

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

BIANCA APARECIDA DE LUCA

**Inoculação de células de Schwann cultivadas pré-tratadas ou não com as citocinas
inflamatórias TGF- β 1 e TNF- α na medula espinal contusa de ratos. Análise neuroquímica
da plasticidade medular**

São Paulo

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

BIANCA APARECIDA DE LUCA

**Inoculação de células de Schwann cultivadas pré-tratadas ou não com as citocinas
inflamatórias TGF- β 1 e TNF- α na medula espinal contusa de ratos. Análise neuroquímica
da plasticidade medular**

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em psicologia.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento
Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

São Paulo
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

De Luca, Bianca Aparecida.

Inoculação de células de Schwann cultivadas pré-tratadas ou não com as citocinas inflamatórias TGF- β 1 e TNF- α na medula espinal contusa de ratos. Análise neuroquímica da plasticidade medular / Bianca Aparecida De Luca; orientador Gerson Chadi. -- São Paulo, 2008.

95 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Lesão medular 2. Células de Schwann 3. Citocinas
4. Regeneração do sistema nervoso central 5. Plasticidade neuroquímica 6. Neuroproteção I. Título.

RD594.3

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bianca Aparecida de Luca

Inoculação de células de Schwann cultivadas pré-tratadas ou não com as citocinas inflamatórias TGF- β 1 e TNF- α na medula espinal contusa de ratos. Análise neuroquímica da plasticidade medular

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em psicologia.
Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Aprovada em: __/__/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José e Elza, por todo amor, dedicação e apoio que sempre me proporcionam.

Obrigada por tudo!

Ao meu marido Vinicius, por seu amor, sua compreensão e por estar sempre ao meu lado.

À minha irmã Claudia e ao meu cunhado Eudes, por todo o auxílio e prontidão durante este e muitos outros trabalhos.

E à minha querida sobrinha Isabella.

Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao professor Gerson Chadi pela orientação e pelos amplos ensinamentos que permitiram a realização deste trabalho, assim como meu crescimento profissional e intelectual.

Aos amigos do Laboratório de Neurocirurgia Funcional (LIM 45) da FMUSP e do Laboratório de Neuroregeneração do Sistema Nervoso Central do ICB-USP: Beatriz F.A. Levy, Camila Silva Siqueira, Jéssica Maximino, Jinger C. Cunha, Vânia C. Gomide, Rafaela F.R. Pestana, Juliana P. Costa, Tatiana Duobles, Rebeca B. Ceccato, Michele S. R. Andrade, Fausto P. Guzen, Marco Taneda, Juliana P. C. Pedroso, Tatiana P. Oliveira e Thais S. Lima pela amizade e pelo trabalho em equipe.

Aos amigos do Laboratório de Neurotransmissão e Modulação Neural da Pressão Arterial.

A toda a minha família e amigos pelo constante apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

A toda equipe de profissionais da USP.

A realização deste trabalho contou com os auxílios concedidos:

FAPESP (95/9060-6)

FAPESP (98/13122-5)

FAPESP (99/01319-1)

FAPESP (07/00491-3)

CNPq (485102/2007-2)

CAPES para B.A.L.

Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

(Leonardo da Vinci)

LISTA DE SIGLAS

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol proprionato
BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CEEA: Comissão de Ética em Experimentação Animal
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CO₂: gás carbônico
CPG: geradora de padrão central
CS: célula(s) de Schwann
DAB: 3-3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro
FGF-1: fator de crescimento fibroblástico ácido
FGF-2: fator de crescimento fibroblástico básico
GABA: ácido gama-aminobutírico
GAP-43: proteína associada ao crescimento 43 KDa
GDNF: fator neurotrófico derivado da glia
GFAP: proteína fibrilar ácida glial
MASCIS: *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*
mm: milímetro(s)
NGF: fator de crescimento do nervo
NMDA: N-metil-D-aspartato
NPY: neuropeptídeo Y
PGSC: proteoglicano sulfato de condroitina
SNC: sistema nervoso central
SNP: sistema nervoso periférico
TGF- β 1: fator de crescimento transformado beta 1
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

A utilização experimental de CS é apontada como uma perspectiva benéfica no tratamento da lesão medular devido estas células produzirem fatores neurotróficos e citocinas inflamatórias que influenciam o ambiente do sistema nervoso. Ratos machos foram submetidos à lesão medular contusa de intensidade moderada (25mm) ao nível do 11^o segmento torácico. As CS cultivadas a partir do nervo ciático foram pré-tratadas ou não com as citocinas inflamatórias TGF- β 1 (5ng/ml) ou TNF- α (30ng/ml) e inoculadas no local da lesão imediatamente após o trauma. O grupo controle e o grupo lesão receberam inoculação do meio de cultura. Após a cirurgia os ratos foram submetidos à análise do comportamento motor durante 8 semanas. O BBB mostrou melhora do comportamento motor ao longo do período analisado para o grupo tratado com as CS. Este efeito não foi potenciado pelo pré-tratamento das CS com as citocinas inflamatórias. As medulas espinais foram processadas e receberam coloração pelo Violeta de Cresilo ou imunomarcagem com a GAP-43, o glutamato, o NPY, a substância P, a GFAP, o FGF-2 e do NG2. Os tratamentos realizados neste desenho experimental não alteraram as respostas neuroprotetivas. Segundo análise estereológica não foram encontradas diferenças no número estimado de neurônios remanescentes e no volume de tecido preservado entre os grupos que receberam lesão medular. A lesão promoveu uma diminuição da imunorreatividade da GAP-43 no corno anterior, que foi revertida quando a lesão recebeu tratamento com as CS pré-tratadas ou não com a citocina TGF- β 1. O resultado do tratamento com as CS foi o de aumento na imunorreatividade do glutamato nas células no corno anterior e no funículo lateral quando comparado com o grupo lesão. Para o NPY no corno anterior houve aumento da imunorreatividade do grupo tratado com as CS apenas em comparação ao grupo controle. Já no funículo lateral a lesão aumentou a imunorreatividade NPY em comparação ao grupo controle, inclusive quando houve tratamento com as CS, mas este deixou de existir quando houve pré-tratamento das CS com as citocinas. Referente ao FGF-2, no funículo lateral e no fascículo grácil houve aumento da imunorreatividade no grupo tratado com as CS, acrescidas ou não de TGF- β 1, apenas em comparação ao grupo controle. Porém, o tratamento com as CS aumentou a imunorreatividade do FGF-2 na região do fascículo grácil. A imunorreatividade do FGF-2 aumentou na região de epicentro da lesão, e este efeito foi mantido nos grupos tratados com as CS, acrescidas ou não de TGF- β 1. Houve significativo aumento da imunorreatividade da GFAP no corno anterior e no funículo lateral quando os grupos lesados foram tratados com as CS e/ou citocinas comparado ao grupo controle. Na região do epicentro, a lesão promoveu aumento da imunorreatividade da GFAP, que foi potencializado quando houve tratamento com as CS. A lesão promoveu aumento da imunorreatividade do NG2 no epicentro, inclusive quando houve tratamento com as CS. O melhor desempenho motor observado no grupo que recebeu inoculação de CS provavelmente está relacionado a fatores como respostas plásticas e neuroquímicas no tecido preservado da medula espinal.

Palavras-chave: lesão medular, células de Schwann, citocinas, regeneração do sistema nervoso central, plasticidade neuroquímica, neuroproteção.

ABSTRACT

The experimental use of Schwann cells is indicated on spinal cord treatment due to the ability of these cells to produce neurotrophic factors and inflammatory cytokines, influencing nervous system environment. Male rats were submitted to a moderate spinal cord contusion (25mm) at 11th thoracic level. Culture Schwann cells were obtained from sciatic nerves and pre-treated or not with inflammatory cytokines TGF- β 1 (5ng/ml) or TNF- α (30ng/ml) and then were inoculated in lesion site just after trauma. Sham and lesion groups received culture medium inoculation. After surgery, rats were submitted to behavior analyses during 8 weeks. BBB showed motor recovery in the Schwann cell group. This effect was not potentiated by pre-treated of Schwann cells with inflammatory cytokines. The spinal cords were processed for Cresil Violet or immunolabeling to GAP-43, glutamate, NPY, substance P, GFAP, FGF-2 and NG2. Stereological analyses showed no differences in the estimated number of remaining neurons and in the volume of the preserved tissue among the lesioned groups. The injury reduced GAP-43 immunoreactivity in ventral horn, which was reverted when injury was treated with Schwann cells pre-treated or not with TGF- β 1. Schwann cell treatment enhanced glutamate immunoreactivity in the ventral horn and lateral funiculus compared with lesioned group. In ventral horn, NPY immunoreactivity was enhanced in Schwann cells group compared with sham group. In lateral funiculus, the injury or the treatment with Schwann cells increased NPY immunoreactivity, comparing with sham group. FGF-2 of lateral funiculus and gracile fasciculus enhanced in Schwann cells group. Treatment with Schwann cells enhanced FGF-2 immunoreactivity in gracile fasciculus. Injury enhanced FGF-2 immunoreactivity in epicenter region, also observed in the groups treated by Schwann cells. In ventral horn and lateral funiculus when the lesioned groups were treated by Schwann cells and/or cytokines there was significant increase in GFAP immunoreactivity compared with sham group. In epicenter, the injury promoted GFAP immunoreactivity increase that was potentiated by Schwann cells treatment. The injury produced NG2 increase in epicenter, included by Schwann cells treatment. The motor recovery showed in Schwann cell group is probably related to neurochemical plasticity in spinal cord preserved tissue.

Key words: spinal cord injury, Schwann cells, cytokines, central nervous sytem regeneration, neurochemical plasticity, neuroprotection.

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Neurodegeneração e Neuroproteção.....	2
1.2 Neuroplasticidade	4
1.3 Células de Schwann	5
1.4 O papel das citocinas inflamatórias na neurodegeneração e neuroplasticidade.....	7
1.5 A citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a citocina antiinflamatória fator de crescimento transformado beta 1 (TGF- β -1)	10
1.6 Comunicação neuroquímica na medula espinal.....	13
1.6.1 Os neuropeptídeos	13
1.6.2 O neurotransmissor glutamato.....	15
1.6.3 A proteína associada ao crescimento 43-KDa (GAP-43) e o fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2)	17
1.6.4 A cicatriz glial e a matriz extracelular	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Cultura de células de Schwann	23
3.2 Tratamento das células de Schwann com citocinas inflamatórias TGF- β 1 ou TNF- α	25
3.3 Desenho experimental	25
3.4 Lesão medular	27
3.4.1 Inoculação das células de Schwann na presença ou não das citocinas inflamatórias TGF- β 1 ou TNF- α na medula espinal	27
3.5 Análise do comportamento motor.....	30
3.5.1 Índice BBB.....	30
3.6 Eutanásia dos animais.....	31
3.7 Processamento tecidual.....	33
3.7.1 Coloração de Nissl e marcação imunohistoquímica.....	33
3.8 Quantificação estereológica	34
3.9 Análise morfométrica	36
3.10 Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS	39
4.1 Parâmetros da lesão	39
4.2 Análise comportamental – Índice BBB.....	39
4.3 Análise estereológica.....	40
4.4 Análise morfométrica	43
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS *	74
ANEXO	95

1. INTRODUÇÃO

A regeneração axonal no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos é limitada devido às moléculas da matriz extracelular associadas com as células gliais que tornam o ambiente do SNC não permissivo ao recrescimento axonal (Koshinaga e Whitemore, 1995; Fawcett e Asher, 1999; Davies, 1998; Chen et al., 2002). Em contraste, Iseda et al. (2004) alegam que o ambiente do SNC é globalmente permissivo e que os neurônios do SNC são intrinsecamente capazes de formar novos axônios após lesão do tecido, mas são desprovidos de grandes quantidades de fatores promotores do crescimento no meio regenerativo. No que diz respeito à medula espinal a cicatriz glial que se forma no local da lesão e o micro ambiente alterado são considerados os principais fatores relacionados a esta falência regenerativa (McKeon et al., 1991).

Enquanto os astrócitos reativos são tidos como moduladores negativos do crescimento axonal e também como produtores de moléculas da matriz extracelular, os astrócitos imaturos são vistos como substratos que sustentam este crescimento (Levine, 1994; McKeon et al., 1995; Fitch e Silver, 1997; Liberto et al., 2004).

O padrão diferente de remielinização observado entre o SNC e o sistema nervoso periférico (SNP) é atribuído à eficácia diferencial das células de Schwann (CS) em relação aos oligodendrócitos (Richardson et al., 1980; Jasmin et al., 2000). O crescimento axonal pode também ser proveniente das fibras preservadas, evento conhecido como brotamento colateral, onde as fibras em crescimento somente precisam se estender por uma pequena distância, pois elas já estão próximas das células-alvo (Kapfhammer, 1997).

As interações dinâmicas entre os neurônios e os seus alvos pós-sinápticos são eventos cruciais no desenvolvimento e na manutenção do sistema nervoso, devido ao fato de que os neurônios competem por quantidades limitadas de moléculas tróficas fornecidas por seus alvos,

por seus aferentes ou pelas células gliais (Barber, 1989).

As substâncias tróficas produzidas pelas CS podem afetar a sobrevivência neuronal e a regeneração do SNC não só através de alterações morfológicas, mas também pelas interações neuroquímicas entre as células após o trauma.

Após a lesão do SNC, tanto os neurônios quanto as células gliais expressam uma variedade de substâncias, entre as mais importantes estão moléculas com efeitos tróficos, conhecidas como os fatores neurotróficos e as citocinas inflamatórias.

As citocinas inflamatórias são importantes proteínas multifuncionais na ativação e comunicação celular. Estas substâncias são expressas durante o processo inflamatório pelas células que invadem a área da lesão e parecem contribuir para o recrutamento de células imunológicas, auxiliando na modulação da resposta glial à cicatrização, bem como na adesão destas células, sugerindo que elas possam melhorar a permissividade do crescimento de fibras e reduzir a perda tecidual (Klusman e Schwab, 1997; Prewitt et al., 1997; Acarin et al., 2000). Logo, a inflamação pode promover respostas benéficas na área da lesão.

1.1 Neurodegeneração e Neuroproteção

Mecanismos bioquímicos e moleculares são responsáveis pela adaptação ou morte celular. Segundo Richter (1998), algumas respostas são comuns no processo de adaptação celular, entre elas a hiperplasia (aumento no número de células), a metaplasia (mudança de um estado diferenciado celular para outro) e a atrofia (diminuição do tamanho da célula e de seu núcleo), deflagrando processos oxidativos intracelulares e ativando programas genéticos de morte celular.

O dano causado pela lesão traumática do SNC é formado pela degeneração primária e pela secundária subsequente. A lesão primária é imediata e irreversível, mas a lesão secundária

envolve o tempo e permite oportunidades para o tratamento (Tator e Fehlings, 1991).

As alterações primárias são acompanhadas por uma resposta inflamatória com infiltração de células fagocíticas e gliais. Estas células podem agir removendo os debris celulares e liberando tanto fatores neurotróficos e citocinas inflamatórias, como moléculas citotóxicas na medula espinal lesada (Blight, 1992; Streit et al., 1998).

Logo após a lesão os astrócitos tornam-se reativos e a microglia inicia um processo rápido de migração para as proximidades da área lesada (Niquet et al., 1994), adquirindo máxima capacidade fagocítica e secretando substâncias que modulam o processo inflamatório local (Leong e Ling, 1992; McMillian et al., 1994). Segundo Leme e Chadi (2001) as interações entre o astrócito e a microglia ativados exercem influências nos eventos tróficos na área da lesão.

A lesão primária da medula espinal leva a uma perda tecidual progressiva, hemorragia, edema, disfunção glial e perda neuronal (Lemke et al., 1990; Tator e Fehlings, 1991; Young, 1992; Tymianski e Tator, 1996), resultando em função neurológica comprometida. Estratégias neuroprotetivas aplicadas logo após as lesões podem limitar, mas não prevenir a perda tecidual (Oudega et al., 2005). A quebra da barreira hemato-medular que ocorre após lesão da medula espinal leva a alterações da homeostase celular e neuroquímica (Rabchevsky et al., 1999). Alterações nos níveis intracelulares de íons e na homeostase das células gliais podem difundir da área da lesão devido à extensiva sinalização intracelular que ocorre entre as células gliais (Mills et al., 2004).

Os eventos inflamatórios e citotóxicos associados resultam em degeneração secundária (Anderson e Hall, 1993). A degeneração secundária é caracterizada pela inflamação, gliose reativa, morte celular e desmielinização, determinando o grau de tecido lesado e prejudicando o prognóstico neurofuncional do indivíduo (Blight, 1992; Dusart e Schwab, 1994; Schwab e Bartholdi, 1996; Crowe et al., 1997; Lee et al., 2000). Os eventos secundários também

aumentam os níveis locais de diversos fatores neurotróficos que estimulam a proliferação de progenitores endógenos (Tokita et al., 2001; Kojima e Tator, 2002), auxiliando no restauro das funções motoras de membros posteriores (Zai e Wrathall, 2005).

O reparo da lesão envolve as interações das células com os produtos secretados no intuito de minimizar danos e restaurar a arquitetura tecidual. O estudo de abordagens que possam influenciar a resposta à lesão, assim como as análises dos mecanismos celulares e moleculares é de particular importância.

1.2 Neuroplasticidade

Neuroplasticidade é a capacidade do sistema nervoso de alterar sua estrutura e funcionamento em resposta a experiências, drogas, hormônios ou lesões (Kolb e Wishaw, 1998; Chen et al., 2002). Experiências podem alterar a extensão dos dendritos e os processos gliais, vasculares e metabólicos em diferentes sistemas (Kolb e Wishaw, 1998; McHugh e McHugh, 2000). Assim, a plasticidade não compreende apenas respostas estruturais, mas diferentes estímulos influenciam também a bioquímica celular.

A melhora funcional observada após lesão medular pode estar relacionada com uma adaptação dos animais à condição física, provavelmente ocasionada pela capacidade do SNC em fazer com que estruturas preservadas desenvolvam funções antes atribuídas a outras células, ou ainda, ao brotamento colateral (Aguayo et al., 1991). Alterações dos sistemas intraespinhais evidenciam a remodelagem de circuitos, justificando o aumento de respostas funcionais como a espasticidade e o clônus muscular que por ventura possam ocorrer. Axônios preservados e/ou regenerados a partir de núcleos do tronco encefálico e mesmo do córtex cerebral, assim como axônios proprioespinais locais constituem um importante fator no grau de recuperação funcional dos animais com lesão medular (Beattie et al., 1997).

Uma região relacionada com fenômenos plásticos na medula espinal, conhecida como geradora de padrão central (CPG), é responsável por padrões de movimentos rítmicos sem a influência de vias supraespinais ou de estímulos sensitivos (de Leon et al., 2001; Raineteau e Schwab, 2001). Esta região está localizada nos níveis lombar e sacral da medula espinal e é formada por neurônios espinais interconectados (de Leon et al., 2001; Dietz, 2003).

Segundo Grillner et al. (1995), alguns neurotransmissores podem modificar as propriedades funcionais da CPG. Os efeitos modulatórios promovidos pelas informações supra-espinal e sensitiva aferente, bem como aqueles influenciados pela liberação local de neurotransmissores, indicam que a CPG não produz padrões estereotipados de movimentos, mas sim padrões flexíveis, gerados a partir de mecanismos plásticos e relacionados às informações que a ela chegam (Mackay-Lyons, 2002).

Dentre os eventos plásticos após lesão da medula espinal ocorre divisão celular endógena. A população de novas células em divisão reconhece oligodendrócitos em regiões de desmielinização, parecendo remielinizar axônios. Ainda, astrócitos gerados são provavelmente importantes para o restabelecimento da estabilidade parenquimal e da barreira hemato-medular após lesão (Smith et al., 1990; Sofroniew, 2000; Faulkner et al., 2004). É importante ressaltar que a recuperação de lesões do SNC requer a ativação astrocitária (Smith et al., 1990; Sofroniew, 2000; Faulkner et al., 2004).

A compreensão dos mecanismos plásticos que ocorrem após lesões do SNC é de fundamental importância para influenciar as respostas bioquímicas e morfológicas, tanto no que diz respeito à regeneração axonal como à formação de conexões sinápticas.

1.3 Células de Schwann

A CS é o principal componente do SNP, onde mieliniza axônios. Ela é responsável pela

produção de vários tipos de substâncias como os fatores neurotróficos, as citocinas inflamatórias, as moléculas de adesão e os componentes da matriz extracelular. Dentre os fatores neurotróficos produzidos pelas CS estão o fator de crescimento do nervo (NGF) (Bandtlow et al., 1987), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (Widenfalk et al., 2001).

O suprimento aumentado de fatores neurotróficos fornecidos por estas células serve para proteger o axônio de uma maior degeneração retrógrada e, conseqüentemente, o corpo celular neuronal, bem como promover o crescimento da fibra (Raivich e Kreutzberg, 1993; Henderson et al., 1994). A secreção de diversos fatores promotores de crescimento axonal faz das CS um substrato celular amplamente utilizado para estratégias de reparo na medula espinal adulta (Li e Raisman, 1994; Chen et al., 1996; Martin et al., 1996; Oudega et al., 1997; Xu et al., 1997). Estas substâncias podem influenciar a sobrevivência, a diferenciação e o crescimento de neurônios, assim como o crescimento de fibras (Xu et al., 1997; Hoke et al., 2003; Peng et al., 2003). Deve ser considerado que na fase aguda da lesão, o processo inflamatório influencia as respostas neurotróficas promovidas pelas CS (Peng et al., 2003).

A migração espontânea de CS para a área da lesão foi descrita em humanos e nas lesões experimentais da medula espinal (Beattie et al., 1997; Buss et al., 2007). Esta habilidade das CS de migrarem para um tecido aparentemente desorganizado e necrótico, adotando uma orientação paralela com o eixo longitudinal da medula espinal, influencia o direcionamento do brotamento e do crescimento axonal (Brook et al., 1998).

As CS podem ser implantadas no SNC como componentes de um enxerto de nervo periférico, como células purificadas ou inseridas no interior de um canal de polímero biocompatível. Um dos fatores importantes do transplante de CS para regiões do SNC lesado é que o mesmo diminui a possibilidade de rejeição imunológica (Menei et al., 1998). Uma vantagem das células de Schwann são as características técnicas, considerando que seu número

pode ser rapidamente aumentado *in vitro* em curto período de tempo (Morrissey et al., 1991).

A habilidade de células de promoverem o reparo do SNC depende das moléculas que elas expressam. As injeções de células na medula espinal contusa resultam em efeitos regenerativos que podem ser a base da recuperação sensório-motora encontrada após tratamentos (Oudega et al., 2005). Quando CS de ratos adultos foram injetadas na medula espinal contusa destes, as mesmas limitaram a perda tecidual induzida pela lesão (Imaizumi et al., 2000; Azanchi et al., 2004), bem como promoveram a mielinização e a regeneração e/ou preservação de axônios espinais e supraespinais, proporcionando uma melhor função motora de membros posteriores (Takami et al., 2002), além de diminuir a cicatriz glial (Martin et al., 1996).

O transplante de CS parece ser uma alternativa viável na tentativa de contornar os fatores restritivos relacionados ao ambiente regenerativo e ao crescimento de fibras nervosas (Xu et al., 1997). O implante de CS obtidas a partir de nervos e expandidas *in vitro* é proposto como uma futura terapia no reparo de lesões do SNC e SNP em humanos (Casella et al., 1996).

1.4 O papel das citocinas inflamatórias na neurodegeneração e neuroplasticidade

A inflamação pós-lesão é crucial para defesa e reparo do tecido acometido. Entre as substâncias produzidas e liberadas durante o processo inflamatório estão as citocinas inflamatórias. Seus efeitos são mediados pela modulação da ativação de células imunes, pela produção e proliferação de outras moléculas após lesões (Di Santo et al., 1997).

As citocinas inflamatórias são um grupo de proteínas de baixo peso molecular, com funções na iniciação, na propagação e na supressão da resposta inflamatória. Estas substâncias são mediadores polipeptídeos e importantes reguladores de uma variedade de processos celulares, tais como a sobrevivência, a proliferação, a diferenciação e a migração. Elas agem

também como mediadoras e ativadoras da função astrocitária (Acarin et al., 2000).

Lesões no SNC produzem uma resposta imunológica com liberação de várias citocinas inflamatórias com funções na regulação da proliferação, da migração e da ativação de células gliais, assim como no recrutamento de células imunológicas para o local da lesão (Giralt et al., 2002; Schermer e Humpel, 2002). Além de seu papel no recrutamento de células inflamatórias, as citocinas podem influenciar o estado de ativação destas células, levando a ativação de astrócitos e microglia (Eddleston e Mucke, 1993).

Deve-se considerar que as citocinas são geralmente produzidas em pequenas quantidades, exercendo sua ação localmente (Acarin et al., 2000). As citocinas não são armazenadas como moléculas pré-formadas, sendo sua síntese iniciada por novas transcrições de genes, como resultado da ativação celular. Uma vez sintetizadas, as citocinas são rapidamente secretadas, resultando em uma grande liberação quando necessário (Abbas e Litchman, 2005).

As citocinas são secretadas por células da imunidade inata e adaptativa, mediando muitas de suas funções. As ações das citocinas são frequentemente pleitrópicas e redundantes, respectivamente a habilidade de uma citocina agir em diferentes tipos celulares, e a propriedade de múltiplas citocinas possuírem os mesmos efeitos funcionais, o que está de acordo com suas diversas ações. Estas proteínas têm a habilidade de estimular a produção de outras citocinas, o que leva a uma cascata de alterações nas quais uma segunda ou terceira citocina podem mediar os efeitos biológicos da primeira. Deste modo, as citocinas podem agir tanto de forma local quanto sistêmica, com ações autócrinas, parácrinas ou endócrinas. Os sinais externos regulam a expressão de receptores de citocinas e, portanto, o potencial da resposta das células às citocinas (Abbas e Litchman, 2005).

As células inflamatórias são decisivas no processo de reparo e cicatrização (Chan et al., 2001; Markus et al., 2002). Estudos *in vitro* relatam a síntese e a liberação de citocinas pelos

astrócitos. Já *in vivo*, a expressão de citocinas em astrócitos parece estar geralmente restrita ao período do desenvolvimento ou a situações patológicas (Brook et al., 2001; Lisak et al., 2001). As microglias reativas e os macrófagos também expressam quantidades elevadas de citocinas inflamatórias ao mesmo tempo em que mostram aumentos dos níveis de fatores neurotróficos após lesão (Barouch e Schwartz, 2002).

As citocinas iniciam alterações que levam a formação de respostas inflamatórias, incluindo permeabilidade vascular elevada e infiltração de células com funções fagocíticas. Este aumento na permeabilidade vascular está relacionado com o rompimento da barreira hemato-medular após lesão medular. Barreira esta ativamente envolvida na modulação dos processos de degeneração e regeneração. Isto porque a comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso se dá através da barreira hemato-medular. Os astrócitos conectam-se aos capilares sanguíneos, através de expansões conhecidas como pés vasculares, participando da formação desta barreira, que é importante para a manutenção não somente como um limite entre o SNC e os compartimentos sanguíneos, mas também para promover uma separação imunológica (Weller et al., 1996). O rompimento pós-traumático da barreira hemato-medular também permite o extravasamento de fatores derivados do sangue e elementos celulares, responsáveis por promover processos inflamatórios (Lee et al., 2000).

Segundo Kerschensteiner et al. (2003) a inflamação após lesões do SNC pode ter efeitos benéficos, já que os fatores que induzem o crescimento e a diferenciação das células estão presentes tanto no sistema imune, através de citocinas inflamatórias, como no sistema nervoso, através dos fatores neurotróficos. Além das CS, as células gliais também são fontes de várias citocinas inflamatórias, as quais podem causar a amplificação ou a supressão das respostas imunes.

Estudos sugerem que tentar impedir ou limitar a inflamação, via a administração de drogas antiinflamatórias pode prevenir a extensiva perda tecidual e restaurar parcialmente a

atividade motora após lesão medular (Popovich et al., 1999; Lee et al., 2000; Stirling et al., 2004; Teng et al., 2004). É possível que em certas condições, o recrutamento e a ativação de macrófagos, microglia e astrócitos precisem ser limitados para evitar um dano extensivo. Entretanto, diminuir a resposta inflamatória pode limitar os processos regenerativos (Pineau et al., 2007). Apesar das evidências de que as células imunes podem contribuir para a perda de tecido neuronal após lesões, outros estudos mostram que quando apropriadamente estimuladas células como os macrófagos e a microglia podem promover o crescimento e regeneração axonal, resultando na recuperação funcional em modelos animais de lesão medular (Prewitt et al., 1997; Rabchevsky e Streit, 1997; Rapalino et al., 1998).

1.5 A citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a citocina antiinflamatória fator de crescimento transformado beta 1 (TGF- β -1)

O TNF- α é o principal mediador da resposta inflamatória aguda, sendo um dos responsáveis pela imunidade inata. Esta citocina é produzida por astrócitos, microglia, macrófagos, células imunes e por neurônios (Medana et al., 1997; Pan et al., 1999).

Esta citocina possui diversos efeitos nas respostas celulares, como na diferenciação, proliferação e reatividade celular, apoptose, imunidade e inflamação (Merrill e Zimmerman, 1991; Tzeng e Wu, 1999; Baud e Karin, 2001). Deste modo, o TNF- α está implicado na indução da produção glial de produtos tóxicos (Chao et al., 1995), na expressão de moléculas de adesão (Munoz-Fernandez e Fresno, 1998), na permeabilidade celular endotelial (de Vries et al., 1996) e na modulação da expressão de moléculas da matriz extracelular (Pineau et al., 2007).

Estudos *in vivo* (Redford et al., 1995; Yan et al., 2001) e *in vitro* (D'Souza et al., 1995) documentam os efeitos citotóxicos do TNF- α nos oligodendrócitos, promovendo a

desmielinização.

O TNF- α é visto como um dos mediadores centrais de lesão tecidual e inflamação, participando de inúmeras condições neurológicas, tais como o trauma, a esclerose múltipla, a doença de Alzheimer e a isquemia (Pan et al, 1999).

Em contraste a essas ações tóxicas, o TNF- α possui efeito regenerativo nos axônios (Schwartz et al., 1991) e tem um efeito neurotrófico pela indução da síntese do NGF em astrócitos (Yoshida e Gage, 1992). Se quantidades inadequadas de TNF- α estão presentes, como em animais tratados com anticorpos neutralizadores anti-TNF ou em camundongos TNF-deficientes, a consequência pode ser o fracasso em conter infecções e inflamações (Abbas e Litchman, 2005). Em baixas doses, ele pode ter ações neuroprotetivas, prevenindo principalmente a morte celular excitotóxica (Cheng et al., 1994).

Entre as citocinas que medeiam a imunidade adaptativa está o TGF- β , que pertence a uma família de moléculas intimamente relacionadas, comumente chamadas de TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. As células do sistema imune sintetizam principalmente TGF- β 1 (Abbas e Litchman, 2005).

De um modo geral, a microglia ativada é a principal produtora de TGF- β 1 após lesões do sistema nervoso (Pasinetti et al., 1993; Lehrmann et al., 1998). Entretanto os neurônios, os astrócitos e as células endoteliais também podem produzi-lo (O'Brien et al., 1994; Logan et al., 1994; Ata et al., 1999).

O TGF- β regula muitos processos, entre eles o desenvolvimento, a angiogênese, a homeostase tecidual e a inflamação (Lagord et al., 2002). Além disso, o TGF- β está implicado na sobrevivência neuronal, na proteção de eventos excitotóxicos e na morte celular isquêmica (Prehn et al., 1993; McNeill et al., 1994) por disparar mecanismos anti-oxidantes e promover a expressão de genes anti-apoptóticos (Pratt e McPherson, 1997). O TGF- β tem habilidade tanto para sustentar quanto para suprir diversas atividades das células inflamatórias. Ele é

quimiotático para as células gliais (Hurwitz et al., 1995), eleva a expressão de citocinas antiinflamatórias e diminui a ativação microglial (Suzumura et al., 1993; Xiao et al., 1997), controlando a extensão dos processos inflamatórios e as reações gliais (Acarin et al., 2000).

O TGF- β atua nos neutrófilos e nas células endoteliais, em grande parte para contrapor-se aos efeitos das citocinas pró-inflamatórias. Por meio dessas ações, o TGF- β inibe as respostas imunes e inflamatórias, além de ativar a síntese de moléculas da matriz extracelular. Estas ações podem promover a cicatrização depois que reações imunes e/ou inflamatórias locais tenham sido controladas (Abbas e Litchman, 2005).

Postula-se que o TGF- β 1 estimule a produção de vários fatores neurotróficos nos astrócitos, além de ser um forte inibidor da proliferação astrocitária, o que pode ser importante nos processos de cicatrização (McTigue et al., 2000; Lagord et al., 2002).

O TGF- β atua também na regulação, na diferenciação e na proliferação de CS (Ridley et al., 1989; Watabe et al., 1994; Sulaiman e Gordon, 2002). Logo, a manipulação dos níveis do TGF- β pode ter efeitos secundários na regeneração axonal através destas células (King et al., 2004). Apesar de não estar presente em altos níveis no SNC adulto normal (Unsicker et al., 1991), há um aumento na expressão do TGF- β após lesão (McTigue et al., 2000; Lagord et al., 2002).

O estudo de Tyor et al. (2002) afirma que apesar de tanto o TNF- α quanto TGF- β estarem presentes nas primeiras horas após o trauma, há uma expressão relativamente tardia do TGF- β em relação ao TNF- α . Por isso, foi proposto que o tratamento precoce com TGF- β poderia conter os efeitos pró-inflamatórios do TNF- α e amenizar a lesão secundária.

1.6 Comunicação neuroquímica na medula espinal

1.6.1 Os neuropeptídeos

Os neuropeptídeos estão amplamente distribuídos no SNC e SNP e possuem ação neurotransmissora, influenciando os processos plásticos do SNC. Estudos sugerem que os neuropeptídeos podem participar do direcionamento e crescimento axonal (De Felipe et al., 1995; White e Mansfield, 1996; White, 1998). O fato de o neuropeptídeo tirosina Y (NPY) ser expresso no SNC é sugestivo de um papel funcional relacionado ao crescimento, direcionamento e trofismo (Ubink et al., 2003).

O NPY é um peptídeo com 36 aminoácidos que pertence à família de polipeptídeos pancreáticos e ativa seis receptores, denominados Y1 à Y6 (Zukowska-Grojec et al., 1998). Os receptores Y1 e Y2 foram identificados na medula espinal (Zhang et al., 1994). Estudos mostraram que o NPY é sintetizado por neurônios na medula espinal, assim como por neurônios simpáticos e parassimpáticos (Lacroix et al., 1990; Lundberg et al., 1990; Schalling et al., 1991). Os interneurônios intrínsecos e os interneurônios de projeções bulboespinais descendentes são a origem do NPY na medula espinal (Hökfelt et al., 1981; Sasek e Elde, 1985; Wakisaka et al., 1991).

Este peptídeo angiogênico está envolvido em diversas funções, como na regulação da pressão sanguínea, na analgesia e no controle do sistema nervoso neurovegetativo (de Quidt e Emson, 1986), além de controlar a liberação de glutamato e sua excitotoxicidade (Zukowska-Grojec et al., 1998).

A imunorreatividade do NPY foi detectada na medula espinal do rato e do gato na ausência de qualquer estimulação periférica (Mark et al., 1997). As concentrações de NPY no corno posterior são maiores que no corno anterior, sugerindo um papel no processamento sensorial aferente (Roddy et al., 1990). Devido o fato de o NPY e do ácido gama-aminobutírico

(GABA) estarem presentes em neurônios do corno posterior, é possível que suas ações estejam intimamente relacionadas. Considerando o GABA como o principal neurotransmissor inibitório, eles poderiam então agir em conjunto para produzir inibição pré-sináptica de aferentes primários nociceptivos (Rowan et al., 1993). Rowan et al (1993) relataram que todos os neurônios que são imunorreativos ao NPY também são imunorreativos ao GABA.

Há evidências que o NPY não seja degradado rapidamente dentro do SNC e por esta razão exista uma melhor distribuição do que liberação em diversas áreas (Fuxe et al., 1990; Liu et al., 1994).

Outro neuropeptídeo, a substância P é um membro da família das taucininas. Os receptores da substância P, conhecidos como neurocininas influenciam diversos processos fisiológicos como a digestão, a imunidade, a função endócrina, a sensação dolorosa e a transmissão de sinal no SNC (Otsuka e Yoshioka, 1993). A substância P funciona como um neurotransmissor entre as fibras aferentes primárias e os neurônios na medula espinal, mediando informações sensoriais dos níveis espinais para centros supra-segmentares (Nicoll et al., 1980).

A substância P exerce influência sobre processos plásticos da medula espinal (Kozlov et al., 2001). Este peptídeo está envolvido na regulação da função de motoneurônios do corno anterior, podendo exercer influências tróficas sobre estas células (Brown et al., 1995).

No sistema nervoso, as células gliais sintetizam e expressam neuropeptídeos (Ubink et al., 2003). A substância P pode ser uma reguladora das funções gliais e desempenhar um papel nos mecanismos de defesa no SNC, modulando a neuroimunoregulação. Por regular as funções da microglia, este peptídeo desempenha um importante papel na patologia de doenças imuno-mediadas (Lai et al., 2000).

A presença de receptores peptidérgicos na glia durante a vida pré-natal sugere que as interações entre as células gliais e entre as células gliais e os neurônios são importantes durante

o desenvolvimento, assim como no adulto sob condições normais e patológicas (Ubink et al., 2003). Deve ser considerado que fatores neurotróficos podem ser reguladores endógenos da expressão peptidérgica glial (Shinoda et al., 1989; McMillian e Hong, 1994).

Se os astrócitos ao redor da área de liberação de peptídeos expressam os receptores correspondentes, eles podem receber informação química dos neurônios que liberaram os peptídeos. A importância de receptores peptidérgicos nos astrócitos está relacionada aos seus efeitos finais nos neurônios vizinhos, sendo que os peptídeos possuem a habilidade de regular a proliferação de astrócitos em cultura, havendo muitos mecanismos possíveis que consideram os efeitos dos peptídeos na proliferação (Deschepper, 1998). A astrocitose reativa que ocorre após lesão medular é acompanhada de um aumento na expressão de várias moléculas, incluindo os receptores peptidérgicos (Eddleston e Mucke, 1993). A presença de receptores peptidérgicos nos astrócitos sugere que os peptídeos têm a habilidade de regular a interação entre os astrócitos e os neurônios. Os peptídeos regulam a utilização de glucose pelos astrócitos. Os astrócitos estão envolvidos na recaptação de neurotransmissores e na liberação e tamponamento do potássio extracelular (Deschepper, 1998). Todas estas funções podem ser reguladas por peptídeos (Kimelberg et al., 1997).

Segundo White (1998), o NPY expresso por precursores de CS tem um papel importante na estimulação ou modulação da liberação de neurotrofina-3 do tecido associado com neurônios sensoriais e motoneurônios. Indireta porque o NPY estimula a liberação de neurotrofina-3 na medula espinal em cultura, que por sua vez estimula o crescimento neurítico de neurônios do gânglio da raiz dorsal.

1.6.2 O neurotransmissor glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso. Seus receptores são de dois tipos: ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores glutamatérgicos

ionotrópicos estão ligados a um canal iônico e são divididos em três classes, nomeadas por seus seletivos agonistas farmacológicos: cainato, NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato). Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos estão ligados a mecanismos intracelulares de transdução de sinal, exercidos através da proteína G (Kaczmarek et al., 1997; Michaelis, 1998; Ozawa et al., 1998).

Os receptores ativados pelo glutamato constituem a classe mais abundante de receptores de neurotransmissores no SNC de vertebrados, sendo essenciais para a neurotransmissão excitatória rápida e sua ativação foi proposta como a base molecular da plasticidade sináptica (Henley et al., 1993). Estudos mostram que a produção de receptores glutamatérgicos pode estar sob regulação induzida pela plasticidade sináptica (Ozaki et al., 1997; Buonanno e Fields, 1999). Isto pode ser benéfico no ambiente comprometido da medula espinal lesada (Grossman et al., 2001).

Os eventos excitotóxicos causados pela excessiva liberação de glutamato ou pela quebra do metabolismo glutamatérgico estão implicados na morte neuronal associada com o trauma da medula espinal (Scarisbrick et al., 1999). A lesão medular causa uma elevação no glutamato extracelular (Panter et al., 1990), que ativa receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Grossman et al., 2001), resultando em um aumento nas concentrações de cálcio em neurônios e astrócitos (Gwak et al., 2005). Uma retroalimentação positiva contínua entre astrócitos e neurônios ocorre após lesão medular, resultando em hiperexcitabilidade neuronal elevada via receptores glutamatérgicos metabotrópicos nos astrócitos, a qual é seguida por alterações neuronais (Gwak et al., 2005).

O glutamato é um importante combustível metabólico (Hertz e Hertz, 2003). Segundo Hertz e Zielke (2004) todas as funções do glutamato são reguladas pelos astrócitos. Isto se aplica não somente aos papéis benéficos do glutamato, mas também a seu papel na excitotoxicidade e morte neuronal. Os neurônios dependem da produção do transmissor

glutamato pelos seus astrócitos vizinhos. Classicamente, os astrócitos são conhecidos por influenciarem o meio do SNC em termos da homeostase do glutamato e mediar respostas inflamatórias no SNC (Giulian, 1987; Walz, 1989).

A recaptção neuronal do transmissor glutamato previamente liberado é deficiente, levando a recaptção por astrócitos, garantindo concentrações glutamatérgicas sinápticas submoleculares sob condições latentes (Danbolt, 2001). Esta recaptção é uma importante função glial, sendo a principal via para a remoção do glutamato da fenda sináptica (Schipke e Kettenmann, 2004).

1.6.3 A proteína associada ao crescimento 43-KDa (GAP-43) e o fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2)

O crescimento axonal, um evento chave tanto durante o desenvolvimento neuronal quanto na regeneração axonal está associado com a elevada expressão de proteínas neuronais específicas. Uma destas proteínas é a GAP-43 (Hoffman, 1989).

A GAP-43 é expressa em altos níveis quando neurônios estão formando novas conexões durante o desenvolvimento e durante os fenômenos plásticos estruturais observados no SNC adulto (Bulsara et al., 2002). Schwab (1993) relatou a correlação dos altos níveis de GAP-43 e o seu potencial plástico em regiões específicas do SNC. A plasticidade atividade-dependente está também relacionada à produção de fatores neurotróficos, sugerindo que estas moléculas sejam reguladoras do crescimento neurítico (Thoenen, 1995). Esta proteína desempenha um papel na transdução do sinal, possivelmente relacionado a motilidade e ao direcionamento do cone de crescimento (Skene, 1989; Strittmatter et al., 1992; Benowitz e Routtenberg, 1997). O crescimento regenerativo correlaciona com um aumento na quantidade de GAP-43 sustentando o transporte axonal nos neurônios em regeneração (Skene e Willard, 1981; Benowitz e Routtenberg, 1997).

Foi proposto que a ausência de significativa regeneração intrínseca por neurônios do SNC está relacionada com uma falência em elevar a expressão da GAP-43 (Skene, 1989). A expressão de GAP-43 e a regeneração axonal são estimuladas quando corpos celulares neuronais são expostos à inflamação (Lu e Richardson, 1995), a neurotrofinas (Kobayashi et al., 1997) ou a CS (Berry et al., 1996).

Outro fator neurotrófico analisado neste experimento, o FGF-2 está amplamente distribuído no SNC (Chadi et al., 1994). Há dois principais subtipos de FGF, o fator de crescimento fibroblástico ácido (FGF-1 ou aFGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2 ou bFGF).

O FGF-2 tem efeitos proliferativos e neurotróficos endereçados a alguns eventos de restauro após lesão do sistema nervoso (Blottner e Baumgarten, 1992). *In vivo*, o FGF-2 está presente nos neurônios (Gomez-Pinilla et al., 1992), nos astrócitos normais e reativos (Leme e Chadi, 2001) e na microglia (Liu et al., 1998). O FGF-2 estimula a proliferação astrocitária, podendo mediar importantes interações entre os neurônios e as células gliais. O FGF-2 promove a proliferação de células-tronco e progenitores neurais na medula espinal do rato adulto (Shihabuddin et al., 1997), como a diferenciação de precursores celulares em oligodendrócitos maduros (McKinnon et al., 1990), sendo mitógeno para as CS (Peulve et al., 1994).

O FGF-2 glial possui efeitos anti-apoptóticos e propriedades neurotróficas parácrinas em neurônios do SNC, como a estimulação da sobrevivência neuronal e do crescimento neurítico (Griffin et al., 1995), promovendo a gliogênese e a angiogênese, além de estimular a secreção de moléculas da matriz extracelular (Reeves et al., 1999). Isto indica seu envolvimento nos eventos pós-lesão (Logan e Berry, 1993; do Carmo Cunha et al., 2007) onde há um aumento relativamente rápido de sua produção (Mocchetti et al., 1996).

O FGF-2 foi visto como neuroprotetivo em modelos de isquemia e lesão traumática

cerebral, promovendo a regeneração axonal na medula espinal lesada (Koketsu et al., 1994; Fisher et al., 1995; Dietrich et al., 1996; Otto e Unsicker, 1990; Meijs et al., 2004). O tratamento com FGF-2 promoveu melhora do comportamento funcional, mas não a preservação tecidual na lesão medular contusa severa (Rabchevsky et al., 1999). Já a adição de FGF-2 ao enxerto de CS promoveu a sobrevivência neuronal perto da interface do enxerto, mas não melhora comportamental (Meijs et al., 2004).

Na medula espinal, a análise das propriedades tróficas parácrinas de substâncias gliais é importante devido às respostas moleculares e celulares locais poderem interferir com os processos de recuperação funcional sensório-motora após lesão do SNC (Chadi et al., 2001).

1.6.4 A cicatriz glial e a matriz extracelular

A falência da regeneração da medula espinal de mamíferos adultos é atribuída à abundância de proteoglicanos inibitórios associados com as células gliais (Grimpe e Silver, 2002). As células gliais são as principais protagonistas nos eventos de reparo e recuperação após lesão nervosa. Os astrócitos, a microglia e as CS no SNC lesionado interferem na manutenção neuronal e no crescimento de fibras (Li e Raisman, 1995; Prewitt et al., 1997; Fawcett e Asher, 1999).

As respostas gliais variam conforme a distância da área da lesão (Mills et al., 2004). Do ponto de vista morfológico, a reação astrocitária que ocorre após lesão medular resulta no aumento do citoplasma, assim como do número e tamanho de seus processos citoplasmáticos (Steward et al., 1993). Estas alterações são acompanhadas de aumento da síntese da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), o filamento intermediário do citoesqueleto do astrócito (Hawrylak et al., 1998).

As células gliais, em particular os astrócitos, expressam receptores de neurotransmissores, tais como receptores de glutamato e de GABA. Todos os receptores

expressos por neurônios foram descobertos na glia. Foi estabelecido que os astrócitos não só promovem o suporte metabólico e estrutural para os neurônios, mas também interferem com a atividade neuronal e estão envolvidos na transmissão do sinal (Schipke e Kettenmann, 2004).

Evidências indicam que a exatidão com a qual axônios em desenvolvimento são direcionados a alvos específicos é devida a uma combinação de moléculas, as quais podem agir em diferentes tempos e lugares como atrativas ou repulsivas para realizar um padrão de crescimento ordenado (Hopker et al., 1999). Os processos astrocitários são responsáveis por guiar o cone de crescimento (Raisman, 2004).

Após lesão, axônios adultos ramificam na área de injúria (Li e Raisman, 1995), mas estas ramificações permanecem restritas à área da lesão e não podem alcançar seus alvos para restaurar conexões funcionais (Raisman, 2004). O fato de a mielina central ser inibitória ao crescimento não explica porque os axônios também falham na regeneração através da substância cinza, onde não há mielina (Aldskogius, 2005). Os oligodendrócitos e a mielina em degeneração são prontamente isolados e removidos pela microglia fagocítica, não podendo formar uma barreira à regeneração (Raisman, 2004). Parece provável que esta prevenção de crescimento esteja associada não com os oligodendrócitos ou com a mielina central, mas aos astrócitos reativos (Bradbury et al., 2002; Grimpe e Silver, 2002; Silver e Miller, 2004). A inibição do avanço dos axônios por astrócitos reativos poderia então explicar porque a regeneração falha em ambas as substâncias da medula espinal, branca e cinza (Raisman, 2004).

Os astrócitos exibem uma relação estrutural com os neurônios em todas as regiões do SNC, constituindo um limite entre o SNC e o SNP nas raízes motoras e sensoriais da medula espinal (Aldskogius e Kozlova, 1998).

A cicatriz glial age como uma barreira tanto física quanto química para a regeneração axonal. Três diferentes famílias de macromoléculas estão implicadas nesta função. Elas são as moléculas inibitórias ao crescimento associadas à mielina (Filbin, 2003), a família das

semaforinas (Moreau-Fauvarque et al., 2003) e diversos proteoglicanos (Morgenstern et al., 2002). Um importante componente do meio celular é a matriz extracelular que contém moléculas axonais inibitórias e favoráveis ao crescimento (Grimpe e Silver, 2002).

A glicoproteína NG2 é um tipo de proteoglicano sulfato de condroitina (PGSC), expressa no SNC adulto e em desenvolvimento pelas células gliais (Karram et al., 2005). Resultados mostram que células NG2-positivas podem ser consideradas células precursoras gliais que geram macrófagos, oligodendrócitos, astrócitos (Levine, 1994; Levison et al., 1999; Dawson et al., 2000; Jones et al., 2003; Zai e Wrathall, 2005) ou neurônios (Karram et al., 2005) no SNC adulto e em desenvolvimento.

Após lesão medular contusa há proliferação de células NG2 de 1-8 semanas (McTigue et al., 2001). Estas células são recrutadas após lesões traumáticas, com acúmulo na área da lesão, provavelmente devido à combinação da proliferação e migração (Levine, 1994).

O PGSC NG2 na cicatriz glial é responsável por impedir o crescimento, contrastando com as observações que axônios podem crescer no interior de fibroblastos NG2-positivos transplantados (Jones et al., 2003). Grimpe e Silver (2002) afirmam que as moléculas de proteoglicanos estão envolvidas com neurônios em regeneração no SNC.

A atividade dos proteoglicanos depende não somente do tipo de neurônio com que eles interagem, mas também da interação com outras células e substâncias ao redor, como as moléculas de adesão celular ou da matriz extracelular (Bovoleta e Feraud-Espinosa, 2000). A regeneração axonal requer uma redução de substratos inibitórios, assim como um aumento de substratos permissivos e direcionadores de crescimento e/ou de fatores neurotróficos no tecido lesado para promover um meio ótimo para a regeneração (Jones et al., 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito recuperação motora e tecidual da injeção de CS cultivadas na medula espinal do rato submetida ao trauma contuso. E ainda, avaliar se o pré-tratamento de CS com as citocinas inflamatórias TGF- β 1 e TNF- α pode interferir nas respostas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Analisar a evolução dos parâmetros motores de ratos com lesão contusa de intensidade moderada da medula espinal ao nível do 11º segmento torácico e tratados com inoculação local de CS, na presença ou não das citocinas inflamatórias TGF- β 1 e TNF- α .
2. Analisar e quantificar através do método estereológico o número estimado de neurônios remanescentes e o volume de tecido preservado.
3. Analisar e quantificar as alterações da imunorreatividade da GAP-43, do glutamato, do NPY, da substância P, da GFAP, do FGF-2 e do PGSC NG2 no epicentro da lesão e no tecido medular preservado nas adjacências da lesão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células de Schwann

Nervos ciáticos foram obtidos de ratos Wistar adultos jovens e machos (250 gramas), em seguida, colocados em uma placa de petri de 60mm com meio Leibovitz-15 (L-15; Gibco, EUA), sob a técnica cirúrgica asséptica segundo método descrito por Morrissey et al. (1991). Todo o excesso de tecido aderido aos nervos (músculos, gorduras, vasos sanguíneos e perineuro) foi removido sob magnificação por uma lupa estereoscópica microcirúrgica (DF Vasconcelos, Brasil). Os nervos foram cortados em pedaços com cerca de 1mm para a obtenção dos explantes, colocados em uma placa de petri de 60mm com solução D-10, composta por DMEN (Gibco, EUA), 0,1% de gentamicina (Life Technologies, EUA) e 10% de soro fetal bovino (Hyclone, EUA). O excesso do meio foi adequado de modo que os explantes não ficassem flutuando, mas se mantivessem completamente cobertos. Em seguida, incubados em estufa de gás carbônico (CO₂, 6%) à 37°C. Este procedimento leva à saída progressiva dos fibroblastos que vão migrando dos explantes primários e se fixando à placa de cultura, etapa esta denominada E₁.

A solução D-10 destas placas foi trocada duas vezes por semana, sendo os explantes transferidos para uma nova placa, aproximadamente uma vez por semana, por 4 semanas, dando início cada semana a uma nova etapa. Esta transferência foi realizada sempre que observada grande quantidade de fibroblastos migrando a partir dos explantes. A dissociação enzimática foi realizada no momento em que a maioria das células que migraram dos explantes eram CS. Este processo consiste em deixar os explantes pernoitarem em uma solução com dispase (1,25U/ml, Boehringer Mannheim, Alemanha) e colagenase (0,05% Worthington, Freehold, EUA), enzimas digestoras que agem sobre os explantes, dissociando-os

completamente.

Após esta etapa, as células foram retiradas juntamente com o meio da placa, centrifugadas e plaqueadas em placas de 100mm com solução D10/Mitógeno, composto por D-10, forskolina ($2\mu\text{M}/\text{ml}$; Sigma, EUA) e extrato pituitário bovino ($20\mu\text{g}/\text{ml}$; Biomedical Technologies, EUA). No dia seguinte, as células mortas e os restos de mielina eram eliminados com a troca do meio, etapa esta chamada de P_0 . Nesta etapa o meio de cultura foi trocado duas vezes por semana. Após a primeira semana de cultivo, as células foram tratadas com o anticorpo THY-1 (gentilmente fornecido pelo Dr. Martin Oudega do Projeto Miami para a Cura da Paralisia, Universidade de Miami, EUA) e com complemento sérico de coelho (ICN Pharmaceuticals, EUA) para a eliminação dos fibroblastos restantes (figura 1). Após o tratamento, as células foram amplificadas, sendo que cada placa teve metade de seu conteúdo colocado em uma outra placa para a divisão celular. Cada semana consiste em uma etapa, sendo P_1 a primeira, e, P_3 a última. Ao término da terceira semana de amplificação, a nova geração de células (P_3) confluída em toda a extensão da placa foi submetida ao regime de tratamento.

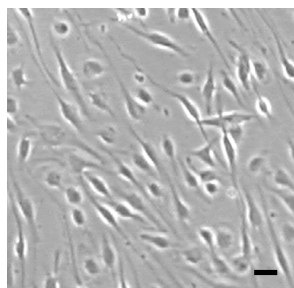


Figura 1. Microfotografia por contraste de fase em microscópio invertido ilustrando células de Schwann cultivadas a partir do nervo ciático do rato, após tratamento para eliminar os fibroblastos. Barra = $30\mu\text{m}$.

3.2 Tratamento das células de Schwann com citocinas inflamatórias TGF- β 1 ou TNF- α

As CS, cultivadas como descrito acima, foram ressuspensas em tripsina/EDTA, adicionadas no meio D-10 e centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos a 4°C. Após o sobrenadante ter sido removido, as células foram ressuspensas em 2ml de D-10. Em seguida, a amostra foi centrifugada novamente e o processo repetido por 3 vezes. Após a centrifugação as células foram contadas com o auxílio de um hemocitômetro. O volume foi dividido em tubos de 1,5ml com o número exato de células para os diferentes tratamentos e centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos à 4°C. Após o sobrenadante ter sido removido, as células foram ressuspensas em 9 μ l de D-10/Mitógeno e pré-tratadas ou não com as citocinas TGF- β 1 (5ng/ml) (Juric & Carman-Krzan, 2000; Yu & Fahnestock, 2002) ou TNF- α (30ng/ml) (Hattori et al., 1996; Appel et al., 1997), constituindo um volume final de aproximadamente 11 μ l (figura 2). As células reconstituídas foram transferidas para tubos de 200 μ l na proporção de 100.000 a 150.000 CS/ μ l (Martin et al., 1993, 1996), incubadas na estufa de CO₂ por 30 minutos e então usadas imediatamente nos animais após lesão medular.

3.3 Desenho experimental

Ratos Wistar machos de aproximadamente 250 gramas foram utilizados sob aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) de acordo com princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais foram obtidos do biotério da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos, como explicado adiante, e receberam lesão contusa da medula espinal de intensidade moderada. Outro grupo de animais recebeu cirurgia

simulada (controle).

EXPLANTE DO NERVO CIÁTICO

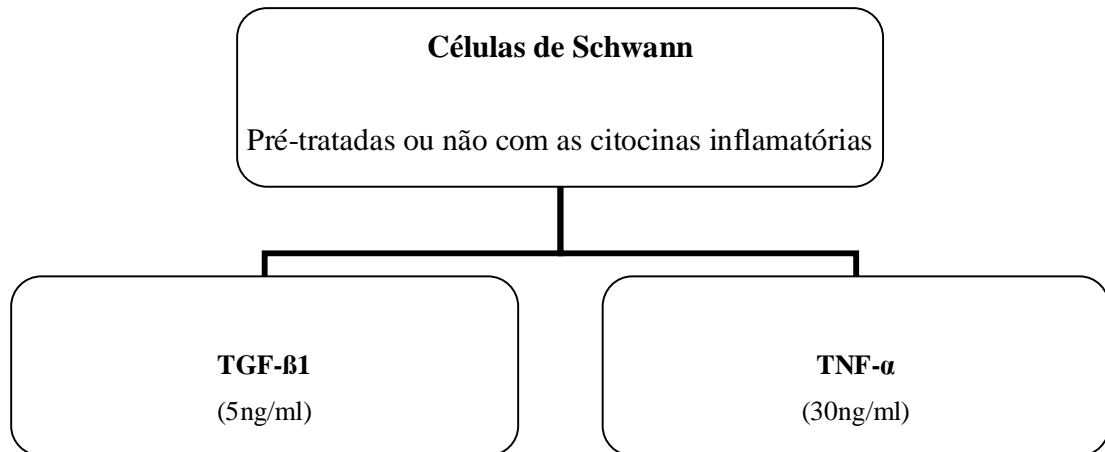


Figura 2. Esquema ilustrando os tratamentos recebidos pelas células de Schwann cultivadas, que foram pré-tratadas ou não com as citocinas inflamatórias TGF- β 1, na concentração de 5ng/ml ou TNF- α , na concentração de 30ng/ml.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos e acompanhados por 60 dias em meio com condições favoráveis e constantes de temperatura (22°C), umidade (55%), luminosidade (12h/dia) e filtragem bacteriológica do ar.

Os ratos receberam antibioticoterapia preventiva (ceftriaxona sódica, 40mg/kg/dia, por via intramuscular) durante 10 dias do período pós-cirúrgico (Madsen et al., 1998). O esvaziamento vesical através da manobra de Credé adaptada (Beattie et al., 1997) foi realizado duas vezes ao dia até o funcionamento da bexiga urinária se restabelecer. Os animais foram submetidos ao teste do comportamento sensório-motor do BBB (Basso et al., 1995).

3.4 Lesão medular

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico por via intraperitoneal (35 a 40 mg/kg) e submetidos a laminectomia da 11^a vértebra torácica, expondo a medula espinal. A lesão contusa foi promovida utilizando-se um equipamento desenvolvido na Universidade de Nova Iorque, denominado NYU Impactor (figura 3A,B). Este equipamento foi desenvolvido a partir de um estudo multicêntrico denominado MASCIS (“*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*”) e é capaz de reproduzir lesões contusas bem definidas e com intensidades graduáveis na medula espinal de ratos (Young, 2002). Os animais foram fixados pelas vértebras, imediatamente superior e inferior àquela submetida a laminectomia, utilizando-se grampos vertebrais específicos. Um peso de 10 gramas caiu de uma distância de 25mm, o que define a lesão de intensidade moderada. Potenciômetros ópticos (figura 3C), acoplados ao sistema registraram dados como a velocidade do impacto (ImpV, m/s), a distância da medula ao peso (mm), a compressão (mm) e a taxa de compressão (Cr, m/s) da medula, através de um software específico.

3.4.1 Inoculação das células de Schwann na presença ou não das citocinas inflamatórias TGF- β 1 ou TNF- α na medula espinal

As CS pré-tratadas ou não com as citocinas inflamatórias TGF- β 1 e TNF- α foram inoculadas no epicentro da lesão (aproximadamente 1 milhão de células/animal) logo após o trauma da medula espinal submetida pelo NYU Impactor. O epicentro é a região que apresenta menor quantidade de tecido preservado. Os animais foram posicionados em uma base estereotáxica e as injeções medulares foram realizadas com agulhas de vidro de 200 μ m obtidas pelo puxador de pipetas (David Kopf Instruments, EUA). As agulhas foram acopladas a

seringas Hamilton de 50 μ l para a promoção da injeção manual que durou aproximadamente 30 segundos (figura 4A,B). Ao término dos procedimentos, os animais tiveram seu dorso suturado e foram mantidos sob condições favoráveis e constantes como descrito acima. Grupos de animais submetidos à lesão contusa foram criados:

- Grupo lesão: animais receberam tratamento com inoculação de meio de cultura D-10/Mitógeno (n=10);
- Grupo células de Schwann: animais receberam inoculação de células de Schwann (n=10);
- Grupo células de Schwann + TGF- β 1: animais receberam inoculação de células de Schwann acrescidas de TGF- β 1 (n=10);
- Grupo células de Schwann + TNF- α : animais receberam inoculação de células de Schwann acrescidas de TNF- α (n=10);
- Grupo TGF- β 1: animais receberam inoculação de TGF- β 1 (n=10);
- Grupo TNF- α : animais receberam inoculação de TNF- α (n=10).

Ainda, no grupo controle foi realizado a laminectomia e inoculação do meio de cultura D-10/Mitógeno, sem que os animais sofressem a lesão medular (n=10). A figura 5 ilustra os grupos de animais deste desenho experimental.

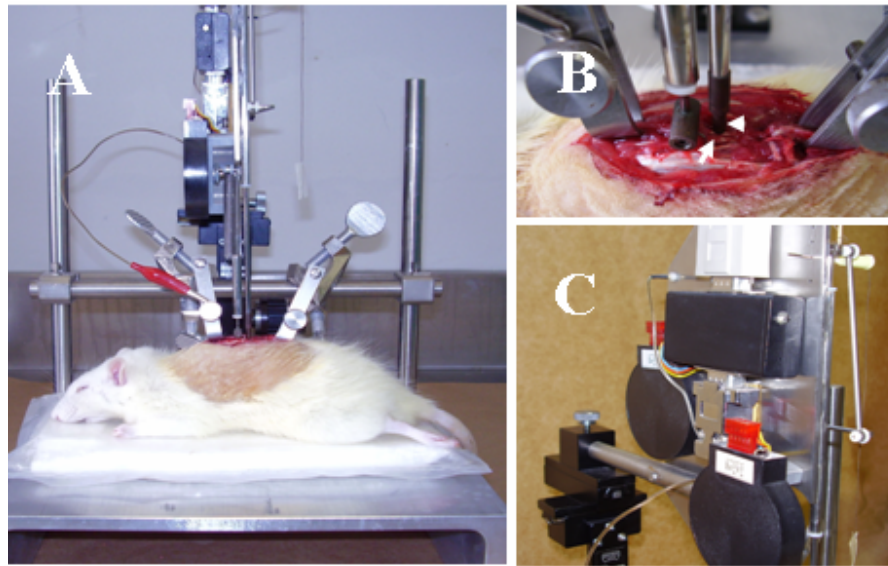


Figura 3. Fotografias ilustrando o posicionamento do rato no Impactor (A), sistema criado pela Universidade de Nova Iorque para promover diferentes intensidades de lesões contusas sobre a medula espinal exposta (B, seta). Um peso de 10 g (B, cabeça de seta) é liberado a uma distância de 25 mm para promover lesões contusas de intensidade moderada. A monitorização da lesão foi realizada através de potenciômetros ópticos acoplados ao sistema (C).

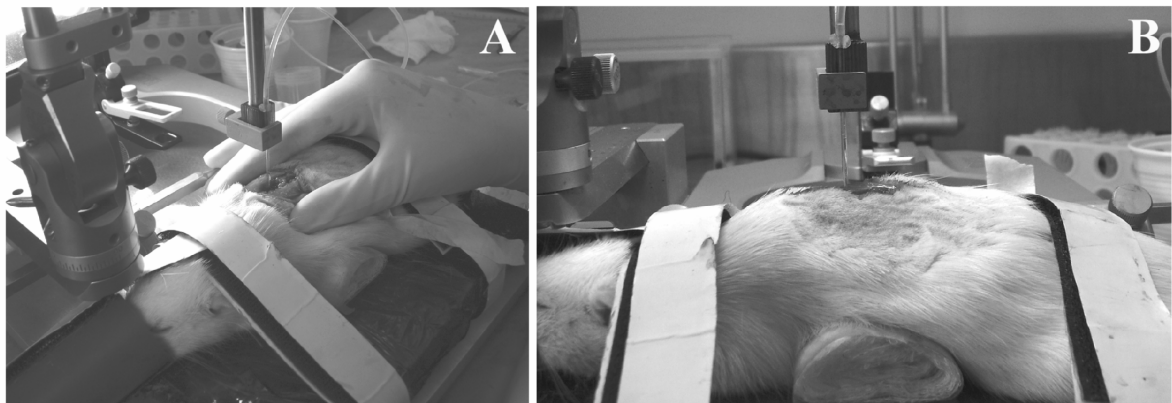


Figura 4. A fotografia mostra o posicionamento do animal no estereotático (A) sendo submetido à inoculação de células na medula espinal (B).

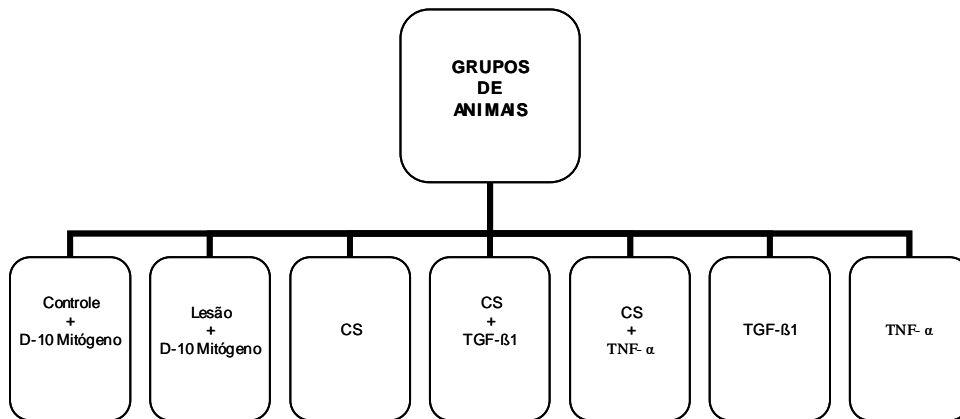


Figura 5. Esquema os grupos de animais deste desenho experimental. O grupo controle recebeu laminectomia e inoculação do meio de cultura D-10 Mitógeno. Os demais grupos receberam lesão contusa de intensidade moderada e os respectivos tratamentos.

3.5 Análise do comportamento motor

Após a lesão contusa da medula espinal, os déficits referentes à motricidade foram analisados, assim como a evolução temporal destes, segundo o teste BBB. Esta análise foi realizada 48 horas, 72 horas e semanalmente depois da cirurgia até o sacrifício dos animais.

3.5.1 Índice BBB

O índice BBB é uma escala de avaliação motora segundo Basso, Beattie e Bresnahan (Basso et al., 1995) que analisa a movimentação voluntária dos membros pélvicos dos animais submetidos à lesão medular (tabela 1). A pontuação varia de 0 a 21 e é dividida em 3 blocos: 0 – 7: corresponde à recuperação inicial dos movimentos articulares dos membros pélvicos; 8 – 13: avaliação dos passos e da coordenação; 14 – 21: corresponde à análise dos movimentos finos realizados durante a locomoção. Dois animais são colocados em uma área que permita sua movimentação confortável e livremente. A avaliação em pares encoraja os animais a se movimentarem e não saírem da área da avaliação, que tem duração aproximada de 5 minutos.

3.6 Eutanásia dos animais

Para a eutanásia, cada grupo experimental foi dividido em duas partes iguais. Na primeira metade foi realizada perfusão transcardíaca conforme procedimento descrito a seguir. Na segunda metade foi realizada decaptação para posterior análise tecidual, não compreendida nesta tese.

Após 8 semanas do período pós-cirúrgico, os animais foram sacrificados através de uma perfusão transcardíaca de solução salina (NaCl 0,9%, Merck, Alemanha), seguida de solução fixadora que consiste de 4% de paraformaldeído (Merck, Alemanha) diluído em tampão fosfato 0,1M; pH 6,9 (de Martino e Zamboni, 1966). As medulas espinais foram rapidamente removidas e pós-fixadas na mesma solução fixadora por 90 minutos e lavadas em uma solução de 10% de sacarose (Merk) dissolvida em tampão fosfato 48 horas para crioproteção. As medulas espinais foram reduzidas em segmentos de 2cm que continham a lesão. Os segmentos da medula espinal foram então congelados pela imersão em líquido isopentano (Sigma, EUA) resfriado com gelo seco (-45°C) e armazenadas em freezer -70°C até sua utilização.

Índice BBB

0	Sem movimento dos membros posteriores
1	Movimento perceptível de uma ou duas articulações, geralmente quadril e/ou joelho
2	Movimento amplo de uma articulação ou movimento amplo de uma articulação e perceptível de outra
3	Movimento amplo de duas articulações
4	Movimento perceptível de todas as três articulações do membro posterior (quadril, joelho e tornozelo)
5	Movimento perceptível de duas articulações e movimento amplo da terceira
6	Movimento amplo de duas articulações e perceptível da terceira
7	Movimento amplo das três articulações do membro posterior
8	Arrasta sem suporte de peso ou realiza colocação plantar das patas sem suporte de peso
9	Colocação do membro posterior com suporte de peso somente quando parado (em posição estática) ou com apoio dorsal e suporte de peso ocasionais, freqüentes ou consistentes e sem passos com apoio plantar
10	Passos com apoio plantar e suporte de peso ocasionais, sem coordenação do membro anterior e do membro posterior (MA e MP respectivamente)
11	Passos com apoio plantar e suporte de peso freqüentes ou consistentes e sem coordenação MA-MP
12	Passos com apoio plantar e suporte de peso freqüentes ou consistentes e coordenação MA-MP ocasional
13	Passos com apoio plantar e suporte de peso consistente e coordenação MA-MP freqüente
14	Passos com apoio plantar e suporte de peso consistentes, coordenação MA-MP consistente e posição predominante da pata durante locomoção é em rotação ou passos com apoio plantar freqüentes, coordenação MA-MP consistente e passos com apoio dorsal ocasional
15	Coordenação MA-MP consistente e arrasta os dedos ao longo do passo
16	Coordenação MA-MP consistente durante a marcha e freqüentemente não arrasta os dedos; a posição predominante da pata é paralela no contato inicial do passo e rodada na fase de retirada
17	Coordenação MA-MP consistente durante a marcha e freqüentemente não arrasta os dedos; a posição predominante da pata é paralela no contato inicial do passo e na fase de retirada
18	Coordenação MA-MP consistente durante a marcha e consistentemente não arrasta os dedos; a posição predominante da pata é paralela no contato inicial do passo e rodada na fase de retirada
19	Coordenação MA-MP consistente durante a marcha e consistentemente não arrasta os dedos; a posição predominante da pata é paralela no contato inicial do passo e na fase de retirada e cauda para baixo parte do tempo
20	Marcha coordenada consistente, consistentemente não arrasta os dedos; a posição predominante da pata é paralela no contato inicial do passo e na fase de retirada, mas há instabilidade de tronco e cauda para cima consistentemente
21	Marcha coordenada consistente, consistentemente não arrasta os dedos; a posição predominante da pata é paralela no contato inicial do passo e na fase de retirada, tronco estável e cauda para cima consistentemente

Tabela 1. Escala desenvolvida por Basso, Beattie e Bresnahan (índice BBB) para avaliação locomotora de ratos com lesão medular. A escala varia de 0 a 21 pontos, onde em zero a funcionalidade dos membros pélvicos do animal é nula, e em 21 os ratos deambulam normalmente.

3.7 Processamento tecidual

Os segmentos congelados das medulas espinais foram seccionados e cortes seriados transversais de 20µm foram obtidos. Os cortes foram efetuados em um criostato Leica, modelo CM3000 (Alemanha) com temperatura variando entre -16 e -20°C. Com um início aleatório, as secções da região estudada foram amostradas sistematicamente, incluindo cada 90 secções. Séries, em ordem crânio-caudal, foram então obtidas. Todos os cortes foram processados em lâminas previamente gelatinizadas, que permaneceram armazenadas à temperatura de -70°C até utilização.

3.7.1 Coloração de Nissl e marcação imunohistoquímica

Uma das séries de secções da medula espinal recebeu coloração pelo Violeta de Cresilo. Isto permitiu a demonstração dos nucléolos e substância de Nissl de neurônios, elementos necessários à análise estereológica das células (Chadi et al., 1993a).

Séries de secções da medula espinal foram submetidas à incubação por 24 ou 48 horas à 4°C, usando o método imunohistoquímico descrito com detalhes por Chadi et al. (1994), com um dos seguintes marcadores:

- Anticorpo monoclonal anti-GAP-43 (Sigma) feito em camundongo diluído na concentração de 1:2600;
- Anticorpo policlonal anti-glutamato (Sigma) feito em coelho diluído na concentração de 1:1500;
- Anticorpo policlonal anti-NPY (Sigma) feito em coelho diluído na concentração de 1:1500;
- Anticorpo policlonal anti-substância P (Península) feito em porco da índia diluído na

concentração de 1:1000;

- Anticorpo policlonal anti-GFAP (Dako) feito em coelho diluído na concentração de 1:1200;
- Anticorpo policlonal anti-FGF-2 (gentilmente cedido pelo Dr. Andrew Baird) feito em coelho diluído na concentração de 1:600;
- Anticorpo policlonal anti-PGSC NG2 (Chemicon) feito em coelho diluído na concentração de 1:600.

O sistema da imunoperoxidase indireta empregando a avidina-biotina (Vectastain, Vector, EUA; Hsu et al., 1981) foi usado com a 3-3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB, Sigma) como cromógeno. Depois de lavadas em tampão fosfato, as secções foram incubadas com imunoglobulinas biotinizadas (Vector, diluído 1:250) por uma hora. Essas imunoglobulinas são obtidas de ovelha ou cavalo e produzidas contra anticorpos de animais cujos anticorpos primários foram retirados. Os anticorpos foram diluídos em tampão fosfato contendo 0,3% Triton X-100. Numa terceira incubação a avidina e uma peroxidase biotinizada foram introduzidas (Vectastain, Vector, ambas diluídas 1:125) durante 45 minutos. A reação foi completada com 0,03% de DAB como cromógeno e água oxigenada (Sigma) durante aproximadamente 6 minutos. Os procedimentos imunohistoquímicos foram uniformizados. Assim, foram considerados os pontos de saturação do DAB, a diluição do anticorpo primário longe da saturação e um tempo de incubação ajustado de tal modo que os elementos mais escuros das secções estivessem inferiores à saturação (Zoli et al., 1990).

3.8 Quantificação estereológica

Esta metodologia foi utilizada na quantificação do número estimado de neurônios

remanescentes corados com a coloração de Violeta de Cresilo. As fases do processamento tecidual para a análise estereológica foram descritas anteriormente (Chadi et al., 1993a; Janson e Moller, 1993). Esta metodologia é realizada no sistema estereológico (C.A.S.T. - System, Olympus, Dinamarca) que permite quantificações das alterações morfológicas com auxílio de computador, empregando ferramentas estereológicas.

Neste experimento, a medula espinal foi seccionada e os cortes seriados amostrados sistematicamente, de tal modo que as séries contêm uma secção a cada 90 secções (fração 1, $F1 = 1/90$). Na fração F1, pontos de contagem puderam ser amostrados sistematicamente (F2). Na fração F2, partículas puderam ser amostradas em regiões sistematicamente determinadas da espessura tecidual (F3), o que pode ser efetuado com o auxílio de microscópio modificado (fracionamento óptico) empregando o dissector óptico. Se o fracionamento foi feito aleatório e sistemático, o número total de partículas (N) pôde ser estimado: $N = Q \cdot F1 \cdot F2 \cdot F3$, sendo Q o número de partículas encontrado nas amostras.

O dissector óptico é uma ferramenta estereológica que permite realizar uma estimativa do número de partículas com uma probabilidade uniforme na terceira dimensão independentemente de suas características morfológicas. O dissector físico foi aplicado em duas secções planas e paralelas separadas por uma distância (h) que, com uma moldura de contagem de área definida, era colocado sistematicamente nos pontos amostrados das secções (Gundersen, 1986; Bendtsen e Nyengaard, 1989). Com o auxílio do microscópio modificado, o dissector óptico conta partículas, definindo uma fina secção óptica dentro de uma secção espessa, através do movimento do plano de foco para cima e para baixo (Gundersen et al., 1988). Um “microcator” acoplado ao microscópio fornece medidas dos movimentos do carro do microscópio no eixo “Z”, como os dados da espessura da secção, posição do dissector no espaço, e a altura do dissector. Com o auxílio de um sistema de projeção, a imagem da secção e a moldura de contagem podem ser projetadas num monitor o que permite a contagem das

partículas. A metodologia para a amostragem sistemática do dissector no interior da secção e da amostragem das partículas está descrita na literatura (West e Gundersen, 1990; West et al., 1991; Chadi et al., 1993c). A figura 6A ilustra a região em que foi realizada a quantificação do número de neurônios remanescentes.

A figura 6B ilustra a moldura de pontos para quantificação utilizada para a obtenção do volume de tecido preservado, utilizando também o método estereológico.

3.9 Análise morfométrica

Segundo Chadi et al. (1994) a medida morfométrica (área) indica a quantidade de perfis imunopositivos. Os procedimentos de análise de imagem foram realizados em um analisador de imagem KS400 (Alemanha) descritos em detalhes na literatura (Zoli et al., 1990; Chadi et al., 1993a, Chadi et al., 1993b). Uma câmera acoplada a um microscópio Zeiss (objetiva de 40x ou 63x) captura a imagem. A imagem das secções foi obtida através da câmara e projetada em um monitor. Campos de área definida foram amostrados em regiões específicas da substância branca e cinza da medula espinal, bilateralmente. Após a correção do sombreamento foram realizados os procedimentos de discriminação. A área total dos perfis imunorreativos foi obtida dentro dos campos de quantificação (figura 6C).

3.10 Análise estatística

Os dados do decurso temporal das médias do teste comportamental foram analisados segundo o teste estatístico *ANOVA* bifatorial de medidas repetidas. As análises estatísticas dos períodos foram realizadas segundo o teste *ANOVA* associado ao pós-teste de Fisher de comparação entre dois grupos.

Os dados da análise estereológica e morfométrica foram comparados estatisticamente através do teste *ANOVA* associado ao pós-teste de Fisher de comparação entre dois grupos. A análise dos dados das regiões craniais e caudais foi agrupada com o intuito de obtermos uma visão global das alterações bioquímicas encontradas na medula espinal. Os dados das regiões cranial distante e cranial adjacente ao epicentro da lesão foram agrupados, assim como os dados das regiões caudal adjacente e distante. A partir disto, foi realizado um terceiro agrupamento entre as regiões cranial e caudal. Este agrupamento também foi realizado para as regiões de epicentro da lesão.

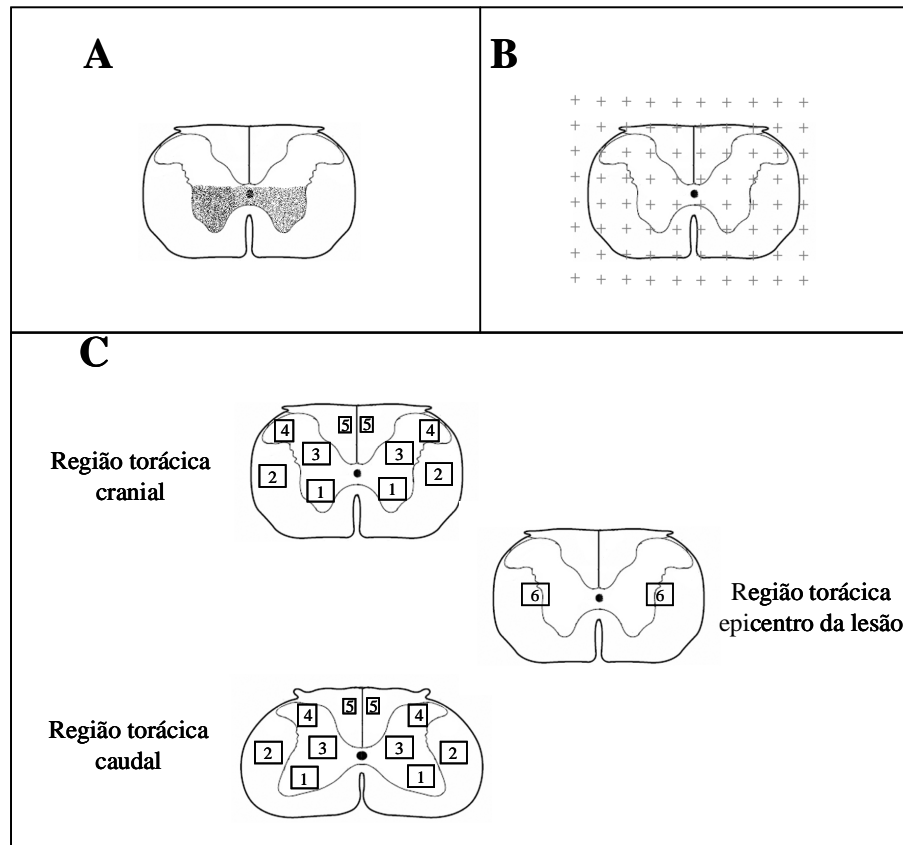


Figura 6. Esquema representativo dos campos amostrados para a análise estereológica e morfométrica (adaptado de: *George Paxinos and Charles Watson - The Rat Brain, In Stereotaxic Coordinates, Compact Third Edition, Academic Press, 1997*). O número estimado de neurônios remanescentes inclui a quantificação amostrada de neurônios motores do corno anterior e neurônios da substância cinza intermédia da medula espinal corados pelo Violeta de Cresilo (A). Moldura de pontos utilizada para a obtenção do volume de tecido preservado (B). Em (C) são apresentadas as áreas utilizadas para a quantificação morfométrica. Os números indicam o tamanho da área: 1, 2, 3 e 6 = $33,6 \times 10^2 \mu\text{m}^2$; 4 = $12,1 \times 10^2 \mu\text{m}^2$; 5 = $8,1 \times 10^2 \mu\text{m}^2$.

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros da lesão

São apresentadas na figura 7 as curvas representativas dos parâmetros da lesão.

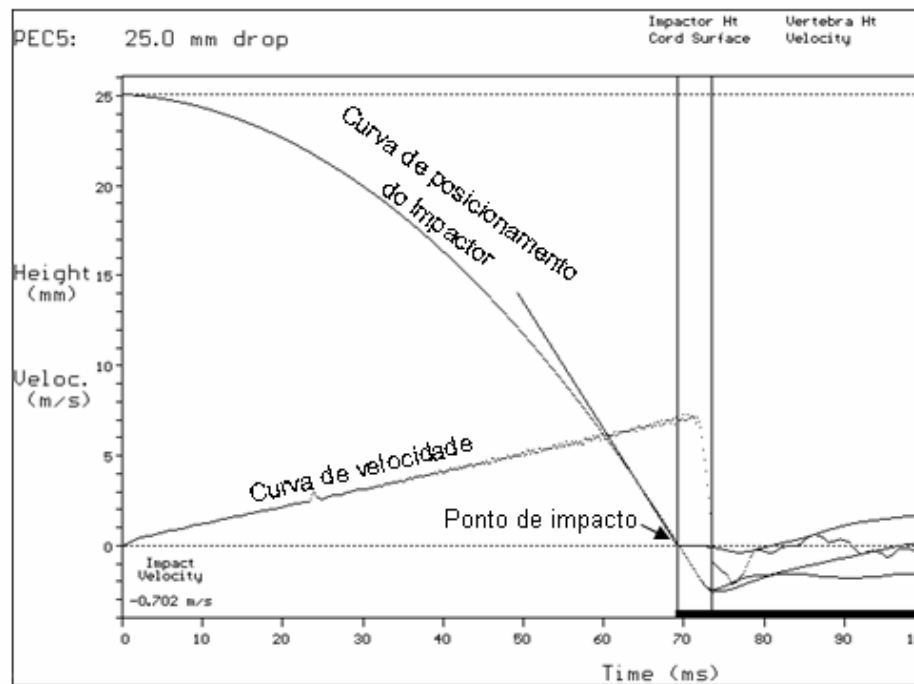


Figura 7. Gráfico registrado pelo NYU Impactor ilustrando os parâmetros como curva de posicionamento do Impactor, curva de velocidade e o ponto de impacto. A queda do peso de 10g sobre a medula espinal exposta ocorreu a partir da distância de 25mm para promover lesões moderadas.

4.2 Análise comportamental – Índice BBB

Um efeito significativo das interações realizadas na medula espinal [$F(6,62) = 311.575$, $p = 0.0001$, e também da progressão temporal da análise [$F(2,62) = 4149.279$, $p = 0.0001$] foi observado. Houve também interação entre os tratamentos e o tempo [$F(12,62) = 116.246$, $p = 0.001$]. As diferenças entre os grupos em cada período estudado estão apresentadas na tabela 2.

Índice BBB

	Período 1	Período 2	Período 3
Controle	20.9 ± 0.1	21 ± 0	21 ± 0
Lesão	0.91 ± 0.61	9.47 ± 0.35	11.75 ± 0.38
CS	0.5 ± 0.34	10.85 ± 0.65	13.02 ± 0.87
CS+TGF-β1	1.1 ± 0.99	10.47 ± 0.32	12.4 ± 0.22
CS+TNF-α	0.16 ± 0.11	10.05 ± 0.44	12.27 ± 0.13
TGF-β1	0.1 ± 0.67	11.02 ± 0.23	12.72 ± 0.28
TNF-α	0.27 ± 0.12	10.38 ± 0.45	12.08 ± 0.28

Tabela 2. Médias ± e.p.m. do índice BBB dos ratos nos diversos grupos experimentais. Os animais receberam cirurgia simulada (controle) ou lesão medular de intensidade moderada pelo NYU Impactor. O teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas mostrou $p=0.0001$ quando os grupos ou o tempo pós-cirúrgico foram analisados (descrito no texto). As análises estatísticas em cada período foram realizadas segundo teste ANOVA de comparações múltiplas e pós-teste de Fisher de comparação entre dois grupos. ★, $p = 0.0001$. Os dados de cada análise foram agrupados em períodos, a saber:
 Período 1 – 48 horas e 72 horas
 Período 2 – semana 1, semana 2, semana 3 e semana 4
 Período 3 – semana 5, semana 6, semana 7 e semana 8.

4.3 Análise estereológica

A quantificação pelo método estereológico mostrou uma significativa redução no número de neurônios remanescentes do corno anterior e da substância cinza intermédia da medula espinal corados pelo Violeta de Cresilo em todos os grupos que receberam lesão contusa de intensidade moderada em relação ao controle. Não foi encontrada diferença deste parâmetro entre os grupos lesados (figura 8A e 9A,B).

A quantificação demonstrou um maior volume de tecido preservado no grupo controle em relação aos grupos que receberam lesão contusa. Também não foi encontrada diferença

deste parâmetro entre os grupos lesados (figura 8B e 9C,D). A análise histológica das secções coradas pelo Violeta de Cresilo mostrou a presença de cavidades, perda ou interrupção tecidual, retração e degeneração cística, assim como infiltrado de células gliais (figura 9D). A análise da porcentagem do volume de tecido preservado em relação ao volume de tecido total da medula espinal do grupo controle que recebeu pequena lesão promovida pela inoculação do meio de cultura D-10/Mitógeno foi de 98,77% (figura 9E).

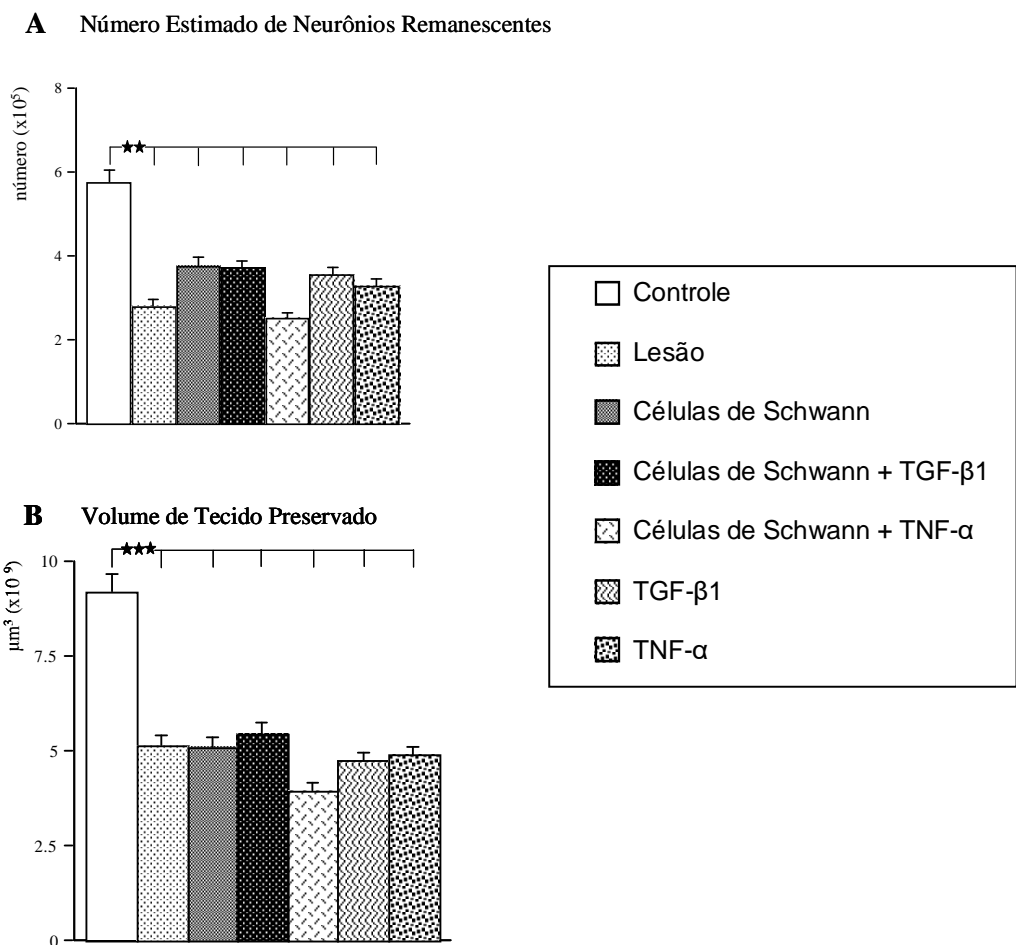


Figura 8. Os gráficos mostram as médias \pm e.p.m. do número estimado de neurônios remanescentes (A) e do volume de tecido preservado (B) quantificados por metodologia estereológica. Os animais receberam cirurgia simulada (controle) ou lesão da medula espinal de intensidade moderada no nível torácico pelo NYU Impactor. O teste ANOVA de comparações múltiplas e o teste de Fisher de comparação entre dois grupos foram realizados. $\star\star = p < 0,01$; $\star\star\star = p < 0,001$.

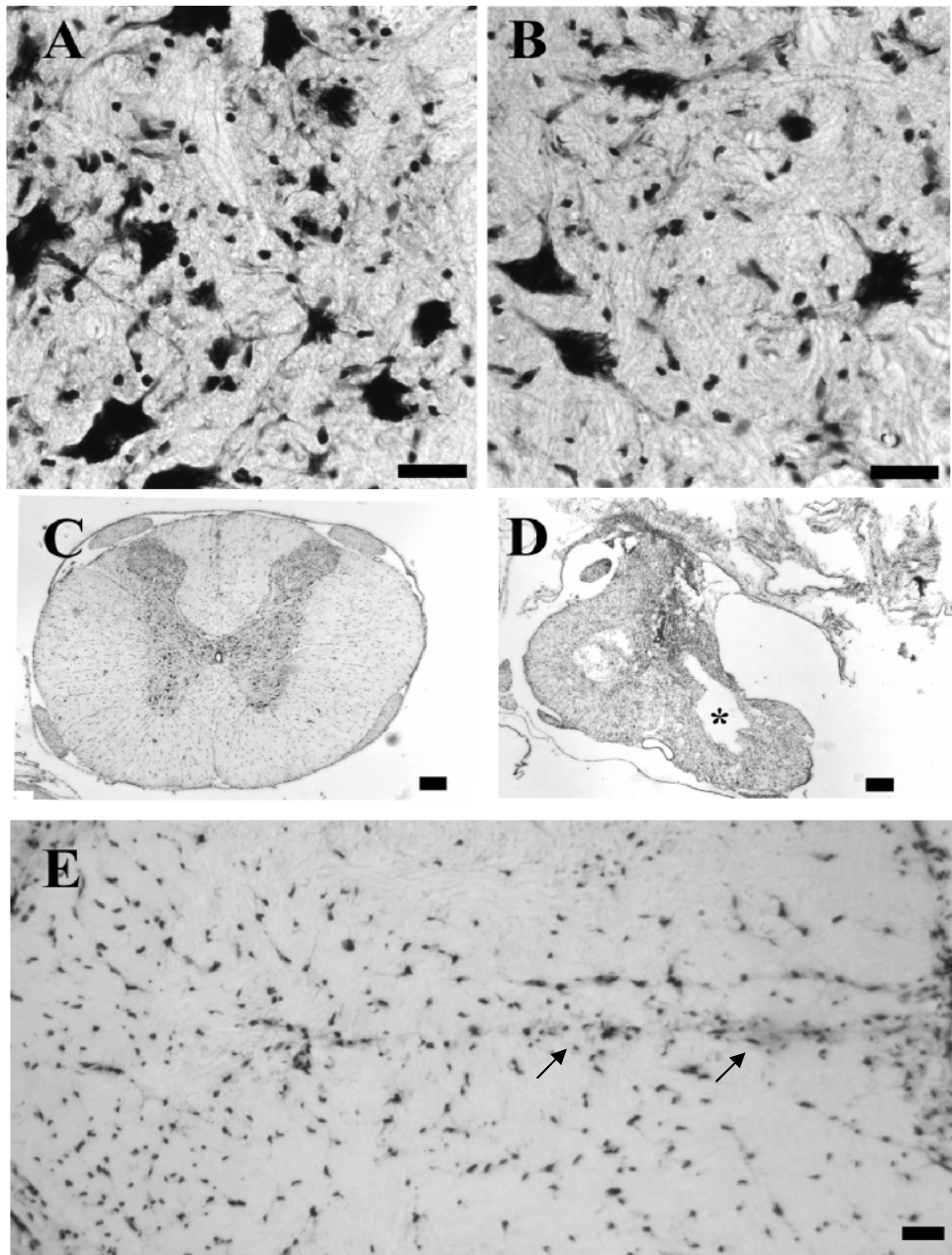


Figura 9. Fotomicrografias de secções da medula espinal ilustrando os neurônios remanescentes (A,B) e o volume de tecido preservado (C,D). Ratos que receberam cirurgia simulada (A,C) e lesão contusa de intensidade moderada (B,D). * indica área de degeneração secundária (cavitação cística). A lesão tecidual provocada pela injeção de meio de cultura no grupo controle é apontada (setas, E). Barras = 200 μ m (A,B); 30 μ m (C,D); 40 μ m (E).

4.4 Análise morfométrica

A imunorreatividade da GAP-43 revelou fibras seccionadas transversalmente e outras longitudinalmente, principalmente na região do corno anterior da medula espinal dos ratos dos diversos grupos experimentais. Na análise morfométrica de imagem da GAP-43 (figura 10A e 11) a lesão promoveu uma dramática diminuição da imunorreatividade da GAP-43 no corno anterior, que foi revertida quando a lesão foi tratada com as CS pré-tratadas ou não com a citocina TGF- β 1. Nas regiões de funículo lateral e fascículo grácil não houve diferença na imunorreatividade da GAP-43 entre os grupos (figura 10B,C).

Imunorreatividade da GAP-43

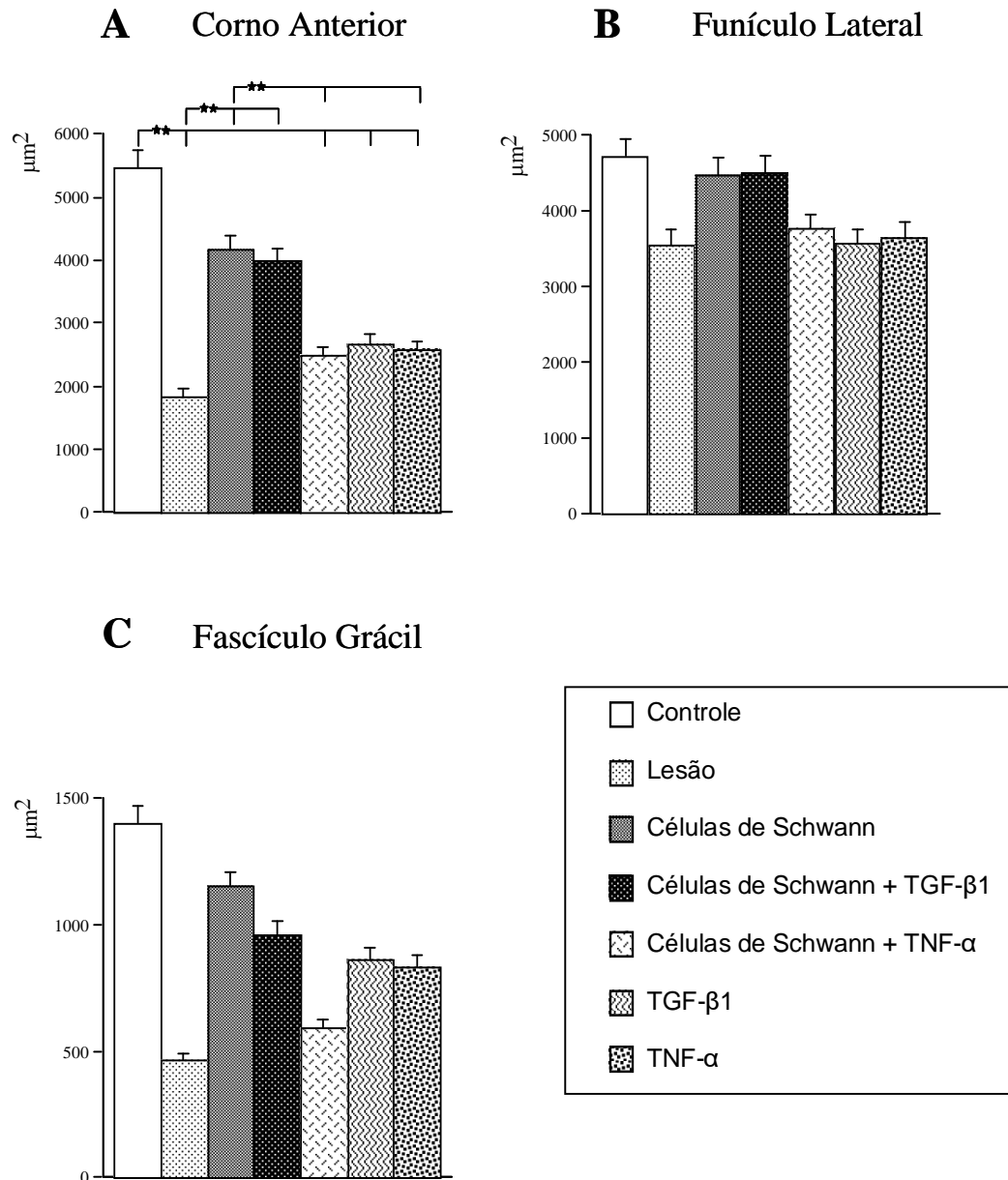


Figura 10. Gráficos das médias \pm e.p.m. das áreas da imunorreatividade da GAP-43 obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno anterior (A), funículo lateral (B) e fascículo grácil (C) em níveis adjacentes ao epicentro da lesão. Teste ANOVA de comparações múltiplas e teste de Fisher de comparação entre dois grupos; ★★ = $p < 0,01$.

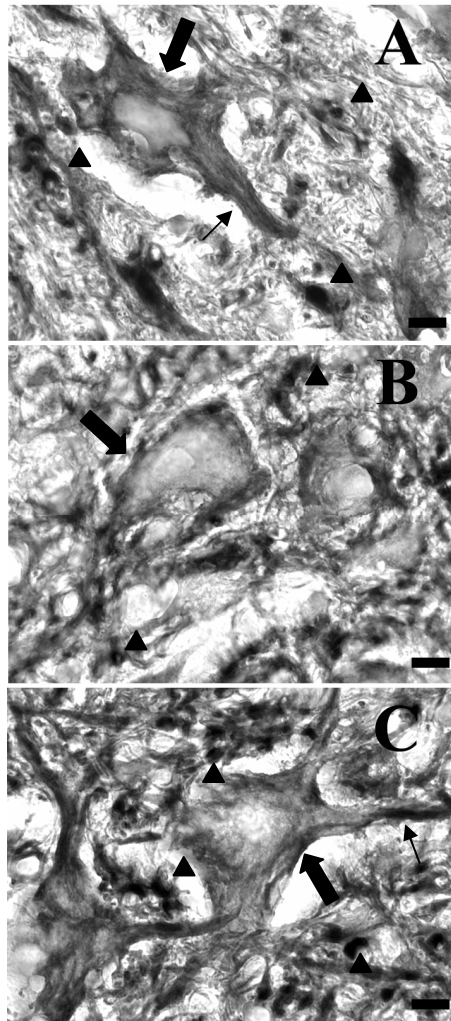


Figura 11. Fotomicrografias da imunorreatividade da GAP-43 no corno anterior da medula espinal de ratos do grupo que recebeu cirurgia controle (A), grupo lesão (B) e grupo tratado com células de Schwann (C). Neurônios do corno anterior (setas largas), prolongamentos neurais (setas finas) e fibras seccionadas transversalmente (cabeças de setas) são apontados. Barras = 10µm.

A lesão não alterou a imunorreatividade do glutamato. Entretanto, o tratamento da medula lesada com as CS por si aumentou a imunorreatividade do glutamato no corno anterior (figura 12A e 13A,C,E) e no funículo lateral (figura 12B e 13B,D,F) quando comparado com o grupo lesão. Efeito este não observado quando as CS foram pré-tratadas com as citocinas.

Foram observadas modificações no corno anterior e no funículo lateral, mas não na substância cinza e no corno posterior (figuras 14A, B, C, D respectivamente) no que se refere a imunorreatividade do NPY.

No corno anterior a lesão não alterou estatisticamente a imunorreatividade NPY. Houve aumento da imunorreatividade do grupo tratado com as CS apenas em comparação ao grupo controle. Porém este aumento deixou de existir quando as CS foram pré-tratadas com as citocinas (figura 14A e 15A,C e E).

Já no funículo lateral a lesão aumentou a imunorreatividade NPY, inclusive quando houve tratamento com as CS. Mas este aumento também deixou de existir quando as CS foram pré-tratadas com as citocinas (figura 14B e 15B,D e F).

Imunorreatividade do Glutamato

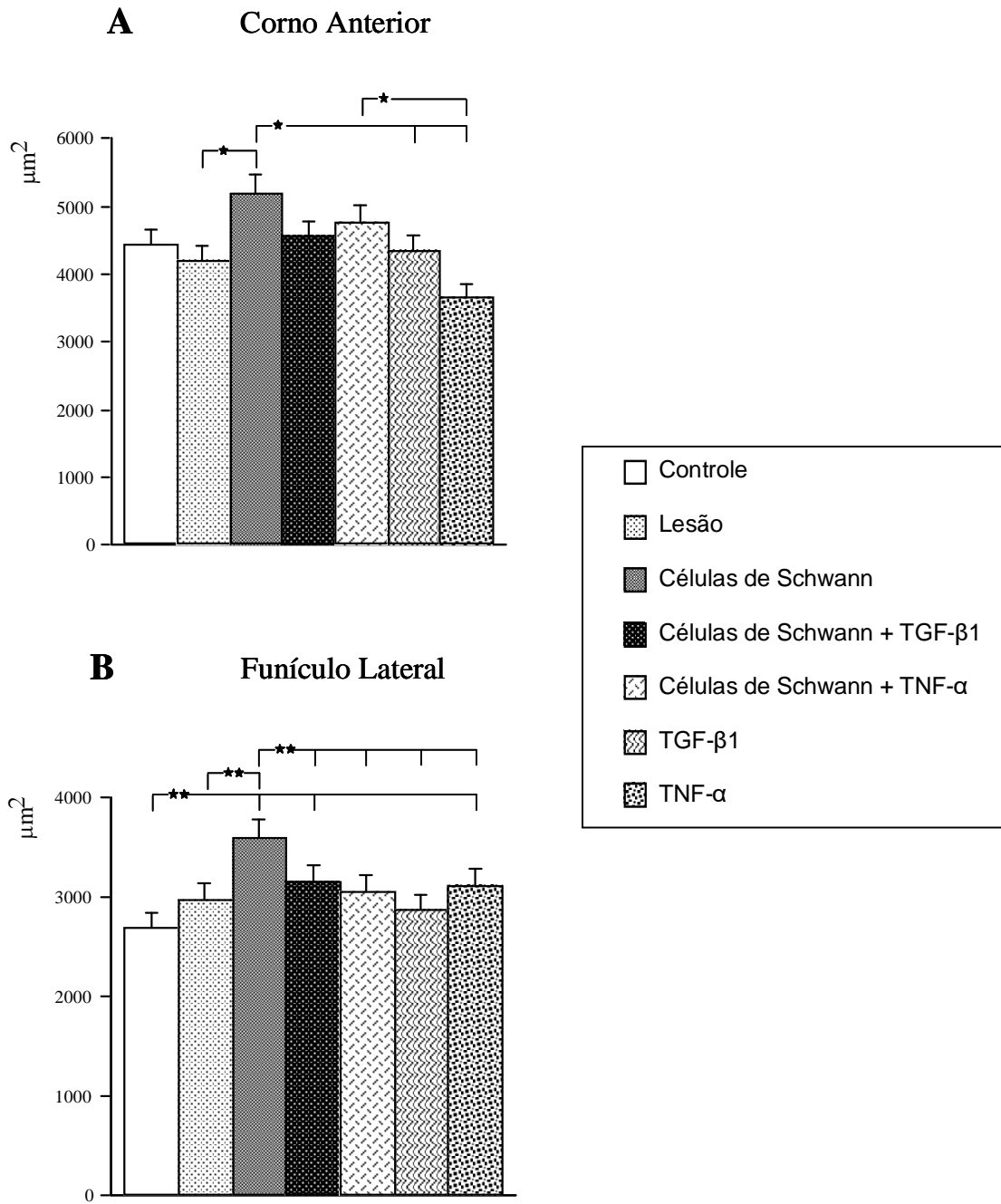


Figura 12. Gráficos das médias \pm e.p.m. das áreas da imunorreatividade do glutamato obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno anterior (A), funículo lateral (B) em níveis adjacentes ao epicentro da lesão. Teste ANOVA de comparações múltiplas e teste de Fisher de comparação entre dois grupos; $\star = p < 0,05$; $\star\star = p < 0,01$.

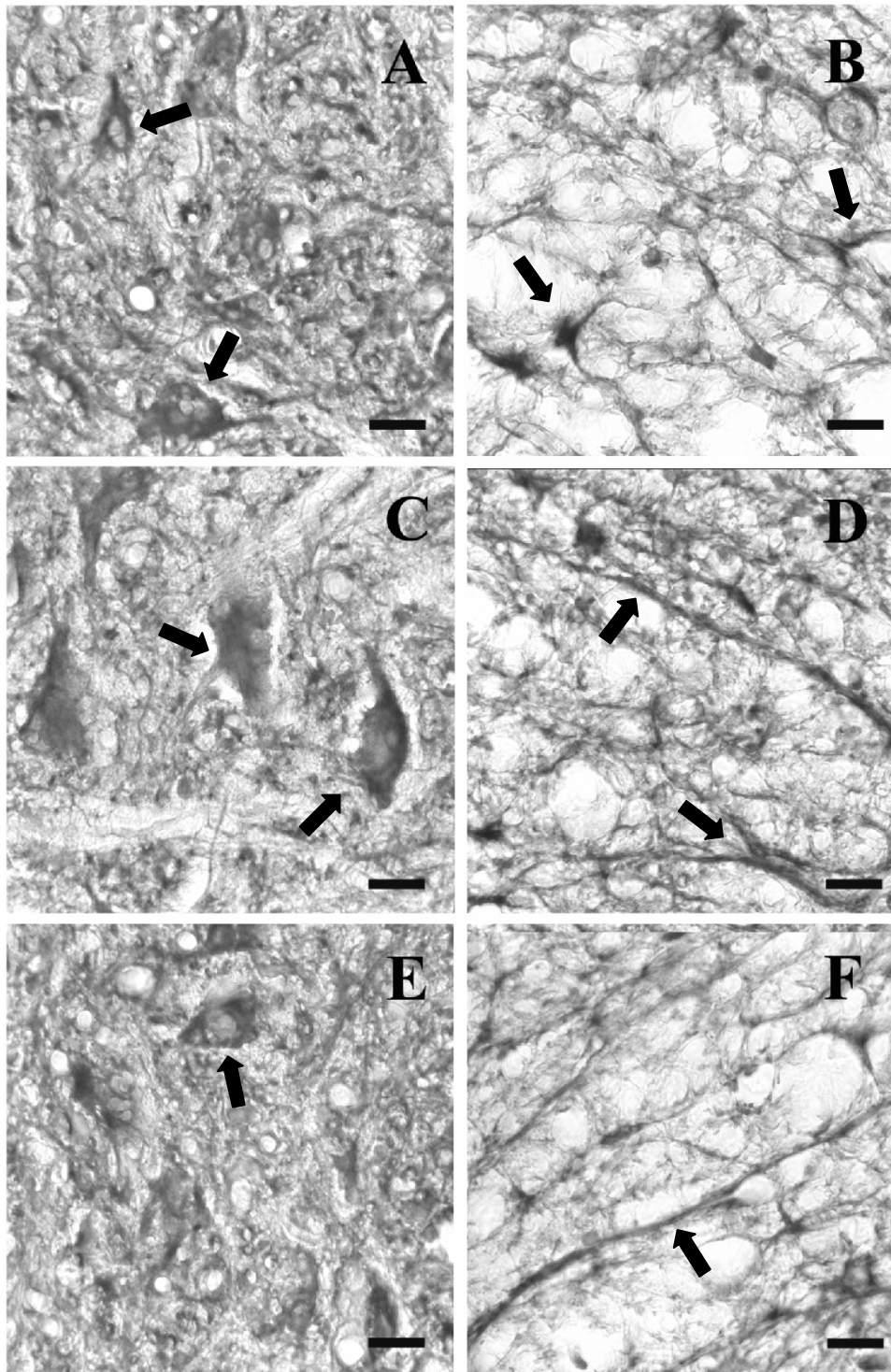


Figura 13. Fotomicrografias da imunorreatividade do glutamato no corno anterior (A,C,E) e no funículo lateral (B,D,F). Painéis A e B ilustram o grupo que recebeu lesão contusa; painéis C e D ilustram o grupo que recebeu lesão contusa e tratamento com células de Schwann; E e F ilustram o grupo que recebeu lesão contusa e tratamento com TNF- α . A imunorreatividade do glutamato é apontada (setas). Barras = 20 μ m.

Imunorreatividade do NPY

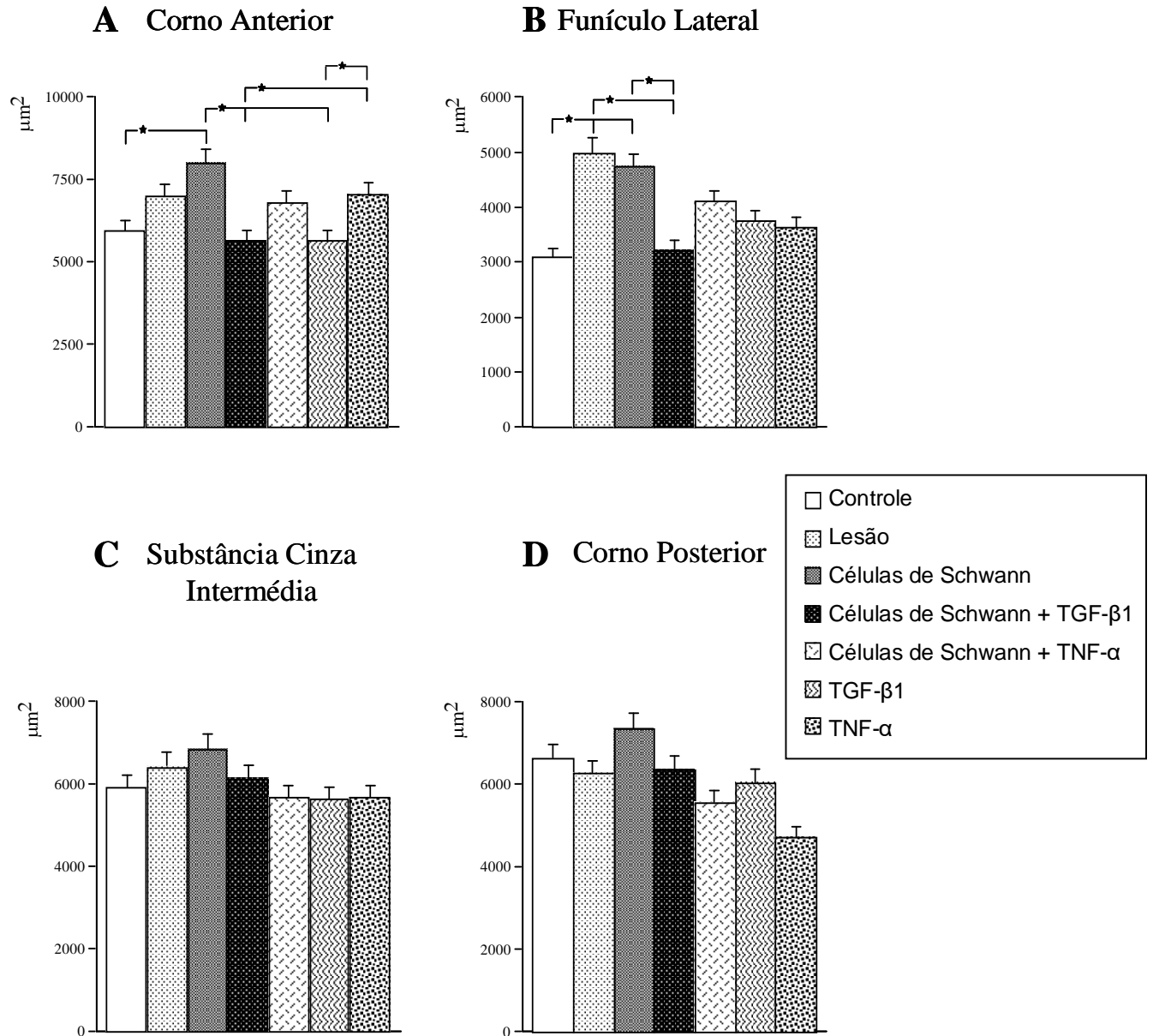


Figura 14. Gráficos das médias \pm e.p.m. das áreas da imunorreatividade do NPY obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno anterior (A), funículo lateral (B), substância cinza intermédia (C) e corno posterior (D) em níveis adjacentes ao epicentro da lesão. Teste ANOVA de comparações múltiplas e teste de Fisher de comparação entre dois grupos; ★ = $p < 0,05$.

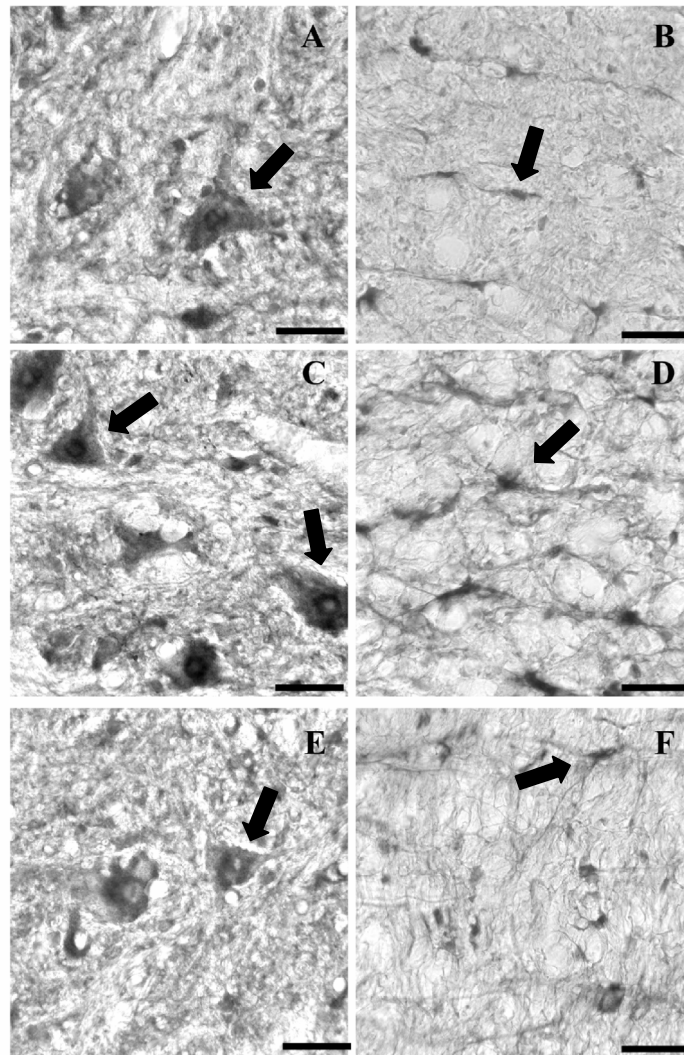


Figura 15. Fotomicrografias da imunorreatividade do NPY no corno anterior (A,C,E) e no funículo lateral (B,D,F). Painéis A e B ilustram o grupo que recebeu lesão cirurgia simulada; painéis C e D ilustram o grupo que recebeu lesão contusa e tratamento com células de Schwann; E e F ilustram o grupo que recebeu lesão contusa e tratamento com células de Schwann e TGF- β 1. A imunorreatividade do NPY é apontada (setas). Barras = 30 μ m.

A imunorreatividade da substância P não foi modificada em função dos tratamentos para as regiões analisadas (figuras 16 e 17).

A lesão contusa não alterou a imunorreatividade da GFAP no corno anterior (figura 18A e 19A, C e E) e no funículo lateral (figura 18B e 19G, H). Porém, quando os grupos lesados foram tratados com as CS e/ou citocinas houve um aumento significativo da imunorreatividade da GFAP comparada ao grupo controle. Na região do epicentro, a lesão promoveu aumento da imunorreatividade da GFAP. Aumento este potenciado quando houve tratamento com as CS (figura 18D e 19B,D e F).

Imunorreatividade da substância P

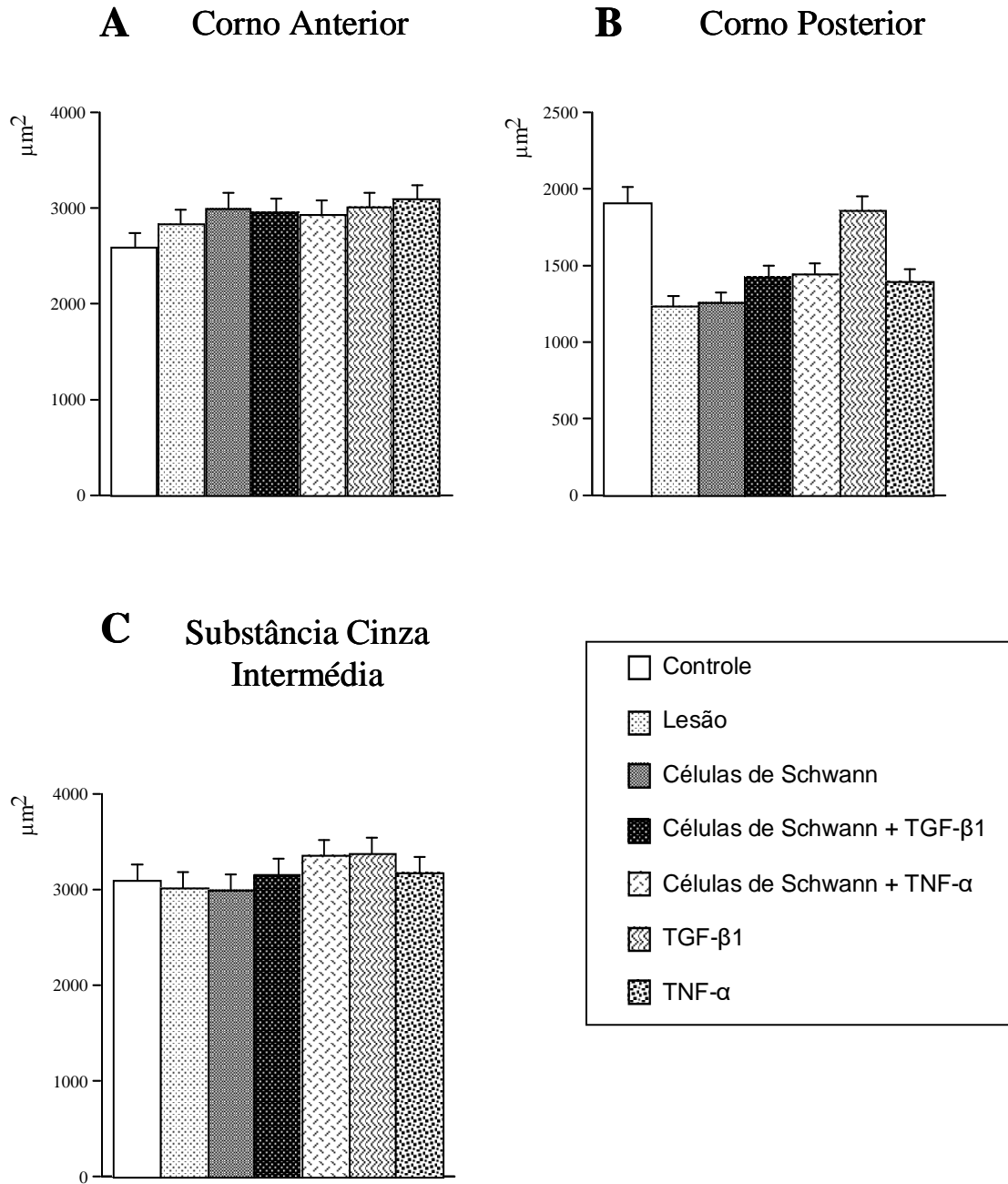


Figura 16. Gráficos das médias \pm e.p.m. das áreas da imunorreatividade da substância P obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno anterior (A), corno posterior (B) e substância cinza intermédia (C) em níveis adjacentes ao epicentro da lesão. Não houve diferença estatística segundo teste ANOVA de comparações múltiplas e teste de Fisher de comparação entre dois grupos.

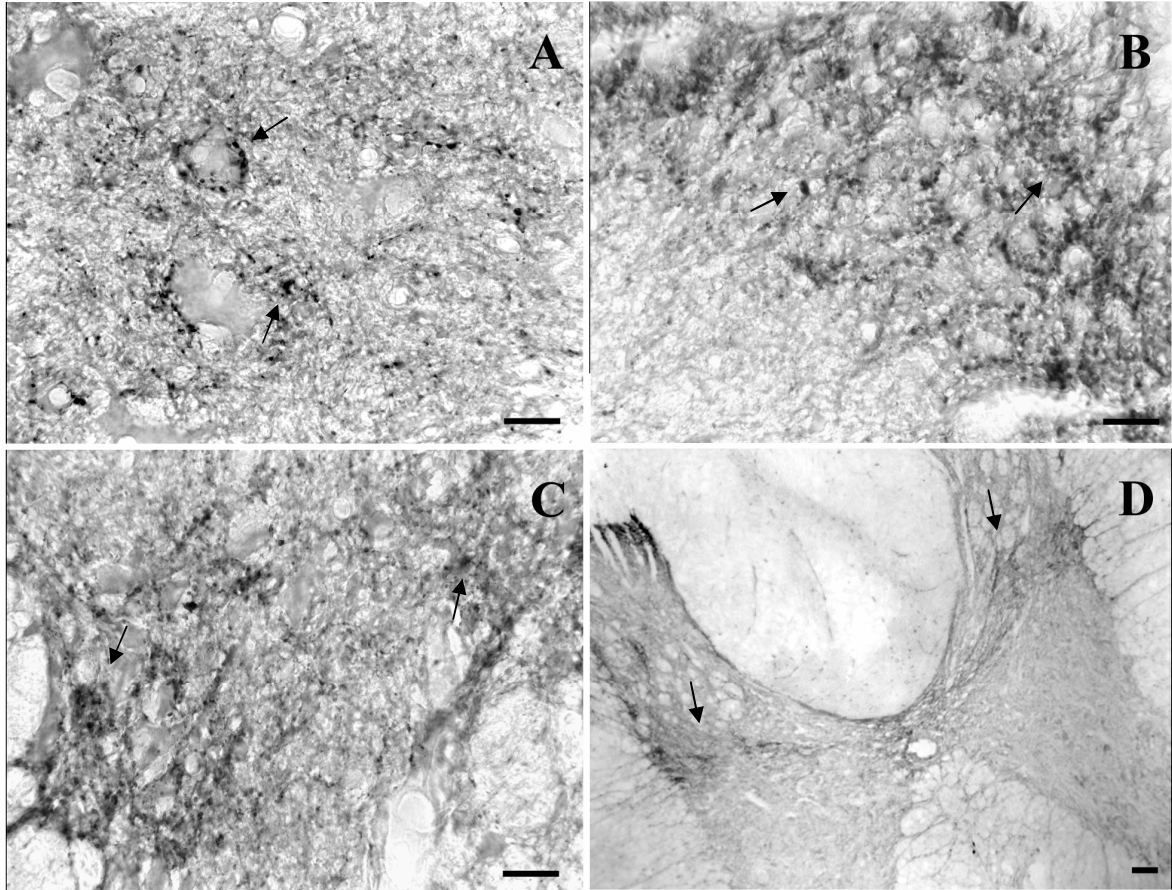


Figura 17. Fotomicrografias da imunorreatividade da substância P no corno anterior (A), corno posterior (B), substância cinza intermédia (C,D) do grupo que recebeu cirurgia simulada. O painel D ilustra fibras imunorreativas a substância P que se estendem da coluna intermédia lateral ao canal central, bilateralmente. Aspecto pontiforme contendo a imunorreatividade da substância P é encontrado ao redor de neurônios do corno anterior e nas demais regiões, sugerindo terminais nervosos imunorreativos (setas). Barras = 20 μ m (A,B,C); 40 μ m (D).

Imunorreatividade da GFAP

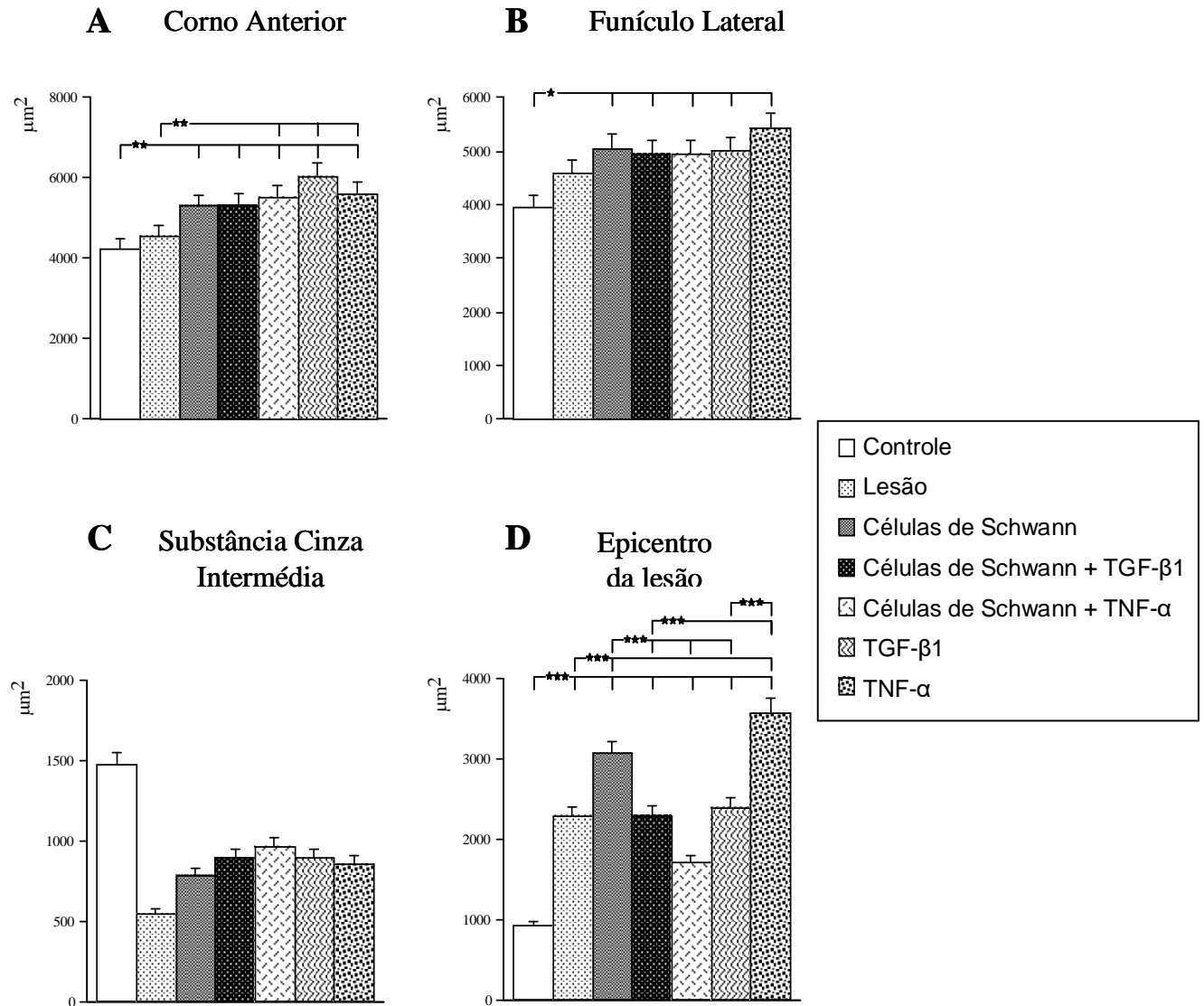


Figura 18. Gráficos das médias \pm e.p.m. das áreas da imunorreatividade da GFAP obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno anterior (A), funículo lateral (B) e substância cinza intermédia (C) em níveis adjacentes ao epicentro da lesão, e no epicentro da lesão (D). Teste ANOVA de comparações múltiplas e teste de Fisher de comparação entre dois grupos.

★ = $p < 0,05$; ★★ = $p < 0,001$; ★★★ = $p < 0,001$.

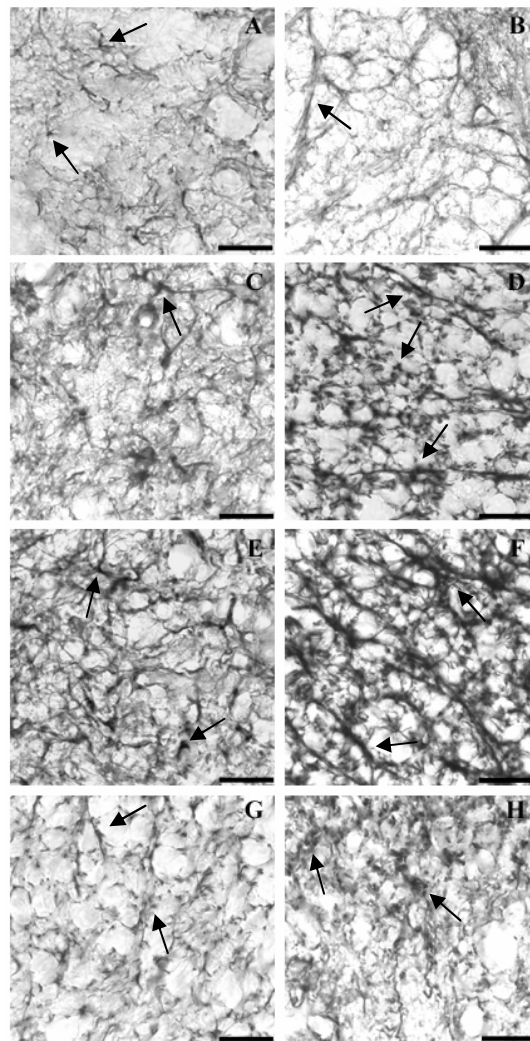


Figura 19. Fotomicrografias da imunorreatividade da GFAP no corno anterior (A,C,E), no epicentro da lesão (B,D,F) e no funículo lateral (G,H) de ratos que receberam cirurgia simulada (A,B,G), lesão contusa (C,D), lesão contusa e tratamento com células de Schwann (E,F,H). A imunorreatividade do astrócito é apontada (setas). Barras = 20 μ m.

A análise morfométrica de imagem da imunorreatividade do FGF-2 na medula espinal nas regiões adjacentes ao epicentro, a lesão contusa não alterou a imunorreatividades FGF-2 (figura 20A,B,C). No funículo houve aumento da imunorreatividade do grupo tratado com as CS, acrescidas ou não de TGF- β 1, apenas em comparação ao grupo controle. Os 3 grupos tratados com as CS apresentaram uma maior imunorreatividade do FGF-2 em relação aos grupos tratados só com as citocinas no funículo lateral (figura 20B e 21B,E e H). Na região do fascículo grácil, também houve aumento da imunorreatividade do grupo tratado com as CS,

acrescidas ou não de TGF- β 1, apenas em comparação ao grupo controle. Entretanto, o tratamento da medula lesada com as CS aumentou a imunorreatividade do FGF-2 (figura 20C). Na região de epicentro a lesão aumentou a imunorreatividade do FGF-2, e este efeito foi mantido nos grupos tratados com as CS, acrescidas ou não da citocina TGF- β 1 (figura 20D e 21C,F e I).

A imunorreatividade do PGSC NG2 não foi modificada em função dos tratamentos nas regiões adjacentes analisadas (figura 22A,B,C e 23A,B). Já no epicentro a lesão promoveu aumento da imunorreatividade do PGSC NG2, inclusive quando houve tratamento com as CS e com a citocina TNF- α na presença ou não das CS (figura 22D; figura 23C,D,E,F).

Imunorreatividade do FGF-2

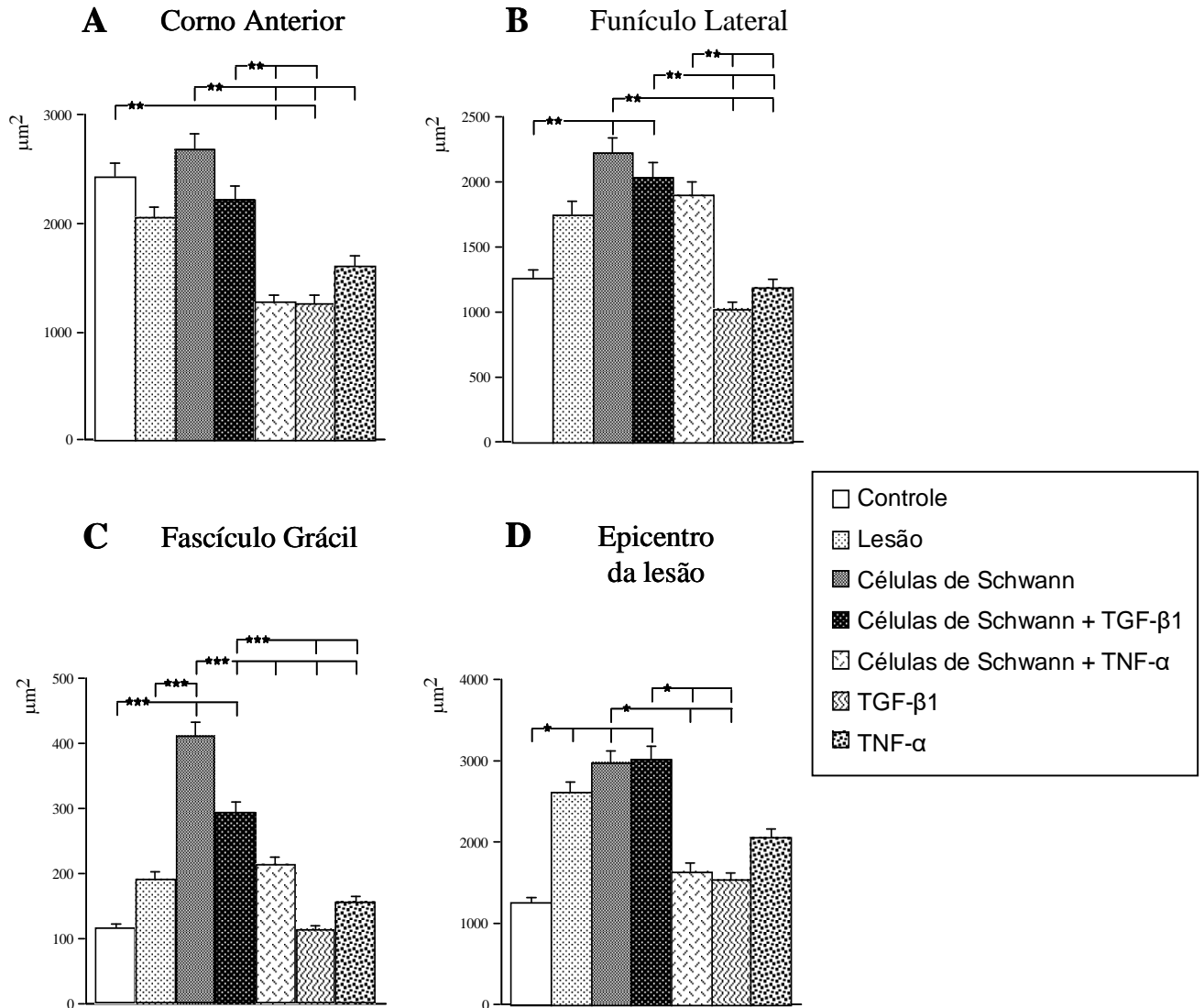


Figura 20. Gráficos das médias \pm e.p.m. das áreas da imunorreatividade do FGF-2 obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno anterior (A), funículo lateral (B) e fascículo grácil (C) em níveis adjacentes ao epicentro da lesão, e no epicentro da lesão (D). Teste ANOVA de comparações múltiplas e teste de Fisher de comparação entre dois grupos.

★ = $p < 0,05$; ★★ = $p < 0,01$; ★★★ = $p < 0,001$.

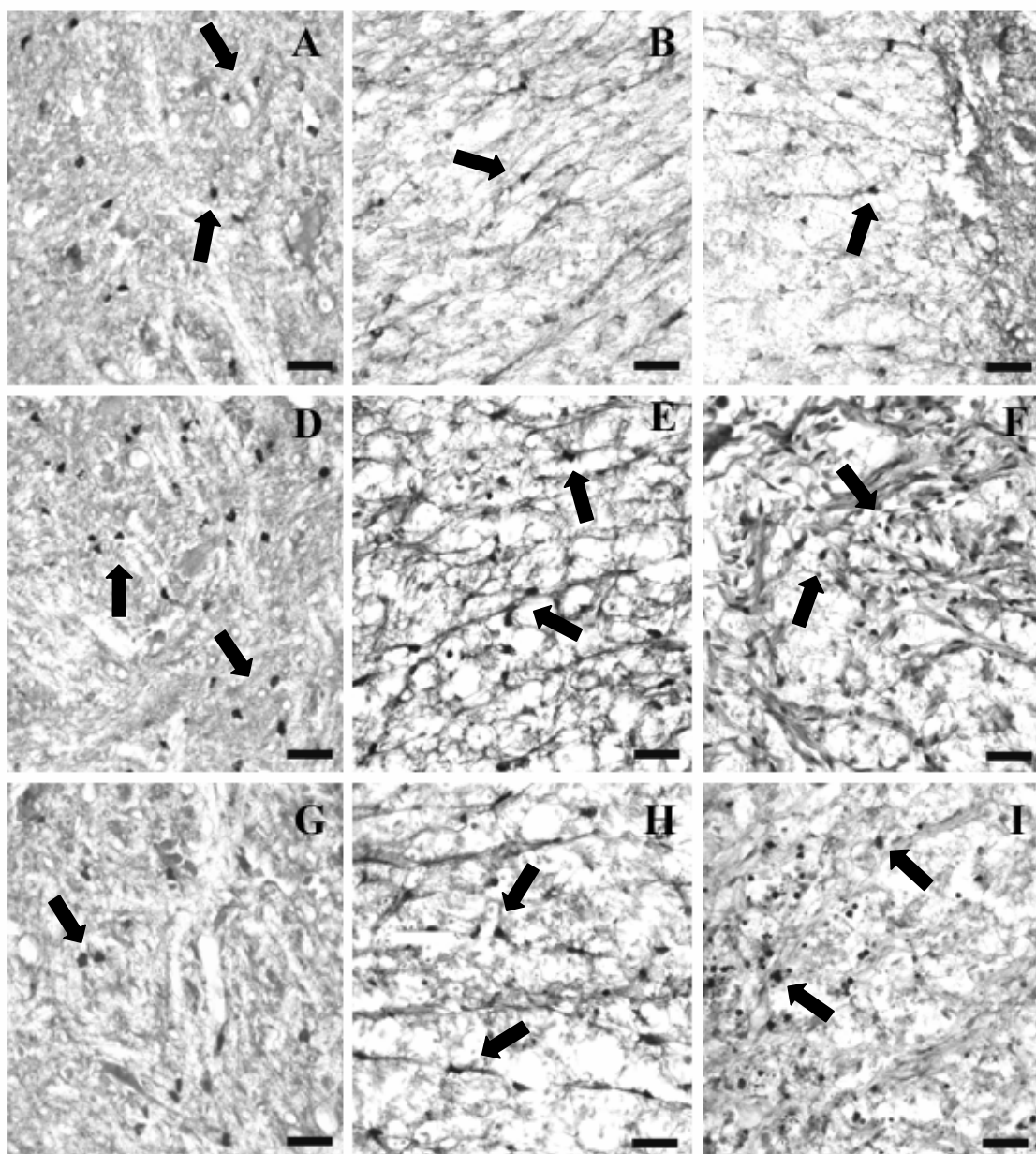


Figura 21. Fotomicrografias da imunorreatividade do FGF-2 no corno anterior (A,D,G), funículo lateral (B,E,H) e no epicentro da lesão (C,F,I) de ratos que receberam cirurgia controle (A,B,C), lesão contusa e tratamento com células de Schwann (D,E,F) ou lesão contusa e tratamento com células de Schwann e $TNF-\alpha$ (G,H,I). A imunorreatividade do FGF-2 é apontada (setas). Barras = 30 μ m.

Imunorreatividade do NG2

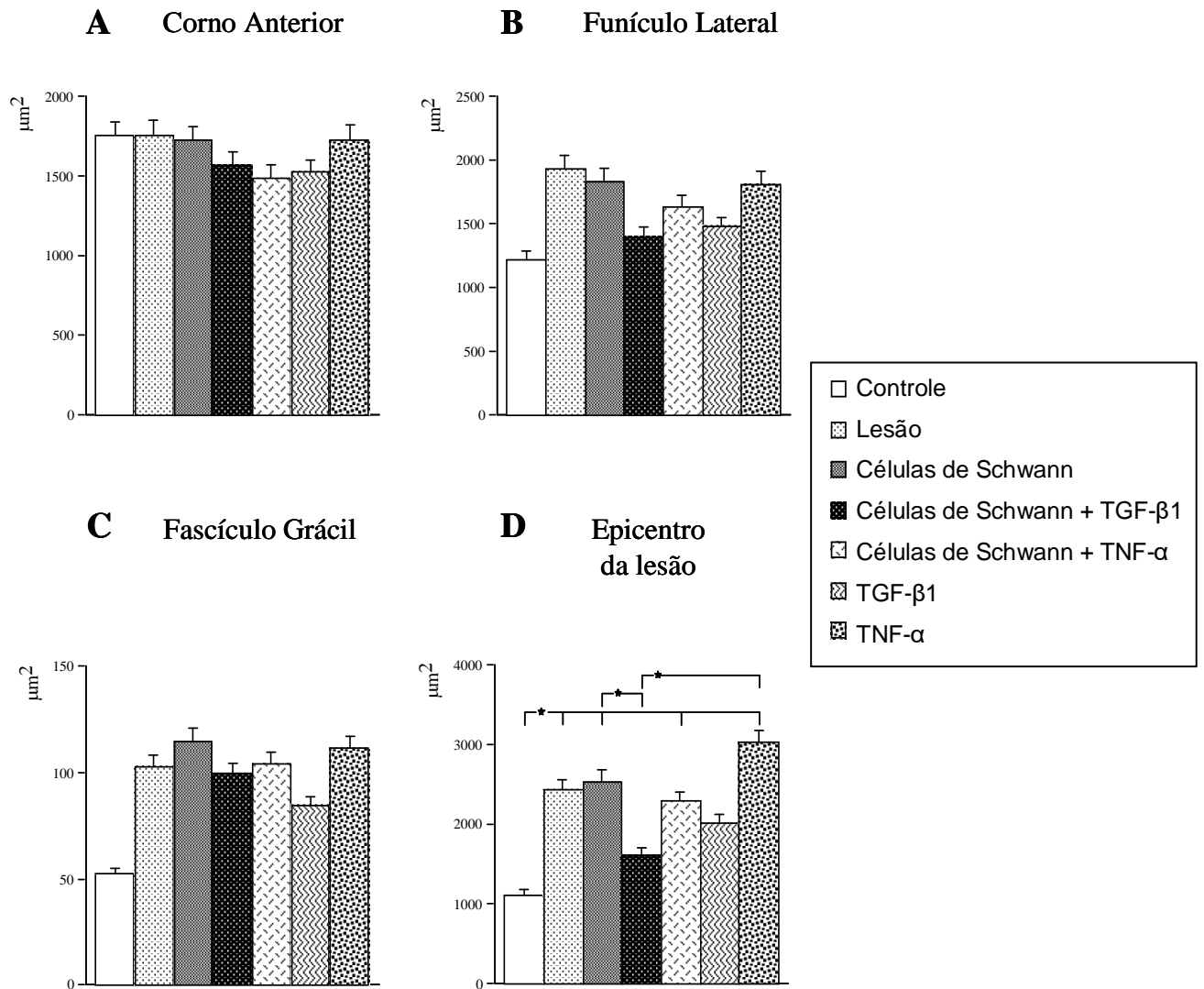


Figura 22. Gráficos das médias \pm e.p.m. das áreas da imunorreatividade do PGSC NG2 obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno anterior (A), funículo lateral (B) e fascículo grácil (C) em níveis adjacentes ao epicentro da lesão, e no epicentro da lesão (D). Teste ANOVA de comparações múltiplas e teste de Fisher de comparação entre dois grupos; ★ = $p < 0,05$.

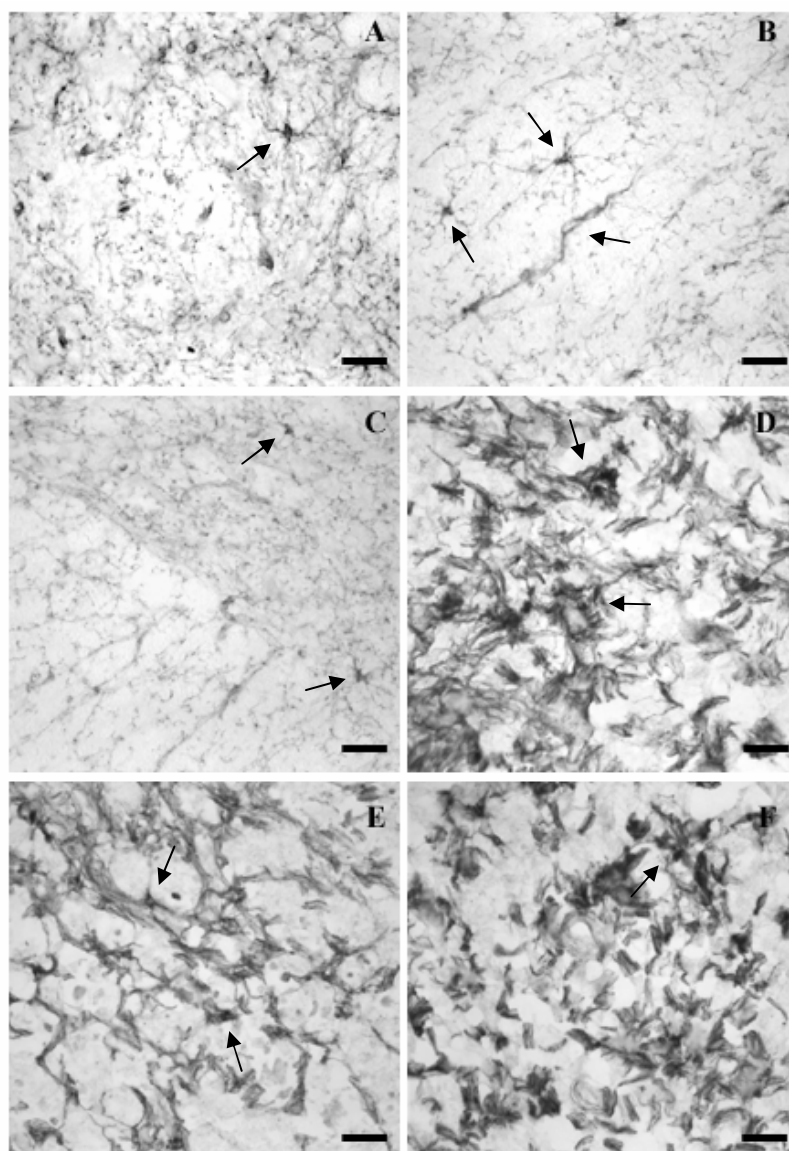


Figura 23. Fotomicrografias da imunorreatividade do PGSC NG2 no corno anterior (A), funículo lateral (B) e no epicentro da lesão (C,D,E,F) de ratos que receberam cirurgia simulada (A,B,C), lesão contusa e tratamento com células de Schwann (D), lesão contusa e tratamento com células de Schwann e TGF- β 1 (E) ou lesão contusa e tratamento com TNF- α (F). A imunorreatividade do PGSC NG2 é apontada (setas). Barras = 30 μ m.

5. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o potencial trófico das CS pré-tratadas ou não com as citocinas inflamatórias TGF- β 1 e TNF- α após lesão medular contusa de ratos em promover a melhora do comportamento motor nestes animais.

O tratamento com CS associadas ou não com as citocinas inflamatórias foi escolhido por dois motivos. O primeiro é o fato de que estudos mostram a influência do meio no crescimento de fibras nervosas lesadas no SNC, assim como o potencial das CS em tornar o meio mais propício à regeneração de neurônios centrais (Li e Raisman, 1994; Peng et al., 2003). A utilização experimental de CS é apontada como uma perspectiva benéfica no tratamento da lesão medular em humanos, já que essas células produzem, entre outros, fatores neurotróficos e citocinas inflamatórias que influenciam o ambiente do sistema nervoso (Ide, 1996; Xu et al., 1997; Keirstead et al., 1999; Hoke et al., 2003). Logo, a inoculação de CS pode liberar fatores quimioatrativos que irão favorecer e guiar o crescimento permissivo de fibras neuronais em direção ao seu alvo específico e também atenuar a formação da cicatriz glial no local do trauma, contribuindo para a regeneração do SNC (Hoke et al., 2003).

O segundo motivo é que a utilização de abordagens que atuem sobre os processos inflamatórios e, conseqüentemente, sobre a degeneração secundária é importante em lesões do SNC. As células imunes podem ser a origem de fatores tróficos, mitogênicos, quimioatrativos e angiogênicos que sustentam a remielinização e a sobrevivência neuronal em diversos modelos de doenças e lesões do SNC (Liberto et al., 2004). Na fase aguda da lesão neural, o processo inflamatório influi diretamente nas respostas neurotróficas promovidas pelas células de Schwann (Peng et al., 2003).

A lesão contusa da medula espinal induzida pelo NYU Impactor é um modelo aceito para promoção da lesão medular graduada e reprodutível em animais experimentais (Chadi et

al., 2001; Young, 2002; do Carmo Cunha et al., 2007). As lesões contusas promovidas pelo NYU Impactor exibem uma degeneração secundária progressiva e produzem a morte celular pela apoptose das células da medula espinal a longo-prazo, incluindo os neurônios e os oligodendrócitos (Abe et al., 1999; Warden et al., 2001). Isto pode modificar o prognóstico de uma lesão medular parcial, considerando a pequena dimensão transversal deste órgão (Andrade et al., 2008).

Uma relação entre o déficit comportamental e a severidade da lesão medular contusa foi descrita com detalhes por Chadi et al. (2001) e Andrade et al. (2008), onde foi demonstrada uma degeneração secundária dependente do tempo após a lesão contusa de intensidade moderada (25mm), mas não severa (50mm). A lesão contusa de intensidade moderada sustenta eventos degenerativos mais demorados se comparada com a de intensidade severa, permitindo uma oportunidade para condutas neuroprotetivas (Andrade et al., 2008). Rosenberg e Wrathall (1997) descreveram que lesões contusas mais severas levam à perda axonal mais precoce. Logo, o conhecimento sobre a correlação entre a progressão dependente do tempo na degeneração secundária e a severidade da lesão pode ser importante quando considerados procedimentos terapêuticos, como tratamentos antiinflamatórios.

O estudo de Martin et al. (1996) que analisa qual o melhor tempo entre a lesão e a injeção das CS, visando a melhor sobrevivência e crescimento das mesmas, mostra que a injeção imediatamente ou após 10 dias de lesão é melhor quando comparado à inoculação após 3 dias. Isto devido às substâncias tóxicas responsáveis pela morte de parte das células inoculadas não estarem presentes imediatamente após a lesão, sendo que no período de 10 dias estas substâncias já estão ausentes. Outra explicação pode ser relacionada com a presença ou ausência de fatores neurotróficos, citocinas inflamatórias ou também com a modificação estrutural da medula espinal. No experimento aqui realizado as injeções foram realizadas imediatamente após o trauma contuso, não só visando a ausência de substâncias tóxicas, mas

também o cuidado e a saúde dos animais, já que uma segunda cirurgia poderia deixar os animais mais debilitados e suscetíveis a infecções.

No presente estudo, a inoculação de CS na lesão contusa da medula espinal de ratos aumentou a recuperação espontânea do comportamento motor ao longo do período analisado, efeito este não potenciado pelo pré-tratamento das CS com as citocinas TGF- β 1 e TNF- α . No estudo de Takami et al. (2002) que inoculava CS uma semana após lesão contusa (12.5mm), foi relatado melhor desempenho motor de membros pélvicos de ratos. Apesar de diferenças na intensidade da lesão e no tempo de inoculação das células, estes resultados estão de acordo com os deste desenho experimental. Outro estudo que relata melhora do comportamento motor após tratamento com as CS é o de Firouzi et al. (2006), apesar da lesão contusa ser promovida por esmagamento e a injeção das células ser realizada no espaço subaracnóide.

A recuperação motora de membros pélvicos após lesão medular incompleta depende do número de axônios descendentes regenerados e/ou preservados do tronco encefálico e do córtex cerebral (Basso et al., 1996) e dos axônios proprioespinais locais (Helgren e Goldberger, 1993). Interessante é o fato de que somente uma pequena porcentagem de axônios descendentes do tronco encefálico é necessária para direcionar os circuitos envolvidos na geração de padrões básicos de locomoção (Helgren e Goldberger, 1993; Basso et al., 1996; Ribotta et al., 2000).

Apesar da melhora comportamental observada no grupo que recebeu tratamento com as CS, não foram observadas alterações morfológicas como diferenças no volume de tecido preservado e no número de neurônios remanescentes. Estes achados indicariam um efeito neuroprotetivo do tratamento. Este resultado difere do estudo de Takami et al. (2002), onde houve preservação tecidual após a injeção de CS. Provavelmente estes resultados são contraditórios devido à inoculação no estudo de Takami et al. (2002) ter sido realizada uma semana após lesão contusa, promovida por uma distância de 12.5mm, com uma sobrevivência de 12 semanas após a lesão. No estudo de Martin et al. (1996) a injeção de CS também promoveu

preservação tecidual, porém a lesão medular contusa foi promovida por um balão inflado. Na lesão contusa de intensidade moderada os neurônios morrem devido à lesão primária e os neurônios localizados nas adjacências sofrem as conseqüências da degeneração secundária (Dusart e Schwab, 1994; Zhang et al., 1997). Na lesão medular, os fatores subseqüentes à lesão primária proporcionam perda tecidual, a qual dificulta a regeneração. Estes fatores são definidos temporalmente, sendo dependentes da síntese ativa de proteínas por células neuronais e gliais (Dusart e Schwab, 1994; Liu et al., 1997). Importante ressaltar que o processo endógeno de migração das CS associado com processos exógenos aumenta a recuperação motora após lesão medular (Beattie et al., 1997).

Os tratamentos realizados nos experimentos deste trabalho não alteraram as respostas neuroprotetivas. Logo, o melhor desempenho motor observado no grupo que recebeu inoculação de CS deve estar relacionado a fatores como respostas plásticas e neuroquímicas no tecido preservado da medula espinal e não às possíveis respostas neuroprotetivas.

As manipulações realizadas neste experimento não influenciaram as marcações imunohistoquímicas das regiões da substância cinza intermédia e do corno posterior, onde não foram constatadas diferenças significativas para as imunorreatividades analisadas, ou talvez após 8 semanas de lesão as alterações nestas regiões já tenham desaparecido. O anexo A resume os principais resultados das imunorreatividades aqui apresentadas.

Os neuropeptídeos estão amplamente distribuídos no SNC, podendo influenciar os processos plásticos da medula espinal como as interações entre os neurônios e os astrócitos (Kozlov et al., 2001). A imunorreatividade do NPY no corno anterior mostrou o grupo controle com menor imunorreatividade em relação ao grupo tratado com as CS. Não foi encontrada diferença estatística entre o grupo lesão e o grupo CS no corno anterior, o que pode estar relacionado com o fato do NPY exercer ações modulatórias influenciando neurônios em regiões distantes da lesão (De Quit e Emson, 1986; Fuxe et al., 1990; Liu et al., 1994). A expressão de

peptídeos em motoneurônios lesados está alterada, porém ainda não está bem estabelecido seu significado (Zhang et al., 1994). Em seu estudo, Palkovits (1995) afirma que os neurônios em resposta a axotomia elevam a expressão de neuropeptídeos responsáveis pela sua sobrevivência e regeneração, podendo alterar a expressão de substâncias relacionadas com sua atividade transmissora e secretória.

Logo, a maior imunorreatividade do grupo CS no corno anterior pode estar de alguma forma influenciando o suporte trófico aos neurônios, provavelmente através de astrócitos vizinhos, considerando que este mesmo padrão ocorre para a imunorreatividade da GFAP e que os neuropeptídeos aumentam a capacidade dos astrócitos de promoverem substratos metabólicos e tróficos aos neurônios (Deschepper, 1998).

Apesar de o NPY exercer funções no processamento sensorial (Sasek e Elde, 1985; Roddy et al., 1990) e no sistema nervoso neurovegetativo, onde está implicado nas alterações urinárias como a bexiga neurogênica após lesões medulares (De Quit e Emson, 1986; Haferkamp et al., 2006), neste experimento não foram encontradas alterações da imunorreatividade do NPY na substância cinza intermédia e no corno posterior.

Trabalhos relatam a presença de terminais nervosos imunorreativos à substância P na medula espinal, provenientes de corpos celulares do tronco encefálico. Entretanto, interneurônios da substância cinza intermédia da medula espinal também projetam para neurônios na própria medula (Gibson et al., 1984; De Quit e Emson, 1986; Brown et al., 1995; Wiedermann et al., 1996). A resposta da substância P após lesão medular está envolvida com os eventos vasculares, imunes e gliais, ou ainda, influenciando os processos plásticos bioquímicos que podem ocorrer no local do trauma e no tecido preservado nas regiões adjacentes (Parker e Grillner, 1999; Edgerton et al., 2004). Deve ser também considerado que os interneurônios atuam sobre os motoneurônios utilizando a substância P como neurotransmissor (Gibson et al., 1984; Cassam et al., 1999). Com base na bibliografia onde há aumento da substância P após

lesão medular e sua influência trófica em motoneurônios no corno anterior (Wiedermann et al., 1996; Cassam et al., 1999; Kozlov et al., 2001; Marriot, 2004) é possível o envolvimento de interneurônios imunorreativos a substância P nos mecanismos de plasticidade neste experimento. Entretanto, este estudo não viu alterações na substância P após 8 semanas de lesão medular. Porém, deve se ressaltar no presente desenho experimental, a imunorreatividade dos neuropeptídeos, onde o grupo controle recebeu inoculação de meio de cultura, o que deve ter ocultado a possível reação de fibras contendo substância P pela lesão em si, assim como influenciando a imunorreatividade do NPY.

Neurônios imunorreativos a GAP-43 foram encontrados na medula espinal (Curtis et al., 1993; Brook et al., 1998). A GAP-43 é uma proteína relacionada com processos de regeneração após lesões do SNC (Skene e Willard, 1981). A maior imunorreatividade da GAP-43 no corno anterior do grupo tratado com as CS em relação ao grupo lesão pode estar relacionada com o estudo de Brook et al. (1998) que afirma que a imunorreatividade da GAP-43 está associada com as CS que invadem o local da lesão. No estudo de Linda et al. (1992) após transecção da medula espinal a imunorreatividade da GAP-43 foi encontrada em neurônios nos segmentos adjacentes à área da lesão. Os padrões de imunorreatividade da GAP-43 aqui encontrados provavelmente estão relacionados com processos plásticos que ocorrem após lesões, como os que ocorrem no hipocampo, onde atividades neuroplásticas como a aprendizagem e memória foram relatadas (Skene, 1989; Benowitz e Routtenberg, 1997).

Estudos indicam que a substância branca lesada é sensível aos mecanismos excitotóxicos que envolvem os receptores glutamatérgicos (Wrathall et al., 1997; Rosenberg et al., 2005).

A diferença encontrada entre o grupo tratado com as CS e o grupo lesão no que se refere a imunorreatividade do glutamato no funículo lateral nas regiões de tecido preservado pode estar relacionada com a sinalização astrocitária na substância branca. O neurotransmissor

glutamato influencia a atividade locomotora em animais com lesão medular, estando envolvido na CPG de vertebrados (Grillner, 2003).

A lesão medular interrompe as vias descendentes controladoras da atividade de motoneurônios da medula espinal que inervam os músculos esqueléticos, no qual muitas delas são do tipo glutamatérgicas (Shapiro, 1997; Grossman e Wrathakk, 2000).

As alterações nas imunorreatividades da GAP-43 e do glutamato provavelmente estão relacionadas com os mecanismos plásticos da CPG encontrados após lesão da medula espinal (Grossman et al., 2001). É possível que uma parte das fibras imunorreativas a GAP-43 encontradas neste experimento sejam glutamatérgicas, notadamente no grupo que recebeu tratamento com as CS, o que poderia ajudar justificar o comportamento motor observado.

Os fatores neurotróficos e as citocinas inflamatórias podem influenciar a sobrevivência, a diferenciação ou a morte das células. O fator neurotrófico FGF-2 regula de modo parácrino o trofismo de diversos tipos de neurônios durante o desenvolvimento e a vida adulta (Chadi et al., 1994; Mocchetti et al., 1996; Gomide e Chadi, 1999). Devido suas múltiplas funções, tais como promover a sobrevivência e a regeneração neuronal, a angiogênese e a remodelação tecidual, o FGF-2 tem sido associado aos mecanismos de reparo endógeno no SNC (Mocchetti et al., 1996; Meijjs et al., 2004).

O FGF-2 está presente em astrócitos e seu aumento pode estar associado à atividade sobre o trofismo neuronal desencadeada após lesão (Leme e Chadi, 2001). Além disso, o FGF-2 estimula as respostas gliais após lesão e promove a proliferação de astrócitos reativos, os quais podem liberar moléculas com efeitos tróficos no ambiente da lesão (Eckenstein et al., 1991; Koshinaga et al., 1993). Estas funções podem estar relacionadas aos resultados aqui demonstrados. O acúmulo da imunorreatividade do FGF-2 ao redor de neurônios indica que ele pode ser liberado por astrócitos, sugerindo que este fator neurotrófico age de modo autócrino, promovendo as funções gliais apropriadas nos processos de recuperação celular (Follesa et al.,

1994).

Os resultados aqui apresentados após 2 meses de lesão estão de acordo com o estudo de Follesa et al. (1994), onde ocorreu aumento da imunorreatividade do FGF-2 nas substâncias cinza e branca da medula espinal 7 dias após lesão medular contusa (25mm). A imunorreatividade do FGF-2 foi detectada no fascículo grácil 5 dias após a lesão medular em ratos (Mocchetti et al., 1996), o que também ocorreu neste experimento. Após a lesão contusa, ocorreu aumento no número de perfis imunorreativos ao FGF-2 no epicentro e em níveis adjacentes, o que pode elevar os processos envolvidos na recuperação funcional, muitas vezes observados após lesão medular em ratos (Beattie et al., 1997).

Apesar do exato mecanismo pelo qual o FGF-2 influencia a sobrevivência da célula e a plasticidade após lesão não ser claro, ele tem sido relacionado com a estabilização da homeostase do cálcio (Mattson et al., 1989; Cheng e Mattson, 1991). Logo, a expressão endógena de fatores neurotróficos pode ser um importante recurso no tratamento de lesões do SNC.

As respostas morfológicas e bioquímicas após lesão medular são mediadas por respostas inflamatórias locais, seguidas por eventos neurodegenerativos e neuroprotetivos (Giulian et al., 1993; Davies et al., 1996; do Carmo Cunha et al., 2007). Após a lesão os componentes da cicatriz glial servem para reparar a barreira hemato-medular, limitando a degeneração celular e a resposta inflamatória, prevenindo que esta se estenda para regiões adjacentes (Moonen et al., 1990; Namiki et al., 2000; Silver e Miller, 2004), promovendo a regeneração do SNC e favorecendo os eventos tróficos no local da lesão e em regiões adjacentes (Chadi et al., 1994).

As respostas gliais no tecido nervoso lesado envolvidas em respostas funcionais intrínsecas são mediadas por substâncias químicas liberadas no local da lesão, (Martin, 1992; Giulian et al., 1996). Postula-se que as interações entre os astrócitos e a microglia ativados exerçam influência nos eventos tróficos na área da lesão, assim como em regiões adjacentes

(Giulian et al., 1996; Leme e Chadi, 2001).

A cicatriz glial é também invadida por células endoteliais que reorganizam os vasos sanguíneos, resultando em uma revascularização que promove suporte trófico e metabólico essencial para o reparo após lesão (Stichel e Muller, 1998). A morte ou a sobrevivência de astrócitos pode influenciar as respostas motoras funcionais através de seus efeitos na neurogênese e na reorganização sináptica (Chen e Swanson, 2003). Deve ser também considerado que os astrócitos podem receber influência de fatores liberados pelas CS os quais podem alterar seu fenótipo e da expressão de citocinas inflamatórias na área da lesão, que interferem com a ativação astrocitária (McKeon et al., 1991; Yoshida et al., 1992).

Na ausência de lesões as células imunorreativas a GFAP são abundantes na substância branca, mas raras na substância cinza. Após lesão medular, aumentos significantes de células imunorreativas a GFAP são encontrados em ambas as substâncias (Curtis et al., 1993; Dusart e Schwab, 1994; Prewitt et al., 1997; Xu et al., 1997; Chadi et al., 2001; Ishii et al., 2001), o que está de acordo com os resultados aqui apresentados, considerando que houve alteração nas regiões do corno anterior e funículo lateral, bem como no epicentro da lesão medular. Assim como no estudo de Takami et al. (2002), onde também foi encontrada maior imunorreatividade da GFAP na região do epicentro da lesão após a injeção de CS.

As substâncias secretadas pelos astrócitos reativos e pela microglia merecem atenção devido seu papel parácrino na formação da cicatriz glial e sua ação neuroprotetora. A secreção de substâncias gliais com atividades inibitórias e tróficas perto da lesão foi descrita, podendo inibir o crescimento de fibras indesejáveis e/ou prevenir a degeneração das fibras (Fawcett e Asher, 1999). Além disso, as células gliais reativas nas áreas lesadas podem favorecer a plasticidade e o trofismo neuronal, através da síntese e da liberação de substâncias com propriedades tróficas (Moonen et al., 1990; Namiki et al., 2000).

Ard et al. (1987) afirmam que a matriz extracelular produzida pelas CS promove e guia

o crescimento neurítico de vários tipos de neurônios do SNC e SNP. Segundo Fitch e Silver (1997), os níveis elevados de proteoglicanos ocorrem em um padrão muito restrito, confinado ao foco de lesão. Segundo Levine (1994) as células imunorreativas ao PGSC NG2 são recrutadas após lesões traumáticas, com acúmulo na área da lesão, provavelmente devido à combinação da proliferação e da migração. O número de células alcança seu pico após 7 dias de lesão, declinando lentamente após este período, o que está de acordo com os resultados aqui apresentados em relação ao PGSC NG2.

Deve ser considerado que as células imunorreativas ao PGSC NG2 podem ser tanto astrócitos como oligodendrócitos (Dawson et al., 2000; Jones et al., 2002; Zai e Wrathall, 2005). Se estas células são oligodendrócitos, elas podem estar associadas a remielinização de fibras. Porém, se estas células se diferenciarem em astrócitos, elas poderiam não só auxiliar na reorganização estrutural do tecido, mas também na produção de substâncias tróficas que beneficiem os processos plásticos do SNC.

Para as imunorreatividades analisadas na região de epicentro da lesão (GFAP, FGF-2 e NG2) o grupo controle foi estatisticamente diferente tanto do grupo que recebeu lesão contusa e inoculação do meio de cultura, como do grupo que recebeu lesão contusa e tratamento com as CS. Porém, o grupo que recebeu lesão contusa e inoculação do meio de cultura foi diferente do grupo tratado com as CS só no que se refere a imunorreatividade da GFAP. Estes resultados podem estar relacionados às quantidades elevadas de fatores neurotróficos que favorecem os eventos tróficos na área da lesão e nas regiões adjacentes (Dijkstra et al., 1999). A síntese e a liberação de substâncias com propriedades tróficas aos neurônios são importantes na contenção da degeneração secundária após a lesão da medula espinal (Namiki et al., 2000). Estas respostas gliais se estendem para as áreas adjacentes do tecido preservado, podendo influenciar a neuroplasticidade na recuperação motora.

O PGSC NG2 e o fator neurotrófico FGF-2 podem, ao menos em parte, serem

responsáveis pela maior reatividade astrocitária do grupo tratado com as CS. Há também o fato de que as próprias CS produzem substâncias tróficas que deixam os astrócitos mais reativos. É importante ressaltar que os astrócitos influenciam a migração das CS (Salgado-Ceballos et al., 1998). Hertz e Zielke (2004) afirmam que grande parte das funções do glutamato são reguladas pelos astrócitos.

É possível que o tratamento com as CS tenha estimulado uma maior reação astrocitária ao nível da lesão, possivelmente contribuindo com um processo mais efetivo de reparo e cicatrização local, com reflexos no processo de recuperação do comportamento. Este efeito de induzir uma maior ativação astrocitária na borda da lesão àquela produzida pela lesão em si não se acompanhou da adicional expressão de FGF-2 e NG2, pelo menos quando analisado aos 2 meses pós-cirúrgico possivelmente pela desnecessária manutenção de um provável “*auto-turnover*” destas moléculas.

As alterações funcionais dos neurônios podem ser bem sutis, sem a necessidade de uma alteração estrutural evidente. Isto pode ser caracterizado pelas mudanças bioquímicas na interação entre as células, caracterizando fenômenos plásticos. Estas observações indicam que os astrócitos reativos podem ser um dos principais responsáveis pelos mecanismos plásticos encontrados neste experimento, principalmente na melhora do desempenho motor dos animais tratados com as CS. O processo endógeno de migração das CS associado com processos exógenos, como a inoculação de CS, aumenta a recuperação motora após lesão da medula espinal (Beattie et al., 1997).

A lesão medular, a locomoção e o treinamento após lesão podem alterar o estado fisiológico e bioquímico dos sistemas de neurotransmissores, alterando as vias sensório-motoras que geram a locomoção (Edgerton et al., 2004). Uma consideração importante para o desenvolvimento de terapias para o tratamento da lesão medular é o fato de que a bioquímica celular é alterada conforme o tempo da lesão (Chau et al., 2002).

As citocinas inflamatórias, reguladas por sinais externos, são mediadoras e ativadoras da função astrocitária. Quando sintetizadas estas substâncias agem rapidamente, exercendo ações locais e sistêmicas, com funções autócrinas e parácrinas (Abbas e Litchman, 2005). A inoculação de citocinas inflamatórias realizada neste experimento provavelmente não foi tão benéfica quanto o próprio potencial endógeno do SNC em promover a homeostase do meio. O fato do tratamento adicional com as citocinas não ter potenciado o efeito das CS pode ser devido diferentes abordagens, concentrações e doses serem necessárias para influenciarem de forma consistente os complexos mecanismos neurobiológicos relacionados a neurodegeneração, a neuroproteção e a neuroplasticidade.

O uso de CS promove uma significativa recuperação funcional e axonal após lesão medular contusa em ratos e assegura investigação para aplicação clínica potencial (Rasouli et al., 2006). A melhor compreensão do funcionamento do SNC frente a lesões ou modificações do ambiente celular e molecular, assim como de seu potencial endógeno, se faz necessária. Há de se considerar que os programas de processamento motor no SNC do rato diferem em alguns pontos daqueles dos humanos. De modo que nem tudo aqui descrito nesta tese pode ser reproduzido na clínica no paciente com traumatismo raqui-medular. Por outro lado, é notório que as avaliações celulares e moleculares aqui aplicadas que evidenciaram a importância da plasticidade na medula espinal lesada nos padrões de recuperação motora espontânea não poderiam ser estudados na clínica.

6. CONCLUSÕES

1. A inoculação de CS na lesão contusa da medula espinal de ratos aumentou a recuperação espontânea do comportamento motor, efeito este não potenciado pelo pré-tratamento das CS com as citocinas inflamatórias TGF- β 1 e TNF- α .
2. As injeções de CS pré-tratadas ou não com as citocinas inflamatórias TGF- β 1 e TNF- α na medula espinal submetida ao trauma contuso pelo NYU Impactor não protegeu o órgão da neurodegeneração secundária e do desaparecimento neuronal próximo à lesão.
3. As alterações das imunorreatividades encontradas nas regiões de tecido preservado provavelmente estão relacionadas com a melhora do comportamento sensório-motor encontrada no grupo tratado com as CS, não observado no pré-tratamento com as citocinas inflamatórias TGF- β 1 e TNF- α .
4. As respostas gliais vistas pela imunorreatividade da GFAP, do FGF-2 e do PGSC NG2 no epicentro da lesão após a injeção das CS não tratadas com as citocinas inflamatórias TGF- β 1 e TNF- α podem estar relacionadas aos processos tróficos parácrinos moduladores do reparo e cicatrização. Estas respostas gliais se estendem para as áreas adjacentes do tecido preservado e podem ter influenciado as respostas neuroplásticas nestas áreas, com repercussão no ganho do comportamento motor.

REFERÊNCIAS *

- Abbas AK, Litchman AH. Citocinas. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª edição. Ed. Saunders/Elsevier – Science Limited; 2005. 251-282.
- Abe Y, Yamamoto T, Sugiyama Y, Watanabe T, Saito N, Kayama H, et al. Apoptotic cells associated with Wallerian degeneration after experimental spinal cord injury: a possible mechanism of oligodendroglial death. *J Neurotrauma* 1999;16(10):945-52.
- Acarin L, Gonzalez B, Castellano B. Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur J Neurosci* 2000;12(10):3505-20.
- Aguayo AJ, Rasminsky M, Bray GM, Carbonetto S, McKerracher L, Villegas-Perez MP, et al. Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1991;331(1261):337-43.
- Aldskogius H. Repairing CNS myelin--astrocytes have to do their jobs. *Exp Neurol* 2005;192(1):7-10.
- Aldskogius H, Kozlova EN. Central neuron-glial and glial-glial interactions following axon injury. *Prog Neurobiol* 1998;55(1):1-26.
- Anderson DK, Hall ED. Pathophysiology of spinal cord trauma. *Ann Emerg Med* 1993;22(6):987-92.
- Andrade MS, Hanania FR, Daci K, Leme RJ, Chadi G. Contuse lesion of the rat spinal cord of moderate intensity leads to a higher time-dependent secondary neurodegeneration than severe one An open-window for experimental neuroprotective interventions. *Tissue Cell* 2008;40(2):143-56.
- Appel E, Kolman O, Kazimirsky G, Blumberg PM, Brodie C. Regulation of GDNF expression in cultured astrocytes by inflammatory stimuli. *Neuroreport* 1997;8(15):3309-12.
- Ard MD, Bunge RP, Bunge MB. Comparison of the Schwann cell surface and Schwann cell extracellular matrix as promoters of neurite growth. *J Neurocytol* 1987;16(4):539-55.
- Ata KA, Lennmyr F, Funa K, Olsson Y, Terent A. Expression of transforming growth factor-beta1, 2, 3 isoforms and type I and II receptors in acute focal cerebral ischemia: an immunohistochemical study in rat after transient and permanent occlusion of middle cerebral artery. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999;97(5):447-55.
- Azanchi R, Bernal G, Gupta R, Keirstead HS. Combined demyelination plus Schwann cell transplantation therapy increases spread of cells and axonal regeneration following contusion injury. *J Neurotrauma* 2004;21(6):775-88.

* Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023

- Bandtlow CE, Heumann R, Schwab ME, Thoenen H. Cellular localization of nerve growth factor synthesis by in situ hybridization. *Embo J* 1987;6(4):891-9.
- Barber PC. Ulex europeus agglutinin I binds exclusively to primary olfactory neurons in the rat nervous system. *Neuroscience* 1989;30(1):1-9.
- Barouch R, Schwartz M. Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. *Faseb J* 2002;16(10):1304-6.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995;12(1):1-21.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study. *J Neurotrauma* 1996;13(7):343-59.
- Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11(9):372-7.
- Beattie MS, Bresnahan JC, Komon J, Tovar CA, Van Meter M, Anderson DK, et al. Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Exp Neurol* 1997;148(2):453-63.
- Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC. Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res* 2002;137:37-47.
- Bendtsen TF, Nyengaard JR. Unbiased estimation of particle number using sections--an historical perspective with special reference to the stereology of glomeruli. *J Microsc* 1989;153(Pt 1):93-102.
- Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 1997;20(2):84-91.
- Berry M, Carlile J, Hunter A. Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve. *J Neurocytol* 1996;25(2):147-70.
- Blight AR. Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992;9 Suppl 1:S83-91.
- Blottner D, Baumgarten HG. Insulin-like growth factor-I counteracts bFGF-induced survival of nitric oxide synthase (NOS)-positive spinal cord neurons after target-lesion in vivo. *J Neurosci Res* 1992;32(4):471-80.
- Bovolenta P, Fernaud-Espinosa I. Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Prog Neurobiol* 2000;61(2):113-32.

Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 2002;416(6881):636-40.

Brook GA, Lawrence JM, Raisman G. Columns of Schwann cells extruded into the CNS induce in-growth of astrocytes to form organized new glial pathways. *Glia* 2001;33(2):118-30.

Brook GA, Plate D, Franzen R, Martin D, Moonen G, Schoenen J, et al. Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression injury of the rat. *J Neurosci Res* 1998;53(1):51-65.

Brown JL, Liu H, Maggio JE, Vigna SR, Mantyh PW, Basbaum AI. Morphological characterization of substance P receptor-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis. *J Comp Neurol* 1995;356(3):327-44.

Bulsara KR, Iskandar BJ, Villavicencio AT, Skene JH. A new millenium for spinal cord regeneration: growth-associated genes. *Spine* 2002;27(17):1946-9.

Buonanno A, Fields RD. Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9(1):110-20.

Buss A, Pech K, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, Noth J, et al. Growth-modulating molecules are associated with invading Schwann cells and not astrocytes in human traumatic spinal cord injury. *Brain* 2007;130(Pt 4):940-53.

Casella GT, Bunge RP, Wood PM. Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia* 1996;17(4):327-38.

Cassam AK, Rogers KA, Weaver LC. Co-localization of substance P and dopamine beta-hydroxylase with growth-associated protein-43 is lost caudal to a spinal cord transection. *Neuroscience* 1999;88(4):1275-88.

Chadi G, Tinner B, Agnati LF, Fuxe K. Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) immunoreactivity exists in the noradrenaline, adrenaline and 5-HT nerve cells of the rat brain. *Neurosci Lett* 1993c;160(2):171-6.

Chadi G, Rosen L, Cintra A, Tinner B, Zoli M, Pettersson RF, et al. Corticosterone increases FGF-2 (bFGF) immunoreactivity in the substantia nigra of the rat. *Neuroreport* 1993a;4(6):783-6.

Chadi G, Moller A, Rosen L, Janson AM, Agnati LA, Goldstein M, et al. Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP-lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. *Exp Brain Res* 1993b;97(1):145-58.

Chadi G, Cao Y, Pettersson RF, Fuxe K. Temporal and spatial increase of astroglial basic fibroblast growth factor synthesis after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine neurons. *Neuroscience* 1994;61(4):891-910.

- Chadi G, Andrade MS, Leme RJ, Gomide VC. Experimental models of partial lesion of rat spinal cord to investigate neurodegeneration, glial activation, and behavior impairments. *Int J Neurosci* 2001;111(3-4):137-65.
- Chan A, Magnus T, Gold R. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. *Glia* 2001;33(1):87-95.
- Chao CC, Hu S, Sheng WS, Peterson PK. Tumor necrosis factor-alpha production by human fetal microglial cells: regulation by other cytokines. *Dev Neurosci* 1995;17(2):97-105.
- Chau C, Giroux N, Barbeau H, Jordan L, Rossignol S. Effects of intrathecal glutamatergic drugs on locomotion I. NMDA in short-term spinal cats. *J Neurophysiol* 2002;88(6):3032-45.
- Chen R, Cohen LG, Hallett M. Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience* 2002;111(4):761-73.
- Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(2):137-49.
- Cheng H, Cao Y, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* 1996;273(5274):510-3.
- Cheng B, Christakos S, Mattson MP. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 1994;12(1):139-53.
- Cheng B, Mattson MP. NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron* 1991;7(6):1031-41.
- Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 1997;3(1):73-6.
- Curtis R, Green D, Lindsay RM, Wilkin GP. Up-regulation of GAP-43 and growth of axons in rat spinal cord after compression injury. *J Neurocytol* 1993;22(1):51-64.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001;65(1):1-105.
- Davies AM. Neuronal survival: early dependence on Schwann cells. *Curr Biol* 1998;8(1):R15-8.
- Davies SJ, Field PM, Raisman G. Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways. *Exp Neurol* 1996;142(2):203-16.
- Dawson MR, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res* 2000;61(5):471-9.
- De Felipe C, Pinnock RD, Hunt SP. Modulation of chemotropism in the developing spinal cord by substance P. *Science* 1995;267(5199):899-902.

de Leon RD, Roy RR, Edgerton VR. Is the recovery of stepping following spinal cord injury mediated by modifying existing neural pathways or by generating new pathways? A perspective. *Phys Ther* 2001;81(12):1904-11.

de Martino C, Zamboni L. A morphologic study of the mesonephros of the human embryo. *J Ultrastruct Res* 1966;16(3):399-427.

de Quidt ME, Emson PC. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system--I. Radioimmunoassay and chromatographic characterisation. *Neuroscience* 1986;18(3):527-43.

de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, et al. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* 1996;64(1):37-43.

Deschepper CF. Peptide receptors on astrocytes. *Front Neuroendocrinol* 1998;19(1):20-46.

Di Santo E, Alonzi T, Poli V, Fattori E, Toniatti C, Sironi M, et al. Differential effects of IL-6 on systemic and central production of TNF: a study with IL-6-deficient mice. *Cytokine* 1997;9(5):300-6.

Dietrich WD, Alonso O, Busto R, Finklestein SP. Posttreatment with intravenous basic fibroblast growth factor reduces histopathological damage following fluid-percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1996;13(6):309-16.

Dietz V. Spinal cord pattern generators for locomotion. *Clin Neurophysiol* 2003;114(8):1379-89.

Dijkstra S, Bar PR, Gispen WH, Joosten EA. Selective stimulation of dendrite outgrowth from identified corticospinal neurons by homotopic astrocytes. *Neuroscience* 1999;92(4):1331-42.

do Carmo Cunha J, de Freitas Azevedo Levy B, de Luca BA, de Andrade MS, Gomide VC, Chadi G. Responses of reactive astrocytes containing S100beta protein and fibroblast growth factor-2 in the border and in the adjacent preserved tissue after a contusion injury of the spinal cord in rats: implications for wound repair and neuroregeneration. *Wound Repair Regen* 2007;15(1):134-46.

D'Souza S, Alinauskas K, McCrea E, Goodyer C, Antel JP. Differential susceptibility of human CNS-derived cell populations to TNF-dependent and independent immune-mediated injury. *J Neurosci* 1995;15(11):7293-300.

Dusart I, Schwab ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1994;6(5):712-24.

Eckenstein FP, Shipley GD, Nishi R. Acidic and basic fibroblast growth factors in the nervous system: distribution and differential alteration of levels after injury of central versus peripheral nerve. *J Neurosci* 1991;11(2):412-9.

- Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 1993;54(1):15-36.
- Edgerton VR, Tillakaratne NJ, Bigbee AJ, de Leon RD, Roy RR. Plasticity of the spinal neural circuitry after injury. *Annu Rev Neurosci* 2004;27:145-67.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 2004;24(9):2143-55.
- Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 1999;49(6):377-91.
- Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(9):703-13.
- Firouzi M, Moshayedi P, Saberi H, Mobasheri H, Abolhassani F, Jahanzad I, et al. Transplantation of Schwann cells to subarachnoid space induces repair in contused rat spinal cord. *Neurosci Lett* 2006;402(1-2):66-70.
- Fisher M, Meadows ME, Do T, Weise J, Trubetsky V, Charette M, et al. Delayed treatment with intravenous basic fibroblast growth factor reduces infarct size following permanent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15(6):953-9.
- Fitch MT, Silver J. Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury leads to increases in putative inhibitory molecules. *Exp Neurol* 1997;148(2):587-603.
- Follesa P, Wrathall JR, Mochetti I. Increased basic fibroblast growth factor mRNA following contusive spinal cord injury. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;22(1-4):1-8.
- Fuxe K, Tinner B, Bjelke B, Agnati LF, Verhofstad A, Steinbusch HG, et al. Monoaminergic and Peptidergic Innervation of the Intermedio-Lateral Horn of the Spinal Cord. *Eur J Neurosci* 1990;2(5):430-450.
- Gibson SJ, Bloom SR, Polak JM. A novel substance P pathway linking the dorsal and ventral horn in the upper lumbar segments of the rat spinal cord. *Brain Res* 1984;301(2):243-51.
- Giralt M, Penkowa M, Lago N, Molinero A, Hidalgo J. Metallothionein-1+2 protect the CNS after a focal brain injury. *Exp Neurol* 2002;173(1):114-28.
- Giulian D. Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Res* 1987;18(1):155-71, 132-3.
- Giulian D, Corpuz M, Chapman S, Mansouri M, Robertson C. Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system. *J Neurosci Res* 1993;36(6):681-93.
- Giulian D, Corpuz M, Richmond B, Wendt E, Hall ER. Activated microglia are the principal glial source of thromboxane in the central nervous system. *Neurochem Int* 1996;29(1):65-76.

Gomez-Pinilla F, Lee JW, Cotman CW. Basic FGF in adult rat brain: cellular distribution and response to entorhinal lesion and fimbria-fornix transection. *J Neurosci* 1992;12(1):345-55.

Gomide VC, Chadi G. The trophic factors S-100beta and basic fibroblast growth factor are increased in the forebrain reactive astrocytes of adult callosotomized rat. *Brain Res* 1999;835(2):162-74.

Griffin K, Patient R, Holder N. Analysis of FGF function in normal and no tail zebrafish embryos reveals separate mechanisms for formation of the trunk and the tail. *Development* 1995;121(9):2983-94.

Grillner S, Deliagina T, Ekeberg O, el Manira A, Hill RH, Lansner A, et al. Neural networks that co-ordinate locomotion and body orientation in lamprey. *Trends Neurosci* 1995;18(6):270-9.

Grillner S. The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(7):573-86.

Grimpe B, Silver J. The extracellular matrix in axon regeneration. *Prog Brain Res* 2002;137:333-49.

Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR. Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol* 2001;168(2):273-82.

Grossman SD, Wrathall JR. The role of activity blockade on glutamate receptor subunit expression in the spinal cord. *Brain Res* 2000;880(1-2):183-6.

Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc* 1986;143(Pt 1):3-45.

Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 1988;96(10):857-81.

Gwak YS, Hulsebosch CE. Upregulation of Group I metabotropic glutamate receptors in neurons and astrocytes in the dorsal horn following spinal cord injury. *Exp Neurol* 2005;195(1):236-43.

Haferkamp A, Freund T, Wagener N, Reitz A, Schurch B, Doersam J, et al. Distribution of neuropeptide Y-containing nerves in the neurogenic and non-neurogenic detrusor. *BJU Int* 2006;97(2):393-9.

Hattori A, Hayashi K, Kohno M. Tumor necrosis factor (TNF) stimulates the production of nerve growth factor in fibroblasts via the 55-kDa type 1 TNF receptor. *FEBS Lett* 1996;379(2):157-60.

- Hawrylak N, Fleming JC, Salm AK. Dehydration and rehydration selectively and reversibly alter glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus and subjacent glial limitans. *Glia* 1998;22(3):260-71.
- Helgren ME, Goldberger ME. The recovery of postural reflexes and locomotion following low thoracic hemisection in adult cats involves compensation by undamaged primary afferent pathways. *Exp Neurol* 1993;123(1):17-34.
- Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 1994;266(5187):1062-4.
- Henley JM, Jenkins R, Hunt SP. Localisation of glutamate receptor binding sites and mRNAs to the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuropharmacology* 1993;32(1):37-41.
- Hertz L, Hertz E. Cataplerotic TCA cycle flux determined as glutamate-sustained oxygen consumption in primary cultures of astrocytes. *Neurochem Int* 2003;43(4-5):355-61.
- Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci* 2004;27(12):735-43.
- Hoffman PN. Expression of GAP-43, a rapidly transported growth-associated protein, and class II beta tubulin, a slowly transported cytoskeletal protein, are coordinated in regenerating neurons. *J Neurosci* 1989;9(3):893-7.
- Hoke A, Ho T, Crawford TO, LeBel C, Hilt D, Griffin JW. Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. *J Neurosci* 2003;23(2):561-7.
- Hokfelt T, Lundberg JM, Terenius L, Jancso G, Kimmel J. Avian pancreatic polypeptide (APP) immunoreactive neurons in the spinal cord and spinal trigeminal nucleus. *Peptides* 1981;2(1):81-7.
- Hopker VH, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M, Holt C. Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 1999;401(6748):69-73.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 1981;75(6):816-21.
- Hurwitz AA, Lyman WD, Berman JW. Tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta upregulate astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J Neuroimmunol* 1995;57(1-2):193-8.
- Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res* 1996;25(2):101-21.
- Imaizumi T, Lankford KL, Kocsis JD. Transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells restores rapid and secure conduction across the transected spinal cord. *Brain Res* 2000;854(1-2):70-8.

Iseda T, Nishio T, Kawaguchi S, Yamamoto M, Kawasaki T, Wakisaka S. Spontaneous regeneration of the corticospinal tract after transection in young rats: a key role of reactive astrocytes in making favorable and unfavorable conditions for regeneration. *Neuroscience* 2004;126(2):365-74.

Ishii K, Toda M, Nakai Y, Asou H, Watanabe M, Nakamura M, et al. Increase of oligodendrocyte progenitor cells after spinal cord injury. *J Neurosci Res* 2001;65(6):500-7.

Janson AM, Moller A. Chronic nicotine treatment counteracts nigral cell loss induced by a partial mesodiencephalic hemitranssection: an analysis of the total number and mean volume of neurons and glia in substantia nigra of the male rat. *Neuroscience* 1993;57(4):931-41.

Jasmin L, Janni G, Moallem TM, Lappi DA, Ohara PT. Schwann cells are removed from the spinal cord after effecting recovery from paraplegia. *J Neurosci* 2000;20(24):9215-23.

Jones LL, Tuszynski MH. Spinal cord injury elicits expression of keratan sulfate proteoglycans by macrophages, reactive microglia, and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* 2002;22(11):4611-24.

Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol* 2003;182(2):399-411.

Juric DM, Carman-Krzan M. Cytokine-regulated secretion of nerve growth factor from cultured rat neonatal astrocytes. *Pflugers Arch* 2000;440(5 Suppl):R96-8.

Kaczmarek L, Kossut M, Skangiel-Kramska J. Glutamate receptors in cortical plasticity: molecular and cellular biology. *Physiol Rev* 1997;77(1):217-55.

Kapfhammer JP. Restriction of plastic fiber growth after lesions by central nervous system myelin-associated neurite growth inhibitors. *Adv Neurol* 1997;73:7-27.

Karram K, Chatterjee N, Trotter J. NG2-expressing cells in the nervous system: role of the proteoglycan in migration and glial-neuron interaction. *J Anat* 2005;207(6):735-44.

Keirstead HS, Morgan SV, Wilby MJ, Fawcett JW. Enhanced axonal regeneration following combined demyelination plus schwann cell transplantation therapy in the injured adult spinal cord. *Exp Neurol* 1999;159(1):225-36.

Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann Neurol* 2003;53(3):292-304.

Kimelberg HK, Cai Z, Rastogi P, Charniga CJ, Goderie S, Dave V, et al. Transmitter-induced calcium responses differ in astrocytes acutely isolated from rat brain and in culture. *J Neurochem* 1997;68(3):1088-98.

King VR, Phillips JB, Brown RA, Priestley JV. The effects of treatment with antibodies to transforming growth factor beta1 and beta2 following spinal cord damage in the adult rat. *Neuroscience* 2004;126(1):173-83.

Klusman I, Schwab ME. Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res* 1997;762(1-2):173-84.

Kobayashi NR, Fan DP, Giehl KM, Bedard AM, Wiegand SJ, Tetzlaff W. BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and α -tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci* 1997;17(24):9583-95.

Kojima A, Tator CH. Intrathecal administration of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes ependymal proliferation and functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *J Neurotrauma* 2002;19(2):223-38.

Koketsu N, Berlove DJ, Moskowitz MA, Kowall NW, Caday CG, Finklestein SP. Pretreatment with intraventricular basic fibroblast growth factor decreases infarct size following focal cerebral ischemia in rats. *Ann Neurol* 1994;35(4):451-7.

Kolb B, Whishaw IQ. Brain plasticity and behavior. *Annu Rev Psychol* 1998;49:43-64.

Koshinaga M, Whittemore SR. The temporal and spatial activation of microglia in fiber tracts undergoing anterograde and retrograde degeneration following spinal cord lesion. *J Neurotrauma* 1995;12(2):209-22.

Koshinaga M, Sanon HR, Whittemore SR. Altered acidic and basic fibroblast growth factor expression following spinal cord injury. *Exp Neurol* 1993;120(1):32-48.

Kozlov A, Kotaleski JH, Aurell E, Grillner S, Lansner A. Modeling of substance P and 5-HT induced synaptic plasticity in the lamprey spinal CPG: consequences for network pattern generation. *J Comput Neurosci* 2001;11(2):183-200.

Lacroix JS, Anggard A, Hokfelt T, O'Hare MM, Fahrenkrug J, Lundberg JM. Neuropeptide Y: presence in sympathetic and parasympathetic innervation of the nasal mucosa. *Cell Tissue Res* 1990;259(1):119-28.

Lagord C, Berry M, Logan A. Expression of TGFbeta2 but not TGFbeta1 correlates with the deposition of scar tissue in the lesioned spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 2002;20(1):69-92.

Lai JP, Zhan GX, Campbell DE, Douglas SD, Ho WZ. Detection of substance P and its receptor in human fetal microglia. *Neuroscience* 2000;101(4):1137-44.

Lee YB, Yune TY, Baik SY, Shin YH, Du S, Rhim H, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2000;166(1):190-5.

Lehrmann E, Kiefer R, Christensen T, Toyka KV, Zimmer J, Diemer NH, et al. Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor-beta1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Glia* 1998;24(4):437-48.

- Leme RJ, Chadi G. Distant microglial and astroglial activation secondary to experimental spinal cord lesion. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59(3-A):483-92.
- Lemke M, Yum SW, Faden AI. Lipid alterations correlate with tissue magnesium decrease following impact trauma in rabbit spinal cord. *Mol Chem Neuropathol* 1990;12(3):147-65.
- Leong SK, Ling EA. Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* 1992;6(1):39-47.
- Levine JM. Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J Neurosci* 1994;14(8):4716-30.
- Levison SW, Young GM, Goldman JE. Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia. *J Neurosci Res* 1999;57(4):435-46.
- Li Y, Raisman G. Schwann cells induce sprouting in motor and sensory axons in the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 1994;14(7):4050-63.
- Li Y, Raisman G. Sprouts from cut corticospinal axons persist in the presence of astrocytic scarring in long-term lesions of the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 1995;134(1):102-11.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 2004;89(5):1092-100.
- Linda H, Piehl F, Dagerlind A, Verge VM, Arvidsson U, Cullheim S, et al. Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons. *Exp Brain Res* 1992;91(2):284-95.
- Lisak RP, Bealmear B, Benjamins JA, Skoff AM. Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta inhibit cyclic AMP-induced Schwann cell differentiation. *Glia* 2001;36(3):354-63.
- Liu JJ, Shi SG, Han QD. [Evaluation of plasma neuropeptide Y levels in patients with congestive heart failure]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1994;33(10):687-9.
- Liu X, Mashour GA, Webster HF, Kurtz A. Basic FGF and FGF receptor 1 are expressed in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis: temporally distinct expression of midkine and pleiotrophin. *Glia* 1998;24(4):390-7.
- Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 1997;17(14):5395-406.
- Logan A, Berry M, Gonzalez AM, Frautschy SA, Sporn MB, Baird A. Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 1994;6(3):355-63.
- Logan A, Berry M. Transforming growth factor-beta 1 and basic fibroblast growth factor in the injured CNS. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14(9):337-42.

- Lu X, Richardson PM. Changes in neuronal mRNAs induced by a local inflammatory reaction. *J Neurosci Res* 1995;41(1):8-14.
- Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Lacroix JS, Pernow J. Neuropeptide Y and sympathetic neurotransmission. *Ann N Y Acad Sci* 1990;611:166-74.
- MacKay-Lyons M. Central pattern generation of locomotion: a review of the evidence. *Phys Ther* 2002;82(1):69-83.
- Madsen JR, MacDonald P, Irwin N, Goldberg DE, Yao GL, Meiri KF, et al. Tacrolimus (FK506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 1998;154(2):673-83.
- Mark MA, Jarrott B, Colvin LA, MacMillan SJ, Duggan AW. The release of immunoreactive neuropeptide Y in the spinal cord of the anaesthetized rat and cat. *Brain Res* 1997;754(1-2):195-203.
- Markus S, Failing K, Baumgartner W. Increased expression of pro-inflammatory cytokines and lack of up-regulation of anti-inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions. *J Neuroimmunol* 2002;125(1-2):30-41.
- Marriott I. The role of tachykinins in central nervous system inflammatory responses. *Front Biosci* 2004;9:2153-65.
- Martin D, Robe P, Franzen R, Delree P, Schoenen J, Stevenaert A, et al. Effects of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury. *J Neurosci Res* 1996;45(5):588-97.
- Martin D, Schoenen J, Delree P, Rigo JM, Rogister B, Leprince P, et al. Syngeneic grafting of adult rat DRG-derived Schwann cells to the injured spinal cord. *Brain Res Bull* 1993;30(3-4):507-14.
- Martin DL. Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 1992;5(2):81-94.
- Mattson MP, Guthrie PB, Kater SB. A role for Na⁺-dependent Ca²⁺ extrusion in protection against neuronal excitotoxicity. *Faseb J* 1989;3(13):2519-26.
- McHugh JM, McHugh WB. Pain: neuroanatomy, chemical mediators, and clinical implications. *AACN Clin Issues* 2000;11(2):168-78.
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* 1991;11(11):3398-411.
- McKeon RJ, Hoke A, Silver J. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol* 1995;136(1):32-43.
- McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA. FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* 1990;5(5):603-14.

- McMillian MK, Thai L, Hong JS, O'Callaghan JP, Pennypacker KR. Brain injury in a dish: a model for reactive gliosis. *Trends Neurosci* 1994;17(4):138-42.
- McMillian MK, Hong JS. Regulation of preproenkephalin expression in astrocytes: is there a role for glia-derived opioid peptides in reactive gliosis? *Crit Rev Neurobiol* 1994;9(1):91-103.
- McNeill H, Williams C, Guan J, Dragunow M, Lawlor P, Sirimanne E, et al. Neuronal rescue with transforming growth factor-beta 1 after hypoxic-ischaemic brain injury. *Neuroreport* 1994;5(8):901-4.
- McTigue DM, Wei P, Stokes BT. Proliferation of NG2-positive cells and altered oligodendrocyte numbers in the contused rat spinal cord. *J Neurosci* 2001;21(10):3392-400.
- McTigue DM, Popovich PG, Morgan TE, Stokes BT. Localization of transforming growth factor-beta1 and receptor mRNA after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 2000;163(1):220-30.
- Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G. Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol* 1997;150(4):1473-86.
- Meijs MF, Timmers L, Pearse DD, Tresco PA, Bates ML, Joosten EA, et al. Basic fibroblast growth factor promotes neuronal survival but not behavioral recovery in the transected and Schwann cell implanted rat thoracic spinal cord. *J Neurotrauma* 2004;21(10):1415-30.
- Menei P, Montero-Menei C, Whittemore SR, Bunge RP, Bunge MB. Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1998;10(2):607-21.
- Merrill JE, Zimmerman RP. Natural and induced cytotoxicity of oligodendrocytes by microglia is inhibitable by TGF beta. *Glia* 1991;4(3):327-31.
- Michaelis EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 1998;54(4):369-415.
- Mills LR, Velumian AA, Agrawal SK, Theriault E, Fehlings MG. Confocal imaging of changes in glial calcium dynamics and homeostasis after mechanical injury in rat spinal cord white matter. *Neuroimage* 2004;21(3):1069-82.
- Mocchetti I, Rabin SJ, Colangelo AM, Whittemore SR, Wrathall JR. Increased basic fibroblast growth factor expression following contusive spinal cord injury. *Exp Neurol* 1996;141(1):154-64.
- Moonen G, Rogister B, Leprince P, Rigo JM, Delree P, Lefebvre PP, et al. Neuroglial interactions and neural plasticity. *Prog Brain Res* 1990;86:63-73.
- Moreau-Fauvarque C, Kumanogoh A, Camand E, Jaillard C, Barbin G, Boquet I, et al. The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J Neurosci* 2003;23(27):9229-39.

- Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res* 2002;137:313-32.
- Morrissey TK, Kleitman N, Bunge RP. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci* 1991;11(8):2433-42.
- Munoz-Fernandez MA, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;56(3):307-40.
- Namiki J, Kojima A, Tator CH. Effect of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 on functional recovery and regeneration after spinal cord injury in adult rats. *J Neurotrauma* 2000;17(12):1219-31.
- Nicoll RA, Schenker C, Leeman SE. Substance P as a transmitter candidate. *Annu Rev Neurosci* 1980;3:227-68.
- Niquet J, Ben-Ari Y, Represa A. Glial reaction after seizure induced hippocampal lesion: immunohistochemical characterization of proliferating glial cells. *J Neurocytol* 1994;23(10):641-56.
- O'Brien MF, Lenke LG, Lou J, Bridwell KH, Joyce ME. Astrocyte response and transforming growth factor-beta localization in acute spinal cord injury. *Spine* 1994;19(20):2321-9; discussion 2330.
- Otsuka M, Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev* 1993;73(2):229-308.
- Otto D, Unsicker K. Basic FGF reverses chemical and morphological deficits in the nigrostriatal system of MPTP-treated mice. *J Neurosci* 1990;10(6):1912-21.
- Oudega M, Moon LD, de Almeida Leme RJ. Schwann cells for spinal cord repair. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(6):825-35.
- Oudega M, Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB. A combination of insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor enhances myelination but diminishes axonal regeneration into Schwann cell grafts in the adult rat spinal cord. *Glia* 1997;19(3):247-58.
- Ozaki M, Sasner M, Yano R, Lu HS, Buonanno A. Neuregulin-beta induces expression of an NMDA-receptor subunit. *Nature* 1997;390(6661):691-4.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;54(5):581-618.
- Palkovits M. Neuropeptide messenger plasticity in the CNS neurons following axotomy. *Mol Neurobiol* 1995;10(2-3):91-103.

- Pan W, Kastin AJ, Bell RL, Olson RD. Upregulation of tumor necrosis factor alpha transport across the blood-brain barrier after acute compressive spinal cord injury. *J Neurosci* 1999;19(9):3649-55.
- Panter SS, Yum SW, Faden AI. Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann Neurol* 1990;27(1):96-9.
- Parker D, Grillner S. Long-lasting substance-P-mediated modulation of NMDA-induced rhythmic activity in the lamprey locomotor network involves separate RNA- and protein-synthesis-dependent stages. *Eur J Neurosci* 1999;11(5):1515-22.
- Pasinetti GM, Nichols NR, Tocco G, Morgan T, Laping N, Finch CE. Transforming growth factor beta 1 and fibronectin messenger RNA in rat brain: responses to injury and cell-type localization. *Neuroscience* 1993;54(4):893-907.
- Peng HB, Yang JF, Dai Z, Lee CW, Hung HW, Feng ZH, et al. Differential effects of neurotrophins and schwann cell-derived signals on neuronal survival/growth and synaptogenesis. *J Neurosci* 2003;23(12):5050-60.
- Peulve P, Laquerriere A, Paresy M, Hemet J, Tadie M. Establishment of adult rat Schwann cell cultures: effect of b-FGF, alpha-MSH, NGF, PDGF, and TGF-beta on cell cycle. *Exp Cell Res* 1994;214(2):543-50.
- Pineau I, Lacroix S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol* 2007;500(2):267-85.
- Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, van Rooijen N, Stokes BT. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 1999;158(2):351-65.
- Pratt BM, McPherson JM. TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8(4):267-92.
- Prehn JH, Backhauss C, Kriegelstein J. Transforming growth factor-beta 1 prevents glutamate neurotoxicity in rat neocortical cultures and protects mouse neocortex from ischemic injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13(3):521-5.
- Prewitt CM, Niesman IR, Kane CJ, Houle JD. Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord. *Exp Neurol* 1997;148(2):433-43.
- Rabchevsky AG, Fugaccia I, Fletcher-Turner A, Blades DA, Mattson MP, Scheff SW. Basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances tissue sparing and functional recovery following moderate spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1999;16(9):817-30.
- Rabchevsky AG, Streit WJ. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 1997;47(1):34-48.

- Raineteau O, Schwab ME. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(4):263-73.
- Raisman G. Myelin inhibitors: does NO mean GO? *Nat Rev Neurosci* 2004;5(2):157-61.
- Raivich G, Kreutzberg GW. Nerve growth factor and regeneration of peripheral nervous system. *Clin Neurol Neurosurg* 1993;95 Suppl:S84-8.
- Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, et al. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 1998;4(7):814-21.
- Rasouli A, Bhatia N, Suryadevara S, Cahill K, Gupta R. Transplantation of preconditioned schwann cells in peripheral nerve grafts after contusion in the adult spinal cord. Improvement of recovery in a rat model. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88(11):2400-10.
- Redford EJ, Hall SM, Smith KJ. Vascular changes and demyelination induced by the intraneural injection of tumour necrosis factor. *Brain* 1995;118 (Pt 4):869-78.
- Reeves FC, Burdge GC, Fredericks WJ, Rauscher FJ, Lillycrop KA. Induction of antisense Pax-3 expression leads to the rapid morphological differentiation of neuronal cells and an altered response to the mitogenic growth factor bFGF. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 2):253-61.
- Ribotta MG, Provencher J, Feraboli-Lohnherr D, Rossignol S, Privat A, Orsal D. Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphe cells reinnervating a precise lumbar level. *J Neurosci* 2000;20(13):5144-52.
- Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 1980;284(5753):264-5.
- Richter C. Oxidative stress, mitochondria, and apoptosis. *Restor Neurol Neurosci* 1998;12(2-3):59-62.
- Ridley AJ, Davis JB, Stroobant P, Land H. Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol* 1989;109(6 Pt 2):3419-24.
- Roddy DR, Yaksh TL, Aimone LD, Go VL. Distribution of neuropeptide Y in the spinal cords of cat, dog, rat, man and pig. *Regul Pept* 1990;29(2-3):81-92.
- Rosenberg LJ, Zai LJ, Wrathall JR. Chronic alterations in the cellular composition of spinal cord white matter following contusion injury. *Glia* 2005;49(1):107-20.
- Rosenberg LJ, Wrathall JR. Quantitative analysis of acute axonal pathology in experimental spinal cord contusion. *J Neurotrauma* 1997;14(11):823-38.
- Rowan S, Todd AJ, Spike RC. Evidence that neuropeptide Y is present in GABAergic neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 1993;53(2):537-45.

Salgado-Ceballos H, Guizar-Sahagun G, Feria-Velasco A, Grijalva I, Espitia L, Ibarra A, et al. Spontaneous long-term remyelination after traumatic spinal cord injury in rats. *Brain Res* 1998;782(1-2):126-35.

Sasek CA, Elde RP. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity and its relationship to FMRF-amide-like immunoreactivity in the sixth lumbar and first sacral spinal cord segments of the rat. *J Neurosci* 1985;5(7):1729-39.

Scarisbrick IA, Isackson PJ, Windebank AJ. Differential expression of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the adult rat spinal cord: regulation by the glutamate receptor agonist kainic acid. *J Neurosci* 1999;19(18):7757-69.

Schalling M, Franco-Cereceda A, Hemsén A, Dagerlind A, Seroogy K, Persson H, et al. Neuropeptide Y and catecholamine synthesizing enzymes and their mRNAs in rat sympathetic neurons and adrenal glands: studies on expression, synthesis and axonal transport after pharmacological and experimental manipulations using hybridization techniques and radioimmunoassay. *Neuroscience* 1991;41(2-3):753-66.

Schermer C, Humpel C. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor activates microglia in rat cortex organotypic brain slices. *Neurosci Lett* 2002;328(2):180-4.

Schipke CG, Kettenmann H. Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia* 2004;47(3):226-32.

Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 1996;76(2):319-70.

Schwab ME. Experimental aspects of spinal cord regeneration. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1993;6(4):549-53.

Schwartz M, Solomon A, Lavie V, Ben-Bassat S, Belkin M, Cohen A. Tumor necrosis factor facilitates regeneration of injured central nervous system axons. *Brain Res* 1991;545(1-2):334-8.

Shapiro S. Neurotransmission by neurons that use serotonin, noradrenaline, glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in the normal and injured spinal cord. *Neurosurgery* 1997;40(1):168-76; discussion 177.

Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol* 1997;148(2):577-86.

Shinoda H, Marini AM, Cosi C, Schwartz JP. Brain region and gene specificity of neuropeptide gene expression in cultured astrocytes. *Science* 1989;245(4916):415-7.

Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 2004;5(2):146-56.

Skene JH. Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci* 1989;12:127-56.

Skene JH, Willard M. Characteristics of growth-associated polypeptides in regenerating toad retinal ganglion cell axons. *J Neurosci* 1981;1(4):419-26.

Smith GM, Rutishauser U, Silver J, Miller RH. Maturation of astrocytes in vitro alters the extent and molecular basis of neurite outgrowth. *Dev Biol* 1990;138(2):377-90.

Sofroniew MV. Astrocyte failure as a cause of CNS dysfunction. *Mol Psychiatry* 2000;5(3):230-2.

Steward O, Kelley MS, Torre ER. The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: temporal relationship between changes in the levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and GFAP mRNA in reactive astrocytes. *Exp Neurol* 1993;124(2):167-83.

Stichel CC, Muller HW. The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res* 1998;294(1):1-9.

Stirling DP, Khodarahmi K, Liu J, McPhail LT, McBride CB, Steeves JD, et al. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *J Neurosci* 2004;24(9):2182-90.

Streit WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol* 1998;152(1):74-87.

Strittmatter SM, Vartanian T, Fishman MC. GAP-43 as a plasticity protein in neuronal form and repair. *J Neurobiol* 1992;23(5):507-20.

Sulaiman OA, Gordon T. Transforming growth factor-beta and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo. *Glia* 2002;37(3):206-18.

Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T. Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol* 1993;151(4):2150-8.

Takami T, Oudega M, Bates ML, Wood PM, Kleitman N, Bunge MB. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J Neurosci* 2002;22(15):6670-81.

Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 1991;75(1):15-26.

Teng YD, Choi H, Onario RC, Zhu S, Desilets FC, Lan S, et al. Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(9):3071-6.

Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 1995;270(5236):593-8.

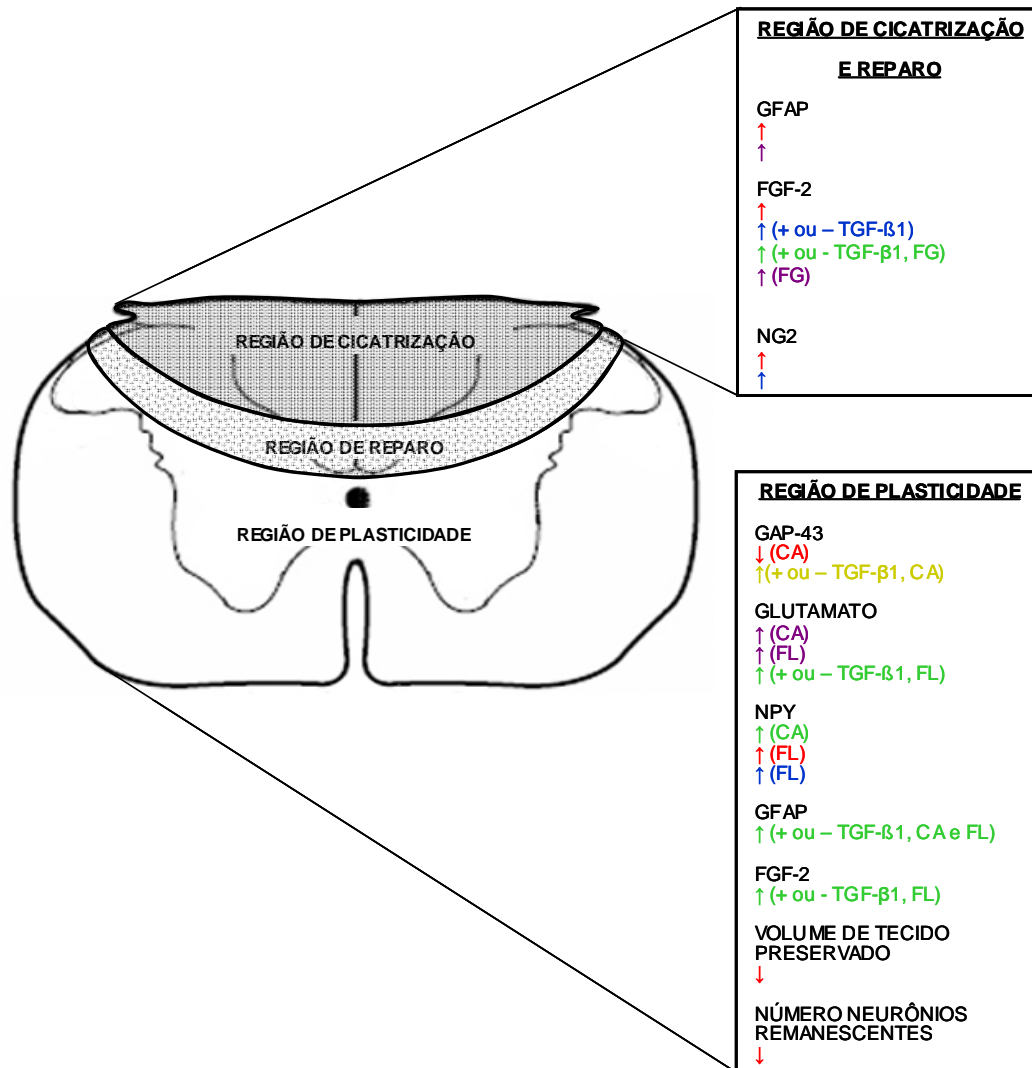
Tokita Y, Keino H, Matsui F, Aono S, Ishiguro H, Higashiyama S, et al. Regulation of neuregulin expression in the injured rat brain and cultured astrocytes. *J Neurosci* 2001;21(4):1257-64.

- Tymianski M, Tator CH. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery* 1996;38(6):1176-95.
- Tyor WR, Avgeropoulos N, Ohlandt G, Hogan EL. Treatment of spinal cord impact injury in the rat with transforming growth factor-beta. *J Neurol Sci* 2002;200(1-2):33-41.
- Tzeng SF, Wu JP. Responses of microglia and neural progenitors to mechanical brain injury. *Neuroreport* 1999;10(11):2287-92.
- Ubink R, Calza L, Hokfelt T. 'Neuro'-peptides in glia: focus on NPY and galanin. *Trends Neurosci* 2003;26(11):604-9.
- Unsicker K, Flanders KC, Cissel DS, Lafyatis R, Sporn MB. Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* 1991;44(3):613-25.
- Wakisaka S, Kajander KC, Bennett GJ. Increased neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy. *Neurosci Lett* 1991;124(2):200-3.
- Walz W. Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog Neurobiol* 1989;33(4):309-33.
- Warden P, Bamber NI, Li H, Esposito A, Ahmad KA, Hsu CY, et al. Delayed glial cell death following wallerian degeneration in white matter tracts after spinal cord dorsal column cordotomy in adult rats. *Exp Neurol* 2001;168(2):213-24.
- Watabe K, Fukuda T, Tanaka J, Toyohara K, Sakai O. Mitogenic effects of platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta, and heparin-binding serum factor for adult mouse Schwann cells. *J Neurosci Res* 1994;39(5):525-34.
- Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol* 1996;6(3):275-88.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991;231(4):482-97.
- West MJ, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol* 1990;296(1):1-22.
- White DM, Mansfield K. Vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y act indirectly to increase neurite outgrowth of dissociated dorsal root ganglion cells. *Neuroscience* 1996;73(3):881-7.
- White DM. Contribution of neurotrophin-3 to the neuropeptide Y-induced increase in neurite outgrowth of rat dorsal root ganglion cells. *Neuroscience* 1998;86(1):257-63.

- Widenfalk J, Lundstromer K, Jubran M, Brene S, Olson L. Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid. *J Neurosci* 2001;21(10):3457-75.
- Wiedermann CJ, Auer B, Sitte B, Reinisch N, Schratzberger P, Kahler CM. Induction of endothelial cell differentiation into capillary-like structures by substance P. *Eur J Pharmacol* 1996;298(3):335-8.
- Wrathall JR, Teng YD, Marriott R. Delayed antagonism of AMPA/kainate receptors reduces long-term functional deficits resulting from spinal cord trauma. *Exp Neurol* 1997;145(2 Pt 1):565-73.
- Xiao BG, Bai XF, Zhang GX, Link H. Transforming growth factor-beta1 induces apoptosis of rat microglia without relation to bcl-2 oncoprotein expression. *Neurosci Lett* 1997;226(2):71-4.
- Xu XM, Chen A, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB. Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. *J Neurocytol* 1997;26(1):1-16.
- Yan P, Li Q, Kim GM, Xu J, Hsu CY, Xu XM. Cellular localization of tumor necrosis factor-alpha following acute spinal cord injury in adult rats. *J Neurotrauma* 2001;18(5):563-8.
- Yoshida K, Gage FH. Cooperative regulation of nerve growth factor synthesis and secretion in fibroblasts and astrocytes by fibroblast growth factor and other cytokines. *Brain Res* 1992;569(1):14-25.
- Young W. Sympathectomy and spinal cord blood flow. *J Neurosurg* 1992;77(4):654-5.
- Young W. Spinal cord contusion models. *Prog Brain Res* 2002;137:231-55.
- Yu G, Fahnstock M. Differential expression of nerve growth factor transcripts in glia and neurons and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;105(1-2):115-25.
- Zai LJ, Wrathall JR. Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury. *Glia* 2005;50(3):247-57.
- Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T. Effect of peripheral axotomy on expression of neuropeptide Y receptor mRNA in rat lumbar dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* 1994;6(1):43-57.
- Zhang Z, Krebs CJ, Guth L. Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Exp Neurol* 1997;143(1):141-52.
- Zoli M, Agnati LF, Fuxe K, Ferraguti F, Biagini G, Cintra A, et al. Long-lasting reduction of glucocorticoid receptor immunoreactivity in the hippocampal field CA1 but not in the dentate gyrus after neonatal treatment with corticosterone in the rat. *Acta Physiol Scand* 1990;138(4):577-9.

Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Fisher TA, Ji H. Mechanisms of vascular growth-promoting effects of neuropeptide Y: role of its inducible receptors. *Regul Pept* 1998;75-76:231-8.

ANEXO



↑ ↓ : A lesão contusa alterou a imunorreatividade, o volume de tecido preservado ou o número de neurônios remanescentes.

↑ ↓: O tratamento com as células de Schwann reverteu o efeito da lesão.

↑ ↓: O tratamento com as células de Schwann manteve o efeito da lesão.

↑ ↓: O tratamento com as células de Schwann potencializou o efeito da lesão.

↑ ↓: O tratamento com as células de Schwann alterou a imunorreatividade quando comparado com o grupo controle.

Anexo A - Esquema representativo dos principais resultados encontrados. CA(Corno Anterior), FL (Funículo Lateral), FG (Fascículo Grácil), + ou - TGF-β1 (presença ou ausência TGF-β1). Figura adaptada de: *George Paxinos and Charles Watson - The Rat Brain, In Stereotaxic Coordinates, Compact Third Edition, Academic Press, 1997.*

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)