

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE PSICOLOGIA

BEATRIZ DE FREITAS AZEVEDO LEVY

Efeitos das células de Schwann cultivadas e tratadas com o PEDF no trofismo de neurônios medulares cultivados e na recuperação motora de ratos submetidos ao trauma contuso da medula espinal pelo Impactor

São Paulo

2008

BEATRIZ DE FREITAS AZEVEDO LEVY

Efeitos das células de Schwann cultivadas e tratadas com o PEDF no trofismo de neurônios medulares cultivados e na recuperação motora de ratos submetidos ao trauma contuso da medula espinal pelo Impactor

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

Levy, Beatriz de Freitas Azevedo.

Efeito das células de Schwann cultivadas e tratadas com o PEDF no trofismo de neurônios medulares cultivados e na recuperação motora de ratos submetidos ao trauma contuso da medula espinal pelo Impactor / Beatriz de Freitas Azevedo Levy; orientador Gerson Chadi. -- São Paulo, 2008.

78 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. Fator derivado do epitélio pigmentado 4. Neurônios 5. Plasticidade neuronal 6. Trofismo I. Título.

RD594.3

FOLHA DE APROVAÇÃO

Beatriz de Freitas Azevedo Levy

Efeitos das células de Schwann cultivadas e tratadas com o PEDF no trofismo de neurônios medulares cultivados e na recuperação motora de ratos submetidos ao trauma contuso da medula espinal pelo Impactor.

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: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo apoio, carinho e confiança.

Aos meus irmãos pela amizade e companheirismo.

Ao Guilherme pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gerson Chadi pelos seus ensinamentos, que contribuíram para o meu crescimento não só na área acadêmica como também na vida pessoal. Muito obrigada por acreditar no meu potencial e principalmente por deixar transparecer sua paixão contagiante pela pesquisa.

A Dra. Vânia C. Gomide, pelos ensinamentos metodológicos, ajuda e amizade.

Às alunas de iniciação científica Tatiana Duobles e Juliana Prado pela dedicação, carinho, auxílio e amizade. Sem vocês a realização deste trabalho seria muito mais difícil.

Às amigas Bianca de Luca, Camila Silva, Jéssica Maximino e Maura Laureano. Muito obrigada pelo apoio e amizade verdadeira que conseguiu ultrapassar as barreiras do laboratório.

Aos colegas do laboratório de Neurologia Experimental - Lim 45: Jinger do Carmo, André Bombeiro, Taís Lima, Thaísa, Karen Foger, Andréas Betz, Rafaela Pestana, Rebeca Boets, Susana Telles. Muito obrigada pela amizade, e por todas as vezes que pude contar com a ajuda de vocês.

Aos funcionários do Lim-45: Sarah Gomes, Florence e Gilmar pela ajuda e profissionalismo.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas III, Faculdade de Medicina de USP e do departamento de Neurociências e comportamento.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio a essa pesquisa

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa auxílio a pesquisa

A realização deste trabalho contou com os auxílios concedidos:

FAPESP (98/13122-5)

FAPESP (99/01319-1)

FAPESP (07/00491-3)

CNPq (485102/2007-2; 311797/2006-7)

CAPES para B.F.A.L

LISTA DE SIGLAS

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CS/coPEDF: CS pré tratadas com coPEDF

CS/nPEDF: CS pré tratadas com nPEDF

CS: célula(s) de Schwann

FGF-2: Fator de Crescimento Fibroblástico básico

FNT: Fatores Neurotróficos

GAP-43: proteína associada ao crescimento 43 KDa

GDNF: fator neurotrófico derivado da glia

GFAP: proteína fibrilar ácida glial

GFP: Proteína Verde Fluorescente

IGF: Fator de Crescimento Insulínico

MAP-2: Proteína associada ao microtúbulo

MASCIS: Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study

MC CS/coPEDF: Meio Condicionado das Células de Schwann pré tratadas com coPEDF

MC CS/nPEDF: Meio Condicionado das Células de Schwann pré tratadas com nPEDF

MCCS: Meio Condicionado das Células de Schwann

NGF: fator de crescimento do nervo

NT-3: Neurotrofina-3

PEDF: Fator neurotrófico derivado do epitélio pigmentado

SN: Sistema Nervoso

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

RESUMO

Levy, B.A **Efeitos das células de Schwann cultivadas e tratadas com o PEDF no trofismo de neurônios medulares cultivados e na recuperação motora de ratos submetidos ao trauma contuso da medula espinal pelo Impactor.** 2008. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Psicologia – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O presente estudo objetivou a avaliação do potencial regenerativo e trófico das CS e do fator neurotrófico PEDF sobre os neurônios da medula espinal através da cultura destas células *in vitro* assim como no modelo experimental da lesão medular contusa *in vivo*. CS foram cultivadas a partir de fragmentos de nervo ciático de ratos adultos jovens. As culturas primárias foram purificadas e utilizadas em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Para avaliar se a cultura de CS tratadas com o PEDF proporciona o trofismo dos neurônios da medula espinal, estes foram cultivados a partir de fragmentos da medula espinal de ratos Wistar neonatos e tratados com o meio condicionado das CS (MCCS) pré-tratadas ou não com formas específicas do PEDF. A resposta trófica foi estudada através da quantificação do número de células bem como da área dos prolongamentos e dos corpos celulares dos neurônios cultivados sobreviventes no decurso temporal da cultura, utilizando-se método estereológico específico. Em outra série de experimentos, Ratos Wistar adultos foram submetidos à lesão medular contusa no 10^o-11^o segmento torácico pelo sistema NYU Impactor e tratados com inoculações locais de CS e do seu meio condicionado na presença ou não do PEDF. Ao término do procedimento cirúrgico, os ratos foram submetidos aos testes do comportamento BBB, CBS durante 6 semanas. Os tratamentos aplicados à cultura de neurônios da medula espinal demonstraram que o MCCS, pré-tratado ou não com diferentes formas moleculares do PEDF e os fatores por si só possuem ações tróficas e plásticas em relação aos neurônios da medula espinal. Foi observado que o MCCS exerceu um efeito de arborização e de trofismo sobre o corpo neuronal dos neurônios medulares, sendo que este efeito foi potencializado quando o MCCS foi obtido a partir de CS pré-tratadas com os fatores nPEDF ou coPEDF, e de intensidade ainda maior quando as formas puras dos fatores em questão foram adicionadas à cultura. Os animais submetidos ao trauma contuso da medula espinal que foram tratados com a inoculação das CS, pré-tratadas ou não com o nPEDF, do meio condicionado destas células e dos fatores nPEDF e coPEDF apresentaram melhor recuperação funcional em relação ao grupo controle. A partir dos dados obtidos neste trabalho pode-se dizer que as CS, seu meio condicionado e o PEDF possuem ações importantes sobre os neurônios da medula espinal, possibilitando a modulação do processo de recuperação funcional deste órgão após o trauma.

Palavras-chave: células de Schwann, PEDF, neurônios, lesão medular contusa, neuroplasticidade, trofismo.

ABSTRACT

The present study aimed the assessment of the trophic and regenerative potential of the Schwann cells (SC) and of the neurotrophic factor PEDF on the spinal cord neurons by means of cultures of those cells *in vitro* as well as in an experimental model of a contused spinal cord lesion *in vivo*. SC were cultivated from sciatic nerves fragments of young adult rats. The primary cultures were purified and used in *in vitro* and *in vivo* experiments. To evaluate if the SC cultures treated with PEDF provide the trophism of the spinal cord neurons, these were cultivated from spinal cords fragments of new born rats and treated with SC conditional medium (SCCM), of cells pre-treated or not with specific isoforms of PEDF. The trophic responses were analyzed by the quantification of the cell number, and the area of sprouting and perycaria of the survived neuronal cells in the culture time course using a specific stereological method. In another series of experiment, adults Wistar rats were submitted to a contuse spinal cord lesion in the 10^o-11^o thoracic level by means of the NYU Impactor and treated with local injection of SC and your CM with the presence or not of the PEDF. In the end of the surgical procedure, the rats were submitted to behaviors testes as the BBB and the CBS during the 6 follow weeks .The spinal cord neuron treatments show that the SCCM, pré-treated or not with specific molecular isoforms of PEDF and this factors by themselves demonstrated trophic and plastic actions with the spinal cord neurons. It was observed that the SCCM exerted a sprouting and trophic effect on the neuronal body of the spinal cord neurons, and that this effect was enhanced when the SCCM was achieved from SC pre-treated with PEDF, and even better when the pures forms of the PEDF was added to the culture. The animals that received the spinal cord lesion and were treated with injection of SC, pre-treated or not with nPEDF, or with the conditioned medium of those cells and the factors nPEDF or coPEDF showed a better functional recovery when compared to the control groups. The results of this study showed that the SC, your conditioned medium and the PEDF play an important role in the spinal cord neurons, allowing the modulation of the functional recovery process of this organ after the trauma.

Key words: Schwann cells, PEDF, neurons, spinal cord lesion, neuroplasticity, trophism

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09.05.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0294/07**, intitulado: **"ANÁLISE DO POTENCIAL DAS CÉLULAS DE SCHWANN CULTIVADAS E TRATADAS COM O PEDF FAVORECEREM O TROFISMO DE NEURÔNIOS MEDULARES IN VITRO E INDUZIREM A REGENERAÇÃO E A RECUPERAÇÃO MOTORA DE RATOS SUBMETIDOS AO TRAUMA CONTUSO DA MEDULA ESPINAL PELO IMPACTOR"**, apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: **Gerson Chadi**

Pesquisador (a) Executante: **Beatriz de Freitas Azevedo Levy**

CAPPesq, 09 de maio de 2007



PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

SUMÁRIO

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 O Fator Neurotrófico PEDF.....	13
3.2 Experimentos <i>In Vitro</i>	13
3.2.1 <i>Cultura Primária de Células de Schwann (CS)</i>	13
3.2.2 <i>Procedimento Imunocitoquímico das Células de Schwann</i>	15
3.2.3 <i>Análise do Efeito Mitógeno do PEDF nas Culturas de Células de Schwann</i>	15
3.2.4 <i>Cultura primária de neurônios motores da Medula Espinal</i>	16
3.2.5 <i>Aquisição do meio condicionado de CS cultivadas com PEDF</i>	18
3.2.6 <i>Tratamentos dos neurônios da Medula Espinal</i>	18
3.2.7 <i>Quantificação da área dos prolongamentos e dos corpos celulares dos</i> <i>neurônios da Medula Espinal cultivados</i>	19
3.3. Experimentos <i>In Vivo</i>	20
3.3.1. <i>Tratamento das CS com o PEDF</i>	20
3.3.2 <i>Lesão Medular Contusa</i>	20
3.3.3. <i>Inoculação das CS</i>	22
3.3.4. <i>Análise Comportamental</i>	22
3.3.4.1 <i>Índice BBB</i>	23
3.3.4.2. <i>Índice CBS</i>	25
3.4. <i>Análise Estatística</i>	27

4. RESULTADOS.....	28
4.1 Experimento <i>in vitro</i>	28
4.1.1 Obtenção das Células de Schwann.....	28
4.1.2 Efeito Mitogênico do PEDF sobre as Células de Schwann Cultivadas	32
4.1.3 Quantificação Esterológica dos Neurônios Cultivados.....	33
4.1.3.1 Número de Prolongamentos por Neurônio.....	36
4.1.3.2 Tamanho do Corpo Neuronal por/ Neurônio.....	39
4.1.3.3 Número de Neurônios Remanescentes.....	42
4.2 Experimento <i>in vivo</i>	44
4.2.1 Lesão Medular Contusa.....	44
4.2.2 Análise Comportamental BBB.....	46
4.2.3 Análise Comportamental CBS.....	51
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

Regeneração do Sistema Nervoso

O conceito de que o Sistema Nervoso Central (SNC) não possui capacidade para se regenerar após uma lesão começou a ser questionado no início do século passado quando Santiago Ramon y Cajal realizou experimentos onde mostrou a resposta regenerativa em axônios centrais lesados (Ramon y Cajal, 1914 apud Stahnisch e Nitsch, 2002).

No entanto, a regeneração dos axônios centrais é limitada pelo ambiente do SNC, o qual possui características inibitórias, assim como pela ausência de condições favoráveis para o crescimento axonal. Células gliais como os astrócitos e os oligodendrócitos medeiam essa inibição através da formação de uma cicatriz glial (Fawcett e Asher, 1999; Logan e Berry, 2002) ou da expressão de proteínas mielínicas inibitórias (Filbin, 2003; Woolf, 2003). Assim, a incapacidade dos neurônios centrais em se regenerarem parece não ser devido a um déficit intrínseco dessas células, mas sim uma característica do meio ambiente do SNC que não oferece suporte regenerativo.

Um dos principais objetivos da Neurociência é entender o processo de contenção regenerativa existente no SNC, e de criar estratégias que permitam contornar esse fato com o mínimo de efeitos colaterais possíveis (Horner e Gage, 2000).

Uma das hipóteses que poderia explicar a natureza inibitória do SNC é o fato de que esse ambiente foi desenvolvido com o propósito principal de manutenção da estabilidade homeostática (Taylor e Bampton, 2004). Os astrócitos respondem à lesão através da formação de uma cicatriz glial com o intuito de isolar a área lesada, impedir a expansão da lesão e dar suporte para as regiões que permaneceram preservadas (Morgenstern et al 2002; Rhodes et al 2003). A função normal das proteínas inibitórias associadas à mielina provavelmente é o

mecanismo utilizado pelo SNC para prevenir a arborização neuronal após um período em que as conexões neurais já foram criadas (Liu et al, 2002; Colello e Schwab, 1994).

No entanto, Aguayo e colaboradores demonstraram em 1981, que o SNC possuía capacidade regenerativa considerável desde que condições favoráveis fossem fornecidas para o crescimento axonal (Aguayo et al., 1981). Também já está claro que após um episódio de lesão do SNC, os neurônios não lesados são capazes de criar novos prolongamentos, o que demonstra claramente uma capacidade plástica do SNC mesmo na vida adulta (Raineteau e Schwab, 2001; Raineteau et al., 2002). Ainda, além de mudanças que ocorrem diretamente no local da lesão, o SNC também é capaz de se reorganizar sob certas circunstâncias. Essa organização pode ocorrer em dois níveis distintos: nos circuitos pré-existentes através de modificações nas conexões sinápticas, evento conhecido como plasticidade sináptica; ou devido da formação de novos circuitos através do brotamento axonal e dendrítico, estes conhecidos como plasticidade anatômica (Raineteau e Schwab, 2001).

Em uma visão otimista, essa plasticidade nos fornece esperança de uma recuperação funcional, tanto através da regeneração de neurônios lesados como também da arborização de tractos axonais. No entanto, esse fato também levanta uma questão polêmica, onde o descontrole do processo regenerativo poderia resultar em um crescimento axonal de forma desordenada e o estabelecimento de conexões aberrantes, as quais no futuro podem resultar em um dano pior do que a perda da função por si só (Edgerton et al., 2001).

Em contraste com o SNC, o sistema nervoso periférico (SNP) possui capacidade regenerativa, e sua função pode ser restaurada após lesão do nervo (Fawcett e Keynes, 1990). O agente principal que possibilita o sucesso da capacidade de regeneração dos nervos é a presença das células de Schwann (CS) (Ramer et al., 2000; Evans, 2001; Zhang et al., 2001). A participação das CS no fenômeno de regeneração neuronal já é conhecida por inúmeras décadas. Em 1911, Tello, um aluno de Cajal, implantou segmentos do nervo ciático no córtex

cerebral de coelhos adultos e após 14 dias foi capaz de observar axônios corticais crescendo através e ao redor dos enxertos de nervos (DeFelipe e Jones 1991). Essa atividade neurotrófica foi atribuída às CS e contribuiu para a visão de que essas células podem ser as participantes chave para a grande capacidade regenerativa do SNP quando comparado ao SNC.

É válido lembrar, no entanto, que a regeneração do SNC envolve várias etapas onde primeiro as células nervosas precisam sobreviver ao trauma, e então os axônios lesados devem re-crescer em direção à sua célula alvo original. Uma vez que o contato foi estabelecido, este axônio precisa ser mielinizado e sinapses funcionais precisam se formar (Horner e Gage, 2000).

Fatores Neurotróficos

O desenvolvimento do sistema nervoso (SN) é um processo longo e que envolve inúmeras etapas. Entre a neurogênese e a sinaptogênese, um único neurônio se depara com uma variedade de fatores ambientais que podem influenciar profundamente seu crescimento, diferenciação e sobrevivência (Zigmond et al, 1999). Alguns estudos demonstram o papel essencial dos fatores neurotróficos (FNT) na sobrevivência dos motoneurônios. O músculo esquelético, sendo o órgão alvo para o motoneurônio, é fonte de diversos FNT incluindo o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina 3 (NT-3), o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) (Maisonpierre et al., 1990; Vejsada et al., 1995; Becker et al., 1998).

Somado ao efeito de promoção da sobrevivência, os FNT também estão envolvidos no processo de diferenciação neuronal e crescimento axonal (Unsicker et al., 1978; Leonard et al., 1988). Alguns estudos postulam ainda um papel chave dos FNT na modulação da atividade sináptica em fenômenos de neuroplasticidade (Klintsova e Greenough, 1999; Seil e Drake-

Baumann, 2000; Wang et al., 2002) como, por exemplo, através capacidade desses fatores aumentarem a produção e liberação de neurotransmissores em sinapses centrais e periféricas (Carmignoto et al., 1997; Ho et al., 2000; Poo, 2001).

As células gliais representam uma importante fonte natural de FNT, promovendo um efeito positivo na sobrevivência neuronal e crescimento axonal não somente durante o processo de desenvolvimento do SN, mas também após um episódio de lesão. (Pellittere et al, 2006).

A influência recíproca entre neurônios e glia foi estabelecida através de demonstrações de que os FNT produzidos pelos neurônios promovem a proliferação, o desenvolvimento e a sobrevivência de células gliais (Hatten, 1985), assim como a formação das sinapses (Nagler et al.,2001). A co-cultura de astrócitos e neurônios têm demonstrado que a regulação da arborização neuronal é intermediada por FNT que são liberados pelos astrócitos (Vaca e Wendt, 1992).

Células de Schwann

As CS foram descobertas no séc. XIX por Theodore Schwann, ao observar que havia um tipo celular que envolvia os axônios do SNP. Enquanto os neurônios formam a base do SN, as células gliais, como as CS, são essenciais para a sobrevivência e funcionamento das células neurais (Bhatheja e Field, 2006).

As CS são responsáveis pela mielinização dos axônios do SNP e, durante o desenvolvimento ou após um episódio de lesão, oferecem suporte trófico para os neurônios e funcionam como guias para os axônios que ainda não atingiram o seu alvo de inervação (Riethmacher et al., 1997; Bhatheja e Field, 2006). Diferente dos oligodendrócitos, que são responsáveis pela mielinização do SNC, após um insulto neste sistema, as CS entram em mitose rapidamente e migram para o local da lesão na tentativa de reparar o dano existente

(Jessen e Mirsky, 2005).

As CS se originam da crista neural, onde ocorre a formação de uma CS precursora durante o desenvolvimento, a qual se transforma em CS imaturas até o nascimento. Após o nascimento, as CS imaturas se transformam em sua grande maioria em CS mielinizantes e em menor número em células não mielinizantes (Jessen et al., 1994).

Diversos estudos exploram o uso de células de Schwann (CS), o principal regente celular na regeneração dos nervos periféricos, no tratamento da lesão da medula espinal na tentativa de maximizar a regeneração e a remielinização axonal, com vistas ao ganho neurofuncional (Martin et al., 1996; Franklin et al., 1997; Azanchi et al., 2004).

As CS têm a capacidade de secretar diversos tipos de fatores neurotróficos como o NGF (fator de crescimento do nervo), o BDNF, o IGF (fator de crescimento insulínico), o FGF-2, o PEDF (fator derivado do epitélio pigmentado) além de outras neurotrofinas (Morrison et al., 1988; Henderson et al., 1993; LeRoith et al., 1993; Springer et al., 1994; Ide, 1996; Hammarberg et al., 1996; Menei et al., 1998; Sayers et al., 1998; Russel et al., 2000; Kubo et al., 2002; Lertsburapa et al., 2004).

Além de estarem envolvidas na produção de fatores neurotróficos, as CS ativam receptores específicos desses fatores, resultando na ativação de uma cascata de eventos intracelulares que modificam a morfologia, a sobrevivência e a capacidade funcional dos neurônios (Yuen et al., 1996).

Pellitteri et al. (2006) demonstraram que essas células são capazes de promover a sobrevivência neuronal e o crescimento neurítico em co-culturas de CS com neurônios glutamatérgicos. Os resultados do grupo foram similares às culturas tratadas com FGF ou IGF, sendo que as mesmas condições eram observadas quando os neurônios eram mantidos com o meio condicionado das CS. Isso sugere que provavelmente as propriedades do meio condicionado das CS são mediadas via moléculas solúveis que são secretadas em seu meio de

cultura, as quais possuem um efeito trófico.

Em outro estudo, os autores demonstraram que o meio condicionado das CS é capaz de restaurar a formação da junção neuromuscular em co-culturas de músculos e nervos, assim como que o produto secretado pelas CS também está envolvido com a promoção da sinaptogênese (Peng et al., 2003).

Por fim, outra vantagem no uso dessas células se deve a características técnicas já que o seu número pode ser rapidamente aumentado *in vitro* dentro de um curto período de tempo (Morrissey et al., 1991).

Células de Schwann no Reparo da Lesão Medular Contusa

A medula espinal é um órgão que quando lesado pode desenvolver alterações estruturais, funcionas e bioquímicas que refletem no comportamento sensório-motor. Logo após a lesão deste órgão, muitas células morrem devido ao dano primário e, na tentativa de contornar o dano existente, os axônios dos neurônios sobreviventes precisam crescer ao longo do local da lesão e encontrar a sua célula alvo inicial. No entanto, o evento do trauma primário, leva à formação de um cenário inibitório para a regeneração axonal (Klussmann e Martin-Villalba, 2005).

Minutos e até semanas depois do trauma primário, uma variedade de processos secundários pode exacerbar o dano pré-existente. A diminuição do influxo sanguíneo no local leva a hipóxia de células, o influxo maciço de cálcio resulta em excitotoxicidade e consequentemente na produção de radicais livres, células inflamatória como os neutrófilos, linfócitos, macrófagos e neuroglias invadem a área da lesão (Fawcett e Asher, 1999; Oudega et al., 2005).

Esses eventos inflamatórios e citotóxicos resultam na perda progressiva de tecido

espinal, provocando uma autodestruição secundária que culmina com a morte de oligodendrócitos, impedindo a mielinização dos axônios íntegros e na formação de uma cicatriz glial que é altamente inibitória para o crescimento das fibras, ficando estas impedidas de encontrarem suas células-alvo de inervação (Anderson e Hall 1993; Beattie et al., 2002).

Inegavelmente, a regeneração axonal na medula espinal lesada é obstrutiva (Silver e Miller, 2004). Inúmeros axônios não são capazes de se alongarem e falham na tentativa de se tornarem parte de novos circuitos axonais que envolvem a recuperação motora. Assim, a primeira ação possível após um trauma medular é limitar a morte celular e conter a natureza maléfica dos eventos secundários à lesão primária (Klussmann e Martin-Villalba, 2005; Oudega, 2007).

O transplante de populações purificadas de CS parece ser uma alternativa viável na tentativa de controlar os fatores restritivos relacionados ao micro-ambiente regenerativo. Diversos grupos de autores já realizaram experimentos envolvendo as CS e a lesão medular contusa. Em 1993, Martin e colaboradores demonstraram que a inoculação dessas células na medula espinal de ratos lesados promoveu a regeneração axonal, principalmente dos axônios localizados próximo ao gânglio da raiz dorsal. O mesmo grupo realizou outro experimento onde a inoculação das CS era realizada em diversos períodos de tempo após a lesão e concluiu que a sobrevivência dessas células é inversamente proporcional ao tempo em que elas são inoculadas na medula após o trauma (Martin et al., 1996).

Takami et al. (2002) inocularam CS na medula espinal do rato lesado e demonstrou que três meses após a lesão, o enxerto de CS estava bem integrado na medula espinal e promoveu diminuição do dano tecidual, regeneração axonal e mielinização dos axônios remanescentes. Este estudo demonstrou ainda que os animais que receberam o enxerto das CS obtiveram melhor recuperação comportamental ao serem submetidos ao teste locomotor de campo aberto, o BBB, (teste este descrito por Basso et al., 1995; Basso et al., 1996).

Xu et al. (1997) demonstraram que as CS cultivadas e implantadas na medula espinal de ratos lesados aumentaram o processo de regeneração das fibras neuronais, fenômeno conseguido pela diminuição da cicatriz glial e indução da remielinização axonal.

No entanto, a sobrevivência das CS no ambiente lesivo é comprometida devido a uma série de eventos imunológicos, inflamatórios, tóxicos e apoptóticos que ocorrem concomitantemente à inoculação dessas células (Anderson e Hall 1993; Schnell et al., 1999). No sentido de investigar mais especificamente a sobrevivência das CS inoculadas, Barakat et al. (2005), transfectaram as CS com a proteína verde fluorescente (GFP) previamente a sua implantação na medula do rato e verificaram que dois meses após a lesão medular contusa, 17% de um total de 2×10^6 células haviam sobrevivido.

Está claro através dos estudos mencionados acima que a inoculação de CS no modelo experimental de lesão medular contusa resulta em efeitos regenerativos que quando somados podem ser a base de uma melhora, embora ainda modesta, da recuperação do comportamento sensório motor dos animais. No entanto, parece que enxerto de CS sozinho não é o tratamento mais adequado para a aquisição significativa de um restauro fisiológico e funcional. Sendo assim, a adição de uma nova abordagem de intervenção, acompanhada da inoculação de CS pode promover um aumento da capacidade de regeneração medular após o trauma.

No sentido de aumentar a sobrevivência celular e a permissividade axonal, as CS podem ser combinadas com fatores neurotróficos, uma vez que a adição desses fatores à cultura das células e consequentemente o aumento deles por essas células parece ser uma alternativa viável para o aumento do potencial neuroregenerativo das CS (Grill et al., 1997; Broude et al., 1999; Liu et al., 1999; Coumans et al., 2001; Himes et al., 2001; Bregman et al., 2002).

Foi demonstrado por Iannotti e colaboradores (2003) que a inoculação do GDNF juntamente com as CS na lesão da medula espinal do rato proporciona um aumento significativo da regeneração e remielinização axonal além da redução do infiltrado de

macrófagos no local da lesão. Adicionalmente, a capacidade regenerativa das CS foi potencializada pela administração do FGF-2 em ratos com lesão medular (Meijs et al., 2004).

Nesta mesma linha de pesquisa, CS combinadas com os FNT BDNF e NT-3 promoveram o aumento da permissividade axonal no local da lesão, assim como o aumento da arborização desses axônios, sendo que os resultados obtidos não foram observados quando os FNT em questão foram inoculados na ausência da CS (Bamber et al., 2001).

Na procura de novos fatores neurotróficos que possam aumentar a capacidade trófica das CS, postula-se que aqueles produzidos por células da medula espinal e que reconhecidamente ativam as CS podem ser os mais efetivos neste processo.

Fator Neurotrófico Derivado do Epitélio Pigmentado

O fator neurotrófico derivado do epitélio pigmentado (PEDF) é uma glicoproteína de 50kDa da família das serpinas (Steele et al., 1993). As serpinas consistem uma importante família de proteínas de estrutura globular, geralmente envolvidas na regulação de eventos proteolíticos ou no transporte hormonal (Tombran-Tink et al., 1996). Este fator neurotrófico foi identificado pela primeira vez por Tombran-Tink e Johnson (1989), colaboradora deste projeto, em um meio condicionado de células epiteliais do pigmento da retina humana; a primeira função trófica identificada deste fator foi a de aumentar a sobrevivência de neurônios da retina (Becerra et al., 1997; Tombran-Tink e Barnstable, 2003).

Sabe-se agora que o PEDF é secretado pela maioria dos tecidos humanos como o cérebro (Bilak et al., 1999), a medula espinal, a retina, os ossos, o coração e o pulmão (Ek et al., 2006), sugerindo que este fator é capaz de exercer ações tróficas às células de origens múltiplas. No final dos anos 90, uma potente atividade anti-angiogênica do PEDF foi descrita, (Dawson et al., 1999), o que de fato pode influenciar o processo regenerativo do SNC por

interferir, deste modo, nos eventos de reparo e cicatrização. Sabe-se hoje que o PEDF é capaz de proteger os neurônios granulares do cerebelo, neurônios hipocámpais e neurônios motores medulares dos efeitos apoptóticos induzidos pela toxicidade glutamatérgica (Taniwaki et al., 1997; Bilak et al., 1999; DeCoster et al., 1999).

Estudo realizado por Houenou e colaboradores (1999) ressalta a importância do PEDF no trofismo dos neurônios motores periféricos, cujos corpos celulares estão localizados no corno anterior da medula espinal. Os autores demonstram que a secção do nervo ciático de ratos neonatos causa a morte de cerca de 50% dos neurônios motores e a atrofia da maioria dos outros 50% sobreviventes. Com a aplicação de PEDF no local onde o nervo foi lesado, a morte dos neurônios motores reduziu em 57% e preveniu completamente a atrofia das células sobreviventes. Os resultados mostram que o PEDF previne a morte celular e promove o crescimento dos neurônios motores periféricos medulares em modelos *in vivo* e *in vitro*. Assim, o PEDF parece exercer efeitos tróficos nos neurônios medulares, abrindo a possibilidade da sua utilização no tratamento de doenças neurodegenerativas e neurotraumáticas desta região do SNC.

Finalmente, Bilak e colaboradores (2002) investigaram a presença e a distribuição do receptor do PEDF na medula espinal, e demonstraram que os neurônios motores possuem sítios de ligações específicos para o PEDF, no entanto, a presença deste receptor nas CS ainda não foi comprovada.

Em virtude da importância crescente das CS nos processos tróficos regenerativos da medula espinal lesada e do papel trófico que começa a ser descrito do PEDF aos neurônios medulares motores, este trabalho abordou a análise dos efeitos da combinação de ambas as abordagens no trofismo dos neurônios medulares *in vitro* e na contenção da evolução clínica e histopatológica da lesão medular contusa de intensidade moderada em ratos promovida pelo New York University (NYU) Impactor.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

2.1.1 Analisar *in vitro* a capacidade do PEDF em promover um efeito mitógeno na cultura de CS.

2.1.2. Analisar *in vitro* a capacidade das CS, estimuladas pelo PEDF, promover o trofismo dos neurônios cultivados da medula espinal do rato.

2.1.3. Analisar *in vivo* o potencial do PEDF em aumentar a eficácia das CS inoculadas na lesão contusa da medula espinal do rato na recuperação do comportamento motor do animal.

2.2. Específicos

2.2.1. Analisar a capacidade de formas moleculares específicas do fator neurotrófico PEDF ativarem o processo de divisão celular das CS cultivadas a partir de fragmentos do nervo ciático do rato.

2.2.2. Analisar a capacidade do meio condicionado de CS pré-tratadas com formas moleculares específicas do PEDF em aumentar o número de prolongamentos dos neurônios da medula espinal cultivados, estudada quantitativamente por método estereológico específico.

2.2.4. Analisar a capacidade do meio condicionado de CS pré-tratadas com formas moleculares específicas do PEDF de evitar a atrofia dos corpos celulares dos neurônios da medula espinal cultivados, estudada quantitativamente por método estereológico específico.

2.2.4. Analisar a capacidade do meio condicionado de CS pré-tratadas com formas

moleculares específicas do PEDF de diminuir a morte celular natural dos neurônios da medula espinal cultivados, estudada quantitativamente por método estereológico específico.

2.2.5. Estudar se formas moleculares específicas do PEDF podem alterar a capacidade das CS, quando inoculadas na medula espinal do rato submetida ao trauma contuso a modificarem a recuperação motora, analisada quantitativamente pelo BBB, CBS e movimento espontâneo em campo aberto por registro de calor à incidência de luz infravermelha.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 O Fator Neurotrófico PEDF

Os experimentos realizados neste trabalho utilizaram duas isoformas do PEDF, o nPEDF e o coPEDF. Ambas as formas foram enviadas pela pesquisadora Joyce Tombran-Tink, a qual é colaboradora deste projeto e descobridora da molécula PEDF.

O nPEDF é a forma nativa da molécula PEDF, possuindo peso molecular de 50 kDa. O coPEDF é um códon otimizado para ser expresso em bactérias, essa alteração, permite que a sua produção seja 15(quinze) vezes maior em comparação com a forma nativa. Ambas as isoformas do PEDF possuem sequências protéicas idênticas, porém, o coPEDF possui um peso molecular de 65 kDa devido a uma fusão com um n-terminal em sua cadeia polipeptídica, o que permite o bom ancoramento e expressão desta proteína.

3.2 Experimentos *In Vitro*

3.2.1 *Cultura Primária de Células de Schwann (CS)*

A cultura primária de CS foi baseada no protocolo de Morrissey et al., (1991). Nervos ciáticos foram obtidos de ratos machos Wistar adultos jovens pesando em média 250gr. Os animais foram tricotomizados e os nervos foram retirados bilateralmente e colocados em uma placa de petri de 60 mm com meio Leibovitz-15 (L-15; Gibco, EUA). Todo o excesso de tecido como de músculo, gordura e vasos sanguíneos, assim como o perineuro, foram removidos com o auxílio de uma lupa.

Após a limpeza, os nervos foram cortados em pequenos fragmentos com cerca de 1 mm

cada para a obtenção dos explantes. Uma média de 20 explantes foram colocados em placas de petri de 60 mm e nutridos com solução D-10, composta por DMEN (Gibco, EUA), 0,1% de gentamicina (Life Technologies, EUA), e 10% de soro fetal bovino (Hyclone, EUA). Os explantes são cobertos completamente, porém sem flutuarem e, em seguida, incubados em estufa de CO₂ (6%) a 37°C. Esta etapa foi chamada de E1.

A solução D-10 destas placas foi trocada 2 vezes por semana, sendo os explantes transferidos para uma nova placa, aproximadamente uma vez por semana, dando início a cada semana, a uma nova etapa, sendo estas E2 e E3. Esta transferência foi feita sempre que observou-se grande quantidade de fibroblasto migrando a partir do explante.

A dissociação enzimática foi realizada no momento em que a maioria das células que migraram dos explantes eram CS, processo este que consiste em deixar os explantes pernitem em uma solução com dispase (1,25 U/ml, Boehringer Mannheim, Alemanha) e colagenase (0,05% Worthington, Freehold, EUA). Após esta etapa, as células foram retiradas juntamente com o meio da placa, centrifugadas e semeadas em placas de 100 mm com solução D10 Mitógeno, composto por D-10, forskolina (2 uM/ml; Sigma, EUA) e extrato pituitário bovino (20 µg/ml; Biomedical Technologies, EUA). 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, University of Miami, EUA) e complemento sérico de coelho (ICN Pharmaceuticals, EUA) para a eliminação dos fibroblastos restantes. Após o tratamento, as células foram amplificadas, sendo que cada placa teve metade de sua população de células deslocada para uma outra placa para a divisão celular. Toda vez que as células se tornavam confluentes era computada como uma nova etapa, sendo P1 a primeira, e, P3 a última. Ao término da terceira semana de amplificação, a nova geração de células (P3) confluída em toda a extensão da placa foi submetida ao regime de tratamento.

3.2.2 Procedimento Imunocitoquímico das Células de Schwann

Para avaliar a pureza da cultura, as CS em P3 foram semeadas em placas de 35 mm na densidade de 3×10^5 células. No dia seguinte ao plaqueamento, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas 2 vezes com solução tampão fosfato (PBS). Após a lavagem, a cultura foi fixada com 4% de paraformoldeído por 30 minutos, seguido por uma lavagem sob agitação de 5 minutos com PBS.

A permeabilização das células foi realizada através da adição de uma solução de 1% de triton em PBS por 10 min, e duas lavagens de 5 minutos, a primeira com uma solução composta por PBS e 0,02% Tween 20 e a segunda com uma solução de PBS, 0,02% de Tween 20 e 1% de albumina soro bovina (BSA). As células foram então bloqueadas com PBS, 2% de soro normal de cabra (NGS), 4% BSA, 0,2% triton por 30 minutos em temperatura ambiente.

O anticorpo S100 β (SIGMA, EUA) foi encubado por 18 horas na concentração de 1/500 seguido por uma lavagem de PBS, 0,02% de Tween 20 e 1% BSA e incubação do anticorpo secundário fluorescente anti rabbit na concentração 1/40 por duas horas. Após a marcação do anticorpo secundário, a cultura foi analisada sob microscópio fluorescente.

3.2.3 Análise do Efeito Mitógeno do PEDF nas Culturas de Células de Schwann

Neste experimento placas de 24 poços foram utilizadas. Em cada poço, 2×10^5 células de Schwann foram plaqueadas com 300 μ l de meio mitógeno. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram tratadas com nPEDF ou coPEDF na concentração de 100ng/ml. O nPEDF corresponde à forma nativa do PEDF enquanto que o coPEDF corresponde a uma forma truncada.

As células permaneceram em cultivo até o término dos períodos pré-estipulados de 24, 48, 72 e 96 horas.

Os seguintes grupos foram criados para o tratamento:

Controle (n=4 para cada período do decurso temporal) – a cada período de 24 horas, 20% do meio das células foi substituído por meio fresco.

nPEDF (n=4 para cada período do decurso temporal) – a cada período de 24 horas 20% do meio das células foi substituído por nPEDF.

coPEDF (n=4 para cada período do decurso temporal) - a cada período de 24 horas 20% do meio das células foi substituído por nPEDF.

Ao término de cada período, as células foram descoladas das placas e contadas no hemocitómetro.

3.2.4 Cultura primária de neurônios motores da Medula Espinal

Os neurônios da medula espinal foram obtidos a partir de ratos Wistar com até 2 dias de idade com base no protocolo de Seybold e Abrahams (Seybold e Abrahams, 2004). Os animais foram rapidamente anestesiados com halotano e decapitados. O corpo do animal foi então imerso em uma solução de 70% de etanol por cerca de 3 minutos para esterilização.

A medula espinal foi retirada e teve a dura mater e vasos sanguíneos removidos com o auxílio de duas pinças finas, sem danificar o tecido. Em seguida, a medula espinal foi cortada em pedaços de cerca de 2 mm. Estes fragmentos foram macerados e transferidos para uma placa de petri de 60 mm com solução tampão gelada composta de 120mM de NaCl, 5mM de KCl, 1,2mM de KH_2PO_4 , 1,2mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25mM de NaHCO_3 e 13mM de Glicose.

Em ambiente estéril, o tecido e a solução foram transferidos da placa para um tubo falcon de 15 ml com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. O conteúdo do tubo foi homogeneizado 15 vezes. Depois de decantado, o tecido foi retirado cuidadosamente com uma pipeta Pasteur e transferido para um novo tubo falcon com mais solução tampão. Esse processo foi realizado mais duas vezes para que as células sanguíneas se desprendam do tecido. Após a última homogeneização e decantamento do tecido, a solução tampão foi então retirada e substituída por uma nova solução contendo tripsina/EDTA (0,5% tripsina e 0,02% EDTA em HBSS; Gibco, EUA). O tubo foi tampado e vedado com filme plástico estéril e incubado em banho maria sob agitação (80 ciclos/min) à 37°C por 30 minutos.

Após o banho maria, o tecido foi dissociado aproximadamente 15 vezes. O precipitado formado, após cerca de 1 minuto, é retirado com a pipeta Pasteur e transferido para um novo tubo com adição de solução tampão. Desse modo, o tecido foi dissociado e transferido para novos tubos, repetindo esse processo até não restar mais precipitado. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação por 10 minutos à velocidade de 1200 rpm/min à 21°C.

Após a centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em solução tampão. Quinze microlitros desta solução foram retirados e colocados no hemocítômetro para a contagem das células. Novamente, a solução foi centrifugada e, finalmente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuscitadas em meio D-10 e plaqueadas na densidade de 1800 cel/mm²

As células foram semeadas em placas de 12 poços (Corning, EUA), placas estas que foram previamente tratadas com poli-d-lisina (10mg/ml; Sigma, EUA) por 1 hora no mínimo e lavadas 2 vezes com água destilada autoclavada. As células foram nutridas com 400µl de meio D-10.

Após vinte e quatro horas da incubação dos neurônios da medula espinal, as células gliais foram eliminadas através do tratamento com citosina-arabinosídeo (10µM; Sigma, EUA). Este tratamento teve a duração de 1 dia.

3.2.5 Aquisição do meio condicionado de CS cultivadas com PEDF

CS em P3 foram cultivadas em placas de 35mm na densidade de 3×10^5 células, e nutridas com 1,5 ml de meio D-10 mitógeno.

As células permaneceram 3 dias em cultivo e após esse período, 100ng/ml dos fatores neurotróficos nPEDF ou coPEDF (gentilmente cedidos pela Dra. Joyce Tombran-Tink) foram dissolvidos no meio mitógeno. Setenta e duas horas depois, o meio foi retirado, aliquotado em eppendorfs e mantidos em freezer -70°C para posteriormente serem utilizados no tratamento dos neurônios da medula espinal.

3.2.6 Tratamentos dos neurônios da Medula Espinal

Após o tratamento da cultura de neurônios da medula espinal com citosina-arabinosídeo, descrito previamente, todas as placas foram lavadas 2 vezes com o meio D-10 e permaneceram com este meio por 3 dias para que as células se recuperassem do tratamento com a droga. Em seguida as placas de cultura foram divididas nos seguintes grupos:

-Meio Neuronal: As células foram nutridas 100% com meio D-10.

-Meio CS: As células foram nutridas 80% com meio D-10 e 20% com meio D-10/Mitógeno (meio utilizado para nutrir as CS)

-MCCS: As células foram nutridas 80% com meio D-10 e 20% com meio condicionado das CS.

-MC CS/nPEDF: As células foram nutridas 80% com meio D-10 e 20% com meio condicionado das CS tratadas com o nPEDF.

-MC CS/coPEDF: As células foram nutridas 80% com meio D-10 e 20% com meio

condicionado das CS tratadas com o coPEDF.

-nPEDF: As células foram nutridas 80% com meio D-10 e 20% com o fator nPEDF.

-coPEDF: As células foram nutridas 80% com meio D-10 e 20% com o fator coPEDF.

A cada período de 24 horas, 20% do conteúdo líquido de cada placa foi retirado e substituído pelo tratamento respectivo de cada grupo. Nove campos fotográficos equidistantes entre si foram obtidos em cada poço de cultura, nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas de tratamentos.

3.2.7 Quantificação da área dos prolongamentos e dos corpos celulares dos neurônios da Medula Espinal cultivados

As placas de cultura contendo os neurônios da medula espinal, submetidas aos diversos tratamentos descritos acima, foram colocadas no microscópio invertido acoplado à iluminação por contraste de fase. Utilizando objetiva de 40 vezes, as imagens foram coletadas a partir de 9 campos equidistantes entre si. Após esse procedimento, as imagens foram transferidas para o computador e as células analisadas quantitativamente através do método estereológico descrito previamente por Gomide e Chadi (1999). A moldura de contagem formada por 315 pontos com área definida de $3,15 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ foi sobreposta às imagens coletadas dos 9 campos da placa. Todos os prolongamentos neuronais e regiões dos corpos celulares dos neurônios que atingirem os pontos da moldura foram contados. A somatória do número de prolongamentos ou das regiões do corpo celular que atingiram os pontos da moldura foi dividida pelo número médio de neurônios existentes na foto. O decurso temporal dos parâmetros analisados foi então tratado estatisticamente como descrito no item 4.3 - Análise Estatística.

3.3. Experimentos *In Vivo*

3.3.1. *Tratamento das CS com o PEDF*

As SC em P3 foram cultivadas em placas de 100 mm na densidade de $1,5 \times 10^6$ por placa. No quarto dia pós plaqueamento as células foram tratadas com nPEDF na concentração de 100 ng/ml. O tratamento teve duração de 72 horas sem a troca do meio.

Após o período de tratamento, o meio condicionado das placas foi removido e aliqotado para ser utilizado no grupo experimental MC CS/nPEDF.

As células foram tratadas com tripsina/EDTA (0,5% tripsina e 0,02% EDTA em HBSS; Gibco, EUA), submetidas à centrifugação e contadas no hemocitômetro. Após a contagem, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas na quantidade exata de microlitros necessários para a inoculação. Cada animal recebeu 10 μ l de solução correspondente ao seu grupo. Neste volume de solução, foi ou não adicionada 10^6 células de acordo com o grupo estipulado.

3.3.2 *Lesão Medular Contusa*

Ratos Wistar machos e adultos foram anestesiados com pentobarbital sódico via intraperitoneal (i.p., 35 a 40 mg/kg) e submetidos à laminectomia da 10^a ou 11^a vértebra torácica, a medula espinal foi exposta sem que houvesse lesão da dura-máter subjacente. A lesão contusa foi promovida utilizando-se um equipamento desenvolvido na Universidade de Nova Iorque denominado NYU Impactor. 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 à laminectomia utilizando-se grampos vertebrais específicos. Um peso de 10 gramas caiu livremente de uma altura de 25 mm para a promoção da lesão contusa de intensidade moderada. Um potenciômetro óptico digital registrou todos os dados como a trajetória da queda do peso, a velocidade do impacto (ImpV, m/s), a distância da medula espinal ao peso (mm), a compressão (mm) e a taxa de compressão (Cr, m/s) da medula espinal através de um software específico. O mesmo programa gerou gráficos que mostraram estes parâmetros (Chadi et al., 2001).

O experimento *in vivo* foi composto de 10 grupos:

-Sham: cirurgia simulada sem lesão contusa com inoculação de D-10/Mitógeno (n=6).

-Contusa: lesão contusa de intensidade moderada com inoculação de D-10/Mitógeno (n=6).

-Células de Schwann: lesão contusa de intensidade moderada com inoculação de CS (n=6).

-Meio Condicionado das Células de Schwann: lesão contusa de intensidade moderada com inoculação de MCCS (n=6).

-Células de Schwann /nPEDF: lesão contusa de intensidade moderada com inoculação de CS tratadas previamente com nPEDF (n=6).

-Células de Schwann /coPEDF: lesão contusa de intensidade moderada com inoculação de CS tratadas previamente com coPEDF (n=6).

-Meio Condicionado das Células de Schwann pré-tratadas com nPEDF (MC CS/nPEDF): lesão contusa de intensidade moderada com inoculação de MC CS/nPEDF (n=6)

-Meio Condicionado das Células de Schwann pré-tratadas com coPEDF (MC CS/coPEDF): lesão contusa de intensidade moderada com inoculação de MC CS/coPEDF (n=6)

-nPEDF: lesão contusa de intensidade moderada com inoculação de nPEDF (n=6)

-coPEDF: lesão contusa de intensidade moderada com inoculação de coPEDF (n=6)

3.3.3. Inoculação das CS

Imediatamente após as lesões medulares, as CS pré-tratadas (n=6) ou não (n=6) com o nPEDF foram injetadas estereotaxicamente no epicentro da lesão. Como dito anteriormente, cada animal recebeu um volume de 10 μ contendo ou não 10⁶ células ou o meio condicionado das células. As injeções medulares foram feitas com agulhas de vidro de 200 μ m de diâmetro externo obtidas pelo puxador de pipetas (Kopt). Essas agulhas foram acopladas às seringas Hamilton de 50 μ l para promoção da injeção manual que durou de 2 a 3 minutos cada.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em ambiente com condições favoráveis e constantes (temperatura de 22°C, umidade de 55%, luminosidade de 12 horas por dia e filtragem bacteriológica do ar) e submetidos à análise do comportamento motor durante 6 semanas. Durante 10 dias do período pós-cirúrgico todos os animais receberam antibioticoterapia preventiva composta de Ceftriaxona Sódica na proporção de 40 mg/kg/dia, por via intramuscular (i.m.).

3.3.4. Análise Comportamental

A análise comportamental foi realizada nos animais 48, 72 horas, bem como 1, 2, 3, 4, 5 e 6 semanas após a cirurgia. Alterações referentes à sensibilidade e à motricidade foram avaliadas através dos testes BBB e CBS.

3.3.4.1 Índice BBB

O índice BBB (Tabela 1) foi desenvolvido por Basso, Beattie e Bresnahan (Basso et al., 1996) para ser utilizado na avaliação de padrões de recuperação da movimentação dos membros posteriores de ratos submetidos a lesões parciais da medula espinal usando o NYU Impactor. Sua pontuação varia de 0 a 21 e divide-se em três momentos:

- de 0 a 7: corresponde aos movimentos das articulações dos membros posteriores nos estágios iniciais de recuperação.
- de 8 a 13: avaliação dos passos e coordenação na fase intermediária de recuperação.
- de 14 a 21: avaliação da movimentação fina das patas usadas durante a locomoção.

Escala BBB de Taxa Locomotora

0	Sem movimento do membro posterior
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 movimento 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 movimento perceptível da terceira
7	Movimento amplo de todas as três articulações do membro posterior
8	Arrasta sem suporte de peso ou colocação plantar da pata sem suporte de peso
9	Colocação da pata com suporte de peso somente quando parado (em posição estática) ou passos 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 membro posterior (MA e MP).
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 consistentes 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 ocasionais.
15	Coordenação MA-MP consistente e arrasta dedos ao longo do passo
16	Coordenação MA-MP consistente durante a marcha e frequentemente 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 frequentemente 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 do 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 (BBB Score).

3.3.4.2. Índice CBS

As análises comportamentais sensório-motoras também foram testadas pelo “Combined Behavioral Score” (CBS) que é uma escala de comportamento composta por um conjunto de testes que permitem que a graduação percentual do déficit medular possa ser definida. Sua descrição e graduação seguem abaixo:

a) Escala de Tarlov: baseia-se na atividade motora espontânea. Cada membro posterior é observado individualmente e classificado segundo a escala abaixo:

Pontos	Comportamento
0	Sem movimentos dos membros posteriores, não fica de pé
1	Apenas movimentos perceptíveis dos membros posteriores, não fica de pé
2	Frequente e/ou rigoroso movimento dos membros posteriores, não fica de pé
3	Pode ficar de pé e dar um ou dois passos
4	Deambula com leve déficit
5	Deambula normalmente

b) Extensão dos dedos dos pés: reflexo presente quando elevamos o rato pelo corpo e os membros ficam livres.

Pontos	Comportamento
0	Sem extensão dos dedos dos pés
1	Leve extensão dos dedos
2	Extensão normal dos dedos

c) Reflexo de Colocação Plantar: o rato é suportado pelo tronco e os membros pélvicos ficam livres. O reflexo consiste na colocação nos pés em uma borda estreita

Pontos	Comportamento
0	Sem tentativa de colocação dos pés
1	Leve tentativa de colocação dos pés
2	Colocação dos pés

d) Reflexos de retirada em resposta à: 1-Extensão: reflexo de extensão dos membros posteriores após extensão. 2-Dor: reflexo de retirada após beliscar a pata posterior com um prendedor de roupas. O estímulo aplicado não é suficientemente forte e prolongado para causar lesão. 3-Pressão: pressiona-se entre o hálux e segundo dedo dos membros posteriores.

Cada reflexo é codificado seguindo:

Pontos	Comportamento
0	Sem retirada
1	Leve retirada
2	Reflexo de retirada normal
3	Reflexo de retirada hiperativo

e) Reflexo de Endireitamento: o rato em decúbito dorsal na mesa.

Pontos	Comportamento
0	Sem tentativa de endireitar-se
1	Tentativa leve ou lenta de rolar em direção ao endireitamento
2	Reflexo de endireitamento normal

f) Plano Inclinado: O rato é colocado de cabeça para baixo em um plano emborrachado. O ângulo do plano é aumentado de zero grau até o ponto em que o rato não possa se manter na posição por 5 segundos. O plano é inclinado novamente até o ponto em que o rato perde a sua posição e o animal é reposicionado para ajustes da inclinação. Ratos normais mantêm-se no plano com uma inclinação de 50 a 60 graus (Rivlin e Tator, 1977).

O CBS originalmente descrito é composto de mais dois testes: resposta ao calor e à natação. Não realizamos estes testes por não consideramos os mesmo convenientes aos animais no período pós-operatório imediato. Então, a graduação dada por nós não chega a 100% de déficit e sim a 90%, já que estes dois testes correspondem a 10% da graduação total.

3.4. Análise Estatística

Para determinar os níveis de significância dos tratamentos realizados com os neurônios da medula espinal no experimento *in vitro*, e dos testes comportamentais dos animais submetidos ao experimento *in vivo*, os dados foram submetidos aos testes de análise de variância ANOVA bifatorial com medidas repetidas para que os diferentes tratamentos pudessem ser analisados em função do decurso temporal realizado, sendo este 24, 48, 72 e 96 horas nos experimentos *in vitro* e 48 horas, 72 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 semanas nos experimentos *in vivo*.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento *in vitro*

4.1.1 Obtenção das Células de Schwann

As CS foram obtidas através de fragmentos do nervo ciático, os quais permaneceram em fase de explantes por 3-4 semanas. Foi observado que durante as duas primeiras semanas desta fase, a grande maioria das células que migravam eram fibroblastos. A partir desta etapa, foi observada a migração mais intensa de CS, a qual se intensificou até o término da quarta semana coincidindo com o período em que os explantes são dissociados. A figura 1 demonstra os explantes e a migração tanto de fibroblastos como de CS.

Uma semana depois da dissociação, as CS são submetidas ao tratamento com o anticorpo Thy.1 com a finalidade de eliminar os fibroblastos restantes, e ao término da terceira semana de amplificação, as células estão prontas para serem utilizadas nos experimentos (Figura 2). Para nos certificarmos que a cultura de CS possui um alto grau de pureza, foi realizado a imunocitoquímica fluorescente com o anticorpo da proteína S100 β a qual é específica para este tipo de célula (Figura 3).

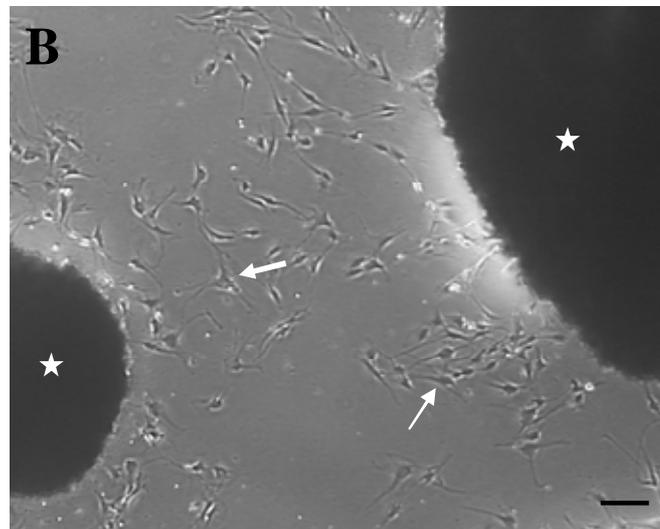
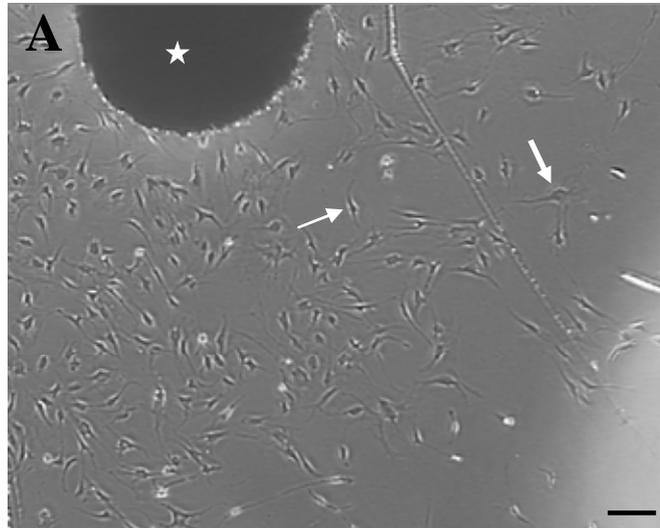


Figura 1: Microfotografias por contraste de fase em microscópio invertido mostrando a migração de CS (seta fina) e fibroblasto (seta grossa) a partir dos explantes de fragmentos do nervo ciático ★.

Barras A e B = 30 μ m

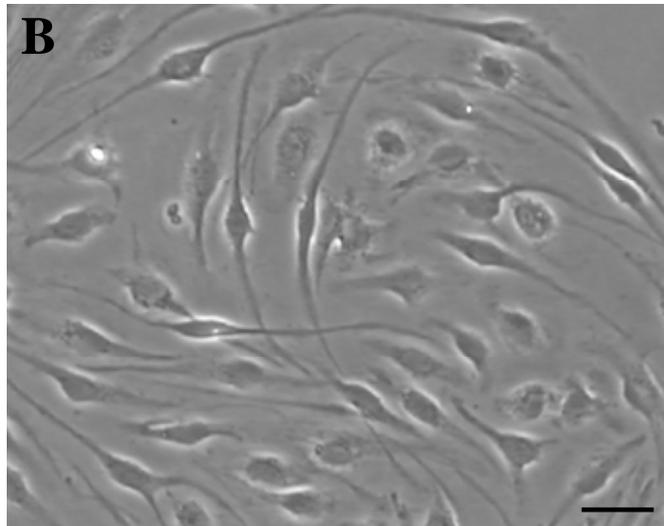
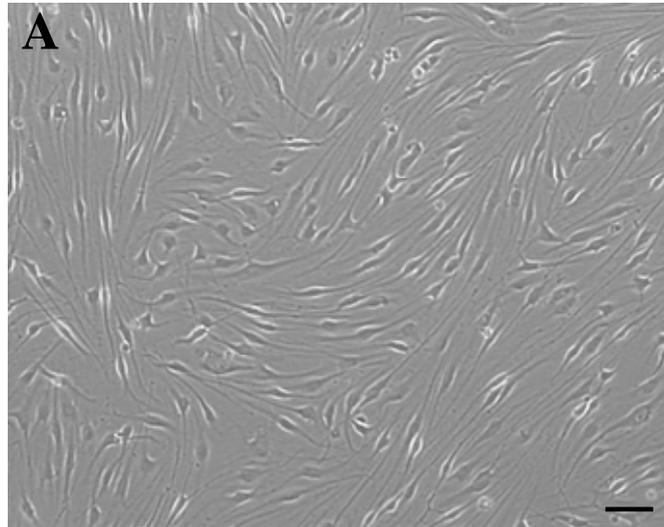


Figura 2: Microfotografias por contraste de fase em microscópio invertido mostrando células de Schwann cultivadas a partir do nervo ciático do rato, após tratamento para eliminar os fibroblastos. Barras A=30 μm , B= 10 μm

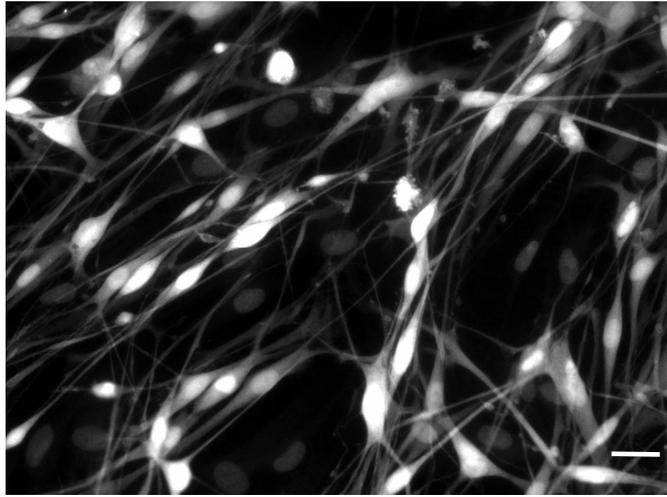


Figura 3: Microfotografia da marcação fluorescente das CS com o anticorpo para a proteína S100.

Barra =10 μm .

4.1.2 Efeito Mitogênico do PEDF sobre as Células de Schwann Cultivadas

A avaliação do efeito mitógeno de diferentes formas moleculares do PEDF sobre as CS foi realizada utilizando um decurso temporal de 96 horas, utilizando-se os grupos controle, nPEDF e coPEDF como demonstrado da Figura 4.

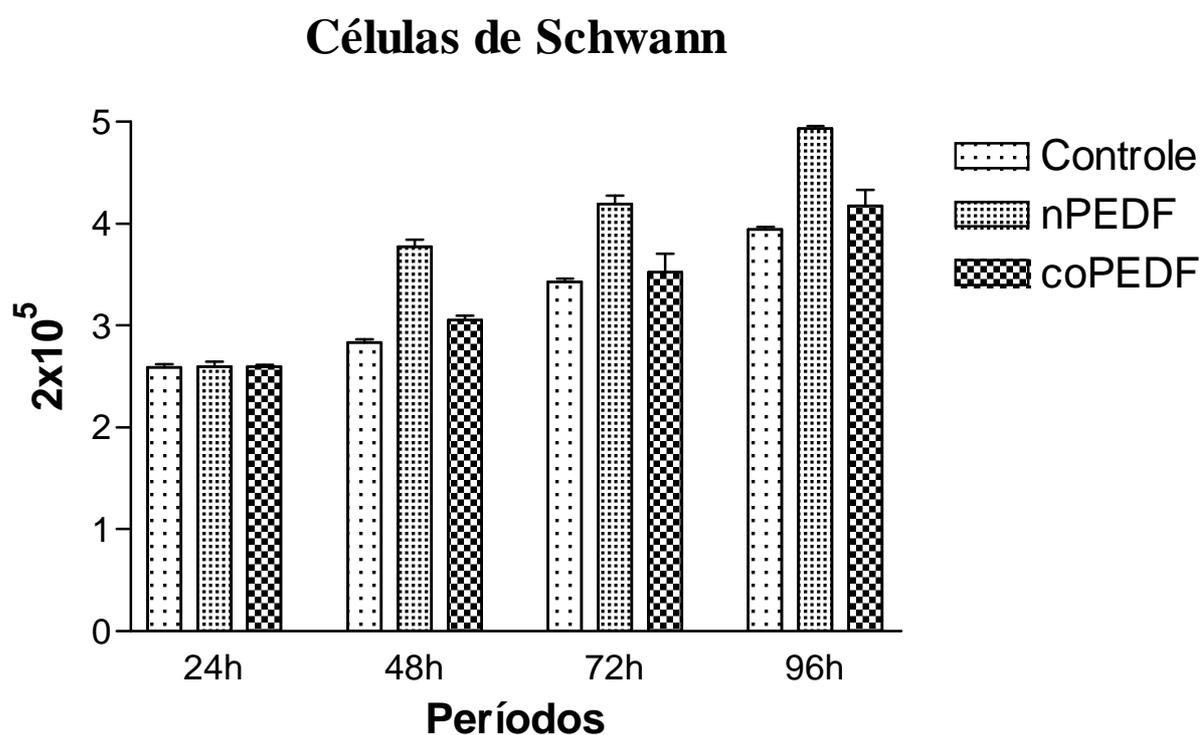


Figura 4: A figura mostra a média e o erro padrão da análise mitogênica das células de Schwann, tratadas com o nPEDF ou o coPEDF.

A análise do efeito mitógeno dos fatores coPEDF e nPEDF foi avaliada através do teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas, o qual demonstrou diferença significativa em relação ao tratamento [$p < 0,0001$; $F(78,78)$], ao tempo [$p < 0,0001$; $F(260,4)$], assim como da interação tempo versus tratamento [$p < 0,0001$; $F(9,084)$]. A comparação dos grupos entre si

também foram analisadas através do teste ANOVA de das vias com medidas repetidas onde as seguintes comparações foram realizadas: Controle X nPEDF, Controle X coPEDF e nPEDF X coPEDF. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 1. A aplicação do pós-teste de Bonferroni foi utilizada com a finalidade de analisar os grupos experimentais ao longo do decurso temporal e os resultados estão presentes na tabela 2.

GRUPOS	TRATAMENTO	TEMPO	INTERAÇÃO TEMPO X TRATAMENTO
Controle X nPEDF	$p < 0,0001$; $F(393,6)$	$p < 0,0001$; $F(533,9)$	$p < 0,0001$; $F(45,13)$
Controle X coPEDF	$p < 0,05$; $F(4,868)$	$p < 0,0001$; $F(106,7)$	—
nPEDF X coPEDF	$p < 0,0001$; $F(62,14)$	$p < 0,0001$; $F(1146,1)$	$p < 0,05$; $F(7,105)$

Tabela 1: Análise estatística do Efeito Mitógeno do PEDF sobre as células de Schwann realizada através do teste ANOVA bifatorial com medidas repetidas

GRUPOS	24 horas	48 horas	72 horas	92 horas
Controle X nPEDF		$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
Controle X coPEDF				
nPEDF X coPEDF		$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$

Tabela 2: Resultado do pós-teste Bonferroni da análise do efeito mitógeno de diferentes formas moleculares do PEDF sobre as CS

4.1.3 Quantificação Esterológica dos Neurônios Cultivados

Os neurônios cultivados e submetidos aos tratamentos propostos foram quantificados estereologicamente. Para tal propósito, foi criada uma moldura composta por 315 pontos, com área definida de $3,15 \times 10^4 \mu\text{m}^2$. Esta moldura foi projetada sobre as fotos da cultura dos neurônios da medula espinal (Figura 4). Fotografias retiradas dos diferentes tratamentos podem ser analisadas a partir da Figura 5.

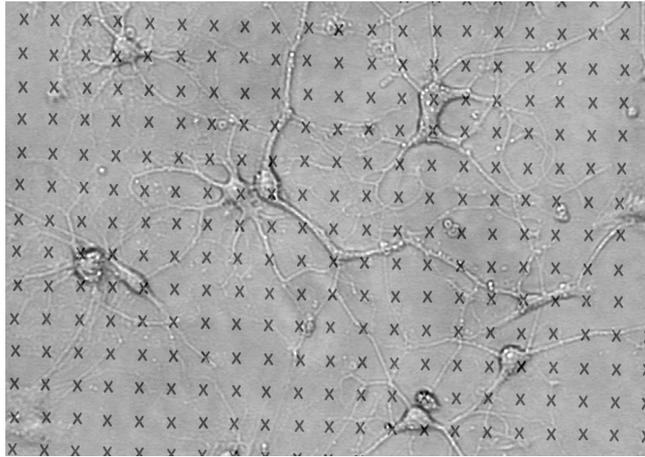


Figura 5: Microfotografia por contraste de fase mostrando a moldura estereológica projetada sobre uma das fotos retiradas da cultura dos neurônios da medula espinal.

O número de prolongamentos por neurônio foi definido através da somatória do número de prolongamentos neuronais que atingiram um dos pontos da moldura e dividido pelo número médio dos neurônios existentes na foto. O tamanho do corpo neuronal foi calculado através da somatória dos pontos que fizeram intersecção com o corpo dos neurônios e dividido pelo número médio de neurônios existentes na foto.

Através da análise descrita acima, a cultura de neurônios da medula espinal submetida aos diferentes tratamentos propostos, foi analisada no que diz respeito ao número de prolongamentos por neurônio, o tamanho do corpo neuronal e a quantidade de neurônios remanescentes ao longo do decurso temporal de 24 a 96 horas.

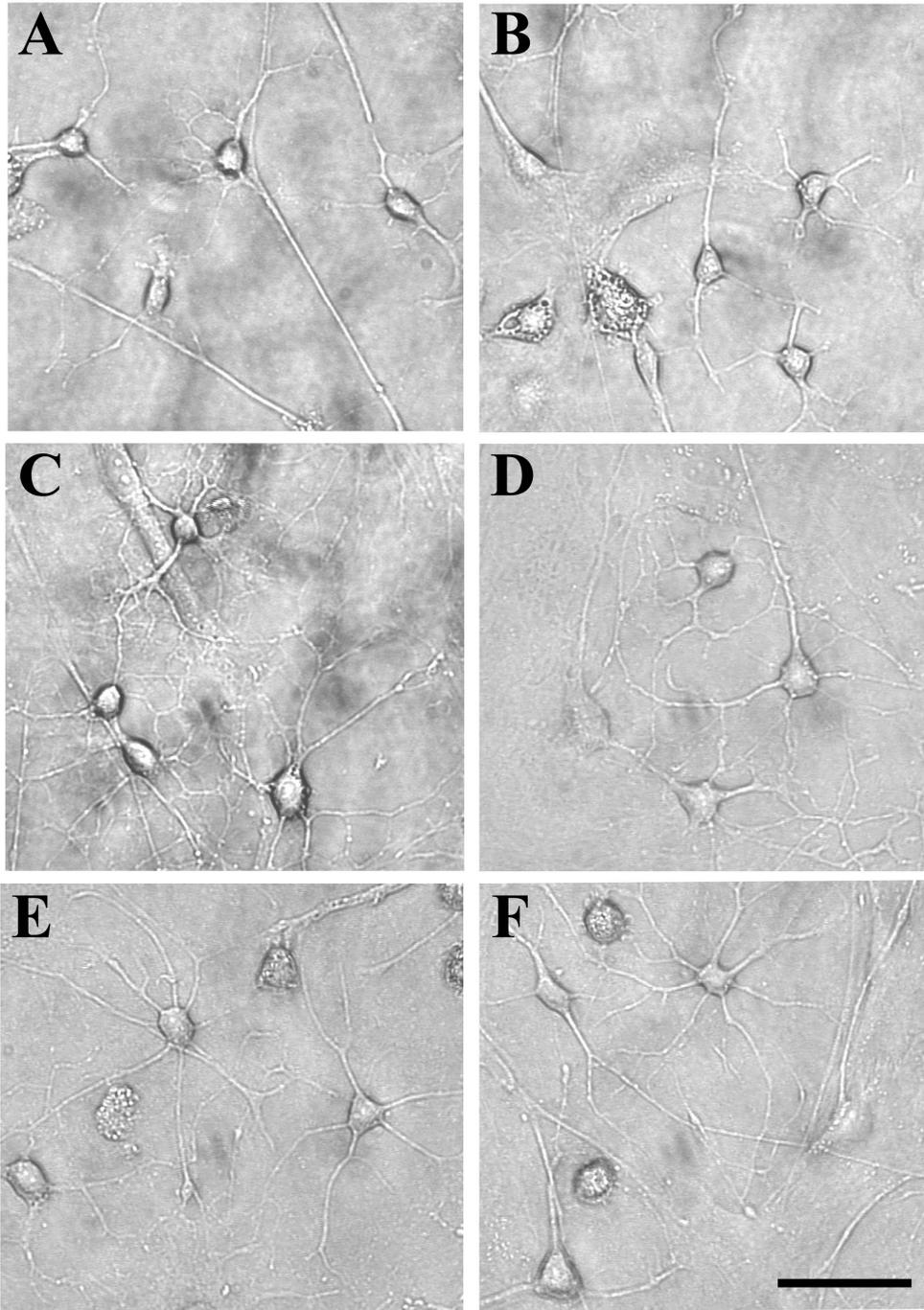


Figura 6: Microfotografia por contraste de fase ilustrando os diferentes tratamentos aplicados à cultura de neurônios da medula espinal no período de 96 horas. D10M em A, M CCS em B, MC CS/nPEDF em C, MCcoPEDF em D, nPEDF em E e coPEDF em F. Todas as figuras possuem barra = 30 μ m, demonstrada na figura F.

4.1.3.1 Número de Prolongamentos por Neurônio

A figura 7 ilustra o número de prolongamentos por neurônio definido através da quantificação estereológica nos períodos de 24 a 96 horas após o início do tratamento sugerido

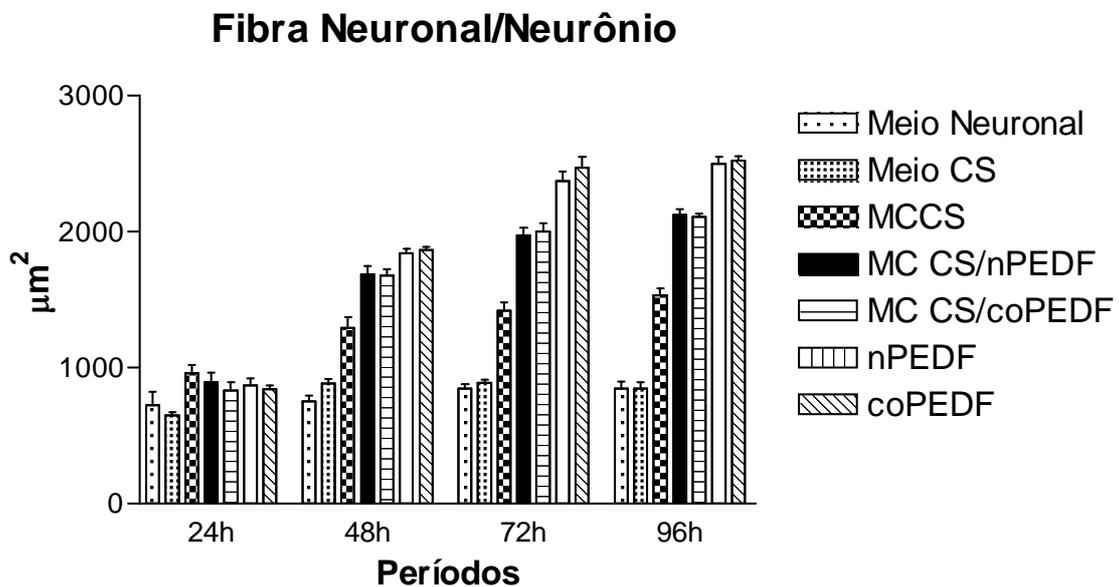


Figura 7: A figura mostra a média e o erro padrão do número de prolongamentos por neurônio na cultura de neurônios da medula espinal. A análise estatística ANOVA de duas vias está representada na tabela 1e 2.

O número de Prolongamentos por neurônio em relação aos grupos experimentais foi analisado através do teste estatístico Anova de duas vias com medidas repetidas. Ao comparar a variável tempo versus tratamento, foi obtido diferenças em relação ao tempo [$p < 0,0001$; $F(433,6)$], ao tratamento [$p < 0,0001$; $F(282,7)$] e interação tempo versus tratamento [$p < 0,0001$; $F(29,17)$].

Os grupos também foram analisados entre si através do teste ANOVA de duas vias com

medidas repetidas onde as seguintes comparações foram realizadas: Meio Neuronal X Meio CS, Meio CS X M CCS, Meio CS X MC CS/nPEDF, Meio CS X MC CS/coPEDF, M CCS X MC CS/nPEDF, M CCS X MC CS/coPEDF, MC CS/nPEDF X MC CS/coPEDF, Meio Neuronal X nPEDF, Meio Neuronal X coPEDF, nPEDF X coPEDF, nPEDF X MC CS/nPEDF, coPEDF X MC CS/coPEDF. Os resultados estão apresentados na tabela 3. O pós-teste Bonferroni foi aplicado com a finalidade de analisar os grupos experimentais ao longo do decurso temporal utilizado e os resultados estão demonstrados na tabela 4.

Em relação aos prolongamentos neuronais observou-se o M CCS promoveu um efeito de arborização neuronal já na fase aguda, efeito este, que se manteve durante todo o período experimental. Os tratamentos da cultura de neurônios com o MC CS/nPEDF ou MC CS/coPEDF promoveu um efeito de arborização nos neurônios cultivados visto em 24 horas para o MC CS/nPEDF e 48 horas para o MC CS/coPEDF quando comparados com o meio das CS .

Apesar de o M CCS ter promovido um efeito de arborização significativo nas culturas de neurônios visto já em 24 horas, a partir deste período os tratamentos com o MC CS/nPEDF e MC CS/coPEDF induziram um efeito arborítico mais significativo do que o promovido pelo M CCS puro.

O tratamento com nPEDF ou coPEDF exerceu efeitos positivos na cultura sobre a arborização dos prolongamentos de neurônios cultivados, constatados a partir das primeiras 48 horas do cultivo celular, efeito este que se prolongou durante as 96 horas da análise. O potencial de arborização neuronal de cada um dos fatores neurotróficos foi maior do que aqueles vistos pelo MC das células de Schwann pré-tratado com cada um desses fatores.

O M CCS exerceu um efeito de arborização agudo e prolongado. A potenciação deste efeito foi vista pelo M CCS pré-tratadas com nPEDF ou coPEDF a partir de 48 horas de análise. O tratamento das culturas de neurônios com os fatores neurotróficos nPEDF ou coPEDF foi

capaz de intensificar os efeitos observados pelo MC CS/nPEDF e MC CS/coPEDF.

GRUPOS	TRATAMENTO	TEMPO	INTERAÇÃO TEMPO X TRATAMENTO
Meio Neuronal X Meio CS	—	$p < 0,001$; F(6,120)	—
Meio CS X M CCS	$p < 0,0001$; F(165,4)	$p < 0,0001$; F(22,76)	$P < 0,0001$; F(4,278)
Meio CS X MC CS/nPEDF	$p < 0,0001$; F(577,0)	$p < 0,0001$; F(88,82)	$P < 0,0001$; F(40,75)
Meio CS X MC CS/coPEDF	$p < 0,0001$; F(728,0)	$p < 0,0001$; F(126,9)	$P < 0,0001$; F(60,24)
M CCS X MC CS/nPEDF	$p < 0,0001$; F(61,71)	$p < 0,0001$; F(73,84)	$P < 0,0001$; F(10,93)
M CCS X MC CS/coPEDF	$p < 0,0001$; F(66,30)	$p < 0,0001$; F(91,67)	$P < 0,0001$; F(15,38)
MC CS/nPEDF X MC CS/coPEDF	—	$p < 0,0001$; F(187,0)	—
Meio Neuronal X nPEDF	$p < 0,0001$; F(641,6)	$p < 0,0001$; F(87,32)	$P < 0,0001$; F63,52)
Meio Neuronal X coPEDF	$p < 0,0001$; F(821,5)	$p < 0,0001$; F(116,6)	$P < 0,0001$; F86,39)
nPEDF X coPEDF	—	$p < 0,0001$; F(446,0)	—
nPEDF X MC CS/nPEDF	$p < 0,0001$; F(28,85)	$p < 0,0001$; F(238,0)	$P < 0,0001$; F(5,661)
coPEDF X MC CS/coPEDF	$p < 0,0001$; F(57,28)	$p < 0,0001$; F(372,7)	$P < 0,0001$; F(9,301)

Tabela 3: Análise Estatística do número de prolongamentos por neurônio realizada através do teste

ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

GRUPOS	24 horas	48 horas	72 horas	92 horas
Meio Neuronal X Meio CS				
Meio CS X M CCS	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
Meio CS X MC CS/nPEDF	$p < 0,001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
Meio CS X MC CS/coPEDF		$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
M CCS X MC CS/nPEDF		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
M CCS X MC CS/coPEDF		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
MC CS/nPEDF X MC CS/coPEDF				
Meio Neuronal X nPEDF		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Meio Neuronal X coPEDF		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
nPEDF X coPEDF				
nPEDF X MC CS/nPEDF			$p < 0,001$	$p < 0,001$
coPEDF X MC CS/coPEDF		$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

Tabela 4: Resultados do pós-teste Bonferroni do número de prolongamentos por neurônio.

4.1.3.2 Tamanho do Corpo Neuronal por/ Neurônio

A análise do corpo neuronal dentro do decurso temporal realizado está demonstrada na figura 8.

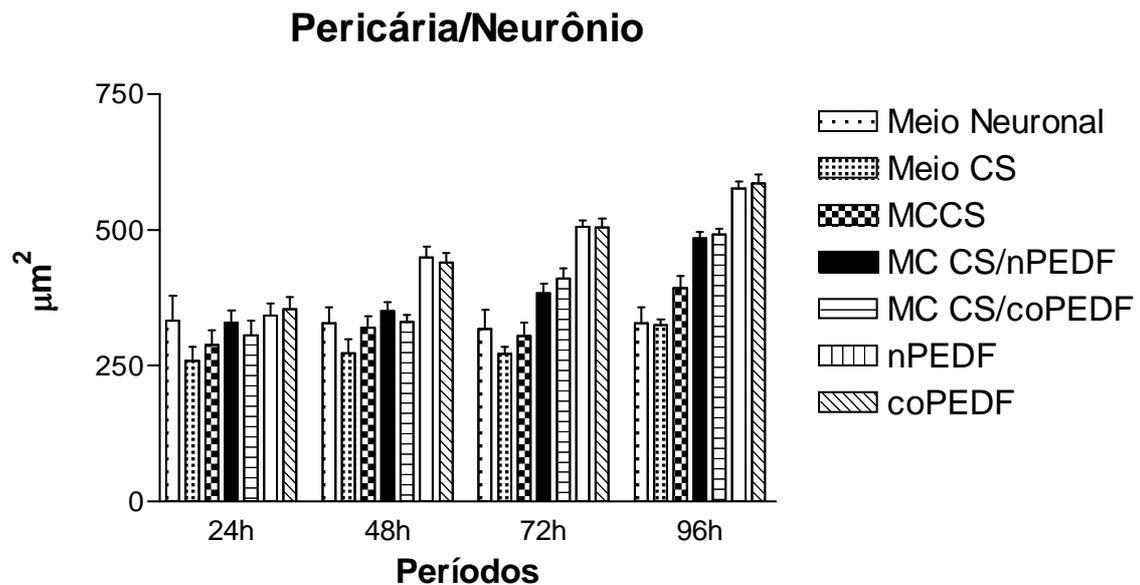


Figura 8: A figura mostra a média e o erro padrão do tamanho do corpo neuronal por neurônio na cultura de neurônios da medula espinal.

O tamanho do corpo neuronal por neurônio em relação aos grupos experimentais foi analisado através do teste estatístico Anova de duas vias com medidas repetidas. Ao comparar a variável tempo versus tratamento, foi obtido diferenças em relação ao tempo [$p < 0,0001$; $F(42,25)$], ao tratamento [$p < 0,0001$; $F(42,77)$] e interação tempo versus tratamento [$p < 0,0001$; $F(3,075)$].

Os grupos também foram analisados entre si através do teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas onde as seguintes comparações foram realizadas: Meio Neuronal X Meio CS, Meio CS X M CCS, Meio CS X MC CS/nPEDF, Meio CS X MC CS/coPEDF, M CCS X

MC CS/nPEDF, MCCS X MC CS/coPEDF, MC CS/nPEDF X MC CScoPEDF, Meio Neuronal X nPEDF, Meio Neuronal X coPEDF, nPEDF X coPEDF, nPEDF X MCnPEDF, coPEDF X MCcoPEDF. Os resultados estão apresentados na tabela 5. O pós-teste Bonferroni foi aplicado com a finalidade de analisar os grupos experimentais ao longo do decurso temporal utilizado e os resultados estão demonstrados na tabela 6.

Em relação ao tamanho do corpo neuronal, o MCCS, promoveu um efeito trófico no corpo neuronal dos neurônios cultivados quando comparado com o meio D-10M, efeito este que foi potencializado parcialmente pelo MC CS/nPEDF, e o MC CS/coPEDF partir de 72 horas do tratamento.

Ao comparar o tratamento com nPEDF ou coPEDF com o meio neuronal, foi observado que esses fatores neurotróficos exerceram efeitos positivos sobre o trofismo do corpo neuronal, constatados a partir das primeiras 48 horas do cultivo celular, efeito este que se prolongou durante as 96 horas da análise. O potencial de trofismo do corpo neuronal de cada um dos fatores neurotróficos foi maior do que aqueles vistos pelo MC das células de Schwann pré-tratado com cada um desses fatores, onde foi observada uma resposta mais tardia, a partir de 72 horas quando comparados com o meio neuronal.

GRUPOS	TRATAMENTO	TEMPO	INTERAÇÃO TEMPO X TRATAMENTO
Meio Neuronal X Meio CS	—	$p < 0,05; F(4,416)$	—
Meio CS X M CCS	$p < 0,05; F(7,007)$	$p < 0,0001; F(4,229)$	—
Meio CS X MC CS/nPEDF	$P < 0,0001; F(54,96)$	$p < 0,0001; F(9,824)$	—
Meio CS X MC CS/coPEDF	$P < 0,0001; F(47,98)$	$p < 0,0001; F(12,18)$	$p < 0,05; F(3,807)$
M CCS X MC CS/nPEDF	$p < 0,001; F(15,09)$	$p < 0,0001; F(11,00)$	—
M CCS X MC CS/coPEDF	$p < 0,001; F(12,93)$	$p < 0,0001; F(12,95)$	—
MC CS/nPEDF X MC CS/coPEDF	—	$p < 0,0001; F(28,88)$	—
Meio Neuronal X nPEDF	$P < 0,0001; F(54,09)$	$p < 0,01; F(5,882)$	$p < 0,001; F(6,862)$
Meio Neuronal X coPEDF	$P < 0,0001; F(54,66)$	$p < 0,01; F(5,547)$	$p < 0,01; F(6,411)$
nPEDF X coPEDF	—	$p < 0,0001; F(60,82)$	—
nPEDF X MC CS/nPEDF	$P < 0,0001; F(41,47)$	$p < 0,0001; F(39,42)$	$p < 0,05; F(3,750)$
coPEDF X MC CS/coPEDF	$P < 0,0001; F(40,50)$	$p < 0,0001; F(41,83)$	—

Tabela 4: Análise Estatística do tamanho do corpo neuronal realizada através do teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

GRUPOS	24 horas	48 horas	72 horas	92 horas
Meio Neuronal X Meio CS				
Meio CS X M CCS				
Meio CS X MC CS/nPEDF			$p < 0,001$	$P < 0,001$
Meio CS X MC CS/coPEDF			$p < 0,001$	$P < 0,001$
M CCS X MC CS/nPEDF				
M CCS X MC CS/coPEDF				
MC CS/nPEDF X MC CS/coPEDF				
Meio Neuronal X nPEDF		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$P < 0,001$
Meio Neuronal X coPEDF			$p < 0,001$	$P < 0,001$
nPEDF X coPEDF				
nPEDF X MC CS/nPEDF		$p < 0,01$	$p < 0,01$	$P < 0,01$
coPEDF X MC CS/coPEDF		$p < 0,001$	$p < 0,01$	$P < 0,05$

Tabela 5: Resultados do pós-teste Bonferroni do tamanho do corpo neuronal

4.1.3.3 Número de Neurônios Remanescentes

A figura 9 ilustra o número de neurônios remanescentes durante o período da realização da cultura dos neurônios da medula espinal

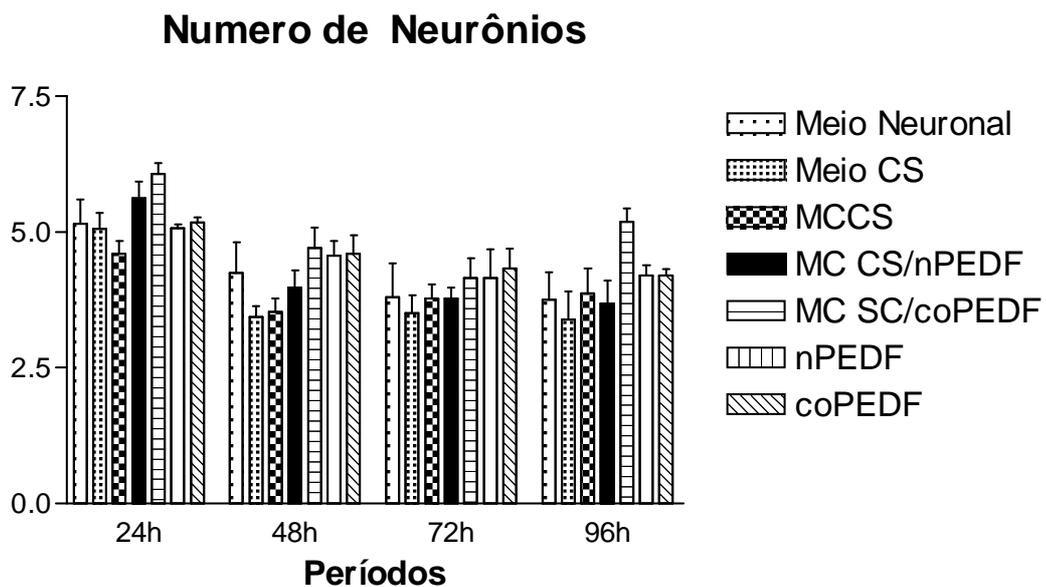


Figura 9: A figura mostra a média e o erro padrão do número de neurônios na cultura de neurônios da medula espinal

O número de neurônios remanescentes da cultura de neurônio da medula espinal de neonatos foi analisado através do teste estatístico ANOVA bifatorial com medidas repetidas e demonstrou diferenças em relação ao tratamento [$p < 0,0001$; $F(5,301)$] e ao tempo [$p < 0,001$; $F(23,74)$].

Os grupos também foram analisados entre si através do teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas onde as seguintes comparações foram realizadas: Meio Neuronal X Meio

CS, Meio CS X M CCS, Meio CS X MC CS/nPEDF, Meio CS X MC CS/coPEDF, M CCS X MC CS/nPEDF, M CCS X MC CS/coPEDF, MC CS/nPEDF X MC CScoPEDF, Meio Neuronal X nPEDF, Meio Neuronal X coPEDF, nPEDF X coPEDF, nPEDF X MCnPEDF, coPEDF X MCcoPEDF. Os resultados estão apresentados na tabela 7. O pós-teste Bonferroni foi aplicado com a finalidade de analisar os grupos experimentais ao longo do decurso temporal utilizado e os resultados estão demonstrados na tabela 8.

Através dos resultados obtidos, pode-se dizer que apenas o MC CS/coPEDF resultou em um efeito neuroprotetor, embora modesto, sobre os neurônios cultivados a partir da medula espinal de ratos neonatos. A análise da cultura de neurônios com os outros tratamentos propostos não resultaram em um efeito neuroprotetor significativo para essas células.

GRUPOS	TRATAMENTO	TEMPO	INTERAÇÃO TEMPO X TRATAMENTO
Meio Neuronal X Meio CS	—	$p < 0,01; F(5,610)$	—
Meio CS X M CCS	—	$p < 0,0001; F(9,864)$	—
Meio CS X MC CS/nPEDF	—	$p < 0,0001; F(16,21)$	—
Meio CS X MC CS/coPEDF	$P < 0,0001; F(24,28)$	$p < 0,0001; F(12,86)$	—
M CCS X MC CS/nPEDF	—	$p < 0,0001; F(11,68)$	—
M CCS X MC CS/coPEDF	$P < 0,0001; F(23,09)$	$p < 0,0001; F(9,257)$	—
MC CS/nPEDF X MC CS/coPEDF	$p < 0,01; F(10,63)$	$p < 0,0001; F(15,07)$	—
Meio Neuronal X nPEDF	—	$p < 0,05; F(2,949)$	—
Meio Neuronal X coPEDF	—	$p < 0,05; F(3,284)$	—
nPEDF X coPEDF	—	$p < 0,05; F(4,309)$	—
nPEDF X MC CS/nPEDF	—	$p < 0,001; F(9,129)$	—
coPEDF X MC CS/coPEDF	$p < 0,05; F(4,330)$	$p < 0,001; F(7,969)$	—

Tabela 6: Análise Estatística do número de neurônios remanescentes realizada através do teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

GRUPOS	24 horas	48 horas	72 horas	92 horas
Meio Neuronal X Meio CS				
Meio CS X M CCS				
Meio CS X MC CS/nPEDF				
Meio CS X MC CS/coPEDF		$p < 0,05$		$p < 0,05$
M CCS X MC CS/nPEDF				
M CCS X MC CS/coPEDF	$p < 0,01$			$p < 0,05$
MC CS/nPEDF X MC CS/coPEDF				
Meio Neuronal X nPEDF				
Meio Neuronal X coPEDF				
nPEDF X coPEDF				
nPEDF X MC CS/nPEDF				
coPEDF X MC CS/coPEDF				

Tabela 7: Resultados do pós-teste Bonferroni do número de neurônios remanescentes

4.2 Experimento *in vivo*

4.2.1 Lesão Medular Contusa

Os parâmetros obtidos pelo sistema Impactor demonstraram uma homogeneidade entre os grupos, evidenciado pela ausência de diferença estatística entre os grupos (Tabela 9). As curvas representativas da trajetória da queda do peso do impactor estão demonstradas na Figura 10 .

	Imp V	Cd	Cr
CONTUSA	0.659±0.005	1.284±0.106	0.209±0.057
CS	0.669±0.006	1.184±0.022	0.176±0.024
MCCS	0.666±0.006	1.197±0.088	0.189±0.045
CS/nPEDF	0.668±0.007	1.254±0.155	0.157±0.019
MC CS/nPEDF	0.654±0.007	1.003±0.061	0.122±0.013
nPEDF	0.653±0.006	1.170±0.074	0.132±0.014
coPEDF	0.660±0.004	1.225±0.203	0.117±0.023
P value	0.7169	0.2596	0.2504

Tabela 8: Médias e e.p.m dos parâmetros da lesão medular contusa registrados pelos parâmetros do Impactor: Velocidade do impactor (Imp V), Compressão medular (Cd) e Taxa de Compressão Medular (Cr). A Cr é obtida através da divisão do Cd pelo tempo de compressão medular Segundo o teste ANOVA de uma via, os grupos não diferiram entre si. Valores de p estão representados na tabela.

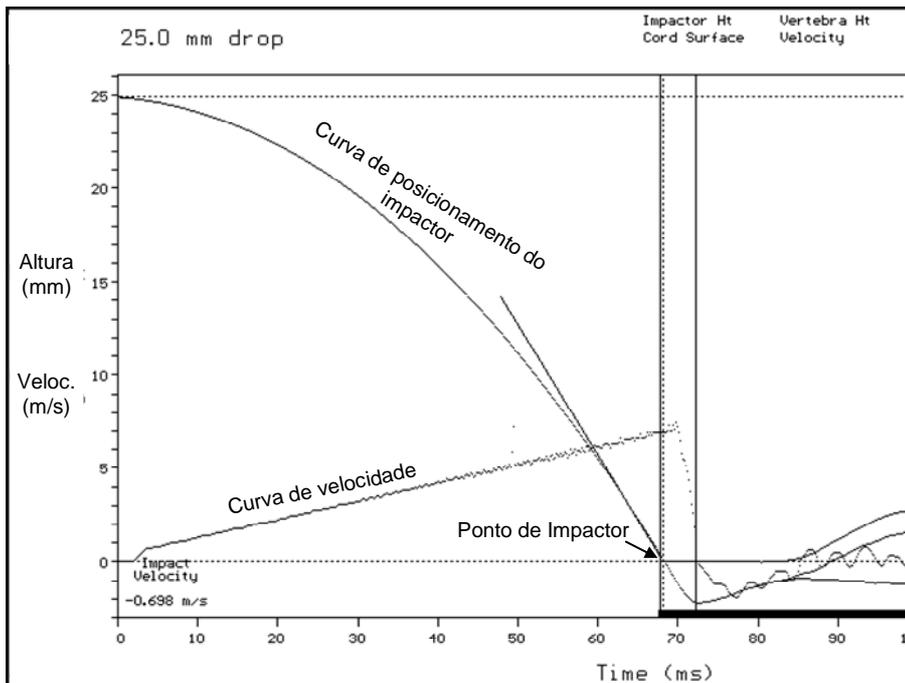


Figura 10: Parâmetros registrados pelo impactor ilustrando as curvas de velocidade, do posicionamento do impactor e o ponto de impacto do peso na medula. A queda do peso de 10g sobre a medula espinal exposta ocorreu a partir da distância de 25 mm, o que caracteriza uma lesão de intensidade moderada.

4.2.2 Análise Comportamental BBB

Os animais que foram submetidos ao trauma medular contuso foram avaliados e a evolução comportamental desses animais está demonstrada na figura 11

A análise da recuperação comportamental dos animais lesados e submetidos a diversos tipos de tratamento foi realizada pelo teste estatístico Anova de duas vias com medidas repetidas, onde observou-se um efeito significativo no que diz respeito ao tratamento [$p < 0,0001$; $F(261,2)$] ao tempo [$p < 0,0001$; $F(49,86)$], assim como a interação tempo versus tratamento [$p < 0,0001$; $F(1,949)$].

Os grupos também foram analisados entre si através do teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas onde as seguintes comparações foram realizadas: Contusa X CS, Contusa X

CSnPEDF, Contusa X MCCA, Contusa X MC CS/nPEDF, Contusa X nPEDF, Contusa X coPEDF, CS X CSnPEDF, CS X MCCA, CS X MC CS/nPEDF, CS X nPEDF, CS X coPEDF, CSnPEDF X MC CS/nPEDF, CSnPEDF X nPEDF, MCCA X MC CS/nPEDF, MCCA X nPEDF, MC CS/nPEDF X nPEDF, nPEDF X coPEDF. Os resultados estão apresentados na tabela 10. O pós-teste Bonferroni foi aplicado com a finalidade de analisar os grupos experimentais ao longo do decurso temporal utilizado e os resultados estão demonstrados na tabela 11.

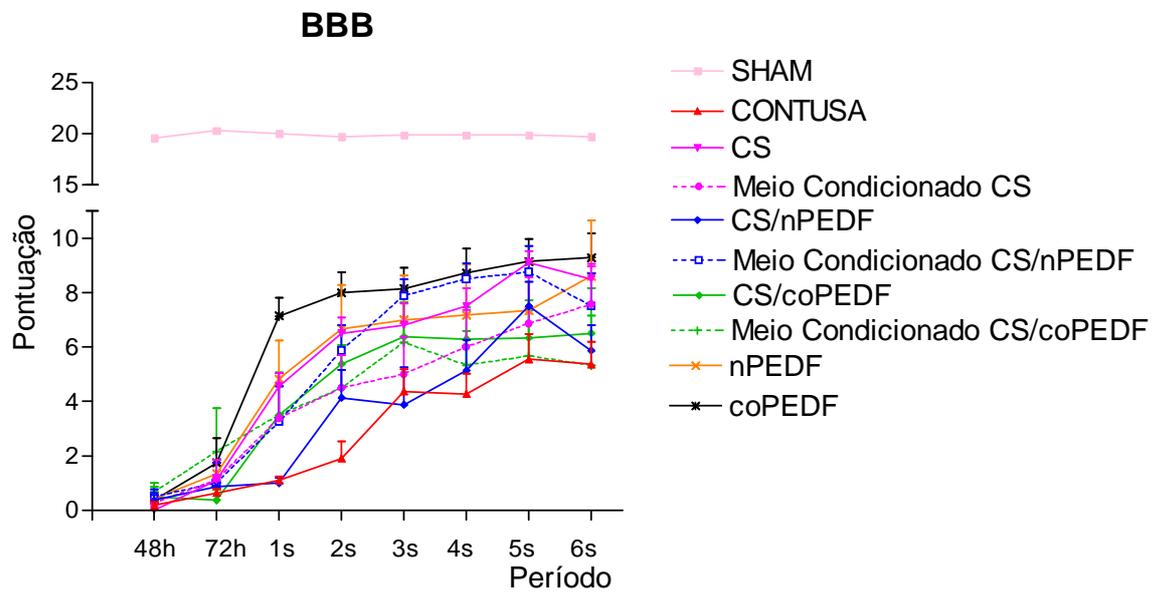


Figura 11: A figura mostra as médias e o e.p.m dos índices do BBB dos ratos nos grupos experimentais. Os animais receberam cirurgia simulada (controle) ou lesão medular contusa de intensidade moderada no nível T-10 pelo NYU Impactor.

GRUPOS	TRATAMENTO	TEMPO	INTERAÇÃO TEMPO X TRATAMENTO
Contusa X CS	p<0.0001 F(75.63)	p<0.0001 F(41.31)	p<0.01 F(3.682)
Contusa X CS/nPEDF	–	p<0.0001 F(20.30)	–
Contusa X CS/coPEDF	p<0.001 F(12.52)	p<0.0001 F(15.78)	–
Contusa X M CCS	p<0.01 F(9.225)	p<0.0001 F(12.86)	–
Contusa X MC CS/nPEDF	p<0.0001 F(44.18)	p<0.0001 F(26.90)	–
Contusa X MC CS/coPEDF	p<0.05 F(6.475)	p<0.0001 F(8.354)	–
Contusa X nPEDF	p<0.0001 F(26.51)	p<0.0001 F(13.65)	–
Contusa X coPEDF	p<0.0001 F(106.2)	p<0.0001 F(30.38)	p<0.001 F(4.514)
CS X CS/nPEDF	p<0.0001 F(30.80)	p<0.0001 F(35.75)	–
CS X CS/coPEDF	p<0.01 F(7.628)	p<0.0001 F(27.83)	–
CS X M CCS	p<0.05 F(6.592)	p<0.0001 F(20.90)	–
CS X MC CS/nPEDF	–	p<0.0001 F(45.29)	–
CS X MC CS/coPEDF	p<0.001 F(8.059)	p<0.0001 F(15.06)	–
CS X nPEDF	–	p<0.0001 F(23.24)	–
CS X coPEDF	p<0.01 F(11.21)	p<0.0001 F(58.66)	–
CS/nPEDF X CS/coPEDF	–	p<0.0001 F(13.37)	–
CS/nPEDF X MC CS/nPEDF	p<0.0001 F(17.24)	p<0.0001 F(22.58)	–
CS/nPEDF X nPEDF	p<0.01 F(10.26)	p<0.0001 F(11.45)	–
CS/coPEDF X MC CS/coPEDF	–	p<0.0001 F(6.299)	–
CS/coPEDF X coPEDF	p<0.0001 F(20.74)	p<0.0001 F(21.47)	–
M CCS X MC CS/nPEDF	–	p<0.0001 F(14.46)	–
M CCS X MC CS/coPEDF	–	p<0.0001 F(5.086)	–
M CCS X nPEDF	–	p<0.0001 F(8.236)	–
M CCS X coPEDF	p<0.0001 F(17.09)	p<0.0001 F(15.99)	–
CS/nPEDF X MC CS/coPEDF	p<0.05 F(4.583)	p<0.0001 F(10.26)	–
MC CS/nPEDF X nPEDF	–	p<0.0001 F(15.33)	–
MC CS/coPEDF X coPEDF	p<0.0001 F(18.24)	p<0.0001 F(11.54)	–
nPEDF X coPEDF	p<0.05 F(4.267)	p<0.0001 F(17.79)	–

Tabela 9: Análise Estatística do teste comportamental BBB realizada através do teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

GRUPOS	48 hs	72 hs	1sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.	5 sem.	6 sem.
Contusa X CS			***	***	*	**	***	**
Contusa X CS/nPEDF								
Contusa X CS/coPEDF			*					
Contusa X MCCS								
Contusa X MC CS/nPEDF				**	**	***	*	
Contusa X MC CS/coPEDF								
Contusa X nPEDF				**				
Contusa X coPEDF			***	***	**	***	**	**
CS X CS/nPEDF			**		*			
CS X CS/coPEDF								
CS X MCCS								
CS X MC CS/nPEDF								
CS X MC CS/coPEDF								
CS X nPEDF								
CS X coPEDF			*					
CS/nPEDF X CS/coPEDF								
CS/nPEDF X MC CS/nPEDF					*			
CS/nPEDF X nPEDF								
CS/coPEDF X MC CS/coPEDF								
CS/coPEDF X coPEDF								
MCCS X MC CS/nPEDF								
MCCS X MC CS/coPEDF								
MCCS X nPEDF								
MCCS X coPEDF								
CS/nPEDF X MC CS/coPEDF								
MC CS/nPEDF X nPEDF								
MC CS/coPEDF X coPEDF								
nPEDF X coPEDF								

Tabela 10: Resultados do pós-teste Bonferroni do teste comportamental BBB

Resumidamente pode-se observar nas tabelas e no gráfico que os animais lesados que receberam inoculação das CS, do meio condicionado das CS pré tratadas com nPEDF, assim como o fator nPEDF puro apresentaram uma maior pontuação do índice BBB quando comparado com o grupo contusa. Esse efeito foi ainda mais significativo com a inoculação do fator neurotrófico coPEDF, onde observa-se que os animais tratados com esse fator apresentaram uma pontuação elevada a partir da primeira semana pós operatória, se estendendo ao longo de todo decurso temporal.

4.2.3 Análise Comportamental CBS

O CBS é um teste comportamental sensório-motor que possui uma escala involutiva. A avaliação dos animais submetidos ao trauma contuso e avaliados através deste teste está demonstrada na figura 11.

A análise do teste comportamental CBS foi realizada pelo teste estatístico ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Os resultados indicaram diferenças em relação ao tratamento [$p < 0,0001$; $F(165,0)$], ao tempo [$p < 0,0001$; $F(79,66)$] e a interação tratamento versus tempo [$p < 0,0001$; $F(3,133)$].

Os grupos também foram analisados entre si através do teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas onde as seguintes comparações foram realizadas: Contusa X CS, Contusa X CSnPEDF, Contusa X M CCS, Contusa X MC CS/nPEDF, Contusa X nPEDF, Contusa X coPEDF, CS X CSnPEDF, CS X M CCS, CS X MC CS/nPEDF, CS X nPEDF, CS X coPEDF, CSnPEDF X MC CS/nPEDF, CSnPEDF X nPEDF, M CCS X MC CS/nPEDF, M CCS X nPEDF, MC CS/nPEDF X nPEDF, nPEDF X coPEDF. Os resultados estão apresentados na tabela 12. O pós-teste Bonferroni foi aplicado com a finalidade de analisar os grupos experimentais ao longo do decurso temporal utilizado e os resultados estão demonstrados na tabela 13.

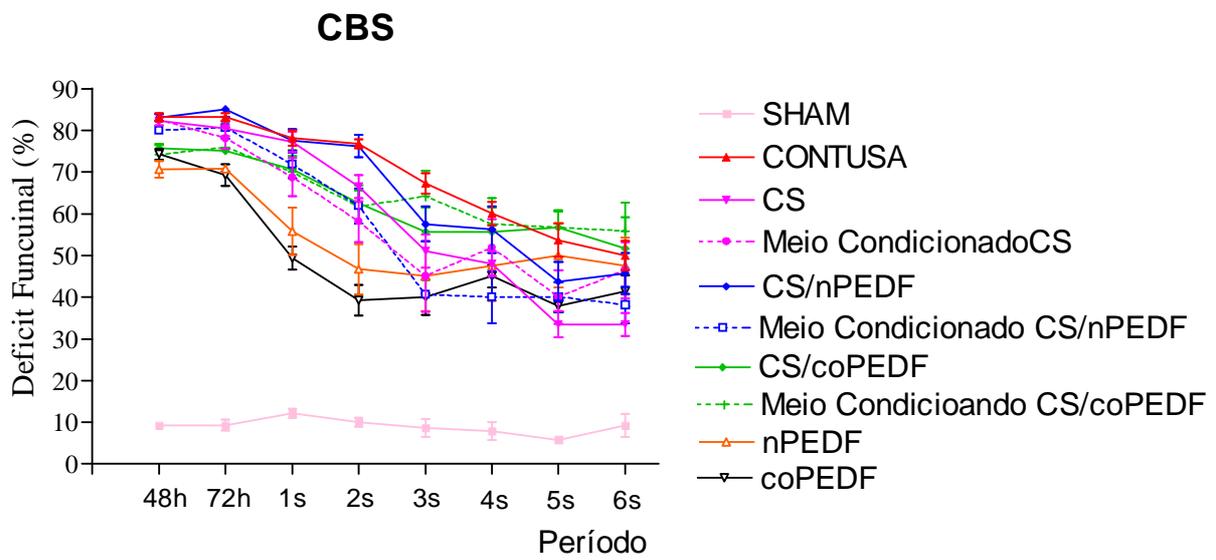


Figura 11: A figura mostra as médias e o e.p.m dos índices do CBS dos ratos nos grupos experimentais. Os animais receberam cirurgia simulada (controle) ou lesão medular contusa de intensidade moderada no nível T-10 pelo NYU Impactor.

GRUPOS	TRATAMENTO	TEMPO	INTERAÇÃO TEMPO X TRATAMENTO
Contusa X CS	p<0.0001 F(59.54)	p<0.0001 F(83.74)	p<0.001 F(4.382)
Contusa X CS/nPEDF	p<0.05 F(5.067)	p<0.0001 F(48.70)	-
Contusa X CS/coPEDF	p<0.001 F(13.64)	p<0.0001 F(22.29)	-
Contusa X M CCS	p<0.0001 F(26.92)	p<0.0001 F(25.79)	-
Contusa X MC CS/nPEDF	p<0.0001 F(68.73)	p<0.0001 F(56.22)	p<0.001 F(3.899)
Contusa X MC CS/coPEDF	p<0.05 F(6.629)	p<0.0001 F(17.25)	-
Contusa X nPEDF	p<0.0001 F(55.18)	p<0.0001 F(15.66)	p<0.01 F(2.862)
Contusa X coPEDF	p<0.0001 F(207.1)	p<0.0001 F(44.74)	p<0.0001 F(7.339)
CS X CS/nPEDF	p<0.0001 F(17.19)	p<0.0001 F(68.32)	-
CS X CS/coPEDF	p<0.05 F(5.015)	p<0.0001 F(36.01)	p<0.0001 F(5.478)
CS X M CCS	-	p<0.0001 F(38.02)	-
CS X MC CS/nPEDF	-	p<0.0001 F(77.77)	-
CS X MC CS/coPEDF	p<0.01 F(8.577)	p<0.0001 F(28.41)	p<0.0001 F(6.407)
CS X nPEDF	p<0.05 F(5.370)	p<0.0001 F(25.27)	p<0.0001 F(5.735)
CS X coPEDF	p<0.0001 F(43.05)	p<0.0001 F(63.40)	p<0.0001 F(10.18)
CS/nPEDF X CS/coPEDF	-	p<0.0001 F(20.11)	p<0.05 F(2.264)
CS/nPEDF X MC CS/nPEDF	p<0.0001 F(23.98)	p<0.0001 F(46.48)	-
CS/nPEDF X nPEDF	p<0.0001 F(21.92)	p<0.0001 F(14.08)	p<0.05 F(2.820)
CS/coPEDF X MC CS/coPEDF	-	p<0.0001 F(6.631)	-
CS/coPEDF X coPEDF	p<0.0001 F(49.91)	p<0.0001 F(18.77)	p<0.05 F(2.137)
M CCS X MC CS/nPEDF	-	p<0.0001 F(26.94)	-
M CCS X MC CS/coPEDF	p<0.05 F(4.094)	p<0.0001 F(8.861)	-
M CCS X nPEDF	-	p<0.0001 F(9.707)	-
M CCS X coPEDF	p<0.001 F(15.86)	p<0.0001 F(20.08)	-
CS/nPEDF X MC CS/coPEDF	p<0.001 F(13.29)	p<0.0001 F(19.07)	p<0.001 F(3.943)
MC CS/nPEDF X nPEDF	-	p<0.0001 F(18.08)	p<0.05 F(2.726)
MC CS/coPEDF X coPEDF	p<0.0001 F(54.77)	p<0.0001 F(14.23)	p<0.05 F(2.161)
nPEDF X coPEDF	p<0.05 F(4.312)	p<0.0001 F(15.22)	-

Tabela 11: Análise Estatística do teste comportamental CBS realizada através do teste ANOVA de duas

vias com medidas repetidas.

GRUPOS	48 hs	72 hs	1sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.	5 sem.	6 sem.
Contusa X CS				*	***	*	***	***
Contusa X CS/nPEDF								
Contusa X CS/coPEDF				*				
Contusa X MCCS				**	***			
Contusa X MC CS/nPEDF				**	***	***	*	*
Contusa X MC CS/coPEDF				*				
Contusa X nPEDF			**	***	**			
Contusa X coPEDF		**	***	***	***	**	***	
CS X CS/nPEDF								
CS X CS/coPEDF							***	**
CS X MCCS								
CS X MC CS/nPEDF								
CS X MC CS/coPEDF							***	***
CS X nPEDF			**	**				
CS X coPEDF			***	***				
CS/nPEDF X CS/coPEDF								
CS/nPEDF X MC CS/nPEDF					*	*		
CS/nPEDF X nPEDF			*	***				
CS/coPEDF X MC CS/coPEDF								
CS/coPEDF X coPEDF			***	***	*		**	
MCCS X MC CS/nPEDF								
MCCS X MC CS/coPEDF								
MCCS X nPEDF								
MCCS X coPEDF			*	*				
CS/nPEDF X MC CS/coPEDF					**	*		*
MC CS/nPEDF X nPEDF								
MC CS/coPEDF X coPEDF			**	**	***		*	
nPEDF X coPEDF								

Tabela 12: Resultados do pós-teste Bonferroni do teste comportamental CBS

A análise estatística do teste comportamental CBS, é muito semelhante ao teste BBB, onde os animais que foram inoculados com CS, MC de CS pré-tratadas com nPEDF, e o fator puro coPEDF obtiveram menor déficit funcional quando comparados com o grupo contusa. Apesar de o fator nPEDF puro ter promovido uma boa pontuação no índice BBB, o mesmo não se repete no CBS.

5. DISCUSSÃO

Durante a embriogênese e o período pós-natal, neurônios e células gliais interagem no desenvolvimento e diferenciação de células nervosas. Tanto no SNP como no SNC, as células gliais possuem um papel importante na constituição de um substrato favorável para as células neuronais, assim como, inúmeras moléculas secretadas pelos neurônios, também influenciam a sobrevivência e a diferenciação das CS.

O presente estudo objetivou a avaliação do potencial regenerativo e trófico das CS e do fator neurotrófico PEDF sobre os neurônios da medula espinal através da cultura destas células *in vitro* assim como no modelo experimental da lesão medular contusa *in vivo*.

Apesar das células de Schwann serem responsáveis pela mielinização dos axônios periféricos, já foi demonstrado o grande potencial dessas células na regeneração do SNC não somente através da mielinização de axônios centrais como também através da produção de moléculas tróficas importantes para o processo regenerativo e trófico deste órgão (Oudega, 2007).

Foi visto por Ullian et al., (2004) que as CS ou o seu meio condicionado estão envolvidos na formação de sinapses entre neurônios da medula espinal. Nesta mesma linha de estudos, foi demonstrado que o MCCS promove a formação sináptica entre neurônios motores e musculares de *Xenopus in vitro* (Peng et al., 2003) e que o produto secretivo das CS influencia a formação de sinapses na junção neuromuscular (Lin et al., 2000).

No presente estudo foi demonstrado que o MCCS exerceu um efeito de arborização agudo e prolongado sobre a cultura de neurônios da medula espinal, comprovando que de fato, a secreção de moléculas tróficas pelas CS pode ser benéfica para o desenvolvimento neuronal. Ao observarmos os grupos controles, meio neuronal e meio das CS, foi visto que os neurônios medulares em cultura possuem habilidade extrínseca de formarem prolongamentos dendríticos,

assim como de manter o trofismo de seus corpos celulares e que, portanto, o produto secretado pelas CS pode ser considerado uma fonte extrínseca de sinalização plástica aos neurônios medulares.

De fato, Pellitteri et al., (2006) demonstrou em co-culturas de neurônios glutamatérgicos e CS, que estas células promoveram não somente a sobrevivência neuronal, como também seu crescimento dendrítico e axonal. Foi observado pelo grupo que os ramos axonais cresciam em direção à cultura de CS, indicando um trofismo particular da arborização dendrítica em relação a essas células.

Assim a habilidade das CS em promover efeitos plásticos e tróficos sobre a cultura de neurônios é mediada através de moléculas solúveis. No entanto, a identificação dos fatores secretados pelas CS é de extrema valia para o entendimento do mecanismo pelo qual estas células induzem os fenômenos plásticos observados neste em outros estudos prévios.

O PEDF é um fator neurotrófico que está presente durante o desenvolvimento de mamíferos atuando em diferentes órgãos, como músculos, fluídos biológicos, e no SNC, onde age preferencialmente nas células endoteliais, e nos neurônios motores da medula espinal. Este fator neurotrófico possui um importante papel na sobrevivência e manutenção desses neurônios não somente durante o desenvolvimento fetal como também na vida pós-natal (Wu and Baccarini, 1996; Tombram-Tink et al., 1996; Bilak et al., 1999).

O estudo de Crawford et al. (2001) demonstrou que o fator neurotrófico PEDF é secretado pelas CS possuindo um efeito anti-apoptótico em relação à essas células. Utilizando um método que induz a apoptose das CS, os autores demonstraram que a adição do PEDF no meio de cultura dessas células, além de promover a proteção das CS, também estimulou sua divisão.

O efeito mitógeno do PEDF sobre as CS também foi demonstrado no presente trabalho, onde se observou que os fatores nPEDF e coPEDF apresentam um efeito mitógeno sobre a

cultura de CS em relação ao grupo controle, efeito este que foi intensamente potencializado pelo fator nPEDF a partir de 48 horas do tratamento se estendendo ao longo de todo decurso temporal.

É importante ressaltar que neste trabalho foi utilizado duas isoformas do fator neurotrófico PEDF, e que apesar das mesmas possuírem a mesma sequência protéica, o coPEDF possui a fusão de um n terminal em sua cadeia polipeptídica. Este fato pode levar a algumas mudanças na conformação da proteína e alterar a ligação desta molécula com seu receptor, fato este que poderia justificar pequenas diferenças entre o nPEDF e o coPEDF.

A habilidade do PEDF em estimular o crescimento das CS pode ser importante no processo regenerativo do SNC, visto que essas células favorecem a regeneração axonal, além de serem consideradas fonte natural de fatores neurotróficos (Cheng et al 1998). A inoculação das CS pré-tratadas com o PEDF na medula espinal lesada pode ser uma maneira de favorecer a sobrevivência dessas células, assim como permitir que as mesmas se multipliquem potenciando o seu suporte trófico.

Além de estimular a divisão das CS, o PEDF também está envolvido com a neuroproteção e diferenciação neuronal. Foi demonstrado por Houenou et al. (1999) que o PEDF promoveu a sobrevivência e a diferenciação (crescimento neurítico) de neurônios motores da medula espinal do embrião da galinha. Os mesmos autores também demonstraram que o PEDF é transportado retrogradamente e preveniu a morte e a atrofia dos neurônios motores de camundongos neonatos após a axotomia.

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstraram o efeito neurotrófico do PEDF sobre os prolongamentos neuronais de neurônios da medula espinal *in vitro*. Apesar da arborização também ter sido observado com o tratamento da cultura com o MCCS, esse fenômeno foi potencializado com a utilização do MC de CS pré-tratadas com o PEDF, sendo ainda mais significativo com a utilização do fator puro (na ausência das CS). A partir dos

dados observados, pode-se dizer que os neurônios da medula espinal são responsivos ao produto de secreção das CS, resposta esta que pode ser amplificada com manipulação específica dessas células. Porém, o efeito mais potente no que se diz respeito à arborização dos neurônios *in vitro*, pode ser conseguido pela identificação de fatores neurotróficos com ações importantes a estes neurônios como é o caso do PEDF.

Os mecanismos da ação neuroplástica do PEDF e suas vias de sinalização ainda não são conhecidos. Bilak et al., (2002) demonstrou que o PEDF está amplamente distribuído na medula espinal e que os neurônios motores possuem receptores específicos e de alta afinidade para o PEDF em sua superfície celular, sendo assim, a ligação da molécula PEDF com seu receptor pode dar início a uma cascata de eventos neuroprotetores. Outra teoria vigente, é que o PEDF possua ações neurotróficas através da modulação intracelular do cálcio (Taniwaki et al., 1997), ou através da síntese e liberação de outros fatores neurotróficos e/ou neurotransmissores (Bilak et al., 2002).

Foi demonstrado por Yabe et al., (2001) que o PEDF protegeu culturas de neurônios cerebelares através do aumento dos níveis de RNAm dos fatores BDNF, NGF e GDNF. De fato, o efeito plástico da cultura de neurônios medulares observado no presente estudo pode ter ocorrido através da presença do PEDF, o qual estimou as CS a secretarem diferentes fatores neurotróficos resultando em uma maior arborização dendrítica e no aumento trofismo dos corpos celulares das culturas que receberam este tratamento.

No entanto, ainda é necessário que seja investigado quais as moléculas produzidas pelas CS, estimuladas pelo PEDF, exercem os efeitos tróficos aos neurônios medulares descritos pioneiramente neste trabalho. Tal análise está sendo realizada no nosso laboratório através de técnicas de Western Blot.

Diversos trabalhos existentes na literatura descreveram o efeito neuroprotetor do PEDF sobre neurônios da medula espinal, este fator está envolvido com o efeito neuroprotetor destes

neurônios contra a excitotoxicidade glutamatérgica, e de situações que induzem a apoptose (Bilak et al., 1999; Houeneou et al., 1999; Bilak et al., 2002). No entanto, este efeito neuroprotetor não foi observado na cultura de neurônios realizada neste trabalho, a não ser um modesto efeito do MC CS/coPEDF.

Uma possível explicação desse resultado é o fato de que os trabalhos prévios que demonstraram a atividade neuroprotetora do PEDF realizaram cultura de neurônios associada a uma situação de dano celular como a excitotoxicidade e a apoptose induzida. Bilak et al. (1999) relataram que PEDF age preferencialmente na sobrevivência de células que estão em sofrimento, possuindo pouca ação sobre os neurônios saudáveis.

Os experimentos *in vivo* realizados no presente estudo, tiveram como principal objetivo analisar o potencial do PEDF em aumentar a eficácia das CS inoculadas na lesão contusa da medula espinal do rato na recuperação do comportamento motor do animal.

Para o desenvolvimento de uma abordagem efetiva da lesão medular, é imperativo o uso de modelos de lesão clinicamente relevantes. Neste trabalho as lesões contusas na medula espinal foram produzidas através do NYU Impactor, o qual produz lesões de intensidade graduada através da queda de um peso de 10g na medula espinal. O Impactor comprime a medula ao cair de uma distância precisa por um curto período de tempo. A razão mais importante para a utilização deste sistema é devido ao fato de que a seqüência patológica dos eventos induzidos por esse sistema é muito semelhante ao observado nos seres humanos.

A lesão contusa de intensidade moderada permite que a análise da resposta de regeneração axonal seja complexa devido à presença de axônios remanescentes. Além disto, este tipo de modelo experimental de lesão medular possibilita a avaliação das características neuroprotetivas dos tratamentos efetuados e a repercussão delas sobre a recuperação comportamental (Young, 2002).

As avaliações pelos testes comportamentais revelam que as lesões contusas de

intensidade moderadas e intensas provocam déficits sensório-motores semelhantes. Porém, foram encontradas fibras remanescentes com maior frequência nas lesões de intensidade moderada (25 mm) do que nas lesões intensas (50 mm) (Beattie et al., 1997). Além disso, nosso laboratório demonstrou recentemente que a lesão moderada oferece uma janela terapêutica para a neuroproteção, já que o decurso temporal da neurodegeneração após esta intensidade é mais lento que aquele deflagrado pelas lesões mais intensas (Andrade et al., 2008).

A inoculação de CS é uma terapia que parece ser capaz de remielinizar a medula espinal após um processo de demielinização, sendo o transplante destas células uma aplicação terapêutica para o reparo do SNC (Baron-Van et al, 1997; Lavdas et al, 2008). Após lesão do tecido nervoso as CS ativam programas intracelulares para a produção de diversos FNT e moléculas da matriz extracelular, os quais suportam a regeneração dos axônios lesados. Em um estudo comparativo, a implantação de CS na medula espinal lesada em ratos adultos mostrou uma maior habilidade de regeneração axonal, assim como, uma melhora significativa da locomoção dos membros posteriores quando comparada à inoculação de células embanhadoras do bulbo olfatório (OEG) (Takami et al., 2002).

Outro aspecto importante a favor das CS é o fato dessas células poderem ser obtidas facilmente e em grande quantidade. Ainda, no futuro, as CS podem ser obtidas através de um pequeno fragmento de nervo de um paciente lesado medular, serem isoladas e amplificadas *in vitro* em um curto período de tempo. Essas células poderão ser então utilizadas em transplantes autólogos, que minimizam a rejeição imunológica dos implantes celulares.

A análise *in vivo* demonstrou que todos os animais manifestaram uma recuperação comportamental espontânea após a lesão medular contusa como foi demonstrado por Basso et al. (1996). O tratamento do trauma contuso da medula espinal com as CS continua causando um efeito positivo sobre a recuperação do BBB e do CBS como descrito na literatura (Paino et al., 1994; Xu et al., 1995, 1997, 1999; Guest et al., 1997; Takami et al 2002) efeito este

reproduzido com intensidade um pouco menor pelo MCCA e o fator nPEDF e intensificado pelo fator coPEDF.

Alguns autores já investigaram a combinação de fatores neurotróficos juntamente com as CS no trauma medular espinal. Rabchevski et al. (1999) demonstraram que o FGF-2 foi capaz de aumentar a capacidade das CS em reparar a medula espinal lesada, levando a uma melhora comportamental. A combinação das CS com as neurofinas BDNF e NT-3 também resultaram em melhora comportamental após a hemilesão medular no estudo realizado por Bamber et al. (2001).

O presente estudo investigou se a presença das diferentes formas moleculares do fator neurotrófico PEDF associado ou não às CS, assim como o meio condicionado dessas células foi capaz de induzir recuperação comportamental dos animais lesados. Foi visto que as CS tratadas com o fator neurotrófico nPEDF e inoculadas no local da lesão prejudicou parcialmente o efeito visto pelas CS sozinhas, entretanto, a utilização do MC CS/nPEDF produziu um efeito temporal consideravelmente benéfico, indicando que existe a necessidade de um tempo prévio necessário para que estas células pré-ativadas pelo nPEDF pudessem produzir os elementos para a promoção na fase aguda dos eventos necessário para aumentar a recuperação comportamental observada.

A inoculação do fator neurotrófico nPEDF puro demonstrou um efeito temporal muito semelhante ao MC CS/nPEDF, já a inoculação do fator coPEDF parece produzir uma taxa de recuperação comportamental superior à inoculação das CS, de fato, os animais que receberam a inoculação do coPEDF adquiriram coordenação motora dos movimentos a partir da segunda semana do início do tratamento.

O produto secretado pelas CS já foi previamente estudado por Peng et al. (2003). Os autores sugerem que o MCCA promove efeito um trófico aos axônios, assim como aumenta a liberação de neurotransmissores em co-culturas de nervos e músculos. Nesta mesma linha de

pesquisa, Son e Thompson (1995) também demonstraram que os fatores solúveis secretados pelas CS levam ao crescimento do axônio e arborização do terminal axonal.

A ação do meio condicionado *in vivo* não reflete o que foi observado *in vitro*, onde se observou um grande efeito do nPEDF nos neurônios cultivados, mas esse efeito não foi tão significativo *in vivo* nos testes BBB e CBS, no entanto, o tratamento prévio das CS com o nPEDF parece potencializar a capacidade regenerativa do meio condicionado destas células.

Deve ser enfatizado que no meio ambiente da lesão existem eventos secundários acontecendo como a ativação de células gliais para a formação da cicatriz glial, a produção de moléculas inibitórias à regeneração, a ativação da microglia e dos macrófagos, que fazem parte do cenário não permissivo a fenômenos regenerativos. Esses eventos interagem entre si e com os tratamentos propostos, justificando pequenas diferenças nos resultados encontrados nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Outro fato importante que justifique as diferenças encontradas é em relação a sobrevivência de células transplantadas ser comprometida em vários modelos de lesões do CNS. Hill et al., (2006) demonstrou que as CS possuem baixa taxa de sobrevivência quando inoculadas em um ambiente de lesão medular, sendo que a maioria das células morrem nas primeiras 24 horas após o enxerto e após 7 dias 20% das células permanecem vivas, sendo que esta porcentagem permanece estável ao longo de 3 semanas.

No entanto, como já foi dito anteriormente, inúmeros trabalhos já demonstraram que a inoculação de CS em lesões medulares contusas melhora o comportamento motor dos animais lesados. Postula-se portando, que muito provavelmente esta melhora, ainda modesta, do quadro neurológico dos animais lesados pode estar restrita a pobre taxa de sobrevivência das CS transplantadas, limitando assim o potencial destas células.

As CS transplantadas na medula espinal têm como um dos objetivos de repor células mortas, preencher áreas lesadas, e servir como um substrato físico para os axônios em

regeneração. No entanto, devido a baixa taxa de sobrevivência, os axônios não terão o suporte necessário para crescer ao longo do local da lesão. Também foi demonstrado que a grande maioria da morte celular ocorre através da necrose, onde a célula em processo de morte libera seu conteúdo intracelular, podendo exacerbar o dano tecidual e mascarar os benefícios e o potencial terapêutico dessas células (Hill et al., 2007).

Assim, os resultados deste trabalho fornecem evidências de que as CS e o seu MC são importantes para os neurônios da medula espinal assim como o FNT PEDF por si só, ou induzindo modificações sobre as CS. Entretanto, deve-se ressaltar que a análise das ocorrências fisiopatológicas e teciduais no que diz respeito a possíveis efeitos neuroprotetivos, ao número de neurônios remanescentes, assim como respostas plásticas comparadas com o efeito dos tratamentos propostos, poderá trazer subsídios importantes para a melhor interpretação dos resultados obtidos.

6. CONCLUSÕES

- O fator neurotrófico PEDF possui ação mitogênica sobre as CS.
- O meio condicionado das CS pré-tratadas com o PEDF, possui um papel importante na arborização dos neurônios da medula espinal.
- A utilização dos fatores PEDF de forma isolada, promoveu um aumento da resposta em relação à quantidade de prolongamentos neuronais.
- O meio condicionado das CS pré-tratadas com o PEDF, ou este fator por si só, induziram respostas tróficas sobre o corpo celular dos neurônios da medula espinal.
- Os tratamentos sugeridos *in vitro*, com exceção do MCcoPEDF, não produziram efeito sobre o número de neurônios remanescentes cultivados a partir da medula espinal de ratos neonatos.
- As CS, seu meio condicionado, e o fator neurotrófico PEDF induziram à recuperação comportamental dos animais submetidos ao trauma medular contuso analisada através dos testes comportamentais BBB e CBS.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguayo AJ, David S, Bray GM. Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol* 1981;95:231-40.
2. Anderson DK, Hall ED. Pathophysiology of spinal cord trauma. *Ann Emerg Med* 1993;22(6):987-92.
3. 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.
4. 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.
5. Bamber NI, Li H, Lu X, Oudega M, Aebischer P, Xu XM. Neurotrophins BDNF and NT-3 promote axonal re-entry into the distal host spinal cord through Schwann cell-seeded mini-channels. *Eur J Neurosci* 2001;13(2):257-68.
6. Barakat DJ, Gaglani SM, Neravetla SR, Sanchez AR, Andrade CM, Pressman Y, et al. Survival, integration, and axon growth support of glia transplanted into the chronically contused spinal cord. *Cell Transplant* 2005;14(4):225-40.
7. Baron-Van Evercooren A, Avellana-Adalid V, Lachapelle F, Liblau R. Schwann cell transplantation and myelin repair of the CNS. *Mult Scler* 1997;3(2):157-61.
8. 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.
9. 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.

10. 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.

11. Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC. Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res* 2002;137:37-47.

12. Baccera SP. Structure-function studies on PEDF. A noninhibitory serpin with neurotrophic activity. *Adv Exp Med Biol* 1997;425:223-37.

13. Becker E, Soler RM, Yuste VJ, Gine E, Sanz-Rodriguez C, Egea J, et al. Development of survival responsiveness to brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3 and neurotrophin 4/5, but not to nerve growth factor, in cultured motoneurons from chick embryo spinal cord. *J Neurosci* 1998;18(19):7903-11.

14. Bhatheja K, Field J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38(12):1995-9.

15. Bilak MM, Corse AM, Bilak SR, Lehar M, Tombran-Tink J, Kuncel RW. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58(7):719-28.

16. Bilak MM, Corse AM, Bilak SR, Lehar M, Tombran-Tink J, Kuncel RW. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58(7):719-28.

17. Bilak MM, Baccera SP, Vincent AM, Moss BH, Aymerich MS, Kuncel RW. Identification of the neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons. *J Neurosci* 2002;22(21):9378-86.

18. Bregman BS, Coumans JV, Dai HN, Kuhn PL, Lynskey J, McAtee M, et al. Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after

spinal cord injury. *Prog Brain Res* 2002;137:257-73.

19. Broude E, McAtee M, Kelley MS, Bregman BS. Fetal spinal cord transplants and exogenous neurotrophic support enhance c-Jun expression in mature axotomized neurons after spinal cord injury. *Exp Neurol* 1999;155(1):65-78.

20. Carmignoto G, Pizzorusso T, Tia S, Vicini S. Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor potentiate excitatory synaptic transmission in the rat visual cortex. *J Physiol* 1997;498 (Pt 1):153-64.

21. 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.

22. Cheng L, Esch FS, Marchionni MA, Mudge AW. Control of Schwann cell survival and proliferation: autocrine factors and neuregulins. *Mol Cell Neurosci* 1998;12(3):141-56.

23. Colello RJ, Schwab ME. A role for oligodendrocytes in the stabilization of optic axon numbers. *J Neurosci* 1994;14(11 Pt 1):6446-52.

24. Coumans JV, Lin TT, Dai HN, MacArthur L, McAtee M, Nash C, et al. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J Neurosci* 2001;21(23):9334-44.

25. Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M, Huang X, Huang L, Volpert O, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 24):4421-8.

26. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):245-8.

27. DeCoster MA, Schabelman E, Tombran-Tink J, Bazan NG. Neuroprotection by

pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 1999;56(6):604-10.

28. DeFelipe J, Jones EG. Parvalbumin immunoreactivity reveals layer IV of monkey cerebral cortex as a mosaic of microzones of thalamic afferent terminations. *Brain Res* 1991;562(1):39-47.

29. Edgerton VR, Leon RD, Harkema SJ, Hodgson JA, London N, Reinkensmeyer DJ, et al. Retraining the injured spinal cord. *J Physiol* 2001;533(Pt 1):15-22.

30. Ek ET, Dass CR, Choong PF. PEDF: a potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities. *Trends Mol Med* 2006;12(10):497-502.

31. Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec* 2001;263(4):396-404.

32. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 1990;13:43-60.

33. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 1999;49(6):377-91.

34. Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(9):703-13.

35. Franklin RJ, Barnett SC. Do olfactory glia have advantages over Schwann cells for CNS repair? *J Neurosci Res* 1997;50(5):665-72.

36. 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.

37. Grill R, Murai K, Blesch A, Gage FH, Tuszynski MH. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 1997;17(14):5560-72.

38. Guest JD, Rao A, Olson L, Bunge MB, Bunge RP. The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord. *Exp Neurol* 1997;148(2):502-22.
39. Hammarberg H, Piehl F, Cullheim S, Fjell J, Hokfelt T, Fried K. GDNF mRNA in Schwann cells and DRG satellite cells after chronic sciatic nerve injury. *Neuroreport* 1996;7(4):857-60.
40. Hatten ME. Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro. *J Cell Biol* 1985;100(2):384-96.
41. Henderson CE, Camu W, Mettling C, Gouin A, Poulsen K, Karihaloo M, et al. Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature* 1993;363(6426):266-70.
42. Hill CE, Moon LD, Wood PM, Bunge MB. Labeled Schwann cell transplantation: cell loss, host Schwann cell replacement, and strategies to enhance survival. *Glia* 2006;53(3):338-43.
43. Hill CE, Hurtado A, Blits B, Bahr BA, Wood PM, Bartlett Bunge M, et al. Early necrosis and apoptosis of Schwann cells transplanted into the injured rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 2007;26(6):1433-45.
44. Himes BT, Liu Y, Solowska JM, Snyder EY, Fischer I, Tessler A. Transplants of cells genetically modified to express neurotrophin-3 rescue axotomized Clarke's nucleus neurons after spinal cord hemisection in adult rats. *J Neurosci Res* 2001;65(6):549-64.
45. Ho N, Destexhe A. Synaptic background activity enhances the responsiveness of neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2000;84(3):1488-96.
46. Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 2000;407(6807):963-70.
47. Houenou LJ, D'Costa AP, Li L, Turgeon VL, Enyadike C, Alberdi E, et al.

Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. *J Comp Neurol* 1999;412(3):506-14.

48. Iannotti C, Li H, Yan P, Lu X, Wirthlin L, Xu XM. Glial cell line-derived neurotrophic factor-enriched bridging transplants promote propriospinal axonal regeneration and enhance myelination after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2003;183(2):379-93.

49. Jessen KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, et al. The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* 1994;12(3):509-27.

50. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(9):671-82.

51. Klintsova AY, Greenough WT. Synaptic plasticity in cortical systems. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9(2):203-8.

52. Klussmann S, Martin-Villalba A. Molecular targets in spinal cord injury. *J Mol Med* 2005;83(9):657-71.

53. Kubo T, Yamashita T, Yamaguchi A, Hosokawa K, Tohyama M. Analysis of genes induced in peripheral nerve after axotomy using cDNA microarrays. *J Neurochem* 2002;82(5):1129-36.

54. Lavdas AA, Papastefanaki F, Thomaidou D, Matsas R. Schwann cell transplantation for CNS repair. *Curr Med Chem* 2008;15(2):151-60.

55. Leonard CS, Simpson JI, Graf W. Spatial organization of visual messages of the rabbit's cerebellar flocculus. I. Typology of inferior olive neurons of the dorsal cap of Kooy. *J Neurophysiol* 1988;60(6):2073-90.

56. LeRoith D, Werner H, Faria TN, Kato H, Adamo M, Roberts CT, Jr. Insulin-like growth factor receptors. Implications for nervous system function. *Ann N Y Acad Sci* 1993;692:22-32.

57. Lertsburapa T, De Vries GH. In vitro studies of pigment epithelium-derived factor in human Schwann cells after treatment with axolemma-enriched fraction. *J Neurosci Res* 2004;75(5):624-31.
58. Lin W, Sanchez HB, Deerinck T, Morris JK, Ellisman M, Lee KF. Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(3):1299-304.
59. Liu Y, Kim D, Himes BT, Chow SY, Schallert T, Murray M, et al. Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. *J Neurosci* 1999;19(11):4370-87.
60. Liu BP, Fournier A, GrandPre T, Strittmatter SM. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* 2002;297(5584):1190-3.
61. Logan A, Green J, Hunter A, Jackson R, Berry M. Inhibition of glial scarring in the injured rat brain by a recombinant human monoclonal antibody to transforming growth factor-beta2. *Eur J Neurosci* 1999;11(7):2367-74.
62. Logan A, Berry M. Cellular and molecular determinants of glial scar formation. *Adv Exp Med Biol* 2002;513:115-58.
63. Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, et al. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 1990;5(4):501-9.
64. 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.
65. 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.

66. Menei P, Montero-Menei C, Whitemore 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.

67. Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res* 2002;137:313-32.

68. Morrison RS, Gross JL, Moskal JR. Inhibition of protein kinase C activity promotes the neurotrophic action of epidermal and basic fibroblast growth factors. *Brain Res* 1988;473(1):141-6.

69. 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.

70. Nagler K, Mauch DH, Pfrieder FW. Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. *J Physiol* 2001;533(Pt 3):665-79.

71. 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.

72. Oudega M, Moon LD, de Almeida Leme RJ. Schwann cells for spinal cord repair. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(6):825-35.

73. Oudega M. Schwann cell and olfactory ensheathing cell implantation for repair of the contused spinal cord. *Acta Physiol (Oxf)* 2007;189(2):181-9.

74. Paino CL, Fernandez-Valle C, Bates ML, Bunge MB. Regrowth of axons in lesioned adult rat spinal cord: promotion by implants of cultured Schwann cells. *J Neurocytol* 1994;23(7):433-52.

75. Pellitteri R, Russo A, Stanzani S. Schwann cell: a source of neurotrophic

activity on cortical glutamatergic neurons in culture. *Brain Res* 2006;1069(1):139-44.

76. 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.

77. Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(1):24-32.

78. Qian JA, Bull MS, Levitt P. Target-derived astroglia regulate axonal outgrowth in a region-specific manner. *Dev Biol* 1992;149(2):278-94.

79. 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.

80. Raineteau O, Schwab ME. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(4):263-73.

81. Raineteau O, Fouad K, Noth P, Thallmair M, Schwab ME. Functional switch between motor tracts in the presence of the mAb IN-1 in the adult rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(12):6929-34.

82. Raineteau O, Fouad K, Bareyre FM, Schwab ME. Reorganization of descending motor tracts in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 2002;16(9):1761-71.

83. Ramer MS, Priestley JV, McMahon SB. Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature* 2000;403(6767):312-6.

84. Rhodes KE, Moon LD, Fawcett JW. Inhibiting cell proliferation during formation of the glial scar: effects on axon regeneration in the CNS. *Neuroscience* 2003;120(1):41-56.

85. Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C. Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor.

Nature 1997;389(6652):725-30.

86. Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg* 1977;47(4):577-81.

87. Russell FD, Koishi K, Jiang Y, McLennan IS. Anterograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptors in rat hypoglossal nerve. *Neuroscience* 2000;97(3):575-80.

88. Sayers ST, Khan N, Ahmed Y, Shahid R, Khan T. Preparation of brain-derived neurotrophic factor- and neurotrophin-3-secreting Schwann cells by infection with a retroviral vector. *J Mol Neurosci* 1998;10(2):143-60.

89. Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci* 1999;11(10):3648-58.

90. Seil FJ, Drake-Baumann R. Neurotrophins and activity-dependent inhibitory synaptogenesis. *Prog Brain Res* 2000;128:219-29.

91. Seybold VS, Abrahams LG. Primary cultures of neonatal rat spinal cord. *Methods Mol Med* 2004;99:203-13.

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

93. Son YJ, Thompson WJ. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 1995;14(1):125-32.

94. Springer JE, Mu X, Bergmann LW, Trojanowski JQ. Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue. *Exp Neurol* 1994;127(2):167-70.

95. Stahnisch FW, Nitsch R. Santiago Ramon y Cajal's concept of neuronal plasticity: the ambiguity lives on. *Trends Neurosci* 2002;25(11):589-91.

96. Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J. Pigment epithelium-

derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(4):1526-30.

97. 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.

98. Taniwaki T, Hirashima N, Becerra SP, Chader GJ, Etcheberrigaray R, Schwartz JP. Pigment epithelium-derived factor protects cultured cerebellar granule cells against glutamate-induced neurotoxicity. *J Neurochem* 1997;68(1):26-32.

99. Taylor JS, Bampton ET. Factors secreted by Schwann cells stimulate the regeneration of neonatal retinal ganglion cells. *J Anat* 2004;204(1):25-31.

100. Tombran-Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30(8):1700-7.

101. Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, Chung D, Linker T, Englander E, et al. Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis* 1996;2:11.

102. Tombran-Tink J, Barnstable CJ. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(8):628-36.

103. Ullian EM, Harris BT, Wu A, Chan JR, Barres BA. Schwann cells and astrocytes induce synapse formation by spinal motor neurons in culture. *Mol Cell Neurosci* 2004;25(2):241-51.

104. Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H. Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75(7):3498-502.

105. Vaca K, Wendt E. Divergent effects of astroglial and microglial secretions on neuron growth and survival. *Exp Neurol* 1992;118(1):62-72.
106. Vejsada R, Sagot Y, Kato AC. Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo. *Eur J Neurosci* 1995;7(1):108-15.
107. Wang CY, Yang F, He XP, Je HS, Zhou JZ, Eckermann K, et al. Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin. *J Biol Chem* 2002;277(12):10614-25.
108. Woolf CJ. No Nogo: now where to go? *Neuron* 2003;38(2):153-6.
109. Wu YQ, Becerra SP. Proteolytic activity directed toward pigment epithelium-derived factor in vitreous of bovine eyes. Implications of proteolytic processing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(10):1984-93.
110. Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB. Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1995;351(1):145-60.
111. 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.
112. Xu XM, Zhang SX, Li H, Aebischer P, Bunge MB. Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell-seeded mini-channel implanted into hemisectioned adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1999;11(5):1723-40.
113. Yabe T, Wilson D, Schwartz JP. NFkappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* 2001;276(46):43313-9.
114. Young W. Spinal cord contusion models. *Prog Brain Res* 2002;137:231-55.

115. Yuen EC, Howe CL, Li Y, Holtzman DM, Mobley WC. Nerve growth factor and the neurotrophic factor hypothesis. *Brain Dev* 1996;18(5):362-8.
116. Zhang Z, Soucacos PN, Bo J, Beris AE, Malizos KN, Ioachim E, et al. Reinnervation after end-to-side nerve coaptation in a rat model. *Am J Orthop* 2001;30(5):400-6; discussion 407.
117. Zigmond MJ. Otto Loewi and the demonstration of chemical neurotransmission. *Brain Res Bull* 1999;50(5-6):347-8.