” no dia 11. Cabe ressaltar que o pico de hiperalgesia ocorre no dia 14, decaindo a partir de então. No dia 21, os valores estão próximos ao basal. Os animais A/J apresentam padrão similar aos C57BL/6 J (**Figura 16B**), salvo no 21º dia após a lesão, quando observamos o ápice da resposta hiperálgica.

Ao compararmos as linhagens entre si, observamos diferença somente no 21º dia após lesão (**Figura 16C**).



**Figura 16.** Teste de von Frey para o limiar nociceptivo. Média do peso de retirada (g) depois da cirurgia subtraído do valor pré-cirúrgico, dos animais da linhagem **(A)** C57BL/6J, **(B)** A/J ou **(C)** ambas.  $\phi$ ,  $P < 0,001$ ;  $\lambda$ ,  $P < 0,01$  em comparação ao basal (ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni). \*,  $P < 0,05$ , C57BL/6 J vs A/J (ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni)

## 6. DISCUSSÃO

Lesões nervosas podem causar grandes perdas funcionais. Contudo, diferente do sistema nervoso central (SNC), o sistema nervoso periférico (SNP) apresenta maior potencial de regeneração, o qual nem sempre é plenamente alcançado (SIDDIQUE; THAKOR, 2013). As lesões nervosas periféricas (LNP) ocorrem com frequência em humanos e animais, levando a severas e duradouras disfunções fisiológicas e funcionais (WOJTKIEWICZ et al., 2015). As causas dessas lesões são múltiplas e distintas, podendo incluir eventos de origem traumática ou resultantes de lesões iatrogênicas, sendo a maioria medicamentosa ou cirúrgica (ALVITES et al., 2018).

A repercussão de lesões axonais periféricas no SNC vem sendo o foco de diversos estudos, visto que as alterações retrógradas influenciam no potencial regenerativo, bem como a recuperação funcional. A plasticidade neural decorrente da axotomia periférica, apesar de bem identificada morfológicamente, é pouco compreendida em termos moleculares. Seu entendimento pode indicar novas abordagens terapêuticas, melhorando o sucesso na recuperação clínica de pacientes. Ainda, pode indicar o potencial regenerativo individual, bem como auxiliar no prognóstico de resposta a tratamentos farmacológicos e cirúrgicos.

A avaliação da cobertura sináptica na medula espinal, após lesão nervosa periférica traz informações importantes sobre a manutenção dos circuitos espinais relacionados aos motoneurônios danificados (BARBIZAN et al., 2013). Por exemplo, um neurônio axotomizado é incapaz de conduzir a informação até o alvo, logo, grande parte de suas sinapses torna-se disfuncional. Nesse sentido, após axotomia periférica observa-se redução na cobertura sináptica em decorrência do destacamento dos botões sinápticos excedentes, o que vem a ser benéfico ao processo regenerativo, visto que o gasto energético volta-se aos mecanismos de reparo celular e não à condução de impulsos que não atingem o alvo (OLIVEIRA et al., 2004; EMIRANDETTI et al., 2006; SABHA et al., 2008). Não obstante, constatamos redução progressiva da cobertura sináptica em animais C57BL/6J e A/J axotomizados, com maior queda sete dias após a lesão, em ambos os grupos. Em estudo anterior, (EMIRANDETTI et al., 2006), empregando a transecção do nervo isquiático, demonstraram maior redução de imunorreatividade anti-sinaptofisina ao redor dos motoneurônios medulares em animais A/J, sete dias após a lesão,

comparativamente a camundongos C57BL/6J. Tais resultados foram correlacionados com mais elevados níveis de MHC-I na linhagem A/J.

No presente estudo, observamos maior expressão de moléculas do MHC-I na medula espinal das duas linhagens nesse mesmo tempo (7 dias), corroborando os estudos que demonstram a participação dessa molécula no processo de plasticidade sináptica, especificamente na manutenção seletiva de sinapses inibitórias (OLIVEIRA et al., 2004; SABHA et al., 2008; THAMS; OLIVEIRA; CULLHEIM, 2008). Contudo, em contraste aos nossos achados, Sabha et al. (SABHA et al., 2008) reportaram que nos animais A/J a expressão de MHC-I e a retração sináptica eram maiores que nos C57BL/6J, sete dias após lesão periférica, igualando mais tardiamente, três semanas após a neurotomia. Segundo os autores, as respostas mais proeminentes resultariam em um processo regenerativo inicial mais bem sucedido, em função do redirecionamento energético (SABHA et al., 2008). Um fato interessante foi que, em nossos experimentos, constatamos maior expressão de moléculas do MHC-I nos animais C57BL/6J cinco dias após a lesão, quando já há uma redução evidente na cobertura sináptica, a qual, entretanto, é igual entre as linhagens. À luz do que foi discutido acima, seria plausível pensar que o processo de resposta retrógrada inicial estaria sutilmente mais avançado nos animais C57BL/6J em relação aos A/J, os quais atingiriam o mesmo patamar logo em seguida, sete dias após a lesão. Contudo, é necessária uma análise mais detalhada acerca dos inputs sinápticos preservados, a fim de se obter o balanço entre terminais excitatórios e inibitórios. Em todo caso, nossos dados reforçam a possível função pleiotrópica exercida pelas moléculas do MHC-I que, em nosso modelo experimental, não estão envolvidas com a clássica apresentação antigênica aos linfócitos T CD8, uma vez que não há quebra da barreira hematoencefálica após axotomia do nervo isquiático (OKLINSKI; CHOI; KWON, 2015) e subsequente infiltração de linfócitos.

Na literatura, foram demonstradas diferenças em vários aspectos da regeneração nervosa entre linhagens isogênicas de camundongos (LIDMAN et al., 2002), que nos remetem ao potencial regenerativo único de cada paciente humano. Os primeiros estudos datam da década de 1990, quando Lu e colaboradores (LU; SKAMENE; RICHARDSON, 1994) reportaram que camundongos C57BL/6J apresentavam

menor potencial regenerativo periférico que a linhagem A/J. Nesse estudo, os autores realizaram esmagamento do nervo isquiático e, 11 dias após, fizeram a contagem dos axônios mielinizados do coto distal do nervo, constatando menor número de fibras nos animais C57BL/6J que nos A/J (XIN et al., 1990). Também realizaram esmagamento de raiz dorsal e contagem de axônios mielínicos 14 dias após a lesão e o resultado foi semelhante (XIN et al., 1990). Em um estudo subsequente (LU; SKAMENE; RICHARDSON, 1994), o mesmo grupo investigou se a causa da disparidade na regeneração periférica poderia ser decorrente de diferenças genéticas entre as linhagens. Por meio de uma série de cruzamentos entre as linhagens, constataram que não havia qualquer polimorfismo gênico responsável por tal diferença (LU; SKAMENE; RICHARDSON, 1994). Outros estudos surgiram na tentativa de elucidar essa questão. Uma hipótese levantada foi que a diferença no potencial regenerativo poderia ser decorrente de características intrínsecas dos neurônios, ou de propriedades do microambiente da lesão periférica e das células envolvidas nesse processo.

Oliveira e Langone (OLIVEIRA; LANGONE, 2000) realizaram um estudo no qual o nervo isquiático de camundongos de diferentes linhagens, incluindo C57BL/6 e A/J, foi transeccionado e, após 14 dias, o coto distal foi transplantado em animais descendentes F1 resultantes do cruzamento entre as linhagens. Por meio da contagem de axônios mielínicos, realizada quatro semanas após o transplante, os autores constataram que a taxa de regeneração era a mesma entre receptores resultantes do cruzamento de C57BL/6J e A/J, que receberam nervo em degeneração tanto de doadores C57BL/6J quanto de A/J. A taxa de regeneração também era semelhante entre camundongos C57BL/6J ou A/J que receberam, respectivamente, nervos isogênicos. Com isso, os autores concluíram que as células da periferia não eram o fator limitante para a baixa regeneração observada nos animais C57BL/6J (OLIVEIRA; LANGONE, 2000). Ainda, o mesmo grupo investigou diferenças entre as linhagens no que diz respeito à fragmentação da mielina e à presença de neurofilamentos na fase aguda e subaguda da degeneração Walleriana (DE LA HOZ et al., 2003). Constataram que 1 e 3 dias após o esmagamento do nervo, havia mais neurofilamentos nos animais AJ que nos C57BL/6J. Além disso, também encontraram nos camundongos C57BL/6J mais células que internalizaram mielina nos dias 3 e 5 após a lesão (DE LA HOZ et al.,

2003), o que é sugestivo de um processo acelerado de limpeza tecidual, que precede a regeneração do nervo. Aos 7 dias após o esmagamento, não observaram mais diferenças entre as linhagens. Com base nesses achados, outros estudos surgiram para investigar se a diferença no potencial regenerativo periférico seria resultante de alterações no SNC (EMIRANDETTI et al., 2006; SABHA et al., 2008), conforme discutiremos adiante.

A relação entre neurônios e células da glia está diretamente ligada à estabilização e manutenção dos contatos sinápticos, provendo um microambiente ao redor das sinapses ativas que limita a difusão de íons e modula a excitabilidade neuronal (ARAQUE; PEREA, 2004). Além disso, frente às lesões, células da glia participam ativamente do processo de destacamento sináptico, conferem neuroproteção através da liberação de fatores neurotróficos, reciclagem de neurotransmissores, dentre outros (CULLHEIM; THAMS, 2007; PEKNY; PEKNA, 2014).

Diante de um desequilíbrio à homeostase, a microglia responde de forma dual, podendo atuar tanto na degeneração, quanto na regeneração. No primeiro caso, pode produzir substâncias que, em grandes quantidades, tornam-se tóxicas, como TNF- $\alpha$  e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (WALTER; NEUMANN, 2009). A produção dessas substâncias é desencadeada por estímulos inflamatórios que, muitas vezes, são originados a partir da própria microglia ativada (KREUTZBERG, 1996; COLTON, 2009). Por outro lado, as células microgliais também regulam a neuroinflamação, através da produção de citocinas anti-inflamatórias, além de fagocitarem debris celulares (limpeza tecidual) e produzirem fatores neuroprotetores, como o BDNF (CULLHEIM; THAMS, 2007; NEUMANN; KOTTER; FRANKLIN, 2008; WALTER; NEUMANN, 2009). Após lesões, a microglia também atua no destacamento das sinapses, interpondo seus prolongamentos entre os terminais pré e pós-sinápticos (CULLHEIM; THAMS, 2007; WALTER; NEUMANN, 2009). Em nossos experimentos, a microglia apresentou comportamento semelhante em ambas as linhagens, com pico de reatividade no sétimo dia após a lesão periférica, concomitantemente à maior expressão de MHC-I e à menor cobertura sináptica.

A astrogliose é um fenômeno comum em decorrência de lesões no SNC, ou mesmo de danos ao SNP. Similarmente à microgliose, também visa a retomada da homeostasia e confere neuroproteção através da produção de fatores neurotróficos

e reciclagem de neurotransmissores, como o glutamato (PEKNY; PEKNA, 2014), além de atuar na eliminação de sinapses (PEKNY; WILHELMSSON; PEKNA, 2014). Em estudos anteriores, nosso grupo demonstrou que a reatividade astrogliar correlacionava-se ao aumento da retração sináptica (EMIRANDETTI et al., 2006) e das moléculas do MHC-I (SABHA et al., 2008; ZANON et al., 2010; BOMBEIRO et al., 2016a) na medula espinal, após axotomia periférica. Ainda, ao compararem as linhagens A/J e C57BL/6J entre si, Emirandetti e colaboradores (EMIRANDETTI et al., 2006) demonstraram que, uma semana após a transecção do nervo isquiático, camundongos A/J apresentavam maior reatividade astrogliar, acompanhada de expressão reduzida de sinaptofisina. O mesmo foi observado por Sabha et al. (SABHA et al., 2008), contudo, acrescido do aumento da expressão de MHC-I. Em nossos experimentos, ao focarmos apenas no dia 7 após a lesão, notamos que também há mais astrócitos reativos em ambas as linhagens, em comparação ao grupo basal. Mais ainda, nesse mesmo tempo (7 dias) há maior imunomarcagem de MHC-I e redução da sinaptofisina. Contudo, nas condições experimentais do presente estudo, as linhagens não diferiram entre si. Ao ampliarmos o tempo avaliado, o que vemos é que a reatividade astrogliar oscila de forma não significativa na linhagem C57BL/6J, com aparente pico no dia 3, enquanto que nos animais A/J, os astrócitos estão nitidamente mais reativos no dia 5, diferindo-se dos C57BL/6J. Aparentemente, há uma antecipação na reatividade astrogliar em ambas as linhagens, quando comparada aos trabalhos acima mencionados (EMIRANDETTI et al., 2006; SABHA et al., 2008). Acreditamos que essa diferença possa ser decorrente dos diferentes modelos de axotomia empregados, sendo que aqui realizamos o esmagamento do nervo, enquanto que nos demais estudos foi realizada a transecção. Uma vez que o esmagamento é mais ameno que transecção, sendo inclusive possível a regeneração do nervo no primeiro caso, acreditamos que os efeitos retrógrados da axotomia decorrente do rompimento total do nervo persistam por mais tempo, justificando, assim, as diferenças observadas.

Assim como as moléculas do MHC-I, PirB pode estar relacionado à modulação da plasticidade sináptica e estabilidade da circuitaria neuronal (THAMS; OLIVEIRA; CULLHEIM, 2008). PirB apresenta-se como um receptor de alta afinidade para proteínas da mielina (NoGo, MAG e OMgp), inibindo a neuritogênese e crescimento axonal (ATWAL et al., 2008). Além disso, ele pode se complexar ao TrkB (receptor

de BDNF, NT3 e NT4), recrutando as fosfatases SHP1 e SHP2 que, por sua vez, desfosforilam o TrkB e, assim, inibem o crescimento de neuritos (FUJITA et al., 2011). Foi proposto para PirB um outro mecanismo que confere estabilidade ao citoesqueleto, através da interação com a mielina. Frente à ligação com NoGo, MAG ou OMgp, PirB recrutaria, na sua cascata de sinalização, crmp2 e cofilina que, respectivamente, interage com microtúbulos e atua na despolimerização da F-actina, inibindo a neuritogênese (LLORENS; GIL; DEL RÍO, 2011). Em nossos experimentos, não constatamos expressão gênica de PirB em motoneurônios, sete dias após o esmagamento do nervo, em ambas as linhagens. Porém, nos animais C57BL/6J, observamos a manutenção da transcrição gênica do TrkB e o aumento na expressão de shp2, crmp2 e cofilina, sugerindo que, naquele momento, os neurônios motores estavam mais propensos a se manter desvinculados de inputs pré-sinápticos, tendo em vista sua não funcionalidade em termos de propagação do impulso nervoso axonal. E isso pode ser benéfico, uma vez que a célula volta seu gasto energético aos mecanismos de reparo celular. Nos animais A/J, por sua vez, observamos queda do TrkB e manutenção dos demais transcritos analisados, também sugestivo de estabilidade da circuitaria neuronal.

Complementarmente à inibição da neuritogênese, também foi relatado que PirB atua no controle da motilidade de macrófagos, pois em animais nocautes em PirB (PirB-KO) essas células são mais reativas, com maior capacidade de aderência e espraiamento (PEREIRA et al., 2004). Em um estudo anterior, constatamos ausência de PirB em projeções de células microgliais cultivadas in vitro, as quais passavam a expressar PirB ao longo do tempo, conforme tornavam-se mais aderidas (BOMBEIRO et al., 2016b). Nesse mesmo estudo, observamos que astrócitos fibrosos, presentes na substância branca e pouco reativos, também expressavam PirB (BOMBEIRO et al., 2016b). Deng e colaboradores constataram a expressão de PirB em astrócitos e neurônios hipocâmpais, durante o processo de neuroinflamação induzida por LPS (BOMBEIRO et al., 2016b). Em nossos experimentos, observamos que embora alguns motoneurônios expressassem PirB, a maior parte da marcação estava concentrada na região da glia, comportando-se, inclusive, de modo similar ao GFAP. Visto que PirB controla a motilidade de macrófagos, é possível que também esteja restringindo a extensão da reatividade astrogliar.

Em todas as análises histológicas por nós realizadas, é interessante notar que 28 dias após a lesão, animais A/J e C57BL/6 não apresentam quaisquer diferenças entre si e equiparam-se aos seus controles basais. Logo, os efeitos da resposta desencadeada pela lesão periférica não perduram por muito tempo.

Para o melhor entendimento do processo regenerativo, a avaliação da marcha em animais lesionados é muito importante, principalmente porque nenhum estudo avaliou de forma contínua e minimamente espaçada o comportamento da recuperação motora e sensoriais em camundongos A/J, comparados aos C57BL/6J.

Com base em nossos achados, constatamos que não houve diferença entre as linhagens ao longo do tempo em relação à recuperação motora. Contudo, é importante observar que mesmo sem diferença estatística, os animais C57BL/6J e A/J apresentam, na sua dinâmica de recuperação, algumas disparidades. Um exemplo disso é observado no 12º dia após a lesão, quando os animais A/J atingem 70,8% de recuperação no SFI, em contrapartida, os animais C57BL/6J só passam a apresentar valores próximos a esse no 21º dia (69,6%), ou seja, nove dias depois.

No presente estudo, também não observamos diferença significativa entre as linhagens ao longo do tempo para intensidade máxima de pressão durante a propulsão. Contudo, vale ressaltar que no 18º dia após a lesão, verifica-se uma queda na intensidade aplicada pelos animais C57BL/6J, que volta a se repetir no 22º dia, porém, em menor proporção. Curiosamente, uma dinâmica semelhante é vista nos animais A/J, porém, essas quedas são antecipadas para o 15º e 19º dia.

Como forma de se avaliar uma possível dor neuropática, realizamos a análise dos dados de intensidade máxima de pressão na fase de apoio (VRINTEN; HAMERS, 2003) e não encontramos diferença entre as linhagens. Porém, foi possível notar que os animais C57BL/6J não apresentaram melhora significativa até o 13º dia, diferente da linhagem A/J que, no 12º dia apresentou valores próximos aos encontrados em condições basais. Isso corrobora os dados que demonstram que os animais C57BL/6J apresentam menor capacidade regenerativa periférica (EMIRANDETTI et al., 2006). Entretanto, tal melhora antecipada não foi constatada na análise do limiar nociceptivo (teste de Von Frey), uma vez que os animais de ambas as linhagens apresentaram um padrão parecido, com exceção do dia 21, quando os animais A/J se apresentaram hiperálgicos. Os mecanismos que causam essas diferenças pontuais permanecem desconhecidos.

## 7. CONCLUSÕES

Com base em nossos achados, observamos que camundongos A/J e C57BL/6J apresentam um padrão de resposta semelhante no que diz respeito à expressão de MHC-I, a qual é proporcional à retração sináptica e à reatividade microglial, corroborando o papel dessa molécula na plasticidade sináptica. Quanto à expressão de PirB, essa se mostrou majoritariamente ligada à contenção da reatividade astrogliar nas duas linhagens, possivelmente por diminuição da motilidade celular, embora não descartemos a possibilidade de que esteja relacionada à estabilização dos circuitos neuronais. Além disso, observaram-se diferenças comportamentais sutis entre as linhagens estudadas, atribuídas a mecanismos intrínsecos desencadeados durante os processos de degeneração e regeneração. Nossos resultados, portanto, contribuem para o entendimento da variada resposta regenerativa após axotomia, em parte dependente de características individuais, sendo necessários estudos mais detalhados acerca das moléculas e mecanismos envolvidos.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUL, A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. [s.l.] Saunders, 2014.

ADLER, J. T. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice, 40th Edition. **Journal of Surgical Research**, v. 158, n. 1, p. 28–29, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/als.2013.12002>>.

ALVITES, R. et al. Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. **Cogent Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1–45, 20 abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/2331205X.2018.1466404>>.

ARAQUE, A.; PEREA, G. Glial modulation of synaptic transmission in culture. **Glia**, v. 47, n. 3, p. 241–248, 15 ago. 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.20026>>.

ARCK, P. C. et al. The alchemy of immune privilege explored from a neuroimmunological perspective. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 480–489, ago. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489208000738>>.

ATWAL, J. K. et al. PirB is a Functional Receptor for Myelin Inhibitors of Axonal Regeneration. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 967–970, 7 nov. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1161151>>.

BAIN, J. R.; MACKINNON, S. E.; HUNTER, D. A. Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 83, n. 1, p. 129–136, jan. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2909054>>.

BARBIZAN, R. et al. Motor Recovery and Synaptic Preservation after Ventral Root Avulsion and Repair with a Fibrin Sealant Derived from Snake Venom. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63260, 7 maio 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0063260>>.

BARRETO, G. E. et al. Astrocytic-neuronal crosstalk: Implications for neuroprotection from brain injury. **Neuroscience Research**, v. 71, n. 2, p. 107–113, out. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2011.06.004>>.

BAUMANN, N.; PHAM-DINH, D. Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 871–927, abr. 2001. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.2001.81.2.871>>.

BEER, G. M.; STEURER, J.; MEYER, V. E. Standardizing Nerve Crushes with a Non-Serrated Clamp. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 17, n. 07, p. 531–534, 2001. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2001-17755>>.

BOMBEIRO, A. L. et al. Enhanced Immune Response in Immunodeficient Mice

Improves Peripheral Nerve Regeneration Following Axotomy. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, n. June, p. 1–14, 14 jun. 2016a. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2016.00151/abstract>>.

BOMBEIRO, A. L. et al. MHC-I and PirB Upregulation in the Central and Peripheral Nervous System following Sciatic Nerve Injury. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0161463, 23 ago. 2016b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452212001650>>.

BOMBEIRO, A. L. et al. Importance of major histocompatibility complex of class I (MHC-I) expression for astroglial reactivity and stability of neural circuits in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 647, p. 97–103, abr. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2017.03.038>>.

BRUSHART, T. **Nerve Repair**. 1ª Edição ed. Nova York: Oxford University Press, Inc., 2011.

BURNETT, M. G. et al. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgical focus**, v. 16, n. 5, p. 1–7, 2004.

CHUNG, W.; ALLEN, N. J.; EROGLU, C. Function, and Elimination. p. 1–18, 2015.

COLTON, C. A. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 399–418, 2009.

CUEVAS, J. **The Peripheral Nervous System**☆. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.

CULLHEIM, S.; THAMS, S. The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. **Brain Research Reviews**, v. 55, n. 1, p. 89–96, ago. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017307000550>>.

DANEMAN, R. The blood-brain barrier in health and disease. **Annals of Neurology**, v. 72, n. 5, p. 648–672, nov. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.23648>>.

DE LA HOZ, C. L. R. et al. Wallerian degeneration in C57BL/6J and A/J mice: differences in time course of neurofilament and myelin breakdown, macrophage recruitment and iNOS expression. **Journal of Anatomy**, v. 203, n. 6, p. 567–578, dez. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-7580.2003.00248.x>>.

DE MEDINACELI, L.; FREED, W. J.; WYATT, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, v. 77, n. 3, p. 634–643, set. 1982. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014488682902345>>.

EDSTRÖM, E. et al. MHC Class I,  $\beta$  2 microglobulin, and the INF- $\gamma$  receptor are upregulated in aged motoneurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 78, n. 6, p. 892–900, 15 dez. 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.20341>>.

EMIRANDETTI, A. et al. Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. **Brain Research**, v. 1095, n. 1, p.

35–42, jun. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899306010444>>.

FARINA, P. et al. **Central nervous system**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

FRANKLIN, S. **The Peripheral and Central Nervous System**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

FRERIA, C. M. et al. Major histocompatibility complex class I expression and glial reaction influence spinal motoneuron synaptic plasticity during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 518, n. 7, p. 990–1007, 1 abr. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cne.22259>>.

FUJITA, Y. et al. Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 7, p. 1389–1401, 6 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3094118&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GEUNA, S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 243, p. 39–46, mar. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.01.021>>.

GINHOUX, F. et al. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 841–845, 5 nov. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1194637>>.

GINHOUX, F. et al. Origin and differentiation of microglia. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 313–26, jun. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3627983&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GOMEZ-SANCHEZ, J. A. et al. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. **The Journal of Cell Biology**, v. 210, n. 1, p. 153–168, 6 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201503019>>.

GRAEBER, M. B. Changing Face of Microglia. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 783–788, 5 nov. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrneurol.2010.17>>.

HAINES, D. E.; MIHAILOFF, G. A.; YEZIERSKI, R. P. The Spinal Cord. In: **Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications**. Fifth Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 138-151.e1.

HALASSA, M. M.; FELLIN, T.; HAYDON, P. G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 2, p. 54–63, fev. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491406002851>>.

HAMMOND, C. Neurons. In: **Cellular and Molecular Neurophysiology**. [s.l.] Elsevier,

2015. p. 3–23.

HEISE, C.; KAYALIOGLU, G. Cytoarchitecture of the Spinal Cord. In: **The Spinal Cord**. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 64–93.

HUH, G. S. et al. Functional Requirement for Class I MHC in CNS Development and Plasticity. **Science**, v. 290, n. 5499, p. 2155–2159, 15 dez. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118151>>.

IANNACCONE, S. et al. In vivo microglia activation in very early dementia with Lewy bodies, comparison with Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 19, n. 1, p. 47–52, jan. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.07.002>>.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principles of Neural Science**. [s.l.] McGraw-Hill Medical; 4 edition, 2000.

KERNS, J. M. The microstructure of peripheral nerves. **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, v. 12, n. 3, p. 127–133, jul. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084208X08000189>>.

KIM, T. et al. Human LILRB2 Is a  $\beta$ -Amyloid Receptor and Its Murine Homolog PirB Regulates Synaptic Plasticity in an Alzheimer's Model. **Science**, v. 341, n. 6152, p. 1399–1404, 20 set. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1242077>>.

KIPNIS, J. Multifaceted interactions between adaptive immunity and the central nervous system. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 766–771, 19 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aag2638>>.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 8, p. 312–318, ago. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8843599>>.

KUBAGAWA, H. et al. Biochemical Nature and Cellular Distribution of the Paired Immunoglobulin-like Receptors, PIR-A and PIR-B. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 2, p. 309–318, 18 jan. 1999. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9892613&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/49750EA8-409E-453B-9F36-78F5C8AC2006>>.

LAWSON, L. J. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151–170, jan. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2089275>>.

LEE, S. K.; WOLFE, S. W. Peripheral nerve injury and repair. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 8, n. 4, p. 243–52, 1 abr. 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951113>>.

LIDMAN, O. et al. Facial nerve lesion response; strain differences but no involvement of IFN- $\gamma$ , STAT4 or STAT6. **NeuroReport**, v. 13, n. 13, p. 1589–1593, set. 2002. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00001756-200209160-00003>>.

LLORENS, F.; GIL, V.; DEL RÍO, J. A. Emerging functions of myelin-associated proteins during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 2, p. 463–475, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.10-162792>>.

LU, X.; SKAMENE, E.; RICHARDSON, P. M. Studies of axonal regeneration in C57BL/6J and A/J mice. **Brain Research**, v. 652, n. 1, p. 174–176, jul. 1994. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899394903352>>.

MACHADO, A.; MACHADO HAERTEL, L. **Neuroanatomia Funcional**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

MARTÍNEZ-CERDEÑO, V. Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. **Developmental Neurobiology**, v. 77, n. 4, p. 393–404, abr. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/dneu.22417>>.

MIHAILOFF, G. A.; HAINES, D. E. The Cell Biology of Neurons and Glia. In: **Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications**. Fifth Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 15-33.e1.

NADI, M.; MIDHA, R. Management of Peripheral Nerve Injuries. In: **Principles of Neurological Surgery**. Fourth Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 832-841.e2.

NEUMANN, H. et al. Induction of MHC class I genes in neurons. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 549–552, 28 jul. 1995. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.7624779>>.

NEUMANN, H. et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Gene Expression in Single Neurons of the Central Nervous System: Differential Regulation by Interferon (IFN)- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ . **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 2, p. 305–316, 20 jan. 1997. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.185.2.305>>.

NEUMANN, H.; KOTTER, M. R.; FRANKLIN, R. J. M. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. **Brain**, v. 132, n. 2, p. 288–295, 20 jun. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awn109>>.

NIMMERJAHN, A. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314–1318, 27 maio 2005. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1110647>>.

OKLINSKI, M. K.; CHOI, H.-J.; KWON, T.-H. Peripheral nerve injury induces aquaporin-4 expression and astrocytic enlargement in spinal cord. **Neuroscience**, v. 311, p. 138–152, dez. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.025>>.

OLIVEIRA, A. L. R. et al. From The Cover: A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 51, p. 17843–17848, 21 dez. 2004. Disponível em: <[papers2://publication/doi/10.1073/pnas.0408154101](http://papers2://publication/doi/10.1073/pnas.0408154101)>.

OLIVEIRA, A. L. R.; LANGONE, F. Non-neuronal cells are not the limiting factor for the low axonal regeneration in C57BL/6J mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 12, p. 1467–1475, dez. 2000. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2000001200011&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2000001200011&lng=en&tlng=en)>.

PAOLICELLI, R. C. et al. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. **Science**, v. 333, n. 6048, p. 1456–1458, 9 set. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1202529>>.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte Reactivity and Reactive Astroglia: Costs and Benefits. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1077–1098, out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287860>>.

PEKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNA, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 30–38, abr. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.071>>.

PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 8, p. 421–431, ago. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223609001015>>.

PEREIRA, S. et al. The Inhibitory Receptor PIR-B Negatively Regulates Neutrophil and Macrophage Integrin Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 9, p. 5757–5765, 1 nov. 2004. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.173.9.5757>>.

PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. R.; HOLMES, C. Microglia in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 4, p. 193–201, 16 abr. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2010.17>>.

REA, P. Essential Anatomy and Function of the Spinal Cord. In: **Essential Clinical Anatomy of the Nervous System**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 121–131.

SABHA, M. et al. MHC I expression and synaptic plasticity in different mice strains after axotomy. **Synapse**, v. 62, n. 2, p. 137–148, fev. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/syn.20475>>.

SCORISA, J. M. et al. Glatiramer Acetate Treatment Increases Stability of Spinal

Synapses and Down Regulates MHC I during the Course of EAE. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 8, p. 1188–1202, 2011. Disponível em: <<http://www.ijbs.com/v07p1188.htm>>.

SECKEL, B. R. Enhancement of peripheral nerve regeneration. **Muscle & Nerve**, v. 13, n. 9, p. 785–800, set. 1990. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mus.880130904>>.

SEDDON, H. J. Three types of nerve injury. **Brain**, v. 66, n. 4, p. 237–288, 1943.

SHIGETOMI, E. et al. Two Forms of Astrocyte Calcium Excitability Have Distinct Effects on NMDA Receptor-Mediated Slow Inward Currents in Pyramidal Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 26, p. 6659–6663, 25 jun. 2008. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1717-08.2008>>.

SIDDIQUE, R.; THAKOR, N. Investigation of nerve injury through microfluidic devices. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 11, n. 90, p. 20130676–20130676, 13 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3836319&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SILVER, J.; MILLER, J. H. Regeneration beyond the glial scar. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 146–156, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn1326>>.

SNYDER, J. M. et al. Nervous System. In: **Comparative Anatomy and Histology**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 403–444.

SOFRONIEW, M. V; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7–35, 10 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20012068>>.

STARKEY, H. D. V. et al. Neuroglial Expression of the MHCI Pathway and PirB Receptor Is Upregulated in the Hippocampus with Advanced Aging. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 48, n. 1, p. 111–126, 6 set. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12031-012-9783-8>>.

SUNDERLAND, S. A CLASSIFICATION OF PERIPHERAL NERVE INJURIES PRODUCING LOSS OF FUNCTION. **Brain**, v. 74, n. 4, p. 491–516, 1951. Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/74.4.491>>.

SUNDERLAND, S. S. The anatomy and physiology of nerve injury. **Muscle & Nerve**, v. 13, n. 9, p. 771–784, set. 1990. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mus.880130903>>.

SYKEN, J. PirB Restricts Ocular-Dominance Plasticity in Visual Cortex. **Science**, v. 313, n. 5794, p. 1795–1800, 22 set. 2006. Disponível em:

<<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/313/5794/1795>>.

TAKAI, T. Paired immunoglobulin-like receptors and their MHC class I recognition. **Immunology**, v. 115, n. 4, p. 433–440, ago. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2005.02177.x>>.

THAMS, S.; OLIVEIRA, A.; CULLHEIM, S. MHC class I expression and synaptic plasticity after nerve lesion. **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 1, p. 265–269, jan. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017307001166>>.

TOEWS, G. B. Macrophages. In: **Asthma and COPD**. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 133–143.

VRINTEN, D. H.; HAMERS, F. F. T. 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. **Pain**, v. 102, n. 1, p. 203–209, mar. 2003. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006396-200303000-00022>>.

WALTER, L.; NEUMANN, H. Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, n. 4, p. 513–525, 9 nov. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00281-009-0180-5>>.

WILLERTH, S. Introduction to the nervous system. In: **Engineering Neural Tissue from Stem Cells**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 17–38.

WOJTKIEWICZ, D. M. et al. Social Impact of Peripheral Nerve Injuries. **HAND**, v. 10, n. 2, p. 161–167, 25 jun. 2015. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1007/s11552-014-9692-0>>.

XIN, L. et al. A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6J mice. **Brain Research**, v. 510, n. 1, p. 144–146, fev. 1990. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000689939090741S>>.

ZANON, R. G. et al. Interferon (IFN) beta treatment induces major histocompatibility complex (MHC) class I expression in the spinal cord and enhances axonal growth and motor function recovery following sciatic nerve crush in mice. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 36, n. 6, p. 515–534, out. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2990.2010.01095.x>>.

ZANON, R. G.; OLIVEIRA, A. L. R. MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transection. **Experimental Neurology**, v. 200, n. 2, p. 521–531, ago. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488606002032>>.

## ANEXOS

CERTIFICADO CEUA/UNICAMP

UNICAMP



CEUA/UNICAMP

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **MHC-I E PirB NA PLASTICIDADE SINÁPTICA MEDULAR EM CAMUNDONGOS COM DIFERENTES RESPOSTAS REGENERATIVAS APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**, registrada com o nº **4558-1/2017**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira e Bruno Henrique De Melo Lima**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **20 de maio de 2017**.

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	12/05/2017-02/03/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	20/05/2017-02/03/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	120
Peso / Idade:	06 semanas / 20g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / A/JUnib
No. de animais:	120
Peso / Idade:	06 semanas / 20g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 20 de maio de 2017.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

## DECLARAÇÃO REFERENTE A DIREITOS AUTORAIS

### Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **MHC-I E PirB NA PLASTICIDADE SINÁPTICA MEDULAR EM CAMUNDONGOS COM DIFERENTES RESPOSTAS REGENERATIVAS APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 17/04/2019

Assinatura : \_\_\_\_\_



Nome do(a) autor(a): **BRUNO HENRIQUE DE MELO LIMA**  
RG n.º 5534550 SSP-GO

Assinatura : \_\_\_\_\_



Nome do(a) orientador(a): **ANDRÉ LUIS BOMBEIRO**  
RG n.º 28991130-8 SSP-SP