

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO INSULINOTRÓPICO DEPENDENTE  
DE GLICOSE (GIP) E DO SEU RECEPTOR NA MEDULA ESPINAL DE ANIMAIS  
SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR TRAUMÁTICA  
INDUZIDA POR COMPRESSÃO**

**ANA BEATRIZ SPERB WANDERLEY MARCOS**

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Pinto Figueiredo

**Florianópolis**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO INSULINOTRÓPICO DEPENDENTE  
DE GLICOSE (GIP) E DO SEU RECEPTOR NA MEDULA ESPINAL DE ANIMAIS  
SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR TRAUMÁTICA  
INDUZIDA POR COMPRESSÃO**

Dissertação apresentada pela aluna Ana Beatriz Sperb Wanderley Marcos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Pinto Figueiredo

**Florianópolis**

**2011**

*Dedico este trabalho aos meus amados pais, Maria Helena e Mauro Rogério, que me deram asas e raízes para que eu conseguisse voar até aqui.*

## **Agradecimentos**

A Deus, por guiar meu caminho, iluminar minha vida e estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis e alegres. Obrigada por fortalecer minha fé a cada dia.

À professora Dra Cláudia Pinto Figueiredo, orientadora e amiga. Obrigada Cláudia pela sua valiosa orientação durante o mestrado, por despertar meu interesse para a pesquisa, pelo amor mútuo e pelo exemplo de competência e dedicação, que guardarei por toda a vida. Você foi imprescindível para a realização e conclusão dessa etapa científica.

Agradeço ao professor Dr. João B. Calixto e aos colegas do LAFEX, por terem me acolhido com tanta ternura e terem compartilhado comigo alguns conhecimentos, em especial a Edinéia, Alessandra, Stefânia, Flávia, Eduardo e Eliziane, pelo carinho e dedicação despendida nesse trabalho.

À minha mãe, por me amar e me fazer acreditar que na vida nada devemos temer, além de me apoiar e incentivar em todos os momentos, inclusive na realização desta pós-graduação. Mãe, você é um exemplo em todos os sentidos.

Ao meu pai, que apesar de ter saído cedo dessa vida, sinto-o presente em todas as situações. Pai, obrigada pelo imenso carinho e amor. Admiro muito o caminho por você percorrido, grande inspiração que me faz tentar andar pelo menos um pouco da sua trajetória.

Ao meu marido, grande amor da minha vida, pelo amor e presença constante, apoio em todas as minhas decisões e principalmente por acreditar nos meus sonhos.

Aos meus avós queridos, que apesar da distância, estão sempre comigo. Vocês são minha fonte de inspiração. Obrigada pela família linda que nos proporcionaram.

Aos meus irmãos que tanto amo, Mauro Rogério e Pedro Paulo, que sempre acompanharam minha trajetória, com muito carinho, incentivo, amizade e compreensão nos momentos difíceis.

À minha sogra Maria José, minhas cunhadas Michella, Renata, Larissa e Flora, ao meu cunhado Murilo e aos meus amados sobrinhos Rafaella e Henrique, partes integrantes dessa família que tanto amo. Obrigada pela compreensão e apoio nos momentos difíceis.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, em especial aos professores Márcia Pizzichini e Roger Walz, por terem me acolhido com tanta ternura e terem me encaminhado à minha grande orientadora.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, em especial ao Sr. Ivo, que esteve sempre disponível para esclarecer dúvidas e encontrar soluções, sempre de forma dedicada e carinhosa.

## Resumo

A lesão traumática da medula espinal (LTME) desencadeia uma síndrome neurológica altamente incapacitante. Uma estratégia aparentemente promissora para o tratamento da lesão medular traumática seria a intensificação dos mecanismos endógenos de neuroproteção, neuroplasticidade e reparo. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de possíveis modificações no padrão de expressão do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e do seu receptor (GIPR) na medula espinal de ratos submetidos à lesão medular traumática induzida por compressão. A análise histológica da medula espinal dos animais lesionados demonstrou um processo necro-hemorrágico na fase aguda (2 h, 6 h e 24 h após a indução da lesão) e uma lesão cavitada com grande quantidade de células balonizadas nas medulas dos animais sacrificados 14 ou 28 dias após indução da lesão. Nossos resultados mostraram que a lesão traumática da medula espinal resultou em aumento da expressão do GIPR na região adjacente ao sítio da lesão 6 h e 28 dias após indução da mesma, e um aumento da expressão do GIP, nesta mesma região, 28 dias após indução da lesão. Os prolongamentos neuronais do epicentro da lesão medular dos animais sacrificados após 24 h, 14 e 28 dias apresentaram maior intensidade de marcação para o GIP quando comparado com os prolongamentos da substância cinzenta dos animais falso-operados. Um achado de grande interesse descrito neste estudo foi a detecção do GIP e do GIPR nas células progenitoras (positivas para a proteína nestina) presentes no epicentro da lesão crônica, e nas células progenitoras do canal ependimário dos animais lesionados sacrificados 24 h após indução da lesão. Estes resultados sugerem que o GIP e seu receptor participem da regulação dos fenômenos proliferativos e/ou reparadores do Sistema Nervoso Central.

## **Abstract**

Spinal cord injury (SCI) results in a loss of movement, sensation and autonomic control below and at the level of the lesion. The spinal cord adult neural stem/progenitor cells are responsive to injury, and the environment plays a pivotal role in the fate decision made by progenitor cells. Several experimental strategies have been used in attempt to increase endogenous mechanisms of neuroprotection, neuroplasticity and repair. The aim of this study was to evaluate the occurrence of possible changes in expression pattern of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) and its receptor (GIPR) in spinal cord of animals submitted to traumatic SCI. The spinal cord of animals submitted to SCI showed hemorrhage and necrosis process in acute phase (2 h, 6 h and 24 h after injury induction). The tissues of animals sacrificed 14 or 28 days after lesion induced injury. TSCI results in increasing of GIPR expression in adjacent areas of lesion 6 h and 28 days after induction, and increasing of GIP expression in the same region, 28 days after injury induction. Neural extensions of spinal cord injury epicenter of animals sacrificed 24 h, 14 and 28 days after TSCI showed higher intensity in marking to GIP when compared to neural extensions of gray matter in false-operated animals. A finding of great interest described in this study was GIP and GIPR detection in progenitor cells (positives to nestin protein) present in epicenter of chronic injury and in progenitor cells of ependymal canal of animals sacrificed 24 h after TSCI. These results suggest that GIP and its receptor participate in the regulation of proliferative or repair central nervous system phenomena.

## **1. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA**

### **1.1. Lesão Medular Traumática**

#### **1.1.1. Características gerais e epidemiologia da lesão**

A lesão da medula espinal acomete mundialmente cerca de 2,5 milhões de pessoas (Schwab *et al.*, 2006). A violência urbana dos grandes centros está nitidamente ligada a estes dados estatísticos, porém a etiologia do trauma medular varia em função do tipo de atividade da população (Berkovsky, 2009).

O traumatismo da medula espinal pode resultar em alterações nas funções motora, sensitiva e autonômica, implicando em perda parcial ou total dos movimentos voluntários ou da sensibilidade (tátil, dolorosa e profunda) em membros superiores e/ou inferiores além de alterações no funcionamento dos sistemas urinário, intestinal, respiratório, circulatório, sexual e reprodutivo (Lianza *et al.*, 2001). As causas mais comumente associadas à lesão traumática da medula espinal são os acidentes automobilísticos (56%), quedas (14%), ferimentos por arma de fogo e outros relacionados à violência (16,6%) e danos causados por esportes (7%) (Vitale *et al.*, 2006). Os homens com média de idade de 25 anos são os mais acometidos (65%), dos quais 70% tornam-se paraplégicos (paralisia parcial ou completa de parte ou ambos os membros inferiores e tronco, resultante de lesões na medula espinal torácica, lombar ou sacral) e 30% tetraplégicos (paralisia parcial ou completa dos quatro membros e tronco, resultante de lesões na medula cervical) (Schmitz, 2004).

A lesão medular traumática é um insulto degenerativo que desencadeia uma síndrome neurológica altamente incapacitante, a qual prejudica o funcionamento de

vários órgãos e sistemas, acarretando alterações da homeostase física e emocional dos pacientes. Os danos à medula espinal durante uma lesão traumática variam consideravelmente dependendo da gravidade, velocidade e duração da lesão. O trauma agudo resulta em prejuízos neurológicos causados pela interrupção direta das vias neuronais, e por alterações subseqüentes que ocorrem por um período de horas até dias após a lesão primária. O processo traumático resulta em hemorragia, edema e isquemia que afeta principalmente a substância cinzenta da medula espinal. Na maioria das vezes, a agressão inicial não é suficiente para causar uma destruição tecidual permanente na medula, porém desencadeia uma série de eventos secundários progressivos que agravam a lesão primária (Lu *et al.*, 2000; Mallei *et al.*, 2005).

### **1.1.2. Respostas primárias e secundárias à lesão medular**

A lesão traumática da medula espinal é caracterizada por uma perda tecidual irreversível e imediata no sítio da lesão, denominada lesão primária, associada a uma expansão tardia ou secundária do dano tecidual (Peng *et al.*, 2009). Sendo assim, a fisiopatologia da lesão medular traumática envolve a compressão de dois mecanismos de lesão: o primário e o secundário (Sonntag e Douglas, 1990; Amar e Levy, 1999; Harrop *et al.*, 2006).

O impacto traumático imediato sobre a medula espinal resulta em danos parciais ou completos dos axônios, das células gliais e dos vasos sanguíneos, com conseqüente processo hemorrágico. Porém, dentro de horas, um dano tecidual adicional é iniciado na proximidade do local da lesão (Tator e Fehlings, 1991),

denominado lesão secundária. Múltiplos mecanismos vasculares, iônicos, bioquímicos, inflamatórios e celulares ocorrem concomitantemente durante o desenvolvimento da lesão tardia ou secundária (Hulsebosch, 2002; Norenberg *et al.*, 2004). Imediatamente após o trauma há uma redução significativa do fluxo sanguíneo da medula espinal, que se agrava nas primeiras horas e persiste por, no mínimo, 24 h (Tator e Fehlings, 1991) após indução do mesmo.

As alterações vasculares incluem inflamação, edema, isquemia, hipóxia e perfusão espinal reduzida. Fatores locais, entre eles vasoespasmo secundário ao dano traumático, produção de eicosanóides, agregação plaquetária intensa acarretando trombose, estresse oxidativo, edema vasogênico, entre outros, estão envolvidos na causa e permanência da isquemia da medula espinal (Dohrmann e Allen, 1975). Dentre os fatores sistêmicos, a hipotensão arterial sistêmica destaca-se como principal. Este fator pode ser causado por choque cardiogênico, hipovolêmico ou neurogênico (Guha e Tator, 1988). Essa fase é seguida por hiperemia e reperfusão tecidual, em que o influxo de radicais livres e outros produtos tóxicos na área levam ao aumento da lesão celular (Amar e Levy, 1999). Dentre as alterações bioquímicas, destaca-se a liberação de glutamato e conseqüente excitotoxicidade, liberação de proteases, formação de óxido nítrico e radicais livres (Agrawal *et al.*, 1998). Além disso, o efeito do trauma provoca a abertura dos canais de sódio, causando entrada desse íon, o que pode resultar, entre outras conseqüências, em acidose intracelular. A entrada de cálcio, que acompanha a entrada de sódio, induz alterações celulares deletérias (Tymianski e Tator, 1996). Em relação às células, pode-se observar intensa migração de macrófagos e neutrófilos para

o local da lesão, provocando apoptose de oligodendrócitos e degeneração Walleriana (degeneração de axônios) (Hausmann, 2003).

Os mecanismos pró-inflamatórios desencadeados pelo trauma do Sistema Nervoso Central (SNC) são complexos e pouco compreendidos, mas parecem contribuir de maneira decisiva para o desenvolvimento da lesão traumática irreversível (Gao e Hong, 2008). Os efeitos da neuroinflamação nos processos traumáticos do sistema nervoso central (SNC) são controversos. Estudos relatam que as células microgliais, linfócitos, anticorpos e citocinas produzidos pela neuroinflamação exercem tanto efeitos benéficos como deletérios nos mecanismos de regeneração do tecido nervoso (Donnelly e Popovich, 2008). A metilprednisolona, um potente imunossupressor glicocorticóide, é capaz de suprimir vários índices de neuroinflamação em modelos experimentais de lesão da medula espinal (Bartholdi e Schwab, 1995; Xu *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001; Fu e Saporta, 2005). Esta estratégia terapêutica, a única disponível, é utilizada na tentativa de diminuir os danos secundários da lesão medular de humanos, mas apresenta resultados muito limitados (Baptiste e Fehlings, 2007). Sendo assim, a eficácia e segurança do tratamento destes pacientes com metilprednisolona vêm sendo freqüentemente questionadas (Coleman *et al.*, 2000; Hurlbert, 2000), visto que a resposta imune do SNC parece ter efeitos duais (Donnelly e Popovich, 2008) na fisiopatologia da lesão.

### 1.1.3. Reorganização neuronal após a lesão da medula espinal

Os axônios de neurônios lesados no SNC adulto apresentam dificuldade à regeneração plena, quando comparados com axônios periféricos lesionados (Condic, 2002; Plunet *et al.*, 2002; Snider *et al.*, 2002). Este fato pode ser atribuído às diferenças intrínsecas e extrínsecas dos neurônios do SNC e periférico. Entretanto, Aguayo e colaboradores (1981) demonstraram que o SNC possui capacidade regenerativa considerável desde que condições favoráveis fossem fornecidas para o crescimento axonal (Aguayo *et al.*, 1981). Após um episódio de lesão, os neurônios não lesados são capazes de criar novos prolongamentos, o que mostra claramente uma capacidade plástica do SNC mesmo durante a vida adulta (Raineteau e Schwab, 2001; Raineteau *et al.*, 2002). Além disso, as mudanças que ocorrem diretamente no local da lesão, são capazes de reorganizar o SNC. Essa reorganização pode ocorrer em dois níveis distintos: nos circuitos pré-existentes, através da modificação de conexões sinápticas, evento conhecido como plasticidade sináptica, ou devido à formação de novos circuitos através do brotamento axonal e dendrítico em torno da cicatriz astrogliosa e distante (rostral ou caudal) do local da lesão, este último conhecido como plasticidade anatômica. Sendo assim, uma estratégia aparentemente promissora para o tratamento da lesão medular traumática é a intensificação dos mecanismos endógenos de regeneração, plasticidade e neuroproteção (Condic, 2002; Plunet *et al.*, 2002; Snider *et al.*, 2002).

A medula espinal tem uma capacidade intrínseca e limitada de reparo espontâneo, e este processo inicia poucos dias após o trauma medular (Snider *et al.*, 2002). Células microgliais e astrocitárias são ativadas após o trauma da medula, o que

resulta em um fenômeno chamado de cicatriz astrogliar. Este fenômeno ocorre com o intuito de isolar a área lesada, impedir a expansão da lesão e dar suporte às regiões que permanecem preservadas; entretanto, a cicatriz astrogliar parece dificultar o crescimento axonal e o processo de regeneração (Fawcett e Asher, 1999). Diversos fatores como a expressão diferencial de genes envolvidos com o crescimento, os genes relacionados à estrutura do axônio, as moléculas de adesão celular e/ou matriz extracelular, o suprimento de fatores neurotróficos, a presença das citocinas inflamatórias e de fatores inibitórios relacionados à substância branca, determinam como o crescimento axonal será sustentado após a lesão medular (Schwartz e Kipnis, 2007; Fitch e Silver, 2008).

Os aspectos relacionados à reorganização neuronal após a lesão do SNC também compreende a formação de novos neurônios, fenômeno conhecido como neurogênese (Gage, 2000). As células-tronco neurais se diferenciam em precursores neurais mantendo-se em estado imaturo, o que permite que as mesmas migrem para estruturas específicas do SNC (Gage, 2000; Merkle *et al.*, 2007; Boutin *et al.*, 2011). Os principais sítios neurogênicos no cérebro adulto são a zona subventricular, o canal ependimário da medula espinal (a continuação do sistema ventricular cerebral ao longo da medula espinal), e o giro denteado da formação hipocampal, cujas células-tronco neurais produzem progenitores que migram em direção a diferentes regiões, como bulbo olfatório, camada de células granulares do giro denteado (Luskin *et al.*, 1993; Lois e Alvarez-Buylla, 1994; Gage, 2000; Cayre *et al.*, 2009) ou mesmo áreas lesionadas da medula espinal de animais submetidos a traumas medulares (Meletis *et al.*, 2008; Foret *et al.*, 2011). Entretanto, pouco é conhecido sobre a natureza ou a extensão da divisão

celular após a lesão da medula espinal e sobre o efeito da neurogênese nos mecanismos de reparo do SNC. Além disso, a formação e a diferenciação de progenitores neuronais e gliais no SNC adulto é um tópico relativamente recente de pesquisa.

#### **1.1.4. A utilização de células-tronco para o tratamento das lesões da medula espinal**

As células-tronco são células com capacidade de auto-replicação, podendo gerar uma cópia idêntica a si mesma ou células com potencial de se diferenciar em vários tecidos. A utilização das células-tronco no tratamento das lesões degenerativas do SNC é considerada uma estratégia promissora devido à sua capacidade de multiplicação, diferenciação e migração para diferentes tecidos. Achados experimentais descrevem que as células-tronco neurais são capazes de secretar fatores tróficos que aumentam a sobrevivência e a diferenciação de células neuronais e/ou astrogliais (Cummings *et al.*, 2005). Entretanto, um dos principais desafios desta terapia é identificar quais fatores determinam o tipo celular que será originado pelas células-tronco.

Os estudos que utilizam modelos experimentais de lesão da medula espinal demonstram que a introdução de células-tronco neurais na medula espinal lesada resulta quase exclusivamente na diferenciação de células gliais, visto que a medula espinal do hospedeiro não é permissível à diferenciação neuronal (Martino e Pluchino, 2006). De muito interesse são os resultados apresentados por Abematsu e

colaboradores (2010), os quais demonstraram que a administração de ácido valpróico, fármaco utilizado no tratamento da epilepsia, capaz de inibir a acetilação de histonas, associada ao transplante de células-tronco neurais, induz a diferenciação neuronal e suprime a diferenciação astrocítica e oligodendrocítica. Este mesmo estudo demonstrou que os animais que receberam ácido valpróico por via intraperitoneal, na ocasião do transplante das células-tronco neurais para a medula espinal lesionada, apresentaram uma melhora significativa das funções motoras, quando comparado aos animais transplantados tratados somente com salina. O tratamento *in vitro* de células-tronco neurais com análogos do ácido valpróico, incapazes de inibir a acetilação de histonas, não induziram a diferenciação neuronal destas células progenitoras. A incubação desta mesma linhagem de células-tronco com outra substância inibidora da acetilação de histonas, a tricoestatina A, induziu a diferenciação neuronal, sugerindo que a inibição da acetilação das histonas é um importante fator para diferenciação das células-tronco neurais em células neuronais (Abematsu *et al.*).

Além disso, as células endimárias/subendimárias do canal medular são fontes endógenas de células-tronco na medula espinal de mamíferos adultos (Meletis *et al.*, 2008). No entanto, o entendimento acerca da sua plasticidade após a indução de traumas medulares permanece pouco compreendido, apesar da relevância deste tema para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

## 1.2. Peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP)

Diversos estudos demonstram um papel importante das incretinas intestinais, peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP, *glucose-dependent insulintropic peptide*) e peptídeo semelhante ao glucagon (GLP, *glucagon-like peptide*), em fenômenos relacionados com regeneração neuronal, neuroproteção, neurogênese e plasticidade sináptica (Rayan *et al.*, 1995; Waschek, 1995; Klimaschewski, 1997; Lioudyno *et al.*, 1998; Abankwa *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Nyberg *et al.*, 2005; Pavelock *et al.*, 2007).

O GIP é um peptídeo composto por 42 aminoácidos, sintetizado pelas células endócrinas do tipo K no duodeno (Brown, 1971; Brown *et al.*, 1974) em resposta à ingestão alimentar, atuando de forma sinérgica com outros peptídeos para a manutenção da liberação da insulina pelo pâncreas (Beck, 1989). Além de sua localização gastrointestinal, inúmeras evidências apontam para a presença de GIP e do seu receptor (GIPR) em diferentes estruturas do sistema nervoso central (SNC) de ratos adultos (Usdin *et al.*, 1993; Nyberg *et al.*, 2005; Nyberg *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2010a; Figueiredo *et al.*, 2010b). Estudos anteriores demonstraram que o GIPR está intensamente presente no bulbo olfatório, hipocampo e nas células de Purkinje do cerebelo de ratos adultos, e que a distribuição deste receptor é predominantemente neuronal (Nyberg *et al.*, 2005; Nyberg *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2010b). Apesar do efeito central do GIP e seu receptor não ser completamente compreendido, alguns estudos sugerem a participação desta via de sinalização nos fenômenos associados com a plasticidade sináptica e a neurogênese (Nyberg *et al.*, 2005; Figueiredo *et al.*, 2010a; Figueiredo *et al.*, 2010b)

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou pela primeira vez a expressão do GIPR no hipocampo e neocórtex humano de um paciente portador de epilepsia de lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo (ELTM-EH), sugerindo uma possível associação do mesmo no processo de epileptogênese (Figueiredo *et al.*, 2010a). Gault e Holscher (2008b) descreveram a participação direta do GIP na liberação de neurotransmissores e na indução da potenciação de longa duração (LTP, *Long-term potentiation*), fenômeno essencial para consolidação da memória, em roedores. Além disso, foi demonstrado que o GIP possui um efeito protetor na sinaptotoxicidade induzida pelo peptídeo beta-amilóide (A $\beta$ ), e que as incretinas GLP e GIP apresentam propriedades neuroprotetoras, sugerindo uma possível utilização desses peptídeos ou de seus análogos sintéticos na redução dos processos degenerativos (Gault e Holscher, 2008a; Gault e Holscher, 2008b; Figueiredo *et al.*, 2010b). Nosso grupo de pesquisa também já relatou que ratos idosos, expostos ao programa de exercícios físicos, apresentam uma melhora dos prejuízos cognitivos, um aumento na expressão do GIPR nos neurônios do giro denteado da formação hipocampal e uma maior quantidade de células em proliferação nesta mesma região (Figueiredo *et al.*, 2010b).

Um estudo publicado em 2002 relatou pela primeira e única vez que o gene *Gip* sofre modificações na sua expressão durante os processos de reparo do SNC (Abankwa *et al.*, 2002). Abankwa e colaboradores (2002) observaram que os animais submetidos à transecção da comissura do fórnix apresentam um importante aumento na expressão do gene que codifica o GIP, nesta estrutura do SNC, durante a fase de regeneração do tecido lesionado (Abankwa *et al.*, 2002). O mesmo grupo demonstrou,

utilizando um modelo de lesão de nervo periférico de roedores, um aumento significativo nos níveis do RNA mensageiro que codifica a sequência de aminoácidos do GIP e GIPR no gânglio da raiz dorsal, na medula espinal e principalmente no nervo ciático em processo de reparo (Buhren *et al.*, 2009). Animais com deleção do gene do GIPR (*Gipr*<sup>-/-</sup>), submetidos à lesão do nervo ciático, apresentam prejuízos da regeneração axonal espontânea, o que sugere um possível envolvimento da via de sinalização GIP/GIPR nos processos de reparo neuronal (Abankwa *et al.*, 2002; Buhren *et al.*, 2009).

### 1.3. JUSTIFICATIVA

Embora a lesão secundária possa ser prevenida, nenhuma opção terapêutica mostrou-se efetiva na diminuição dos danos tardios em pacientes com lesão aguda da medula espinal (Peng *et al.*, 2009). O desenvolvimento de uma terapia efetiva para tratar os indivíduos nesta condição é um dos maiores desafios de médicos e pesquisadores.

Nos últimos 25 anos, fortes evidências sugerem que a insulina, além de apresentar importante efeito no metabolismo energético periférico, também desempenha um papel fundamental no SNC (Havrankova *et al.*, 1978; Unger *et al.*, 1991; Reagan *et al.*, 2001), como efeitos anti-oxidantes e neuroprotetores endógenos (De Felice *et al.*, 2009). Entretanto, o metabolismo normal da glicose é mantido não só pelos hormônios pancreáticos, insulina e glucagon, mas também pelos hormônios gastrointestinais denominados “incretinas”, tais como o GIP e GLP (Baggio e Drucker, 2007; Salehi *et al.*, 2008).

O GIP e GIPR são amplamente expressos em diferentes estruturas do SNC de mamíferos adultos (Usdin *et al.*, 1993; Nyberg *et al.*, 2005; Nyberg *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2010a; Figueiredo *et al.*, 2010b). Estudos descreveram um papel importante das incretinas intestinais, como GIP, GLP-1 e peptídeo intestinal vasoativo (VIP), em fenômenos relacionados com o desenvolvimento e/ou regeneração de estruturas do SNC e periférico, e com mecanismos de sobrevivência neuronal (Rayan *et al.*, 1995; Waschek, 1995; Klimaschewski, 1997; Lioudyno *et al.*, 1998; Abankwa *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Pavelock *et al.*, 2007; Buhren *et al.*, 2009). A escassez de

dados na literatura, somado aos resultados prévios de nosso grupo indicam a necessidade de melhores estudos *in vivo* e *in vitro* que avaliem a modulação da expressão do GIPR ou o possível efeito do GIP nos mecanismos de neuroplasticidade e neuroproteção.

Além disso, a identificação de novos fatores neuroprotetores é fundamental para o entendimento e tratamento das lesões medulares traumáticas, visto que as mesmas apresentam um alto impacto na qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Neste sentido, a avaliação de possíveis modificações na expressão do GIP e GIPR na medula espinal de animais submetidos à lesão medular traumática, durante o período pós-traumático agudo (2h, 6h e 24 h) e tardio (14 e 28 dias) após a indução da lesão, poderá de alguma forma, contribuir para o entendimento acerca dos mecanismos de reparo do SNC.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a ocorrência de possíveis modificações no padrão de expressão do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e do seu receptor (GIPR) na medula espinal de animais submetidos à lesão medular traumática.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar possíveis modificações na expressão do GIP e GIPR na medula espinal de animais submetidos à lesão medular traumática, durante o período pós-traumático agudo (2 h, 6 h e 24 h) e tardio (14 e 28 dias) após a lesão.

- Identificar a presença de progenitores neurais (positivos para a proteína nestina) na medula espinal de animais submetidos à lesão medular traumática, durante o período pós-traumático agudo e tardio.

- Identificar o fenótipo das células da medula espinal dos animais submetidos ao modelo experimental de lesão traumática, por meio da co-localização do GIP ou GIPR com a proteína nestina, na qual é utilizada para identificar progenitores neurais.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Lesão Medular Traumática

Os experimentos foram conduzidos utilizando ratos Wistar, adultos, machos, com cerca de 60 dias, pesando entre 270g e 300g, que foram anestesiados com quetamina e xilazina (70 e 10 mg/kg, respectivamente, intraperitoneal). O modelo de lesão medular traumática utilizado foi o previamente descrito (Vanicky *et al.*, 2001) com algumas modificações. O dorso do animal foi depilado e uma incisão na pele de aproximadamente 3,0 cm foi feita na linha média dorsal, e o tecido gorduroso da região foi removido. Após este procedimento, os músculos que se inserem ao nível das vértebras torácicas 10-12 foram dissecados, seguido pela remoção do osso e fixação da coluna espinal por um fórceps. Para acessar a medula espinal, um pequeno orifício (1,5 mm de diâmetro) foi realizado ao nível da 11<sup>a</sup> vértebra torácica com o auxílio de lupa e broca cirúrgicas. A abertura permitiu a inserção de um cateter Fogarty 2F (Lemaitre Catheters, Burlington, MA, EUA) diretamente no canal medular, sem o rompimento da dura mater. O cateter, previamente conectado a uma seringa preenchida com 1,0 ml de água, foi inserido no espaço epidural e avançado na direção rostral aproximadamente 1,0 cm, de maneira que a extremidade do cateter repousou sob a 10<sup>a</sup> vértebra torácica. O cateter foi inflado em um diâmetro fixo de 3,0 mm, para indução de uma lesão medular traumática moderada, por período suficiente para o desaparecimento dos reflexos espinhais. Após este período, o cateter foi removido, seguido de realização da sutura por planos (muscular e pele). Os animais falso-operados foram submetidos ao mesmo protocolo descrito acima, porém o cateter não foi inserido no canal medular. Finalizado o procedimento cirúrgico, todos os animais

receberam injeção intramuscular de antibiótico de amplo espectro (cloridrato de oxitetraciclina 20%). A indução da paraplegia poderia acarretar alterações na contração/relaxamento da bexiga/uretra (dissinergia do esfíncter uretral), portanto a bexiga dos animais foi esvaziada nos primeiros dias, quando necessário, através da compressão manual da região abdominal do animal. Os animais foram divididos em grupos experimentais compostos por animais controle (nenhuma intervenção cirúrgica), falso-operados (intervenção cirúrgica; sem inserção do cateter) e lesionados (intervenção cirúrgica; com inserção de cateter). Os cuidados pré- e pós-operatórios seguiram o protocolo descrito por Santos-Benito e colaboradores (Santos-Benito *et al.*, 2006), bem como as normas do MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) e do comitê de ética local (CEUA-UFSC, protocolo de Aprovação n. PP00032). Os animais foram sacrificados 2 h, 6 h, 24 h, 14 dias ou 28 dias após a indução da lesão medular, sendo as amostras teciduais da medula espinal submetidas à análise histológica e imuno-histoquímica.

## **3.2. Reação Imuno-histoquímica**

### **3.2.1. Reação de imunoperoxidase**

As amostras de tecido foram coletadas após realização de procedimento anestésico e perfusão dos animais com solução fisiológica e paraformaldeído 4%, sendo mantidas nessa mesma solução durante 24 h. As amostras foram submetidas ao processamento histológico, inclusão em parafina e microtomia. Com objetivo de amostrar a área da lesão e regiões adjacentes, todas as medulas foram incluídas no

eixo longitudinal (Peng *et al.*, 2009). Para a análise histológica foram utilizados cortes teciduais (3-4  $\mu\text{m}$ ), obtidos das amostras fixadas, e inclusas em parafina, sendo coradas pela técnica da hematoxilina e eosina (HE). Para análise imunohistoquímica, os cortes histológicos foram desparafinados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena e reativação antigênica induzida por calor. A imunodeteção das proteínas de interesse foi realizada utilizando os anticorpos de coelho anti-GIPR (1:300, gentilmente cedido por T.J.Kieffer, University of British Columbia, CA) e anti-GIP (1:250; LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA), e de camundongo anti-Nestina (1:100, Millipore/Chemicon, Billerica, MA, USA), para identificação do GIPR, GIP e dos progenitores neurais, respectivamente. Os anticorpos foram diluídos em líquido diluidor de anticorpos com componente redutor de reação inespecífica (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), e a solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais, sendo as lâminas mantidas em câmara úmida durante 12-16 h, a uma temperatura de 2-8°C. A seguir, as lâminas foram lavadas em tampão salina fosfato (PBS) e os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo, dependendo da natureza do anticorpo primário (Dako Cytomation), em câmara úmida durante 50 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS e a detecção foi realizada utilizando o sistema da streptavidina-biotina-peroxidase (Dako Cytomation). Após 30 minutos de incubação das lâminas em câmara úmida com a solução de streptavidina-biotina-peroxidase à temperatura ambiente, as mesmas foram lavadas com PBS e a detecção foi completada utilizando-se uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-

tetraaminobifeniltetrahydrocloro) (DAB, Sigma-Aldrich do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil) e 0,3% de peróxido de hidrogênio (Merck do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil). Posteriormente, foi realizada contra-coloração das secções histológicas em solução de hematoxilina de Harris (Merk), desidratação das mesmas através de imersões em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol (Sigma-Aldrich do Brasil Ltda) e montagem em meio de montagem permanente (Entellan, Merck). Para cada reação foi utilizado um controle negativo, no qual o corte histológico foi incubado somente com a solução diluente (abolição do anticorpo primário).

### **3.2.2. Reação de imunofluorescência**

Para identificar a possível expressão de GIP e seu receptor nas células progenitoras da medula espinal dos animais submetidos à lesão traumática da medula espinal (LTME), foi utilizada a técnica de imunofluorescência com dupla marcação. Em secções histológicas distintas foram realizadas imunodeteccões simultâneas para o GIPR e para a proteína nestina ou para o GIP e a proteína nestina. As secções histológicas foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima, com exceção do bloqueio da peroxidase endógena. Os anticorpos de coelho anti-GIP ou anti-GIPR e de camundongo anti-nestina foram utilizados nas mesmas diluições e condições em relação à reação de imunoperoxidase. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS e os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo secundário de galinha anti-IgG de coelho conjugado com alexafluor 488 (1:300, Invitrogen, Carlsbad, California, CA) e anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com

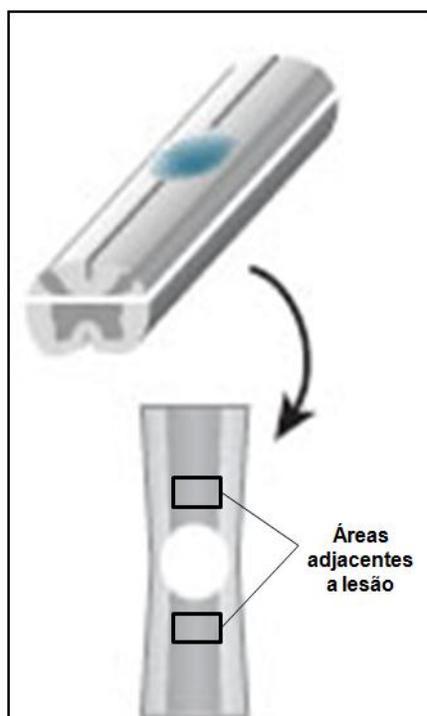
alexafluor 568 (1:300, Invitrogen, Carlsbad, California, CA) em câmara úmida durante 150 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS e as lamínulas fixadas com meio de montagem aquoso (Vectashield; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Para cada reação foi utilizado um controle negativo, no qual o corte histológico foi incubado com soro não imune diluído na solução diluente.

### **3.3. Análise Imuno-histoquímica**

Para análise da reação de imuno-histoquímica do GIP e GIPR foram obtidas 2-4 imagens a partir dos cortes histológicos longitudinais da medula espinal dos animais lesionados (n=30), falso-operados (n=30) e animais naïve (n=5), utilizando uma câmera digital (Sight DS-5ML1), acoplada a um microscópio óptico Eclipse 50i (Nikon, Melville, NY, USA). Foram capturadas duas imagens nas áreas adjacentes a lesão traumática, caracterizadas por uma arquitetura histológica normal (borda da lesão), conforme demonstrado na Figura 1. Também foram analisadas imagens correspondentes ao canal ependimário e/ou ao sítio da lesão. A avaliação semi-quantitativa das diferentes proteínas pesquisadas foi realizada no programa de análise de imagem NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, USA), por meio da ferramenta *Threshold Color*. A densidade óptica que melhor discriminou a imunomarcação (coloração castanha) foi obtida e os dados foram expressos como unidade arbitrária de densidade óptica. As reações de imunofluorescência foram avaliadas em microscópio de varredura confocal (DMI6000 B Microscope, Leica Microsystems, Wetzlar, Lahn-Dill, Alemanha) no Laboratório Central de Microscopia da UFSC.

### 3.4. Análise estatística:

Foi utilizado teste “t” de *Student* ou ANOVA de uma via, seguido de teste *post hoc* de Newman-Keuls.

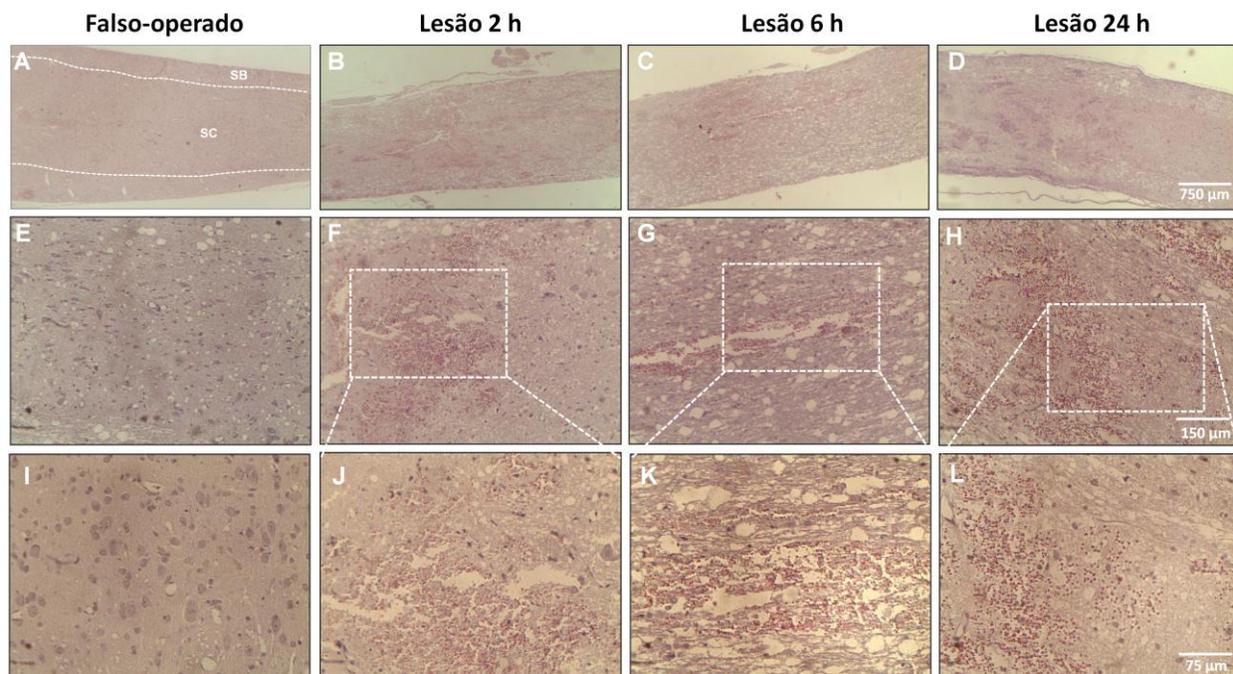


**Figura 1. Ilustração dos eixos de inclusão das medulas espinhais e das áreas de avaliação microscópicas.**

## **4. RESULTADOS**

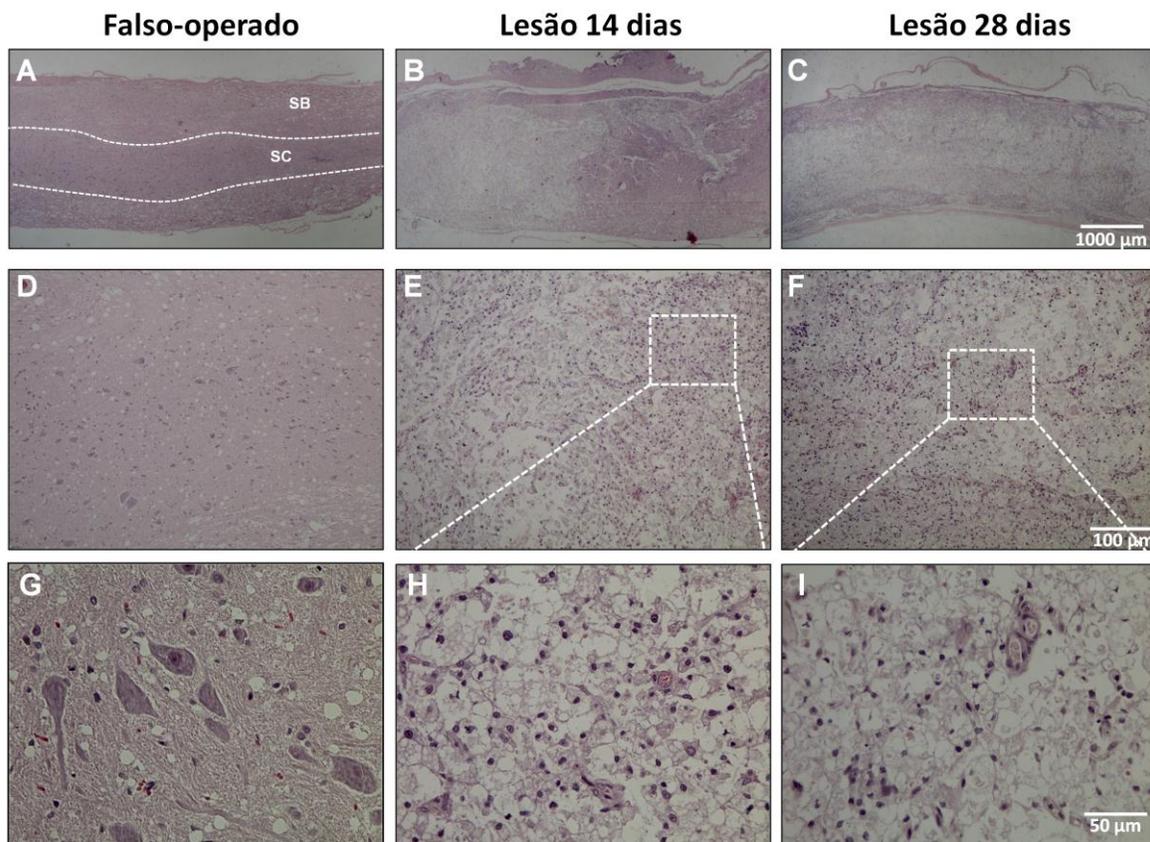
### **4.1. Análise histológica da medula espinal dos animais submetidos ao modelo de lesão medular traumática induzida por compressão**

As amostras de medula espinal dos animais de todos os grupos experimentais, sacrificados em diferentes períodos experimentais, foram incluídas no eixo longitudinal, coradas e analisadas para descrição dos achados histológicos. Os grupos de animais falso-operados não apresentaram alterações na arquitetura geral da medula espinal (Figura 2A e 3A), além de manter preservada a morfologia da substância cinzenta (Figura 2E e I, Figura 3D e G), independente do período experimental. Em contrapartida, as medulas espinais dos animais sacrificados 2 h após indução da lesão traumática da medula espinal (LTME) apresentaram arquitetura desorganizada (Figura 2B). A Figura 2F mostra que a substância cinzenta da área da lesão foi parcialmente substituída por regiões cavitadas, debris celulares, além de áreas hemorrágicas caracterizadas pela presença de hemácias extravasadas. A Figura 2J, que corresponde a uma ampliação da área delimitada no painel 2F, é representativa das alterações morfológicas ocorridas na substância cinzenta dos animais lesionados sacrificados após 2 h. É importante ressaltar que a área composta por debris celulares corresponde à necrose de liquefação, histologicamente caracterizada por um fundo amorfo sem evidência de estruturas celulares, com áreas cavitadas imersas em fundo hemorrágico (Figura 2J), que corresponde a um estágio agudo da lesão traumática. Os animais lesionados e sacrificados após 6 h ou 24 h, apresentaram alterações histológicas semelhantes às aquelas observadas nas medulas espinais dos animais sacrificados após 2 h da indução da lesão, conforme ilustrado na Figura 2C, G e K e 2D, H e L.



**Figura 2. Análise histológica da medula espinal dos animais submetidos ao modelo experimental de trauma medular por compressão, sacrificados 2 h, 6 h ou 24 h após indução da lesão.** As medulas espinais dos animais dos diferentes grupos experimentais foram fixadas, incluídas em parafina no eixo longitudinal, e as seções histológicas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). (A) Imagem representativa da medula espinal dos animais falso-operados sacrificados nos diferentes períodos experimentais; a substância cinzenta (SC) está delimitada pela linha tracejada, e envolta pela substância branca (SB). Os painéis E e I correspondem a imagens amplificadas da SC sem alterações histológicas aparentes. (B, C e D) Imagens representativas da medula espinal dos animais sacrificados 2 h, 6 h ou 24 h após a lesão medular, respectivamente. (F, G e H) ilustram a presença de debris celulares, hemácias extravasadas e áreas de cavitação na SC dos mesmos. Os painéis J, K e L correspondem a imagens amplificadas das áreas delimitadas nos painéis F, G e H, sendo possível visualizar necrose de liquefação caracterizada por um fundo amorfo sem evidência de estruturas celulares, associado à hemorragia intensa.

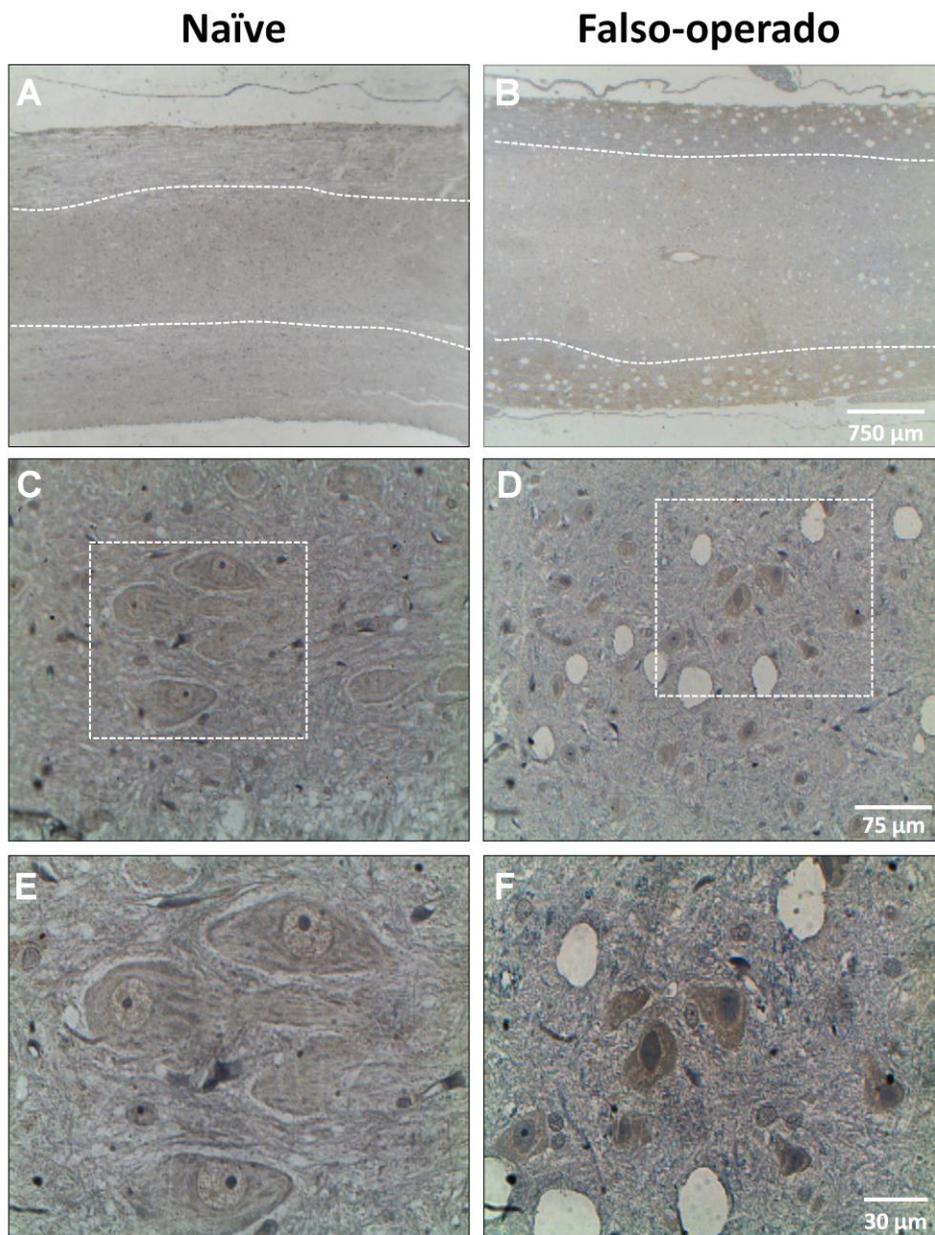
Conforme ilustrado na Figura 3B, as medulas espinais dos animais sacrificados 14 dias após serem submetidos à lesão traumática da medula espinal (LTME) apresentaram importantes alterações na arquitetura geral das mesmas. Na região da substância cinzenta foram observadas amplas áreas cavitadas possivelmente relacionadas com processo necrótico em fase resolutive (Figura 3E). A Figura 3H, que corresponde a uma ampliação da área delimitada no painel E, é representativa das alterações morfológicas celulares da substância cinzenta dos animais lesionados sacrificados após 14 dias. É possível notar a presença de células balonizadas, que são compatíveis histologicamente com células neuronais degeneradas (Figura 3H). De maneira interessante, as medulas espinais dos animais sacrificados 28 dias após a indução da LTME mostraram alterações histopatológicas semelhantes às observadas nos animais sacrificados 14 dias após a indução da lesão, conforme ilustrado na Figura 3C, F e I.



**Figura 3. Análise histológica da medula espinal dos animais submetidos ao modelo experimental de trauma medular por compressão, sacrificados 14 e 28 dias após indução da lesão.** As medulas espinais dos animais dos diferentes grupos experimentais foram fixadas, incluídas em parafina no eixo longitudinal, e as secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). (A) Imagem representativa da medula espinal dos animais falso-operados; a substância cinzenta (SC) está delimitada pela linha tracejada, e envolta pela substância branca (SB). Os painéis D e G correspondem a imagens amplificadas da SC sem alterações histológicas aparentes. (B e C) Imagens representativas da medula espinal dos animais sacrificados 14 e 28 dias após a indução da lesão medular, respectivamente. (E e F) ilustram a presença de áreas claras na região lesionada, e os painéis (H e I) correspondem a imagens amplificadas das áreas delimitadas nos painéis E e F, sendo possível visualizar células balonizadas, que são histologicamente compatíveis com células neuronais degeneradas.

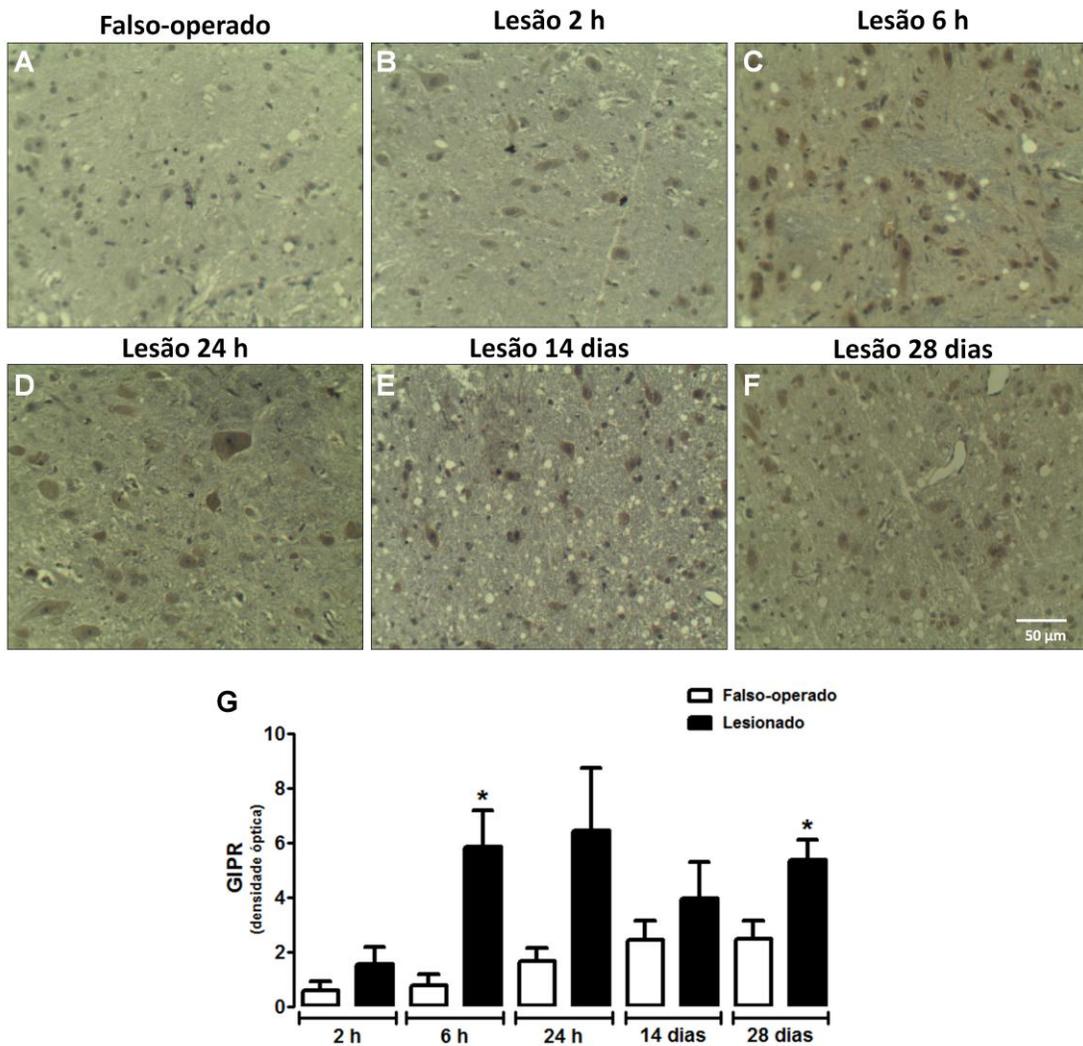
#### **4.2. Avaliação imuno-histoquímica do receptor do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIPR) na medula espinal dos animais submetidos ao modelo de lesão medular traumática induzida por compressão**

As secções histológicas das medulas espinais submetidas à análise imuno-histoquímica para detecção do GIPR demonstraram um padrão de marcação predominantemente citoplasmático. Somente as células morfológicamente compatíveis com neurônios apresentaram marcação positiva para o GIPR (Figuras 4, 5 e 6). As amostras de medula espinal dos animais naïve (Figura 4A, C e E) e falso-operados (Figura 4B, D e F) mostraram uma imunoreatividade moderada para o anticorpo anti-GIPR. A medula espinal dos animais naïve e falso-operados não apresentaram diferença no padrão, tampouco da intensidade da imunoreatividade para o GIPR.



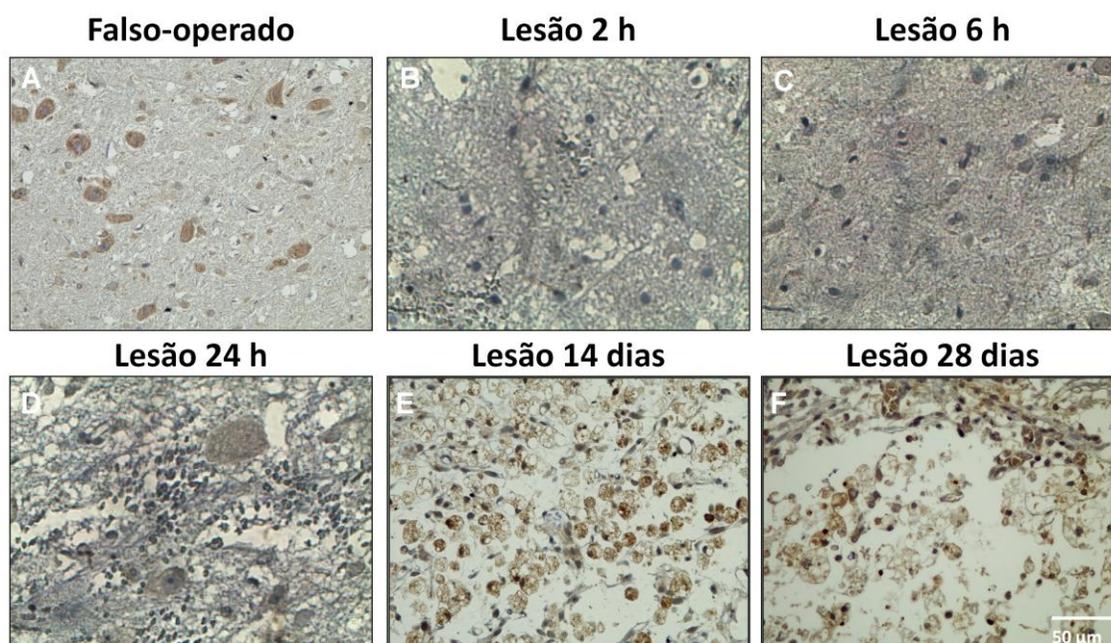
**Figura 4. Análise do padrão de expressão do receptor do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIPR) na medula espinal de animais não-lesionados.** (A) Imagem representativa da imunoreatividade para o anticorpo anti-GIPR na medula espinal de animais naïve e (B) falso-operados. A substância cinzenta (SC) está delimitada pela linha tracejada. Os painéis C e D correspondem a imagens amplificadas da SC das medulas espinais, demonstrando uma marcação moderada nas células morfológicamente compatíveis com neurônios. E e F correspondem a imagens amplificadas das áreas delimitadas nos painéis C e D, sendo possível observar o padrão de marcação citoplasmático do anticorpo anti-GIPR.

A Figura 5 ilustra a imunoreatividade para o GIPR na área adjacente ao trauma (borda da lesão) da medula espinal dos animais submetidos à LTME, sacrificados em diferentes períodos experimentais, conforme descrito nos materiais e métodos. Os animais sacrificados 2 h, 24 h ou 14 dias após submissão do trauma medular não apresentaram diferença significativa na expressão do GIPR na área adjacente a lesão quando comparado com a substância cinzenta dos animais falso-operados (Figura 5A, B, D, E e G) ( $P=0,2031$ ,  $P=0,1121$  e  $P=0,4591$  respectivamente). De maneira interessante, os animais sacrificados 6 h ou 28 dias após a indução do trauma medular apresentaram uma maior imunoreatividade para o GIPR na área adjacente a lesão, quando comparado com os animais falso-operados sacrificados neste mesmo período experimental ( $P=0,0220$  e  $0,0416$ , respectivamente) (Figura 5A, C, F e G).



**Figura 5. Análise da expressão do receptor do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIPR) na região adjacente ao sítio da lesão da medula espinal dos animais submetidos ao modelo experimental de trauma medular induzido por compressão.** (A) Imagem representativa da imunoreatividade para o GIPR na medula espinal dos animais falso-operados e lesionados, sacrificados 2 h (B) (n=5), 6 h (C) (n=5), 24 h (D) (n=5), 14 (E) (n=5) e 28 dias (F) (n=5) após indução da lesão traumática. (G) Avaliação semi-quantitativa da expressão do GIPR na região adjacente a lesão traumática (borda da lesão). Os resultados estão expressos em média e erro padrão da média em unidade arbitrária de densidade óptica. \* $P \leq 0,05$  comparando os animais lesionados com seus respectivos grupos controle (animais falso-operados), correspondentes a cada período experimental, utilizado teste *t*.

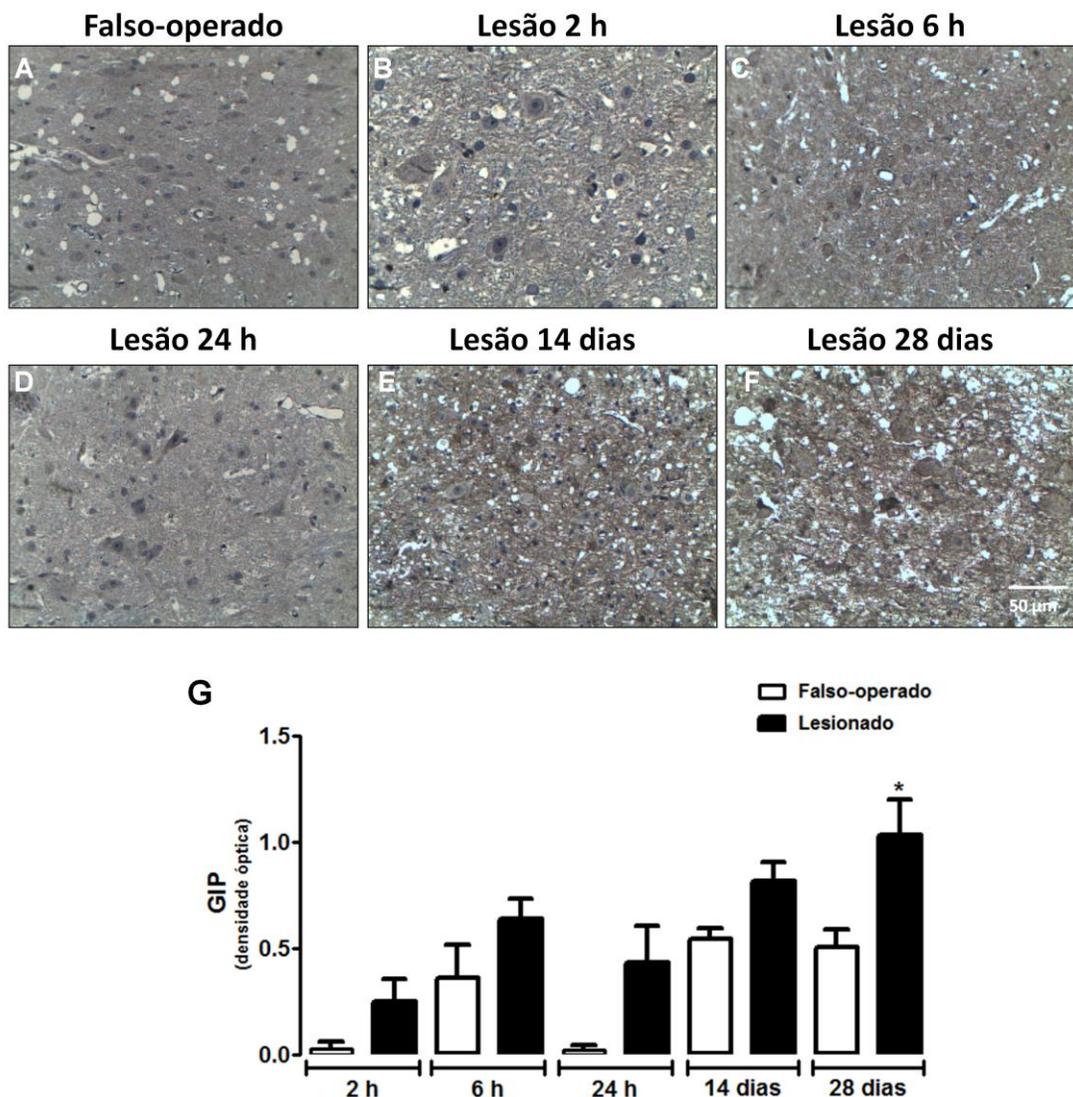
A Figura 6 mostra a análise qualitativa da imunomarcção do GIPR na área lesionada da medula espinal dos animais sacrificados em diferentes períodos experimentais após a indução da mesma. Os animais sacrificados 2 h, 6 h e 24 h (fase aguda) após a indução da LTME apresentaram marcação para o GIPR apenas nas células morfolologicamente compatíveis com neurônios viáveis, sendo que os debris celulares e as áreas hemorrágicas apresentaram-se negativos (Figura 6B, C e D). Em contrapartida, a área da medula espinal que foi lesionada e avaliada 14 ou 28 dias após a indução da LTME (fase crônica) apresentou um padrão de marcação peculiar. Ou seja, a maior intensidade de marcação foi observada nas células morfolologicamente compatíveis com neurônios balonizados, sendo que o padrão de imunomarcção foi predominantemente granular (Figura 6E e F). Não foi realizada análise quantitativa para o GIPR na área da lesão devido à grande heterogeneidade da população celular e da distribuição neuronal.



**Figura 6. Análise do padrão de expressão do receptor do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIPR) no epicentro da lesão da medula espinal de animais submetidos ao modelo de lesão medular traumática induzida por compressão. (A)** Imagem representativa do padrão de expressão do GIPR na substância cinzenta dos animais falso-operados. A medula espinal dos animais lesionados, sacrificados 2 h (B), 6 h (C) e 24 h (D) após o trauma medular, demonstrou imunoreatividade para o GIPR somente nas células morfológicamente compatíveis com neurônios viáveis. (E e F) A área lesionada da medula espinal dos animais sacrificados no período crônico (14 e 28 dias após indução da lesão) apresentaram um padrão de marcação granular citoplasmático em células balonizadas, histologicamente compatíveis com neurônios degenerados.

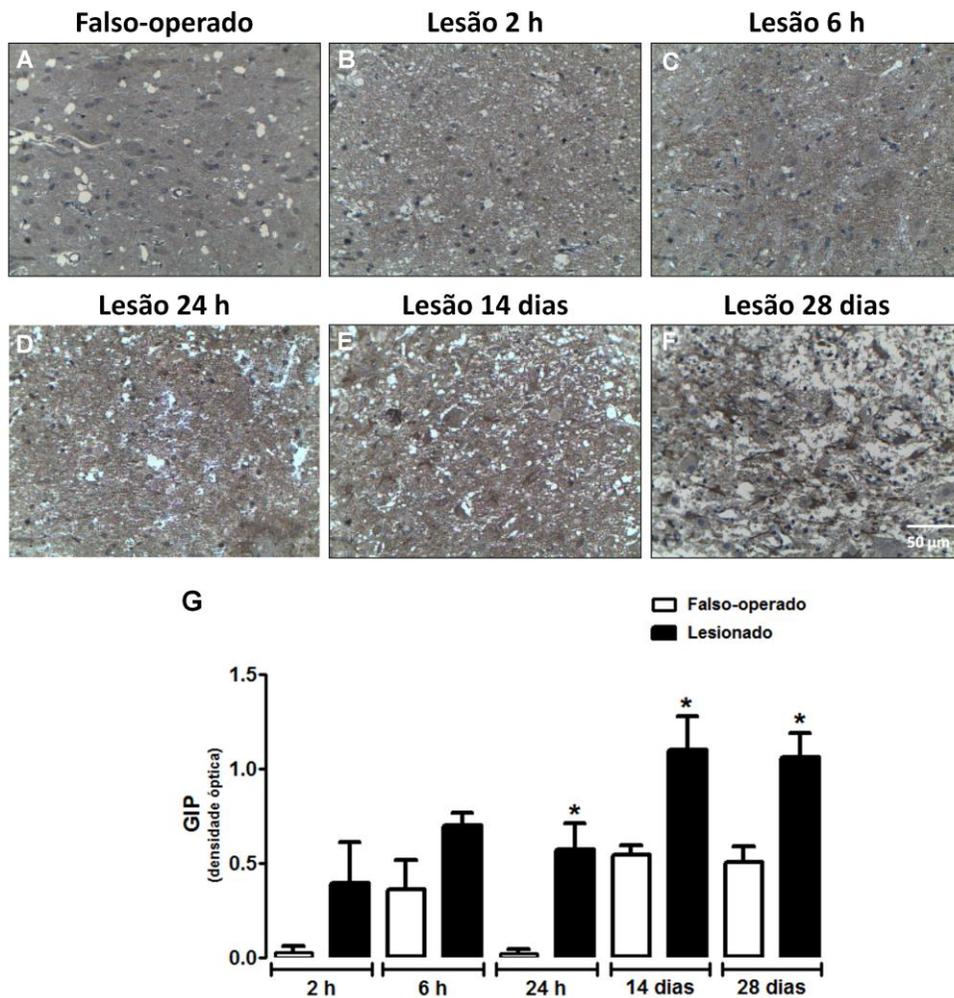
#### **4.3. Avaliação imuno-histoquímica do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP) na medula espinal dos animais submetidos ao modelo de lesão medular traumática induzida por compressão**

As secções histológicas das medulas espinais submetidas à análise imuno-histoquímica para o GIP demonstraram positividade no citoplasma e prolongamentos das células morfológicamente compatíveis com neurônios. A Figura 7 ilustra a imunoreatividade para o GIP na área adjacente ao trauma (borda da lesão) da medula espinal dos animais submetidos à LTME. Os animais sacrificados 28 dias após LTME (Figura 7F) apresentaram diferença no padrão de expressão do GIP (Figura 7G) na região adjacente a lesão, quando comparados à substância cinzenta da medula espinal dos animais falso-operados ( $P=0,0494$ ). Entretanto, os animais sacrificados 2 h, 6 h, 24 h ou 14 dias após submissão do trauma medular apresentaram uma discreta tendência, porém não significativa, ( $P=0,1036$ ;  $P=0,1274$ ;  $P=0,0964$ ;  $P=0,0711$ ) ao aumento de intensidade da expressão do GIP na área adjacente a lesão quando comparado à substância cinzenta dos animais falso-operados sacrificados neste mesmo período (Figura 7G).



**Figura 7. Análise da expressão do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) na região adjacente ao sítio da lesão da medula espinal dos animais submetidos ao modelo experimental de trauma medular induzido por compressão.** Imagem representativa da imunoreatividade para o GIP da medula espinal dos animais falso-operados (A) e lesionados, sacrificados 2 h (B) (n=5), 6 h (C) (n=5), 24 h (D) (n=5), 14 (E) (n=5) e 28 dias (F) (n=5) após indução da lesão traumática. (G) Avaliação semi-quantitativa da expressão do GIP na região adjacente a lesão traumática (borda da lesão). Os resultados estão expressos em média e erro padrão da média em unidade arbitrária de densidade óptica. \*P≤ 0,05 comparando os animais lesionados com seus respectivos grupos controle (animais falso-operados), correspondentes a cada período experimental, utilizado teste *t*.

Um padrão temporal semelhante ao encontrado na borda da lesão foi observado na análise da expressão imuno-histoquímica do GIP no epicentro da lesão medular (Figura 8). Ou seja, os prolongamentos neuronais presentes nas áreas lesionadas da medula espinal dos animais sacrificados 24 h, 14 ou 28 dias após indução da LTME apresentaram uma maior reatividade para o GIP quando comparado com os prolongamentos presentes nos animais falso-operados sacrificados nos mesmos períodos experimentais ( $P=0,0114$ ;  $0,0386$  e  $0,0228$ , respectivamente) (Figura 8D, E, F e G).

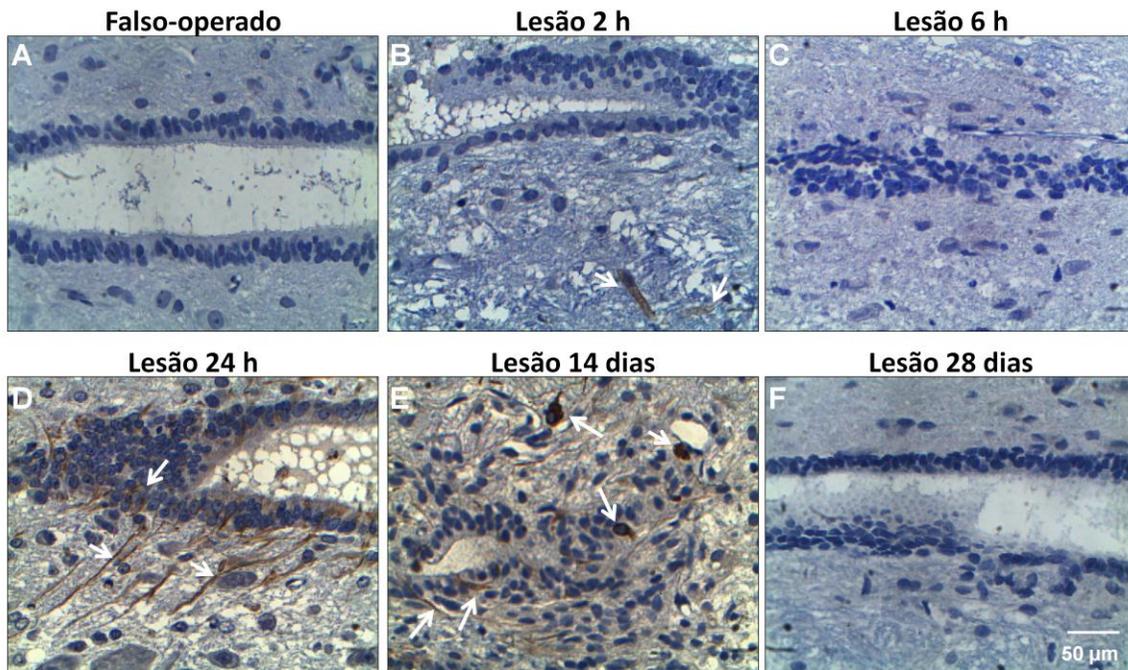


**Figura 8. Análise do padrão de expressão do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) no epicentro da lesão da medula espinal de animais submetidos ao modelo de lesão medular traumática induzida por compressão.** (A) Imagem representativa da imunoreatividade para o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) na medula espinal dos animais falso-operados (A) e lesionados, sacrificados após 2 h (B) (n=5), 6 h (C) (n=5), 24 h (D) (n=5), 14 (E) (n=5) e 28 dias (F) (n=5). Observa-se um padrão de marcação imuno-histoquímico granular no citoplasma e prolongamentos das células neuronais. (G) Avaliação semi-quantitativa da expressão do GIP nos prolongamentos neuronais presentes no epicentro da lesão ou nos prolongamentos neuronais da substância cinzenta dos animais falso-operados. Os resultados estão expressos em média e erro padrão da média em unidade arbitrária de densidade óptica. \* $P \leq 0,05$  comparando os animais lesionados com seus respectivos grupos controle (animais falso-operados), correspondentes a cada período experimental, utilizado teste *t*.

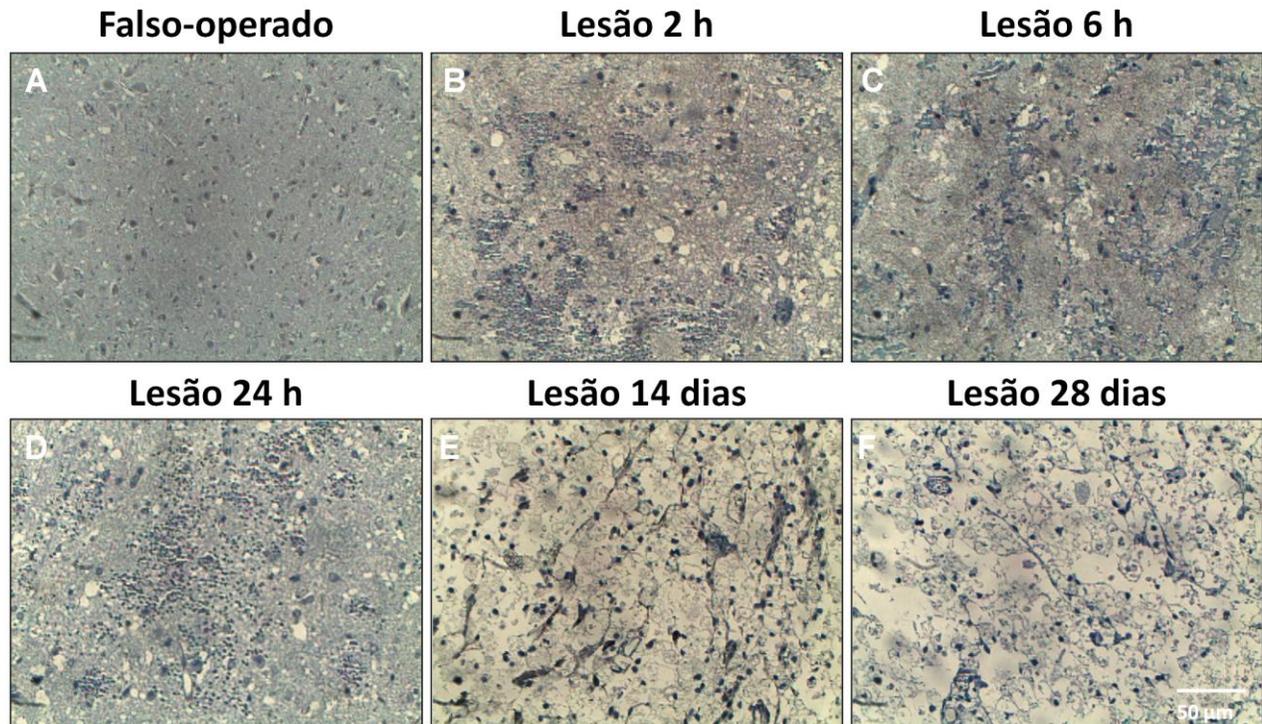
Já foi anteriormente descrita a existência de uma população de células progenitoras na região endimária dos ventrículos laterais de roedores adultos (Gage, 2000). A Figura 9 demonstra a imunoreatividade para o anticorpo anti-nestina no canal medular dos animais submetidos ao trauma da medula espinal, sacrificados em diferentes tempos experimentais. Foram observadas células progenitoras, caracterizadas pela positividade para a proteína nestina, na área adjacente ao canal medular dos animais sacrificados 2 h e 14 dias após indução da LTME, conforme ilustrado na Figura 9B e E, respectivamente. Não foram observadas células positivas para a nestina no canal medular, ou na região adjacente ao mesmo, dos animais falso-operados ou sacrificados 6 h e 28 dias após a indução da lesão (Figura 9C e F, respectivamente).

As células endimárias do canal medular dos animais sacrificados 24 h ou 14 dias após indução da lesão traumática apresentaram intensa positividade para a proteína nestina (Figura 9D e E), sendo que a maior intensidade de marcação ocorreu nas células dos animais sacrificados 24 h após indução da lesão. De maneira interessante, somente no grupo de animais sacrificados 14 dias após a indução da LTME, observam-se células positivas para nestina no epicentro da lesão medular. A Figura 10 ilustra a imunoreatividade para a proteína nestina na substância cinzenta da medula espinal dos animais falso-operados e lesionados. É importante ressaltar que o epicentro da lesão da medula espinal dos animais sacrificados 14 dias (Figura 10E) após indução da lesão apresentou uma intensa quantidade de células positivas para a proteína nestina, o que corresponde fenotipicamente a progenitores neurais que provavelmente migraram do canal medular para o local de reparo. Os grupos

sacrificados na fase aguda do modelo ou 28 dias após indução da lesão não apresentaram nenhuma célula positiva para proteína nestina no epicentro da lesão (Figura 10).



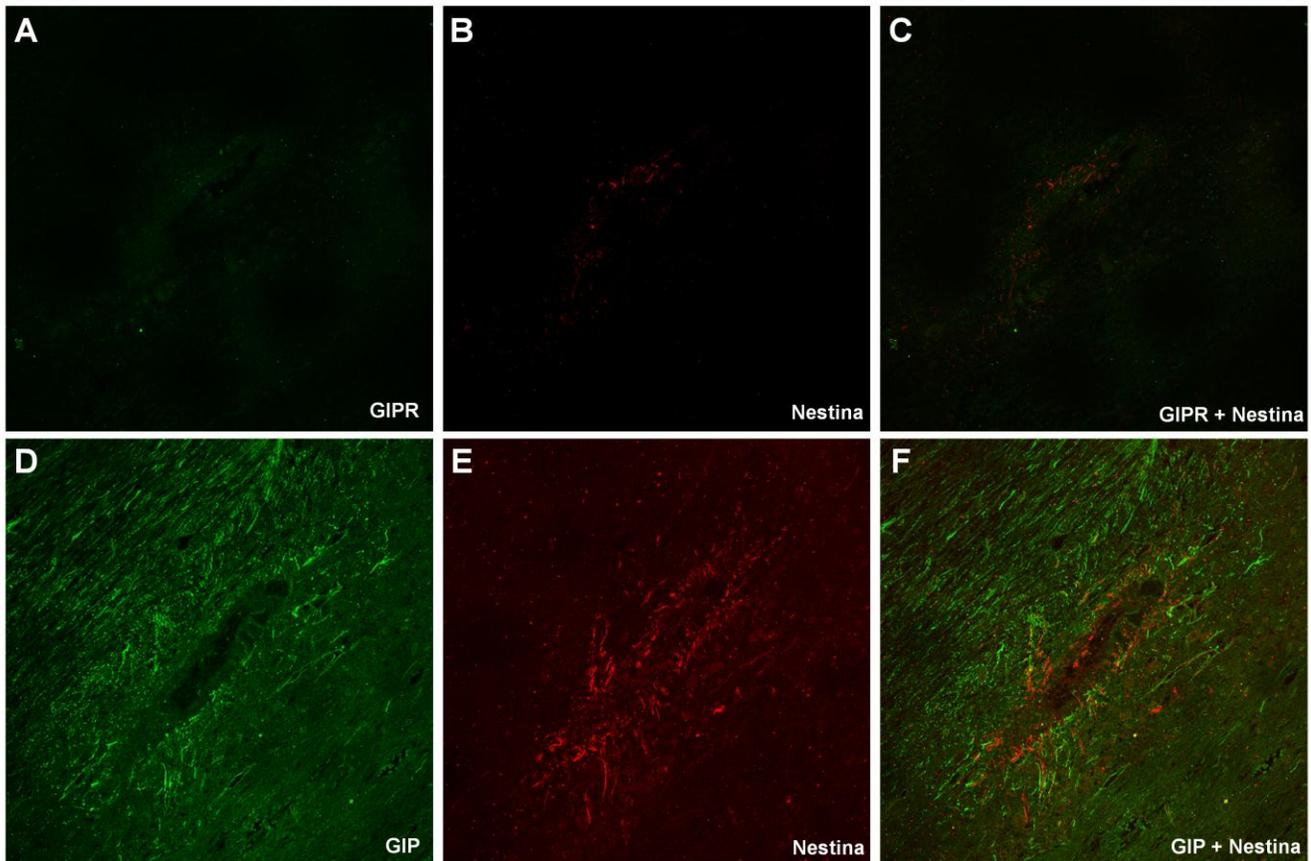
**Figura 9. Detecção de progenitores neurais, caracterizados pela positividade para a proteína nestina, nas células ependimárias e na região adjacente ao canal medular de animais submetidos ao modelo de lesão traumática da medula espinal induzida por compressão.** Imagens representativas da imunoreatividade para a proteína nestina nas células ependimárias do canal medular dos animais falso-operados (A) e lesionados, sacrificados após 2 h (B), 6 h (C), 24 h (D), 14 dias (E) e 28 dias (F).



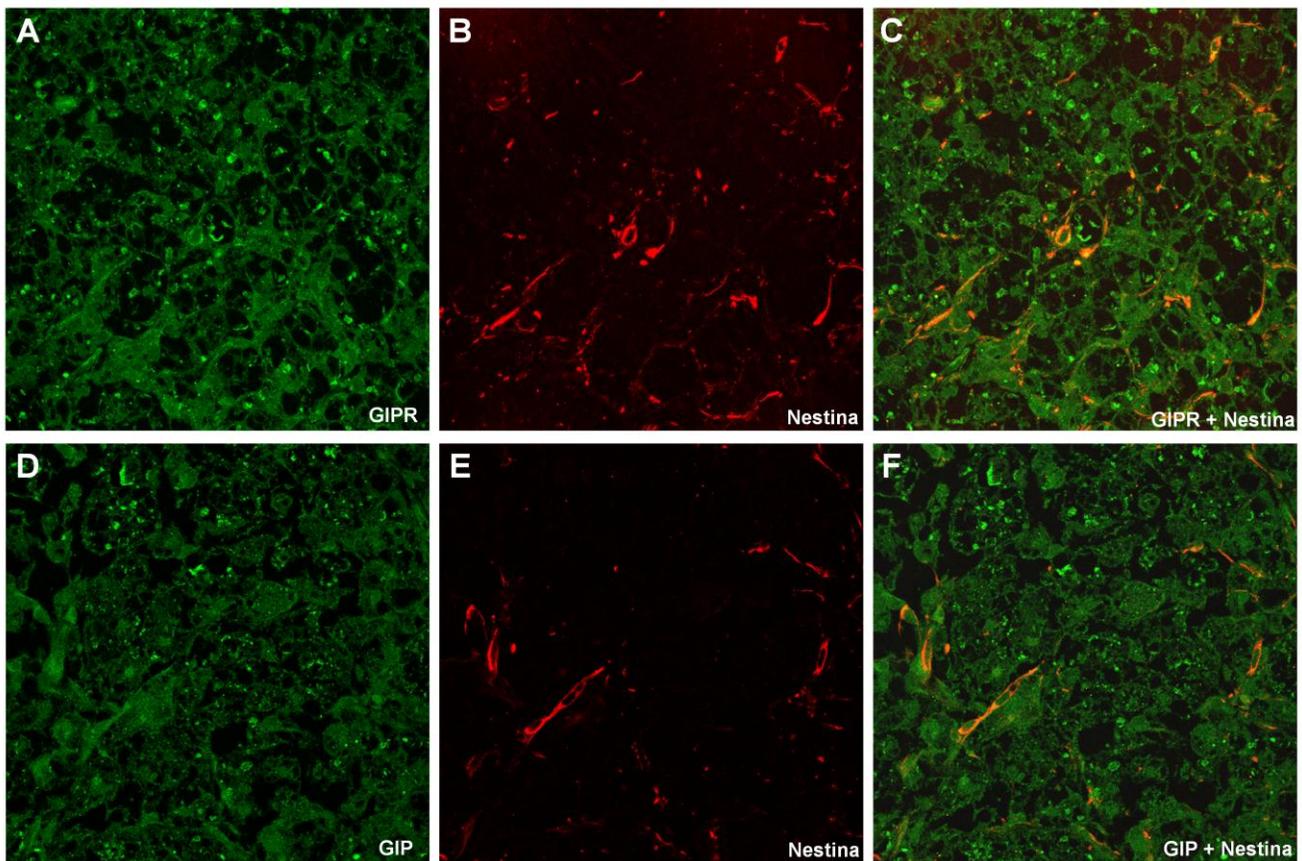
**Figura 10. Detecção de progenitores neurais, caracterizados pela positividade para a proteína nestina, no epicentro da área lesionada da medula espinal de animais submetidos ao modelo experimental de lesão traumática da medula espinal induzida por compressão.** Não foi possível identificar células positivas para a proteína nestina na substância cinzenta dos animais falso-operados (A) e sacrificados 2 h (B), 6 h (C), 24 h (D) e 28 dias (F) após a indução da lesão traumática da medula espinal (LTME). Entretanto a região correspondente a área lesionada da medula espinal dos animais sacrificados 14 dias (E) após indução da lesão apresentou uma intensa quantidade de células positivas para a proteína nestina, o que corresponde fenotipicamente a progenitores neurais que migraram do canal medular.

Na tentativa de estabelecer uma possível relação entre os progenitores neurais e a via de sinalização do GIPR, foram realizadas reações de imuno-histoquímica com dupla marcação, utilizando anticorpos secundários fluorescentes, para o GIP ou GIPR e a proteína nestina. A Figura 11 ilustra a imunoreatividade das células endimárias do canal medular para a proteína nestina (vermelho) e para o GIPR (verde), na medula espinal dos animais sacrificados 24 h após indução da LTME (Figura 11A, B e C). É possível observar que as células da região do canal medular, positivas para nestina, não apresentaram marcação para o GIPR (Figura 11C). Em contrapartida, estas mesmas células endimárias (positivas para a nestina) foram também reativas para o anticorpo anti-GIP (Figura 11D, E e F). O painel F da Figura 11 demonstra a co-localização do GIP e da proteína nestina, caracterizada pela marcação amarela.

A região do epicentro da lesão medular dos animais sacrificados 14 dias após indução da mesma apresentou positividade acentuada para o marcador de células progenitoras (nestina) (Figura 12B e E). De maneira interessante, as células progenitoras presentes no sítio da lesão medular destes animais, foram positivas tanto para o GIPR (Figura 12A) como para o GIP (Figura 12D), conforme ilustrado na sobreposição das imagens (Figura 12C e F, respectivamente).



**Figura 11.** As células ependimárias do canal medular dos animais sacrificados 24 h após a indução da lesão traumática da medula espinal (LTME) que são positivas para a proteína nestina também expressam o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP). Os progenitores neurais, positivos para a proteína nestina (vermelho), dos animais sacrificados 24 h após a indução da LTME não expressam o receptor do GIP (GIPR) (A, B e C). Estas mesmas células progenitoras apresentaram forte reatividade para o anticorpo anti-GIP, conforme ilustrado nos painéis D, E e F.



**Figura 12.** As células progenitoras, positivas para nestina, presentes no sítio da lesão medular dos animais sacrificados 14 dias após a indução da mesma, são positivas para o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e seu receptor (GIPR). As células positivas para a proteína nestina (vermelho), dos animais sacrificados 14 dias após a indução da lesão traumática da medula espinal (LTME) (B e E) apresentam forte positividade tanto para o GIP (A) como para GIPR (C) (verde), conforme demonstra a sobreposição das imagens (C e F).

## 5. Discussão

Os nervos periféricos de mamíferos adultos, quando lesionados, regeneram seus axônios de maneira espontânea, em contrapartida, o potencial de regeneração do SNC é muito limitado. Entretanto, intervenções terapêuticas experimentais sugerem que apesar de limitado, o potencial regenerativo residual do SNC pode ser estimulado, se os axônios lesionados forem expostos a condições ambientais favoráveis ao seu crescimento (Horner e Gage, 2000). As lesões do SNC, especialmente as traumáticas, resultam em migração de células gliais e acúmulo de inibidores associados à mielina, que parecem ser responsáveis pelo desenvolvimento de um microambiente hostil, não permissivo ao crescimento e/ou regeneração que impede a reparação da mielina e neurônios lesados (Yiu e He, 2006).

Os eventos traumáticos do SNC resultam em imediata morte neuronal e glial, seguido de um processo patológico tardio insidioso. Este processo tardio, também denominado lesão secundária, é caracterizado pela morte apoptótica de células neuronais e gliais, aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica, e principalmente por um processo inflamatório complexo e pouco compreendido que pode persistir por anos (Donnelly e Popovich, 2008). O presente estudo descreve as alterações morfológicas da medula espinal dos animais submetidos ao modelo de lesão medular traumática induzido por compressão (Vanicky *et al.*, 2001), sacrificados durante as fases aguda e crônica do processo traumático. Observou-se que o epicentro da lesão da medula espinal dos animais sacrificados 2 h, 6 h e 24 h após indução da mesma, é composto por debris celulares que corresponde à necrose de liquefação,

histologicamente caracterizada por um fundo amorfo sem evidência de estruturas celulares, com áreas cavitadas imersas em fundo hemorrágico. Este processo necro-hemorrágico corresponde a um estágio agudo da lesão. Não foi encontrado na literatura especializada nenhuma descrição histológica da medula espinal de animais submetidos ao modelo experimental de lesão medular traumática por compressão, sacrificados no período compreendido entre 2 h e 7 dias após a indução da mesma.

Na análise histológica da medula espinal dos animais lesionados sacrificados durante a fase crônica da lesão (14 ou 28 dias após indução) foi possível observar que a presença de áreas cavitadas foi a única característica histológica em comum com a medula dos animais sacrificados na fase aguda. Os cortes histológicos destes animais apresentaram grande quantidade de células balonizadas, envoltas por amplas áreas cavitadas, possivelmente relacionadas com processo necrótico em fase resolutiva. A presença de células balonizadas foi observada somente na medula espinal dos animais sacrificados 14 e 28 dias após a indução da LTME, o que sugere ser uma evidência tardia do processo traumático. Marques e colaboradores (2009) descreveram que a medula espinal dos animais submetidos à lesão medular traumática apresenta um aumento importante da densidade celular, associado a edema e cavitações, no período de 7 a 56 dias após a indução da lesão (Marques *et al.*, 2009). Nossos resultados também corroboram o estudo recente que descreveu o aparecimento de lesões cavitadas com células balonizadas na medula espinal de animais sacrificados 14 dias após a indução da lesão medular traumática (Zhang *et al.*, 2011).

Inúmeros estudos mostram que as células progenitoras da medula espinal são responsivas à lesão tecidual (Obermair *et al.*, 2008). A resposta destas células frente à lesão resulta em divisão, migração, e maturação dos precursores neurais (Okano *et al.*, 2007). As células endimárias do canal medular são descritas como fonte de células progenitoras da medula espinal adulta (Meletis *et al.*, 2008; Foret *et al.*, 2011). Entretanto, o padrão temporal e espacial da proliferação, diferenciação e migração dos progenitores neurais, assim como as potenciais funções destas células nos processos traumáticos da medula espinal são foco de intensa pesquisa. Com objetivo de identificar a presença de células progenitoras na medula espinal dos animais submetidos ao modelo de lesão medular traumática induzido por compressão (Vanicky *et al.*, 2001), secções histológicas das medulas dos animais falso-operados ou lesionados, sacrificados em diferentes períodos experimentais, foram submetidas à avaliação imuno-histoquímica para detecção da proteína nestina (marcador de células progenitoras neurais). Foram identificadas células positivas para a proteína nestina na região do canal medular, e no sítio da lesão dos animais submetidos à lesão medular traumática. Os animais falso-operados e os sacrificados 2 h, 6 h e 28 dias após a indução da lesão medular (Figura 9), não demonstraram positividade para a proteína nestina nas células endimárias do canal medular, tampouco na área lesionada da medula espinal (Figura 10). A maior quantidade de células progenitoras positivas para a proteína nestina foi encontrada na região do canal medular dos animais sacrificados 24 horas após a indução da lesão, e no epicentro da lesão dos animais sacrificados 14 dias após indução da mesma. Neste cenário, Cizkova e colaboradores (2009) demonstraram que a lesão medular traumática resulta em uma rápida indução da

expressão da proteína nestina nas células endimárias do canal medular (Cizkova *et al.*, 2009), assim como demonstrado neste no presente estudo. Além disso, nossos resultados também corroboram um estudo anterior que descreveu um aumento significativo de células progenitoras no epicentro da lesão a partir de 7 dias após da mesma, diminuindo após 28 dias (McTigue *et al.*, 2001). A ausência de células progenitoras no epicentro da lesão dos animais sacrificados 28 dias após indução da LTME pode ser resultado do processo de diferenciação celular, que resulta em perda da expressão da proteína nestina.

Pesquisas demonstram que a insulina e algumas incretinas possuem outras funções no organismo além do controle do metabolismo energético (Unger *et al.*, 1991; Zhao e Alkon, 2001; Hoyer, 2004; Li e Holscher, 2007; Wu *et al.*, 2007). A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido, sendo essencial para manutenção da homeostase da glicose, do crescimento e diferenciação celular (Saltiel e Kahn, 2001). A insulina e seu receptor, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, estão amplamente distribuídos no SNC, e a ativação desta via de sinalização resulta em efeitos associados com o controle do metabolismo, crescimento e diferenciação dos neurônios e células da glia (Zhao e Alkon, 2001). Estudos recentes têm sugerido que a ativação dos receptores neuronais de insulina resulta em uma diminuição da sinaptotoxicidade induzida por oligômeros de beta-amilóide, sugerindo um possível papel neuroprotetor deste peptídeo (Zhao *et al.*, 2008; De Felice *et al.*, 2009). Wu e colaboradores (2007) investigaram os efeitos neuroprotetores da insulina na patogênese do trauma medular, e demonstraram que a administração sistêmica de insulina possui efeitos anti-apoptóticos, além de diminuir o processo inflamatório induzido pela lesão medular, o que promove uma

melhora funcional significativa dos animais submetidos a um modelo de lesão medular traumática por compressão (Wu *et al.*, 2007). A insulina atua através de seus receptores específicos, os quais são muito semelhantes à sequência do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1), sendo que ambos dividem muitas das mesmas vias de sinalização intracelular (Siddle *et al.*, 2001). A insulina e o IGF-1 apresentam efeitos estimulatórios similares. Muitos estudos relatam que o IGF-1 atenua o dano associado à lesão medular, além de reduzir a reação celular induzida pelo estresse tecidual, o edema e o desequilíbrio eletrofisiológico da medula espinal (Sharma *et al.*, 2000; Winkler *et al.*, 2000a; Winkler *et al.*, 2000b). Um importante efeito do IGF-1 é sua atividade no controle do crescimento axonal, visto que o bloqueio do seu receptor parece ser capaz de interromper o crescimento axonal de neurônios adultos e/ou em desenvolvimento (Ozdinler e Macklis, 2006).

Considerando que as incretinas, GIP e GLP, são moduladores positivos dos efeitos da insulina (Salehi *et al.*, 2008), da expressão dos receptores de IGF-1 (Leen *et al.*, 2011), da plasticidade neuronal, neurogênese e neuroproteção, o presente estudo avaliou, pela primeira vez, o padrão de expressão do GIP e do seu receptor na medula espinal dos animais submetidos ao modelo de lesão medular traumática induzida por compressão. Conforme demonstrado na Figura 5, a medula espinal dos animais sacrificados 6 h ou 28 dias após a indução da lesão medular apresentaram uma maior expressão do GIPR nos neurônios adjacentes ao sítio da lesão (borda da lesão), quando comparados aos neurônios da substância cinzenta dos animais falso-operados. A região adjacente a lesão medular dos animais sacrificados 2 h, 24 h ou 14 dias após indução da lesão mostraram uma tendência ao aumento da expressão do GIPR, porém

não significativa (Figura 5G). Este aumento não significativo do pode estar associado com o número de animais utilizados nos grupos experimentais (n=5 animais). O padrão temporal de expressão do GIPR no sítio da lesão não pode ser quantificado em função das grandes diferenças morfológicas observadas no epicentro da lesão dos animais sacrificados durante a fase aguda ou crônica do modelo. Entretanto foi possível observar uma marcação intensa de padrão granular nas células balonizadas do sítio da lesão dos animais sacrificados na fase crônica, o que poderia sugerir um possível mecanismo de proteção frente ao insulto degenerativo reversível.

O padrão de expressão do GIP na substância cinzenta da medula espinal de todos os animais avaliados foi predominantemente citoplasmático, com grande densidade de imunoreatividade nos prolongamentos celulares das células morfolologicamente compatíveis com neurônios (Figura 7). Foi possível observar alterações na imunoreatividade para o anticorpo anti-GIP na região adjacente (borda) a área lesionada da medula espinal dos animais sacrificados 28 dias após indução da lesão, quando comparado com a substância cinzenta dos animais falso-operados (Figura 7G). A avaliação semi-quantitativa da intensidade da imunomarcação para o GIP nos prolongamentos presentes no sítio lesionado da medula espinal dos animais submetidos ao modelo mostrou aumento significativo 24 h, 14 e 28 dias após a indução da lesão. Estudos anteriores demonstram que o aumento da expressão do GIP está associado com processos de neurogênese e regeneração axonal (Abankwa *et al.*, 2002; Nyberg *et al.*, 2005; Figueiredo *et al.*, 2010b). Um achado de grande interesse descrito neste estudo foi a detecção do GIP e do GIPR nas células progenitoras, positivas para a proteína nestina, presentes no epicentro da lesão crônica, e somente

do GIP nas células ependimárias do canal medular dos animais sacrificados 24 h após indução da lesão (Figura 11 e 12).

Estes resultados sugerem que o GIP e GIPR estão associados com a regulação dos fenômenos proliferativos (neurogênese) e reparadores (crescimento axonal e/ou dendrítico) do SNC, por meio de mecanismos parácrinos e/ou autócrinos. Entretanto, estudos adicionais utilizando diferentes modelos experimentais de regeneração axonal, crescimento dendrítico, proliferação e diferenciação de progenitores neurais são fundamentais para o entendimento do mecanismo pelo qual o GIP e seu receptor atuam nos processos de reparo do SNC.

## 6. Conclusões

- O receptor do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIPR) está expresso nas células morfológicamente compatíveis com neurônios dos animais falso-operados e naïve. A lesão traumática da medula espinal resulta em aumento da expressão deste receptor na região adjacente ao sítio da lesão 6 h e 28 dias após indução da mesma.
- O peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP) está expresso nos prolongamentos neuronais da substância cinzenta dos animais falso-operados, naïve e lesionados. A lesão traumática da medula espinal resulta em aumento da expressão deste peptídeo na região adjacente ao sítio da lesão 28 dias após indução da mesma.
- A lesão traumática resulta em aumento do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP) nos prolongamentos neuronais do epicentro da lesão medular dos animais sacrificados 24 h, 14 e 28 dias após indução da mesma.
- A lesão traumática da medula espinal resulta em um aumento importante no número de células progenitoras (positivas para a proteína nestina) na região do canal endimário da medula espinal dos animais sacrificados 24 h após a indução da lesão, sendo que estas células co-expressam o peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP).
- A lesão traumática da medula espinal resulta em um aumento no número de células progenitoras (positivas para a proteína nestina) no epicentro da lesão medular somente dos animais sacrificados 14 dias após a indução da mesma, sendo que estas células co-expressam tanto o peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP) quanto o seu receptor (GIPR).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abankwa, D., P. Kury e H. W. Muller (2002). "Dynamic changes in gene expression profiles following axotomy of projection fibres in the Mammalian CNS." Mol Cell Neurosci **21**(3): 421-35.

Abematsu, M., K. Tsujimura, M. Yamano, M. Saito, K. Kohno, J. Kohyama, M. Namihira, S. Komiya e K. Nakashima "Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury." J Clin Invest **120**(9): 3255-66.

Agrawal, S. K., E. Theriault e M. G. Fehlings (1998). "Role of group I metabotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord white matter injury." J Neurotrauma **15**(11): 929-41.

Aguayo, A. J., S. David e G. M. Bray (1981). "Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents." J Exp Biol **95**: 231-40.

Amar, A. P. e M. L. Levy (1999). "Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury." Neurosurgery **44**(5): 1027-39; discussion 1039-40.

Baggio, L. L. e D. J. Drucker (2007). "Biology of incretins: GLP-1 and GIP." Gastroenterology **132**(6): 2131-57.

Baptiste, D. C. e M. G. Fehlings (2007). "Update on the treatment of spinal cord injury." Prog Brain Res **161**: 217-33.

Bartholdi, D. e M. E. Schwab (1995). "Methylprednisolone inhibits early inflammatory processes but not ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in the rat." Brain Res **672**(1-2): 177-86.

Beck, B. (1989). "Gastric inhibitory polypeptide: a gut hormone with anabolic functions." J Mol Endocrinol **2**(3): 169-74.

Berkovsky, T. C. (2009). Handbook of spinal cord injuries types, treatments, and prognosis. Hauppauge, NY, Nova Science.

Boutin, C., O. Hardt, A. de Chevigny, N. Core, S. Goebbels, R. Seidenfaden, A. Bosio e H. Cremer (2011). "NeuroD1 induces terminal neuronal differentiation in olfactory neurogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(3): 1201-6.

Brown, J. C. (1971). "A gastric inhibitory polypeptide. I. The amino acid composition and the tryptic peptides." Can J Biochem **49**(2): 255-61.

Brown, J. C., I. G. Cleator, J. R. Dryburgh, R. A. Pederson e H. Schubert (1974). "The physiology and pathophysiology of gastric inhibitory polypeptide (GIP) and motilin." Verh Dtsch Ges Inn Med **80**: 377-80.

Buhren, B. A., M. Gasis, B. Thorens, H. W. Muller e F. Bosse (2009). "Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and its receptor (GIPR): cellular localization, lesion-affected expression, and impaired regenerative axonal growth." J Neurosci Res **87**(8): 1858-70.

Cayre, M., P. Canoll e J. E. Goldman (2009). "Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain." Prog Neurobiol **88**(1): 41-63.

Cizkova, D., M. Nagyova, L. Slovinska, I. Novotna, J. Radonak, M. Cizek, E. Mechirova, Z. Tomori, J. Hlucilova, J. Motlik, I. Sulla, Jr. e I. Vanicky (2009). "Response of ependymal progenitors to spinal cord injury or enhanced physical activity in adult rat." Cell Mol Neurobiol **29**(6-7): 999-1013.

Coleman, W. P., D. Benzel, D. W. Cahill, T. Ducker, F. Geisler, B. Green, M. R. Gropper, J. Goffin, P. W. Madsen, 3rd, D. J. Maiman, S. L. Ondra, M. Rosner, R. C. Sasso, G. R. Trost e S. Zeidman (2000). "A critical appraisal of the reporting of the National Acute Spinal Cord Injury Studies (II and III) of methylprednisolone in acute spinal cord injury." J Spinal Disord **13**(3): 185-99.

Condic, M. L. (2002). "Neural development: axon regeneration derailed by dendrites." Curr Biol **12**(13): R455-7.

Cummings, B. J., N. Uchida, S. J. Tamaki, D. L. Salazar, M. Hooshmand, R. Summers, F. H. Gage e A. J. Anderson (2005). "Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 14069-74.

De Felice, F. G., M. N. Vieira, T. R. Bomfim, H. Decker, P. T. Velasco, M. P. Lambert, K. L. Viola, W. Q. Zhao, S. T. Ferreira e W. L. Klein (2009). "Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 1971-6.

Dohrmann, G. J. e W. E. Allen (1975). "Microcirculation of traumatized spinal cord. A correlation of microangiography and blood flow patterns in transitory and permanent paraplegia." J Trauma **15**(11): 1003-13.

Donnelly, D. J. e P. G. Popovich (2008). "Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury." Exp Neurol **209**(2): 378-88.

Fawcett, J. W. e R. A. Asher (1999). "The glial scar and central nervous system repair." Brain Res Bull **49**(6): 377-91.

Figueiredo, C. P., V. L. Antunes, E. L. Moreira, N. de Mello, R. Medeiros, G. Di Giunta, B. Lobao-Soares, M. Linhares, K. Lin, T. L. Mazzuco, R. D. Prediger e R. Walz (2010a). "Glucose-dependent insulinotropic peptide receptor expression in the hippocampus and neocortex of mesial temporal lobe epilepsy patients and rats undergoing pilocarpine induced status epilepticus." Peptides.

Figueiredo, C. P., F. A. Pamplona, T. L. Mazzuco, A. S. Aguiar, Jr., R. Walz e R. D. Prediger (2010b). "Role of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its receptor in the central nervous system: therapeutic potential in neurological diseases." Behav Pharmacol **21**(5-6): 394-408.

Fitch, M. T. e J. Silver (2008). "CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure." Exp Neurol **209**(2): 294-301.

Foret, A., R. Quertainmont, O. Botman, D. Bouhy, P. Amabili, G. Brook, J. Schoenen e R. Franzen (2011). "Stem cells in the adult rat spinal cord: plasticity after injury and treadmill training exercise." J Neurochem **112**(3): 762-72.

Fu, E. S. e S. Saporta (2005). "Methylprednisolone inhibits production of interleukin-1beta and interleukin-6 in the spinal cord following compression injury in rats." J Neurosurg Anesthesiol **17**(2): 82-5.

Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science **287**(5457): 1433-8.

Gao, H. M. e J. S. Hong (2008). "Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression." Trends Immunol **29**(8): 357-65.

Gault, V. A. e C. Holscher (2008a). "GLP-1 agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid." Eur J Pharmacol **587**(1-3): 112-7.

Gault, V. A. e C. Holscher (2008b). "Protease-resistant glucose-dependent insulinotropic polypeptide agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid." J Neurophysiol **99**(4): 1590-5.

Guha, A. e C. H. Tator (1988). "Acute cardiovascular effects of experimental spinal cord injury." J Trauma **28**(4): 481-90.

Harrop, J. S., A. Sharan e J. Ratliff (2006). "Central cord injury: pathophysiology, management, and outcomes." Spine J **6**(6 Suppl): 198S-206S.

Hausmann, O. N. (2003). "Post-traumatic inflammation following spinal cord injury." Spinal Cord **41**(7): 369-78.

Havrankova, J., J. Roth e M. Brownstein (1978). "Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat." Nature **272**(5656): 827-9.

Horner, P. J. e F. H. Gage (2000). "Regenerating the damaged central nervous system." Nature **407**(6807): 963-70.

Hoyer, S. (2004). "Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease." Eur J Pharmacol **490**(1-3): 115-25.

Hulsebosch, C. E. (2002). "Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury." Adv Physiol Educ **26**(1-4): 238-55.

Hurlbert, R. J. (2000). "Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care." J Neurosurg **93**(1 Suppl): 1-7.

Klimaschewski, L. (1997). "VIP -- a 'very important peptide' in the sympathetic nervous system?" Anat Embryol (Berl) **196**(4): 269-77.

Leen, J. L., A. Izzo, C. Upadhyay, K. J. Rowland, P. E. Dube, S. Gu, S. P. Heximer, C. J. Rhodes, D. R. Storm, P. K. Lund e P. L. Brubaker (2011). "Mechanism of action of glucagon-like peptide-2 to increase IGF-I mRNA in intestinal subepithelial fibroblasts." Endocrinology **152**(2): 436-46.

Li, L. e C. Holscher (2007). "Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review." Brain Res Rev **56**(2): 384-402.

Lianza, S., M. E. Casalis, J. M. D. Greve e R. Eichberg (2001). A lesão medular. Medicina de Reabilitação. G. Koogan. Rio de Janeiro: 299-322.

Lioudyno, M., Y. Skoglosa, N. Takei e D. Lindholm (1998). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects dorsal root ganglion neurons from death and induces calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in vitro." J Neurosci Res **51**(2): 243-56.

Lois, C. e A. Alvarez-Buylla (1994). "Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain." Science **264**(5162): 1145-8.

Lu, J., K. W. Ashwell e P. Waite (2000). "Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis." Spine (Phila Pa 1976) **25**(14): 1859-66.

Luskin, M. B., J. G. Parnavelas e J. A. Barfield (1993). "Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells." J Neurosci **13**(4): 1730-50.

Mallei, A., S. A. Aden, A. Bachis, C. Brandoli, E. Ongini e I. Mocchetti (2005). "The nitrosteroid NCX 1015, a prednisolone derivative, improves recovery of function in rats after spinal cord injury." Brain Res **1062**(1-2): 16-25.

Marques, S. A., V. F. Garcez, E. A. Del Bel e A. M. Martinez (2009). "A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: morphological and functional assessment." J Neurosci Methods **177**(1): 183-93.

Martino, G. e S. Pluchino (2006). "The therapeutic potential of neural stem cells." Nat Rev Neurosci **7**(5): 395-406.

McTigue, D. M., P. Wei e B. T. Stokes (2001). "Proliferation of NG2-positive cells and altered oligodendrocyte numbers in the contused rat spinal cord." J Neurosci **21**(10): 3392-400.

Meletis, K., F. Barnabe-Heider, M. Carlen, E. Evergren, N. Tomilin, O. Shupliakov e J. Frisen (2008). "Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells." PLoS Biol **6**(7): e182.

Merkle, F. T., Z. Mirzadeh e A. Alvarez-Buylla (2007). "Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain." Science **317**(5836): 381-4.

Norenberg, M. D., J. Smith e A. Marcillo (2004). "The pathology of human spinal cord injury: defining the problems." J Neurotrauma **21**(4): 429-40.

Nyberg, J., M. F. Anderson, B. Meister, A. M. Alborn, A. K. Strom, A. Brederlau, A. C. Illerskog, O. Nilsson, T. J. Kieffer, M. A. Hietala, A. Ricksten e P. S. Eriksson (2005). "Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation." J Neurosci **25**(7): 1816-25.

Nyberg, J., C. Jacobsson, M. F. Anderson e P. S. Eriksson (2007). "Immunohistochemical distribution of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in the adult rat brain." J Neurosci Res **85**(10): 2099-119.

Obermair, F. J., A. Schroter e M. Thallmair (2008). "Endogenous neural progenitor cells as therapeutic target after spinal cord injury." Physiology (Bethesda) **23**: 296-304.

Okano, H., M. Sakaguchi, K. Ohki, N. Suzuki e K. Sawamoto (2007). "Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms." J Neurochem **102**(5): 1459-65.

Ozdinler, P. H. e J. D. Macklis (2006). "IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons." Nat Neurosci **9**(11): 1371-81.

Pavelock, K. A., B. M. Girard, K. C. Schutz, K. M. Braas e V. May (2007). "Bone morphogenetic protein down-regulation of neuronal pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and reciprocal effects on vasoactive intestinal peptide expression." J Neurochem **100**(3): 603-16.

Peng, W., M. L. Cotrina, X. Han, H. Yu, L. Bekar, L. Blum, T. Takano, G. F. Tian, S. A. Goldman e M. Nedergaard (2009). "Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(30): 12489-93.

Plunet, W., B. K. Kwon e W. Tetzlaff (2002). "Promoting axonal regeneration in the central nervous system by enhancing the cell body response to axotomy." J Neurosci Res **68**(1): 1-6.

Raineteau, O., K. Fouad, F. M. Bareyre e M. E. Schwab (2002). "Reorganization of descending motor tracts in the rat spinal cord." Eur J Neurosci **16**(9): 1761-71.

Raineteau, O. e M. E. Schwab (2001). "Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury." Nat Rev Neurosci **2**(4): 263-73.

Rayan, G. M., C. Johnson, J. Pitha, S. Cahill e S. Said (1995). "Vasoactive intestinal peptide and nerve growth factor effects on nerve regeneration." J Okla State Med Assoc **88**(8): 337-41.

Reagan, L. P., N. Gorovits, E. K. Hoskin, S. E. Alves, E. B. Katz, C. A. Grillo, G. G. Piroli, B. S. McEwen e M. J. Charron (2001). "Localization and regulation of GLUTx1 glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2820-5.

Salehi, M., B. A. Aulinger e D. A. D'Alessio (2008). "Targeting beta-cell mass in type 2 diabetes: promise and limitations of new drugs based on incretins." Endocr Rev **29**(3): 367-79.

Saltiel, A. R. e C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.

Santos-Benito, F. F., C. Munoz-Quiles e A. Ramon-Cueto (2006). "Long-term care of paraplegic laboratory mammals." J Neurotrauma **23**(3-4): 521-36.

Schmitz, T. J. (2004). Lesão Medular Traumática. Fisioterapia Avaliação e Tratamento. Manole. São Paulo: 874-87.

Schwab, J. M., K. Brechtel, C. A. Mueller, V. Failli, H. P. Kaps, S. K. Tuli e H. J. Schluesener (2006). "Experimental strategies to promote spinal cord regeneration--an integrative perspective." Prog Neurobiol **78**(2): 91-116.

Schwartz, M. e J. Kipnis (2007). "Model of acute injury to study neuroprotection." Methods Mol Biol **399**: 41-53.

Sharma, H. S., F. Nyberg, T. Gordh, P. Alm e J. Westman (2000). "Neurotrophic factors influence upregulation of constitutive isoform of heme oxygenase and cellular stress response in the spinal cord following trauma. An experimental study using immunohistochemistry in the rat." Amino Acids **19**(1): 351-61.

Siddle, K., B. Urso, C. A. Niesler, D. L. Cope, L. Molina, K. H. Surinya e M. A. Soos (2001). "Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors." Biochem Soc Trans **29**(Pt 4): 513-25.

Snider, W. D., F. Q. Zhou, J. Zhong e A. Markus (2002). "Signaling the pathway to regeneration." Neuron **35**(1): 13-6.

Sonntag, V. K. e R. A. Douglas (1990). "Management of spinal cord trauma." Neurosurg Clin N Am **1**(3): 729-50.

Tator, C. H. e M. G. Fehlings (1991). "Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms." J Neurosurg **75**(1): 15-26.

Tymianski, M. e C. H. Tator (1996). "Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury." Neurosurgery **38**(6): 1176-95.

Unger, J. W., J. N. Livingston e A. M. Moss (1991). "Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects." Prog Neurobiol **36**(5): 343-62.

Usdin, T. B., E. Mezey, D. C. Button, M. J. Brownstein e T. I. Bonner (1993). "Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain." Endocrinology **133**(6): 2861-70.

Vanicky, I., L. Urdzikova, K. Saganova, D. Cizkova e J. Galik (2001). "A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat." J Neurotrauma **18**(12): 1399-407.

Vitale, M. G., J. M. Goss, H. Matsumoto e D. P. Roye, Jr. (2006). "Epidemiology of pediatric spinal cord injury in the United States: years 1997 and 2000." J Pediatr Orthop **26**(6): 745-9.

Waschek, J. A. (1995). "Vasoactive intestinal peptide: an important trophic factor and developmental regulator?" Dev Neurosci **17**(1): 1-7.

Winkler, R., F. Pasleau, N. Boussif e D. Hodzic (2000a). "[The IGF system: summary and recent data]." Rev Med Liege **55**(7): 725-39.

Winkler, T., H. S. Sharma, E. Stalberg e R. D. Badgaiyan (2000b). "Neurotrophic factors attenuate alterations in spinal cord evoked potentials and edema formation following trauma to the rat spinal cord." Acta Neurochir Suppl **76**: 291-6.

Wu, X. H., S. H. Yang, D. Y. Duan, H. H. Cheng, Y. T. Bao e Y. Zhang (2007). "Anti-apoptotic effect of insulin in the control of cell death and neurologic deficit after acute spinal cord injury in rats." J Neurotrauma **24**(9): 1502-12.

Xu, J., G. Fan, S. Chen, Y. Wu, X. M. Xu e C. Y. Hsu (1998). "Methylprednisolone inhibition of TNF-alpha expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats." Brain Res Mol Brain Res **59**(2): 135-42.

Xu, J., G. M. Kim, S. H. Ahmed, J. Xu, P. Yan, X. M. Xu e C. Y. Hsu (2001). "Glucocorticoid receptor-mediated suppression of activator protein-1 activation and matrix metalloproteinase expression after spinal cord injury." J Neurosci **21**(1): 92-7.

Yiu, G. e Z. He (2006). "Glial inhibition of CNS axon regeneration." Nat Rev Neurosci **7**(8): 617-27.

Zhang, Q. L., J. Liu, P. X. Lin e H. Webster (2002). "Local administration of vasoactive intestinal peptide after nerve transection accelerates early myelination and growth of regenerating axons." J Peripher Nerv Syst **7**(2): 118-27.

Zhang, S. X., F. Huang, M. Gates, J. White e E. G. Holmberg (2011). "Histological repair of damaged spinal cord tissue from chronic contusion injury of rat: a LM observation." Histol Histopathol **26**(1): 45-58.

Zhao, W. Q. e D. L. Alkon (2001). "Role of insulin and insulin receptor in learning and memory." Mol Cell Endocrinol **177**(1-2): 125-34.

Zhao, W. Q., F. G. De Felice, S. Fernandez, H. Chen, M. P. Lambert, M. J. Quon, G. A. Krafft e W. L. Klein (2008). "Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors." Faseb J **22**(1): 246-60.