



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas

**O tratamento com laminina ácida promove
neuroproteção e recuperação funcional em
modelo experimental de lesão medular**

Karla Menezes

Orientadora: **Prof. Tatiana Lobo Coelho de Sampaio**

VOLUME II

Rio de Janeiro

Maio 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

O tratamento com laminina ácida promove neuroproteção e recuperação funcional em modelo experimental de lesão medular

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfológicas.

Karla Menezes

Orientadora: **Tatiana Lobo Coelho de Sampaio**

Rio de Janeiro
2008

Banca Examinadora

Membros Titulares

Prof. Dr. Radovan Borojevic
Departamento de Histologia e Embriologia – ICB - UFRJ

Prof. Dr. Marcelo Felipe Santiago
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Prof. Dra. Helena Araújo
Departamento de Histologia e Embriologia – ICB - UFRJ

Suplentes

Prof. Aurélio Vicente da Graça Souza
Departamento de Histologia e Embriologia – UFRJ

Revisor

Prof. Dr. João Ricardo Menezes
Departamento de Anatomia – ICB - UFRJ

Orientadora

Prof. Dra. Tatiana Lobo Coelho de Sampaio
Departamento de Histologia e Embriologia – UFRJ
Universidade Federal do Rio de Janeiro

COORDENADOR DO PROGRAMA DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto
Departamento de Anatomia – ICB - UFRJ

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia da Matriz Extracelular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob orientação da Profa. Tatiana Lobo Coelho de Sampaio, com auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

FICHA CATALOGRÁFICA

MENEZES, Karla

O TRATAMENTO COM LAMININA ÁCIDA PROMOVE NEUROPROTEÇÃO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR

Dissertação de Mestrado – Mestrado em Ciência Morfológica

XII - 95 p.

1. laminina 2. medula nervosa 3. lesão raquimedular 4. crescimento axonal 5. células progenitoras

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências de Biomédicas, ICB, 2008.

Orientador: Prof. Tatiana Lobo Coelho de Sampaio

Orientador: Coelho-Sampaio, Tatiana Lobo

II. Tese

guarda”...

A meus pais... “meus anjos da

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a vida duas vezes... por fazer milagres em alguns momentos... por me proteger todos os dias...

A meus pais pelo amor incondicional... mesmo longe estiveram presentes em todos os momentos de minha caminhada, me fazendo acreditar que era possível... que toda dificuldade seria transponível... que os sonhos poderiam se realizar...

A Tatiana, por me receber como aluna e como amiga, por me dar a oportunidade de realizar esse trabalho e acreditar que eu seria capaz...

Ao Fabiano por estar incondicionalmente ao meu lado... por querer acima de tudo me ver crescer...

Aos meus queridos alunos e amigos, Marcos, Raphael e Ian, sem os quais esse trabalho não contemplaria os mesmos resultados...

A Lela pelo carinho especial em todos os momentos...

A todos do nosso laboratório, que me ajudaram cada um a sua forma... agradeço por terem me recebido com tamanha cordialidade...

A Madalena por me ensinar sempre com muita calma e dedicação...

As minhas amigas cariocas Lídia, Cláudia, Leandra, Daiana, Carol, Karina, Paola e Bebel, que me acolheram e tornaram essa cidade um pouco mais maravilhosa...

A minhas amigas mineiras, que estiveram ao meu lado, independente da distância...

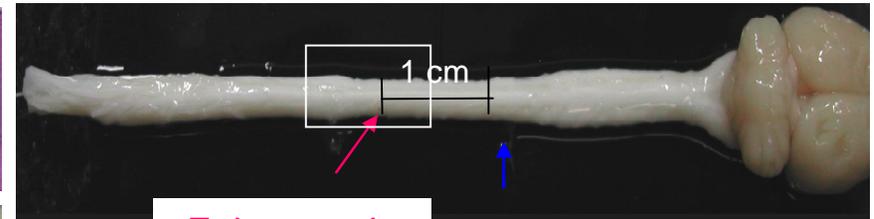
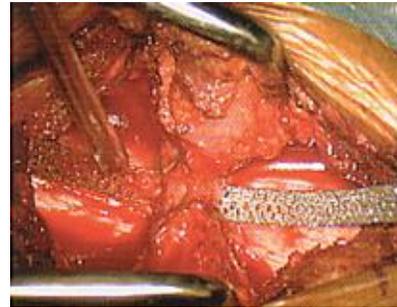
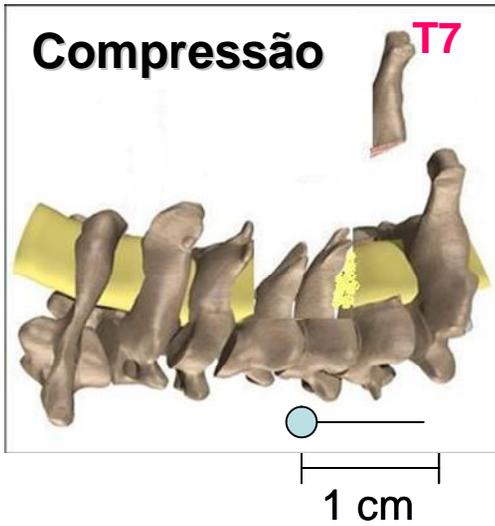
Há uma lista enorme de pessoas que fizeram parte desta caminhada... eu excederia o espaço permitido para citar cada uma delas... Espero um dia poder retribuir por tudo...

RESUMO

A medula espinhal, que é parte do sistema nervoso central, não se regenera espontaneamente após ser lesionada. Isso ocorre principalmente porque os axônios atingidos pela injúria não conseguem crescer novamente e reencontrar seus alvos funcionais. Sabendo que a proteína laminina polimerizada em pH ácido é capaz de estimular o crescimento axonal *in vitro*, delineamos o objetivo central desta dissertação: investigar se a injeção de laminina ácida no sítio da injúria medular poderia promover a regeneração axonal em ratos adultos. Utilizamos 3 tipos de lesões modelo, compressão, transecção parcial e transecção total e verificamos que em todos os casos o tratamento promoveu uma melhora significativa da função locomotora que variou entre 20 e 100% dependendo da lesão. A análise morfológica dos animais experimentais demonstrou que a laminina ácida reduzia o infiltrado inflamatório, o tamanho da cavidade cística e a astrogliose reativa. Foi verificada ainda a presença de neurônios em regeneração (GAP 43 positivos) no sítio da lesão, o que foi corroborado pelo aumento da marcação com o neurorastreador fluorogold em regiões acima do sítio lesionado. Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram que o tratamento com laminina ácida melhora a locomoção de animais submetidos a injúria medular experimental, o que é propiciado por um efeito anti-inflamatório, neuroprotetor e possivelmente pela indução da regeneração axonal.

ABSTRACT

The spinal cord, as part of the central nervous system, does not spontaneously regenerate after injury. This is because affected axons cannot re-grow through the non-permissive environment of the nervous tissue scar in order to find their functional targets. Knowing that the extracellular matrix protein laminin polymerized in acidic pH can stimulate axonal growth *in vitro*, we established the central goal of this dissertation, namely to investigate whether the injection of acidic laminin in the lesion site would promote axonal regeneration in adult rats. We used 3 types of injury - compression, partial transection and total transection - and found that in all cases the treatment significantly improved the locomotor function, between 20-100%, depending on the injury. Morphological analyses revealed that acidic laminin reduced the inflammatory reaction, the size of the cystic cavity and the glial scar. Neurons in regeneration (labeled with anti-GAP 43 antibody) were detected in the lesion site, which was corroborated by the observation of a higher number of fluorogold-labeled neuronal bodies above the injury. Results obtained in this dissertation demonstrate that the treatment with acidic laminin induces functional recovery in animals submitted to experimental injury, which is promoted by an anti-inflammatory and neuroprotector effect and likely by the induction of axonal regeneration.

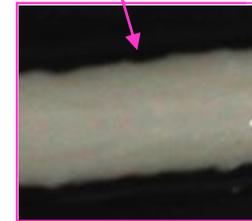


Epicentro da
lesão

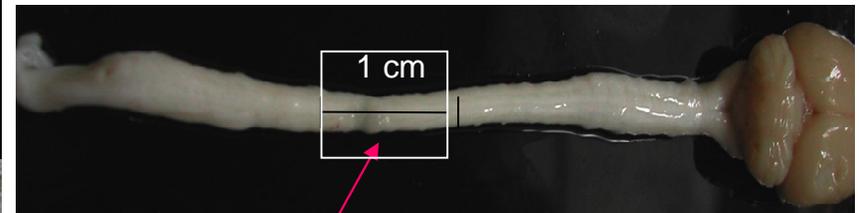
Retirada da Vértebra T7

(Local do ponto de
sutura)

**Medula pós
compressão**



DISSECÇÃO



Epicentro da
lesão

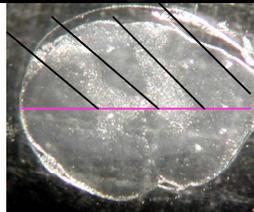
**Medula pós
Transecção**



LAMINECTOMIA



Parcial



Completa

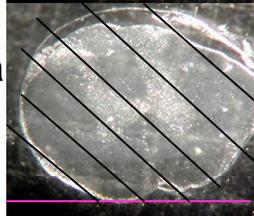


Figura 16: Descrição dos procedimentos cirúrgicos e processamentos dos tecidos medulares nos modelos de compressão e transecção medular. No modelo de compressão, a laminectomia envolveu a retirada da vértebra T7 e inserção do catéter Folgarty no interior do canal medular, alojado a 1 cm de distância do local da retirada da vértebra T7. Em seguida o balão presente na extremidade deste catéter foi inflado com um volume de 10 μ l, provocando a lesão medular. Após oito semanas deste procedimento, o animal foi perfundido e realizado a dissecação do tecido. A presença dos pontos internos com fio cirúrgico indicaram o local onde havia sido removido cirurgicamente a vértebra T7. Logo depois, mediu-se 1 cm deste local no sentido caudal para determinar o epicentro da lesão. Deste ponto, mediu-se 0,5 em ambas as direções, caudal e rostral. No modelo de transecção medular, retirou-se a vértebra T8/T9, cujo segmento medular foi seccionado, parcial ou completamente. Oito semanas após, o animal foi sacrificado e submetido a dissecação. O epicentro foi identificado pela presença da alteração do tecido no local, medindo-se 0,5 centímetros em ambas as direções, caudal e rostral.

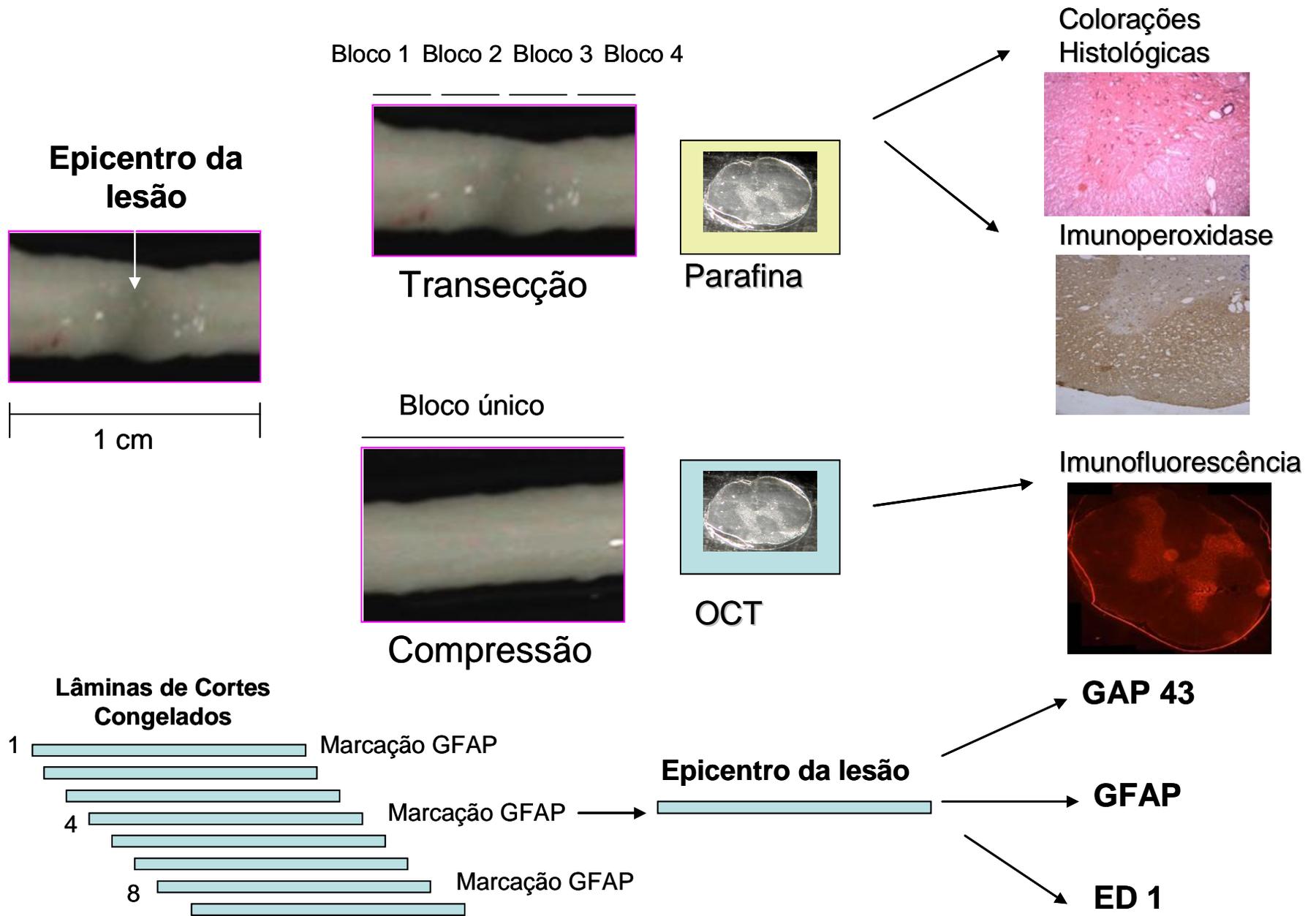
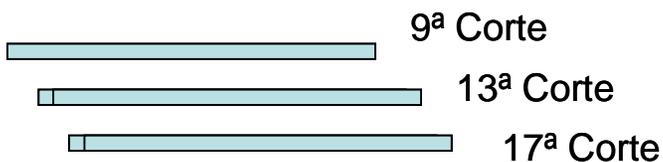
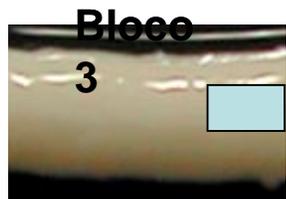
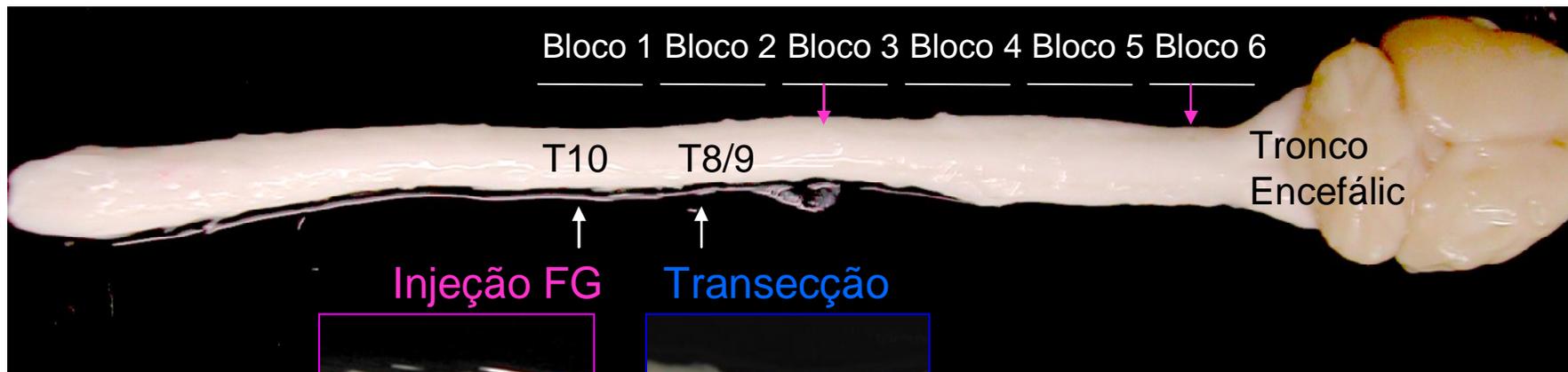
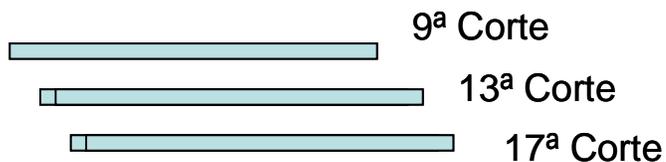
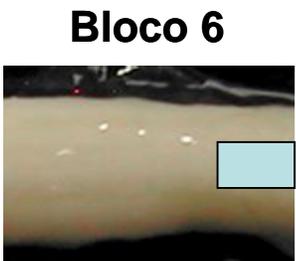


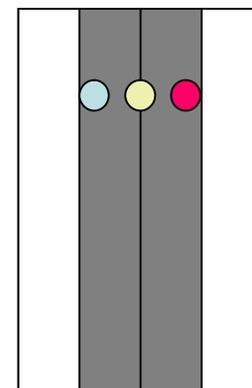
Figura 17: Processamento do tecido para realização de ensaios histoquímicos e de imunomarcações. Os teciduais medulares contendo o epicentro da lesão foram processados segundo o tipo de técnica aplicado para análise morfológica. Para realização de ensaios de imunoperoxidase e colorações histológicas, o tecido foi dividido em quatro blocos, emblocados posteriormente em parafina e cortados em fatias de 4 μm . Para os ensaios de imunofluorescência, os tecidos foram mantidos com 1 cm de extensão, congelados em nitrogênio líquido/OCT e cortados em fatias de 20 μm . Para identificação do epicentro da lesão, foram realizados ensaios com anti-GFAP de 3 em 3 lâminas, e medido a área da cavidade cística cada um deles. A lâmina com maior área foi considerada o epicentro. Nas lâminas vizinhas (a 100-150 μm de distância) foram realizados os ensaios de imunomarcação com anti-GAP 43 e ED1.



Região Mediana da Medula

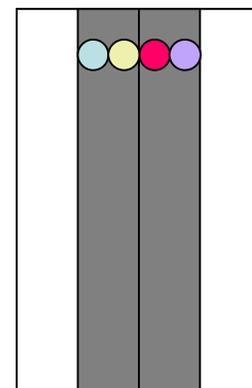


Microscópio Confocal Multifotônico



Bloco 3

- Lateral esquerda
- Medial
- Lateral direita



Bloco 6

- Lateral esquerda
- Medial esquerda
- Medial direita
- Lateral direita

Figura 18: Descrição dos procedimentos envolvidos na injeção do Fluorogold. A injeção do Fluorogold (FG) foi realizada 8 semanas após a transecção completa (T8/T9) da medula espinhal, na porção caudal à lesão (nível T10). Após a dissecação do tecido, a medula espinhal foi dividida em 6 blocos, sendo o bloco 1 aquele mais caudal (local da injeção do FG) e o bloco 6 o mais rostral (próximo a medula). A análise foi realizada no bloco 3 (segmento acima da transecção medular) e no bloco 6 (segmento próximo ao tronco encefálico). Em cada animal (n=1), controle tampão ácido e tratado laminina ácida, foram analisados 3 lâminas, referente ao 9°, 13° e 17°cortes, as quais estão localizadas na porção mediana da medula espinhal. Em cada um destes cortes, avaliamos o número de células marcadas com FG em quatro (bloco 3) ou três (bloco 6) regiões diferentes da SC. No bloco 3, foram selecionada as regiões lateral direita, lateral esquerda e medial. Já no bloco 6 avaliamos regiões lateral direita, lateral esquerda, medial direita e medial esquerda. As análises foram realizadas no microscópio confocal multifotônico, com uma leitura óptica de 8 (bloco 3) e 12 μm (bloco 6) de espessura.

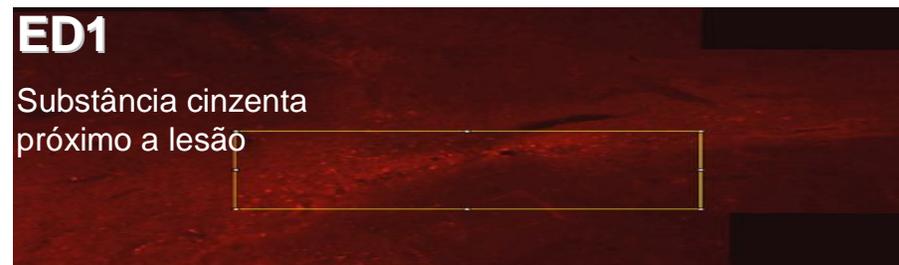
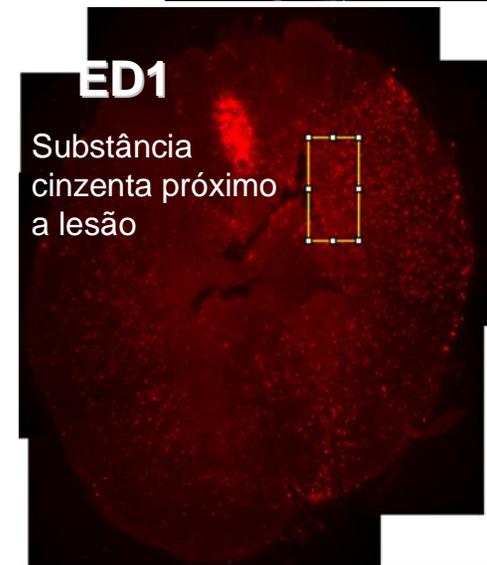
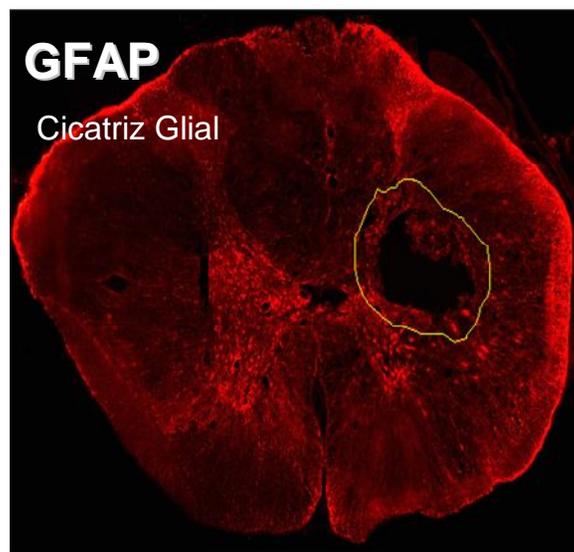
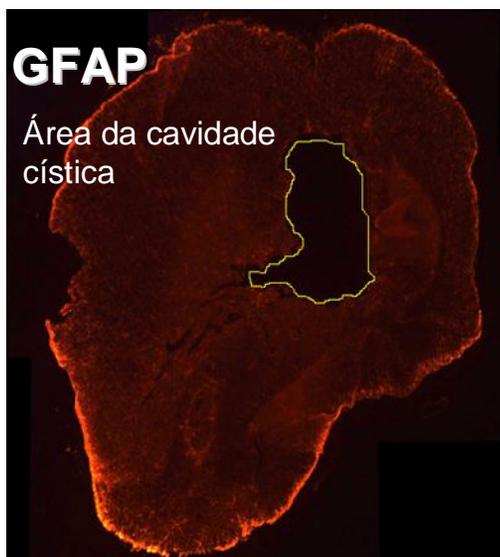
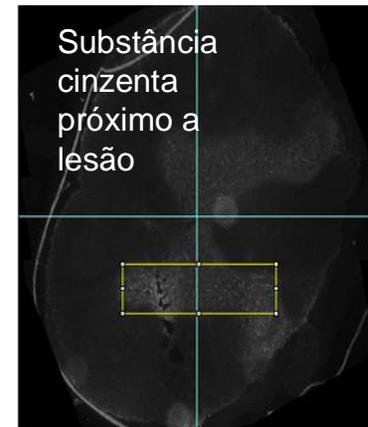
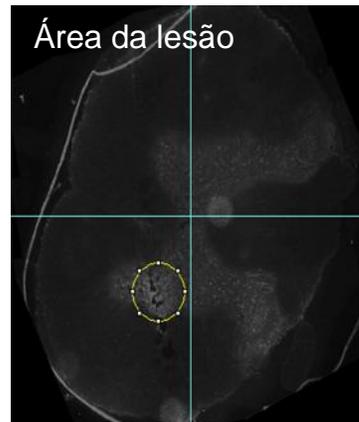
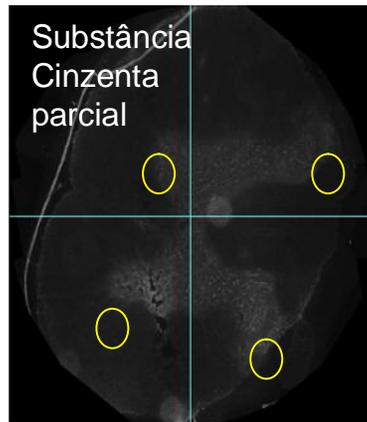


Figura 19: Análise quantitativa das marcações por imunofluorescência com anti-GFAP, anti-GAP 43 e ED1, utilizando a técnica de ImageJ. O programa ImageJ (NIH) foi utilizado para quantificar a intensidade da fluorescência pela intensidade da graus de cinza de cada pixel das imagens obtidas pelos ensaios de imunofluorescência (anti-GFAP, anti-GAP 43 e ED1). A quantificação foi implementada em 3 animais de cada grupo experimental (LM4 e T4), avaliando pelo menos 10 regiões diferentes em cada lâmina estudada. Nos ensaios com anti-GAP 43, foram avaliados 4 locais da substância cinzenta, sendo quantificado 3 pontos em cada uma destas regiões. Além disso, avaliamos a substância cinzenta total e a região específica onde se encontrava a lesão. Para as marcações com anti-GFAP foram analisados 10 pontos aleatórios na margem da cavidade cística e também nesta zona marginal como um todo. Nos ensaios com ED1, avaliamos 10 regiões aleatórias na região próxima a cavidade cística e ao infiltrado inflamatório. Para identificar o epicentro da lesão e comparar a extensão da cavidade cística entre os animais tratados e controles, calculamos a área da cavidade cística em cada uma das lâminas marcadas com anti-GFAP, através do programa Axiovision.

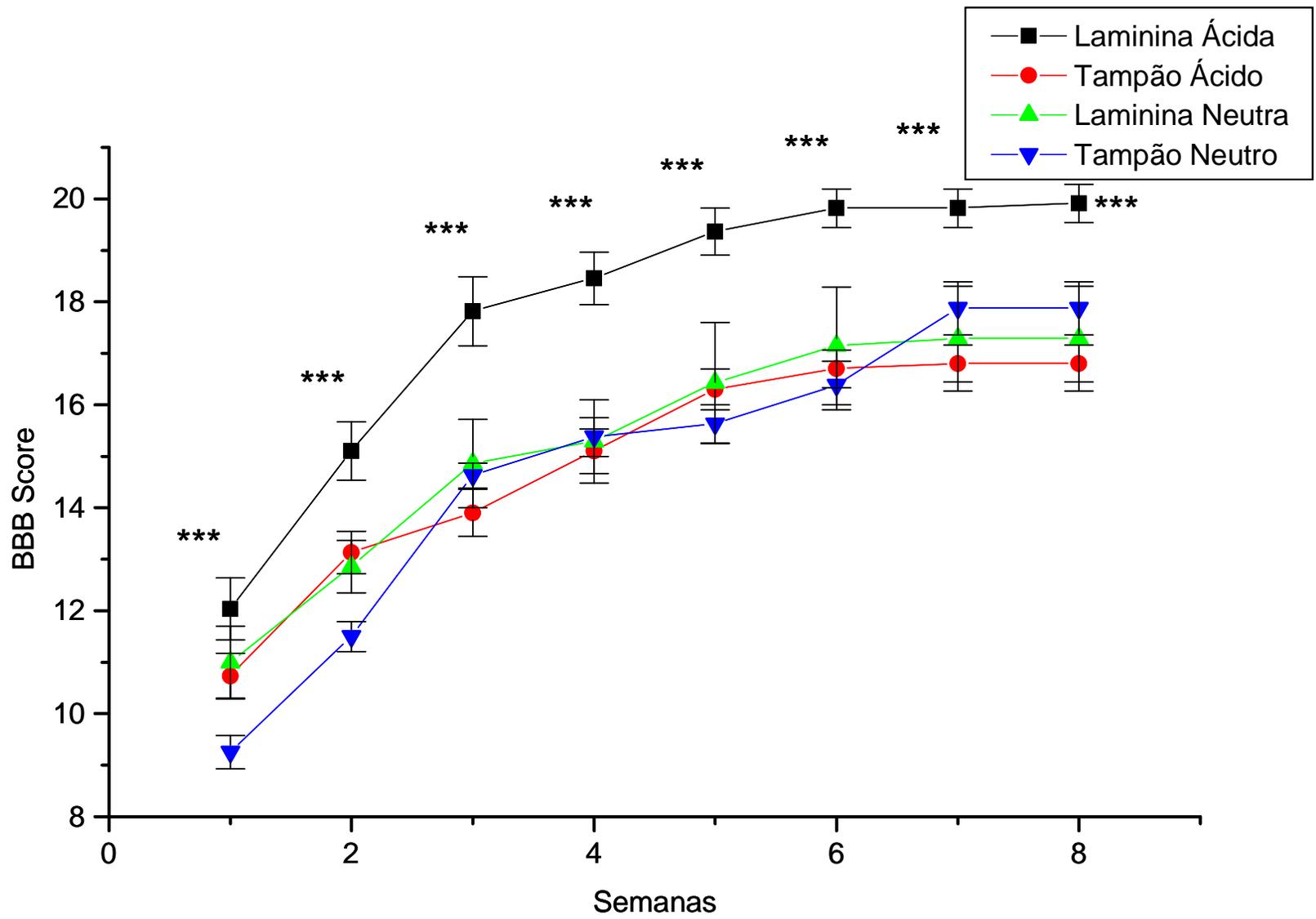
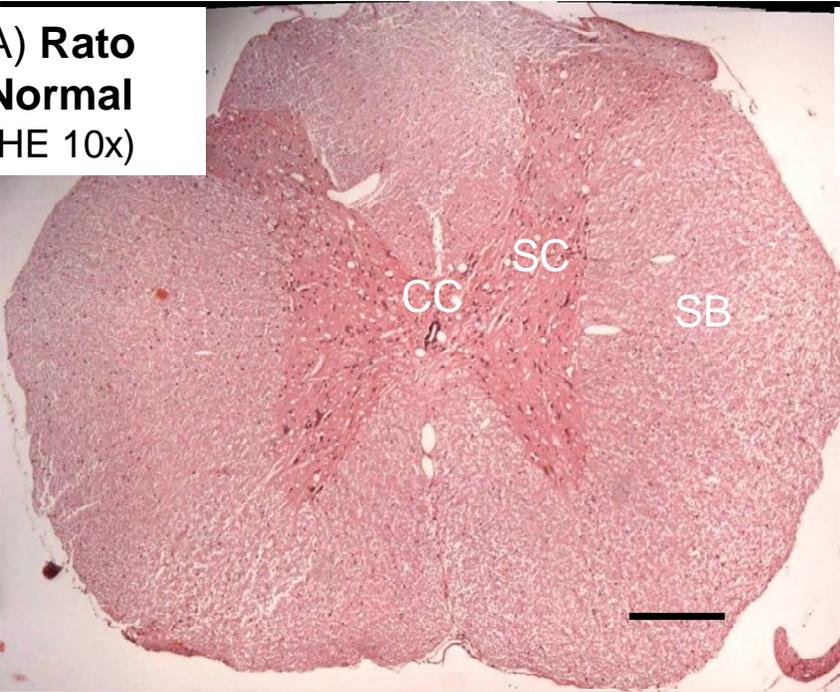


Figura 20: Efeito da laminina ácida na recuperação funcional dos animais submetidos à compressão medular durante o período de 8 semanas. Grupos experimentais: Laminina ácida de camundongo, Laminina neutra de camundongo, Tampão ácido, Tampão Neutro, cada qual com 10 animais. O teste BBB foi realizado semanalmente, durante 8 semanas. O tratamento com laminina (*Invitrogen, Quebec, CA*) foi injetado na medula espinhal a 1 cm do epicentro da lesão, na concentração de 100 µg/ml, volume total de 10µl. Teste estatístico (*Kruskal-Wallis / One Way ANOVA*). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$ e (***) $p \leq 0,001$.

**A) Rato
Normal
(HE 10x)**



**E) Rato
Normal
(FB 10x)**

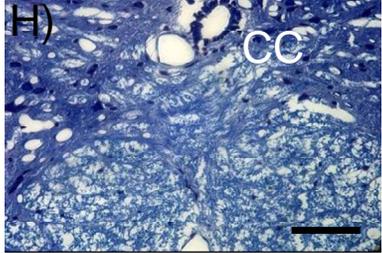
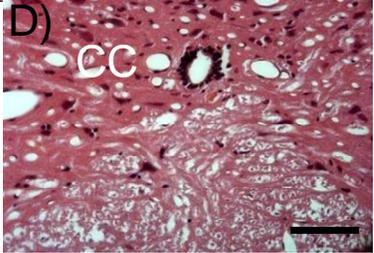
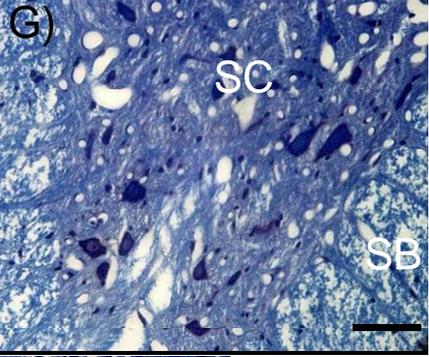
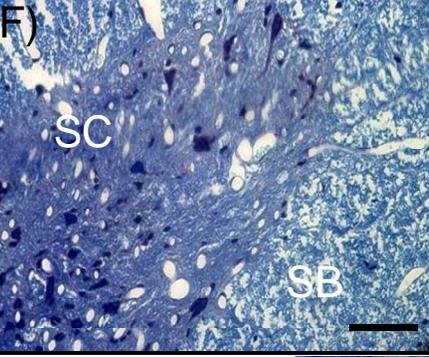
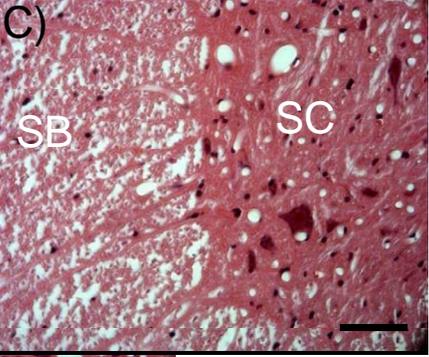
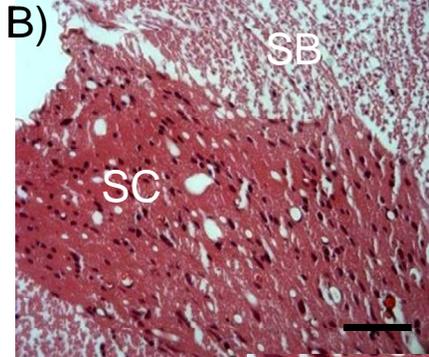
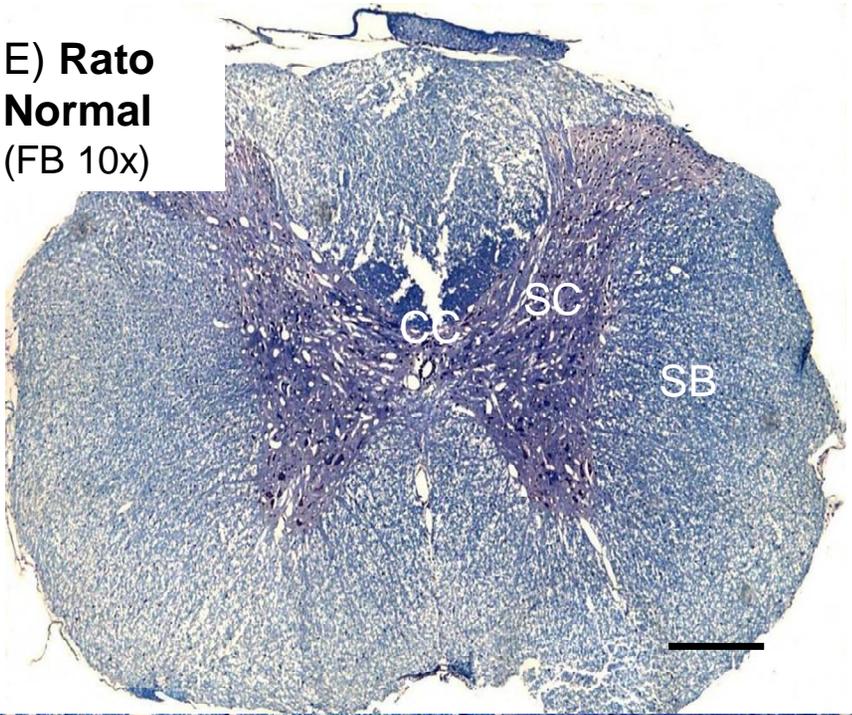
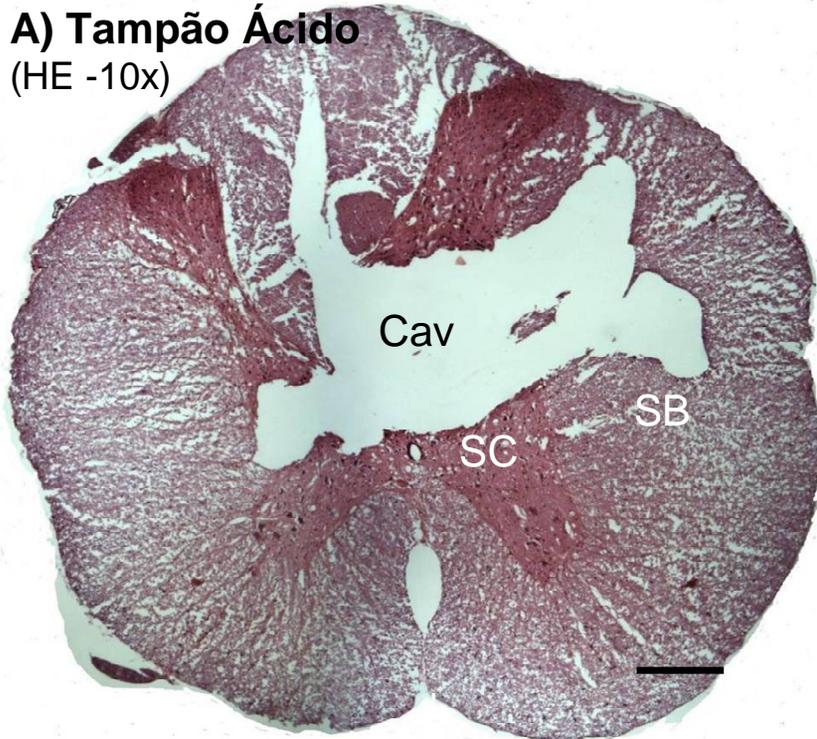
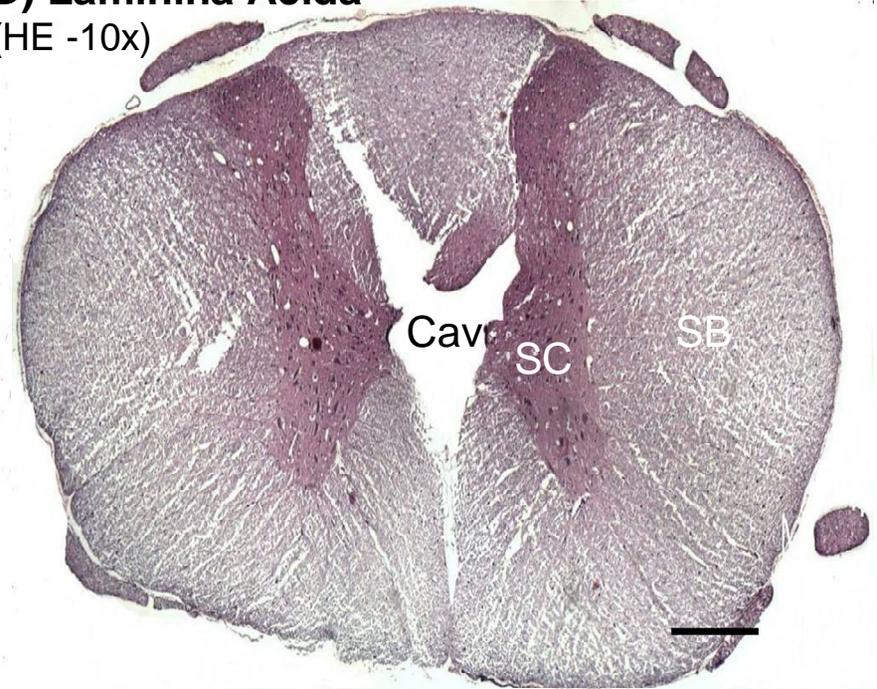


Figura 21: Análise Histológica da medula espinhal do rato normal. O tecido foi processado em blocos de parafina, os quais foram cortados transversalmente em fatias de 4 μm de espessura. As colorações utilizadas foram Hematoxilina e Eosina (HE) (A-D) e Luxol Fast Blue (FB) (E-H). Coloração HE: A) Medula espinhal (aumento de 10 x); B) Região do corno dorsal (aumento de 40 x); C) Região do corno ventral (aumento de 40x); D) Região do canal central (aumento de 40x). Coloração FB: E) Medula espinhal (aumento de 10 x); F) Região do corno dorsal (aumento de 40 x); G) Região do corno ventral (aumento de 40x); H) Região do canal central (aumento de 40x). Barra de Calibração: 200 μm (aumento de 10x) e 50 μm (aumento de 40x). SB (substância branca); SC (Substância cinzenta); CC (canal central).

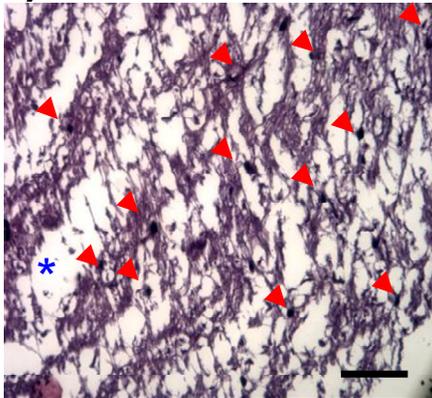
A) Tampão Ácido
(HE -10x)



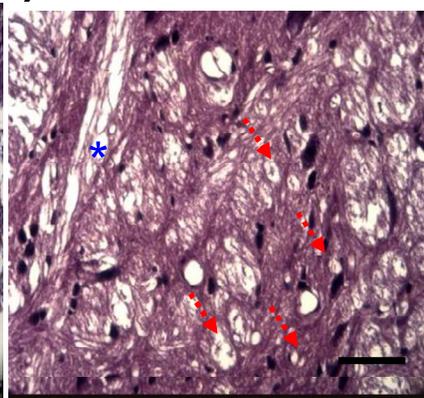
D) Laminina Ácida
(HE -10x)



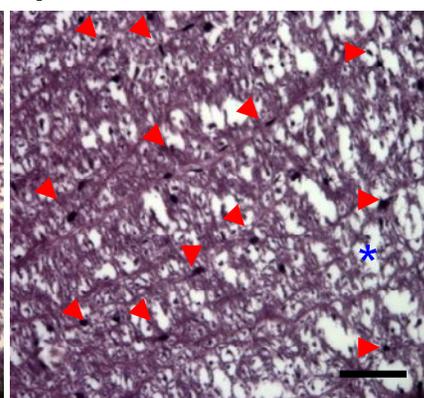
B) SB



C) SC



E) SB



F) SC

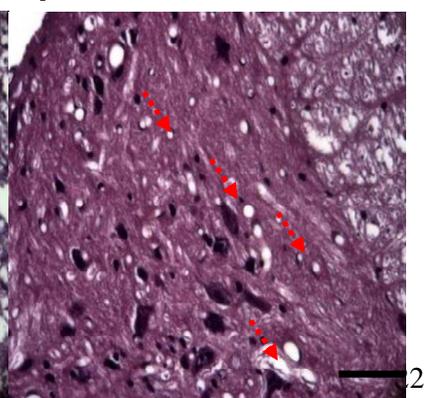
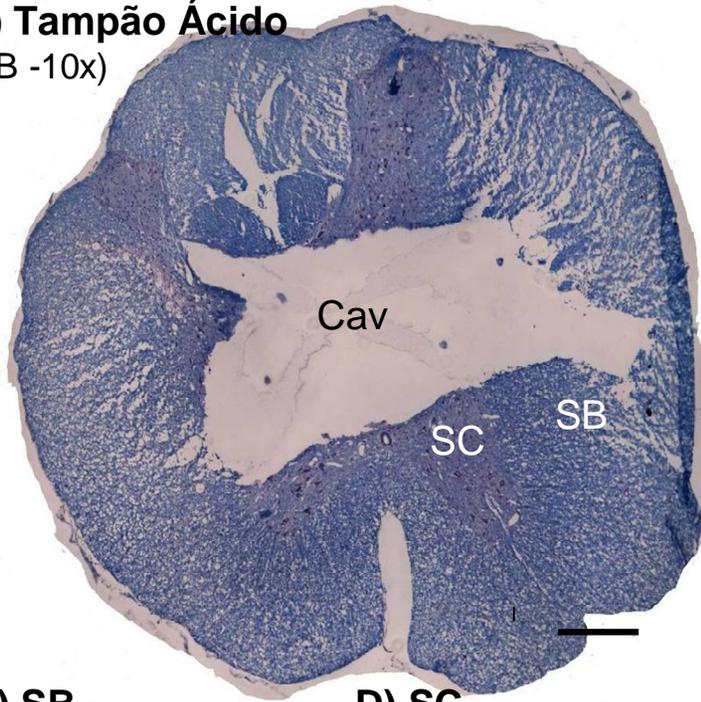
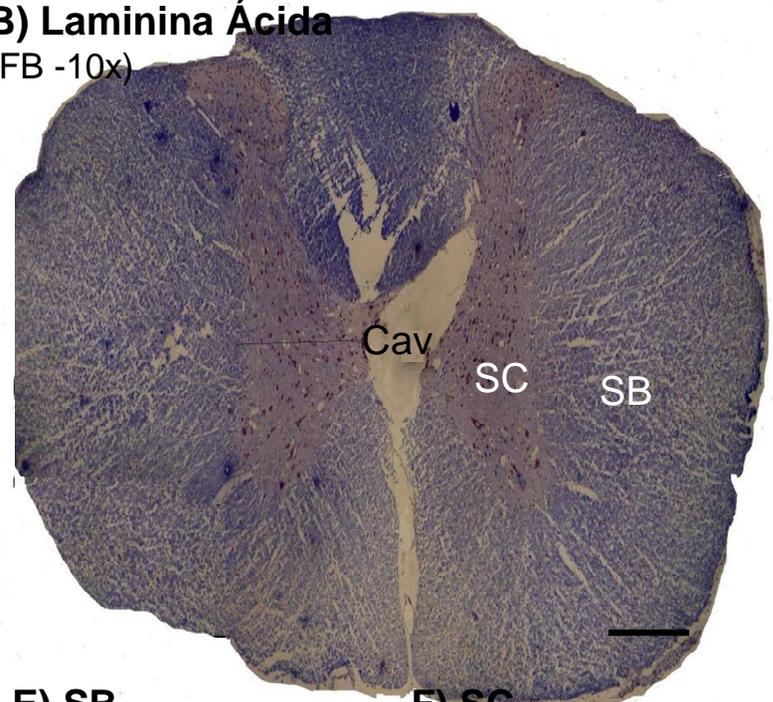


Figura 22: Análise Histológica dos animais submetidos à compressão medular através da coloração HE. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 3 animais de cada. O tecido foi processado em blocos de parafina, os quais foram cortados transversalmente em fatias de 4 µm de espessura. A coloração utilizada foi Hematoxilina e Eosina (HE). Animal Tampão Ácido (A-C): A) Medula Espinhal (aumento 10x); B) Substância Branca (Aumento de 40x); C) Substância Cinzenta (aumento 40x). Animal Laminina Ácida (D-F): D) Medula Espinhal (aumento 10x); E) Substância Branca (Aumento de 40x); F) Substância Cinzenta (aumento 40x). As setas descontínuas (em vermelho) indicam vesículas (em branco) formadas em conseqüência da morte celular. As extremidades das setas (em vermelho) indicam a presença de núcleos na substância branca. Os asteriscos (em azul) demonstram a perda de parênquima tecidual. Barra de calibração: 200 µm (aumento de 10x) e 50 µm (aumento de 40x). SB (substância branca); SC (Substância cinzenta); Cav (cavidade cística).

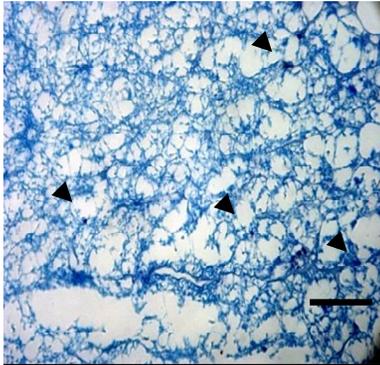
A) Tampão Ácido
(FB -10x)



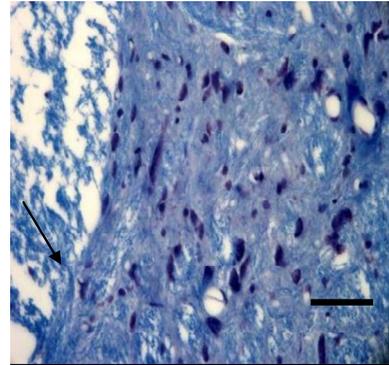
B) Laminina Ácida
(FB -10x)



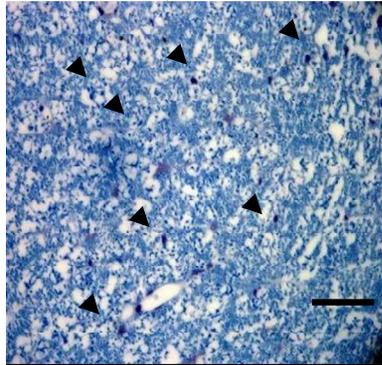
C) SB



D) SC



E) SB



F) SC

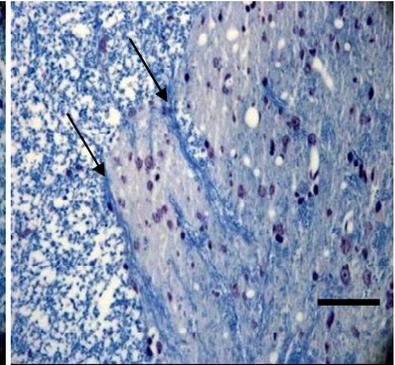


Figura 23: Análise Histológica dos animais submetidos à compressão medular através da coloração FB. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 3 animais de cada. O tecido foi processado em blocos de parafina, os quais foram cortados transversalmente em fatias de 4 µm de espessura. A coloração utilizada foi Luxol Fast Blue (FB). Animal Tampão Ácido (A-C): A) Medula Espinhal (aumento 10x); B) Substância Branca (Aumento de 40x); C) Substância Cinzenta (aumento 40x). Animal Laminina Ácida (D-F): D) Medula Espinhal (aumento 10x); E) Substância Branca (Aumento de 40x); F) Substância Cinzenta (aumento 40x). As setas contínuas (em preto) indicam a presença de feixes de mielina projetados da substância cinzenta para a substância branca. As extremidades das setas (em preto) indicam núcleos de células presentes na substância branca. SB (substância branca); SC (Substância cinzenta); Cav (cavidade cística). Barra de calibração: 200 µm (aumento de 10x) e 50 µm (aumento de 40x).

A) Tampão Ácido

Anti-GFAP
(10x)

Área da Cavidade Cística:
568.259,92 μm^2



B) Laminina Ácida

Área da
Cavidade Cística:
316.972,45 μm^2

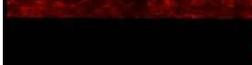
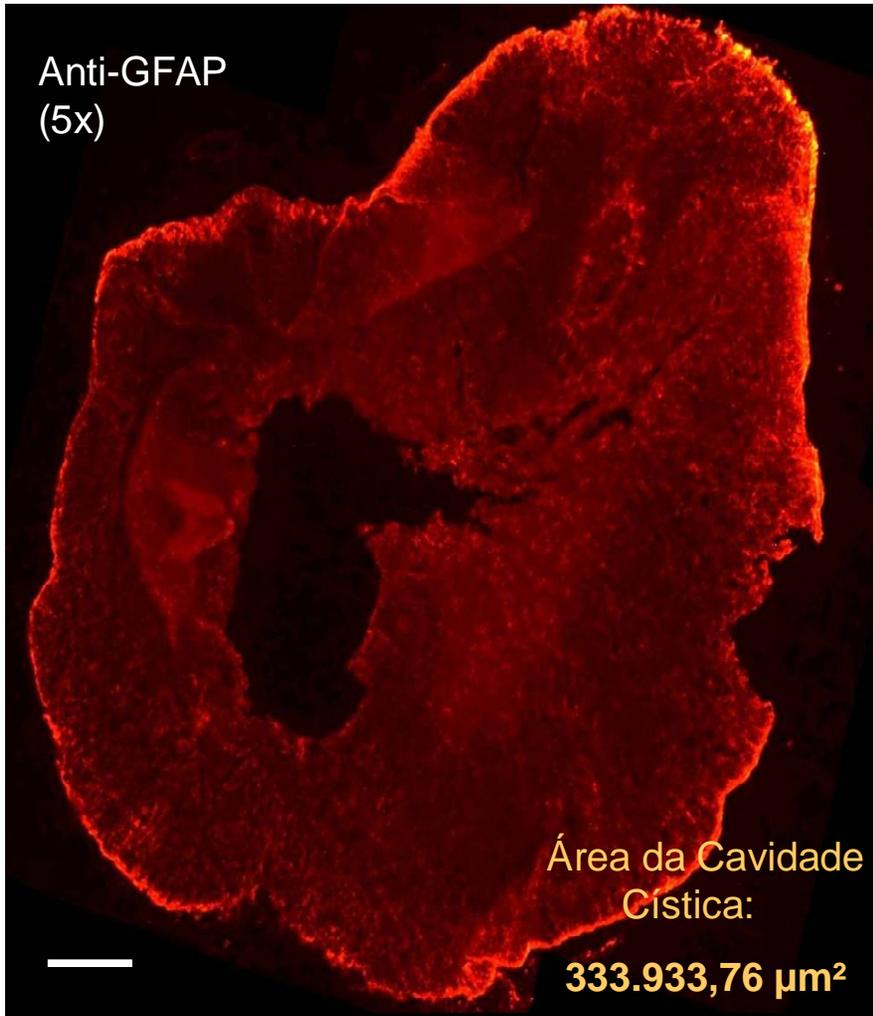


Figura 24: Análise da área da cavidade cística dos animais submetidos à compressão medular através da imunofluorescência com anti-GFAP em cortes longitudinais. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 2 animais de cada, 8 semanas após a lesão. O tecido foi congelado em nitrogênio líquido, cortado longitudinalmente em fatias de 20 μm de espessura. A imunomarcacão com anti-GFAP foi realizada de 3 em 3 lâminas para identificação do epicentro da lesão. A área da cavidade cística foi calculada em diversos cortes, sendo aquela com a maior extensão considerada como epicentro. A) Animal Tampão Ácido (aumento 10x) – área da cavidade cística medida foi de 568.259,92 μm^2 ; B) Animal Laminina Ácida (aumento de 10x) – área da cavidade cística foi de 316.972,45 μm^2 . Barra de calibraçã: 200 μm .

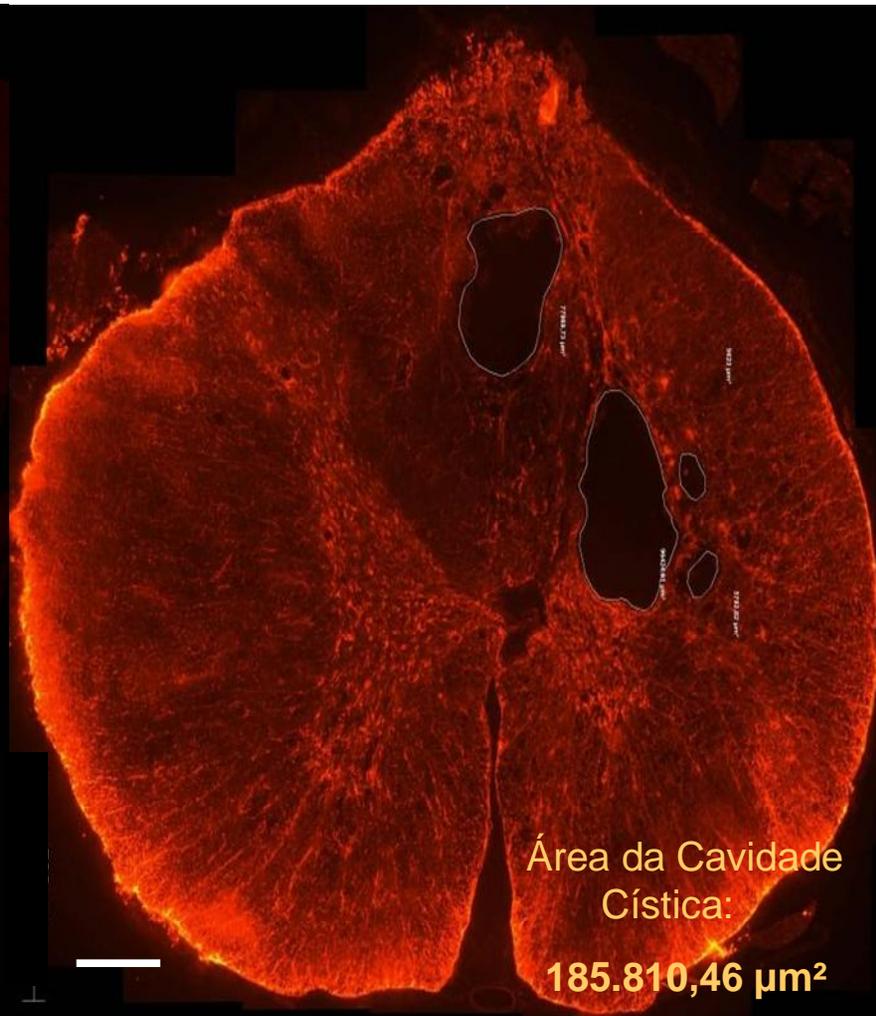
A) Tampão Ácido

Anti-GFAP
(5x)



Média: 286.503,05 μm^2

B) Laminina Ácida

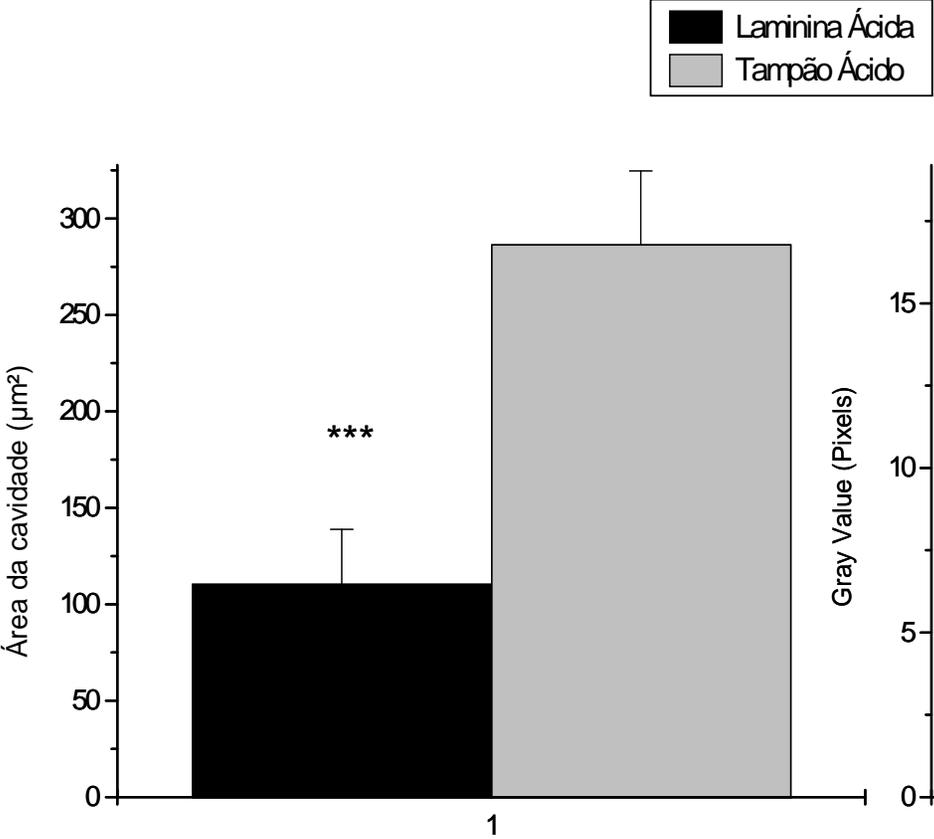


Média: 110.707,24 μm^2

Figura 25: Análise da área da cavidade cística dos animais submetidos à compressão medular através da imunofluorescência com anti-GFAP em corte transversais. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 4 animais de cada, 8 semanas após a lesão. O tecido foi congelado em nitrogênio líquido, cortado transversalmente em fatias de 20 μm de espessura. A imunomarcacão com anti-GFAP foi realizada de 3 em 3 lâminas para identificação do epicentro da lesão. A área da cavidade cística foi calculada em diversos cortes, sendo aquela com a maior extensão considerada como epicentro. A) Animal Tampão Ácido (aumento 5x) – área da cavidade cística medida foi de 333.933,76 μm^2 ; B) Animal Laminina Ácida (aumento de 5x) – área da cavidade cística foi 89.117,09 μm^2 . A média da área da cavidade encontrada nos animais controles e tratados analisados foi de 286.503,05 μm^2 e de 110.707,24 μm^2 . Barra de calibração: 200 μm .

Efeito da Laminina na Cicatriz Glial

A) Área da Cavidade Cística



B) Quantificação de Astrócitos

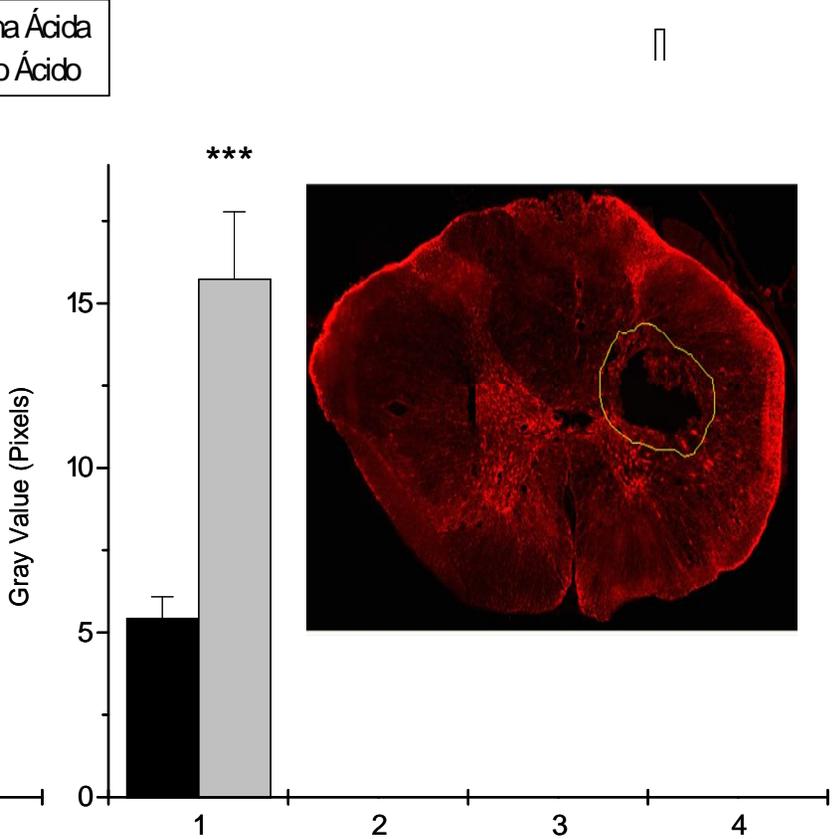


Figura 26: Quantificação da área da cavidade cística e da imunofluorescência com anti-GFAP dos animais submetidos à compressão medular. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida. A área da cavidade cística foi calculada na seqüência progressiva de 3 em 3 lâminas marcadas com anti-GFAP, sendo o corte com maior extensão da lesão considerado como epicentro da lesão. A quantificação dos astrócitos foi realizada através do programa ImageJ, avaliando a intensidade da fluorescência (pixels) das células marcadas na região que circunda a cavidade. A) Gráfico da área da cavidade cística. B) Quantificação da imunomarcacão para astrócitos na região marginal da cavidade cística. Teste estatístico (*Teste T*). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$ e (***) $p \leq 0,001$.

Efeito da Laminina Ácida durante a primeira semana após a Compressão Medular

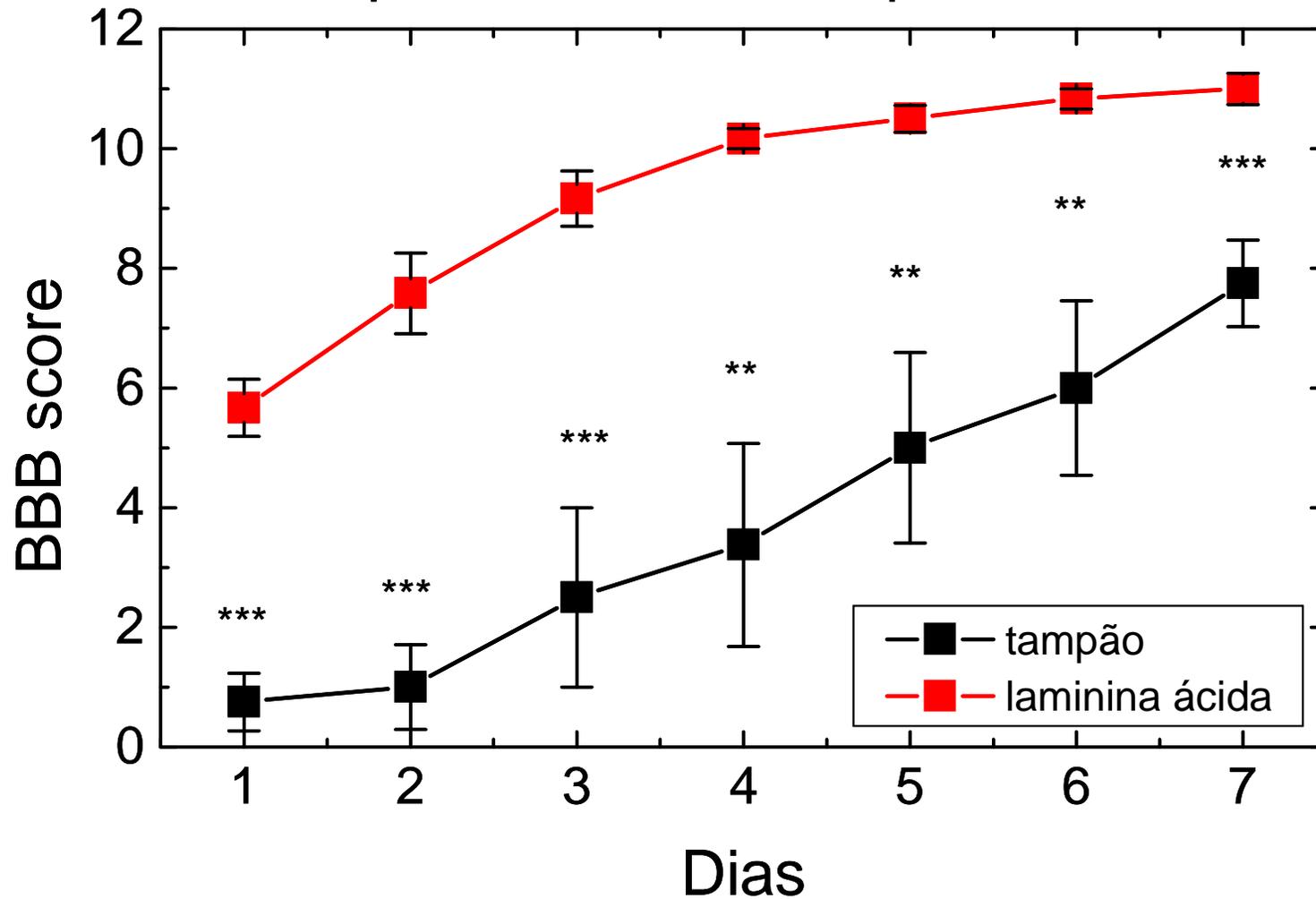


Figura 27: Efeito da laminina ácida na recuperação funcional dos animais submetidos à compressão medular durante o período de 7 dias. Grupos experimentais: Laminina ácida e Tampão ácido, cada qual com 10 animais. O teste BBB foi realizado diariamente, durante 1 semana. O tratamento com laminina (*Invitrogen, Quebec, CA*) foi injetado na medula espinhal a 1 cm do epicentro da lesão, na concentração de 100 µg/ml, volume total de 10µl. Teste estatístico (Kruskal-Wallis / One Way ANOVA). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$ e (***) $p \leq 0,001$.

Efeito da Laminina Ácida na Inflamação durante a primeira semana após a lesão

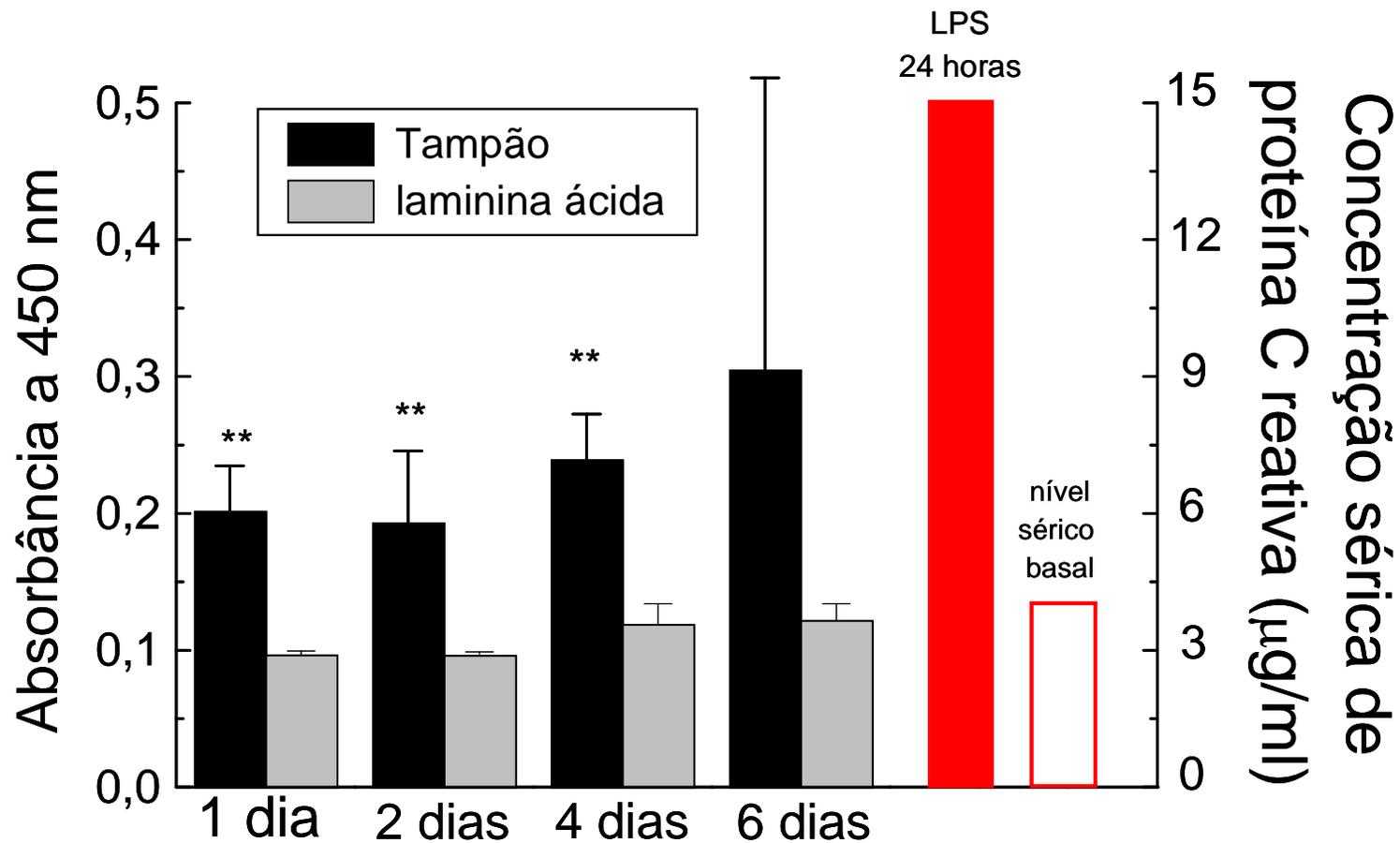
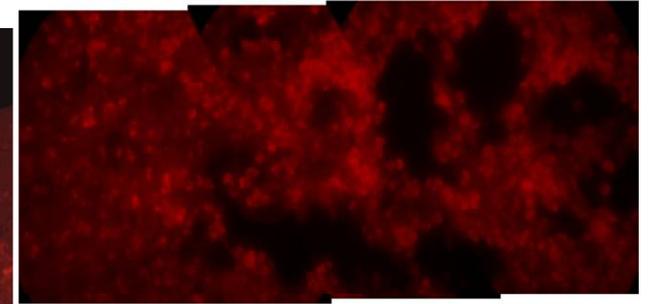
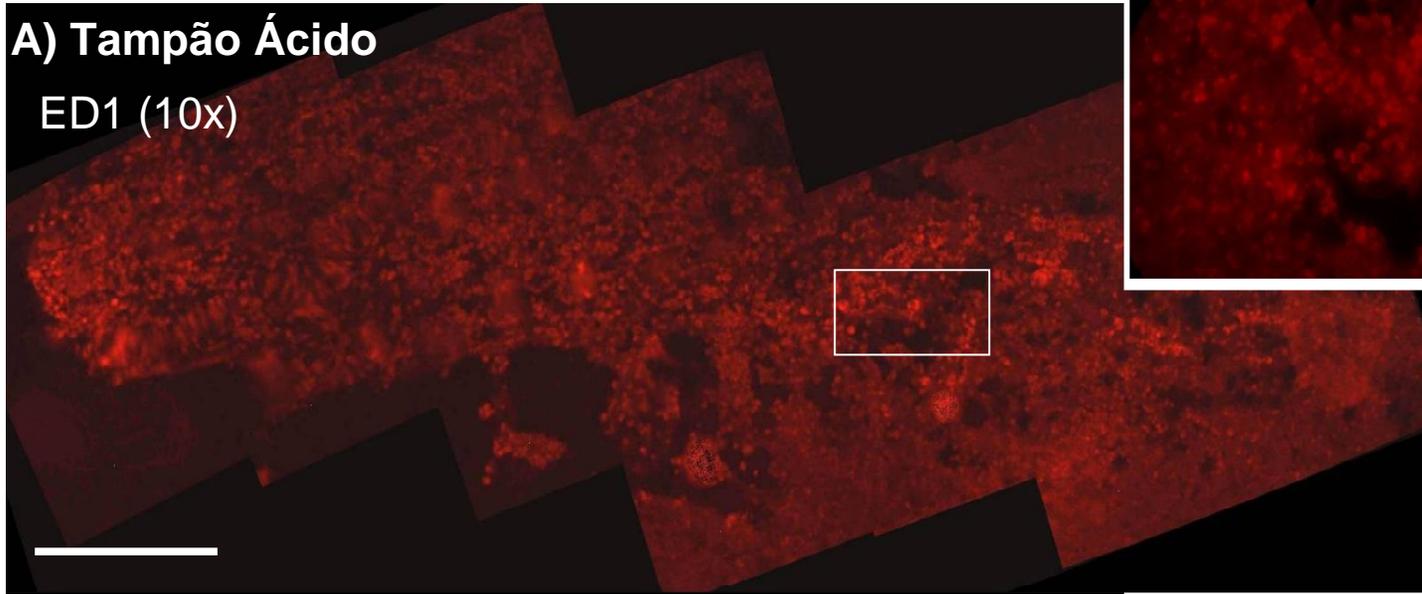


Figura 28: Quantificação de proteína C reativa, através da técnica ELISA, realizada nos animais submetidos à compressão medular. Grupos experimentais: rato normal, rato com inflamação aguda (injeção de LPS), controle tampão neutro, controle tampão ácido, laminina neutra, laminina ácida. Cada ponto experimental avaliou 3 ratos. As coletas de sangue para quantificação da proteína C reativa foram realizadas no primeiro, segundo, quarto e sexto dias após a compressão medular e injeção do tratamento. O gráfico demonstra o nível sérico da proteína C reativa nos respectivos grupos experimentais (laminina ácida e tampão ácido) ao longo da primeira semana. Teste estatístico (*One Way ANOVA*). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$ e (***) $p \leq 0,001$.

A) Tampão Ácido

ED1 (10x)



B) Laminina Ácida

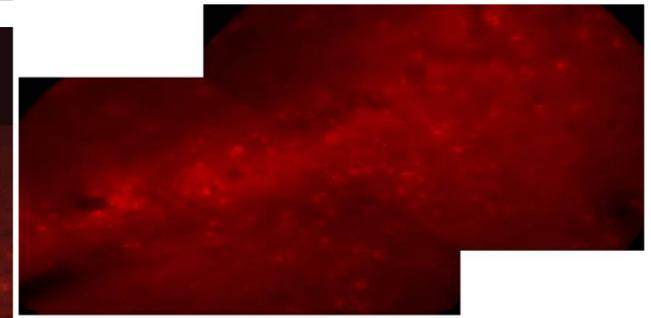
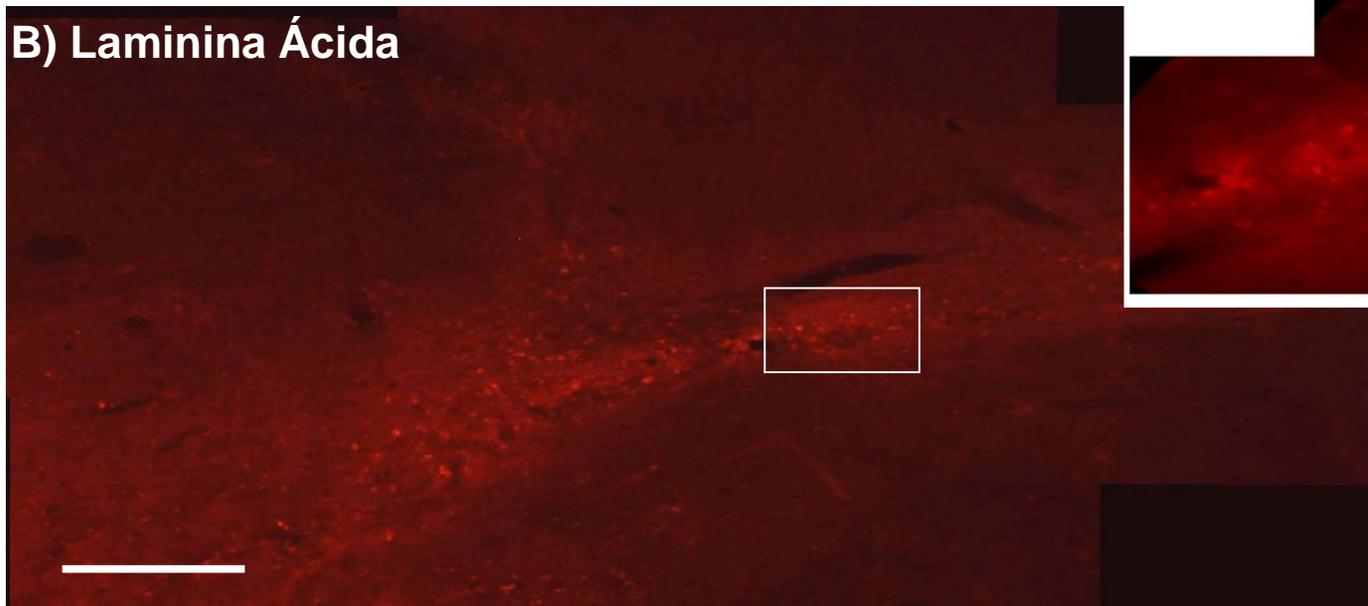
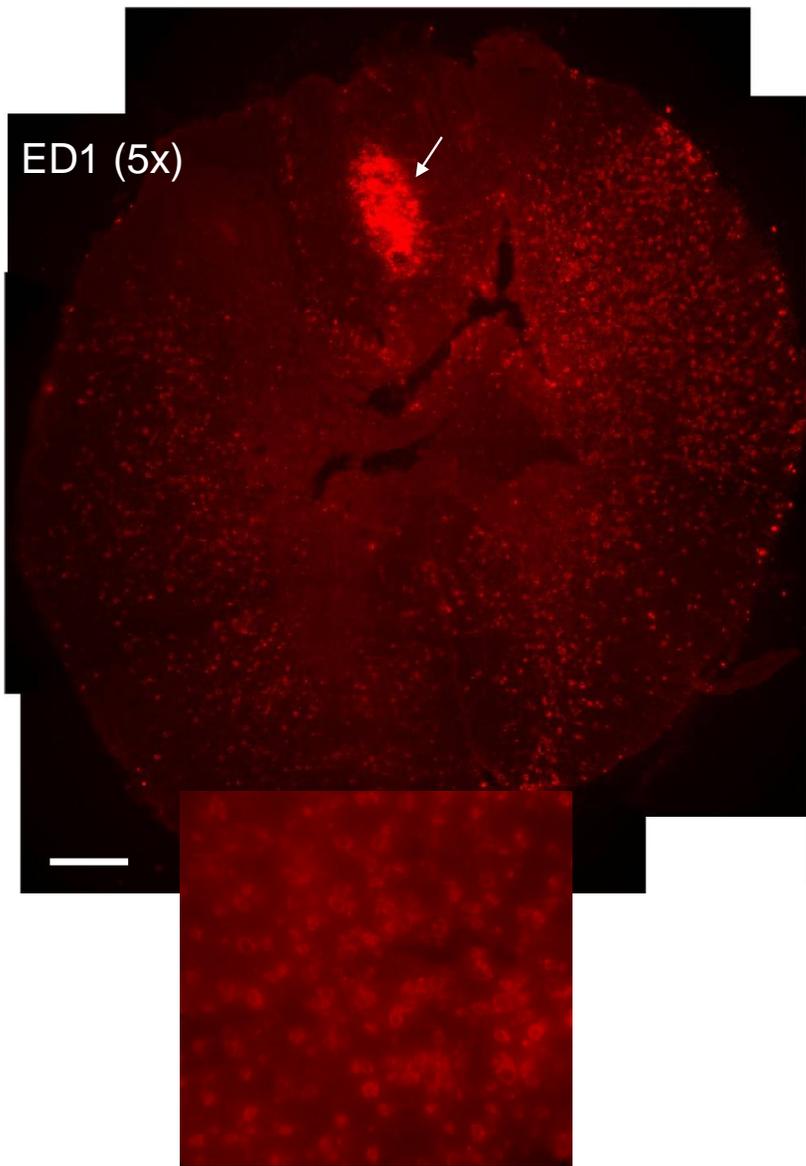


Figura 29: Análise da inflamação nos animais submetidos à compressão medular, através da imunofluorescência com ED1 em cortes longitudinais. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 4 animais de cada, 1 semana após a lesão. O tecido foi congelado em nitrogênio líquido, cortado longitudinalmente em fatias de 20 µm de espessura. O corte demonstrado está a 100-150 µm do epicentro da lesão. A imunomarcção a com ED1 permitiu a visualização de macrófagos e microglias situados próximo à cavidade cística. A) Animal Tampão Ácido (aumento 10x). B) Animal Laminina Ácida (aumento de 10x). As setas indicam macrófagos/microglias marcados positivamente ao longo do tecido e próximo à cavidade cística (Cav). Barra de calibração: 200 µm.

A) Tampão Ácido



B) Laminina Ácida

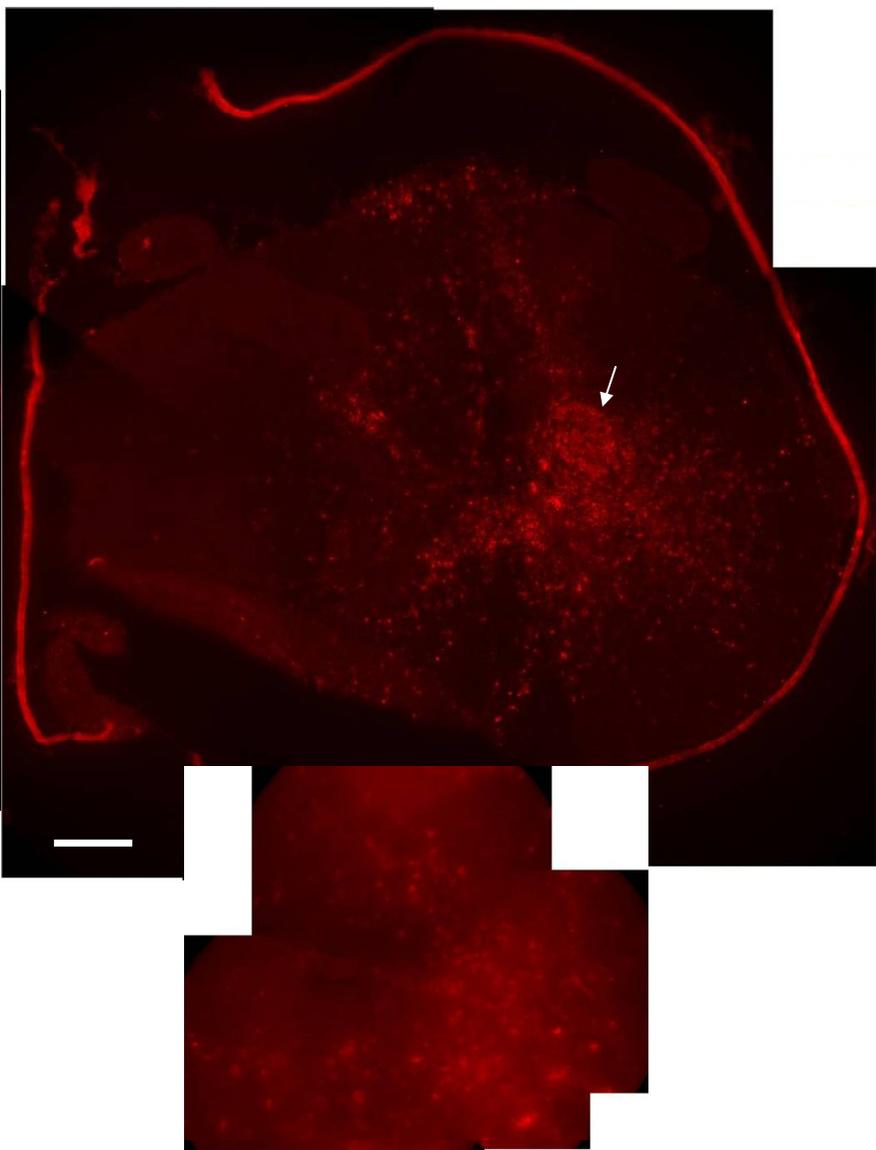


Figura 30: Análise da inflamação nos animais submetidos à compressão medular, através da imunofluorescência com ED1 em cortes transversais. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 4 animais de cada, 1 semana após a lesão. O tecido foi congelado em nitrogênio líquido, cortado transversalmente em fatias de 20 μm de espessura. O corte demonstrado está a 100-150 μm do epicentro da lesão. A imunomarcção com ED1 permitiu a visualização de macrófagos e microglias situados próximo à cavidade cística. A) Animal Tampão Ácido (aumento 5x). B) Animal Laminina Ácida (aumento de 5x). As setas indicam o infiltrado inflamatório, onde estão presentes os macrófagos e microglias marcados positivamente próximos à cavidade cística (Cav). Barra de calibração: 200 μm .

Efeito da Laminina Ácida na Inflamação

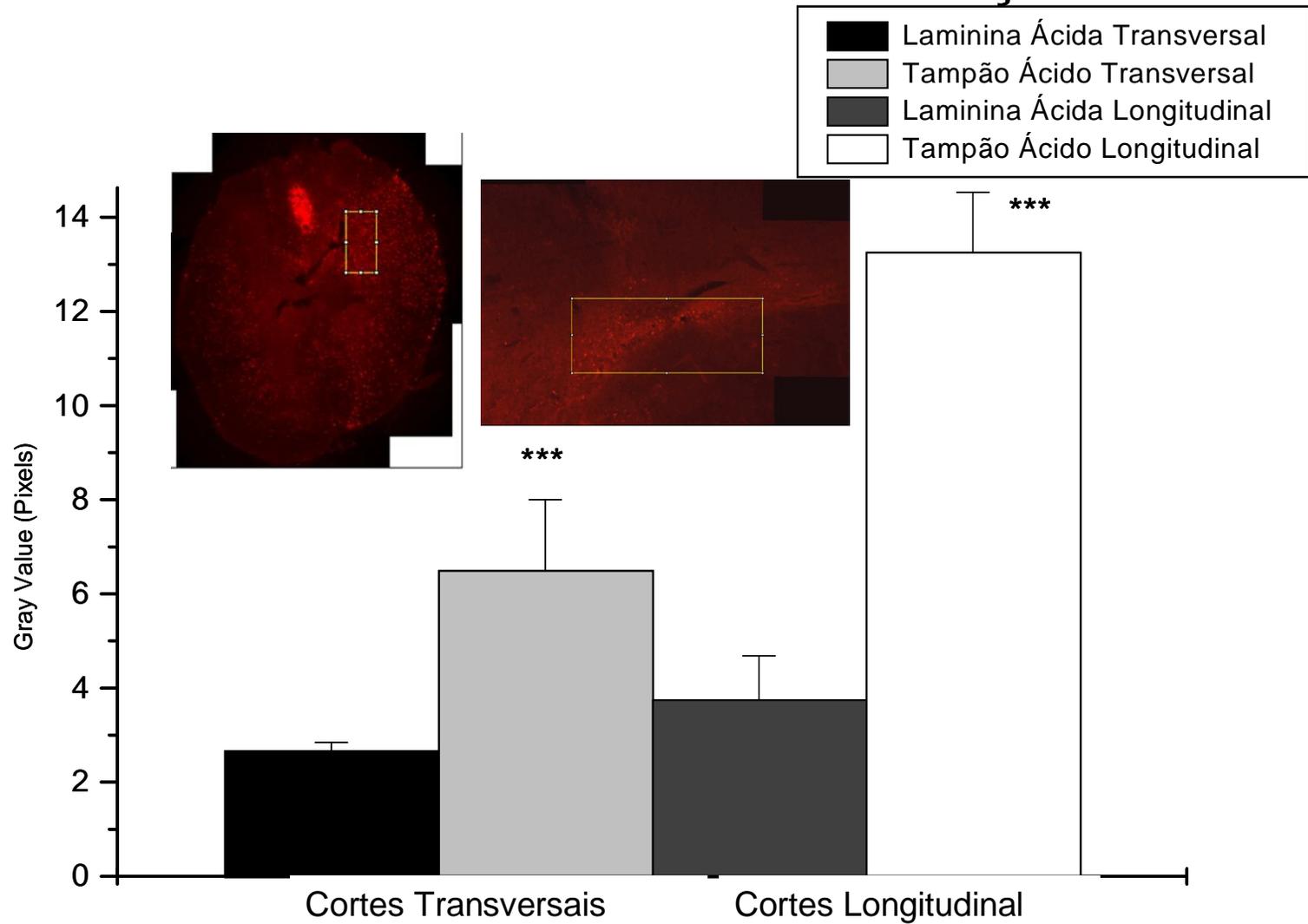


Figura 31: Quantificação da imunofluorescência com ED1 dos animais submetidos à compressão medular. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida. O tecido analisado para quantificação representada em ambos os gráficos foi extraído de 8 animais de cada grupo, e cortados nos sentidos transversal (4) e longitudinal (4). A quantificação dos macrófagos e microglias foi realizada através do programa ImageJ, avaliando a intensidade da fluorescência (pixels) das células marcadas na região que circunda a cavidade. Teste estatístico (*Teste T*). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$ e (***) $p \leq 0,001$.

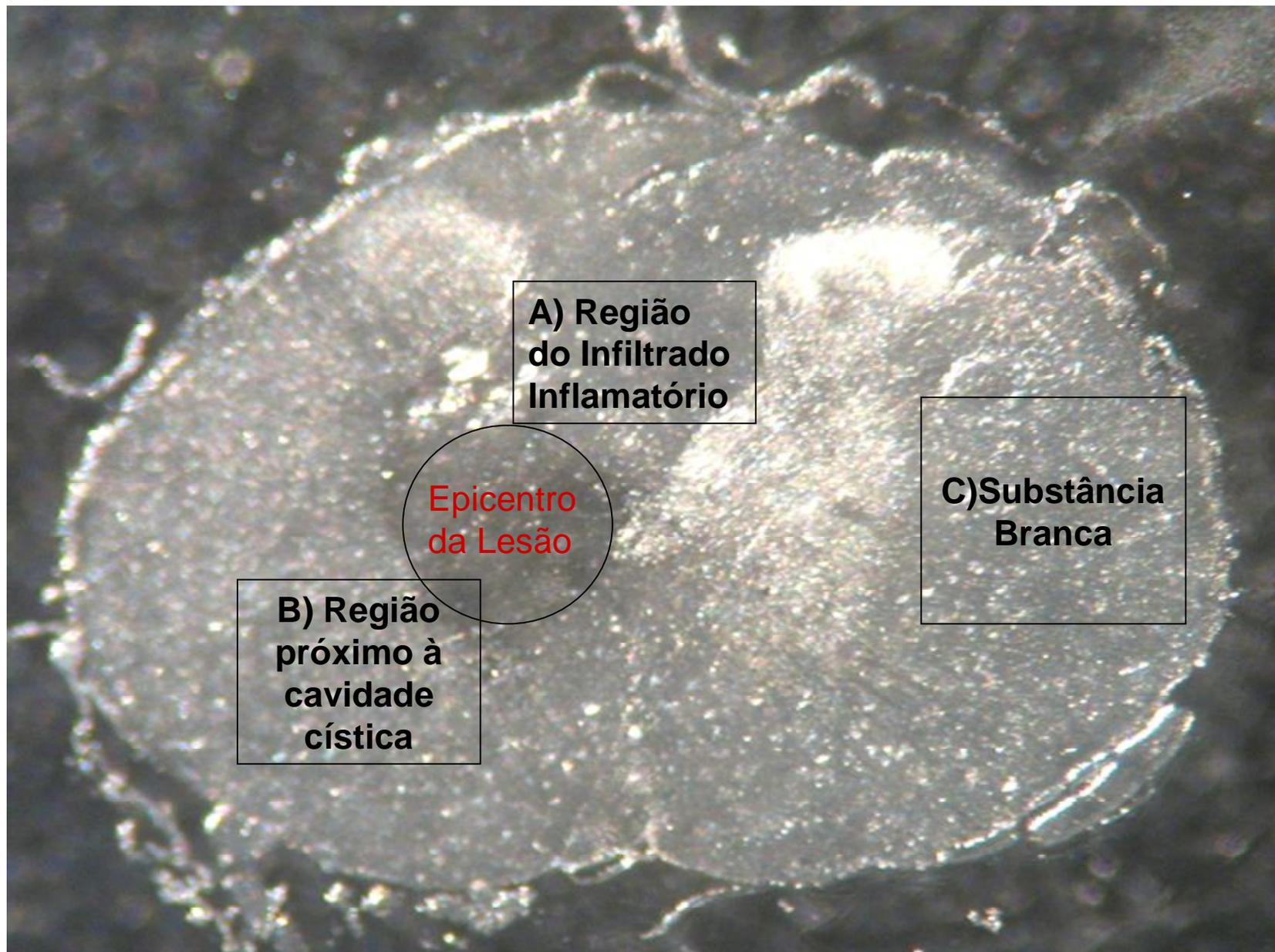


Figura 32: Locais selecionados para análise dos ensaios de imunoperoxidase dos animais submetidos à compressão medular. Foto macroscópica de um corte congelado (20 µm de espessura), 8 semanas após a compressão medular, realizada com máquina fotográfica digital, sobre um fundo preto e iluminação com fibra óptica. Os locais específicos para análise das imunomarcações foram: A) região do infiltrado inflamatória; B) a região próxima à cavidade cística; C) a substância branca.

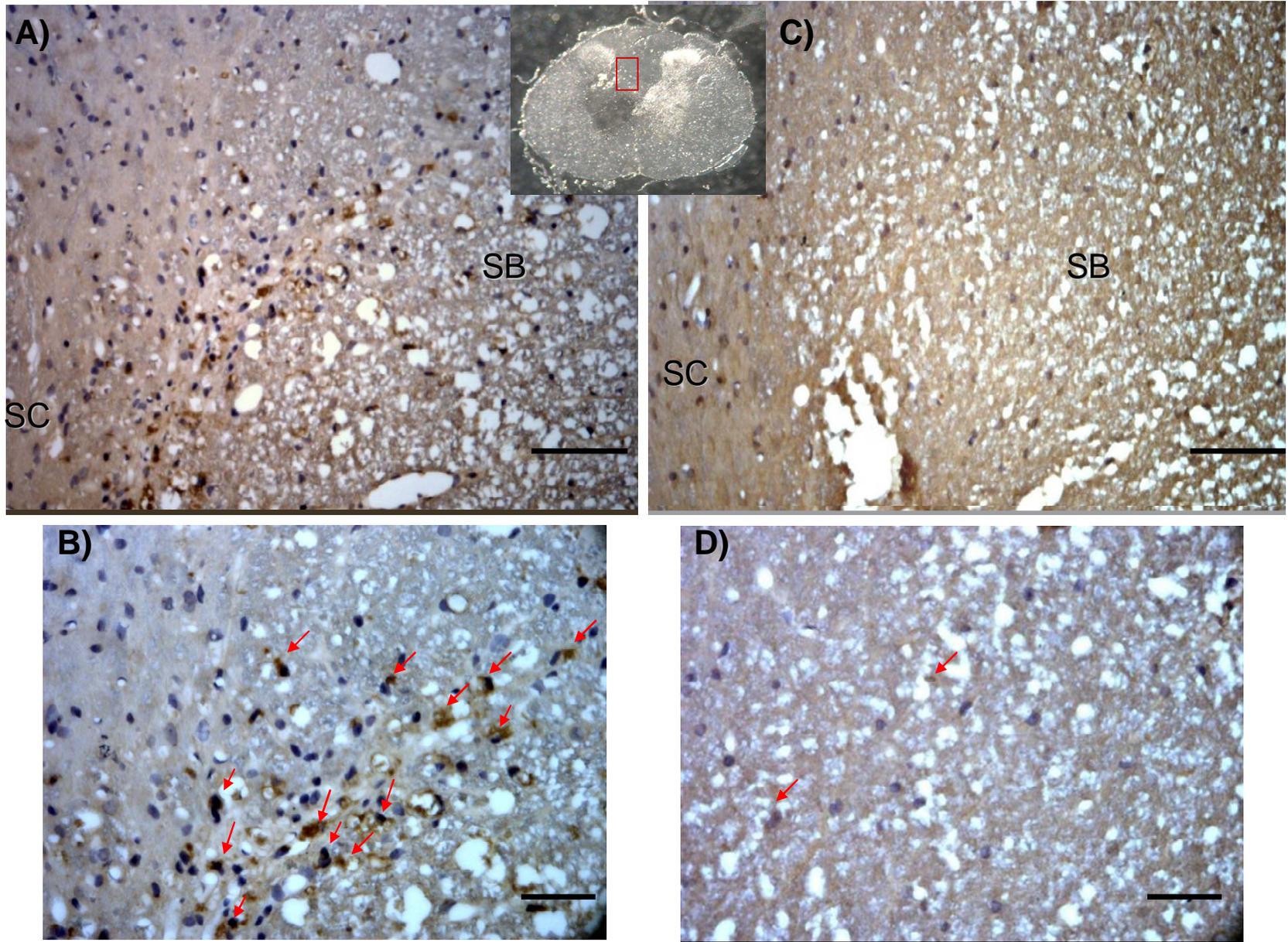


Figura 33: Análise da inflamação nos animais submetidos à compressão medular, na região do infiltrado inflamatório, através da imunoperoxidase com ED1. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 3 animais de cada, 8 semana após a lesão. O tecido foi processado em blocos de parafina, os quais foram cortados transversalmente em fatias de 4 μm de espessura. A imunomarcação com ED1 permitiu a visualização de macrófagos e microglias situados próximo à cavidade cística, na região dorsal. Animal Tampão Ácido: A) Região do infiltrado com aumento de 10x, B) Região do infiltrado com aumento de 40x. Animal Laminina Ácida: C) Região do infiltrado com aumento de 10x, D) Região do infiltrado com aumento de 40x. As setas indicam as células positivamente marcadas para ED1 na região do infiltrado inflamatório dentro da substância branca (SB). Barra de calibração: 100 μm (aumento de 20x) e 50 μm (aumento de 40x).

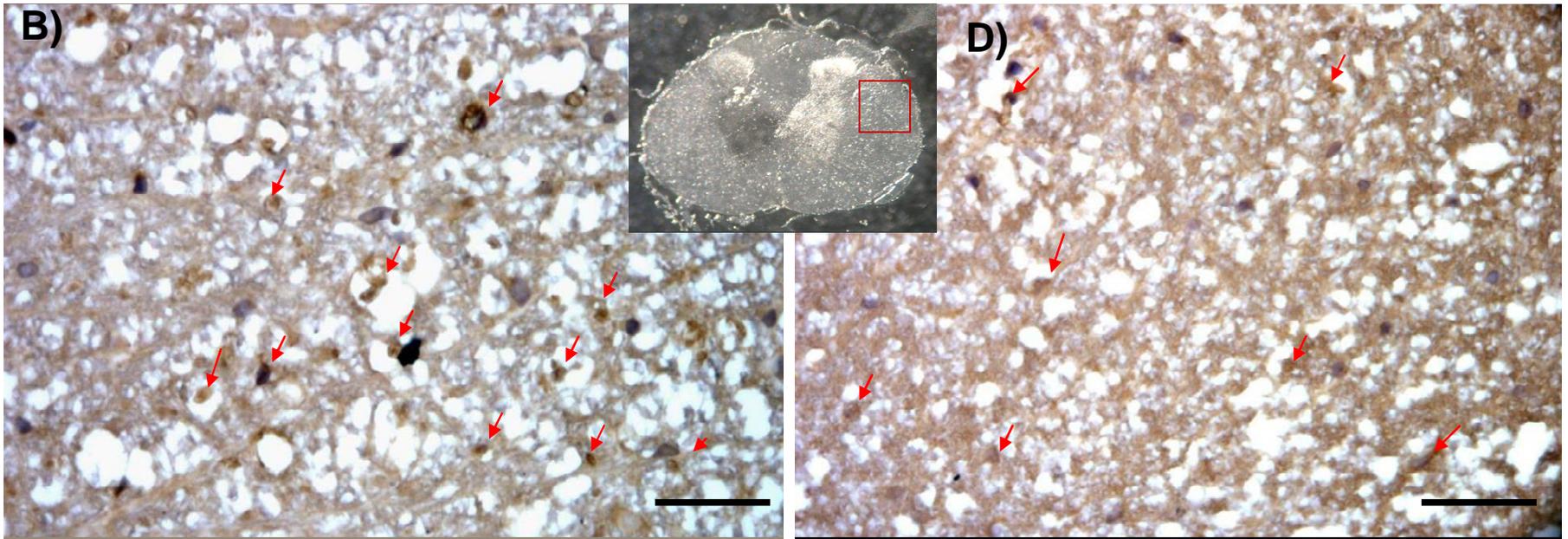
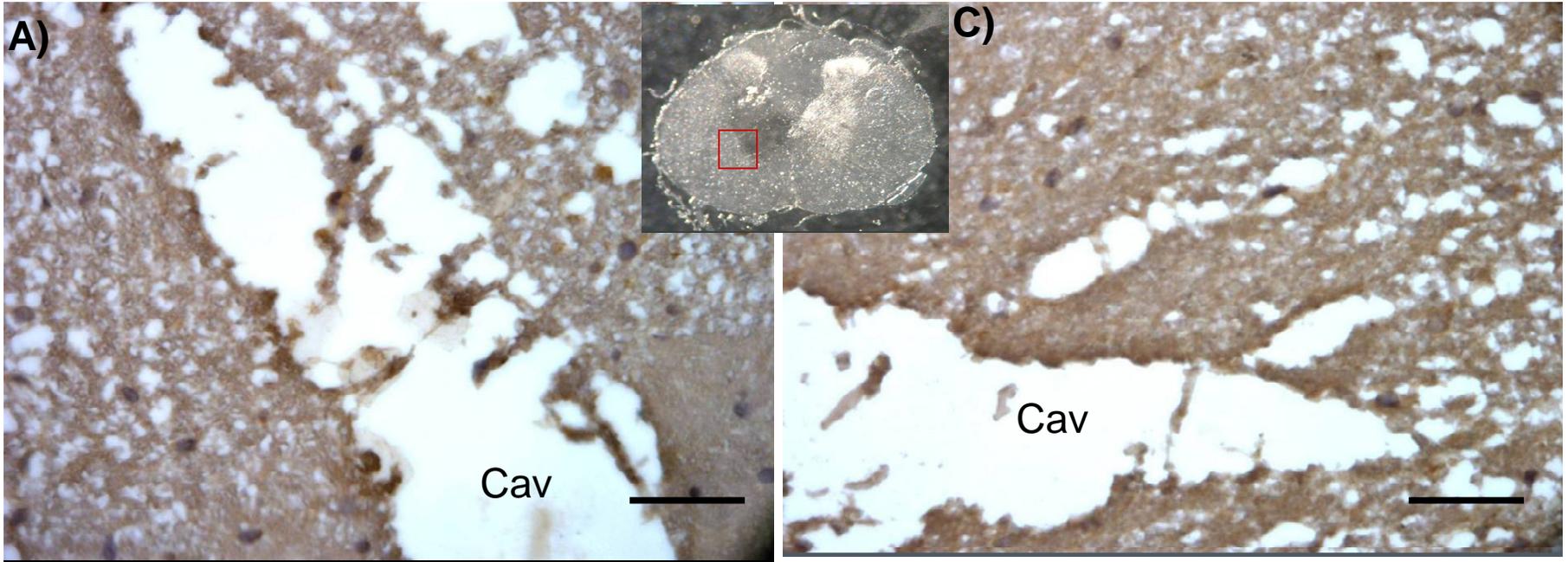
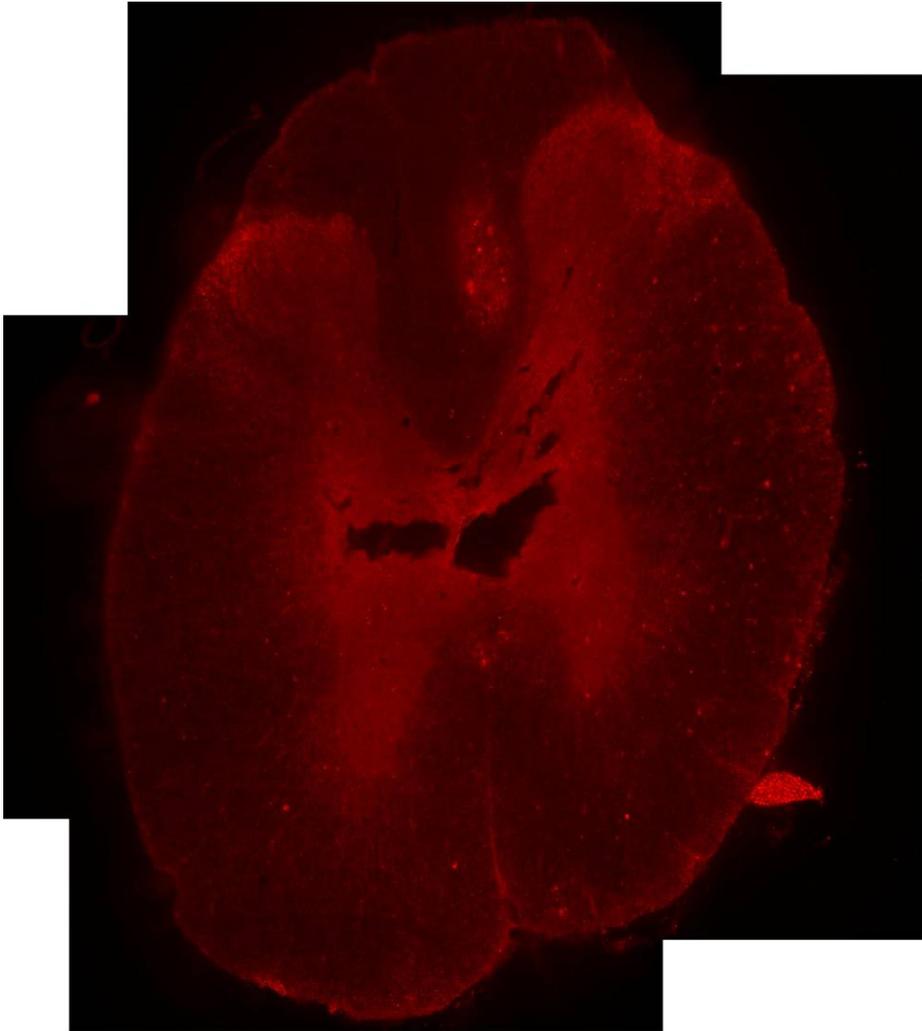


Figura 34: Análise da inflamação dos animais submetidos à compressão medular, nas regiões próximas a cavidade cística e na substância branca, através da imunoperoxidase com ED1. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 3 animais de cada, 8 semana após a lesão. O tecido foi processado em blocos de parafina, os quais foram cortados transversalmente em fatias de 4 µm de espessura. A imunomarcação com ED1 permitiu a visualização de macrófagos e microglias situados próximo à cavidade cística, na região próxima à cavidade cística (A e C) e a substância branca (B e D). Animal Tampão Ácido: A) Região próxima a cavidade cística com aumento de 40x, B) Região da substância branca com aumento de 40x. Animal Laminina Ácida: C) Região próxima a cavidade cística com aumento de 40x, D) Região da substância branca com aumento de 40x. As setas (em vermelho) indicam células positivamente marcadas por ED1 próximo à cavidade cística (Cav). Barra de calibração: 50 µm (aumento de 40x).

A) Tampão Ácido



B) Laminina Ácida

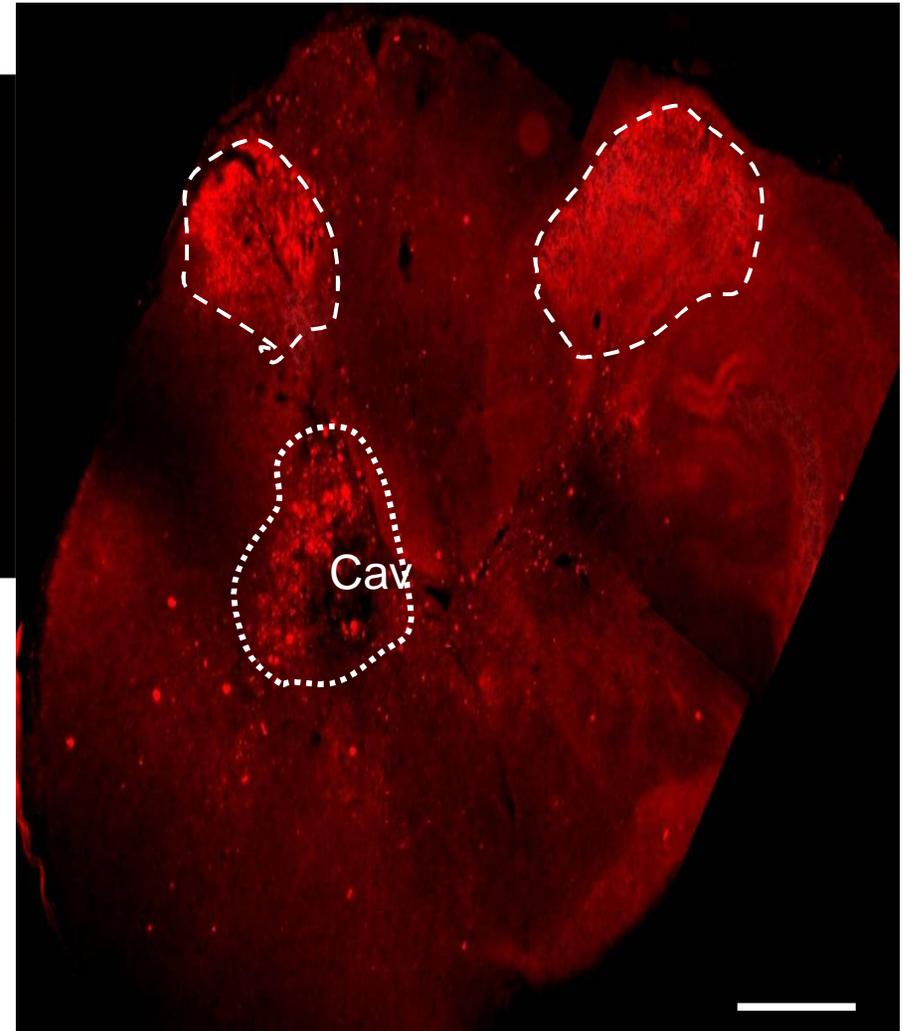


Figura 35: Análise da regeneração axonal dos animais submetidos à compressão medular através da imunofluorescência com anti-GAP 43. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 4 animais de cada, 8 semanas após a lesão. O tecido foi congelado em nitrogênio líquido, cortado longitudinalmente em fatias de 20 µm de espessura. A imunomarcação com anti-GAP 43 permitiu a visualização de neurônios em crescimento, situados próximo à cavidade cística, na substância branca e principalmente na cinzenta. As imagens demonstradas nesta figura correspondem a cortes situados a 100-150 µm de distância do epicentro da lesão. A) Animal Tampão Ácido (aumento 5x); B) Animal Laminina Ácida (aumento de 5x). A área tracejada por hífen indica a presença de neurônios marcados com anti-GAP 43 na região do corno dorsal, enquanto aquela tracejada por pontos indica células positivamente marcadas nas proximidades da cavidade cística (Cav). Barra de calibração: 200 µm.

Efeito da Laminina na Regeneração Axonal

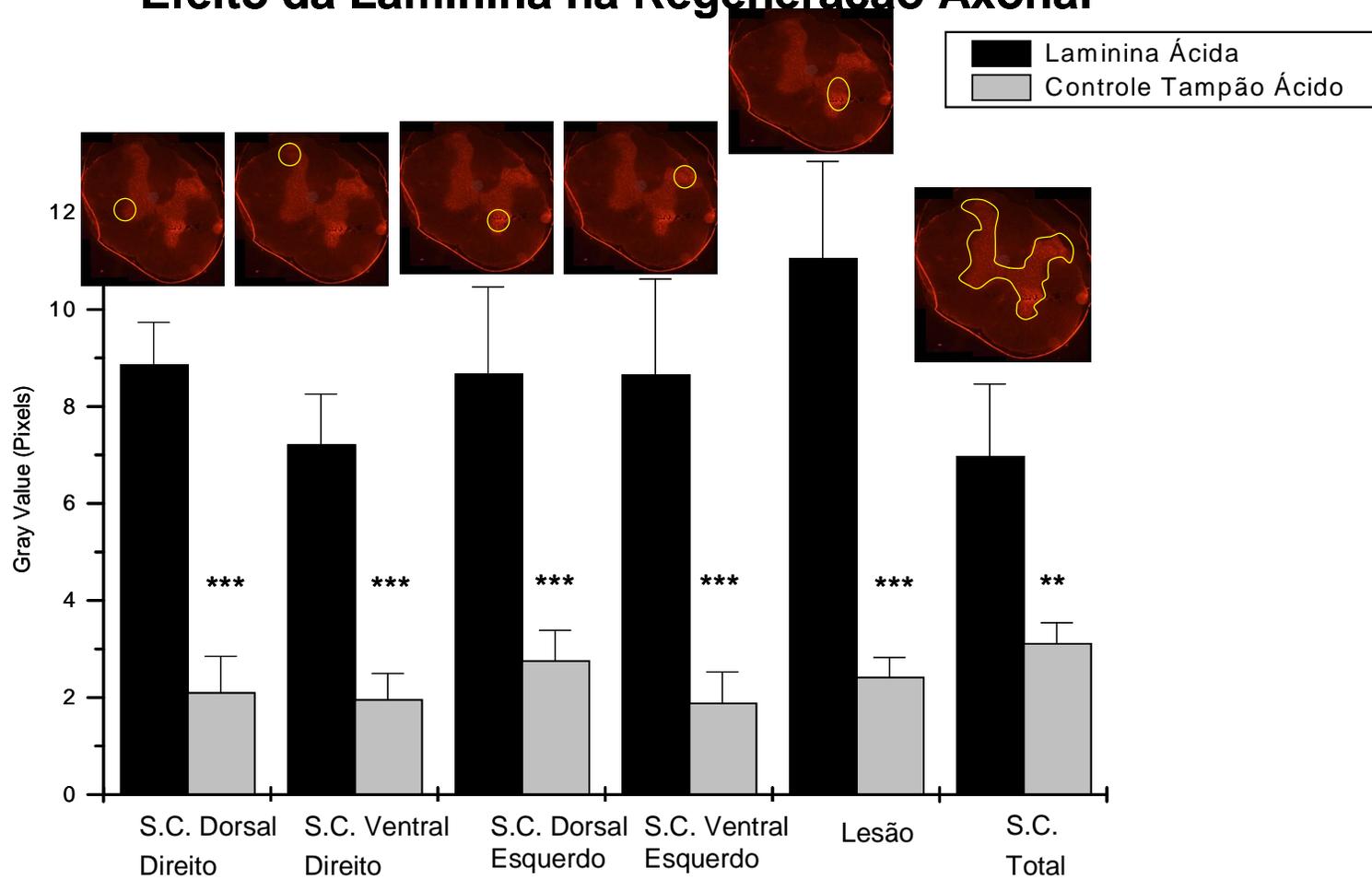
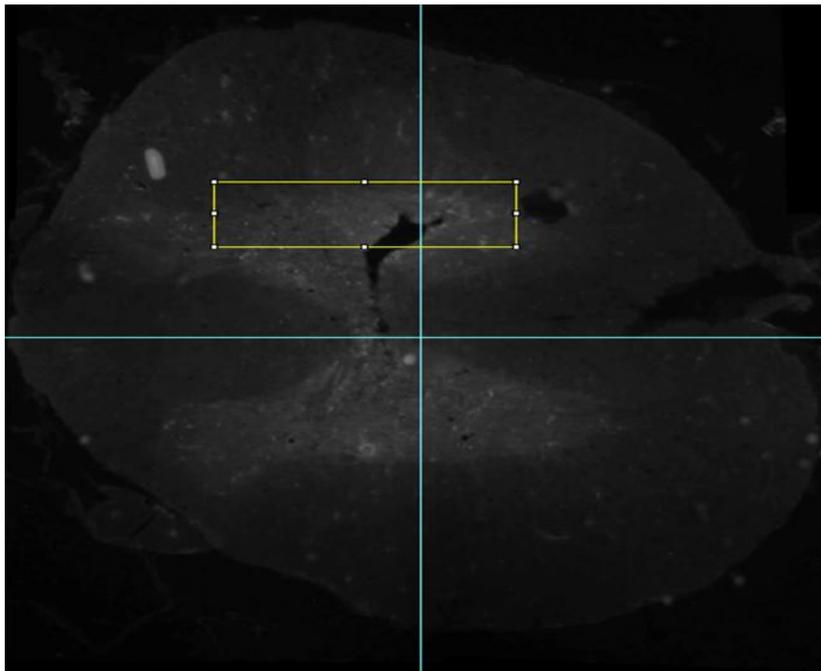
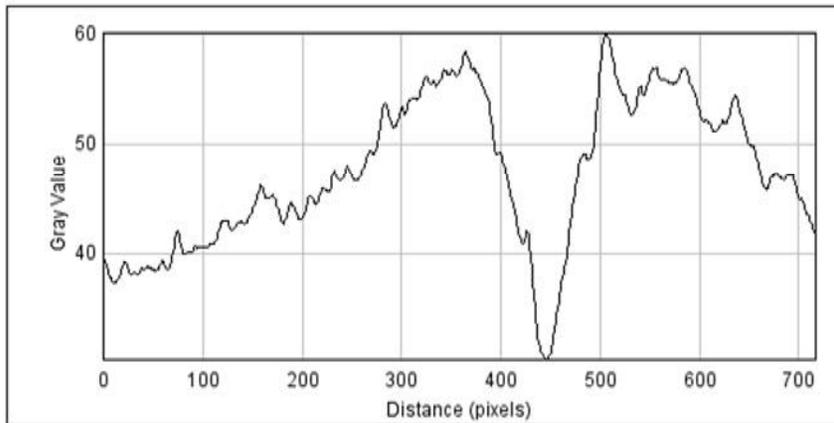


Figura 36: Quantificação da imunofluorescência com anti-GAP 43 dos animais submetidos à compressão medular. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 4 animais de cada grupo. O tecido foi congelado em nitrogênio líquido, cortado transversalmente em fatias de 20 µm de espessura. A quantificação dos neurônios em processo de regeneração foi realizada através do programa ImageJ, avaliando a intensidade da fluorescência (pixels) das células marcadas em diferentes locais da substância cinzenta, tanto na região dorsal e ventral, quanto próxima a cavidade cística. Teste estatístico (*Teste T*). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$ e (***) $p \leq 0,001$.

Tampão Ácido



Laminina Ácida

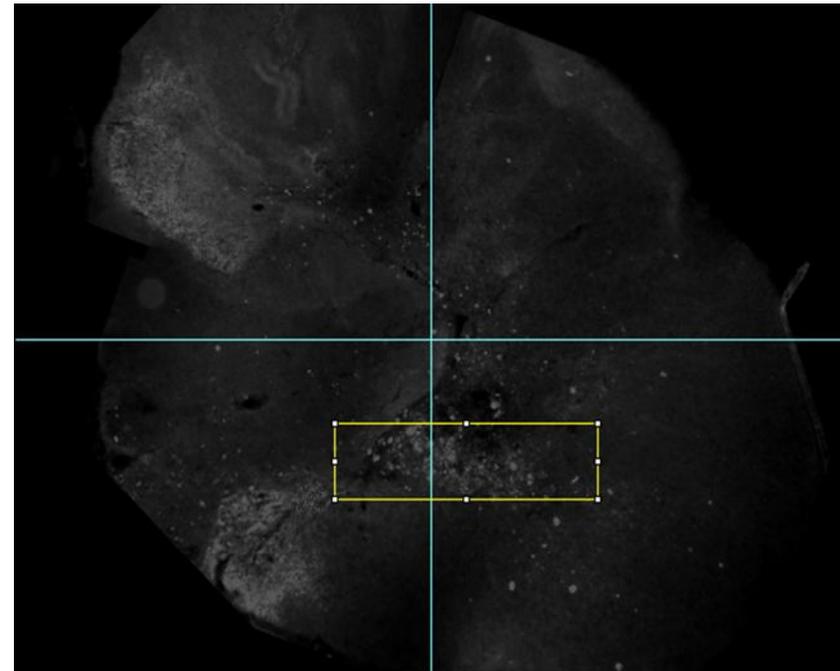
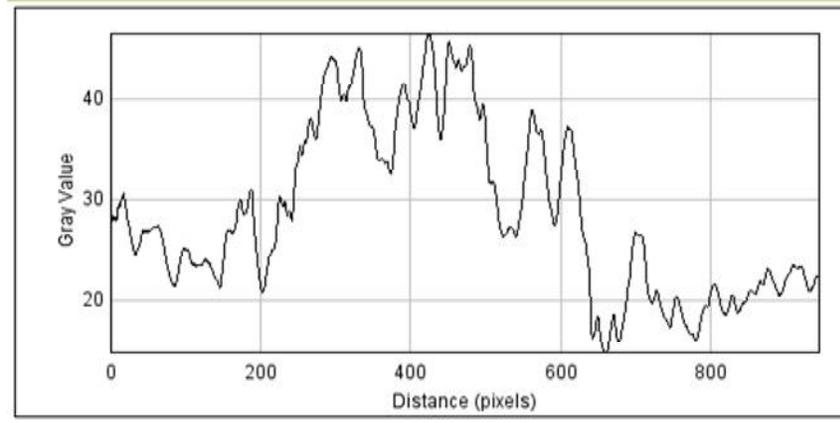


Figura 37: Histograma da imunofluorescência com anti-GAP 43 na região próxima a cavidade cística dos animais submetidos à compressão medular. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 4 animais de cada grupo. O tecido foi congelado em nitrogênio líquido, cortado transversalmente em fatias de 20 µm de espessura. A quantificação dos neurônios em processo de regeneração foi realizada através do programa ImageJ, avaliando a intensidade da fluorescência (pixels) das células marcadas localizadas na substância cinzenta, nas proximidades da cavidade cística.

Efeito da Laminina Ácida na Transecção Medular Parcial

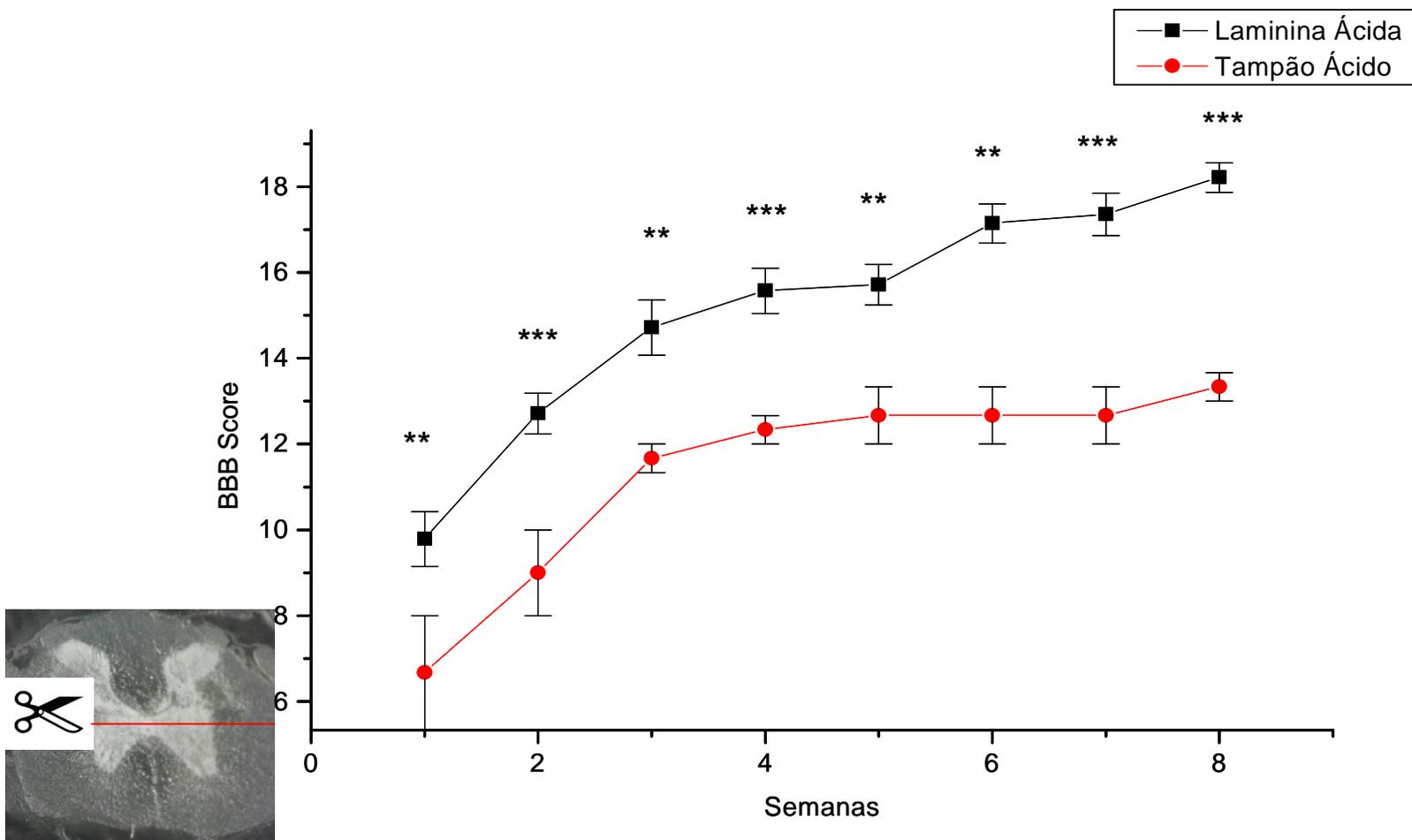


Figura 38: Efeito da laminina ácida na recuperação funcional dos animais submetidos à transecção medular parcial. Grupos experimentais: Laminina ácida de camundongo e Tampão ácido, cada qual com 10 animais. O teste BBB foi realizado semanalmente, durante 8 semanas. O tratamento com laminina (*Invitrogen, Quebec, CA*) foi injetado na medula espinhal nos dois cotos distal e proximal (não separados totalmente), na concentração de 100 µg/ml, volume total de 10µl. O teste BBB foi realizado semanalmente. Teste estatístico (Kruskal-Wallis / One Way ANOVA). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$ e (***) $p \leq 0,001$.

Efeito da Laminina Ácida na Transecção Medular Completa

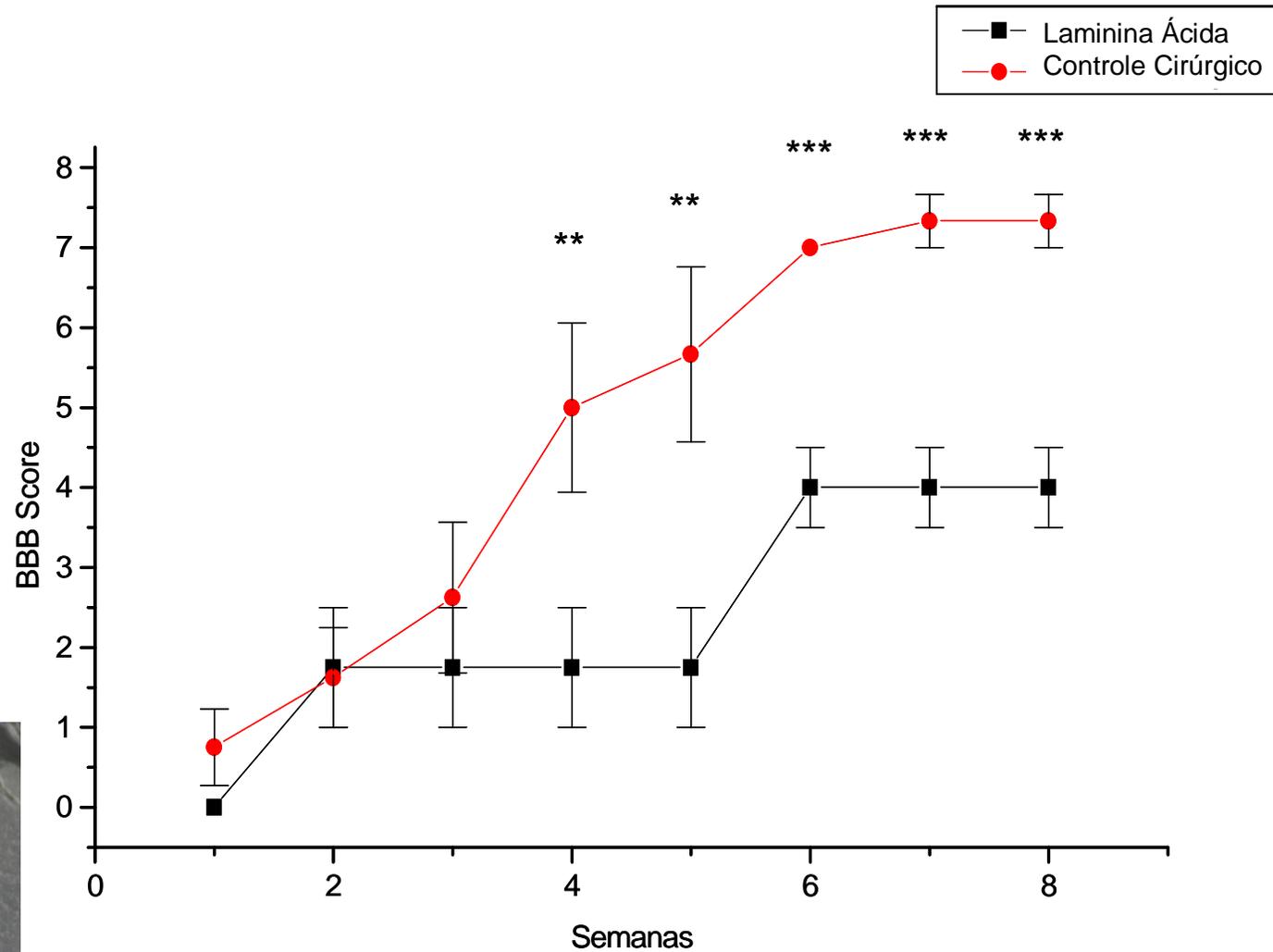


Figura 39: Efeito da laminina ácida na recuperação funcional dos animais submetidos à transecção medular completa. Grupos experimentais: laminina ácida, tampão ácido e controle cirúrgico, cada qual com 7 animais. O teste BBB foi realizado semanalmente, durante 8 semanas. O tratamento com laminina (*Invitrogen, Quebec, CA*) foi injetado na medula espinhal nos dois cotos distal e proximal (separados totalmente), na concentração de 100 µg/ml, volume total de 10µl. O gráfico não apresenta o grupo experimental do tampão ácido porque o mesmo apresentou o mesmo perfil do controle cirúrgico. Teste estatístico (Kruskal-Wallis/ One Way ANOVA). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$ e (***) $p \leq 0,001$.

Comparação entre os efeitos da Laminina Ácida de Camundongo, Laminina Ácida Humana e as Células Mesenquimais na Transecção Medular Completa

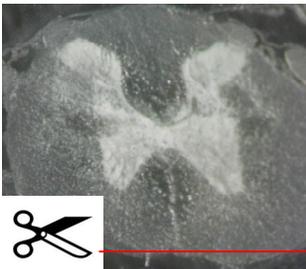
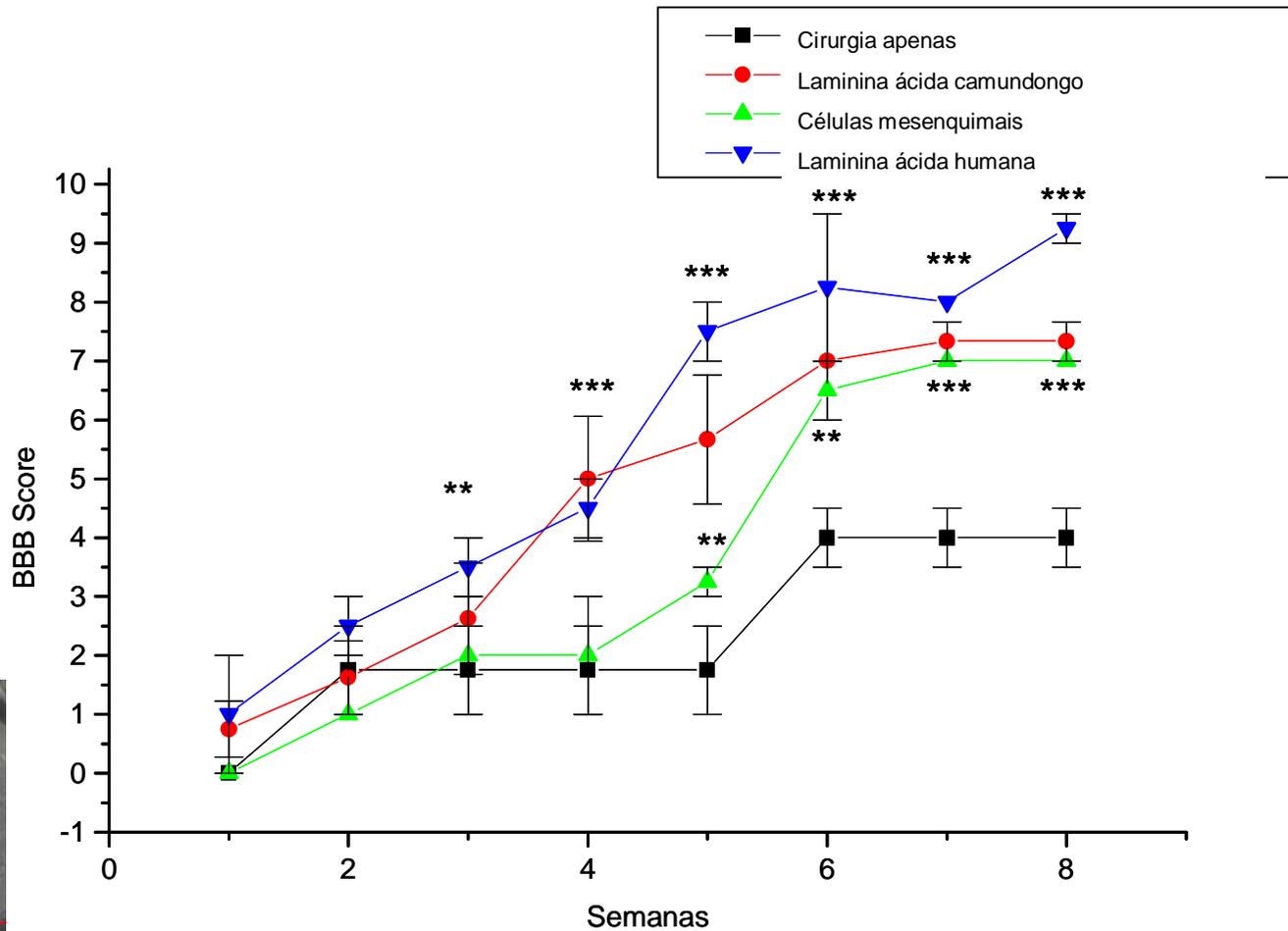
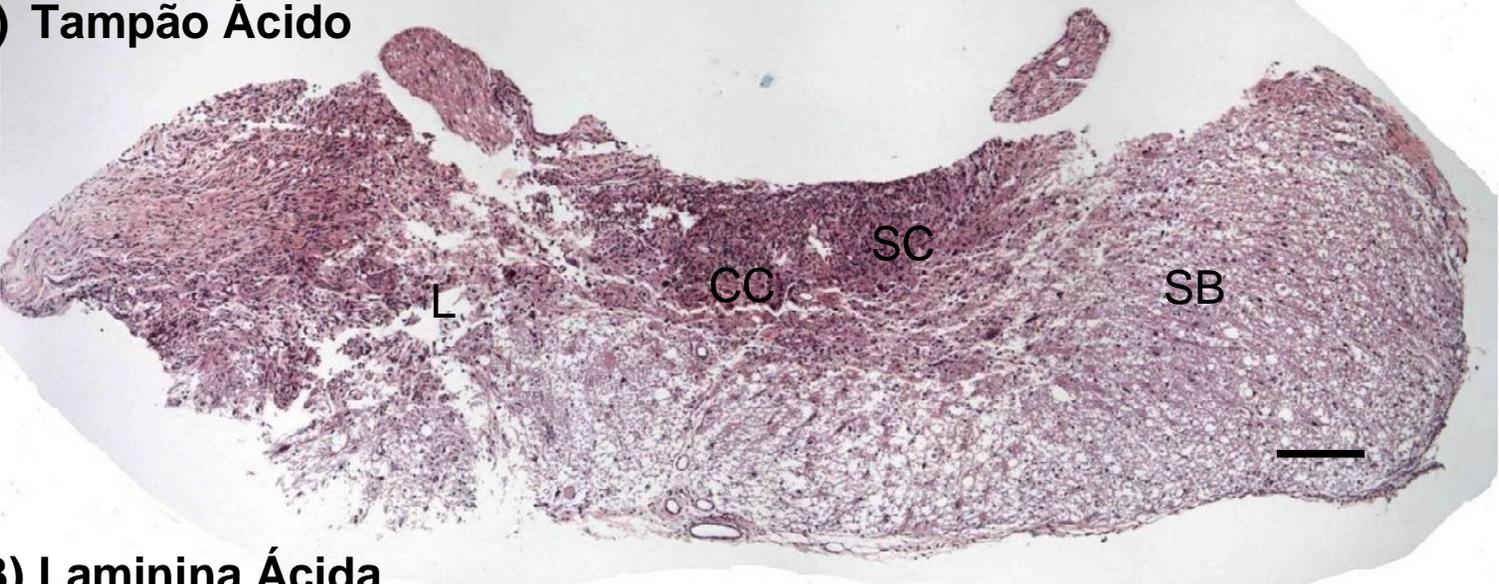


Figura 40: Comparação entre os efeitos da laminina ácida de camundongo, laminina ácida humana e células mesenquimais na recuperação funcional dos animais submetidos à transecção medular completa. Grupos Experimentais: Laminina ácida de camundongo (7 animais), laminina ácida humana (5 animais), células mesenquimais de tecido adiposo (5 animais) e controle cirúrgico (7 animais). O teste BBB foi realizado semanalmente, durante 8 semanas. Os tratamentos com laminina-111 de camundongo (*Invitrogen, Quebec, CA*) e laminina -211 humana (cedida pelo *Dr. Peter Yurchenco*) foram injetados na medula espinhal nos dois cotos distal e proximal (separados totalmente), na concentração de 100 µg/ml, volume total de 10µl. As células mesenquimais derivadas de tecido adiposo humana foi injetada no mesmo local, diluída em DMEM, na concentração de 5×10^5 , com o mesmo volume final. Teste estatístico (Kruskal-Wallis/ One Way ANOVA). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$ e (***) $p \leq 0,001$.

A) Tampão Ácido



B) Laminina Ácida

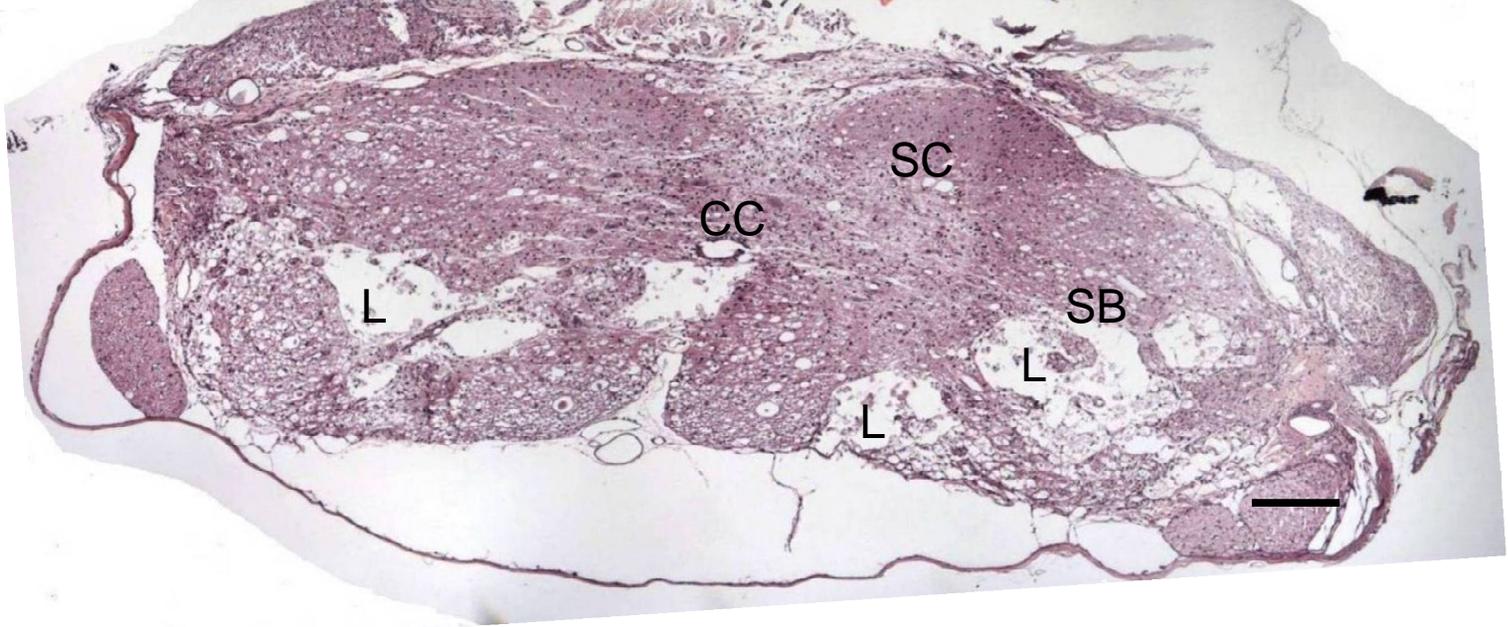


Figura 41: Análise Histológica dos animais submetidos à transecção medular completa. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 3 animais de cada. O tecido foi processado em blocos de parafina, os quais foram cortados transversalmente em fatias de 4 µm de espessura. A coloração utilizada foi Hematoxilina e Eosina (HE). Os cortes selecionados para esta demonstração correspondem ao epicentro da lesão, no interior do tecido que conectava os dois cotos distal e proximal. A) medula espinhal do animal tampão ácido (aumento 10x); B) medula espinhal do animal laminina ácida (aumento 10x). CC (canal medular); SB (substância branca); SC (substância cinzenta); L (local de lesão tecidual). Barra de calibração: 200 µm (aumento de 10x).

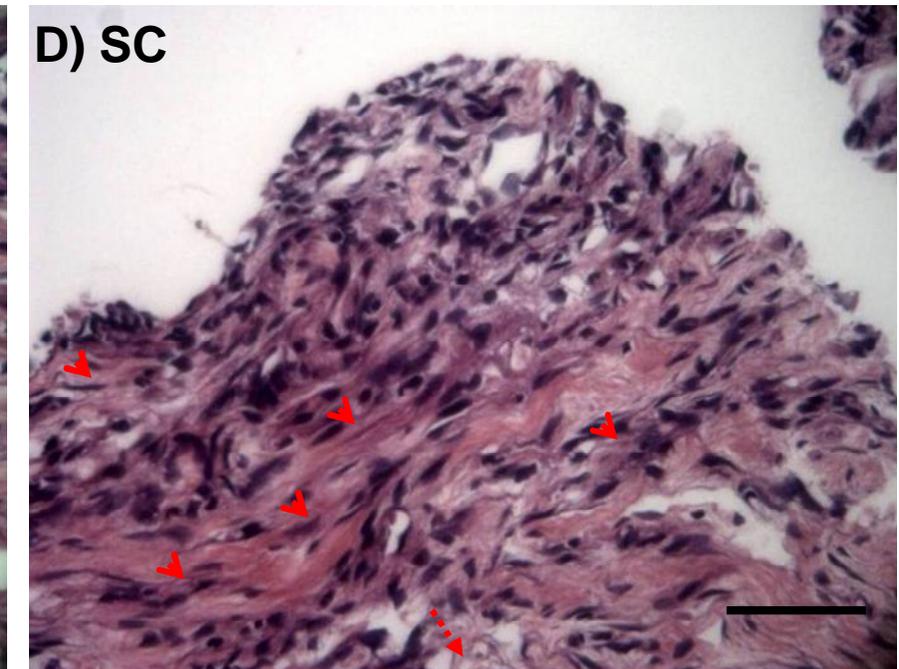
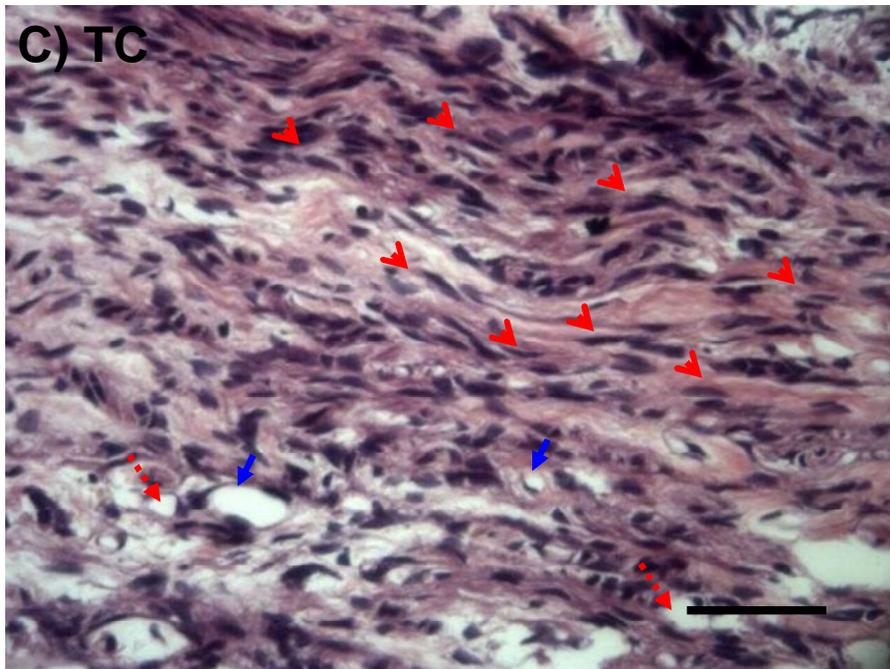
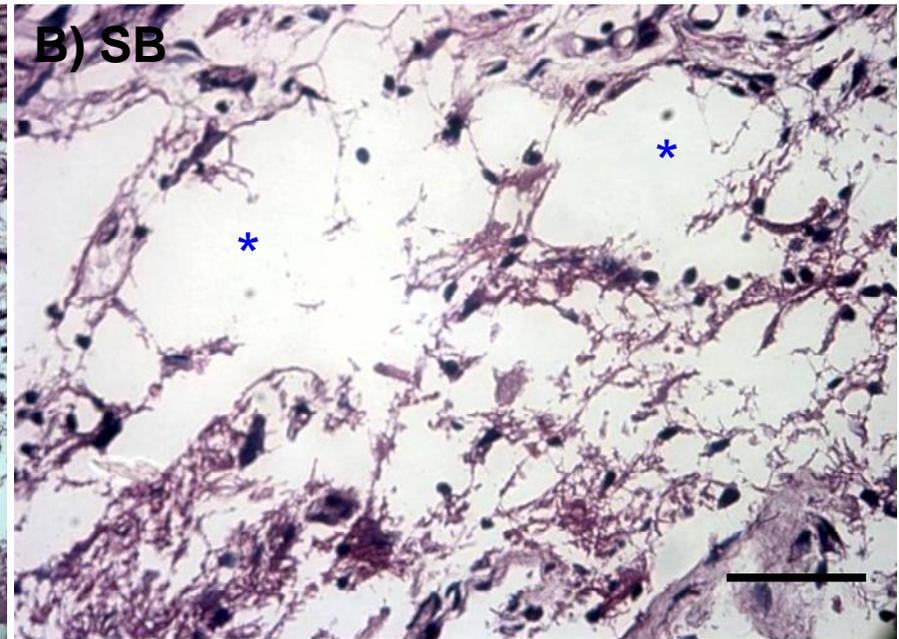
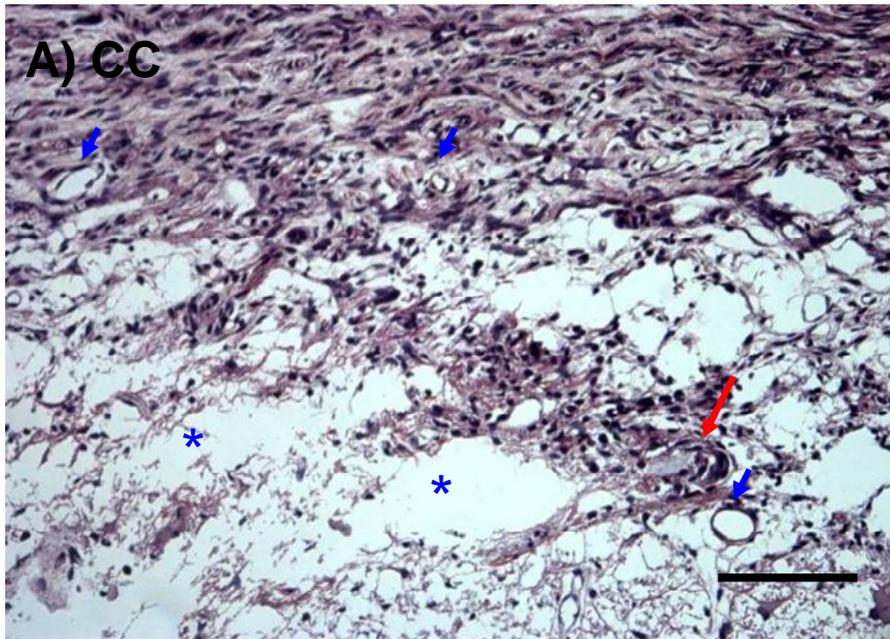


Figura 42: Análise Histológica dos animais controles submetidos à transecção medular completa. Análise do grupo experimental controle tampão ácido (3 animais). O tecido foi processado em blocos de parafina, os quais foram cortados transversalmente em fatias de 4 μm de espessura. A coloração utilizada foi Hematoxilina e Eosina (HE). Os cortes selecionados para esta demonstração correspondem ao epicentro da lesão, no interior do tecido que conectava os dois cotos distal e proximal. A) Canal central (aumento 20x); B) Substância branca na região ventral (aumento 40x); C) Tecido de cicatrização na região dorsal (aumento de 40x); D) Substância cinzenta na região dorsal (aumento de 40x). A seta contínua (em vermelho) indica o canal central da medula espinhal (figura A). As setas contínuas (em azul) indicam os vasos sanguíneos. A seta descontínua (em vermelho) indica vesículas (em branco) formadas em consequência da morte celular. A extremidade da seta (em vermelho) indica núcleos achatados das células desta zona de cicatrização. Os asteriscos (em azul) indicam perda de parênquima tecidual. Barra de calibração: 100 μm (aumento de 20x) e 50 μm (aumento de 40x).

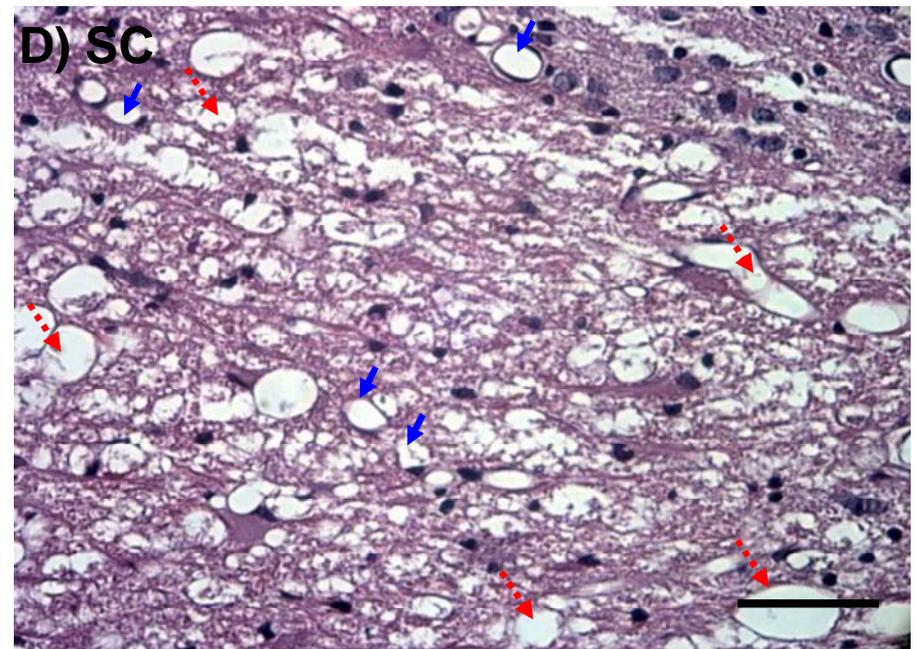
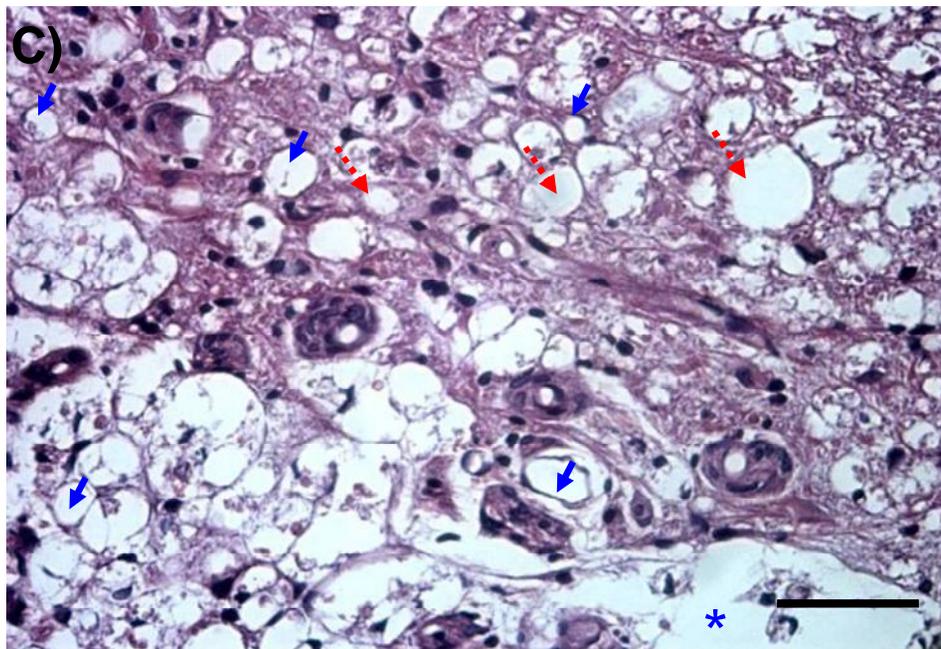
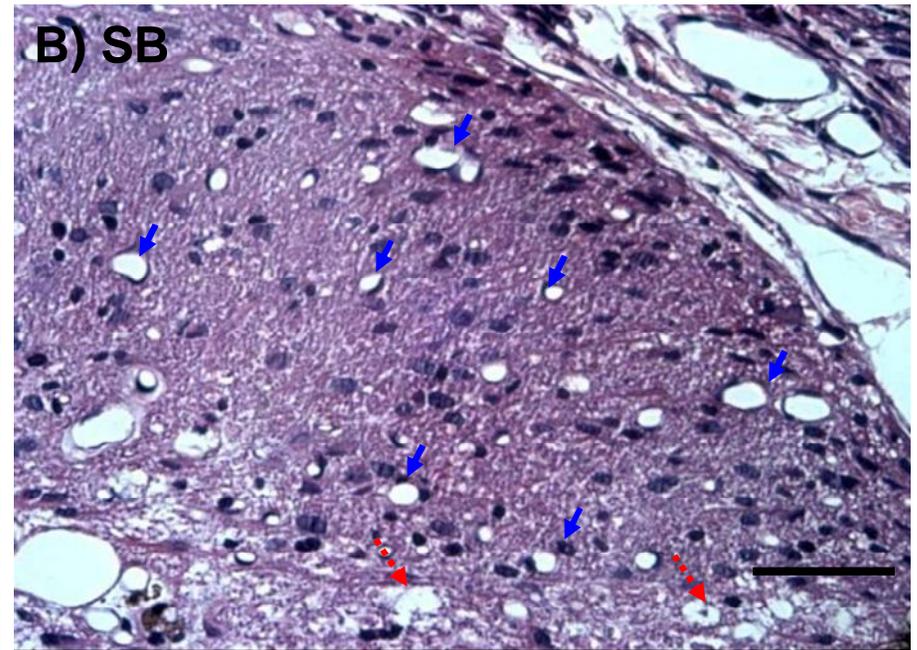
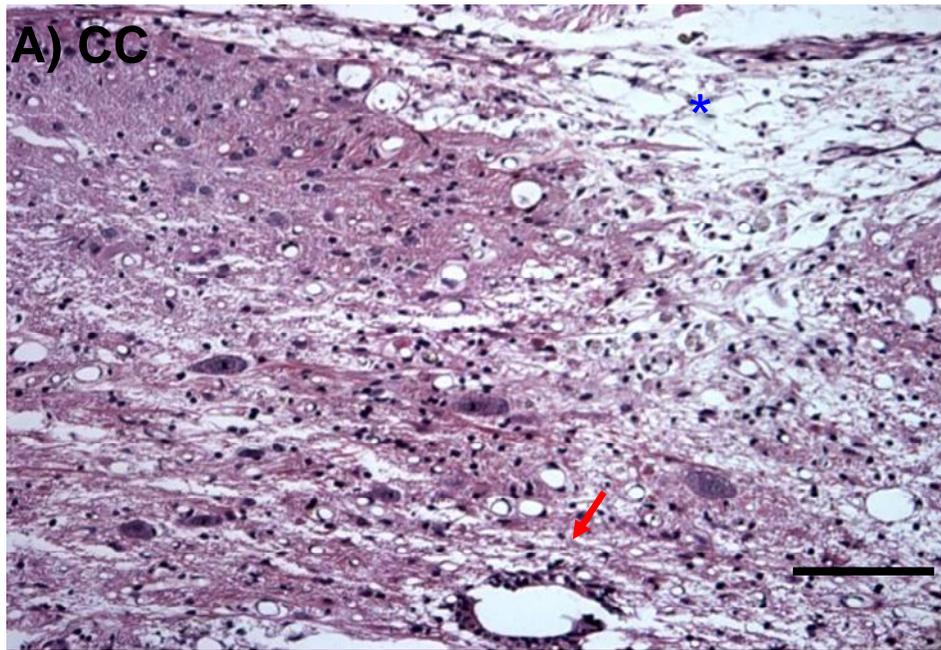
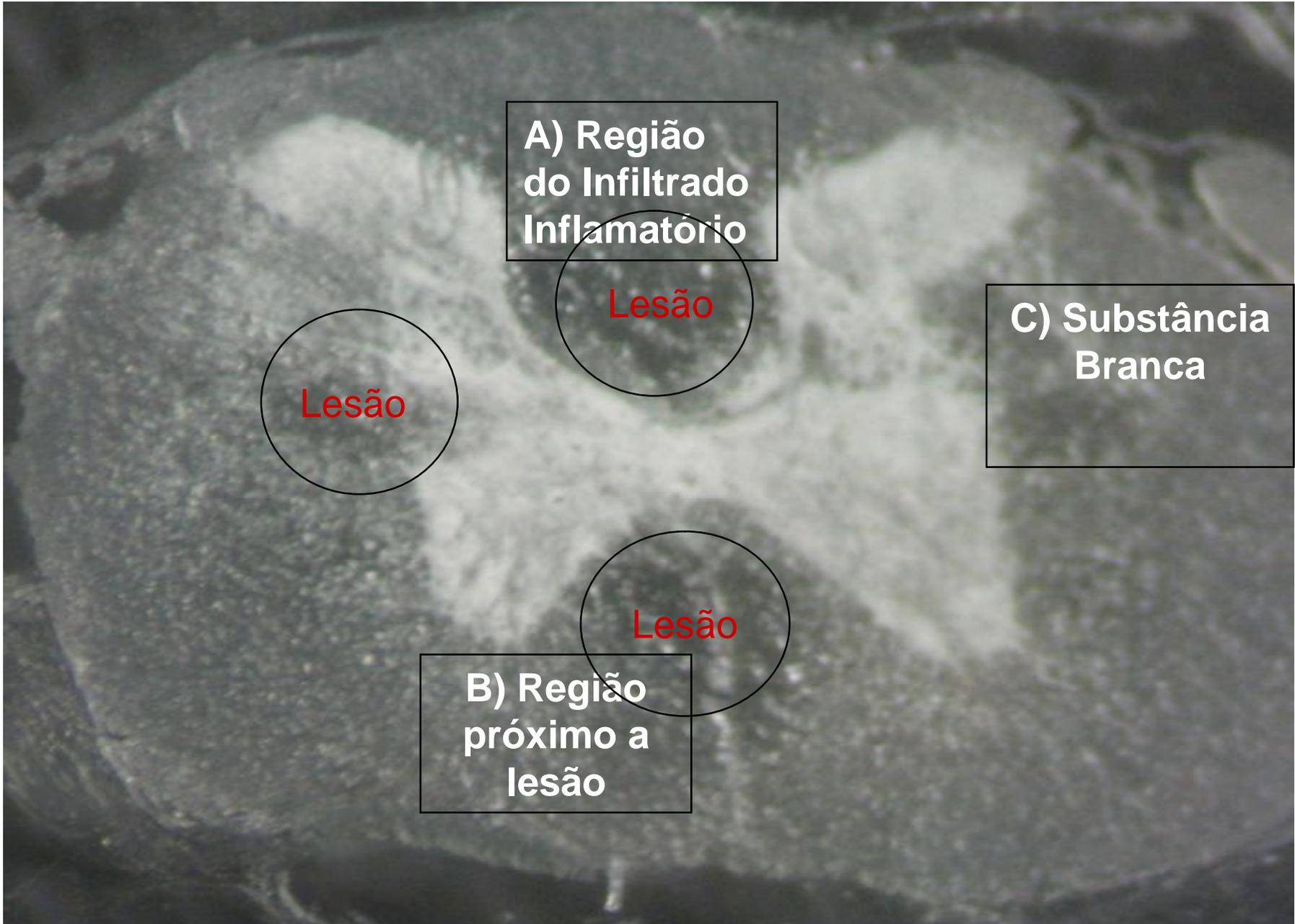


Figura 43: Análise Histológica dos animais tratados com laminina ácida submetidos à transecção medular completa. Análise do grupo experimental tratado com laminina ácida de camundongo (3 animais). O tecido foi processado em blocos de parafina, os quais foram cortados transversalmente em fatias de 4 μm de espessura. A coloração utilizada foi Hematoxilina e Eosina (HE). Os cortes selecionados para esta demonstração correspondem ao epicentro da lesão, no interior do tecido que conectava os dois cotos distal e proximal. A) Canal central (aumento 20x); B) Substância branca na região ventral (aumento 40x); C) Tecido de separação entre a substância branca e cinzenta na região dorsal (aumento de 40x); D) Substância cinzenta na região dorsal (aumento de 40x). A seta contínua (em vermelho) indica o canal central da medula espinhal (figura A). As setas contínuas (em azul) indicam vasos sanguíneos. A seta descontínua (em vermelho) indica vesículas (em branco) formadas em consequência da morte celular. Os asteriscos (em azul) indicam perda de parênquima tecidual. Barra de calibração: 100 μm (aumento de 20x) e 50 μm (aumento de 40x).



A) Região do Infiltrado Inflamatório

Lesão

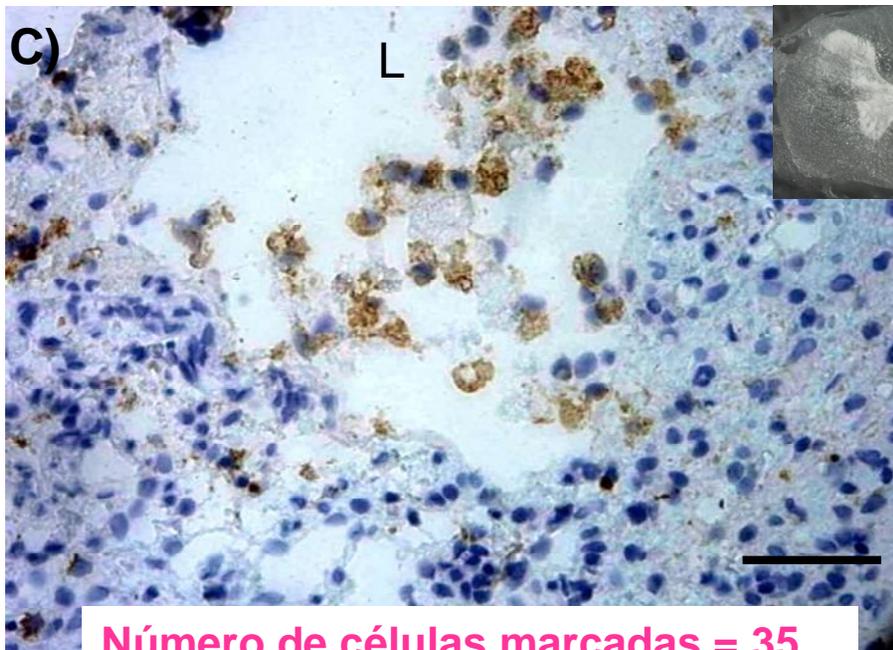
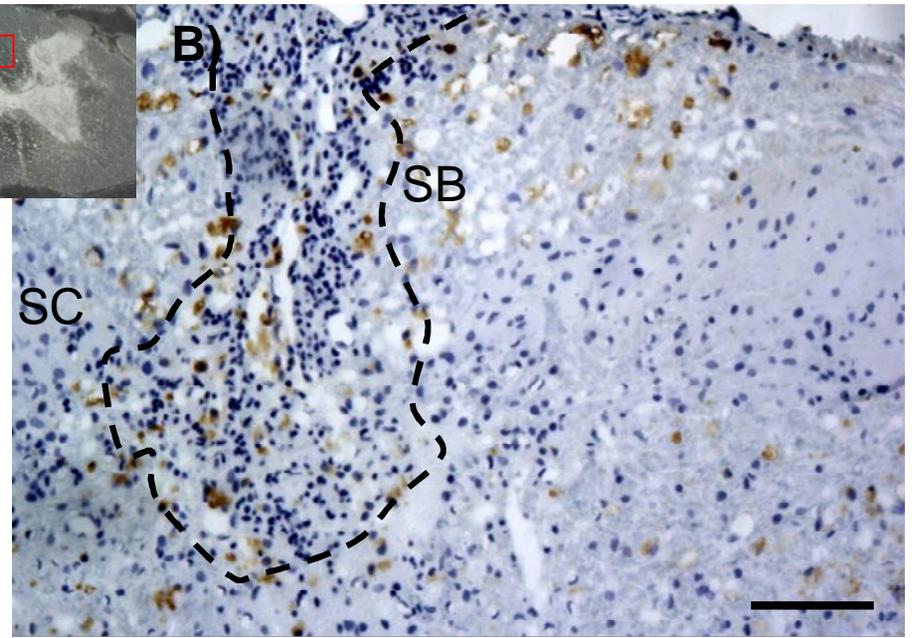
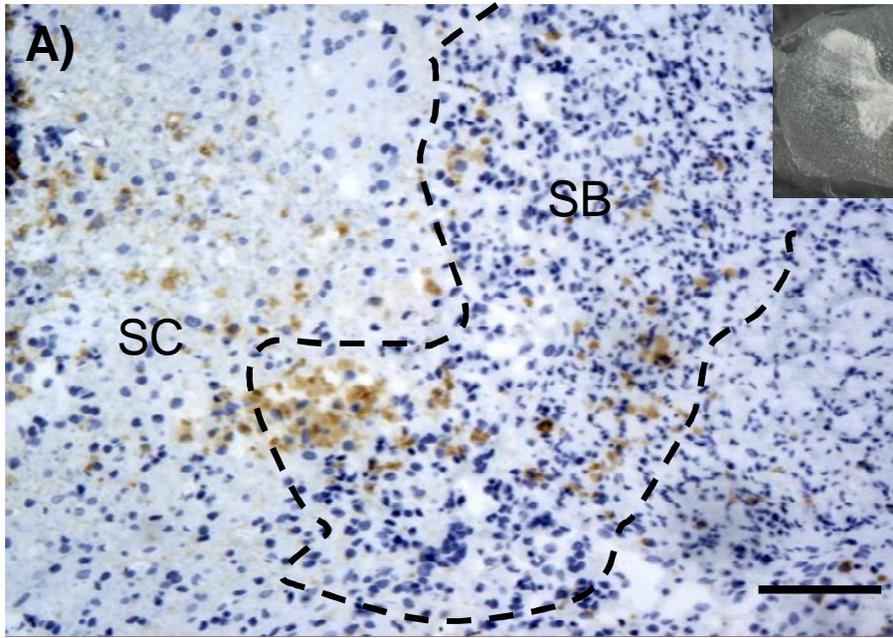
Lesão

C) Substância Branca

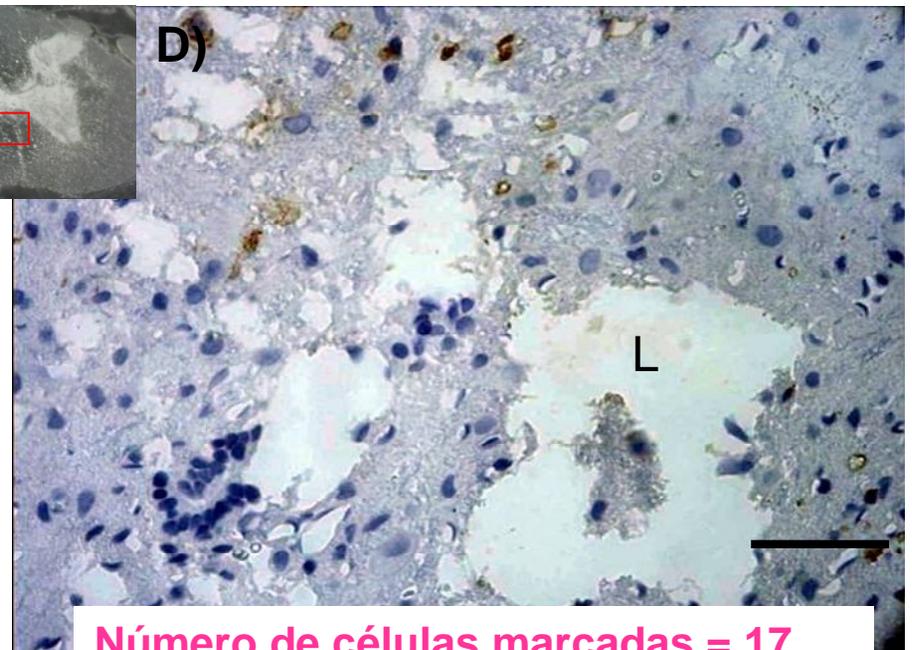
B) Região próximo a lesão

Lesão

Figura 44: Locais selecionados para análise dos ensaios de imunoperoxidase dos animais submetidos à transecção medular completa. Foto macroscópica de um corte congelado, 8 semanas após a transecção medular, realizada com máquina fotográfica digital, sobre um fundo preto e iluminação com fibra óptica. O tecido analisado foi congelado em nitrogênio líquido, cortado transversal em fatias de 20 μm de espessura. Este corte de caráter ilustrativo corresponde ao início da lesão, a 250 μm de seu epicentro. Os locais específicos para análise das imunomarcações foram: A) região do infiltrado inflamatória; B) a região próxima à cavidade cística; C) a substância branca.



Número de células marcadas = 35



Número de células marcadas = 17

Figura 45: Análise da cicatriz glial dos animais submetidos à transecção medular completa, na região do infiltrado inflamatório e próximo a área da lesão, através da imunoperoxidase com anti-GFAP. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 3 animais de cada, 8 semana após a lesão. O tecido foi processado em blocos de parafina, os quais foram cortados transversalmente em fatias de 4 μm de espessura. A imunomarcção com anti-GFAP permitiu a visualização de astrócitos situados na região do infiltrado inflamatório (A e C) e na margem da cavidade cística (B e D). Animal Tampão Ácido: A) Região do infiltrado com aumento de 20x, C) Região próxima à lesão com aumento de 40x. Animal Laminina Ácida: B) Região do infiltrado com aumento de 20x, D) Região próxima à lesão com aumento de 40x. A contagem de células marcadas para GFAP próxima a área da lesão foi realizada somente neste campo de aumento 40x para ilustrar a diferença da quantidade de astrócitos presentes neste local em ambos os animais. SC (substância cinzenta); SB (substância branca); L (local de lesão). A área tracejada indica o local do infiltrado inflamatório. Barra de calibração: 100 μm (aumento de 20x) e 50 μm (aumento de 40x).

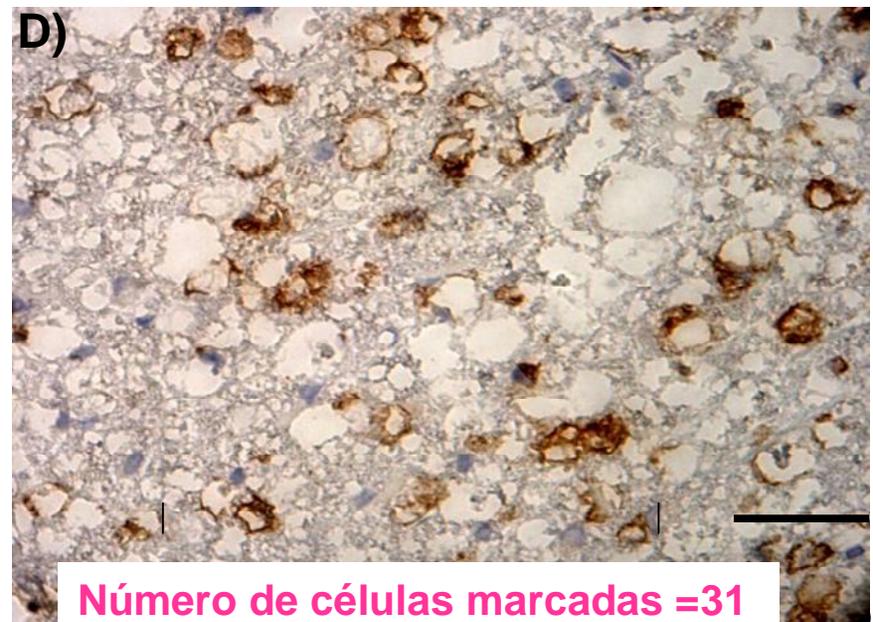
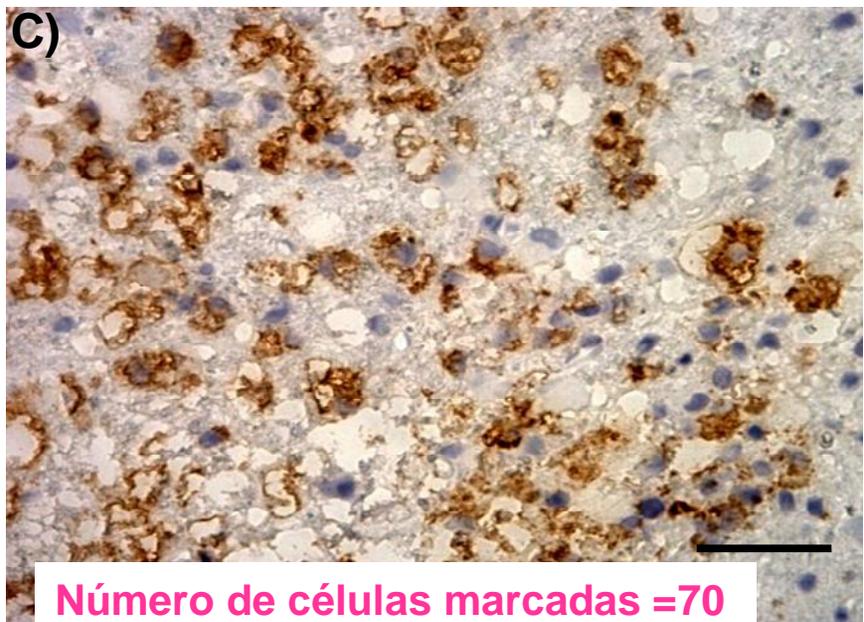
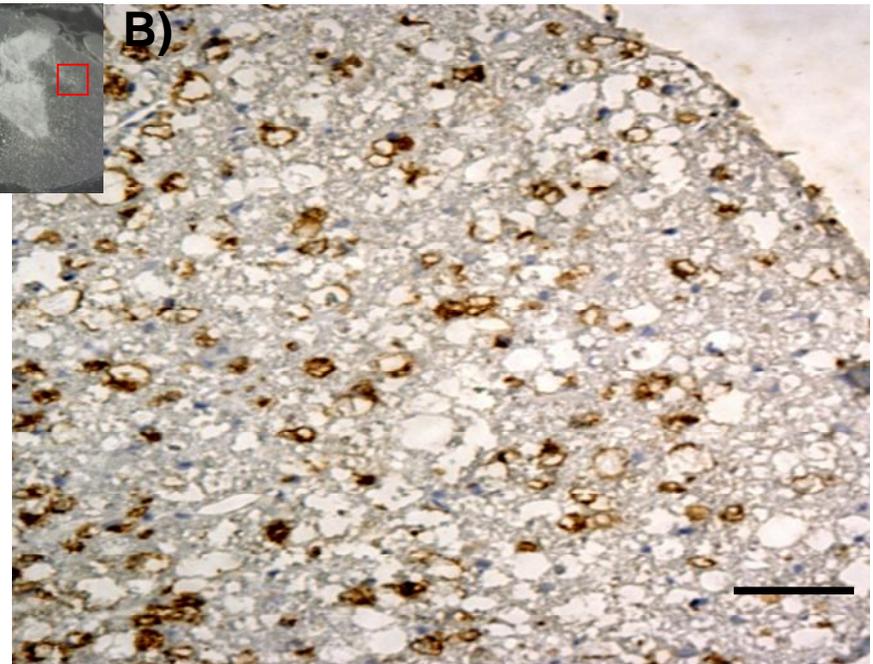
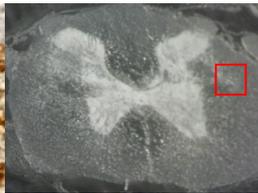
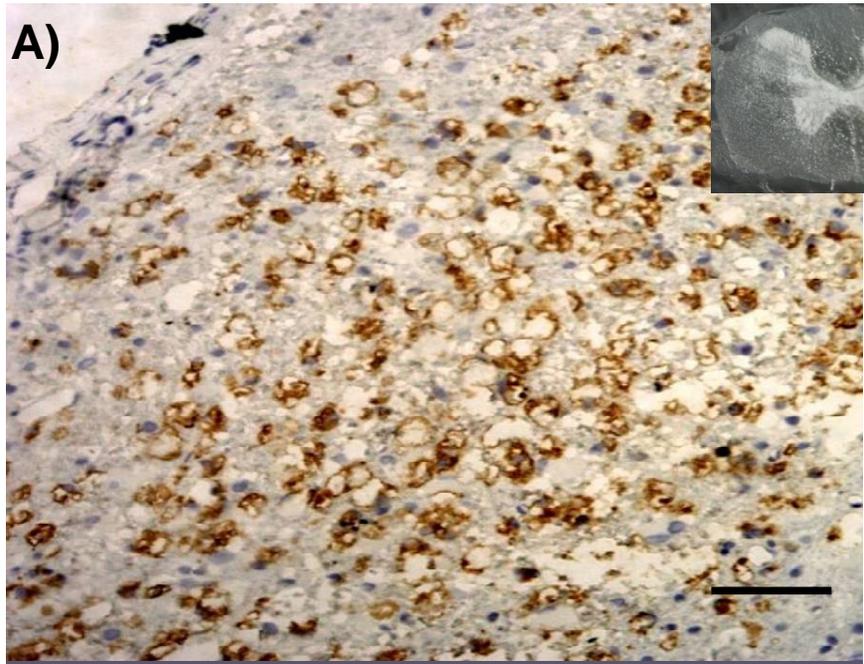


Figura 46: Análise da inflamação nos animais submetidos à transecção medular completa, na região da substância branca, através da imunoperoxidase com ED1. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 3 animais de cada, 8 semana após a lesão. O tecido foi processado em blocos de parafina, os quais foram cortados transversalmente em fatias de 4 µm de espessura. A imunomarcação com ED1 permitiu a visualização de macrófagos e microglias situados na região da substância branca (A-D). Animal Tampão Ácido: A) Substância branca com aumento de 20x, C) Substância branca com aumento de 40x. Animal Laminina Ácida: B) Substância branca com aumento de 20x, D) Substância branca com aumento de 40x. A contagem de células positivas para ED1 na substância cinzenta foi realizada somente neste campo de aumento 40x para ilustrar a diferença da quantidade de células presentes neste local em ambos os animais. Barra de calibração: 100 µm (aumento de 20x) e 50 µm (aumento de 40x).

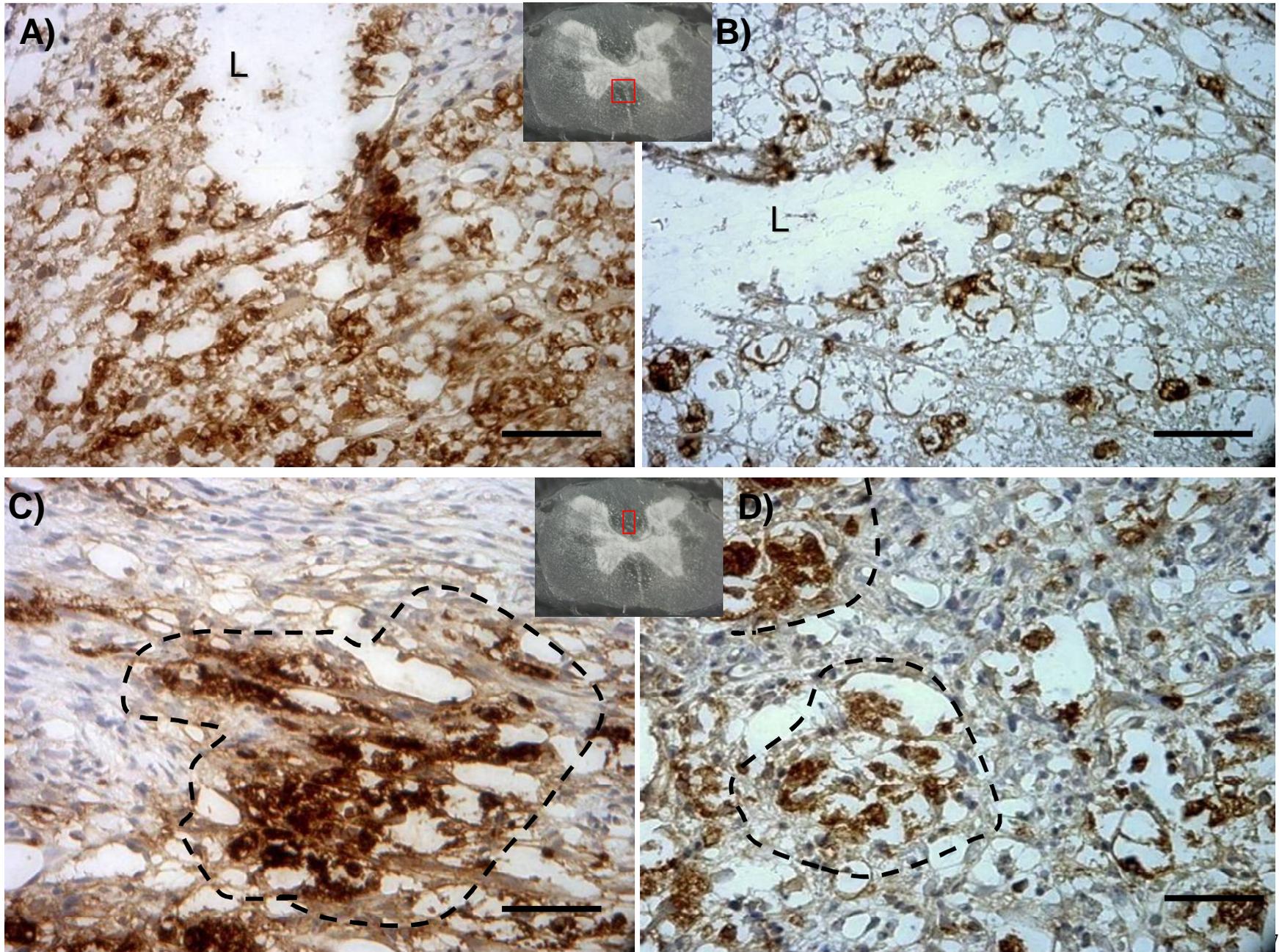


Figura 47: Análise da inflamação nos animais submetidos à transecção medular completa, na região próxima a área da lesão e do infiltrado inflamatório, através da imunoperoxidase com ED1. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 3 animais de cada, 8 semana após a lesão. O tecido foi processado em blocos de parafina, os quais foram cortados transversalmente em fatias de 4 μm de espessura. A imunomarcacão com ED1 permitiu a visualizaçãõ de macrófagos e microglias situados na região próxima a área da lesão (A e B) e na região do infiltrado inflamatório (C e D). Animal Tampão Ácido: A) Região próxima a lesão com aumento de 40x; C) Região do infiltrado inflamatório com aumento de 40x. Animal Laminina Ácida: B) Região próxima a lesão com aumento de 40x; D) Região do infiltrado inflamatório com aumento de 40x. A área tracejada indica a região do infiltrado inflamatório. L (Local de lesão tecidual). Barra de calibraçãõ: 100 μm (aumento de 20x) e 50 μm (aumento de 40x).

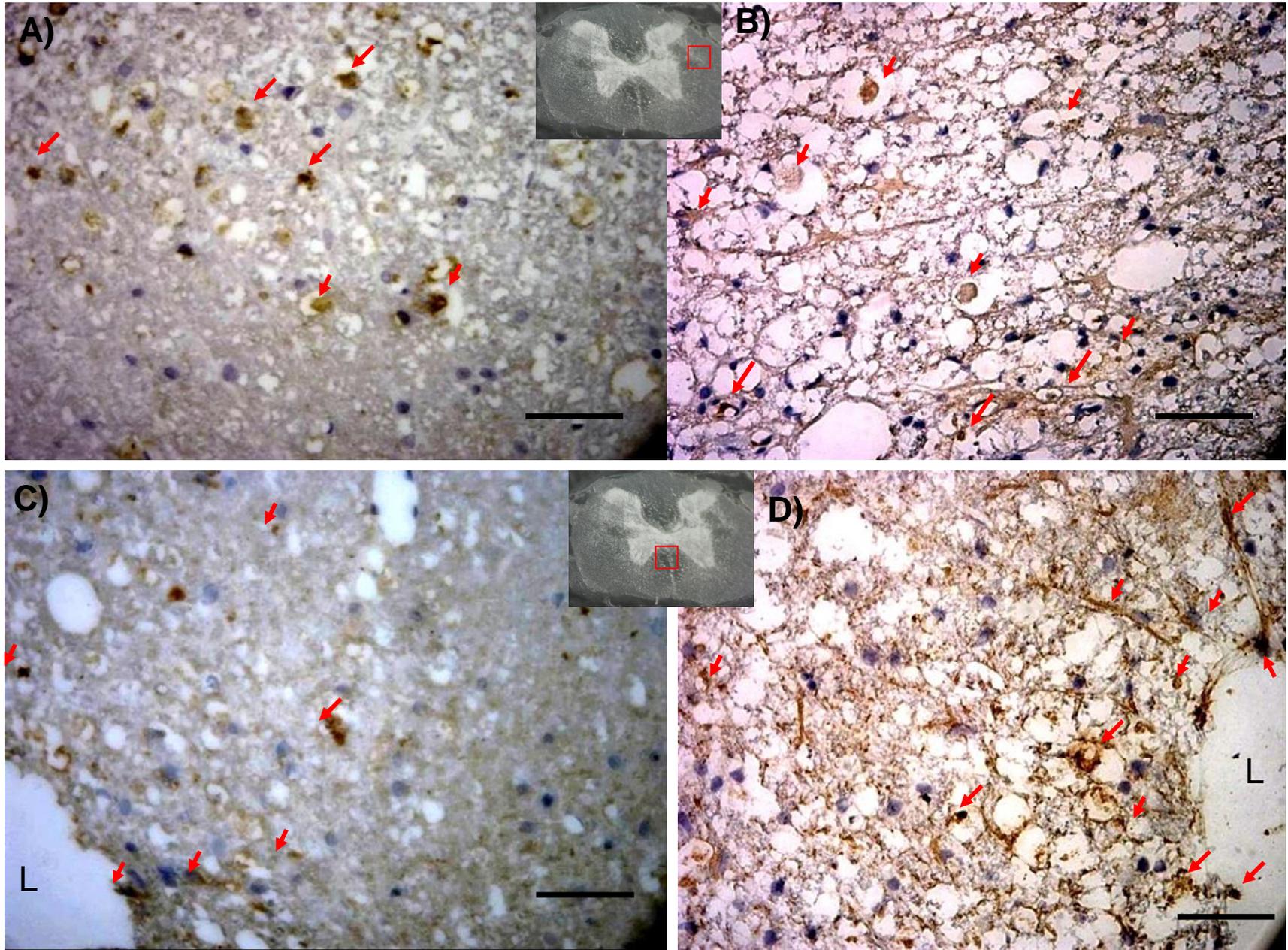


Figura 48: Análise da regeneração axonal nos animais submetidos à transecção medular completa, na região da substância branca e próxima a área da lesão, através da imunoperoxidase com GAP-43. Grupos experimentais: controle tampão ácido e tratado laminina ácida, sendo analisado 3 animais de cada, 8 semana após a lesão. O tecido foi processado em blocos de parafina, os quais foram cortados transversalmente em fatias de 4 μm de espessura. A imunomarcação com anti- GAP 43 permitiu a visualização de neurônios em processo de regeneração, situados na substância branca (A e B) e na região próxima a área da lesão (C e D). Animal Tampão Ácido: A) Substância Branca com aumento de 40x; C) Região próxima a lesão com aumento de 40x. Animal Laminina Ácida: B) Substância Branca com aumento de 40x; D) Região próxima a lesão com aumento de 40x. As setas (em vermelho) indicam células positivamente marcadas com anti-GAP 43. L (Local de lesão tecidual). Barra de calibração: 50 μm (aumento de 40x).

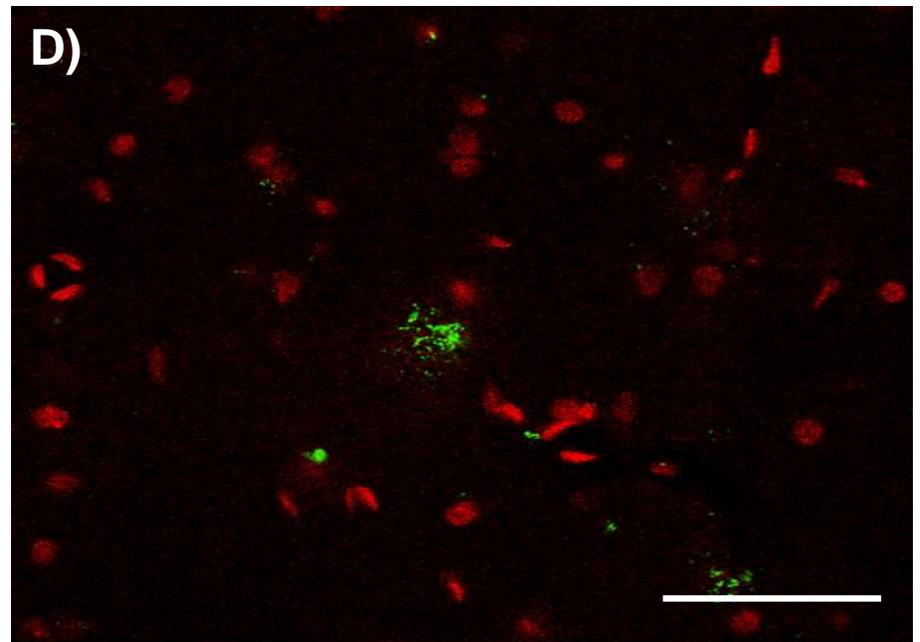
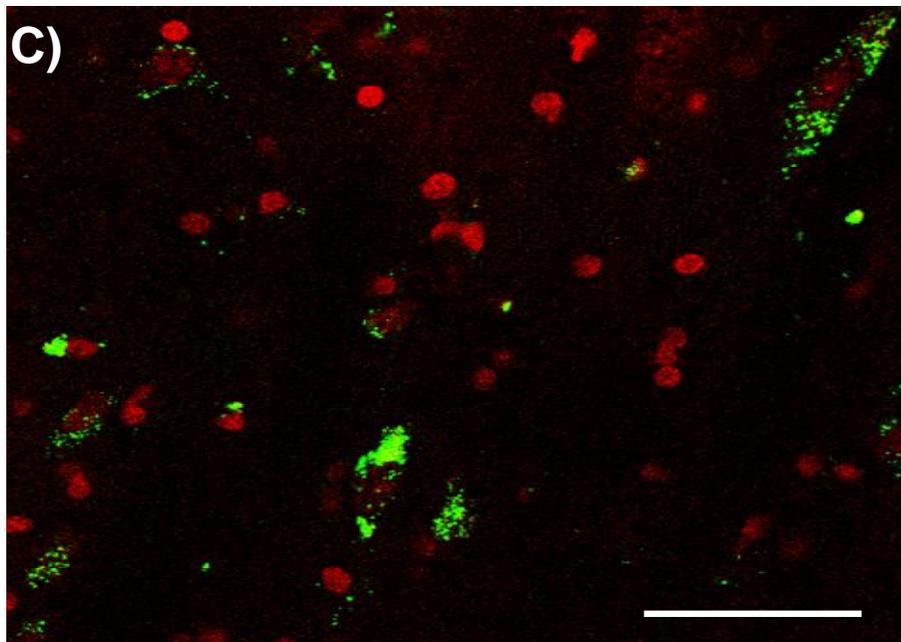
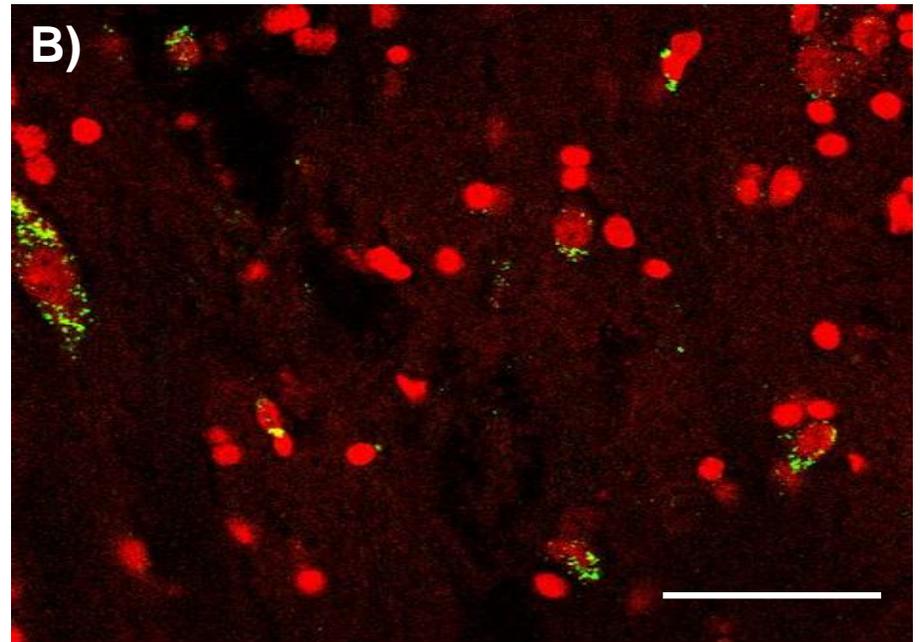
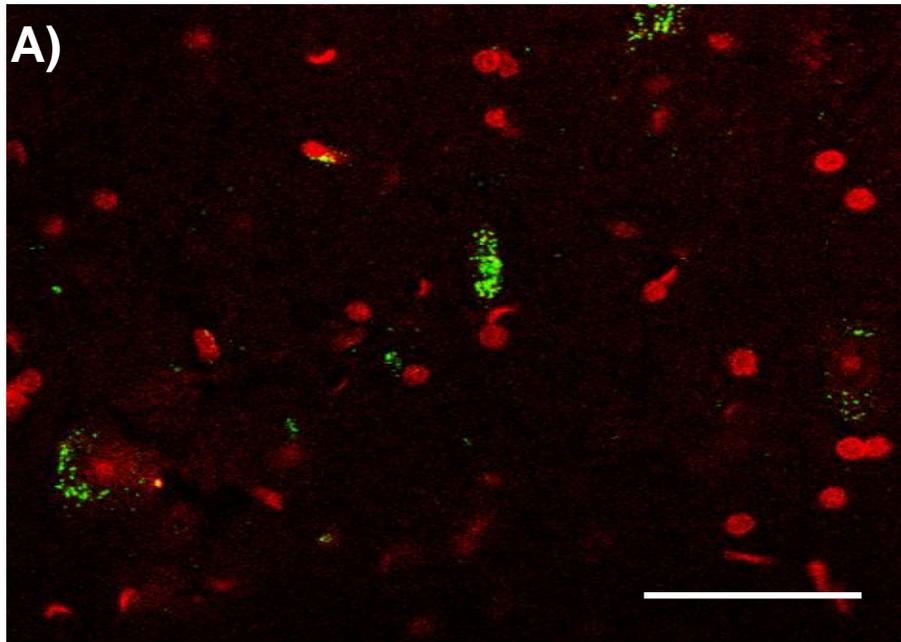


Figura 49: Análise da regeneração axonal no animal controle submetido à transecção medular completa, através da marcação com o neurotraçador Fluorogold. A análise foi realizada em 1 animal que pertence ao grupo controle tampão, 8 semana após a lesão. O tecido foi processado no vibrátomo, em cortes longitudinais de 50 μm . O local selecionado para contagem das células marcadas com Fluorogold foi a região próxima ao tronco encefálico, em 4 pontos diferentes na substância cinzenta de cada corte: lateral direita (A), medial direita (B), lateral esquerda (C) e medial esquerda (D). Os núcleos das células da amostra foram marcados com Topro, visualizados com a cor vermelha, e as células positivamente marcadas com FG podem ser visualizados pela cor verde. A leitura em cada um dos pontos foi realizada em fatias de 12 μm . As imagens foram realizadas no microscópio confocal multifotônico, no aumento de 40x. Barra de calibração: .

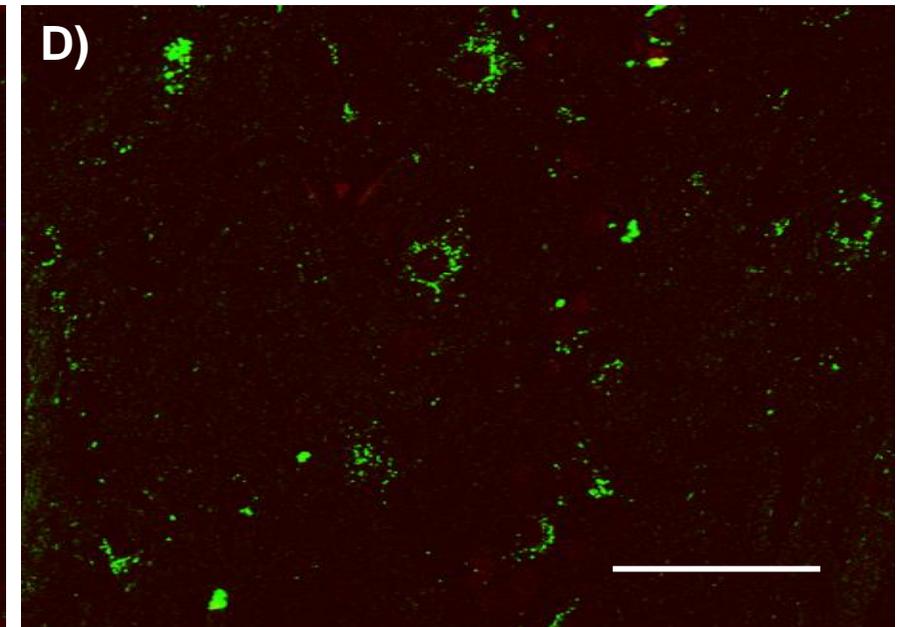
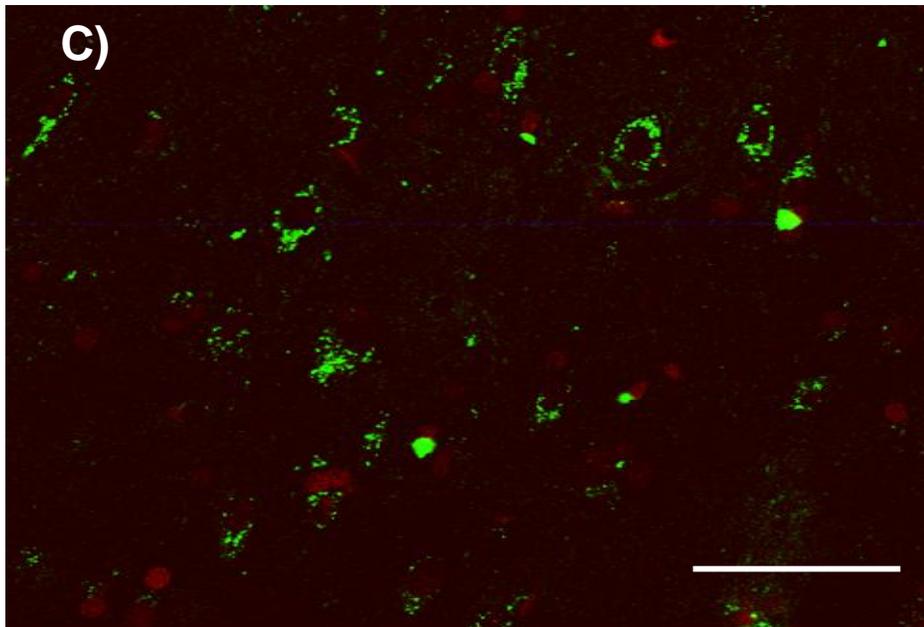
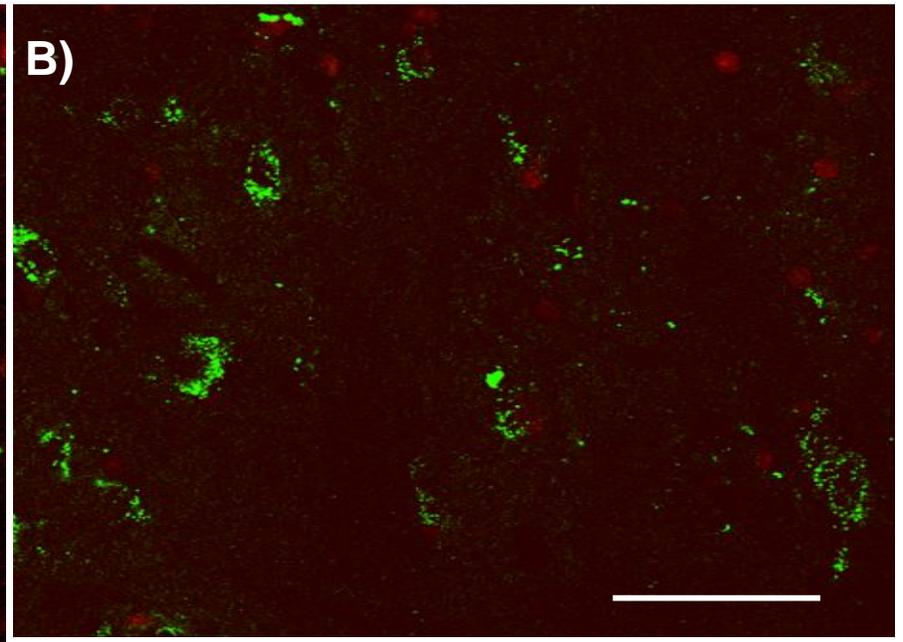
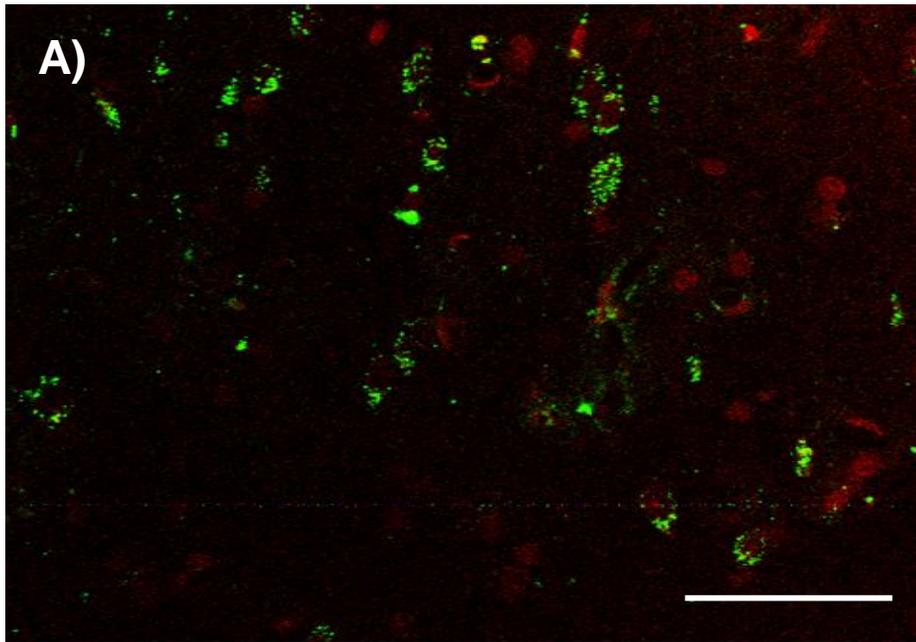
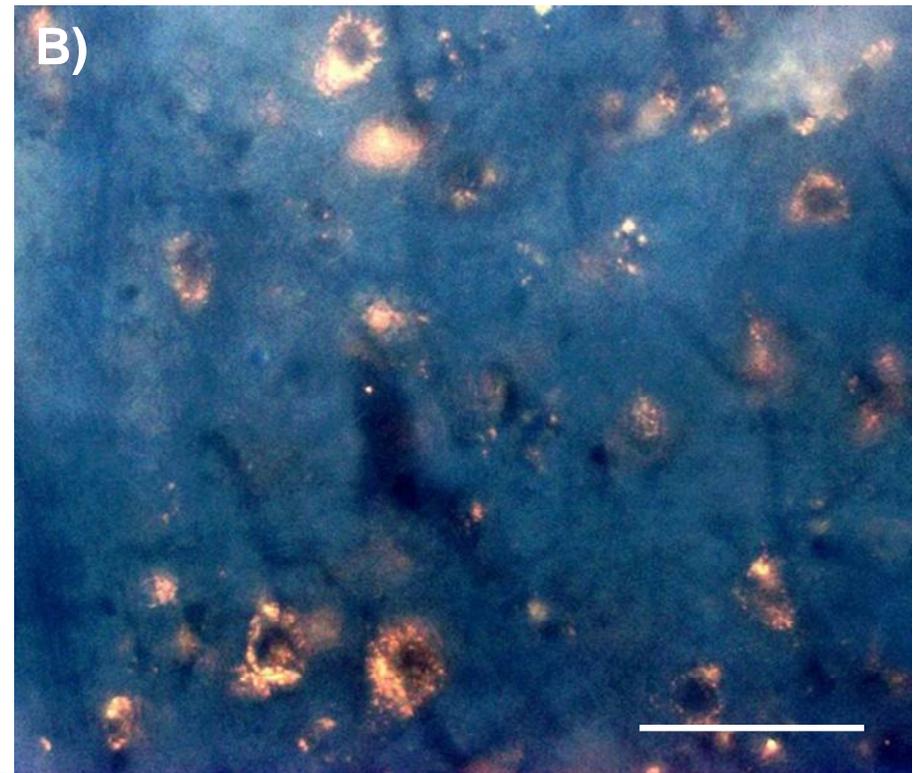
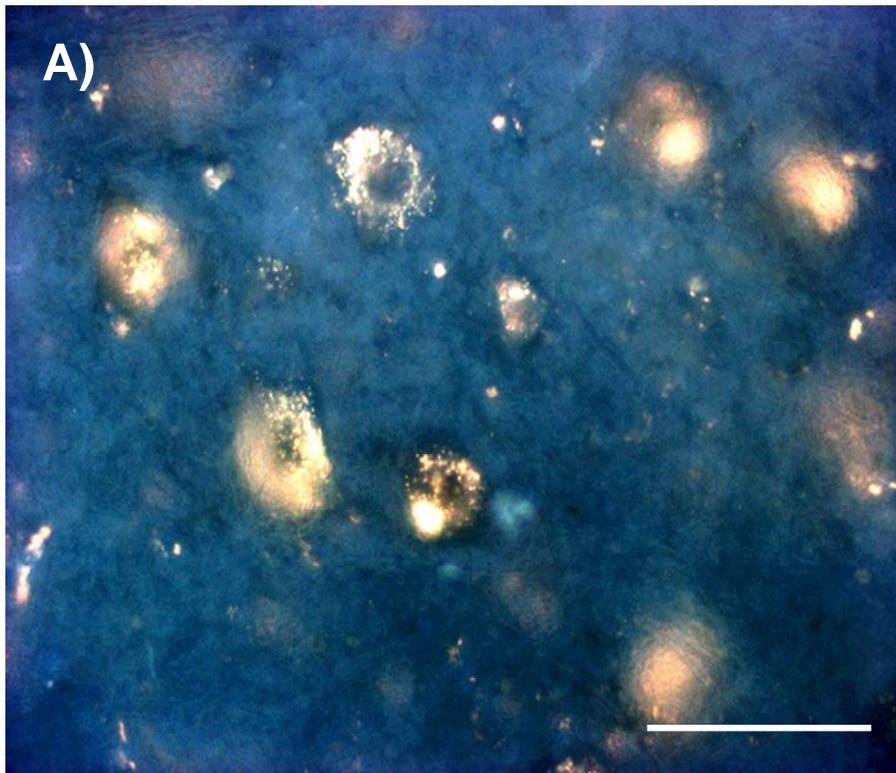
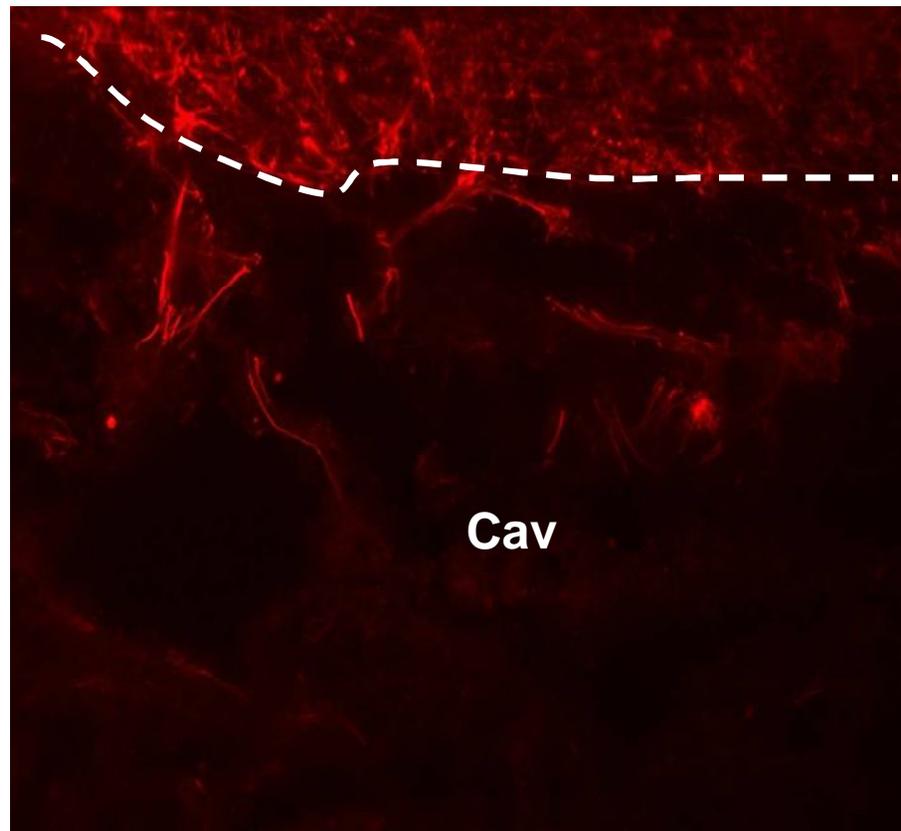
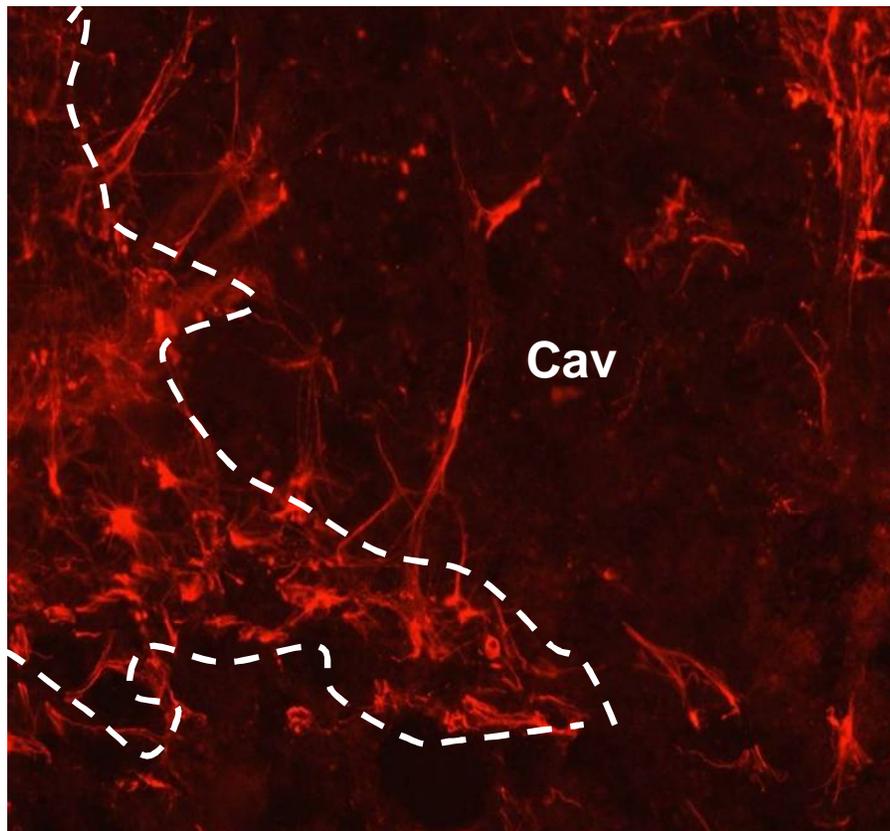


Figura 50: Análise da regeneração axonal no animal tratado com laminina ácida submetido à transecção medular completa, através da marcação com o neurotraçador Fluorogold. A análise foi realizada em 1 animal que pertence ao grupo tratado com laminina ácida de camundongo, 8 semana após a lesão. O tecido foi processado no vibrátomo, em cortes longitudinais de 50 μm . O local selecionado para contagem das células marcadas com Fluorogold foi a região próxima ao tronco encefálico, em 4 pontos diferentes na substância cinzenta de cada corte: lateral direita (A), medial direita (B), lateral esquerda (C) e medial esquerda (D). Os núcleos das células da amostra foram marcados com Topro, visualizados com a cor vermelha, e as células positivamente marcadas com FG podem ser visualizados pela cor verde. A leitura em cada um dos pontos foi realizada em fatias de 12 μm . As imagens foram realizadas no microscópio confocal multifotônico, no aumento de 40x. Barra de calibração: .



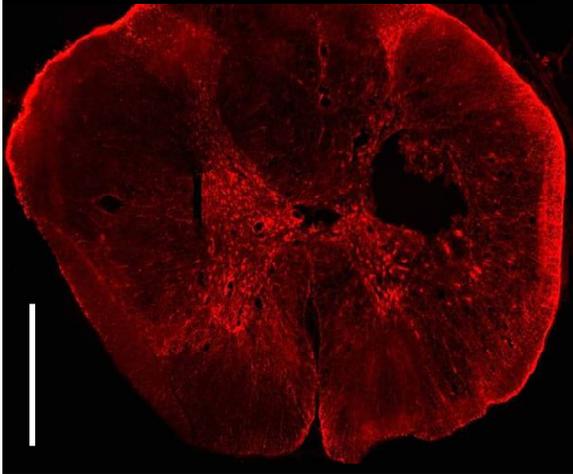
Tratamento	Região Próximo ao Tronco Medular	Região próximo a Transecção Medular
Tampão Ácido	60	24
Laminina Ácida	95	62

Figura 51: Quantificação das células marcadas com Fluorogold dos animais submetidos à transecção medular completa. A análise foi realizada em um animal que pertence ao grupo experimental controle tampão ácido e um tratado com laminina ácida, 8 semana após a lesão. O tecido foi processado no vibrátomo, em cortes longitudinais de 50 μm . As células positivamente marcadas com FG podem ser visualizadas pela cor amarelo claro e eventualmente cor branca no microscópio de fluorescência, utilizando o filtro ultravioleta, no aumento de 40x. Os locais selecionados para contagens das células marcadas com Fluorogold foram a região próxima ao tronco encefálico e aquela próxima a transecção completa da medula, na porção rostral a lesão. A leitura em cada uma das regiões foi realizada em fatias de 12 e 8 μm , respectivamente. A tabela apresenta o número de células contadas nestas duas regiões em ambos os animais (controle e tratado). A) Animal tampão ácido; B) Animal laminina ácida. Barra de calibração:



Complementar 1: Imunomarcção com anti-GFAP em cortes transversais. O ensaio demonstra a eficácia da marcação de astrócitos com anti-GFAP na delimitação da cavidade cística (aumento de 40x).

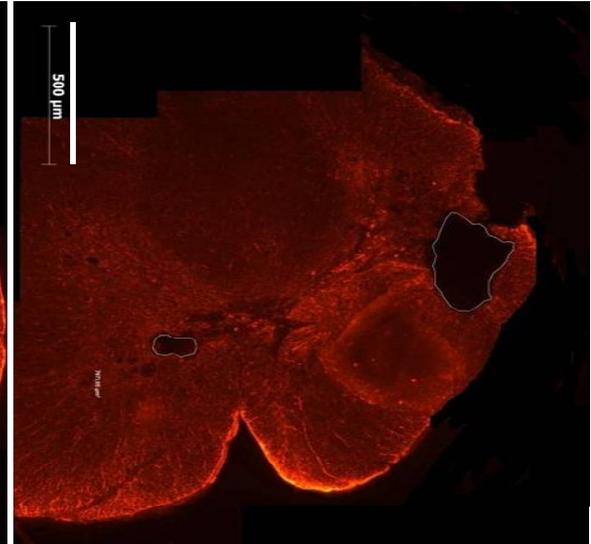
Laminina Ácida



Caudal (89.117 μm^2)

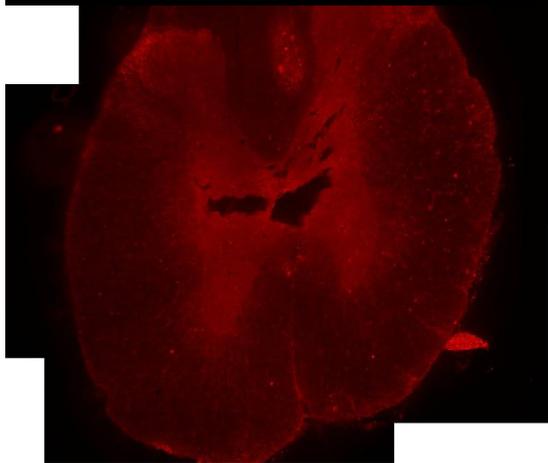


Epicentro (185.810 μm^2)

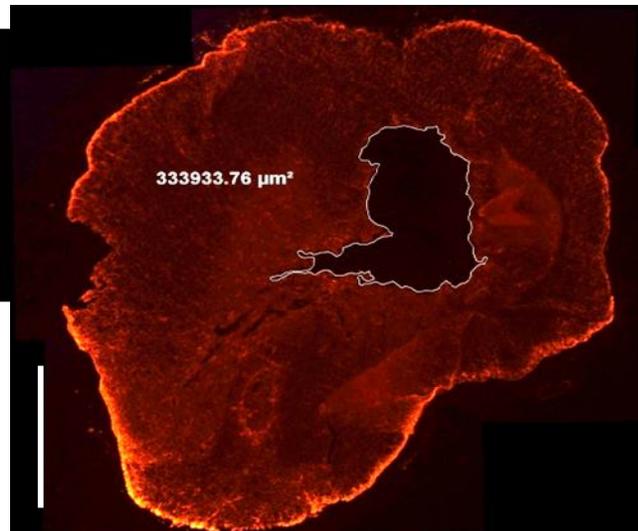


Rostral (61.130 μm^2)

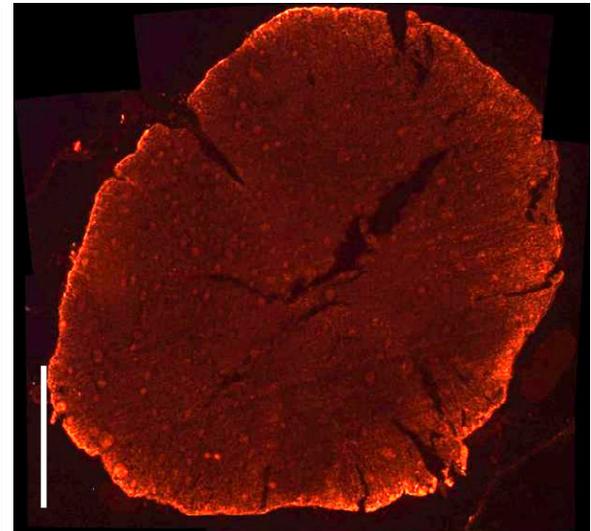
Tampão Ácido



Caudal (198.571 μm^2)



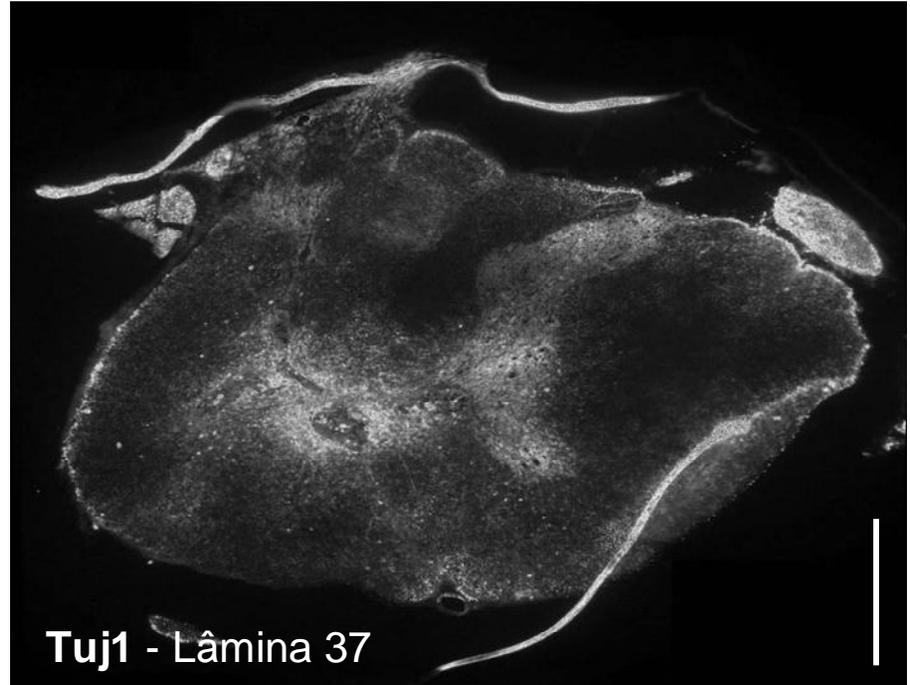
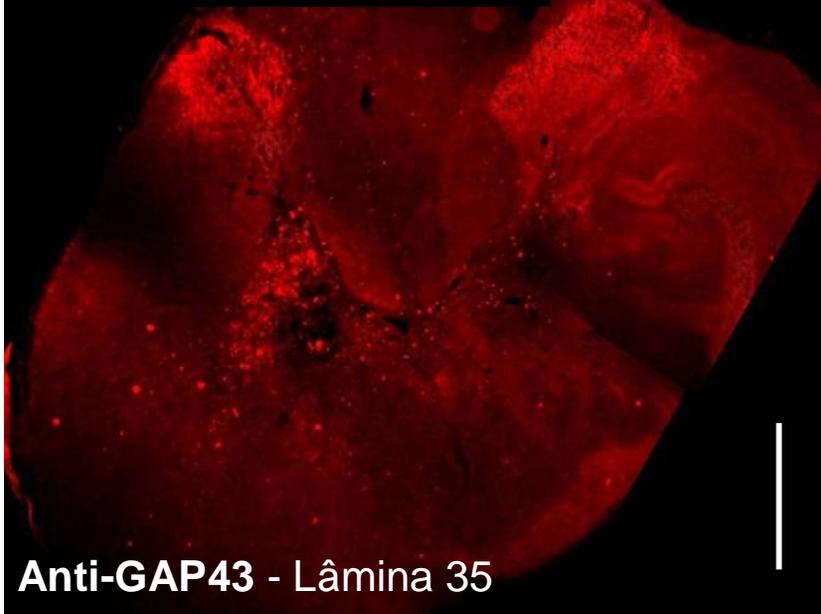
Epicentro (333.933,76 μm^2)



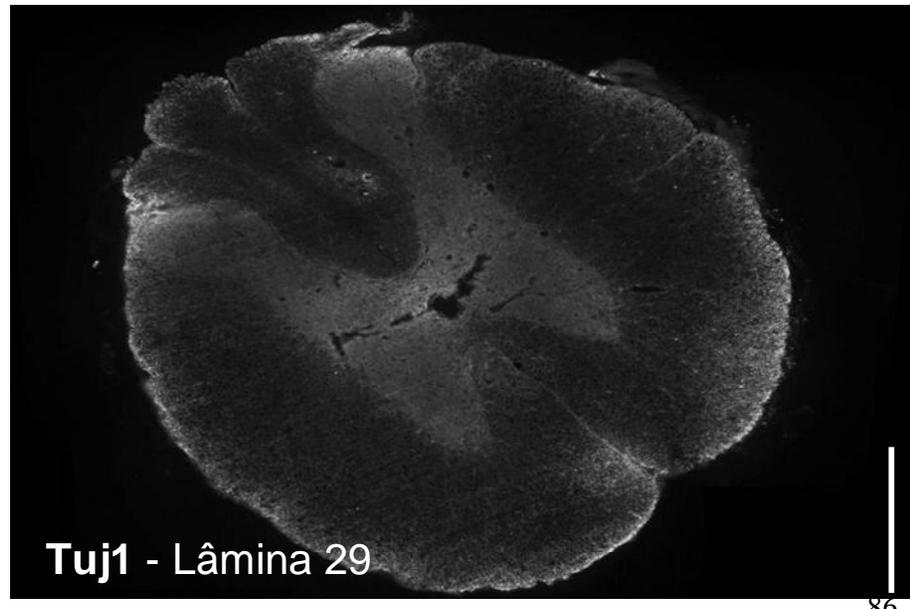
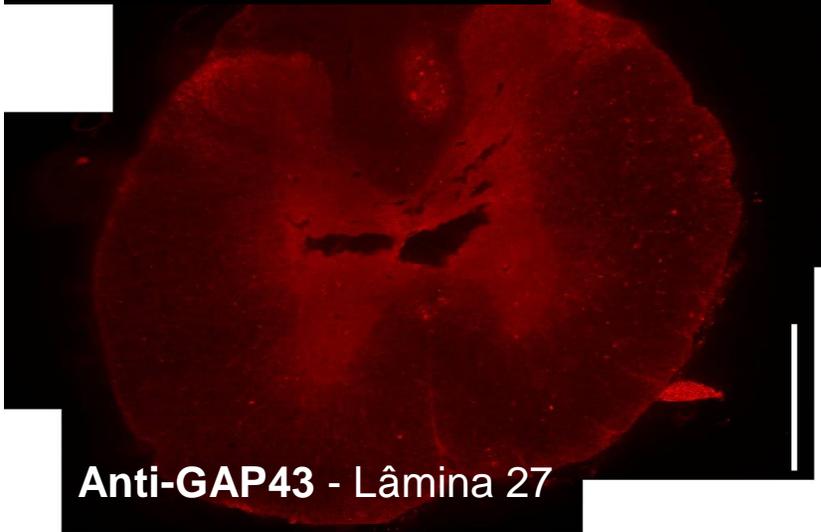
Rostral (113.852 μm^2)

Complementar 2: Quantificação da área da cavidade cística e identificação do epicentro da lesão, através da imunomarcção com anti-GFAP em cortes transversais. A marcação de astrócitos com anti-GFAP nas seqüência de 3 em 3 lâminas permitiu identificar a lâmina com maior área de lesão. Barra de calibração: 200 μm (aumento de 5x).

Laminina Ácida



Tampão Ácido



Complementar 3: Comparação entre as imunomarcações com anti-GFAP em cortes transversais. A realização de ensaios de imunofluorescência com anti-GAP 43 e Tuj1 em lâminas subsequentes (distância de 100-150 μm entre elas) sugere a presença de neurônios em crescimento localizados na mesma região marcada positivamente com Tuj1 nos animais tratados com laminina. Já os animais controles não apresentaram uma marcação expressiva com anti-GAP 43, assim como também é observado no ensaio com Tuj1. Barra de calibração: 200 μm (aumento de 5x).

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](#)