

Gabriela Bortolança Chiarotto

**"Efeito neuroprotetor do Tempol (4-hidroxi
tempo) após transecção do nervo isquiático em
ratos neonatos"**

Campinas, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GABRIELA BORTOLANÇA CHIAROTTO

**“EFEITO NEUROPROTETOR DO TEMPOL
(4-HIDROXI TEMPO) APÓS TRANSECÇÃO DO
NERVO ISQUIÁTICO EM RATOS NEONATOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pela candidata

Gabriela Bortolança Chiarotto

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
da UNICAMP para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na
área de Anatomia.

Orientador: Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Campinas, 2013

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

C431e Chiarotto, Gabriela Bortolança, 1989-
Efeito neuroprotetor do Tempol (4-hidroxi tempo) após transecção do nervo
Isquático em ratos neonatos / Gabriela Bortolança Chiarotto. – Campinas, SP :
[s.n.], 2013.

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

1. Neuroproteção. 2. Tempol. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de, 1971-
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Neuroprotective effects of Tempol (4-hidroxi tempo) after sciatic nerve
transection in neonatal rats

Palavras-chave em Inglês:

Neuroprotection

Tempol

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira [Orientador]

Valéria Paula Sassoli Fazan

Fábio Rogério

Data de defesa: 14-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

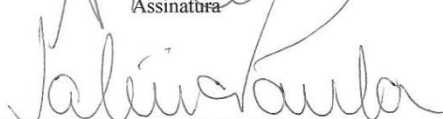
Campinas, 14 de agosto de 2013.

BANCA EXAMINADORA

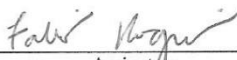
Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira (Orientador)


Assinatura

Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan


Assinatura

Dr. Fábio Rogério


Assinatura

Dr. Guilherme de Araújo Lucas

Assinatura

Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud

Assinatura

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King

Abstract

The peripheral nerve injury in newborn animals results in extensive neuronal death in the spinal cord and dorsal root ganglia. Since most neuronal loss is due to oxidative stress and apoptotic mechanisms, several studies have been conducted to investigate the effect of neuroprotective substances. Among these drugs, the antioxidant Tempol has shown promising results as it is capable of chelating reactive oxygen species (ROS) and to minimize or even prevent, tissue damage. In this sense, the present study aimed to evaluate the neuroprotective effects of Tempol on neuronal death induced by sciatic nerve section in newborn rats. For this purpose, two days old (P2) Wistar rats underwent left sciatic nerve section and were divided into two groups: (1) Tempol-treated group (24mg/kg) - 10 minutes and 6 hours, and every 24 hours after injury for up to 1 week; (2) Group Vehicle - Vehicle treated with the same dilution of Tempol. The animals of both groups were sacrificed at survival times of 8, 12, 24, 72 hours and one week after the lesion. The contralateral side of the spinal cord was used as internal control. After the respective days of survival, the animals were anesthetized and underwent thoracotomy for transcardial perfusion with saline and fixative. The assembly containing the lumbar intumescence and nerve roots were processed for subsequent preparation of histological sections. Cross sections of 12 μm were used for evaluation of neuronal survival and TUNEL for the detection and quantification of apoptotic cells. The results showed that Tempol treatment increased the survival of motoneurons in the spinal cord 15% after 8 hours, 19% after 12 hours, 13% after 24 hours, 15% after 72 hours and 21% after one week post-lesion ($p < 0.0001$). Likewise, Tempol treated animals showed a decrease in the number of

TUNEL positive cells, indicating reduction in apoptotic events. To further investigate the apoptotic events observed herein, we have performed qRT-PCR evaluation of bax, caspase3 and bcl2 transcript levels, 12 and 24 after injury. The results showed an increase in gene expression of 13, 3 and 28 times for bax, caspase 3 and bcl2, respectively, after 12 hours of axotomy and treatment with Tempol. After 24 hours no differences were observed relative to the control. As a whole, these results showed that Tempol is neuroprotective, leading to improved survival of motor neurons after peripheral nerve injury, minimizing the occurrence of apoptotic events.

Resumo

A lesão do nervo periférico em animais neonatos resulta em extensa morte neuronal na medula espinal e nos gânglios das raízes dorsais. Como a maior parte da perda neuronal é devido ao estresse oxidativo e mecanismos apoptóticos, vários estudos têm sido realizados a fim de investigar o efeito de substâncias neuroprotetoras. Dentre esses fármacos, o antioxidante Tempol tem mostrado resultados promissores, uma vez que é capaz de quelar espécies reativas de oxigênio (ROS) e minimizar, ou mesmo prevenir, danos teciduais. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos neuroprotetores do Tempol sobre a morte neuronal induzida pela secção do nervo isquiático em ratos recém-nascidos. Para as análises morfológicas, ratos Wistar com dois dias de idade (P2), foram submetidos à secção do nervo isquiático esquerdo e foram divididos em dois grupos: (1) grupo tratado com Tempol (24mg/kg), 10 minutos, 6 horas e a cada 24 horas após a lesão por até 1 semana; (2) grupo veículo – tratado com o veículo de diluição do Tempol nos mesmos períodos de tratamento. Os animais de ambos os

grupos foram sacrificados em tempos de sobrevida de 8, 12, 24, 72 horas e uma semana após a lesão. O lado contralateral da medula foi utilizado como controle interno para análise dos resultados. Após os respectivos dias de sobrevida, os animais foram anestesiados e submetidos à toracotomia para perfusão com solução salina e fixadora. Em seguida, o conjunto contendo a intumescência lombar e as raízes nervosas foram processadas para posterior confecção dos cortes histológicos. Secções transversais de 12 µm da intumescência lombar foram utilizadas nas técnicas de Microscopia de luz para avaliação da sobrevivência neuronal e TUNEL para detecção e quantificação de células apoptóticas. Os resultados demonstraram que o tratamento com Tempol aumentou a sobrevivência de motoneurônios da medula espinal em 15% após 8 horas; 19% após 12 horas; 13% após 24 horas; 15% após 72 horas e 21% após uma semana pós-lesão ($p < 0,0001$). Da mesma forma, os animais tratados com Tempol apresentaram uma diminuição do número de células TUNEL positivas, indicando uma redução dos eventos apoptóticos. Para a realização da qRT-PCR, a intumescência lombar foi dissecada 12 e 24 após lesão. Os resultados mostraram um aumento na expressão gênica de 13, 3 e 28 vezes para *bax*, *caspase3* e *bcl2*, respectivamente, após 12 horas da axotomia e tratamento com Tempol. Após 24 horas houve redução na expressão dos genes estudados, porém, esta não foi estatisticamente significativa. Como um todo, os presentes resultados mostraram que o tratamento com Tempol é neuroprotetor, levando à maior sobrevivência de motoneurônios após a lesão de nervo periférico, minimizando a ocorrência de eventos apoptóticos.

Sumário

Dedicatória.....	xv
Agradecimentos.....	xvi
Lista de figuras.....	xix
Lista de tabelas.....	xxiii
Lista de abreviaturas.....	xvi
1. Introdução.....	1
1.1. Neurônios Motores.....	1
1.2. Radicais livres e Estresse oxidativo.....	4
1.3. Morte celular e Apoptose.....	7
1.3.1. Via extrínseca da apoptose.....	9
1.3.2. Via intrínseca da apoptose.....	10
1.4. Tempol.....	13
2. Justificativa.....	19
3. Objetivos.....	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. Metodologia.....	23
4.1. Animais e grupos experimentais.....	23
4.2. Procedimento cirúrgico para transecção do nervo isquiático.....	24
4.3. Preparação e inoculação do Tempol.....	25
4.4. Sacrifício dos animais e obtenção dos espécimes.....	25

4.5. Microscopia de luz para avaliação da sobrevivência neuronal.....	27
4.6. Reação de TUNEL para detecção de células apoptóticas.....	28
4.6.1. Análise qualitativa e quantitativa das células apoptóticas evidenciadas pela reação de TUNEL.....	29
4.7. qRT-PCR.....	30
4.8. Análise estatística.....	31
5. Resultados.....	33
5.1. Efeito do tratamento com Tempol na sobrevivência dos motoneurônios medulares.....	33
5.2. Reação de TUNEL para detecção de células apoptóticas.....	36
5.3. Efeito do tratamento com Tempol na expressão de transcritos gênicos pró-apoptóticos (<i>bax</i> e <i>caspase 3</i>) e anti-apoptótico (<i>bcl2</i>).....	44
6. Discussão.....	49
7. Conclusões.....	59
8. Bibliografia.....	61
9. Anexos.....	79

“Aos meus pais, minha irmã e meus amigos por sempre me apoiarem e acreditarem na
minha capacidade”.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por sempre guiar meus passos para o caminho certo, me dá forças nos momentos de dificuldades e por colocar em meu caminho pessoas do bem.

Aos meus pais José Mario e Eva por fazerem o possível e o impossível para que eu pudesse estar aqui hoje, por me apoiarem e me incentivarem sempre e pelo amor incondicional.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira pela oportunidade, por todo conhecimento adquirido, pela paciência e confiança. Muito mais que um orientador, obrigada por ser esse ser humano maravilhoso. Meu muito obrigado por toda ajuda que o senhor me deu nos meus momentos de dificuldades durante o desenvolvimento do projeto.

Aos meus queridos professores: Dra. Fernanda Mendonça, Dra. Glaucia M. dos Santos, Dr. Armino Alves e Lia Mara Neves por todo ensinamento durante a graduação, pela confiança, amizade, por me ensinarem o amor pela pesquisa e acreditarem na minha capacidade.

À minha irmã Marcela, minhas amigas Ana Laura, Marcella, Mayara, Joyce e Juliana e meus familiares que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso.

Em especial aos amigos Matheus Perez, Luciana e Giuliano pela amizade dentro e fora do laboratório, por estarem ao meu lado nos momentos mais tensos, pelas risadas, conselhos e amizade verdadeira.

Ao meu namorado Ricardo pela paciência durante esses anos, ao carinho, amizade e companheirismo.

Ao pós doutorando e amigo André Luis Bombeiro por todo ensinamento e colaboração para realização do qRT-PCR.

Aos meus amigos de laboratório: Luisa, Gabriela, Mateus Vidgal, Aline, Nathália, Kyl, Roberta, Camila, Gustavo, Rodrigo, Juliana, Sérgio, Bárbara, André, Suzana, Mariana, Sheila e Gleidy pela amizade, companheirismo e paciência.

Aos professores Prof. Dr. Fábio Rogério, Prof. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan, Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas e Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud pelo aceite do convite para participarem da minha banca.

A Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de desenvolver minha pesquisa.

Ao CNPq pela bolsa concedida no início do mestrado.

A FAPESP pela bolsa concedida durante o mestrado e auxílio financeiro para realização do projeto bem como aos recursos utilizados para apresentação deste trabalho em congresso.

À CAPES/PROAP pelo auxílio financeiro.

À todos os professores e funcionários do departamento de Biologia Celular e Estrutural e a Liliam secretária do programa pela amizade, paciência e conhecimentos adquiridos

Lista de Figuras

Figura 1: Cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria ilustrando a formação de espécies reativas de oxigênio (LEHNINGER, 2007).

Figura 2: Via extrínseca da apoptose ativada por meio de receptores de morte FAS (ALBERTS, 2008).

Figura 3: Via intrínseca da apoptose. Desenho esquemático de como o citocromo c liberado da mitocôndria ativa o Apaf 1 (ALBERTS, 2008).

Figura 4: Procedimento cirúrgico para transecção do nervo isquiático. **A.** Incisão na pele da região pósteromedial da coxa esquerda, evidenciando o nervo isquiático. **B.** Nervo isquiático após transecção, previamente à remoção de um segmento de 2 milímetros do coto distal

Figura 5: Representação esquemática da seleção dos cortes da intumescência lombar para a contagem dos motoneurônios através da coloração de Nissl. Os cortes utilizados estão destacados pelo círculo vermelho.

Figura 6: Cortes histológicos da região lombar da medula, ao nível do núcleo motor lateral do corno ventral, corados com a técnica de Nissl.

Figura 7: **A.** Sobrevivência de motoneurônios da medula espinal de ratos neonatos após transecção do nervo isquiático e tratamento com Tempol 8, 12, 24, 72 horas e 7 dias após lesão. **B.** Representação esquemática da medula espinal, indicando a região onde os motoneurônios foram analisados. (lâmina IX).

Figura 8: Sobrevivência dos motoneurônios medulares após transecção do nervo isquiático comparando-se os tempos de sobrevivência estudados: 8h, 12h, 24h, 72h e 7 dias

após transecção do nervo isquiático. **A.** grupo veículo. **B.** grupo Tempol. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Figura 9: Exemplos representativos de células TUNEL positivas nas regiões ventral (**A, B e C**), média (**D, E e F**) e dorsal (**G, H e I**) da medula espinal, 8 horas após axotomia do nervo isquiático em ratos neonatos e tratamento com Tempol. Grupo veículo (**A, D e G**), Grupo Tempol (**B, E e H**) e Contralateral (**C, F e I**). Escala = 50 μm .

Figura 10: Exemplos representativos de células TUNEL positivas nas regiões ventral (**A, B e C**), média (**D, E e F**) e dorsal (**G, H e I**) da medula espinal, 12 horas após axotomia do nervo isquiático em ratos neonatos e tratamento com Tempol. Grupo veículo (**A, D e G**), Grupo Tempol (**B, E e H**) e Contralateral (**C, F e I**). Escala = 50 μm .

Figura 11: Exemplos representativos de células TUNEL positivas nas regiões ventral (**A, B e C**), média (**D, E e F**) e dorsal (**G, H e I**) da medula espinal, 24 horas após axotomia do nervo isquiático em ratos neonatos e tratamento com Tempol. Grupo veículo (**A, D e G**), Grupo Tempol (**B, E e H**) e Contralateral (**C, F e I**). Escala = 50 μm .

Figura 12: Exemplos representativos de células TUNEL positivas nas regiões ventral (**A, B e C**), média (**D, E e F**) e dorsal (**G, H e I**) da medula espinal, 72 horas após axotomia do nervo isquiático em ratos neonatos e tratamento com Tempol. Grupo veículo (**A, D e G**), Grupo Tempol (**B, E e H**) e Contralateral (**C, F e I**). Escala = 50 μm .

Figura 13: Exemplos representativos de células TUNEL positivas nas regiões ventral (**A, B e C**), média (**D, E e F**) e dorsal (**G, H e I**) da medula espinal, 7 dias após axotomia do nervo isquiático em ratos neonatos e tratamento com Tempol. Grupo veículo (**A, D e G**), Grupo Tempol (**B, E e H**) e Contralateral (**C, F e I**). Escala = 50 μm .

Figura 14: Quantificação de núcleos apoptóticos nas regiões: **A.** ventral, **B.** média e **C.** dorsal da medula espinal 8, 12, 24, 72 horas e 7 dias após axotomia e tratamento com Tempol.

Figura 15: Visão panorâmica da distribuição dos núcleos apoptóticos na medula lombar após a transecção do nervo isquiático. **A:** grupo veículo e **B:** grupo tratado com Tempol. D: dorsal e V: ventral. Escala 200 μ m.

Figura 16: TUNEL combinado com imunomarcção anti-NeuN, evidenciando um neurônio TUNEL positivo. Núcleos corados com DAPI. **A:** TUNEL; **B:** NeuN; **C:** DAPI e **D:** sobreposição. Barra de escala = 20 μ m.

Figura 17: Expressão relativa dos genes pró-apoptóticos *bax* (**A**) e *caspase 3* (**B**) e anti-apoptótico *bcl2* (**C**), 12 horas após a axotomia periférica e tratamento com Tempol. *** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$; de acordo com a ANOVA de uma via seguida do pós teste *Bonferroni*.

Figura 8 Expressão relativa dos genes pró-apoptóticos *bax* (**A**) e *caspase 3* (**B**) e anti-apoptótico *bcl2* (**C**), 24 horas após a axotomia periférica e tratamento com Tempol.

Figura 19: Expressão relativa de *bax* nos grupos veículo e Tempol 12 e 24 horas após axotomia. (**A**): grupo veículo; (**B**): grupo Tempol. *** $p < 0,0001$.

Figura 20: Expressão relativa de *caspase 3* nos grupos veículo e Tempol 12 e 24 horas após axotomia. (**A**): grupo veículo; (**B**): grupo Tempol. * $p < 0,05$.

Figura 21: Expressão relativa de *bcl2* nos grupos veículo e Tempol 12 e 24 horas após axotomia. **(A):** grupo veículo; **(B):** grupo Tempol. * $p < 0,05$.

Figura 22: Relação *bcl2/bax* nos grupos controle, veículo e Tempol após 12 **(A)** e 24 horas **(B)** axotomia do nervo isquiático.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais para realização das técnicas de TUNEL e Microscopia de Luz.

Tabela 2: Divisão dos grupos experimentais para realização da qRT-PCR.

Tabela 3: Sequência dos primers utilizados para qRT-PCR.

Lista de Abreviaturas

ADP: adenosina difosfato

AMP: atrofia muscular progressiva

Apaf 1: fator 1 de ativação de protease apoptótica

ATP: adenosina trifosfato

Ca²⁺: cálcio

CAT: catalase

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CNTF: fator neurotrófico ciliar

CTE: cadeia transportadora de elétrons

DNA: ácido desoxirribonucléico

DRG: gânglio da raiz dorsal

ELA: esclerose lateral amiotrófica

ELP: esclerose lateral primária

EPO: eritropoetina

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GPx: glutathione peroxidase

GSH: glutathione

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HENE: 4-hidroxi-2-trans-nonenal

IL-3: interleucina 3

MDA: dialdeidomalônico

MPTP: 1-methyl-4-phenylpyridinium

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

NADPH: forma reduzida da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

O_2^- : ânion superóxido

PA: pressão arterial

PARP-1: poly (ADP-ribose) polymerase 1

PBP: paralisia bulbar progressiva

Prx: piroxirredoxina

qRT-PCR : quantitative real time polymerase chain reaction

RNS: espécies reativas do nitrogênio

ROS: espécies reativas do oxigênio

rTNF: receptor de fator de necrose tumoral

SNC: sistema nervoso central

SNS: sistema nervoso simpático

SOD: superóxido dismutase

TPM: transição da permeabilidade mitocondrial

$TPNO^+$: cátion oxamônio

Trx : tioredoxina

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labeling

$\Delta\Psi$: potencial de membrana mitocondrial interna

1. Introdução

1.1: Neurônios Motores

Os neurônios são as células especializadas na condução do impulso nervoso e constituem a unidade fundamental do sistema nervoso (SN). Essas células são altamente excitáveis, comunicam-se entre si e com outras células efetadoras através de atividade elétrica que provoca modificações no seu potencial de membrana (MACHADO, 1998). Um neurônio típico é constituído de um corpo (soma), dendritos e um axônio. O corpo celular do neurônio é considerado o centro metabólico sendo responsável pela síntese de praticamente todas as proteínas neuronais, bem como pela degradação e renovação dos constituintes celulares, incluindo os de membrana. Os dendritos, por sua vez, são especializados em receber e gerar estímulos, sendo geralmente curtos e ramificados (MACHADO, 1998). O axônio tem origem no corpo do neurônio em uma região denominada cone de implantação. Possui comprimento variável, podendo ter, no homem, de poucos milímetros a mais de um metro, como é caso dos axônios dos neurônios que formam o nervo isquiático. O axônio conduz o potencial de ação gerado no corpo celular, sendo que velocidade de condução varia de acordo com o diâmetro e o grau de mielinização da fibra (MACHADO, 1998; KANDEL *et al.*, 2000).

Os neurônios motores medulares são considerados alvos de injúria oxidativa devido ao seu alto metabolismo aeróbico, grandes quantidades de substratos oxidáveis, como ácidos graxos poliinsaturados e catecolaminas, e capacidade antioxidante

relativamente reduzida, como demonstrado pelas baixas concentrações de GSH (glutathiona) e GPx (glutathiona peroxidase) (SAGARA *et al.*, 1993; DAMIER *et al.*, 1993). Além disso, o tecido nervoso como um todo, quando exposto a condições de alta demanda energética como em caso de injúrias teciduais, pode aumentar consideravelmente a produção mitocondrial de superóxido e outras espécies reativas do oxigênio (ROS) devido à disfunção na cadeia de transporte de elétrons (CTE) (ANDERSEN, 2004; PATENAUDE *et al.*, 2005).

Em animais neonatos, os neurônios motores medulares, bem como os neurônios sensitivos primários, presentes nos gânglios dorsais, são grandemente susceptíveis à degeneração após sofrerem axotomia. Em ratos, a transecção do nervo isquiático no dia do nascimento, leva à morte de 53% a 89% dos neurônios sensitivos axotomizados (SCHMALBRUCH, 1987; SCHMALBRUCH, 1988). Além disso, há fortes indícios que a perda dos motoneurônios e neurônios sensitivos axotomizados induz a apoptose de interneurônios medulares, indicando que esta lesão promove efeitos mais amplos do que o atualmente conhecido (OLIVEIRA *et al.*, 1997). A morte neuronal induzida pela lesão axonal em ratos neonatos tem sido extensivamente investigada, e comparada à morte celular programada que ocorre durante o desenvolvimento (LOWRIE e VBROVÁ, 1992).

A lesão de neurônios em animais jovens ou recém nascidos produz morte celular maior do que a produzida por lesão retrógrada em animais adultos (ALDSKOGIUS e RISLING, 1981; BREGMAN e GOLDBERGER, 1983; YIP *et al.*, 1984; SCHMALBRUCH, 1987). Apesar da maior vulnerabilidade dos neurônios em indivíduos recém nascidos, a lesão do sistema nervoso imaturo é geralmente seguida por maior reorganização anatômica e

maior recuperação da função quando comparada ao adulto (KENNARD, 1942; GOLDMAN, 1974; BREGMAN e GOLDBERGER, 1983; LEONARD e GOLDBERGER, 1987 A, B). Os gânglios das raízes dorsais da medula espinal fornecem um modelo acessível para estudar dois eventos distintos, a morte celular e a recuperação anatômica e bioquímica do sistema nervoso.

Há crescentes evidências na literatura de que mecanismos apoptóticos possam estar relacionados à morte neuronal observada após transecção do nervo isquiático em ratos recém nascidos (LAWSON e LOWRIE, 1998).

O neurônio motor caracteriza-se pela natureza colinérgica, distribuição na região anterior da medula espinal e sistema nervoso suprasegmentar, desempenhando papel de integração de impulsos de origem do sistema nervoso central e atividade muscular. Para realizar tal função, torna-se necessária uma estrutura metabólica aprimorada presente no corpo celular, cujas dimensões superam a dos demais neurônios medulares, apresentando axônio extenso com ramificações dendríticas proeminentes. O corpo celular dos motoneurônios apresenta alta atividade oxidativa mitocondrial, necessária para a produção de enzimas e outras proteínas responsáveis pela manutenção de sua integridade funcional, eliminando resíduos tóxicos da célula, estruturando o citoesqueleto para garantia de um transporte axonal adequado, garantindo a neuroproteção diante do estresse metabólico. O axônio apresenta-se mielinizado, possui grande diâmetro e condução rápida, transmitindo o potencial de ação originado no corpo celular até o órgão alvo. As doenças que afetam o neurônio motor caracterizam-se por causarem degeneração neuronal, isto é, dano na estrutura funcional celular, seja por alterações do

DNA ou por estresse funcional, ou necrose secundária à agressão direta ao neurônio. Além disso, nota-se que as doenças diferem no acometimento anatômico, com seletividade por locais e organelas específicas, reforçando as várias origens etiológicas. A doença do neurônio motor é um termo que se aplica a síndromes clínicas com características próprias como a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), Atrofia Muscular Progressiva (AMP), Esclerose Lateral Primária (ELP) e Paralisia Bulbar Progressiva (PBP) (CHIEIA, 2005).

1.2: Radicais livres e Estresse Oxidativo

Os radicais livres são espécies químicas que contêm um ou mais elétrons não emparelhados, tornando-os altamente reativos. Aqueles derivados de moléculas de oxigênio são chamados espécies reativas do oxigênio (ROS), e aqueles derivados a partir do óxido nítrico, de espécies reativas do nitrogênio (RNS). ROS são gerados por uma série de reações promovidas pela xantina-oxidase, enzimas microsomais, ciclooxigenases e lipoxigenases (CAI e HARRISON, 2000).

A principal fonte de ROS nas células aeróbias, no entanto, é a respiração celular e fosforilação oxidativa dentro da mitocôndria. Durante o processo de transferência de elétrons entre os complexos de proteínas que medeiam a fosforilação do ADP em ATP e a redução de oxigênio para a água, na CTE, há geração de radicais livres. Elétrons que escapam da CTE, principalmente através dos complexos mitocondriais I e III, são transferidos diretamente para o oxigênio para criar O_2^- (TURRENS e BOVERIS, 1980; BOVERIS, CADENAS e SATOPPANI, 1976; CADENAS *et al.*, 1977). Devido à alta demanda de

ATP e aumento da fosforilação oxidativa para atender a essa necessidade, os neurônios são particularmente propensos a gerar maiores concentrações de ROS.

Evidências sugerem que os radicais livres e o estresse oxidativo podem estar envolvidos na patogênese dos danos neurológicos de várias doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica. Como medida de parâmetros de estresse oxidativo, existe um considerável número de casos onde se relatou aumento nos níveis de compostos resultantes da peroxidação lipídica como o MDA (dialdeídomalônico) e HENE (4-hidroxi-2-trans-nonenal) no SNC de pacientes, além de produtos da oxidação protéica, como grupos carbonil e 3-nitrotirosina, e também produtos que resultam da oxidação do DNA, bem como concentrações reduzidas dos antioxidantes GSH e ácido ascórbico e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes CAT (catalase) e GPx (JENNER e OLANOW, 1996; LIU *et al.*, 1999; PERRY *et al.*, 2003).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular. Quando ocorre adaptação, as células podem tolerar estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta na ativação da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Apesar disso, nem sempre o estresse oxidativo precisa envolver defesas antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Entretanto, cabe ressaltar que os radicais livres são produtos do metabolismo celular normal e, quando em concentrações baixas ou moderadas, podem desempenhar funções benéficas como a defesa contra agentes infecciosos, a atuação em sistemas de sinalização celular como mensageiros secundários e indução de resposta mitogênica (VALKO *et al.*, 2007).

No processo de transporte de elétrons (**Figura 1**) que ocorre na membrana mitocondrial interna, a oxidação e redução do oxigênio molecular (O_2) à água gera intermediários metabólicos, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($OH^{\cdot}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que constituem as ROS responsáveis pela toxicidade atribuída ao O_2 . Uma vez que estas espécies possuem alta reatividade, podem causar dano aos tecidos ao reagir com biomoléculas (FRIDOVICH, 1998; GABBITA *et al.*, 2000). Fisiologicamente, a concentração de espécies reativas é regulada pela atividade de sistemas de defesa antioxidante. Estes envolvem a ação de compostos redox, que incluem a glutathiona (GSH), tioredoxina (Trx), o ácido ascórbico (vitamina C), o α - tocoferol (vitamina E) e flavonóides, além de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), que converte o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPx) e a peroxirredoxina (Prx), que convertem o H_2O_2 em água (FINKEL e HOLBROOK, 2000; NORDBERG e ARNÉR, 2001).

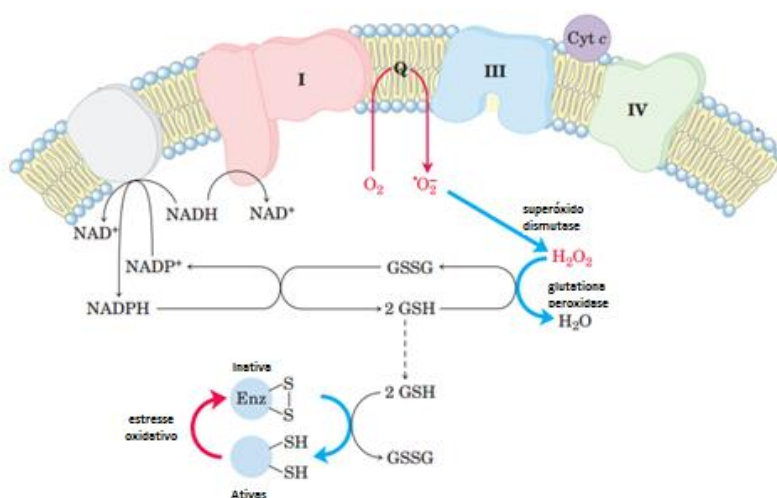


Figura 1: Cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria ilustrando a formação de espécies reativas de oxigênio. Modificado de LEHNINGER, 2007.

1.3: Morte Celular – Apoptose

A morte celular desempenha uma parte importante e crucial no desenvolvimento de vegetais e animais e, normalmente, continua na vida adulta (ALBERTS, 2008).

A morte celular pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose. Na morte celular por necrose, as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular.

Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando danos às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (ZIEGLER e GROSCURTH, 2004).

A morte celular programada em animais, em geral, mas não exclusivamente, ocorre por apoptose (ALBERTS, 2008).

A apoptose é um fenômeno complexo caracterizado por condensação cromatínica, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos, sendo que a morte e proliferação celular estão intimamente conectadas. Dessa maneira a célula morre de forma silenciosa e é rapidamente eliminada, sem causar uma resposta inflamatória prejudicial (ALBERTS, 2008).

No sistema nervoso de vertebrados em desenvolvimento, mais da metade de tipos distintos de células nervosas normalmente morrem assim que são formados. No desenvolvimento animal, a morte celular programada elimina células em excesso, geralmente por apoptose (ALBERTS, 2008).

A apoptose pode ser acelerada em certas doenças, como as doenças neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (HALLIWELL e

GUTTERIDGE, 2007). Este processo de morte celular possui um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual (WYLLIE, 1985) e participa de várias situações fisiológicas tais como o colapso endometrial durante a menstruação, a deleção de células nas criptas intestinais e na embriogênese. Assim, é um mecanismo rigidamente controlado por expressão gênica decorrente da interação célula e meio externo, levando à produção de várias moléculas com atividades específicas que resultam em alterações celulares funcionais expressas morfologicamente (ISRAELS e ISRAELS, 1999). Após o reconhecimento do processo apoptótico como um mecanismo celular fundamental, a biologia da apoptose continuou a ser investigada avaliando-se as alterações morfológicas e bioquímicas características (WYLLIE, 1985), a natureza das vias intracelulares (HALE *et al.*, 1996), a complexa biologia molecular de genes e elementos efetores (BAKER e REDDY, 1996; FRASER e EVAN, 1996), a sua relação no desenvolvimento embrionário (BRILL *et al.*, 1999), o seu papel na homeostase celular e o seu envolvimento na patogênese de várias doenças (THOMPSON, 1995), tais como doenças auto imunes, infecções parasitárias, doenças neurodegenerativas, lesões isquêmicas e câncer (MARTIN e GREEN, 1995; GREEN e MARTIN, 1995; LEE e BERNSTEIN, 1995; RAFFRAY e COHEN, 1997; JOHNSTONE, RUEFLI e LOWE, 2002; MAKIN, 2002; REED, 2003).

A maquinaria intracelular responsável pela apoptose é similar em todas as células animais. Ela depende de uma família de proteases que têm uma cisteína no seu sítio ativo e clivam suas proteínas-alvo em ácidos aspárticos específicos. Elas foram então chamadas de caspases. As caspases são sintetizadas na célula como precursores inativos, ou procaspases, os quais são tipicamente ativados por clivagem proteolítica. Uma vez

ativadas, as caspases clivam e então ativam outras procaspases, resultando em uma cascata proteolítica amplificada. Algumas das procaspases que operam na apoptose agem no início da cascata proteolítica e são chamadas de procaspases iniciadoras. Quando ativadas, elas clivam e ativam procaspases executoras, assim como proteínas alvo específicas na célula (ALBERTS, 2008).

As duas vias de sinalização melhor entendidas que podem ativar a cascata da caspase, levando a apoptose em células animais são chamadas de via extrínseca e via intrínseca. Cada uma usa sua própria procaspase iniciadora e seu complexo de ativação (ALBERTS, 2008).

1.3.1: Via extrínseca da apoptose

Proteínas de sinalização extracelular ligam-se a receptores de morte na superfície celular, disparando a via extrínseca da apoptose. Receptores de morte são proteínas transmembranas contendo um domínio extracelular de ligação, um domínio transmembrana único e um domínio de morte intracelular, o qual é requerido pelos receptores para ativar o programa apoptótico (ALBERTS, 2008).

A via extrínseca é desencadeada por ligantes específicos de grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (BUDIARDJO *et al.*, 1999). Tal fato resulta na trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos. Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/ MORT-1. Essas moléculas têm a

capacidade de recrutarem a caspase 8 que irá ativar a caspase 3, executando a morte por apoptose (**Figura 2**) (DANIEL *et al.*, 2001).

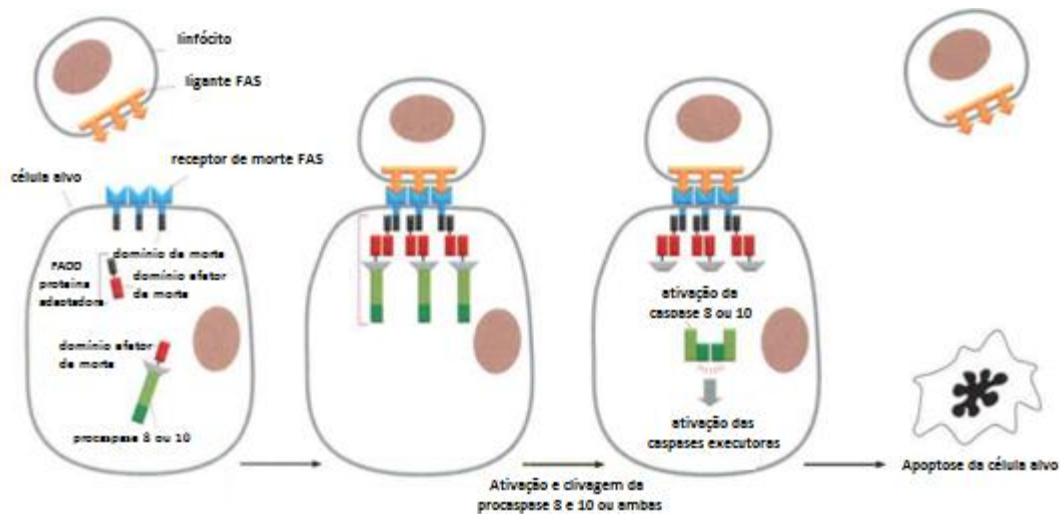


Figura 2: Via extrínseca da apoptose ativada por meio de receptores de morte FAS.

Modificado de ALBERTS, 2008.

1.3.2: Via intrínseca da apoptose

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes (HENGARTNER, 2000).

Em células de vertebrados, a ativação intracelular do programa de morte apoptótico ocorre por meio da via intrínseca, que depende da liberação, no citosol, de proteínas mitocondriais que normalmente residem no espaço intermembranas dessas organelas. Algumas das proteínas liberadas ativam a cascata proteolítica da caspase no citoplasma levando à apoptose (ALBERTS, 2008).

Uma proteína crucial liberada da mitocôndria na via intrínseca é o citocromo c, um componente da cadeia transportadora de elétrons. Quando liberado no citosol, liga-se à

proteína adaptadora de ativação da procaspase chamada Apaf 1 (fator 1 de ativação da protease apoptótica), provocando a oligomerização de Apaf 1 em um heptâmero em forma arredondada chamada apoptossomo. As proteínas Apaf 1 no apoptossomo recrutam então proteínas procaspases iniciadoras (procaspase 9), as quais são ativadas por proximidade ao apoptossomo. Moléculas caspases 9 ativadas ativam então procaspases executadoras para induzir apoptose (**Figura 3**) (ALBERTS, 2008).

Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$), bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Ao mesmo tempo, a água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (LOEFFLER e KREMER, 2000; GUPTA, 2003). Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a indução do $\Delta\psi$ e TPM levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção ROS (KROEMER e REED, 2000). O aumento nos níveis de ROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, aumentando o colapso do $\Delta\psi$ (GREEN e KROEMER, 2004). A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, sabe-se que as ROS induzem a ativação das caspases 3 e 9 (GOTTLIEB *et al.*, 2000; GOTTLIEB, 2001).

Dentre os principais indutores e bloqueadores da via intrínseca da apoptose, destacam-se os membros da família do gene Bcl 2. Proteínas Bcl 2 regulam a via intrínseca de apoptose principalmente pelo controle da liberação do citocromo c e de outras proteínas intermembranas mitocondriais no citosol (ALBERTS, 2008).

Os membros da família Bcl-2 como Bcl-2 e Bcl-X inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo *c* e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (HENGARTNER, 2000). A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER e THOMPSON, 1999). A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Após um estímulo indutor de morte celular, Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo sequestro de Bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial (MURPHY *et al.*, 2000). A Bax pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas anti-apoptóticas (PETROS *et al.*, 2004).

Vários estudos têm sido realizados para investigar o efeito de neuroprotetores sobre apoptose em tecidos lesionados com o objetivo de reduzir a morte neuronal. A investigação dessa nova classe de drogas iniciou-se a partir da melhor compreensão dos fenômenos bioquímicos envolvidos nas lesões do SNC. Observou-se que, a despeito da etiologia da lesão primária, dano subsequente afeta neurônios inicialmente não afetados pelo estímulo agressor. Qualquer que seja esse estímulo (trauma incluindo edema, inflamação, isquemia, etc.), alterações bioquímicas fazem sentir-se no meio ambiente metabólico dos neurônios vizinhos àqueles inicialmente agredidos, promovendo perda neuronal secundária, mesmo após a cessação da agressão primária (BOWERS *et al.*, 1997; ZIY *et al.*, 1997).

O emprego de drogas capazes de regularizar esse microambiente ou de aumentarem a resistência neuronal ao mesmo (“neuroprotetores”) vem sendo estudado no tratamento de moléstias que afetam o SNC, destacando-se a doença de Parkinson (BOWERS *et al.*, 1997; ZIY *et al.*, 1997), acidentes vasculares cerebrais (ONGINI *et al.*, 1997; TSUCHIDA *et al.*, 1997) e doenças degenerativas (BEHL *et al.*, 1997; HEIDRICH *et al.*, 1997), dentre outras.

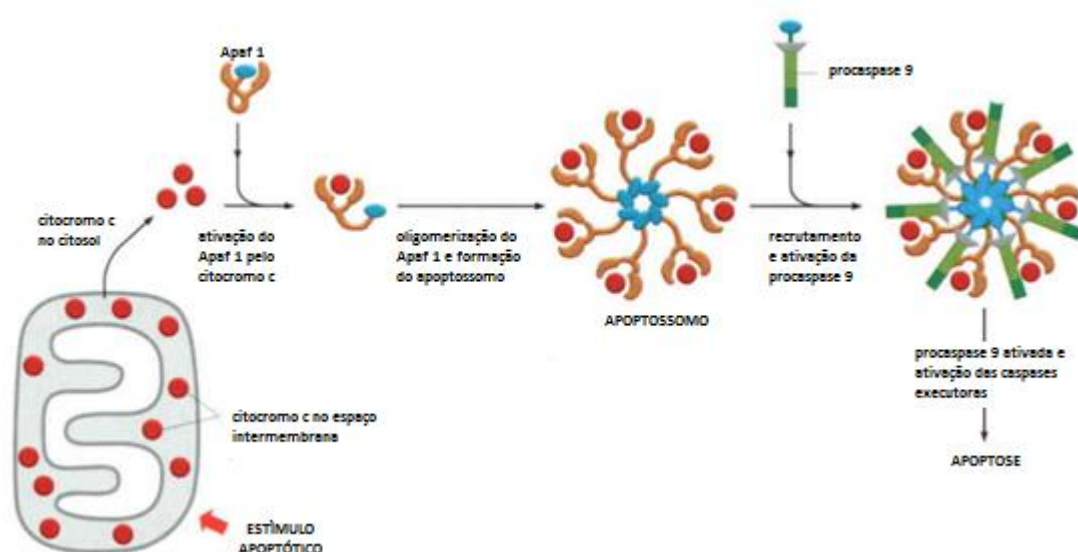
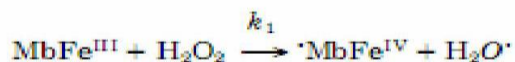


Figura 3: Via intrínseca da apoptose. Desenho esquemático de como o citocromo c liberado da mitocôndria ativa o Apaf 1. Modificado de ALBERTS, 2008.

1.4: Tempol

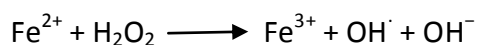
Entre as drogas neuroprotetoras estudadas, destaca-se o Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1-oxil) considerado um nitróxido, ou seja, um radical livre que pode passar por uma ou duas reações de redução (ganho de elétrons) se transformando em cátions e fornecendo, portanto, ações metabólicas redox (WILCOX e

PEARLMAN, 2008). O Tempol é caracterizado como uma molécula de baixo peso, estável, metal-independente, com excelente permeabilidade celular, e ativa tanto *in vivo* quanto *in vitro* (SCHNACKENBERG, 2002; BELTOWSKI *et al.*, 2005; ASABA *et al.*, 2007). Tempol reage com superóxido cataliticamente, sendo considerado, portanto, um mimético da SOD. Outra característica do Tempol é que, *in vitro*, este aumenta a atividade catalase-mimética da metamioglobina (MbFe^{III}), facilitando, portanto, a dismutação do peróxido de hidrogênio.



Dessa maneira, o Tempol é um SOD mimético que não apenas reduz os efeitos diretos do superóxido, mas também dirige o superóxido à reação de Fenton. O Tempol facilita o metabolismo de H₂O₂ pela atuação semelhante à da catalase, mas não é um mimético da catalase *per se* (SCHNACKENBERG, 2002; WILCOX e PEARLMAN, 2008). Além disso, pode-se afirmar que o Tempol limita a formação de radicais hidroxil tóxicos produzidos pela reação de Fenton, uma vez que atua pela oxidação de metais reduzidos de transição como ferro, cobre cádmio ou cromo. Portanto, diminui a viabilidade de espécies reduzidas da reação de Fenton (WILCOX e PEARLMAN, 2008), protegendo células e tecidos de danos provenientes de ROS.

Reação de Fenton:



Além disso, os nitróxidos são antioxidantes multifuncionais capazes de reagir com diversos oxidantes biológicos e redutores celulares e serem reciclados a nitróxidos através do cátion oxamônio (TPNO⁺) e derivados hidroxilamina (TPNOH) (BORISENKO *et al.*, 2004).

Assim como outros antioxidantes, é um radical captador de membrana permeável e atravessa facilmente a barreira hematoencefálica (LIANG *et al.*, 2005).

Estudos mostram que o Tempol normaliza a pressão arterial em vários modelos animais de hipertensão como ratos espontaneamente hipertensos (SCHNACKENBERG e WILCOX, 1999), ratos Dahl-sensíveis a sal (ZICHA *et al.*, 2001), hipertensão arterial induzida por angiotensina II (NISHIYAMA *et al.*, 2001), por acetato de deoxicorticosterona e dieta com sal (BESWICK *et al.*, 2001), pela endotelina (SEDEEK *et al.*, 2003), pela dexametasona (ZHANG *et al.*, 2004) e dieta com alta frutose (ONUMA e NAKANISHI, 2004).

Lipman *et al.*, (2006) demonstraram a neuroproteção do Tempol no fator de crescimento neural em células diferenciadas PC12 contra a MPTP+ (1-methyl-4-phenylpyridinium), uma toxina usada farmacologicamente para induzir a doença de Parkinson. Este achado confirma os estudos anteriormente observados *in vivo* sobre os efeitos neuroprotetores do Tempol. Entretanto, outros estudos clínicos são necessários para estabelecer se o Tempol e/ou seus derivados se constituem em potenciais fármacos anti-parkinsonianos.

Na década de 1990, Schnackenberg, Welch e Wilcox relataram que a administração de Tempol por via intravenosa, intraperitoneal ou via oral em modelos de ratos hipertensos levou a uma redução da pressão arterial (PA) e peroxidação lipídica (SCHNACKENBERG *et al.*, 1998; SCHNACKENBERG e WILCOX, 1999). Relataram que a resposta anti-hipertensiva aguda ao nitróxido foi relacionada com sua atividade de superóxido dismutase (SOD) mimético *in vitro* (PATEL *et al.*, 2006), potencializando os

efeitos dependentes da óxido nítrico sintase (NOS) e na inibição do sistema nervoso simpático (SNS), através de ações que incluem ativação de canais de potássio dependentes de ATP (CHEN, 2007). Por outro lado, a resposta de longo prazo para o Tempol implicaria na correção da sensibilidade ao sal (WELCH *et al.*, 2005b), hipoxia renal (WELCH e WILCOX, 2001; WELCH *et al.*, 2003, 2005a), e vasoconstrição renal (KAWADA *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2003, 2004, 2006). Mostraram ainda que a microperfusão local de Tempol no interstício do rim, no modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), modelo de estresse oxidativo, restaurou a sinalização de NO entre a mácula densa e a arteríola aferente (WELCH e WILCOX, 2001) e que a infusão sistêmica de Tempol melhorou a eficácia do rim em usar oxigênio para transportar sódio tubular e, consequentemente, aumentou a pO₂ cortical renal (WELCH *et al.*, 2005a). FINK *et al.*, 2004 demonstraram, pela primeira vez, os efeitos do Tempol independentes do NO para reduzir a atividade do SNS e associaram essa resposta anti-hipertensiva (XU *et al.*, 2004) à ativação de grande condutância de Ca²⁺ e canais de potássio (XU *et al.*, 2005, 2006). Esses estudos lançaram as bases para um significativo interesse científico em nitróxidos como agentes capazes de reduzir ROS.

PEIXOTO *et al.*, 2009 e 2012, estudaram o efeito renoprotetor do Tempol na nefropatia diabética experimental e observaram que o antioxidante Tempol restaurou o estado redox, reduziu o acúmulo de matriz extracelular, restaurou a expressão de nefrina, preveniu apoptose de podócitos induzida parcialmente por PARP-1 e melhorou a albuminúria, sem alterar a glicose sanguínea e a pressão arterial.

VAZ E AUGUSTO, 2008 examinaram os efeitos do Tempol na nitração em ribonuclease mediada pela mieloperoxidase, uma enzima que desempenha um papel central em diversos processos inflamatórios. Os resultados indicaram que o Tempol inibiu a nitração de RNAses mediada pela peroxidase, principalmente devido à sua reação com o dióxido de nitrogênio para produzir o cátion oxamônio que, por sua vez, é reciclado de volta a Tempol reagindo com peróxido de hidrogênio e radical superóxido para produzir oxigênio e regenerar nitrito.

TISUHAKE *et al.*, 2010 estudaram os efeitos do Tempol em modelos de ratos com esclerose múltipla induzida pelo vírus da hepatite (MHV-59) e os resultados indicaram que o antioxidante Tempol melhorou a encefalomielite viral por alterar o estado redox do ambiente infectado, o que contribuiu para atenuação da resposta inflamatória do SNC.

LINARES, *et al.*, 2013 avaliaram os efeitos do Tempol em um modelo animal de esclerose lateral amiotrófica em ratos hSOD1 G93A e mostraram que a administração intraperitoneal do nitróxido cíclico Tempol (26 mg/kg três vezes por semana) antes do início da doença (7 semanas) em ratas, moderadamente estendeu a sobrevivência dos animais por 17 dias e protegeu as estruturas celulares e moleculares contra os danos oxidativos, desacelerando a progressão da doença. Esse resultado foi associado com o efeito protetor na medula espinal evidenciado pelo número de células neuronais mantidos e níveis de agentes redutores. O fato do tratamento com Tempol parcialmente conservar tecidos medulares contra processos oxidativos é consistente com a idéia de que o dano oxidativo contribui para o processo neurodegenerativo na ELA.

Esta visão geral sobre os efeitos e mecanismos do Tempol apóia o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para doenças neurodegenerativas com base em nitróxidos, como antioxidantes, para minimizar os danos teciduais causados por estresse oxidativo e, consequentemente, apoptose neuronal.

2. Justificativa

Nos últimos anos, a morte de motoneurônios submetidos à axotomia tem sido associada à produção de radicais livres, como o óxido nítrico (NO) e seus derivados (CLOWRY, 1993; WU e LI, 1993; WU *et al.*, 1995; NOVIKOV *et al.*, 1995 e 1997; ROSSITER, 1996; YU, 1997; MARIOTTI *et al.*, 1997; ESTÉVEZ *et al.*, 1998; YICK *et al.*, 1998). O emprego de drogas capazes de manter a homeostase do microambiente neuronal ou de aumentar a resistência neuronal após lesão pode contribuir de forma decisiva para o sucesso regenerativo e recuperação de funções afetadas (BEHL *et al.*, 1997; HEIDRICH *et al.*, 1997). Entretanto, poucos fármacos utilizados têm capacidades significativamente neuroprotetoras e eficiência a longo prazo. Por outro lado, o Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidine-1-oxil) é caracterizado como uma molécula de baixo peso molecular, estável, com grande permeabilidade celular *in vivo* e *in vitro* (BELTOWISKI *et al.*, 2005; ASABA *et al.*, 2007; SCHNACKERNBERG, 2002). Tem sido considerado um potente nitróxido reciclável capaz de reagir com radicais livres (BORISENKO *et al.*, 2004), podendo ser, portanto considerado um importante antioxidante. Desse modo, nosso trabalho teve por objetivo investigar os mecanismos envolvidos na morte de neurônios motores, empregando-se um modelo experimental já bastante estudado e conhecido, a axotomia periférica em animais neonatos. Assim, avaliamos o potencial neuroprotetor do Tempol utilizando-se desse modelo, que induz morte neuronal por apoptose (LOWRIE e LAWSON, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Acreditamos que o presente estudo traz novos

conhecimentos sobre os efeitos dessa droga e seus possíveis mecanismos de ação sobre a morte neuronal, com vistas em futuras intervenções terapêuticas em doenças e ou lesões que afetem o SNC.

3. Objetivos

3.1: Objetivo Geral

Estudar os mecanismos moleculares envolvidos na morte neuronal em ratos neonatos após axotomia periférica e possível modulação dos mesmos pelo tratamento com Tempol.

3.2: Objetivos Específicos:

- ✓ Avaliar o efeito neuroprotetor do tratamento com Tempol sobre a morte de motoneurônios medulares em ratos neonatos (P2) submetidos à secção do nervo isquiático, através da avaliação da sobrevivência neuronal 8, 12, 24, 72 horas e uma semana após a axotomia.
- ✓ Quantificar a ocorrência de fragmentação de DNA na intumescência lombar de ratos neonatos (P2) após axotomia do nervo isquiático e administração de Tempol, durante a primeira semana pós-lesão (8, 12, 24, 72 horas e 1 semana).
- ✓ Avaliar a expressão de genes pró-apoptóticos *bax* e *caspase3* e anti-apoptótico *bcl2* na intumescência lombar de ratos neonatos após axotomia do nervo isquiático em P2 e administração de Tempol durante a primeira semana pós-lesão, em diferentes tempos de sobrevida (12, 24 horas).

4. Metodologia

4.1: Animais e grupos experimentais:

Foram utilizados 80 ratos Wistar com dois dias de vida (P2), obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) e deixados com a mãe durante todo o período experimental. Os experimentos foram conduzidos seguindo-se as normas de ética na experimentação animal (parecer comitê de ética nº2506-1). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Regeneração Nervosa do Departamento de Anatomia (Instituto de Biologia), sob condições de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro) e temperatura (23°C) controladas. Os ratos neonatos foram divididos em grupos considerando-se a realização da axotomia periférica do nervo isquiático, administração de Tempol e tempo de sobrevivência após a lesão. Desta forma, foram constituídos os seguintes grupos experimentais: (1) animais submetidos à axotomia e tratados com Tempol; (2) animais submetidos à axotomia e tratados com o veículo de diluição do Tempol. O lado contralateral à lesão de cada animal foi utilizado como controle interno para análise dos resultados. O tratamento teve duração de até sete dias após a lesão. Os tempos de sobrevivência após a transecção do nervo isquiático e o número de animais avaliados estão indicados nas **Tabelas 1 e 2**, de acordo com as técnicas realizadas.

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais para realização das técnicas de TUNEL (n=4) e Microscopia de Luz (n=5).

Grupos	Sobrevida	Animais tratados com Tempol	Animais tratados com veículo
1	8 horas	5	5
2	12 horas	5	5
3	24 horas	5	5
4	72 horas	5	5
5	1 semana	5	5

Tabela 2: Divisão dos grupos experimentais para realização da qRT-PCR

Grupos	Sobrevida	Animais controle	Animais tratados com Tempol	Animais tratados com veículo
1	12 horas	5	5	5
2	24 horas	5	5	5

4.2: Procedimento cirúrgico para transecção do nervo isquiático (Figura 4)

Os animais foram anestesiados por hipotermia profunda e colocados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico. O nervo isquiático, no nível do terço médio da coxa esquerda, foi exposto e seccionado ao nível do músculo piriforme. A fim de impedir o contato entre os cotos proximal e distal, foi removido um segmento de aproximadamente 2 milímetros do coto distal, com o auxílio de uma microtesoura. A seguir, a musculatura foi reposicionada e a pele suturada com fio de nylon 8-0. Os animais foram colocados em local aquecido até despertarem da anestesia. Após a cirurgia, os animais foram mantidos com a mãe até o momento do sacrifício.

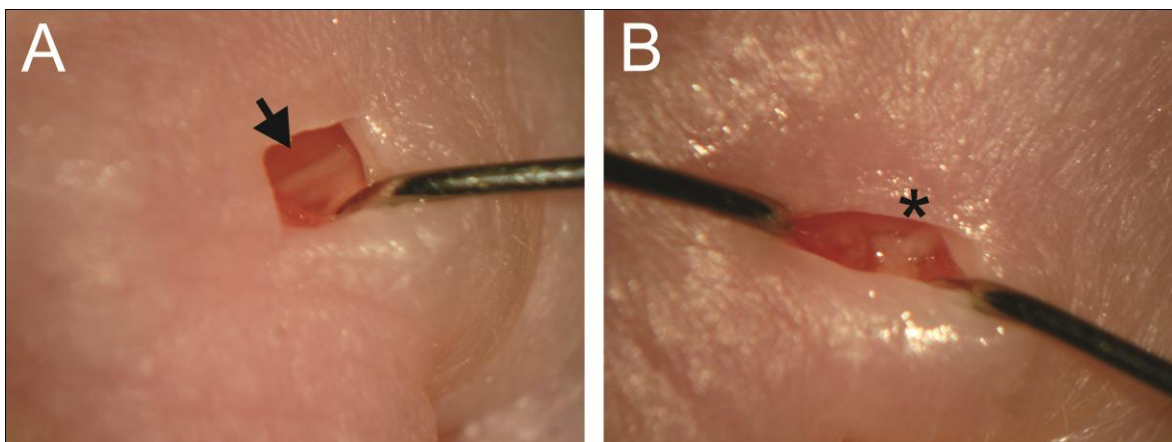


Figura 4: Procedimento cirúrgico para transecção do nervo isquiático. **A.** Incisão na pele da região póstero-medial da coxa esquerda, evidenciando o nervo isquiático (seta). **B.** Nervo isquiático após transecção, previamente à remoção de um segmento de 2 milímetros do coto distal (coto proximal *).

4.3: Preparação e inoculação do Tempol

O Tempol foi diluído em solução salina e, em seguida, aplicado por via intraperitoneal, na concentração de 24mg/kg de massa corpórea (TSUHAKO, 2009), 10 minutos após a lesão, 6 horas após a lesão e a cada 24 horas durante o período de uma semana. Os animais do grupo veículo receberam o mesmo veículo de diluição do Tempol. A concentração do Tempol foi definida com base na literatura. Já os períodos de aplicação foram determinados pensando-se no tempo de sobrevivência dos grupos experimentais. O peso dos animais foi monitorado dia a dia para o ajuste da dose.

4.4: Sacrifício dos animais e obtenção dos espécimes

Os animais dos grupos 24, 72 horas e 1 semana foram sacrificados sempre no período inverso ao do recebimento da dose, respeitando-se o horário da cirurgia. Após os períodos de sobrevivência de 8, 12, 24, 72 horas e 1 semana, os animais destinados a técnica

de TUNEL e microscopia de Luz foram sacrificados. Para tal, todos os animais foram anestesiados profundamente com Kensol (xilasina, 5mg/Kg) e Vetaset (cetamina, 100mg/Kg) e submetidos à toracotomia seguida de perfusão transcardíaca. Visando a lavagem total dos órgãos e vasos, primeiramente os animais foram perfundidos com uma solução salina tamponada e heparinizada (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio – PB 0,1M; pH 7,38) e, em seguida foram perfundidos com uma solução fixadora (formaldeído 10% em PB 0,1M; pH 7,38). Após a fixação, o conjunto contendo a intumescência lombar e raízes nervosas foram dissecadas e imersas na mesma solução fixadora por 12 horas e mantido a uma temperatura de 4°C. Passado esse período, as medulas foram lavadas com PB (0,1M) por 3 vezes de 5 minutos cada. Em seguida, foram criopreservadas em solução de sacarose (20% em PB 0,1M) por 12 horas. Passado o período em sacarose, os espécimes foram congelados em gelo seco, embebidos em Tissue-Tek, e armazenados em ultrafreezer (-80° C) até posterior utilização. Na ocasião da confecção dos cortes histológicos, os espécimes foram retirados do ultrafreezer, montados em um suporte de metal e levados a um criostato Microm (HM525).

Para obtenção dos espécimes para realização do qRT-PCR, os animais foram sacrificados nos tempos de sobrevida de 12 e 24 horas após a lesão do nervo isquiático. Os animais foram anestesiados da mesma forma como descrito anteriormente, porém, foram apenas perfundidos com a solução salina tamponada e heparinizada (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio – PB 0,1M; pH 7,38). Em seguida o conjunto contendo intumescência lombar e raízes nervosas foram dissecados e congelados em gelo seco e armazenados em ultrafreezer (-80°C) até posterior utilização.

4.5: Microscopia de Luz para avaliação da sobrevivência neuronal

Para contagem de motoneurônios, secções transversais de 12µm de espessura da intumescência lombar foram coradas com corante de Nissl por 3 minutos, desidratadas, diafanizadas e, em seguida, montadas com bálsamo e lamínula. Assim, neurônios presentes no núcleo lateral do corno anterior no lado ipsilateral (lesado) e contralateral (não lesado) foram contados em cortes alternados de cada espécime em aproximadamente 20 secções, na área lesada da intumescência lombar, sendo o intervalo entre eles de 48µm (**Figura 5**), e representada pela razão percentual entre o número de motoneurônios do lado ipsilateral e contralateral à lesão nos diferentes tempos de sobrevivência estudados (8, 12, 24, 72 horas e 7 dias após lesão). Apenas as células com núcleo e nucléolo visíveis foram contadas. Para corrigir contagens duplas de neurônios, devido ao fato da mesma célula poder estar presente em duas secções, foi utilizada a fórmula de Abercrombie (Abercrombie & Johnson, 1946):

$$N=nt/(t+d)$$

Onde N é o número corrigido de neurônios contados, n é o número de células contadas, t é a espessura das secções (48µm) e d é o diâmetro médio dos neurônios. Como a diferença no tamanho afeta significativamente o número de células, o valor de d foi calculado especificamente para cada grupo experimental (ipsilateral e contralateral). Neste sentido, o diâmetro dos neurônios para cada grupo foi mensurado (Image Tool software, versão 3.00) e a média calculada.

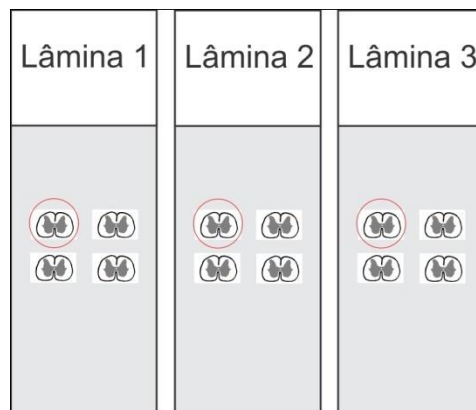


Figura 5: Representação esquemática da seleção dos cortes da intumescência lombar para a contagem dos motoneurônios através da coloração de Nissl. Os cortes utilizados estão destacados pelo círculo vermelho.

4.6: Reação do TUNEL para detecção de células apoptóticas

A detecção dos neurônios apoptóticos foi realizada através da técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP-nick-end-labeling). Para tal, foram obtidos cortes transversais (12µm de espessura) alternados de forma a ser avaliada uma secção a cada cinco obtidas. Quatro cortes foram colocados em cada lâmina de vidro, previamente gelatinizada, sendo estes secos ao ar por trinta minutos e, em seguida, acondicionados em caixas plásticas para armazenamento em freezer (-20°C). As secções foram retiradas do freezer aproximadamente vinte minutos previamente à utilização, para climatização. Em seguida, foram pós-fixadas em uma solução de etanol/ácido acético (2:1) por cinco minutos a -20°C e lavadas duas vezes por cinco minutos em PBS (0,01M). As lâminas foram então transferidas para uma câmara úmida contendo uma solução tampão de equilíbrio (Chemicon, s7110-1) e incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. A solução tampão foi retirada e os cortes foram incubados em uma solução de reação contendo enzima TdT (Chemicon, s7110-4) por 60 minutos a 37°C. Depois foram lavados

em PBS por 10 minutos e incubados em solução de fluorescência (Chemicon, s7110-5 e 6) por 30 minutos. Depois as lâminas foram lavadas e montadas com glicerol. As imagens foram capturadas e digitalizadas, utilizando-se um microscópio de fluorescência (Eclipse TS100, Nikon, Tóquio, Japão) equipado com câmera digital (DMX 1200F, Nikon, Tóquio, Japão).

4.6.1: Análise qualitativa e quantitativa das células apoptóticas evidenciadas pela reação de TUNEL

Para cada animal, lâminas alternadas foram utilizadas para o mapeamento e contagem das células TUNEL positivas. Assim, cada corte foi analisado sob microscópio óptico (Leica, DM 5500), num aumento final de 400 vezes, sendo que os núcleos contendo fragmentação de DNA foram identificados pela emissão de fluorescência no comprimento de onda da fluoresceína. Só foram considerados positivos os núcleos contendo fluorescência intensa, sendo estes utilizados para o mapeamento e contagem.

Com o auxílio de um esboço de uma secção transversal da medula espinal ao nível lombar, as células TUNEL positivas foram então registradas de acordo com sua localização *in situ*. Portanto, para cada animal, seis mapeamentos de secções representativas foram realizados, totalizando-se trinta cortes por grupo experimental e veículo. Esse procedimento foi realizado para o estudo do padrão temporal de morte neuronal por apoptose e para o estudo do efeito da administração de Tempol sobre a morte neuronal, após transecção do nervo isquiático em animais recém nascidos.

Em seguida à obtenção da localização topográfica das células, foi obtido seu número total em cada secção, levando-se em conta o lado ipsilateral e contralateral à

lesão realizada. Os valores obtidos nos seis cortes para cada animal (esquerdo e direito) foram então somados e assim empregados para o cálculo das médias em cada grupo.

4.7: qRT-PCR

Para a avaliação do efeito neuroprotetor do Tempol foi feita análise, por qRT-PCR, de tecido da intumescência lombar da medula espinal. As amostras foram utilizadas para análise dos seguintes genes pró e anti-apoptóticos: *bax* e *caspase-3* e *bcl-2* respectivamente. (β -actina foi usada como controle endógeno da reação). Todos os iniciadores foram desenhados utilizando-se *softwares* específicos. As sequências de cada gene foram obtidas no banco público de dados do NCBI e estão detalhadas na **Tabela 3**. A amplificação de DNA genômico foi evitada construindo-se um dos iniciadores no limite exon /intron, sempre que possível. Foi feita extração de RNA para determinação da expressão relativa destes genes em tecidos medulares. O RNA total foi extraído usando-se um *kit* comercial para extração (RNAspin-GE), conforme instruções do fabricante. A transcrição reversa do cDNA foi feita a partir de 2,0 μ g de RNA total. Após a síntese do cDNA, todo o procedimento para a PCR quantitativa foi realizado na plataforma de instrumentação MX3005P (GE). As reações de PCR foram realizadas com *kit* comercial SYBR *Green*, segundo as instruções do fabricante. As reações foram realizadas utilizando-se 45 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 60°C para anelamento e 1 minuto a 75°C para extensão, seguido de mais 10 minutos a 75°C para o término da reação. A expressão relativa foi avaliada com base no constitutivo (β -actina) e nos controles, a partir do Ct destes para cada gene testado.

Tabela 3: Sequência dos primers utilizados para qRT-PCR

Genes		Sequências
Bax	Forward primer	GCAGAGGATGATTGCTGACGTGGAC
	Reverse primer	GGCCCCAGTTGAAGTTGCCATCAG
caspase 3	Forward primer	TGGAGGCCGACTTCCTGTATGCT
	Reverse primer	TGGCGCAAAGTGACTGGATGAACC
bcl-2	Forward primer	TGACTGAGTACCTGAACCGGCATCT
	Reverse primer	GAGGTCGCATGCTGGGGCCATA

4.8: Análises estatísticas

Os resultados quantitativos foram analisados empregando-se os valores das médias e respectivos erros-padrão submetidos à análise de variância (ANOVA). Para a análise *post-hoc* das diferenças entre as médias dos diferentes grupos, foi utilizado o teste de *Bonferroni*, assumindo-se um nível de significância igual a 0,05.

5. Resultados

5.1: Efeito do tratamento com Tempol na Sobrevivência dos Motoneurônios medulares

O efeito do tratamento do Tempol em ratos neonatos após a lesão unilateral do nervo isquiático foi analisado através da coloração de Nissl, determinando-se a porcentagem de sobrevivência neuronal, sendo esta, representada pela razão percentual entre o número de motoneurônios do lado ipsilateral e contralateral à lesão nos diferentes tempos de sobrevida estudados (8, 12, 24, 72 horas e 7 dias após lesão). O lado contralateral de ambos os grupos analisados (veículo e Tempol) não apresentou diferenças estatísticas do número absoluto de motoneurônios. Dessa forma, foi possível avaliar a porcentagem de sobrevivência neuronal, em relação ao lado contralateral de ambos os grupos analisados, nos diferentes tempos de sobrevida. Após 8, 12, 24, 72 horas e uma semana da axotomia do nervo isquiático, os animais de ambos os grupos experimentais mostraram uma redução significativa do número de motoneurônios medulares presentes no núcleo motor lateral do corno ventral da medula espinal do lado ipsilateral a lesão. Porém, quando comparamos os dois grupos, observa-se que o grupo veículo, que recebeu somente o veículo de diluição do Tempol, apresentou um número estatisticamente menor de motoneurônios do lado ipsilateral à lesão, quando comparado ao grupo tratado que recebeu a dose de 24mg/kg de Tempol (**Figura 6**). Os resultados mostraram que o tratamento com Tempol aumentou a sobrevivência dos motoneurônios medulares após 8 horas da lesão do nervo isquiático e que este aumento foi observado

em todos os tempos de sobrevida analisados até uma semana após lesão, sendo este de 15% após 8 horas; 19% após 12 horas; 13% após 24 horas; 15% após 72 horas e 21% após uma semana a lesão (**p < 0.001). (**Figura 7**).

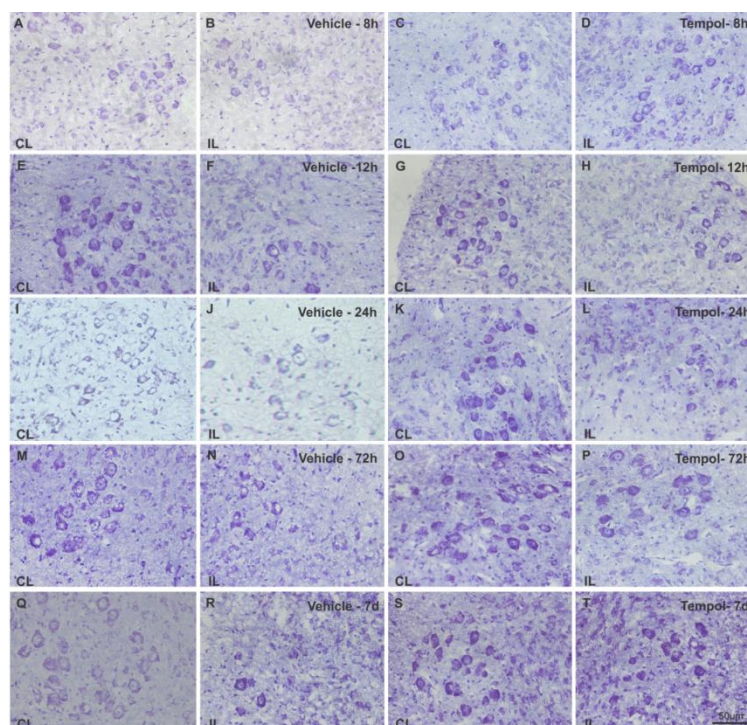


Figura 6: Cortes histológicos da região lombar da medula, ao nível do núcleo motor lateral do corno ventral, corados com a técnica de Nissl. A, B, C e D correspondem ao grupo 8 horas (A e B veículo; C e D Tempol), A e C correspondem ao lado contralateral e, B e D ao lado ipsilateral. E, F, G e H correspondem ao grupo 12 horas (E e F veículo; G e H Tempol), E e G correspondem ao lado contralateral e, F e H ao lado ipsilateral. I, J, K e L correspondem ao grupo 24 horas (I e J veículo; K e L Tempol), I e K correspondem ao lado contralateral e, J e L ao lado ipsilateral. M, N, O e P correspondem ao grupo 72 horas (M e N veículo; O e P Tempol), M e O correspondem ao lado contralateral e, N e P ao lado ipsilateral. Q, R, S e T correspondem ao grupo 7 dias (Q e R veículo e, S e T Tempol), Q e S correspondem ao lado contralateral e, R e T ao lado ipsilateral. Escala 50µm.

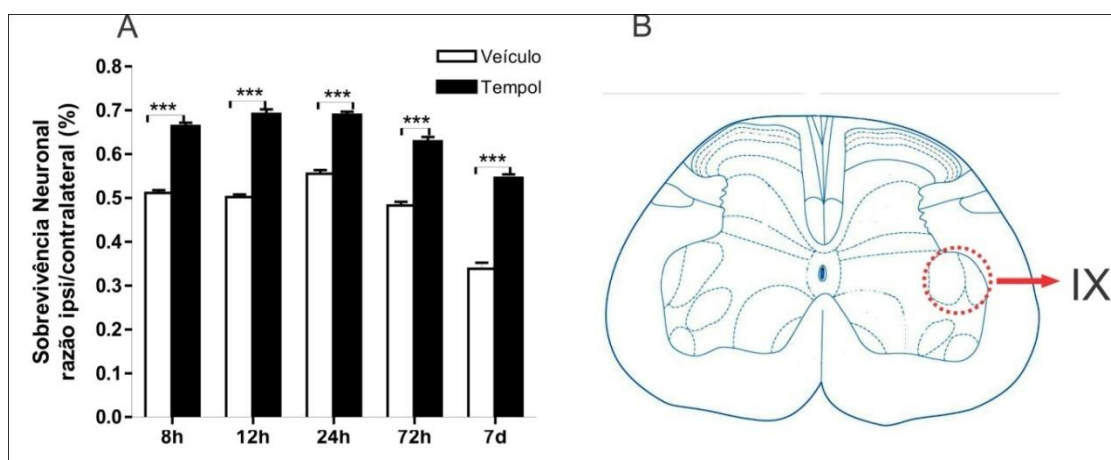


Figura 7: **A.** Sobrevivência de motoneurônios da medula espinal de ratos neonatos após transecção do nervo isquiático e tratamento com Tempol 8, 12, 24, 72 horas e 7 dias após lesão. Os resultados demonstraram um aumento na sobrevivência neuronal de 15% após 8 horas; 19% após 12 horas; 13% após 24 horas; 15% após 72 horas e 21% uma semana após a lesão (** $p < 0.001$). **B.** Representação esquemática da medula espinal, indicando a região onde os motoneurônios foram analisados. (lâmina IX).

Avaliação da sobrevivência neuronal entre os tempos de sobrevida estudada

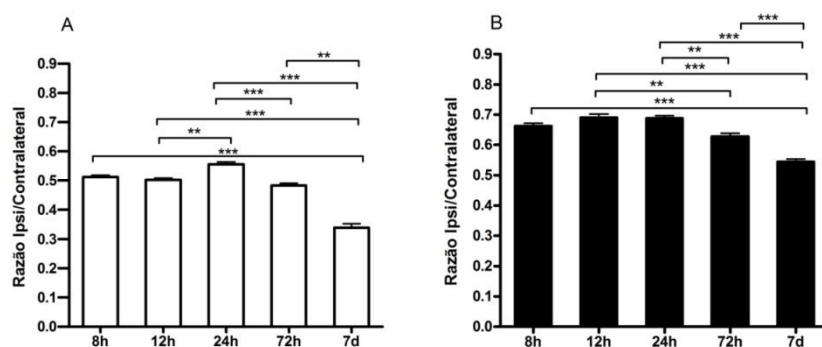


Figura 8: Sobrevivência dos motoneurônios medulares após transecção do nervo isquiático comparando-se os tempos de sobrevida estudados: 8h, 12h, 24h, 72h e 7 dias após transecção do nervo isquiático. **A.** grupo veículo. **B.** grupo Tempol. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

5.2: Reação de TUNEL para detecção de células apoptóticas

A fim de avaliar a ocorrência de eventos apoptóticos no período neonatal após a transecção do nervo isquiático, foi utilizada a técnica de TUNEL (teminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick end-labeling) que marca células em processo de apoptose. As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio de fluorescência (Eclipse TS100, Nikon, Tóquio, Japão), equipado com câmera digital (DMX 1200F, Nikon, Tóquio, Japão) e conectado a um sistema de aquisição de imagens (câmera Nikon e software Metamorph). Para análise da presença de células apoptóticas, foram capturadas seis imagens correspondentes, respectivamente, às regiões ventral, média e dorsal dos lados contralateral e ipsilateral à lesão na região lombar da medula espinal de cada um dos animais (n= 4/grupo). Dessa forma, foi analisada toda a substância cinzenta e não somente a região do grupo dos motoneurônios lesados do corno ventral, como mostrado na **Figura 9: 8 horas; Figura 10: 12 horas; Figura 11: 24 horas; Figura 12: 72 horas e Figura 13: 7 dias após lesão**. Esta análise é de grande importância, uma vez que, a transecção periférica na fase neonatal, leva à morte tanto de motoneurônios axotomizados quanto de interneurônios medulares. Através dessas imagens foi realizada a análise quantitativa das células TUNEL-positivas em ambos os grupos experimentais, nos diferentes tempos estudados. Comparando-se os grupos experimentais, observou-se que o grupo tratado com Tempol apresentou um menor número de células TUNEL-positivas, indicando que o tratamento promoveu diminuição dos eventos apoptóticos comparativamente ao grupo veículo. Os resultados mostraram uma diminuição estatisticamente significativa de núcleos apoptóticos na região ventral da medula, 8 horas após a axotomia e tratamento

com Tempol (**Figura 14: A**). Na região média da medula espinal, (**Figura 14: B**), essa diminuição foi estatisticamente significativa 12 horas e 24 horas após a axotomia e tratamento com Tempol. Em relação à região dorsal (**Figura 14: C**), a redução de células apoptóticas, foi estatisticamente significativa 8 horas após axotomia do nervo isquiático. (*p < 0.05).

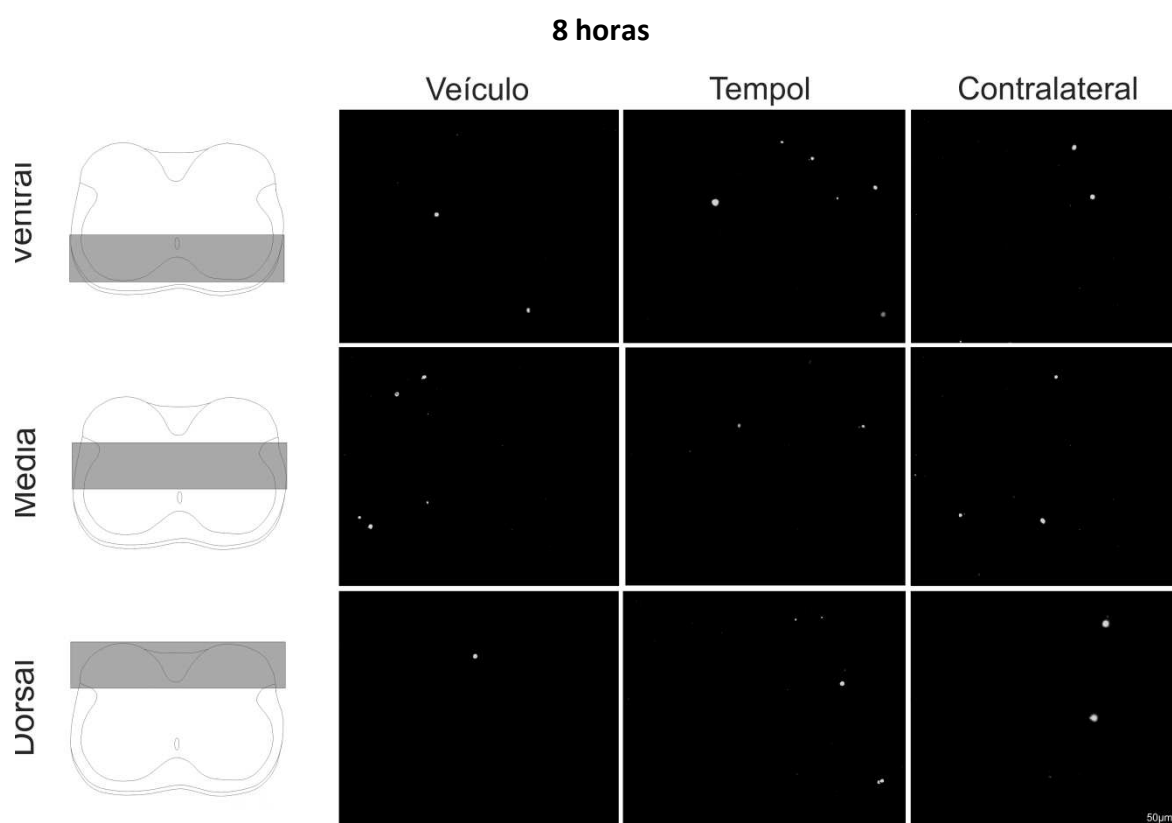


Figura 9: Exemplos representativos de células TUNEL positivas nas regiões ventral (**A, B e C**), média (**D, E e F**) e dorsal (**G, H e I**) da medula espinal, 8 horas após axotomia do nervo isquiático em ratos neonatos e tratamento com Tempol. Grupo veículo (**A, D e G**), Grupo Tempol (**B, E e H**) e Contralateral (**C, F e I**). Escala = 50 µm.

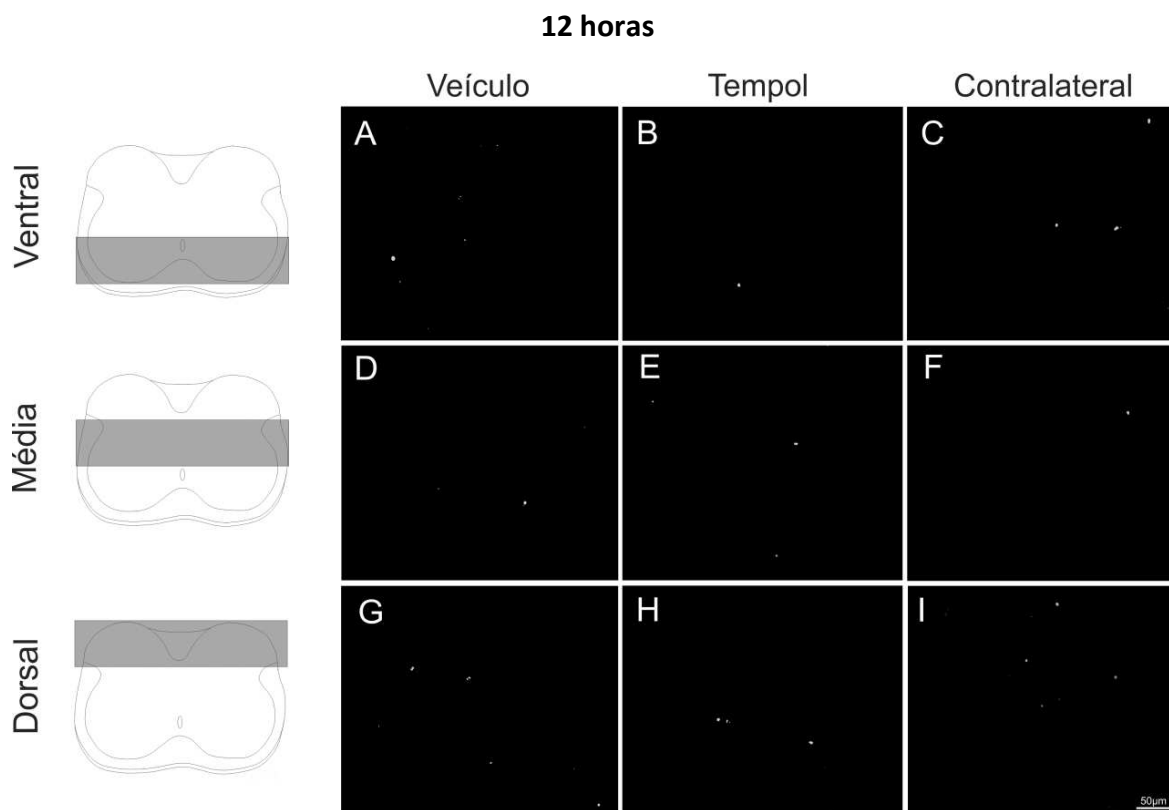


Figura 10: Exemplos representativos de células TUNEL positivas nas regiões ventral (**A, B e C**), média (**D, E e F**) e dorsal (**G, H e I**) da medula espinal, 12 horas após axotomia do nervo isquiático em ratos neonatos e tratamento com Tempol. Grupo veículo (**A, D e G**), Grupo Tempol (**B, E e H**) e Contralateral (**C, F e I**). Escala = 50 µm.

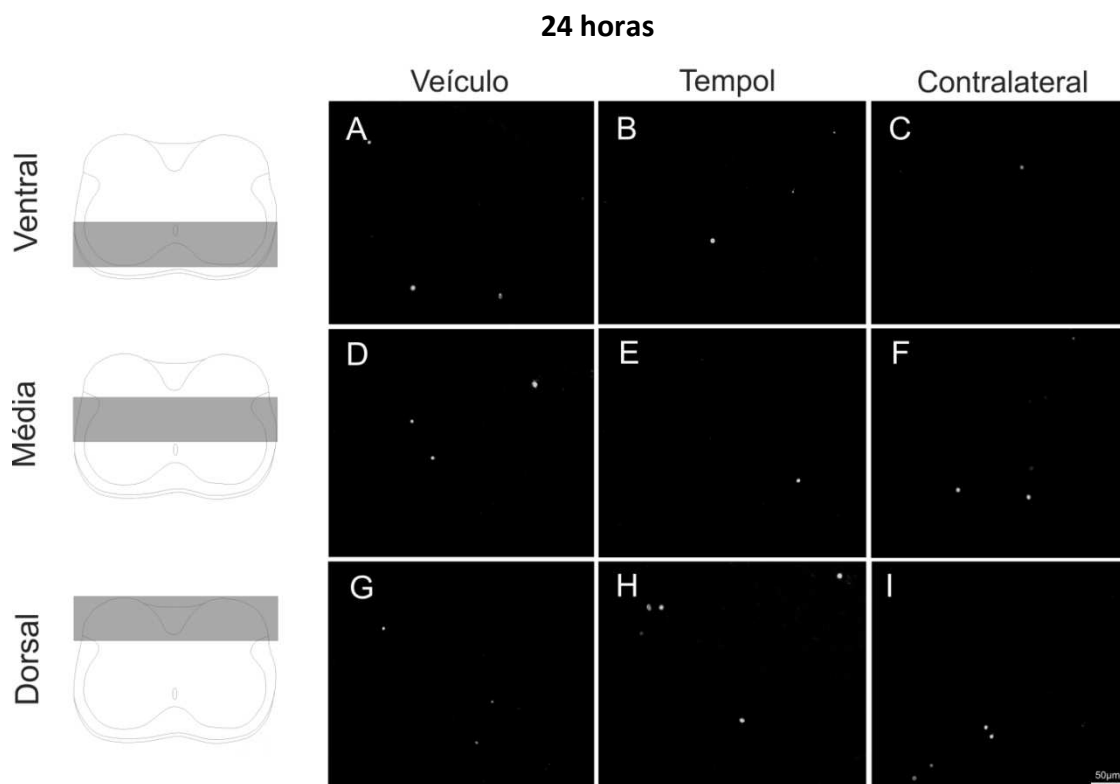


Figura 11: Exemplos representativos de células TUNEL positivas nas regiões ventral (**A, B e C**), média (**D, E e F**) e dorsal (**G, H e I**) da medula espinal, 24 horas após axotomia do nervo isquiático em ratos neonatos e tratamento com Tempol. Grupo veículo (**A, D e G**), Grupo Tempol (**B, E e H**) e Contralateral (**C, F e I**). Escala = 50 µm.

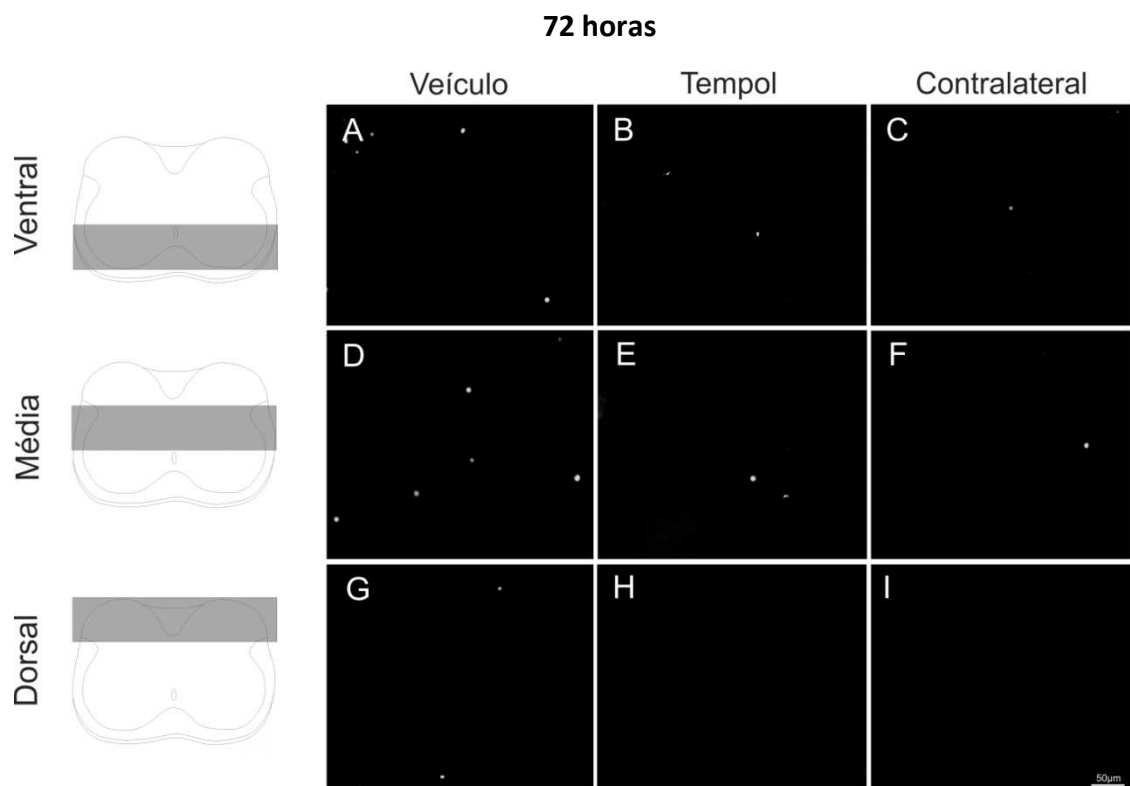


Figura 12: Exemplos representativos de células TUNEL positivas nas regiões ventral (**A, B e C**), média (**D, E e F**) e dorsal (**G, H e I**) da medula espinal, 72 horas após axotomia do nervo isquiático em ratos neonatos e tratamento com Tempol. Grupo veículo (**A, D e G**), Grupo Tempol (**B, E e H**) e Contralateral (**C, F e I**). Escala = 50 μ m.

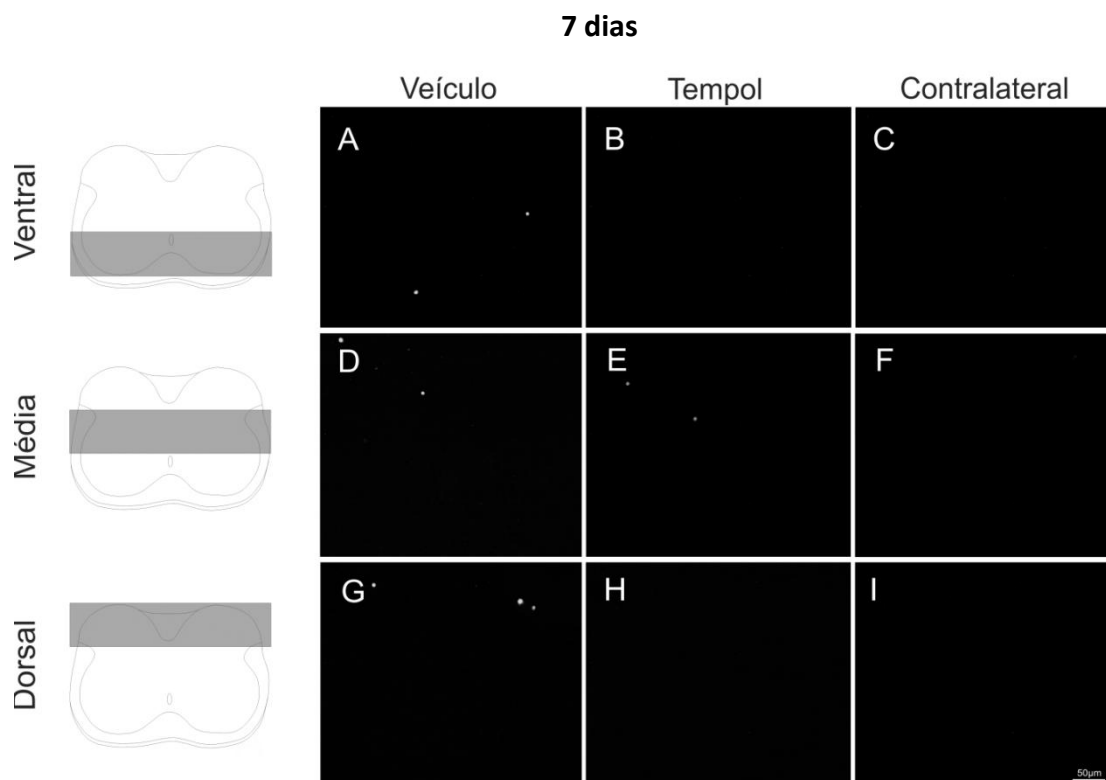


Figura 13: Exemplos representativos de células TUNEL positivas nas regiões ventral (**A, B e C**), média (**D, E e F**) e dorsal (**G, H e I**) da medula espinal, 7 dias após axotomia do nervo isquiático em ratos neonatos e tratamento com Tempol. Grupo veículo (**A, D e G**), Grupo Tempol (**B, E e H**) e Contralateral (**C, F e I**). Escala = 50 µm.

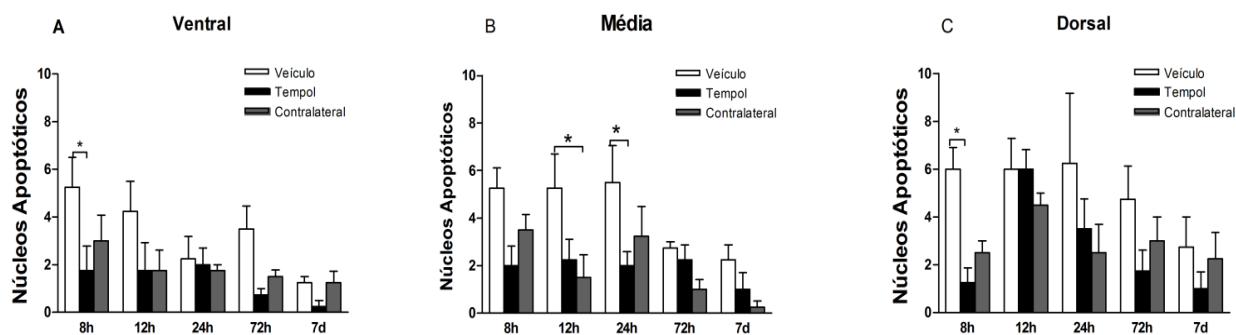


Figura 14: Quantificação de núcleos apoptóticos nas regiões: **A.** ventral, **B.** média e **C.** dorsal da medula espinal 8, 12, 24, 72 horas e 7 dias após axotomia e tratamento com Tempol. Os resultados demonstraram uma diminuição do número de núcleos apoptóticos na região ventral (**A**) da medula espinal 8 horas após a axotomia e tratamento com Tempol (**8 horas** 5,25±2,5; 1,75±2,06; 3,0±2,1; **12 horas** 4,24±2,5; 1,75±2,36; 1,75±1,7; **24 horas** 2,25±1,89; 2,5±1,91; 1,75±0,5; **72 horas** 3,5±1,91; 0,75±0,5; 1,5±0,57 e **7 dias** 1,25±0,5; 0,25±0,05; 1,25±0,95) grupos veículo, Tempol e contralateral respectivamente. Na região média (**B**), os resultados foram significativos 12 e 24 horas após axotomia e tratamento com Tempol (**8 horas** 5,25±1,7; 2,0±1,6; 3,5±1,2; **12 horas** 5,25±2,87; 2,25±1,7; 1,5±1,91; **24 horas** 5,5±3,1; 2,0±1,1; 3,25±2,5; **72 horas** 2,75±0,5; 3,0±1,8; 1,0±0,8; **7 dias** 2,25±1,25; 1,0±1,41; 0,25±0,5), grupos veículo, Tempol e contralateral respectivamente. Na região dorsal (**C**), houve diferenças estatísticas no grupo 8 horas (**8 horas** 6,0±1,8; 1,25±1,25; 2,5±1,0; **12 horas** 6±2,58; 6±1,63; 4,5±1; **24 horas** 6,25±5,8; 3,5±2,5; 2,5±2,3; **72 horas** 4,5±2,75; 1,75±1,7; 3,0±2,0; **7 dias** 2,75±2,5; 1,0±1,41; 4,0±2,0) grupos veículo, Tempol e contralateral respectivamente (*p < 0.05). O grupo contralateral corresponde ao grupo veículo.

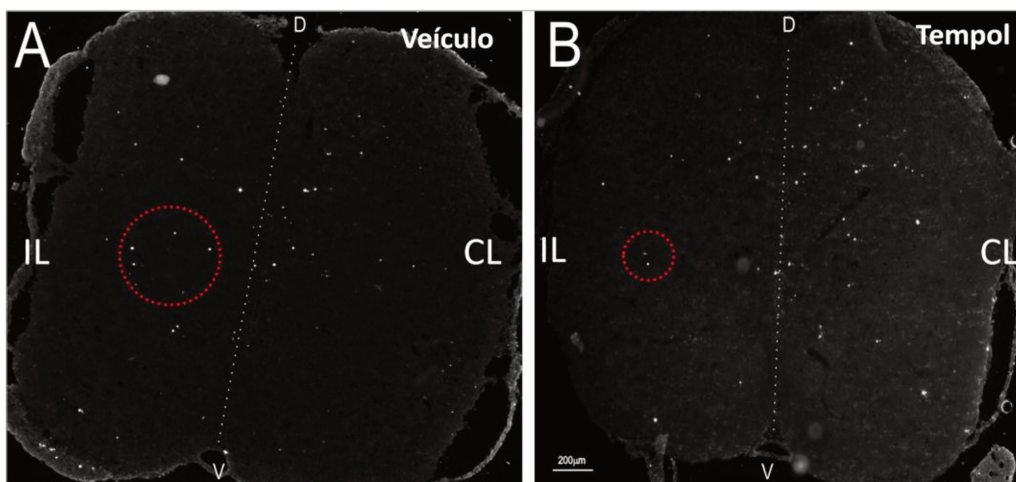


Figura 15: Visão panorâmica da distribuição dos núcleos apoptóticos na medula lombar após a transecção do nervo isquiático 12 horas após a lesão. **A:** grupo veículo e **B:** grupo tratado com Tempol. D: dorsal e V: ventral. Escala 200 μ m.

A fim de assegurar a presença de neurônios TUNEL positivos, a dupla marcação com NeuN (Abcam, EUA, 1:500) foi efetuada e visualizada em microscópio de fluorescência (Leica, DM 5500B), equipado com uma câmara de fluorescência (DFC345FX) e software LAS-AF (Versão 4.2).

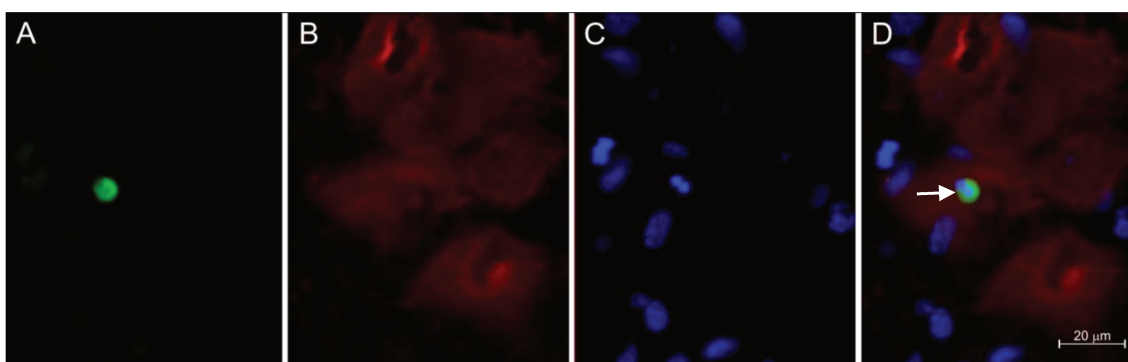


Figura 16: TUNEL combinado com imunomarcação anti-NeuN, evidenciando um neurônio TUNEL positivo. Núcleos corados com DAPI. **A:** TUNEL; **B:** NeuN; **C:** DAPI e **D:** sobreposição. Barra de escala = 20 μ m.

5.3: Efeito do tratamento com Tempol na expressão de transcritos gênicos pró-apoptóticos (*bax* e *caspase 3*) e anti-apoptótico (*bcl2*)

Para melhor entendermos os mecanismos moleculares envolvidos na morte neuronal em ratos neonatos após axotomia periférica e possível modulação dos mesmos pelo tratamento com Tempol, as intumescências lombares de animais neonatos foram utilizadas para realização da técnica qRT-PCR, mensurando-se a expressão dos genes pró-apoptóticos *bax* e *caspase 3* e anti-apoptótico *bcl2* após 12 e 24 horas à axotomia do nervo isquiático. Os resultados mostraram que o tratamento com Tempol ocasionou, 12h após a axotomia, um aumento de aproximadamente 13, 3 e 28 vezes na expressão gênica de *bax*, *caspase 3* e *bcl 2*, respectivamente, em relação ao controle (**Figura 17: A, B e C**).

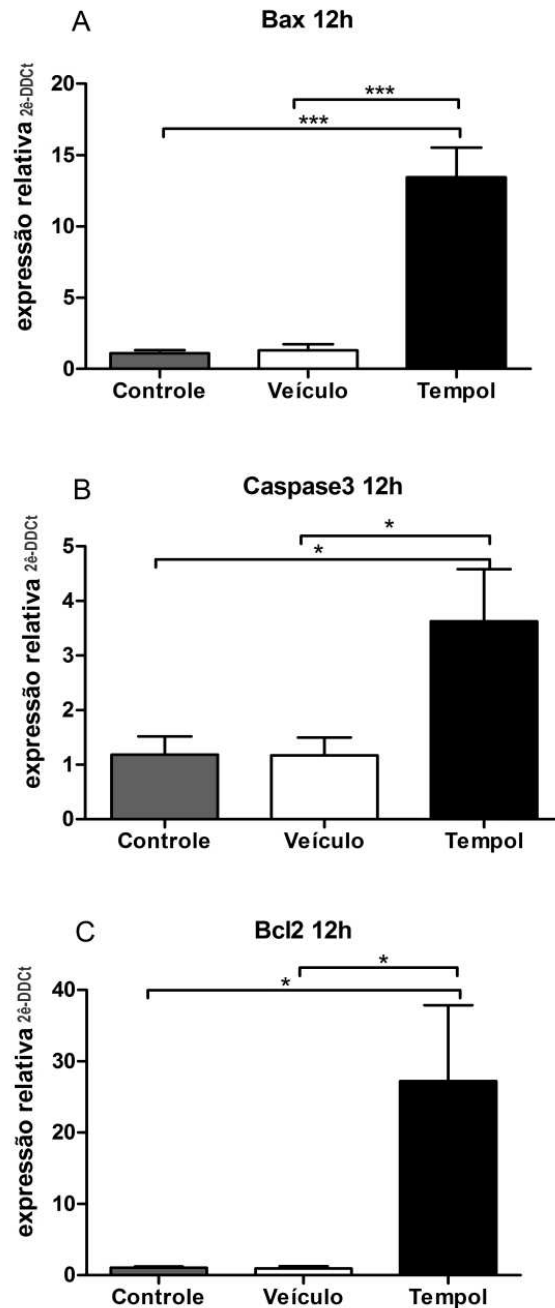


Figura 17: Expressão relativa dos genes pró-apoptóticos *bax* **(A)** e *caspase 3* **(B)** e anti-apoptótico *bcl2* **(C)**, 12 horas após a axotomia periférica e tratamento com Tempol.*** $p < 0,001$, * $p < 0,05$; de acordo com a ANOVA de uma via seguida do pós teste Bonferroni.

Após 24 horas a axotomia, o tratamento com Tempol reduziu a expressão relativa de *bax*, *caspase3* e *bcl2* quando comparado com o grupo controle. No entanto, não houve diferenças estatísticas entre os grupos. (Figura 18: A, B e C).

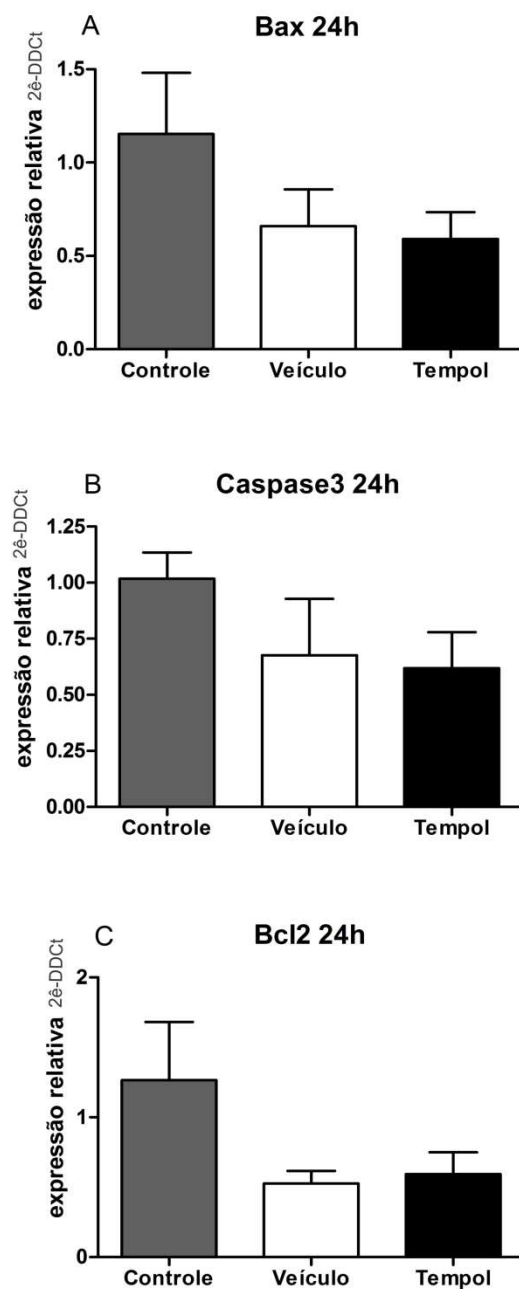


Figura 18: Expressão relativa dos genes pró-apoptóticos *bax* (A) e *caspase 3* (B) e anti-apoptótico *bcl2* (C), 24 horas após a axotomia periférica e tratamento com Tempol.

Comparando-se a expressão relativa de *bax*, *caspase 3* e *bcl2* entre os tempos analisados, nos grupos veículo ou Tempol, observou-se no grupo Tempol uma redução na expressão de *bax* (96,3%) (**Figura 19: A e B**), *caspase 3* (98,3%) (**Figura 20: A e B**) e *bcl2* (98,1%) (**Figura 21: A e B**).

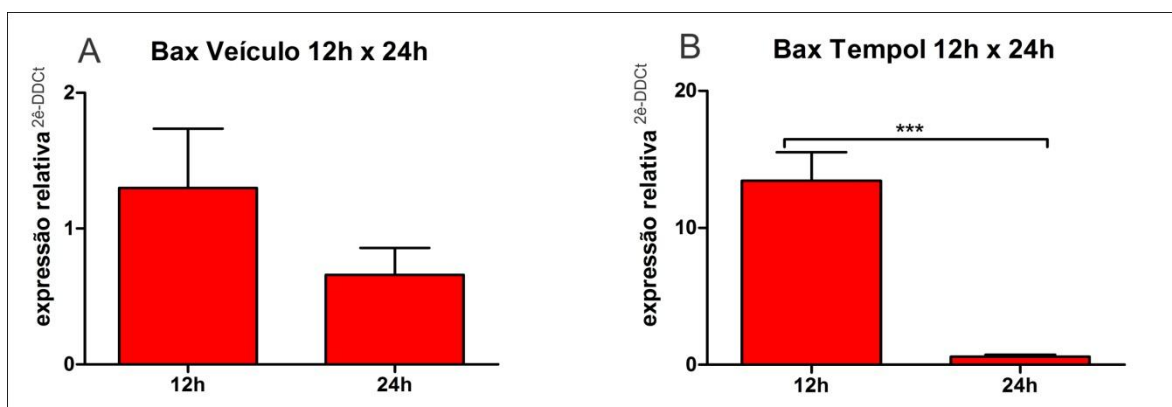


Figura 19: Expressão relativa de *bax* nos grupos veículo e Tempol 12 e 24 horas após axotomia. **(A):** grupo veículo; **(B):** grupo Tempol. ***p<0,001.

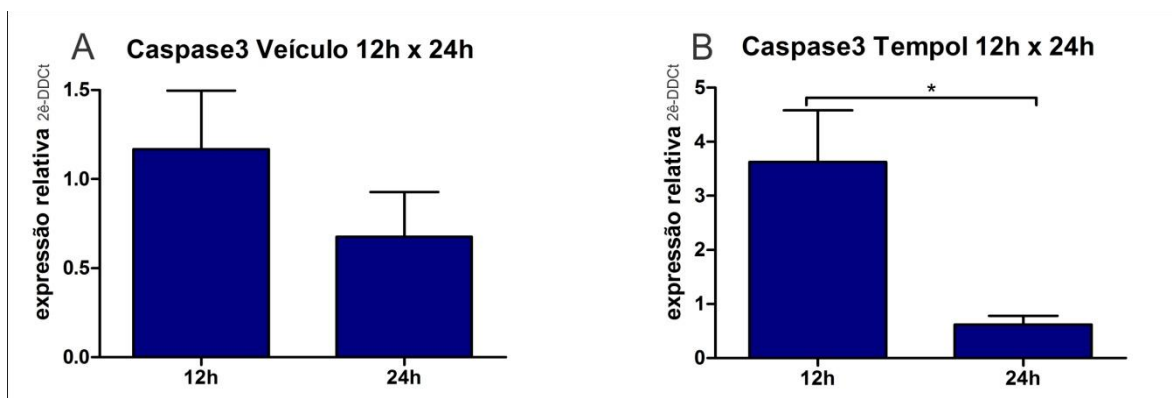


Figura 20 Expressão relativa de *caspase 3* nos grupos veículo e Tempol 12 e 24 horas após axotomia. **(A):** grupo veículo; **(B):** grupo Tempol. *p<0,05.

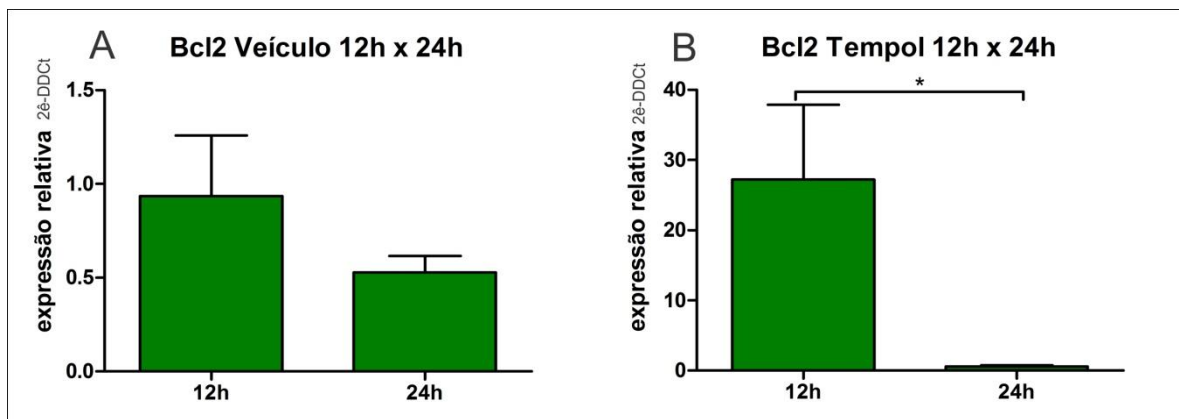


Figura 21: Expressão relativa de *bcl2* nos grupos veículo e Tempol 12 e 24 horas após axotomia. **(A):** grupo veículo; **(B):** grupo Tempol. * $p < 0,05$.

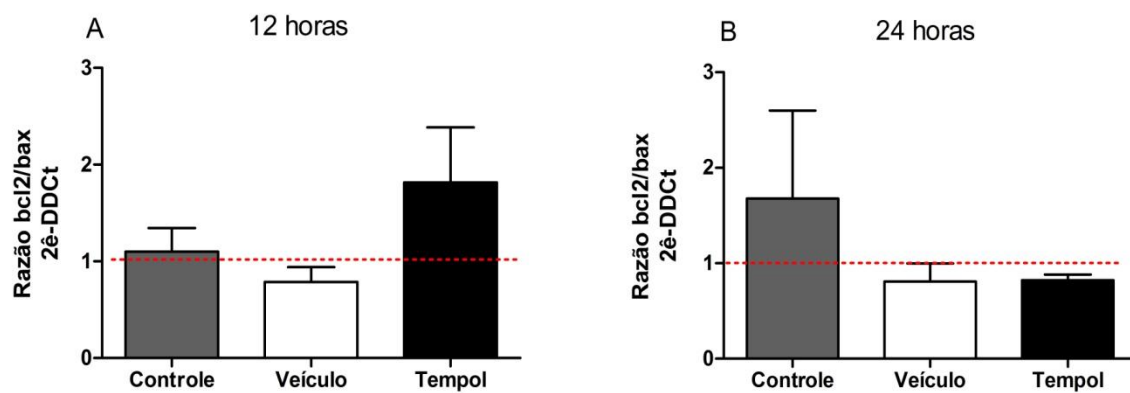


Figura 22: Relação *bcl2/bax* nos grupos controle, veículo e Tempol após 12 **(A)** e 24 horas **(B)** axotomia do nervo isquiático.

6. Discussão

Para avaliar a utilidade terapêutica do Tempol, foi estudada a sua capacidade para prevenir a morte de neurônios motores espinais de ratos neonatos após axotomia do nervo isquiático. Nossos resultados indicam que o Tempol resgatou os neurônios motores espinais da morte após axotomia neonatal. Também mostraram que o Tempol atuou preponderantemente nos neurônios ipsilaterais ao lado operado, uma vez que o número de neurônios motores, no lado não operado, não foi alterado entre os grupos veículo e Tempol.

Em nosso estudo, a sobrevivência dos motoneurônios medulares foi avaliada através da coloração de Nissl (cresyl violeta), na intumescência lombar de ratos neonatos axotomizados, seguida de contagem direta, empregando-se a técnica esteriológica de Abercrombie. Os resultados mostram um aumento na sobrevivência dos motoneurônios nos grupos tratados com Tempol em todos os tempos de sobrevida estudados, quando comparados aos respectivos grupos que receberam o veículo de diluição. ROGÉRIO e colaboradores (2002) avaliaram o efeito antioxidante da melatonina na sobrevivência neuronal em ratos neonatos axotomizados e relataram que 5 dias após a lesão os grupos tratados com 1, 5 e 10mg/kg de melatonina apresentaram maior sobrevivência neuronal quando comparados ao grupo veículo, sendo a sobrevivência de 74%, 65% e 66% respectivamente.

A axotomia de neurônios, muitas vezes leva à apoptose dos neurônios lesionados. Cerca de 50% dos neurônios sensoriais morrem dentro de 2-3 semanas após a lesão do

nervo no recém-nascido e dentro de 2 meses após lesão no adulto (Hart *et al.*, 2002; McKay Hart *et al.*, 2002).

Pelo fato de motoneurônios degenerarem em várias doenças humanas é importante compreender os mecanismos moleculares que são responsáveis pelo processo de morte celular e também de identificar a influência genética que confere uma proteção celular. O paradigma experimental da axotomia do nervo periférico oferece um modelo ideal para o estudo da morte celular dos motoneurônios da medula espinal.

No caso de neurônios motores adultos, o curso de tempo é mais lento. Um estudo detalhado por MA *et al.*, (2001) dirige-se tanto ao longo do tempo de morte neuronal motora, e às questões metodológicas que sustentam estudos conflitantes anteriores. Neste estudo, as contagens de neurônios motores foram obtidas com o rastreo retrógrado e várias técnicas quantitativas 4, 6, 8 e 16 semanas após a raiz espinal C7 ser dividida 10 mm em relação à DRG. A perda de neurônios não foi encontrada dentro de 6 semanas após o trauma, mas a perda de 21% era evidente após 8 semanas e chegou a 31% depois de 16 semanas. A morte celular após avulsão de raízes ventrais é mais rápida e extensa, com 53% dos neurônios motores mortos dentro de 4 semanas (ZHANG *et al.*, 2005). Em recém-nascidos, o tempo da morte do neurônio motor é mais rápido (atingindo valor platô dentro de 10 dias da divisão do tronco do plexo braquial) e mais extenso: 80% dos neurônios morrem (ASZMANN *et al.*, 2004).

YASU *et al.*, (2002) avaliaram o efeito protetor da interleucina 3 (IL-3) e da eritropoetina (EPO) na morte de neurônios motores após a axotomia em ratos neonatos 1-3 horas após o nascimento. Os animais receberam tratamento durante 4 dias após a

lesão. Os autores relataram que o número total de neurônios motores do lado operado foi reduzido para cerca da metade dos neurônios motores do grupo não operados em ratos do grupo controle. Os tratamentos com 1,0 e 5,0 $\mu\text{g/Kg}$ de IL-3 testadas não trouxeram alteração significativa no número total de neurônios motores no lado operado, quando comparados com os animais controle. No entanto, a IL-3, na concentração de 10,0 $\mu\text{g/kg}$, atenuou significativamente a perda de neurônios motores no lado operado. Intraperitonealmente, 0,5 e 1,0 mg/kg de EPO não afetou o número total de neurônios motores, quando comparado com animais controle. Era evidente que 5,0 mg/kg de EPO, produziram uma redução significativa na perda de neurônios motores no lado operado, em comparação com veículo. A taxa de sobrevivência (lado operado / lado intacto $\times 100$) foi utilizada como índice de sobrevivência neuronal. Um aumento significativo na taxa de sobrevivência foi obtida com 10,0 $\mu\text{g/kg}$ de IL-3 (26%) e com 5,0 mg/kg de EPO (25%) em comparação com o controle. A taxa de sobrevivência aumentada foi devido a uma redução na perda de neurônios motores no lado da axotomia.

Estes estudos confirmam que a morte neuronal significativa ocorre após padrões comuns de lesão do nervo periférico, mas que uma janela clinicamente relevante de oportunidade neuroprotetora existe antes de uma significativa perda celular ocorrer.

NUMA e colaboradores (2011) estudaram os efeitos do Tempol na morte de células PC12 induzidas pela cocaína e os resultados mostraram que esta induziu a morte celular de uma forma dependente da dose e que foi significativamente reduzida pelo radical nítróido estável Tempol. Além disso, o Tempol inibiu significativamente o dano oxidativo induzido pela cocaína. Cumulativamente, estes resultados sugerem que os

nitróxidos, como Tempol, podem atenuar o dano oxidativo e a morte celular e que as células PC12 podem ser utilizadas como um modelo *in vitro* para investigar o mecanismo molecular preciso destes compostos.

Recentemente, LINARES et al., 2013 observaram que o tratamento com Tempol 26mg/kg (intraperitoneal) 3 vezes por semana em um modelo de esclerose lateral amiotrófica (hSOD G93A) mostrou-se neuroprotetor promovendo um aumento na sobrevivência dos animais por 17 dias. Além disso, o tratamento com Tempol protegeu as estruturas celulares e moleculares contra danos oxidativos. Os dados sugerem que o tratamento com nitróxidos é uma boa alternativa para ser testada em modelos animais de ELA.

Uma perda significativa de neurônios dos gânglios das raízes dorsais (DRG) foi relatada em modelos animais de lesão de nervo periférico. Neurônios sensoriais neonatais são mais suscetíveis a morte celular induzida pela axotomia e retirada de fator de crescimento do nervo (NGF) do que neurônios adultos (Chung-Ren et al., 2011).

Do dia embrionário 13 aos 3 dias pós-natal, 65% de todos os neurônios motores degeneram por um mecanismo de apoptose (Oppenheim, 1991; Yamamoto e Henderson, 1999). Acredita-se que estes neurônios morram devido à inabilidade de captar quantidade significativa de fatores neurotróficos produzidos, em quantidade limitada, no órgão alvo (Oppenheim, 1991). Esta predisposição de motoneurônios embrionários e neonatais morrerem durante o desenvolvimento sugere que eles têm uma maior sensibilidade para a morte celular, em oposição aos motoneurônios adultos, que são capazes de resistir a um estímulo lesivo.

MCKAY HART *et al.*, (2002) avaliaram neurônios sensoriais e células satélites após a axotomia periférica e reparação do nervo imediatamente após a lesão ou após uma semana da axotomia em ratos adultos, empregando a técnica de Tunel e análises morfológicas em diferentes tempos de sobrevivência: 1 a 14 dias, 1 a 6 meses, e relataram que neurônios TUNEL-positivos, exibindo uma variedade de morfologias, foram vistos em todos os pontos temporais com um pico no grupo de 2 semanas após axotomia, apenas em gânglios axotomizados. O número de células satélites TUNEL-positivas atingiu o pico 2 meses após axotomia e eram mais numerosas nos gânglios axotomizados comparados ao controle. Nos animais que foram submetidos a reparação do nervo, o número de neurônios TUNEL positivos foi reduzido, indicando que a reparação imediata era mais protetora do que o reparo após uma semana a lesão.

GROVES *et al.*, (1997) demonstraram ocorrência de fragmentação do DNA nos neurônios, 7 dias após a transecção do nervo isquiático em ratos adultos e, embora a maioria dos autores não demonstrem qualquer perda neuronal no prazo de 7 dias de axotomia, VESTERGAARD *et al.*, (1997) encontraram uma perda de 6% após 4 dias, aumentando para 19% após 8 dias.

WOLF e MISSLER (1992) relataram que a transecção do nervo isquiático causa a morte dos motoneuronios espinais em ratos recém-nascidos, e que esse tipo de morte ocorre por apoptose. Esses dados corroboram com os observados em nosso trabalho, onde células em processo apoptótico foram evidenciadas através da técnica de TUNEL em cortes transversais da medula espinal. O tratamento com Tempol reduziu o número de células TUNEL-positivas do lado ipsilateral à lesão, quando comparado com animais que

receberam somente o veículo de diluição. Essa redução foi estatisticamente significativa 8 horas após lesão nas regiões ventral e dorsal da medula espinal e 12 e 24 horas após lesão na região média. As células TUNEL-positivas foram mais evidenciadas na região média e dorsal da medula lombar, não ficando restritas somente ao grupo dos motoneurônios axotomizados na região ventral da medula, indicando que a axotomia do nervo periférico induz a apoptose de interneurônios, neurônios motores e sensitivos e células gliais. Dados semelhantes foram observados por ROGÉRIO e colaboradores (2006), que realizaram a técnica de TUNEL para detecção de células apoptóticas na medula lombar de ratos neonatos (P2) após axotomia do nervo periférico. Tais autores relataram que células TUNEL-positivas foram localizadas na substância cinzenta, principalmente no corno dorsal dos grupos controle e grupos lesionados. No primeiro dia após lesão, o número de células marcadas aumentou significativamente no grupo veículo, quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com melatonina. O número de células marcadas não apresentou diferenças entre os grupos estudados 3 horas, 6 horas, 3 dias e 5 dias após axotomia.

Em nosso estudo, células TUNEL- positivas foram dificilmente observadas no pool dos motoneurônios, porém, como observado pelas duplas marcações TUNEL/NeuN, podemos afirmar que há neurônios morrendo por apoptose, também em nosso modelo experimental. OLIVEIRA e colaboradores (1997 e 2002) detectaram um pequeno, mas significativo, aumento no número de células TUNEL-positivas no corno ventral da medula espinal de ratos neonatos (P2), após axotomia. A difícil identificação de motoneurônios no

cornu ventral da medula pode ser atribuída à rapidez do processo de morte de motoneurônios imaturos após axotomia periférica.

Possivelmente, esta redução de morte por apoptose promovida pelo nitróxido Tempol deve estar relacionada com sua propriedade antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo e proporcionando um microambiente favorável para sobrevivência e manutenção desses neurônios, bem como de células não neuronais.

Em animais neonatos, motoneurônios seccionados morrem por um mecanismo de apoptose, tal como evidenciado pela ativação da caspase-3 e fragmentação do DNA (de Bilbao e Dubois-Dauphin, 1996; Li et al., 1998b; de Bilbao et al., 1999; Guarin et al., 1999; Vanderluit et al., 2000). A morte celular dos motoneurônios nos recém nascidos pode ser prevenida com a superexpressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL (Dubois-Dauphin et al., 1994; Parsadanian et al., 1998), ou pela supressão da proteína pró-apoptótica Bax (Deckwerth et al., 1996).

Para melhor compreendermos os mecanismos pelos quais o Tempol promoveu proteção sobre os motoneurônios e células não neuronais, realizamos a técnica qRT-PCR para avaliarmos a expressão de genes pró e anti-apoptóticos *bax* e *caspase 3* e *bcl2*, respectivamente 12 e 24 horas após a axotomia do nervo isquiático. Nossos resultados mostraram um aumento de aproximadamente 13, 3 e 28 vezes na expressão gênica de *bax*, *caspase 3* e *bcl 2*, respectivamente, em relação ao controle após 12 horas a lesão e tratamento com Tempol. Dados semelhantes foram observados por REZENDE e colaboradores (2008) que relataram uma diminuição de 18% nos níveis de *bax* e um aumento de 87% de *bcl2* após tratamento com CNTF na primeira semana pós natal em

ratos neonatos axotomizados. A relação *bcl2* e *bax* também aumentou. Os mesmos autores relataram, pela primeira vez, que o CNTF reduz a quantidade de *bax* no citoplasma, indicando que o tratamento reduz a ação pró-apoptótica de *bax*, sugerindo que a diminuição de *bax* e/ou o aumento de *bcl2/bax* pode ser responsável pela redução da morte de motoneurônios. Em nosso trabalho, a relação *bcl2/bax* após 12 horas a lesão e tratamento com Tempol, não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos. Porém, observa-se um aumento nessa relação no grupo tratado com Tempol 12 horas após a lesão, quando comparado aos grupos controle e veículo, sugerindo que o nitróxido pode estar modulando os mecanismos de morte através do aumento de *bcl2* em relação à *bax*. Esta hipótese é sustentada pelo fato de *bax* ser essencial para a morte induzida por axotomia em roedores neonatos, como demonstrado em camundongos *bax* knockout. Com efeito, KINUGASA e colaboradores (2002) relataram que a secção do nervo isquiático em ratos recém-nascidos com deficiência de *bax* (*bax*^{-/-}) produziu uma menor morte de motoneurônios do que a observada em animais do tipo selvagem (*bax*^{+/+}). Além da redução dos níveis de *bax*, *bcl2* interage com *bax* na membrana mitocondrial, inibindo a formação de poros pela oligomerização de *bax* (Dlugosz *et al.*, 2006).

A importância de *bcl2* pode ser observada no estudo de DUBOIS-DAUPHIN e colaboradores (1994). Estes relataram que motoneurônios do nervo facial de ratos transgênicos que superexpressam *bcl2* humana são resistentes à axotomia, realizada aos 2 dias de idade. Estes autores mostraram que os neurônios motores sobreviventes apresentaram imunomarcagem mais intensa para *bcl2* do que os do lado contralateral, 7 dias após a lesão. Evidência adicional do papel anti-apoptótico de *bcl2* foi fornecida pela

ausência de células marcadas com TUNEL de 8 horas a 5 dias depois da secção do nervo facial (de Bilbao, F.; Dubois-Dauphin, M.; 1996).

Após 24 horas e tratamento com Tempol, nossos resultados mostraram uma diminuição da expressão de *bax*, *caspase 3* e *bcl2*. Quando comparamos a expressão desses genes entre 12 e 24 horas nos grupos veículo e Tempol, observamos um aumento da expressão dos genes estudados 12 horas e uma diminuição da expressão dos mesmos após 24 horas.

Interessantemente, a administração de Tempol aumentou tanto expressão de transcritos gênicos pró e antiapoptóticos, reforçando a presença de apoptose nos tempos de sobrevida estudados. Porém, tendo-se em vista que o tratamento com o fármaco gerou aumento significativamente maior de mRNA para genes antiapoptóticos, nossos resultados sugerem que o Tempol atue primordialmente de forma neuroprotetora.

Nossos resultados contribuem com evidências que nitróxidos estáveis, como Tempol, minimizam a ocorrência de eventos apoptóticos no período neonatal após axotomia periférica e promovem aumento da sobrevivência de motoneurônios, possivelmente através da modulação dos mecanismos apoptóticos, relacionados principalmente com a expressão de *bax* e *bcl2*.

7. Conclusões

De acordo com os resultados desse estudo, conclui-se que o tratamento com Tempol é neuroprotetor, levando à sobrevivência dos motoneurônios após a lesão de nervo periférico e diminuição dos eventos apoptóticos.

Especificamente, o presente estudo permite concluir que:

- O tratamento com Tempol aumenta a sobrevivência de motoneurônios da medula espinal em todos os tempos de sobrevida estudados 8 horas, 12 horas, 24 horas, 72 horas e uma semana pós lesão ($p < 0,0001$).
- Os animais tratados com Tempol apresentaram uma diminuição do número de células TUNEL positivas, indicando uma redução dos eventos apoptóticos.
- O tratamento com Tempol aumentou a expressão dos genes pró-apoptóticos (bax, 13 vezes) e anti-apoptóticos (bcl2, 28 vezes) nas primeiras 12 horas após lesão.

8. Bibliografia

- Alberts, B. et al. (2008). Molecular biology of the cell. Fifth edition. New York, Garland science.
- Aldskogius, H.; Risling, M. (1981). Effect of sciatic neurectomy on neuronal number and size distribution in the L7 ganglion of kittens. *Exp. Neurol.*
- Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* 10: 18-25.
- Asaba, K.; Tojo, A.; Onozato, M. L.; Goto, A.; Fujita, T. (2007). Double-edged action of SOD mimetic in diabetic nephropathy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 49: 13-19.
- Aszmann, O. C.; Winkler, T.; Korak, K. et al. (2004). The influence of GDNF on the timecourse and extent of motoneuron loss in the cervical spinal cord after brachial plexus injury in the neonate. *Neurol Res*; 26: 211–217.
- Bahadori, M. H.; TtakiAl-Tiraihi.; Valojerdi, M. R. (2001). Sciatic nerve transection in neonatal rats induces apoptotic neuronal death in L5 dorsal root ganglion *Journal of Neurocytology* 30, 125–130.
- Baker, S. J.; Reddy, E. P. (1996). Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*, n. 12, p. 1-9.
- Behl, C.; Trapp, T.; Skutella, T.; Holsboer, F. (1997). Protection against oxidative stress-induced neuronal cell death - a novel role for RU486. *Eur J Neurosci.* 9:912-20.

- Bełtowski, J.; Jamroz-Wisniewska, A.; Borkowska, E.; Nazar, J.; Marciniak, A. (2005). Antioxidant treatment normalizes renal Na⁺,K⁺-ATPase activity in leptin-treated rats. *Pharmacol Rep* 57: 219-28.
- Beswick, R. A.; Dorrance, A. M.; Leite, R.; Webb, R. C. (2001). NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*. 38:1107–11.
- Borisenko, G. G.; Martini, I.; Zhao, Q.; Amoscato, A. A.; Tyurina, Y. Y.; Kagan, V. E. (2004). Glutathione propagates oxidative stress triggered by myeloperoxidase in HL-60 cells. Evidence for glutathionyl radical-induced peroxidation of phospholipids and cytotoxicity. *J BiolChem* 279: 23453–23462.
- Boveris, A.; Cadenas, E.; Stoppani, A. O. (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 156 (2), 435–444.
- Bowers, W. J.; Howard, D. F.; Federoff, H. J. (1997). Gene therapeutic strategies for neuroprotection: implications for Parkinson's disease. *Exp Neurol*.144:58-68.
- Bregman, B. S.; Goldberger, M. E. (1983). Infant lesion effect: 111. Anatomical correlates of sparing and recovery of function after spinal cord damage in newborn and adult cats. *Dev. Brain Res.* 9:137-154.
- Brill, A. et al. (1999). The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J. Assist. Reprod. Genet.*, n. 16, p. 512-519.
- Budihardjo, I.; Oliver, H.; Lutter, M.; Luo, X.; Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Ver Cell Dev Biol*.15:269-90.

- Cadenas, E. et al. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 180 (2), 248–257.
- Cai, H.; Harrison, D.G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87 (10), 840–844.
- Chen, C.; Gonzalez, F. J.; Idle, J. R. (2007). LC-MS-based metabolomics in drug metabolism. *Drug Metab. Rev.* 39(2–3), 581–97.
- Chieia, M. A. T. (2005). Doenças do neurônio motor. *Revista Neurociências* V13 N3 (supl-versão eletrônica) – jul/set.
- Chung-Ren, L.; Chien-Hui, Y.; Chiu-En, Huang.; Chih-Hsien, W.; Yi-Shen, Chen.; Shyr-Ming.; Sheen-Chen.; Hui-Wen, H.; Kuan-Hung, C. (2011). GADD45A Protects Against Cell Death in Dorsal Root Ganglion Neurons Following Peripheral Nerve Injury *Journal of Neuroscience Research* 89:689–699.
- Clowry, G. J. (1993). Axotomy induces NADPH diaphorase activity in neonatal but not adult motoneurons. *Neuroreport*, 5: 361-364, 1993.
- Damier, P.; Hirssch, E. C.; Zhang, P.; Agid, Y.; Javoy-Agid, F. (1993). Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52: 1-6.
- Daniel, P. T.; Wider, T.; Sturm, I.; Schulze-Osthoff, K. (2001). The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*. 25:1022-1032.

- de Bilbao, F.; Dubois-Dauphin, M. (1996). Time course of axotomy-induced apoptotic cell death in facial motoneurons of neo-natal wild type and bcl-2 transgenic mice. *Neuroscience*. 71: 1111-1119.
- de Bilbao, F.; Guarin, E.; Nef, P.; Dubois-Dauphin, M. (1999). The mouse cyp32 mRNA transcript is early up-regulated in axotomized motoneurons following facial nerve transection. *Neurosci Lett* 266:65–68.
- Deckwerth, T. L.; Elliott, J. L.; Knudson, C. M.; Johnson Jr, E. M.; Snider, W. D.; Korsmeyer, S. J. (1996). BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 17:401–411.
- Dlugosz, P. J.; Billen, L. P.; Annis, M. G.; Zhu, W.; Zhang, Z.; Lin, J. et al. (2006). Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J* 25: 2287-2296.
- Dubois-Dauphin, M.; Frankowski, H.; Tsujimoto, Y.; Huarte, J.; Martinou, J. C. (1994). Neonatal motoneurons overexpressing the bcl-2 protooncogene in transgenic mice are protected from axotomy-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3309–3313.
- Estevez, A. G.; Spear, N.; Manuel, S. M.; Radi, R.; Henderson, C. E.; Barbeito, L.; Beckman, J. S. (1998). Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation, *J. Neurosci.* 18 923–931.
- Finkel, T.; Hodbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
- Fraser, A.; Evan, G. A. (1996). license to kill. *Cell*, n. 85, p. 781-784.

- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp. Biol.* 201(8): 1203-9. Review.
- Gabbita, S. P.; Robinson, K. A.; Stewart, S. A.; Floyd, R. A.; Hensley, K. (2000). Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Arq. Biochem. Biophys.* 376: 1-13.
- Goldman, P. S. (1974). An alternative to developmental plasticity: Heterology of CNS structures in infants and adults. In D.G. Stein, J.J. Rosen, and N. Butlers (eds): *Plasticity and Recovery of Function in the Central Nervous System*. New York Academic Press, pp. 149-174.
- Gottlieb, E.; Vander Heiden, M. G.; Thompson, C. B. (2000). Bcl-XL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 20:5680-689.
- Gottlieb, R. A. (2001). Mitochondrial and apoptosis. *Biol Signals Recept.* 10:147-61.
- Green, D. R.; Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 305:626-29.
- Green, D. R.; Martin, S. J. (1995). The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr Opin Immunol.*, n. 7, p. 694-703.
- Groves, M. J.; Christopherson, T.; Giometto, B. et al. (1997). Axotomy-induced apoptosis in adult rat primary sensory neurons. *J Neurocytol.* 26: 615-624.

- Guarin, E.; Seuret, P.; Nef, S.; de Bilbao, F.; Nef, P.; Dubois-Dauphin, M. (1999) cyp32 messenger RNA neosynthesis is induced by fatal axotomy and is not regulated by athanatal Bcl-2 over-expression. *Neuroscience* 90:653–664.
- Gupta, S. (2003). Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Int J Oncol.* 22:15-20.
- Hale, A. J. et al. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem.*, n. 236, p. 1-26.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (2007). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, oxford, pp 268-340.
- Hart, A. M.; Wiberg, M.; Youle, M.; Terenghi, G. (2002). Systemic acetyl-L-carnitine eliminates sensory neuronal loss after peripheral axotomy: a new clinical approach in the management of peripheral nerve trauma. *Exp Brain Res* 145:182–189.
- Heidrich, A.; Rösler, M.; Riederer, P. (1997). Pharmacotherapy of Alzheimer dementia: therapy of cognitive symptoms - new results of clinical studies. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 65:108-21.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407:770-76.
- Israels, L. G.; Israels, E. D. (1999). Apoptosis. *Stem Cells*, n. 17, p. 306-313.
- Jemmer, P.; Olanow, C. W. (1996). Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiology.* 47, 161-170.
- Johnstone, R. W.; Ruefli, A. A.; Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, n. 108, p. 153-164.

- Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessell, T. M. (2000). Principles of neural science. 4.ed. McGraw-Hill.
- Kawada, N.; Imai, E.; Karber, A.; Welch, W. J.; Wilcox, C. S. (2002). A mouse model of angiotensin II slow pressor response: role of oxidative stress. J Am SocNephrol13:2860–2868.
- Kennard, M. (1942). Cortical reorganization or motor function: Studies on series of monkeys of various ages from infancy to maturity. Arch. Neurol. Psychiatry 47:227 - 240.
- Kinugasa, T.; Ozaki, S.; Hamanaka, S.; Kudo, N. (2002). The effects of sciatic nerve axotomy on spinal motoneurons in neonatal Bax-deficient mice. Neurosci Res 44: 439-446.
- Kroemer, G.; Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. Nat Med. 6:51316.
- Lawson, S. J.; Lowrie, M. B. (1998). The role of apoptosis and excitotoxicity in the death of spinal motoneurons and interneurons after neonatal nerve injury. Neuroscience 87, 337–348.
- Lee, J. M.; Bernstein, A. (1995). Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. Cancer Metastasis Rev., n. 14, p. 149-161.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M.M. (2007). Lehninger Princípios de Bioquímica Ed. Sarvier.

- Leonard, C. T.; Goldberger, M. E (1987a). Consequences of damage to the sensorimotor cortex in neonatal and adult cats. I. Sparing and recovery of function. Dev. Brain Res. 32-14.
- Leonard, C. T.; Goldberger, M. E. (1987b). Consequences of damage to the sensorimotor cortex in neonatal and adult cats. 11. Maintenance of exuberant projections. Dev. Brain Res. 3215-30.
- Li, L.; Houenou, L.; Wu, W.; Lei, M.; Prevette, D. M.; Oppenheim, R. W. (1998b). Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice. J Comp Neurol 396:158–168.
- Liang, Q.; Smith, A. D.; Pan, S.; Tyurin, V. A.; Kagan, V. E.; Hastings, T. G.; Schor, N. F. (2005). Neuroprotective effects of TEMPOL in central and peripheral nervous system models of Parkinson's disease. Biochemical Pharmacology 70, 1371–1381.
- Linares, E.; Seixas, L. V.; Prazeres, J. N.; Ladd, F. V. L.; Ladd, A. A. B. L.; Coppi, A. A.; Ohara, A. (2013). Tempol Moderately Extends Survival in a hSOD1 G93A ALS Rat Model by Inhibiting Neuronal Cell Loss, Oxidative Damage and Levels of Non-Native hSOD1 G93A Forms. PLOS ONE. v8.
- Lipman, T.; Tabakman, R.; Lazarovici, P. (2006). Neuroprotective effects of the stable nitroxide compound Tempol on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in the nerve growth factor-differentiated model of pheochromocytoma PC12 cells. European Journal of Pharmacology 549, 50–57.

- Liu, D.; Wen, J.; Liu, J.; Li, L. (1999). The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA and membrane phospholipids. *FASEB J* 13:2318-2328.
- Loeffler, M.; Kremer, G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cellular Res.* 256:19-26.
- Lowrie, M. B.; Lavalette, D.; Davis, C. E. (1994). Time course of motoneurons death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. *Dev. Neurosci.*, 16, 279-284.
- Lowrie, M. B.; Lawson, S. J. (2000). Cell death of spinal interneurons. *Prog. Neurobiol.* 61: 543-555.
- Lowrie, M. B.; Vbrová, G. (1992). Dependence of postnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. *Trends in Neurosciences*, 15: 80-84.
- Ma, J.; Novikov, L. N.; Wiberg, M. et al. (2001). Delayed loss of spinal motoneurons after peripheral nerve injury in adult rats: A quantitative morphological study. *Exp Brain Res*; 139: 216–223.
- Machado, A. B. M. (1998). *Neuroanatomia funcional*. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu,
- Makin, G. (2002) Targeting apoptosis in cancer chemo therapy. *Expert Opin Ther Targets*, n. 6, p. 73-84.
- Mariotti, R.; Peng, Z. C.; Kristensson, K.; Bentivoglio, M. (1997). Age-dependence induction of nitric oxide synthase activity in facial motoneurons after axotomy. *Exp. Neurol.*, 145: 361-370.

- Martin, S. J.; Green, D. R. (1995). Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, n. 18, p. 137-153.
- McKay Hart, A.; Brannstrom, T.; Wiberg, M.; Terenghi, G. (2002). Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination. *Exp Brain Res* 142:308–318.
- Murphy, K. M.; Ranganathan, V.; Farnsworth, M. L.; Kavallaris, M.; Lock, R. B. (2000). Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ.* 7:102-11.
- Nishiyama, A.; Fukui, T.; Fujisawa, Y.; Rahman, M.; Tian, R. X.; Kimura, S. et al. (2001). Systemic and regional hemodynamic responses to tempol in angiotensin II-infused hypertensive rats. *Hypertension.* 37: 77-83.
- Nordberg, J.; Arnér, E. S. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31 (11): 1287-312.
- Novikov, L.; Novikova, L.; Kellerth, J. O. (1995). Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and blocks nitric oxide synthase expression in adult rat spinal motoneurons after ventral root avulsion. *Neurosci.Lett.*, 200: 45-48.
- Novikov, L.; Novikova, L.; Kellerth, J. O. (1997). Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience*, 79: 765-774.
- Oliveira, A. L.; Risling, M.; Deckner, M.; Lindholm, T.; Langone, F.; Cullheim, S. (1997). Neonatal sciatic nerve transection induces TUNEL labeling of neurons in the rat spinal cord and DRG. *Neuroreport*, 8: 2837-2840.

- Oliveira, A. L.; Rislingl, M.; Negro, A.; Langone, F.; Cullheim, S. (2002) Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. *J. Comp. Neurol.*, 447: 381-393.
- Ongini, E.; Adami, M.; Ferri, C.; Bertorelli, R. (1997). Adenosine A2A receptors and neuroprotection. *Ann N Y AcadSci*; 825:30-48.
- Onuma, S.; Nakanishi, K. (2004). Superoxide dismutase mimetic tempol decreases blood pressure by increasing renal medullary blood flow in hyperinsulinemic-hypertensive rats. *Metabolism*. 53: 1305-8.
- Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453–501.
- Parsadanian, A. S.; Cheng, Y.; Keller-Peck, C. R.; Holtzman, D. M.; Snider, W. D. (1998). Bcl xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J Neurosci* 18:1009–1019.
- Patel, K.; Chen, Y.; Dennehy, K.; Blau, J.; Mendonca, M.; Tarpey, M.; Krishna, M.; Mitchell, J. B.; Welch, W. J.; Wilcox, C. S. (2006). Acute antihypertensive action of nitroxides in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R37–R43.
- Peixoto, E. B. M. I.; Pessoa, B. S.; Biswas, S. K.; Lopes de Faria J. B. (2009). Antioxidant SOD Mimetic Prevents NADPH Oxidase-Induced Oxidative Stress and Renal Damage in the Early Stage of Experimental Diabetes and Hypertension. *Am J Nephrol* 229:309–318.

- Peixoto, E. B. M. I.; Papadimitriou, A.; Lopes de Faria, J. M.; Lopes de Faria, J. B. (2012). Tempol reduces podocyte apoptosis via PARP signaling pathway in experimental diabetes mellitus. *Nephron Exp Nephrol*.120(2):81-90.
- Perry, G.; Taddeo, M. A.; Petersen, R. B.; Castellani, R. J.; Harris, P. L.; Siedlak, S. L.; Cash, A. D.; Liu, Q.; Nunomura, A.; Atwood, C. S.; Smith, M. A. (2003). Adventiously-bound redox active iron and copper are at the center of oxidative damage in Alzheimer's disease. 3th edition. Oxford University Press. *Biometals* 16: 77-81.
- Petros, A. M.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*.1644:83-94.
- Raffray, M.; Cohen, G. M. (1997). Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct models of cell death. *Pharmacol. Ther.*, n. 75, p. 153-177.
- Reed, J. C. (2003). Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer cell*, n. 3, p. 17 - 22.
- Rezende, A. C. S.; Vieira, A. S.; Rogério, F.; Rezende, L. F.; Boschero, A. C.; Negro, A.; Langone, F. (2008). Effects of systemic administration of ciliary neurotrophic factor on Bax and Bcl-2 proteins in the lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transaction. *Braz J Med Biol Res* 41(11).
- Rogerio, F.; de Souza, Q. L.; Teixeira, S. A.; Oliveira, A. L.; de Nucci, G.; Langone, F. (2002). Neuroprotective action of melatonin on neo-natal rat motoneurons after sciatic nerve transection. *Brain Res*; 926: 33-41.

- Rogério, F.; Jordão Júnior, H.; Vieira, A. S.; Maria, C. C. J.; Rezende, A. C. S.; Pereira, G. A. G.; Langone, F. (2006). Bax and Bcl-2 expression and TUNEL labeling in lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy and melatonin treatment. *BR AIN RESEA RCH* 1112 , 80–90.
- Rossiter, J. P.; Riopelle, R. J.; Bisby, M. A. (1996). Axotomy-induced apoptotic cell death of neonatal rat facial motoneurons: time course analysis and relation to NADPH diaphorase activity. *Exp. Neurol.*, 138: 33-44.
- Sagara, J. I.; Miura, K.; Bannai, S. (1993) Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *JNeurochem.* 61: 1672-1676.
- Schmalbruch, H. (1987). Loss of sensory neurons after sciatic nerve section in the rat. *Anat Rec* 219:323–329.
- Schmalbruch, H. (1988). The effect of peripheral nerve injury on immature motor and sensory neurons and on muscle fibres. Possible relation to the histogenesis of Werdnig-Hoffmann disease. *Rev Neurol* 144:721– 729.
- Schnackenberg, C. G. (2002). Oxygen radicals in cardiovascular renal disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2: 121-5.
- Schnackenberg, C. G.; Welch, W. J.; Wilcox, C. S. (1998). Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension.* 32: 59-64.
- Schnackenberg, C. G.; Wilcox, C. S. (1999). Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f2alpha. *Hypertension.* 33: 424-8.

- Sedeek, M. H.; Llinas, M. T.; Drummond, H.; Fortepiani, L.; Abram, S. R.; Alexander, B. T. et al. (2003). Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. *Hypertension*. 42:806-10.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, n. 267, p. 1456-1462.
- Tisuhako, M. H.; Augusto, O.; Linares, E.; Chadi, G.; Giorgio, S.; Pereira, C. A. (2010). Tempol ameliorates murine viral encephalomyelitis by preserving the blood-brain barrier, reducing viral load and lessening inflammation. *Free Radic. Biol. Med* 48 704-712.
- Tsuchida, E.; Rice, M.; Bullock, R. (1997). The neuroprotective effect of the forebrain selective NMDA antagonist CP101,606 upon focal ischemic brain damage caused by acute subdural hematoma in the rat. *J Neurotrauma*. 14:409-17.
- Turrens, J. F.; Boveris, A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 191 (2), 421–427.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J Biochem.Cell. Biol.* 39(1): 44-84. Epub 2006 Aug 4.
- Vander Heiden, M. G. V.; Thompson, C. B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol.* 1:E209-16.
- Vanderluit, J. L.; McPhail, L.T.; Fernandes, K. J.; McBride, C. B.; Huguenot, C.; Roy, S.; Robertson, G. S.; Nicholson, D. W.; Tetzlaff, W. (2000). Caspase-3 is activated

following axotomy of neonatal facial motoneurons and caspase-3 gene deletion delays axotomy-induced cell death in rodents. *Eur J Neurosci* 12:3469–3480.

- Vaz, S. M.; Augusto, O. (2008). Inhibition of myeloperoxidase-mediated protein nitration by tempol: kinetics, mechanism, and implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:8191–8196.
- Vestergaard, S.; Tandrup, T.; Jakobsen, J. (1997). Effect of permanent axotomy on number and volume of dorsal root ganglion cell bodies. *J Comp Neurol*;388: 307–312.
- Wang, D.; Chabrashvili, T.; Wilcox, C. S. (2004). Enhanced contractility of renal afferent arterioles from angiotensin-infused rabbits: roles of oxidative stress, thromboxane-prostanoid receptors and endothelium. *Circ Res* 94:1436- 1442.
- Wang, D.; Chen, Y.; Chabrashvili, T.; Aslam, S.; Borrego Conde, L. J.; Umans, J. G.; Wilcox, C. S. (2003). Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to Ang II of afferent arterioles from rabbits infused with Ang II. *J Am Soc Nephrol* 14:2783–2789.
- Wang, D.; Jose, P.; Wilcox, C. S. (2006). α_1 receptors protect the renal afferent arteriole of angiotensin-infused rabbits from norepinephrine-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 17:3347–3354.
- Welch, W. J.; Blau, J.; Xie, H.; Chabrashvili, T.; Wilcox, C. S. (2005a). Angiotensin induced defects in renal oxygenation: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H22–H28.

- Welch, W. J.; Mendonca, M.; Aslam, S.; Wilcox, C. S. (2003). Roles of oxidative stress and AT1 receptors in renal hemodynamics and oxygenation in the post-clipped 2K,1C kidney. *Hypertension* 41:692–696.
- Welch, W. J.; Mendonca, M.; Blau, J.; Karber, A.; Dennehy, K.; Patel, K.; Lao, Y. S.; Jose, P. A.; Wilcox, C. S. (2005b). Antihypertensive response to prolonged tempol in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int* 68:179–187.
- Welch, W. J.; Wilcox, C. S. (2001) AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. *Kidney Int* 59:1257–1263.
- Wilcox, C. S.; Pearlman, A. (2008). Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev* 260:418–469.
- Wolff, J. R.; Missler, M. (1992). Synaptic reorganization in developing and adult nervous systems. *Anat. Anz.* 174, 393–403.
- Wu, W.; Li, L. (1993). Inhibition of nitric oxide synthase reduces motoneuron death due to spinal root avulsion. *Neurosci .Lett.*, 153: 121-124.
- Wu, W.; Li, L.; Penix, J. O.; Gu, Y.; Liu, H.; Pevette, D. M. Houenou, L. J.; Oppenheim, R. W. (1995). GDNF and BDNF inhibit the induction of NOS and prevent the death of adult rat spinal motoneurons following root avulsion. *Society for neuroscience*, 21: 279.
- Wyllie, A. H. (1985). The biology of cell death in tumors. *Anticancer Res.*, n. 5, p. 131-142.
- Xu, H.; Bian, X.; Watts, S. W.; Hlavacova, A. (2005). Activation of vascular BK channel by tempol in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension* 46:1154–1162.

- Xu, H.; Fink, G. D.; Galligan, J. J. (2004). Tempol lowers blood pressure and sympathetic nerve activity but not vascular O₂•_• in DOCA-salt rats. *Hypertension* 43: 329–334.
- Xu, H.; Jackson, W. F.; Fink, G. D.; Galligan, J. J. (2006). Activation of potassium channels by tempol in arterial smooth muscle cells from normotensive and deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* 48:1080–1087.
- Yamamoto, Y.; Henderson, C. E. (1999). Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal motoneurons in chicken, mouse, and rat. *Dev Biol* 214:60–71.
- Yasuo, I.; Ken, I.; Yasumitsu, I.; Osamu, I.; Kounosuke, I.; Masao, K. (2002). Protective effect of interleukin- 3 and erythropoietin on motor neuron death after neonatal axotomy. *Neurol Res*; 24: 643 –646.
- Yick, L. W.; Wu, W.; So, K. F.; Wong, S. Y. (1988). Time course of NOS expression and neuronal death in Clarke's nucleus following traumatic injury in adult rat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, 241: 155-158.
- Yip, H. K.; Rich, K. M.; Lampe, P. A.; Johnson Jr, E. M. (1984). The effect of nerve growth factor and its antiserum on the postnatal development and survival after injury of sensory neurons in rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* 4 (12):298&2992.
- Yu, W. H. A. (1997). Regulation of nitric oxide synthase expression in motoneurons following nerve injury. *Dev. Neurosci.*, 19: 247-254.

- Zhang, C. G.; Welin, D.; Novikov, L. et al. (2005). Motorneuron protection by N acetyl-cysteine after ventral root avulsion and ventral rhizotomy. *Br J Plast Surg*;58: 765–773
- Zhang, Y.; Croft, K. D.; Mori, T. A.; Schyvens, C. G.; McKenzie, K. U.; Whitworth, J. A. (2004). The antioxidant tempol prevents and partially reverses dexamethasone-induced hypertension in the rat. *Am J Hypertens*.17: 260-5.
- Zicha, J.; Dobesová, Z.; Kunes, J. (2001). Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. *J Hypertens*.19:247-54.
- Ziegler, U.; Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*.19:124-28.
- Ziy, I.; Offen, D.; Barzilai, A. et al. (1997). Modulation of control mechanisms of dopamine-induced apoptosis - a future approach to the treatment of Parkinson's disease? *J Neural Transm*;49(Suppl):195-202.

9. Anexos

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada **"Efeito neuroprotetor do Tempol (4-hidroxi tempo) após transecção do nervo isquiático em ratos neonatos"**:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2506-1, Instituição:Unicamp

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno(a): Gabriela Bortolança Chiarotto



Orientador(a): Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



CEUA/Unicamp

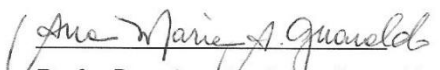
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

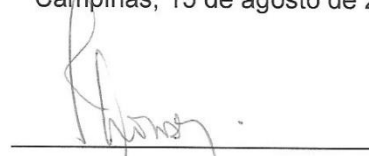
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "**Efeito neuroprotetor do Tempol (4 – hidroxil – Tempo) após transecção do nervo isquiático em ratos neonatos**" (protocolo nº **2506-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira / Gabriela Bortolança Chiarotto**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **15 de agosto de 2011**.

Campinas, 15 de agosto de 2011.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva