



Efeito neuroprotetor do 2,4-dinitrofenol (DNP) em um modelo de lesão por esmagamento do nervo ciático de camundongos

Rodrigo Furtado Madeiro da Costa

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Química Biológica)

Fevereiro de 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Efeito neuroprotetor do 2,4-dinitrofenol (DNP) em um modelo de lesão por esmagamento do nervo ciático de camundongos

Rodrigo Furtado Madeiro da Costa

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Química Biológica)

Banca examinadora:

Prof. Marcus Fernandes de Oliveira (Presidente da Banca)

Prof. Francesco Langone

Prof^a. Silvana Allodi

Prof^a. Maria Christina Fialho de Mello (Revisora)

Prof^a. Ana Maria Blanco Martinez (Orientadora)

Prof. Sérgio T. Ferreira (Orientador)

Ficha Catalográfica

Madeiro da Costa, Rodrigo.

Efeito neuroprotetor do 2,4-dinitrofenol (DNP) em um modelo de lesão por esmagamento do nervo ciático de camundongos - Rodrigo F. Madeiro da Costa. Rio de Janeiro: UFRJ/IBqM, 2009.

x, 57f.: Il.; 31cm.

Tese (doutorado) – UFRJ/ Instituto de Bioquímica Médica/ Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2009.

Referências Bibliográficas: f. XX-XX.

1. Degeneração axonal. 2. Neuroproteção. 3. Dinitrofenol. 4. Ultraestrutura. 5. Função do membro. I. Ferreira, Sérgio Teixeira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. III. Título.

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Doenças Neurodegenerativas do Instituto de Bioquímica Médica e no Laboratório de Neurohistologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Professor Sérgio T. Ferreira e da Prof^a. Ana Maria Blanco Martinez, com auxílios financeiros da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Howard Hughes Medical Institute (HHMI).

“A maior riqueza de um homem é saber ler e escrever.”

Crispiniano Nunes da Costa (meu avô)

Para Julia; minha linda, minha mulher, crítica científica e inspiração, e para Joana; minha pequenininha, minha princesa e minha esperança num mundo melhor.

Essa tese é para vocês.



Agradeço aos meus orientadores por todo o apoio e confiança depositada em mim. Acredito ter chegado finalmente ao começo. Foram suas mãos que com carinho e sabedoria me guiaram pelo difícil caminho do desenvolvimento do pensamento científico. Hoje olho para trás e vejo a longa estrada pela qual caminhamos juntos, com dificuldades, vitórias, preocupações e muitas alegrias.

Ana e Sérgio, o que vocês me deram é o bem mais valioso de todos; o conhecimento e a capacidade de gerá-lo com pureza e verdade.

Muito obrigado.



Aos amigos do Laboratório de Doenças Neurodegenerativas e do Laboratório de Neurohistologia e Ultraestrutura, meus sinceros agradecimentos por toda a ajuda, amizade, críticas, elogios, horas da mais pura filosofia científica no bloco A e intermináveis discussões de resultados na hora do cafezinho.



Um agradecimento especial à Professora Maria Christina Mello, que acompanhou e ajudou a direcionar essa tese e me ajudou em todos os momentos com valiosas sugestões. Agradeço também pela excelente revisão e pelo constante incentivo.



Muito obrigado a toda equipe do Laboratório de Ultraestrutura Celular Herta Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e do Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do Instituto de Microbiologia Paulo P Góis pelo uso dos microscópios eletrônicos e por me receberem sempre de portas abertas.



A Bomblim, pois em 1825, quando os primeiros colonos cruzaram em seus botes de madeira o oceano comendo apenas um lanchusco, enfim... Por seus conselhos, ajuda, exemplo e forma de pensar inspiradora.

A meus pais e aos amigos, Xicão, Marcinha e Alexandre, que fingem que estão me entendendo quando perguntam sobre o que eu faço, muito obrigado por me aturarem.



Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Howard Hughes Medical Institute (HHMI) por permitir financeiramente que este trabalho fosse realizado com qualidade.



RESUMO

EFEITO NEUROPROTETOR DO 2,4-DINITROFENOL (DNP) EM UM MODELO DE LESÃO POR ESMAGAMENTO DO NERVO CIÁTICO DE CAMUNDONGOS

Rodrigo Furtado Madeiro da Costa

Orientadores: Prof. Sérgio T. Ferreira e Prof^a. Ana Maria Blanco Martinez

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Química Biológica.

A degeneração de nervos periféricos acontece através de um processo conhecido como Degeneração Walleriana, levando à denervação dos músculos-alvo e perda da função motora. Estudos anteriores de nosso e de outros grupos demonstraram que o 2,4-dinitrofenol (DNP) causa aumentos nos níveis intracelulares de AMP cíclico e da proteína ligadora de microtubulos, tau, e promove neuritogênese em culturas neuronais primárias *in vitro*, além de preservar a substância branca após trauma de medula espinal *in vivo*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da administração sistêmica de DNP na degeneração do nervo ciático de camundongos após trauma por esmagamento induzido pela aplicação de um clipe de aneurisma de 10 g por 1 minuto no nervo ciático esquerdo. Quatro grupos de camundongos Suíços adultos fêmeas foram usados: não lesionado, lesionado recebendo veículo (PBS), lesionado recebendo 3 doses (a cada 24 horas) de DNP (0.06 mg/kg) e lesionado recebendo 5 doses (a cada 12 horas) de DNP. Os animais foram sacrificados 48 horas após a lesão e tanto os nervos lesionados quanto os não lesionados (contra-laterais) e os gânglios da raiz dorsal correspondentes foram processados para microscopia de luz e eletrônica. Usando critérios morfométricos, ultraestruturais e bioquímicos, demonstramos aqui que o DNP protege contra a degeneração axonal dos nervos lesionados. Especificamente, o DNP bloqueou a desintegração do citoesqueleto, impediu alterações morfológicas mitocondriais e preservou a imunoreatividade das proteínas APP e Neuregulina 1 nos nervos lesionados. Um teste funcional de locomoção foi realizado para avaliar o desempenho dos animais pós-lesão e mostrou que os animais tratados com DNP apresentaram a função do membro significativamente preservada em relação aos animais lesionados não tratados. Os resultados indicam que o DNP protege o nervo contra danos após a lesão e sugerem que este pode ser um adjuvante no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas em lesões nervosas.

ABSTRACT

NEUROPROTECTION BY 2,4-DINITROPHENOL (DNP) IN A SCIATIC NERVE CRUSHING INJURY MODEL IN MICE

Rodrigo Furtado Madeiro da Costa

Supervisors: Prof. Sérgio T. Ferreira e Prof^a. Ana Maria Blanco Martinez

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Química Biológica.

Peripheral nerve degeneration takes place by a process known as Wallerian degeneration and leads to denervation of target muscles and loss of motor function. Previous studies have shown that 2,4-dinitrophenol (DNP) causes an increase in intracellular levels of cAMP and of the microtubule associated protein, tau, promotes neurogenesis in primary neuronal cultures *in vitro*, and preserves white matter after spinal cord injury *in vivo*. The aim of the current work was to evaluate the effects of systemic DNP administration on sciatic nerve degeneration following a crushing injury induced by application of a 10 g clip for 1 minute in the left sciatic nerve of mice. Four groups of adult female Swiss mice were used: control uninjured, injured receiving vehicle (PBS), injured receiving 3 doses (every 24 hours) of DNP (0.06 mg/kg) and injured receiving 5 doses (every 12 hours) of DNP. Animals were sacrificed 48 hours after injury and both injured and uninjured (contralateral) sciatic nerves and corresponding dorsal root ganglia were processed for light and electron microscopy. Using morphometric, ultrastructural and biochemical criteria, we demonstrate that DNP prevented axonal degeneration of injured nerves. Specifically, DNP blocked cytoskeletal disintegration and morphological alterations in mitochondria and preserved APP and Neuregulin 1 immunoreactivities in injured nerves. A walking track functional test carried out to evaluate post-injury performance showed that DNP-treated animals had significantly preserved limb function following injury compared to untreated animals. Results indicate that DNP prevents post-injury nerve damage and suggest that it may be a useful adjuvant in the development of novel therapeutic approaches in nerve injury.

Lista de Abreviações

AMPC – Adenosina mono fosfato cíclico
APP – Proteína precursora amilóide
ATP – Adenosina tri-fosfato
BACE – β -site APP-cleavage enzyme
BDNF – Brain derived neurotrophic factor
BSA – Bovine serum albumine
CS – Células de Schwann
DNP – 2,4 dinitrofenol
DW – Degeneração Walleriana
EGF – Epidermal growth factor
EROs – Espécies reativas de oxigênio
GDNF – Glia derived neurotrophic factor
GRD – Gânglio da raiz dorsal
IFC – Índice de função do ciático
kV – kilo voltagem
MAG – Myelin associated protein
N2A – Células derivadas de neuroblastoma murino
NMDA – N-metil D-aspartato
Nrg1 – Neuregulina 1
OMBP – Oligodendrocyte myelin basic protein
PBS – Phosphate buffer saline
sAPP α – proteína precursora amilóide solúvel
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico
UPS – Ubiquitine proteasome system
Wld^s – Slow Wallerian degeneration

INDICE

INTRODUÇÃO	1
1. O Sistema Nervoso	1
1.1 Organização Básica e Função	1
1.2 O Sistema Nervoso Periférico	1
1.3 O Neurônio	3
1.4 O Nervo Ciático	6
1.5 As fibras mielinizadas.	7
2. Neurodegeneração e Degeneração Walleriana (DW)	9
2.1 Aspectos gerais	12
3.2 APP e neuroproteção	12
3.3 O 2,4-dinitrofenol como um agente protetor	33
3. DNP e Neuroproteção	12
3.1 Mecanismos moleculares de neuroproteção	15
3.2 APP e neuroproteção	17
OBJETIVOS	19
MATERIAIS E MÉTODOS	20
1. Preparo das solucoes de 2,4-dinitrofenol (DNP).....	20
2. Animais e procedimentos cirúrgicos	20
3. Processamento para microscopia de luz e eletrônica	21
4. Morfometria	23
5. Imunofluorescência	24
6. Ensaio de função do nervo ciático	24
RESULTADOS	27
1. Artigo "Systemic administration of 2,4-dinitrophenol protects against sciatic nerve degeneration following a crushing injury"	27
2. Resultados adicionais	28
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
<i>Curriculum vitae</i>	54

Introdução

1. O Sistema Nervoso

1.1 Organização Básica e Função

O sistema nervoso é um conjunto de estruturas extremamente especializado e de alta complexidade anatômica. Pode ser dividido basicamente em sistema nervoso periférico (SNP) e sistema nervoso central (SNC). O SNC é composto por estruturas presentes dentro de caixas ósseas (crânio e coluna vertebral) e pode ser dividido em hemisférios cerebrais, diencéfalo, mesencéfalo, ponte, bulbo, cerebelo e medula espinal (Kandel, 2000). Em termos de funções cognitivas superiores, como raciocínio, memória e emoção, o cérebro é a região mais importante do SNC, e não é difícil estabelecer uma relação entre a complexidade de suas funções e o seu tamanho, já que ocupa 80% da cavidade craniana (Machado, 2003). Já o SNP é distribuído por todo o organismo. É dividido em nervos, que atuam como condutos de comunicação do SNC com os demais órgãos, e gânglios, que são aglomerados de corpos celulares distribuídos por vários órgãos (Lent, 2008). Esse conjunto interconectado de fibras e diversos tipos celulares permitem que o organismo decodifique as mensagens recebidas do ambiente e dos próprios órgãos e reaja a mudanças contínuas presentes nesses universos. Também controla e integra as várias atividades autônomas do corpo, como a respiração, circulação, etc. (Moore & Dalley, 1999).

1.2 O Sistema Nervoso Periférico

O sistema nervoso periférico se origina no sistema nervoso central a partir de nervos cranianos e espinhais. Os cranianos inervam a maior parte da cabeça e pescoço e os espinhais inervam o corpo em geral. Além dos nervos, os gânglios são parte importante do sistema nervoso periférico. Estes são agrupamentos de corpos celulares

de neurônios, situados nos espaços entre os órgãos ou embutidos na parede dos órgãos. Os nervos periféricos se ramificam e confluem inúmeras vezes em busca de seu alvos no corpo. À medida que se direcionam e atingem cada vez mais a periferia, se tornam mais finos até se desdobrarem em filetes nervosos e, finalmente, em terminais axônicos.

Os nervos espinhais são formados por dois conjuntos de filetes nervosos que emergem dos forâmens intervertebrais posicionados dorsal e ventralmente ao longo da medula. Esses filetes recebem a denominação de raízes dorsais e ventrais, respectivamente. As raízes dorsais são sensoriais, trazem as informações táteis, térmicas e dolorosas de todo o corpo, exceto da cabeça. Já as raízes ventrais são motoras e controlam os músculos esqueléticos estriados, os estriados cardíacos, os músculos lisos das vísceras e as glândulas (Lent, 2008).. Assim, os nervos periféricos podem ser sensoriais, motores ou mistos, formados por fibras sensoriais e motoras. Os corpos celulares dos neurônios de onde provêm tais fibras encontram-se também em regiões distintas. Os neurônios sensoriais estão presentes nos gânglios da raiz dorsal (GRD). Esses neurônios são, por definição, neurônios pseudo-unipolares. Durante o desenvolvimento, sofrem uma transformação morfológica que faz com que seus dois prolongamentos, que antes emergiam de pólos opostos, fundam-se dando origem a um prolongamento único que se bifurca. Um dos prolongamentos se dirige `a periferia e possui a característica funcional de um dendrito, pois os impulsos sensoriais surgem em sua ponta e são conduzidos ao corpo celular no GRD. O prolongamento que se dirige `a medula é o verdadeiro axônio, que, entretanto, não apresenta nenhuma diferença morfológica em relação ao prolongamento periférico. Os neurônios motores, ou motoneurônios, se encontram no corno ventral da medula e seus axônios se estendem diretamente aos músculos sem intermédio de gânglios (Fig. 01).

A distribuição das funções obedece à organização segmentar do SNP, ou seja, os nervos e os gânglios cervicais relacionam-se com o dorso da cabeça, pescoço, ombros e parte dos braços; os torácicos são responsáveis pelos braços, tórax e parte do abdômen; os lombares cuidam do abdômen e parte das pernas e os sacrais, das pernas e da pelve (Lent, 2008).

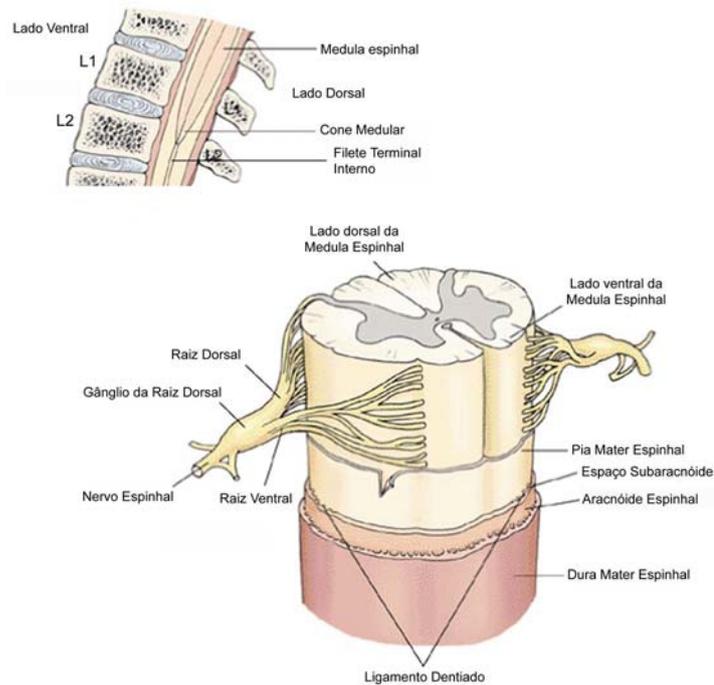


Figura 01 – Representação esquemática da medula espinhal e das raízes dorsal e ventral. O nervo espinhal é formado pela junção da raiz ventral e do ramo proveniente do gânglio da raiz dorsal. Adaptado de Siegel, 2006.

1.3 O Neurônio

Podemos considerar que o neurônio é a unidade funcional da intrincada rede que compõe o sistema nervoso. Os neuronios possuem características morfológicas, moleculares, metabólicas e funcionais muito específicas. São eles os responsáveis por receber, processar, armazenar ou “esquecer” as informações sensoriais coletadas no ambiente pelo indivíduo, além de controlar o funcionamento dos órgãos e dos membros por mecanismos bioquímicos altamente coordenados. Acredita-se que, somente no encéfalo, existam aproximadamente cem bilhões de neurônios.

Apesar de sua indiscutível importância para a sobrevivência do indivíduo e de todas as funções altamente especializadas que desenvolvem, os neurônios necessitam de um grupo de células no seu entorno ou até mesmo em íntimo contato chamadas células da glia. Os tipos celulares que compõe esse grupo são os astrócitos, oligodendrócitos, microglia, células ependimais e células de Schwann dentre outras. Cada uma delas possui um nicho e funções específicas vitais para o perfeito funcionamento do sistema nervoso.

Cada neurônio consiste de um corpo celular, de onde parte um grande número de processos denominados neuritos. Os prolongamentos que recebem a informação e a transmitem para o corpo celular são chamados de dendritos. Um longo neurito que conduz a informação do corpo celular para diferentes alvos é chamado de axônio. Além dos prolongamentos como estruturas de extrema importância para o funcionamento dos neurônios, estão presentes em cada célula um núcleo com um nucléolo bem evidente, mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, citoesqueleto composto por microtúbulos, neurofilamentos e filamentos de actina, complexo de Golgi e um conjunto composto pelo retículo endoplasmático rugoso e ribossomas livres conhecido como substância de Nissl.

O axônio é uma estrutura longa, cilíndrica e delgada. Emerge a partir de uma pequena elevação cônica do corpo celular neuronal que não contém substância de Nissl, chamada de cone de implantação axonal. A membrana plasmática do axônio é chamada de axolema e o citoplasma de axoplasma. Não há substância de Nissl nem complexo de Golgi no axoplasma, que, entretanto, é rico em microtúbulos, neurofilamentos e mitocôndrias e retículo endoplasmático liso.

Exatamente como uma via expressa, o axônio é responsável pelo transporte de vesículas e proteínas do soma para os terminais e também no sentido inverso. Os três tipos de transporte presentes nos axônios são:

- Transporte anterógrado rápido: está relacionado com o transporte de materiais do corpo celular para os terminais, principalmente membrana recém sintetizada e proteínas que serão secretadas.
- Transporte anterógrado lento: envolve o movimento de constituintes dos microtúbulos e neurofilamentos processados no soma para os terminais, entre outros.
- Transporte retrógrado rápido: é o transporte de materiais dos terminais para o corpo celular. É mais lento que o transporte anterógrado rápido.

Os neurônios podem apresentar diversas formas, dependendo das diferentes funções que podem exercer e das diferentes regiões em que podem estar presentes. Entretanto, é basicamente a forma que define a classificação básica dos neurônios. Os tipos mais comuns são os neurônios multipolares, bipolares, pseudo-unipolares e unipolares (Siegel, 2006) (Fig. 02).

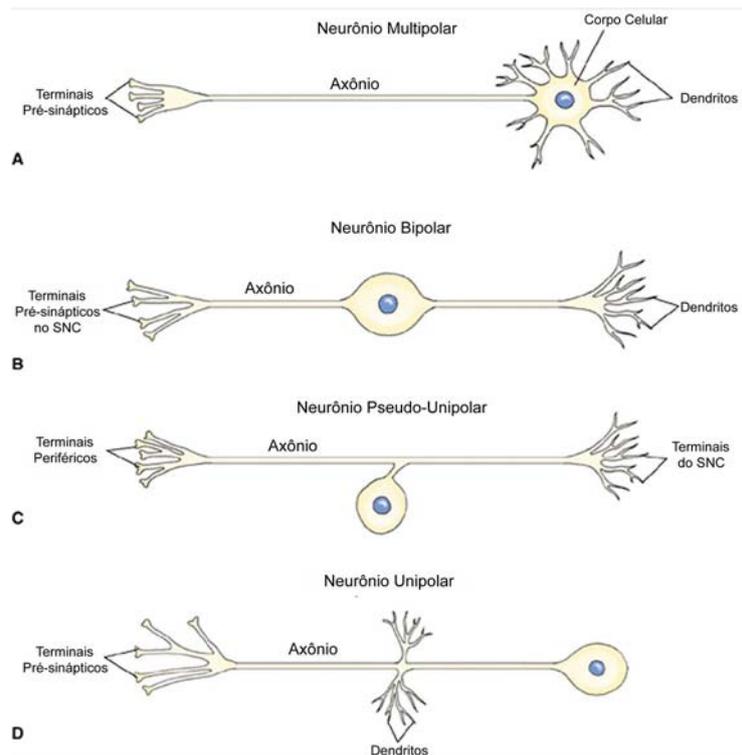


Figura 02 – Diferentes tipos de neurônios. (A) Neurônio Multipolar, (B) Neurônio Bipolar, (C) Neurônio Pseudo-Unipolar e (D) Neurônio Unipolar. Adaptado de Siegel, 2006.

1.4. O Nervo Ciático

O nervo ciático é o maior e mais longo nervo do corpo humano, forma a maior parte do plexo sacral e é formado pelos ramos anteriores de L4 a S3. É responsável por inervar a pele do pé, a maior parte da perna, os músculos posteriores da coxa, todos os músculos do pé e da perna e todos os ramos articulares do membro inferior. Curiosamente, o nervo ciático é tão grande que recebe seu próprio suprimento sanguíneo da artéria glútea inferior (Moore & Dalley, 1999).

Cada nervo ciático é revestido pelo epineuro, que consiste de uma densa camada de tecido conjuntivo e abriga vários subconjuntos de feixes revestidos pelo perineuro. No interior no perineuro, há outra camada de tecido conjuntivo chamada de endoneuro, que abriga as fibras nervosas (Fig. 03).

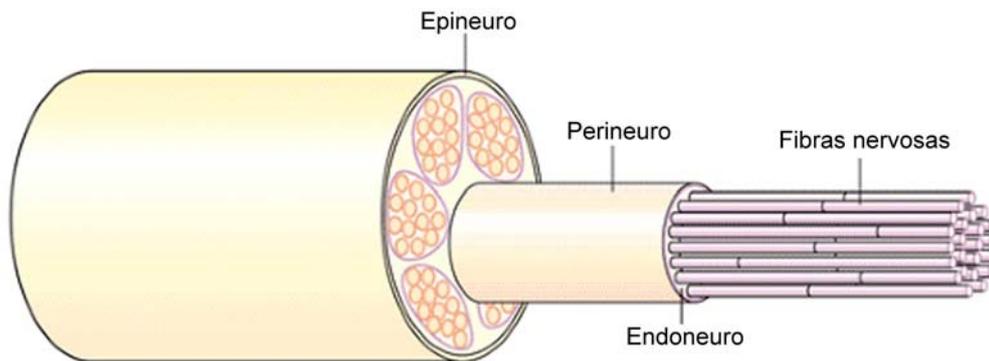


Figura 03 – Composição da estrutura e organização do nervo ciático. Presença de três subconjuntos de tecidos. Adaptado de Siegel, 2006.

Lesões no nervo ciático são comuns em acidentes automobilísticos e durante a prática de esportes como escalada e patinação. As lesões mais comuns no nervo ciático apresentam as seguintes características clínicas (Snell, 2006):

Motoras – Os tendões presentes na fossa poplíteia ficam paralisados, mas é possível uma leve flexão do joelho graças à ação do nervo femoral e do nervo obturador. Todos os músculos abaixo do joelho são paralisados e o peso do pé faz com que este assuma uma posição de flexão plantar, conhecida como pé eqüino.

Sensitivas – A sensibilidade é perdida abaixo do joelho exceto por uma área estreita abaixo do lado medial da parte inferior da perna e ao longo da borda medial do pé até a base do dedão, a qual recebe terminações do nervo femural.

Os resultados de reparo operativo em lesões do nervo ciático são pobres. É rara a completa recuperação sensitiva e de movimentos ativos nos pequenos músculos do pé. Perda de sensibilidade na sola do pé promove o aparecimento de inevitáveis úlceras tróficas (Snell, 2006).

1.5 As Fibras nervosas

1.5.1 Mielínicas

Os axônios dos neurônios que compõem o nervo ciático são completamente revestidos por uma bainha de mielina compacta, formada por um tipo celular exclusivo do sistema nervoso periférico: as células de Schwann (CS). Desde os primórdios da neurociência moderna, muitos cientistas vêm descrevendo a estrutura, função e relação da bainha de mielina com o axônio. Entretanto, até o desenvolvimento de técnicas para observação de material biológico através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), muitas das descrições estavam erradas. Ramon y Cajal (1928) descreveu a mielina como uma entidade independente das CS. Foi também descrita por Green (1954) como uma extensão espiralada da membrana plasmática das CS. Na medida em que as técnicas de coloração e componentes ópticos dos microscópios de luz, assim como agentes contrastantes e microscópios eletrônicos eram aperfeiçoados, a ultraestrutura da mielina foi intensamente investigada (Trapp e Kidd, 2004).

Podemos dividir a estrutura da fibra nervosa em nodo de Ranvier, paranodo e internodo. Em termos morfológicos simples, a mielina do internodo pode ser dividida em dois domínios: compacta e não compacta. A mielina compacta envolve o axônio e corresponde à maioria da mielina presente no internodo. O núcleo das CS está posicionado no meio dessa região, onde canais citoplasmáticos translúcidos, chamados de incisuras de Schmidt-Lanterman, atravessam radialmente a mielina compacta permitindo a comunicação da membrana do axônio com a região endoneural.

Uma vez que a maioria dos componentes da mielina são sintetizados na região perinuclear das células de Schwann, canais citoplasmáticos na superfície externa são necessários para expandir e suprir o internodo. As alças terminais da mielina, ou alças paranodais nas terminações laterais dos internodos são regiões de abundante adesão

entre a mielina e o axônio. As membranas da superfície interna da mielina estão em contato direto com os axônios e os canais citoplasmáticos transmitem sinais axonais que regulam a formação da mielina e ajudam a determinar o comprimento e a espessura do internodo (Trapp e Kidd, 2004).

A arquitetura multilamelar única da bainha de mielina foi descrita há décadas, porém, a criação dessa elaborada estrutura ainda é pouco conhecida. Ainda mais surpreendente é a precisa relação entre o diâmetro do axônio e o diâmetro da fibra mielínica, conhecido como relação G (*G ratio*). Fanarraga e cols. (1998), após transplantarem oligodendrócitos em tratos nervosos contendo axônios de diferentes tamanhos demonstraram que o número de lamelas é determinado pelo axônio e não pela glia, pois a espessura da bainha de mielina formada pelos oligodendrócitos transplantados era proporcional ao diâmetro do axônio.

Uma sinalização axonal chave para a regulação da espessura da bainha de mielina é através do fator de crescimento Neuregulina 1 (Nrg1) (Michailov e cols. 2004). As neuregulinas são proteínas transmembrana secretadas e codificadas por quatro genes. Os produtos do gene *Nrg1* foram isolados e caracterizados como potentes mitógenos para CS, ligantes para o oncogene neu e como moléculas estimuladoras para a formação de sinapses neuromusculares (revisado em French-Constant e cols., 2004). Todas as Nrg1s tem um domínio extracelular do tipo fator de crescimento epidermal (EGF) que pode ser secretado, ancorado à superfície celular como parte de uma isoforma transmembrana ou clivado. Dessa forma o domínio EGF da Nrg1 pode ser usado para sinalização de longo alcance e de curto alcance através do receptor ErbB (Falls, 2003).

O sistema receptor-ligante neuregulina/ErbB tem como função a sinalização de íntimo contato entre axônios e células mielinizantes. Os neurônios do SNP expressam

os ligantes da família das neuregulinas (Ho e cols., 1995), enquanto as células de Schwann expressam os receptores ErbB2 e ErbB3, que heterodimerizam para formar receptores funcionais para neuregulina (Vartanian e cols., 1997).

2. Neurodegeneração e Degeneração Walleriana (DW)

2.1 Aspectos Gerais

Primeiramente precisamos levar em consideração que o sistema nervoso, de uma maneira geral, não possui um mecanismo eficiente de regeneração ou reposição celular. Doenças ou traumas no SNC geram, na grande maioria das vezes, danos irreversíveis ao indivíduo, comprometendo gravemente a cognição e a locomoção, dentre outras funções. A capacidade de regeneração dos neurônios do SNC é muito pobre, provavelmente devido a eventos secundários às lesões, incluindo a formação de cicatriz glial (Ramón y Cajal, 1928; Stichel e cols. 1999; Fields e cols. 1999), presença de proteínas que inibem o crescimento dos axônios no local da lesão (Bandtlow e Schwab, 2000; Qiu e cols. 2000) e falta de acesso de fatores neurotróficos (Filbin, 2003; Sandvig e cols. 2004). Já os neurônios do SNP, após um trauma, encontram um ambiente muito menos hostil, ou seja, com menos fatores celulares e moleculares de repressão de crescimento axonal que o SNC (Stoll e cols. 2002).

A DW é um processo progressivo de destruição pró-ativa de um nervo lesionado e foi descrita em 1850 por Augustus Waller para nervos periféricos (Waller, 1850). Quando uma fibra nervosa é seccionada, uma série de eventos é desencadeada resultando na dissolução da porção distal dos axônios, remodelamento dos constituintes da fibra nervosa como, por exemplo, as células de Schwann e, posteriormente, a regeneração das fibras através do crescimento dos axônios.

As etapas da DW são muito bem definidas. Logo após a secção ou esmagamento do nervo, há o rompimento da membrana plasmática axonal ocasionando um grande influxo de Ca^{++} para o axoplasma, quebrando sua homeostasia no local da lesão. O aumento da concentração intracelular de Ca^{++} ativa enzimas proteolíticas conhecidas como calpaínas, que degradam os microtúbulos e causam a fragmentação do axônio (Schlaepfer e Bunge, 1973; George e cols., 1995). Zhai e colaboradores (2003) descreveram também a participação do sistema ubiquitina proteasoma (UPS) na DW, demonstrando que a inibição farmacológica do UPS pode atrasar marcadamente a DW em seus estágios iniciais, possivelmente estabilizando os microtúbulos.

A degeneração axonal ocorre frequentemente em muitos tipos de doenças neurodegenerativas crônicas e em injúrias a axônios causados por agentes tóxicos, isquemia e insultos traumáticos (Raff e cols. 2002, Coleman e Perry, 2002) e pode estar completa em 24 horas para fibras de pequeno calibre e 48 horas para fibras de grande calibre (Stoll e cols. 1989).

No SNP, a destruição da mielina, que também constitui um evento importante na DW, começa entre 12 e 24 horas após a lesão. A bainha se fragmenta em estruturas elipsóides oblongas que frequentemente contém resíduos de citoplasma chamados ovóides. Um terminal dessa estrutura elipsóide está localizado próximo ao nodo de Ranvier, o outro no meio do internodo (Koeppen 2004).

Durante o processo de DW há uma intensa sinalização com o objetivo de recrutar fagócitos, em especial macrófagos, para que seja feita a remoção dos remanescentes do axônio e da bainha de mielina (Griffin e cols. 1995), o que culmina na remoção completa da porção distal do nervo. A remoção dos remanescentes do nervo é um dos fenômenos cruciais para que o mesmo seja capaz de se reparar e regenerar.

Patologicamente, a degeneração e regeneração que ocorrem em humanos e em neuropatias periféricas experimentais são muito similares à DW. Essas similaridades têm permitido aos pesquisadores usar a DW experimental como uma ferramenta para estudar a patogênese e potenciais tratamentos para neuropatias periféricas (Glass, 2004).

De fato, a DW constitui um excelente modelo de estudo para traumas na medula espinal, além de compartilhar similaridades com muitas outras formas de degeneração axonal em doenças neurológicas em estágios finais e poder ser estudada em animais vivos e em culturas *in vitro* (Luo e O’Leary, 2005). A DW é um modelo de lesão simples e extremamente útil, com implicações para nossa compreensão da fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, inflamatórias e traumáticas do sistema nervoso (Stoll e cols., 2002).

Uma recente descoberta, e uma das mais interessantes no estudo da DW, foi o camundongo “Slow Wallerian Degeneration” (Wld^s). O camundongo Wld^s valida o conceito de que a DW não é o simples resultado da privação do axônio de proteínas que estejam sendo constantemente produzidas na porção distal à lesão, ou seja, ainda em contato com o corpo celular (Glass, 2004). Nesses camundongos, a degeneração da porção distal dos nervos seccionados é retardada devido à superexpressão de uma proteína quimérica, a Wld^s, composta pelos 70 primeiros aminoácidos da proteína de montagem da ubiquitina UFD2 fusionada à enzima nicotinamida mononucleotídeo adenililtransferase (Nmnat1), que está envolvida no metabolismo de NAD (Conforti e cols., 2000; Hagg e Oudega, 2006; Luo e O’Leary, 2005). Por não existir o domínio enzimático de poliubiquitinação nos primeiros 70 aminoácidos da UFD2, alguns pesquisadores propuseram que a Wld^s protege o axônio aumentando a atividade da Nmnat ou como uma proteína dominante negativa que interfere com a UFD2 e, assim,

com a degradação do citoesqueleto via proteasoma (Mack e cols., 2001; Coleman e Perry, 2002).

3. DNP e Neuroproteção

3.1. Mecanismos Moleculares de Neuroproteção

Apesar das muitas similaridades nos componentes celulares e moleculares, o SNC e o SNP possuem características próprias. A capacidade regenerativa talvez seja uma das diferenças mais evidentes entre o SNC e o SNP, e se deve primordialmente aos componentes moleculares de cada segmento do sistema nervoso. Esses constituintes são responsáveis não só por proteger o nervo após eventos traumáticos, mas também por remover moléculas que inibem a regeneração dos axônios, como, por exemplo, proteínas presentes nos debris celulares de mielina (NOGO, MAG, OMBP, etc).

Durante a DW no SNC, os axônios colapsam e se desintegram na mesma janela de tempo que no SNP (George e Griffin, 1994), mas a remoção dos debris de mielina contendo os inibidores de crescimento axonal é atrasada por meses (Perry e cols. 1987; Stoll e cols. 1989). Já o SNP recruta uma grande população de macrófagos hematogênicos e uma ampla distribuição dos sinais inflamatórios, características que o tornam mais hábil para remover sinais que impedem o crescimento axonal (Perry e cols., 1987; George e Griffin, 1994)

Os neurônios pseudo-unipolares presentes no GRD possuem duas ramificações (Fig. 02 da página 5). O ramo periférico apresenta uma resposta regenerativa robusta após uma injúria, enquanto que o ramo central que parte do GRD e segue para a medula espinhal apresenta uma contrastante incapacidade regenerativa (Teng e Tang, 2006).

Um dos fatores mais importantes que influenciam no sucesso do reparo de um nervo é o tempo decorrido entre a injúria e o início do tratamento ou cirurgia (Samii, e

cols., 2003). Estratégias farmacológicas para proteger os axônios contra a degeneração podem proteger os pacientes dos sintomas e deficiências associadas aos efeitos neuropáticos nos casos em que a degeneração axonal pode ser prevista como, por exemplo, no caso de tratamento com quimioterápicos, infecção por HIV e doença de Charcot-Marie-Tooth (Glass, 2004). Entretanto, estratégias para evitar a morte neuronal têm mostrado sucesso limitado na prevenção ou diminuição da neurodegeneração, sugerindo que a morte neuronal é um evento tardio na maioria das doenças e traumas, não sendo então um bom alvo terapêutico (Zhai e cols. 2003). É de interesse relatar que, os axônios que estão em processo de DW não parecem apresentar ativação detectável de caspases (Finn e cols., 2000). Dessa forma, a DW e apoptose constituem vias distintas de programas de autodestruição. Interferir com os processos de degeneração axonal pode representar um caminho terapêutico adicional e complementar para diversas formas de insultos (Zhai e cols. 2003).

O SNP possui uma capacidade regenerativa intrínseca. Entretanto, em muitos casos a regeneração é comprometida ou limitada por fatores como a severidade da lesão ou a distância entre o local da lesão e o órgão alvo. Muitas estratégias têm sido propostas na tentativa de facilitar a regeneração (Zhai e cols., 2003; Araujo Couto e cols., 2004; Camins e cols., 2006), tais como sustentar o crescimento axonal após uma transecção completa (Battiston e cols., 2005; Pereira Lopes e cols., 2006; Hattori e cols., 2008), ligar segmentos neurais desconectados (Meek & Coert, 2002), melhorar a sobrevivência celular e promover a recuperação funcional do membro (Lee e cols., 2005; Bregman e cols., 1997 e 2002).

Pearse e cols. (2004) descreveram uma estratégia na qual os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) foram aumentados para superar os aspectos inibitórios do sistema nervoso. A utilização de inibidores da enzima fosfodiesterase, que degrada o

AMPC, em conjunto com a administração do dibutilil-AMPC, um análogo do AMPC, promoveu o crescimento axonal e recuperação funcional em ratos após lesão na medula espinal.

O AMPC é um importante sinalizador intracelular em neurônios. Sua participação já foi demonstrada em processos como formação e consolidação de memória, neuritogênese, diferenciação e regeneração neuronais (revisado em De Felice e cols., 2007). Estratégias visando a modulação dos níveis de AMPC em neurônios, usando moléculas endógenas ou drogas que inibem a degradação deste sinalizador, se mostraram promissoras nos processos de diferenciação (Vaudry e cols., 2002) e regeneração (Nikulina e cols., 2004) neuronais, bem como na retenção de memória (Monti e cols., 2006).

Outros trabalhos também mostram que a presença do AMPC nos cones de crescimento influencia diretamente seu direcionamento (Song e cols., 1997), seu comportamento quimiotático (Ming e cols., 1997) e permite que neurônios de animais adultos estendam prolongamentos através de substratos inibitórios como mielina ou glicoproteínas associadas a mielina (MAG) (Cai e cols. 2001). A administração de neurotrofinas, como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator neurotrófico derivado de glia (GDNF), pode bloquear os efeitos inibitórios das MAGs aumentando os níveis de AMPC, provavelmente por inibir a enzima fosfodiesterase (Gao e cols. 2003).

Foi descrito por Wasilewska-Sampaio e cols. (2005) que a administração do 2,4-dinitrofenol (DNP) em culturas primárias de neurônios corticais e hipocámpais aumentou significativamente a concentração de AMPC, promovendo crescimento dos neuritos e aumento na expressão da proteína Tau, o que influencia na estabilidade dos

microtúbulos. O mesmo trabalho mostrou, ainda, que o DNP estimula a diferenciação neuronal em uma linhagem de células de neuroblastoma murino N2A.

3.2. APP e neuroproteção

A proteína precursora amilóide (APP) é membro de uma família de proteínas de membrana do tipo I. É uma proteína morforeguladora que apresenta uma região transmembrana, um grande domínio extracelular e uma pequena cauda intracelular. Foi descrita primeiramente como um receptor em função de sua estrutura (Kang e cols., 1987). Entretanto, ao contrário de outros receptores, só uma pequena parte da APP é transportada para a membrana plasmática dos neurônios para ali permanecer (Storey e cols. 1999).

A chamada via amiloidogênica de processamento da APP consiste da clivagem seqüencial da APP pela β -secretase (BACE) e pelo complexo γ -secretase (Haass, 2004), resultando em um fragmento de 40 a 42 aminoácidos conhecido como peptídeo β -amilóide, principal neurotoxina responsável pela doença de Alzheimer (De Felice e Ferreira, 2002; Ferreira e cols., 2007). Entretanto, a APP também pode ser processada por uma via não amiloidogênica pela α -secretase (Allinson e cols., 2003). Nesse caso, a clivagem resulta em um fragmento com propriedades neuroprotetoras conhecido como APP solúvel alfa, ou sAPP α (Mattson, 1994; Chen e cols., 2006).

Embora a maioria dos estudos envolvendo a APP tenha como foco a doença de Alzheimer, essa proteína também é responsável por um número significativo de eventos fisiológicos em células neurais, como crescimento celular, diferenciação e proliferação (revisado em Gralle e Ferreira, 2007). Nishimura (2003) mostrou que a expressão da APP é super-regulada de forma transiente nos neurônios do GRD durante a maturação e apoptose. Já se sabe que a expressão da APP em neurônios é elevada durante eventos

degenerativos (Wallace, e cols., 1993) e que, em uma linhagem celular imortalizada derivada de neurônios, APP aumenta a adesão ao substrato, a outras células da mesma linhagem e a gliócitos (Breen e cols., 1991).

A presença de APP tem sido demonstrada na membrana do corpo celular dos neurônios, mas também é transportada rapidamente de maneira anterógrada (Koo e cols., 1990). Parte das moléculas de APP é transportada para a membrana plasmática axonal, enquanto que as remanescentes podem ser transportadas para o terminal axônico e metabolizadas (Morin e cols., 1993).

No nervo ciático de ratos, o transporte da APP é bidirecional (tanto anterógrado quanto retrógrado) e feito juntamente com a presenilina-1, uma das constituintes do complexo γ -secretase (Edbauer e cols., 2003). Isso sugere que estas proteínas podem carregar informação tanto do corpo celular para o terminal axônico quanto na direção oposta (Papp e cols., 2002). Ainda não é bem descrito se o transporte da presenilina-1 e do complexo γ -secretase é feito com interações físicas diretas entre ambas (Xia e cols., 1997).

Há também uma íntima ligação entre a BACE-1 e a mielinização em nervos periféricos e centrais. Willem e cols. (2006) mostraram que camundongos *BACE^{-/-}* apresentavam hipomielinização periférica, feixes axonais anormais e acúmulo de neuregulina-1 não processada. Esses dados foram confirmados por Hu e cols. (2006), que também mostraram a importância da fosforilação de Akt na regulação da espessura na mielina.

3.3. O 2,4-dinitrofenol como um agente protetor

O 2,4-dinitrofenol (DNP) é um conhecido desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial. Foi proposto no início do século XX como uma droga para

redução de peso e controle da obesidade em humanos, sendo amplamente usado para este fim durante quase 10 anos. O uso excessivo gerou efeitos colaterais graves, incluindo cegueira e até morte, os quais levaram à proibição de sua prescrição para fins de tratamento de obesidade e perda de peso (Parascandola, 1974).

Em altas concentrações, o DNP interfere no metabolismo energético celular, desacoplando a fosforilação oxidativa, por meio do transporte de prótons através da membrana mitocondrial, desfazendo, assim, o gradiente eletroquímico formado pela cadeia de transporte de elétrons. Nos últimos anos, a utilização experimental do DNP tem mostrado uma série de efeitos neuroprotetores contra uma grande variedade de insultos. Alguns estudos mostraram que o DNP protege os neurônios da toxicidade induzida pelo peptídeo β -amilóide, principal neurotoxina envolvida na doença de Alzheimer (De Felice e cols. 2001, 2004). Foi descrito também que o DNP protege os neurônios contra a toxicidade induzida pela injeção intraestriatal de ácido quinolínico (um agonista de receptores de glutamato do tipo NMDA; Maragos e cols., 2003), atenua o dano oxidativo e aumenta a preservação de substância branca em um modelo experimental de trauma na medula espinhal (Jin e cols., 2004) e aumenta a preservação tecidual em traumas cerebrais (Pandya e cols., 2007). Apesar dos mecanismos envolvidos nas ações do DNP não estarem ainda completamente elucidados, é provável que existam efeitos tanto mitocondriais, como um leve desacoplamento e conseqüente redução na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), quanto não mitocondriais, como o aumento na concentração de AMPc, que possam explicar seu perfil benéfico neuroprotetor (De Felice e Ferreira, 2006; De Felice e cols., 2007).

Esta tese foi direcionada pela hipótese de que o DNP possa atuar *in vivo* como um agente neuroprotetor, capaz de bloquear a degeneração do citoesqueleto e resgatar

os neurônios da morte resultante de um trauma por esmagamento em um nervo periférico.

Objetivos

Os objetivos principais desta tese foram:

I) Avaliar os efeitos do DNP administrado de maneira sistêmica na degeneração axonal após lesão por esmagamento do nervo ciático em camundongos.

II) Analisar qualitativamente e quantitativamente aspectos morfológicos do nervo ciático após a lesão.

III) Investigar a distribuição de proteínas importantes para sobrevivência neuronal (APP) e mielinização (Nrg1) após lesão e tratamento com DNP.

IV) Avaliar qualitativamente alterações morfológicas mitocondriais induzidas pela lesão do nervo ciático e do tratamento com DNP.

V) Avaliar os efeitos do DNP na perda de função do membro posterior após lesão do nervo ciático.

Materiais e Métodos

1. Preparo das soluções de 2,4-dinitrofenol (DNP)

As soluções de DNP (Sigma) utilizadas no tratamento dos animais lesionados foram preparada diariamente em uma concentração inicial de 1 mM a pH 7.2 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e mantidas ao abrigo da luz envoltas em papel alumínio. As soluções permaneceram em constante agitação por no mínimo 2 horas. Após a completa dissolução do composto, essa solução estoque foi diluída com PBS até a concentração de 20 μ M e mantida à temperatura ambiente e protegida da luz até o momento de administração aos animais.

2. Animais e procedimentos cirúrgicos

Todos os experimentos de lesão por esmagamento do nervo ciático foram realizados utilizando camundongos Suíços com oito semanas de vida e pesando aproximadamente 30g cada, segundo procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ (protocolo # IBQM023). Utilizamos, primeiramente, vinte camundongos fêmeas isogênicas que foram distribuídas de forma aleatória em quatro grupos de cinco animais cada.

Após a separação em caixas apropriadas, cada animal foi anestesiado com uma solução contendo atropina 0,2 mg/kg, xilazina 5 mg/kg e quetamina 100 mg/kg. Após a devida verificação de que estes animais não sentiriam nenhum tipo de dor ou desconforto, a região posterior da pata traseira esquerda, mais precisamente a região da fossa poplítea e a parte posterior da coxa foi tricotomizada. Os animais foram posicionado sobre a mesa cirúrgica com o dorso voltado para cima e, então, foi feita uma incisão na pele de forma paralela ao fêmur e acima da fossa poplítea.

Posteriormente, foi feita uma abertura nos músculos que abrigam o nervo ciático sem que estes fossem cortados ou lesionados. Esse cuidado é muito importante, de forma a evitar uma resposta do organismo a uma lesão além da resposta especificamente induzida pela compressão do nervo.

Uma vez que o nervo foi exposto, um clipe de aneurisma de 10g de pressão (Kent Scientific Corp., Torrington, CT) foi colocado na metade da distância entre a fossa poplíteia e a junção do fêmur na bacia, onde foi feita uma compressão por 1 minuto. Após a compressão, os animais tiveram então os músculos colocados em suas posições originais e a pele suturada com um fio de nylon monofilamento preto 6.0 (Shalon suturas, GO, Brasil).

Os grupos experimentais foram divididos em animais que receberam injeções intraperitoneais de 0,5 ml de DNP 20 μ M nos tempos 0, 24 e 48 horas (grupo DNP3) ou 0, 12, 24, 36 e 48 horas (grupo DNP5) após a lesão. O grupo controle foi lesionado e cada animal recebeu injeções intraperitoneais contendo 0,5 ml de PBS nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas após a lesão.

Cada animal foi sacrificado exatamente da mesma forma em cada grupo experimental, de acordo com a técnica que seria aplicada para a obtenção dos resultados detalhados nos tópicos a seguir.

3. Processamento para microscopia óptica e eletrônica

Após as 48 horas de tratamento pós-lesão, os animais foram anestesiados profundamente com uma injeção intraperitoneal de 0,1 ml de pentobarbital 10 mg/Kg, posicionados sobre uma mesa de cortiça com a região ventral voltada para cima e com as patas traseiras e dianteiras fixas com alfinetes. A região abdominal dos animais foi aberta de forma perpendicular ao eixo da coluna logo abaixo do gradil costal, expondo o

diafragma. Este, então, foi aberto expondo o coração, no qual era inserida uma agulha conectada a uma seringa com solução fixadora contendo paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,2. No momento em que a solução foi injetada no ventrículo esquerdo de cada animal, o átrio direito foi aberto com uma tesoura a fim de liberar a saída do sangue e, posteriormente, da solução fixadora que, neste momento, perfundia todo o corpo do animal, especialmente o tecido nervoso. Dessa forma, obtivemos o animal completamente fixado, com um mínimo de alterações ultraestruturais decorrentes de sua morte. A porção proximal do nervo e os gânglios da raiz dorsal foram fixados por imersão em uma nova solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M posteriormente à perfusão. Esse material foi lavado em tampão fosfato 0,1 M e incubado por 24 horas em solução de sacarose 30% para crioproteção, em seguida posicionado em formas de papel alumínio, submerso em OCT (Sakura Finetechnical, Tóquio, Japão), congelado a -20°C dentro da câmara do criostato (Leica Microsystems, CM1850, Alemanha) e cortado em fatias de 12 µM de espessura. Os cortes foram coletados em lâminas de vidro e processados para imunofluorescência (veja abaixo).

Retiramos também dos animais fixados um segmento de 1 mm de comprimento da porção distal localizada 1 mm abaixo do sitio de lesão no nervo e fizemos uma segunda fixação por imersão em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% (Sigma, USA) diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (Sigma) por 2 horas. O material foi lavado em tampão cacodilato 0,1 M e pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio 1%, CaCl₂ 5 mM e ferricianeto de potássio 0,8%. Esse material foi, então, lavado em tampão cacodilato 0,1 M, em água desionizada e incubado em solução de acetato de uranila 1% por 24 horas. No dia seguinte, os nervos foram lavados em água e desidratados em soluções de concentrações crescentes de acetona (10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 90%,

100% e 100% super seca) e incubados em soluções de resina EPON (Ted Pella, USA) em acetona na proporção de 2:1 por 24 horas, 1:1 por mais 24 horas e em resina pura por mais 24 horas. No final da incubação em resina pura, os fragmentos foram posicionados em formas especiais de borracha, devidamente identificados e colocados em estufa a 60 °C por 72 horas. Após a polimerização da resina, os nervos foram cortados transversalmente em fatias de 500 nm de espessura em um ultramicrotomo (RMS Ultramicrotome MT6000-XC, RMS Inc., EUA) com facas de vidro. Os cortes foram coletados em lâminas de vidro e corados com solução de azul de toluidina 1% para posterior observação ao microscópio óptico. Fatias de 70 nm de espessura foram feitas com faca de diamante (Diatome), coletadas em grades de cobre de 300 mesh e contrastadas em solução de acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 2% para observação em um microscópio eletrônico Zeiss 900 operado a 80 kV. Tanto os nervos e ipsolaterais quanto contralaterais foram retirados e processados para análises.

4. Morfometria

Foram utilizados nas análises morfológicas somente os animais cujos cortes semi-finos, ou seja, de 500 nm de espessura, dos nervos não-lesionados não apresentavam nenhum tipo de alteração na morfologia, organização e densidade das fibras. Esse controle foi de extrema importância para garantirmos que as alterações observadas nos nervos lesionados eram fruto exclusivamente da lesão por esmagamento e não por qualquer condição gerada pela fixação do animal ou processamento do material.

Os nervos ipsolateral e contralateral de cada animal foram cuidadosamente observados ao microscópio óptico e as imagens foram divididas em cinco quadrantes

para que as fibras mielínicas tivessem, então, sua área total e área do axônio medidas. Foram medidas 40 fibras de cada quadrante do nervo, totalizando 200 fibras por animal.

5. Imunofluorescência para Proteína Precursora Amilóide (APP) e Neuregulina-1 (NRG1).

Os cortes congelados obtidos em criostato foram lavados em PBS, incubados em solução permeabilizante de Triton X-100 0,1% por 40 minutos, solução de cloreto de amônio 50 mM por 15 minutos e PBS/BSA 1% e 3% por 15 minutos cada. Foram utilizados anticorpos primários anti-APP (Chemicon, Billerica, MA) na diluição de 1:200 e anti NRG1 (Lab Vision Corp., Fremont, CA, EUA) na diluição de 1:2.000, ambos por 24 horas. Após a incubação dos anticorpos primários, o material foi lavado com PBS, bloqueado com PBS/BSA 1% e 3% por 15 minutos cada e incubado por 40 minutos ao abrigo da luz com anticorpo secundário IgG anti-mouse conjugada a Alexa 555 (Molecular Probes, Eugene, OR) diluído 1:5.000. Antes da montagem e vedação das lamínulas, o material foi incubado em solução de DAPI 0.01% por 5 minutos e lavado em água. Foi utilizado N-propil-galato 0.1M diluído em glicerol/PBS (9:1) para diminuir o decaimento da fluorescência dos anticorpos secundários. As lâminas foram observadas em um microscópio invertido de epifluorescência Nikon TE300 com aquisição digital para captura das imagens com lente objetiva de 100x de aumento com imersão em óleo.

6. Ensaio de perda de função do nervo ciático

O ensaio de função do nervo ciático foi realizado com o objetivo de monitorar como o tratamento com DNP afetaria diretamente na capacidade de caminhada do animal, o que reflete a progressão da degeneração Walleriana.

O nervo ciático, como já foi descrito anteriormente, inerva também os músculos responsáveis pela movimentação do calcanhar, estando, dessa maneira, diretamente relacionado com a capacidade de caminhada do animal.

Nosso modelo consistiu em realizar um ensaio funcional uma vez por semana durante seis semanas após a lesão. Os animais eram, primeiramente, habituados por 5 minutos a um corredor de madeira (medindo 30 cm de comprimento, 5 cm de largura interna e 5 cm de altura) contendo uma tira de papel absorvente (gramatura de 140 g/m²) durante uma semana antes da lesão (Fig. 04).

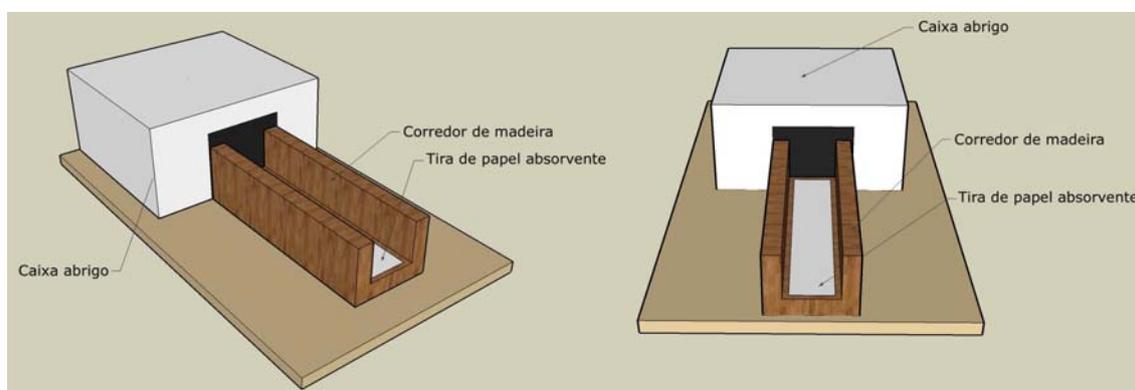


Fig. 04 - Desenho do sistema montado para adquirir as medidas das patas dos animais após lesão.

Em uma das extremidades do corredor era colocada uma caixa com uma pequena abertura (caixa abrigo), suficiente para um camundongo entrar. Os animais eram colocados um por vez no corredor, que podiam explorar livremente sem obrigação de caminhar em uma direção específica. Durante esse processo, todos os animais exploravam todo o corredor e, por fim, caminhavam em direção à caixa abrigo. Essa etapa de habituação foi crucial para que os animais não parassem para explorar o corredor nem corressem para o lado oposto durante a realização dos experimentos.

Os animais foram lesionados como descrito acima (seção 2 dos Materiais e Métodos). O DNP foi administrado semanalmente (0.5 ml, 20 µM). Uma semana após a lesão, todos os animais tiveram suas patas traseiras pintadas com tinta atóxica de cor

preta e foram colocados para caminhar no corredor. As impressões das patas ficaram marcadas no papel absorvente, o qual foi devidamente identificado e guardado para posterior análise. Foi necessário que, em cada tira de papel, houvesse no mínimo cinco pares de patas (pata direita e esquerda) impressos, com a mesma distância entre eles. Dessa forma, tivemos certeza de que o animal manteve uma velocidade constante durante aquela caminhada, não havendo alteração no padrão da pegada em função da velocidade.

A distância (em cm) entre o primeiro e o quinto dedo foi medida tanto da pata do membro correspondente ao nervo lesionado quanto do não lesionado (Fig. 05). A pata do membro não lesionado de cada animal foi usada como controle.

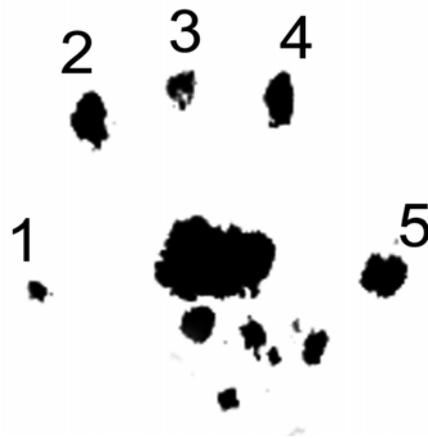


Fig. 05 – Pegada de um animal não lesionado. Os dedos numerados correspondem: 1 – hálux; 2 – segundo pododáctilo; 3 – terceiro pododáctilo; 4 – quarto pododáctilo e 5 – quinto pododáctilo.

Resultados

1. Artigo “Systemic administration of 2,4-dinitrophenol protects against sciatic nerve degeneration following a crushing injury”.

O trabalho mostra os resultados das abordagens experimentais descritas nesta tese. O estudo da degeneração Walleriana no nervo ciático de camundongos é uma ferramenta excelente para entender os diversos fenômenos envolvidos nos processos neurodegenerativos e a utilização do DNP como um agente neuroprotetor abre caminho para uma estratégia completamente nova nesse campo. Esse trabalho encontra-se em fase final de revisão para submissão.

Resumo

A degeneração de nervos periféricos acontece através de um processo conhecido como Degeneração Walleriana, levando à denervação dos músculos-alvo e perda da função motora. Estudos anteriores de nosso e de outros grupos demonstraram que o 2,4-dinitrofenol (DNP) causa aumentos nos níveis intracelulares de AMP cíclico e da proteína ligadora de microtubulos, tau, e promove neuritogênese em culturas neuronais primárias *in vitro*, além de preservar a substância branca após trauma de medula espinal *in vivo*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da administração sistêmica de DNP na degeneração do nervo ciático de camundongos após trauma por esmagamento induzido pela aplicação de um clipe de aneurisma de 10 g por 1 minuto no nervo ciático esquerdo. Quatro grupos de camundongos Suíços adultos fêmeas foram usados: não lesionado, lesionado recebendo veículo (PBS), lesionado recebendo 3 doses (a cada 24 horas) de DNP (0.06 mg/kg) e lesionado recebendo 5 doses (a cada 12 horas) de DNP. Os animais foram sacrificados 48 horas após a lesão e tanto os nervos lesionados quanto os não lesionados (contralaterais) e os gânglios da raiz dorsal correspondentes foram processados para microscopia de luz e eletrônica. Usando critérios morfométricos, ultraestruturais e bioquímicos, demonstramos aqui que o DNP protege contra a degeneração axonal dos nervos lesionados. Especificamente, o DNP bloqueou a desintegração do citoesqueleto, impediu alterações morfológicas mitocondriais e preservou a imunoreatividade das proteínas APP e Neuregulina 1 nos nervos lesionados. Um teste funcional de locomoção foi realizado para avaliar o desempenho dos animais pós-lesão e mostrou que os animais tratados com DNP apresentaram a função do membro significativamente preservada em relação aos animais lesionados não tratados. Os resultados indicam que o DNP protege o nervo contra danos após a lesão e sugerem que este pode ser um adjuvante no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas em lesões nervosas.

**2,4-Dinitrophenol blocks neurodegeneration and preserves sciatic nerve function
following trauma**

Rodrigo F. Madeiro da Costa¹, Ana M. Blanco Martinez^{2*} and Sergio T. Ferreira^{1,2*}

¹Programa de Bioquímica e Biofísica Celular, Instituto de Bioquímica Médica,

²Programa de Neurobiologia Básica e Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

* Corresponding authors: Sérgio T. Ferreira, Instituto de Bioquímica Médica,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil; Email:
ferreira@bioqmed.ufrj.br, Phone/Fax: +55(21)3888-8308; Ana M. B. Martinez,
Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de
Janeiro, RJ 21941-590, Brazil; Email: martinez@histo.ufrj.br; Phone/Fax:
+55(21)2562-6431.

Running title: DNP blocks axon degeneration

Abstract

Preventing the harm caused by nerve degeneration is a major challenge in neurodegenerative diseases and in various forms of trauma to the nervous system. The aim of the current work was to investigate the effects of systemic administration of 2,4-dinitrophenol (DNP), a compound with newly recognized neuroprotective properties, on sciatic nerve degeneration following a crushing injury. Sciatic nerve injury was induced by unilateral application of an aneurism clip. Four groups of mice were used: uninjured, injured treated with vehicle (PBS), injured treated with 2 intraperitoneal doses of DNP (0.06 mg DNP/kg every 24 hours) and injured treated with 4 doses of DNP (every 12 hours). Animals were sacrificed 48 hours post-injury and both injured and uninjured (contralateral) sciatic nerves were processed for light and electron microscopy. Morphometric, ultrastructural and immunohistochemical analysis of injured nerves established that DNP prevented axonal degeneration, blocked cytoskeletal disintegration and preserved the immunoreactivities of amyloid precursor protein and neuregulin 1, proteins implicated in neuronal survival and myelination. Functional tests revealed preservation of limb function following injury in DNP-treated animals. Results indicate that DNP prevents nerve degeneration and suggest that it may be a useful small-molecule adjuvant in the development of novel therapeutic approaches in nerve injury.

Key words: peripheral nervous system, nerve degeneration, neuroprotection, amyloid precursor protein, neuregulin

Introduction

Axon degeneration is a common denominator in several types of traumatic injury to the nervous system and in neurodegenerative diseases (Coleman and Perry, 2002). It results in impairment of anterograde and retrograde transport and loss of neuronal connectivity, which culminate in nerve cell dysfunction and death.

Degeneration of the peripheral nervous system (PNS) is a progressive process that can be initiated by trauma or disease. Following an injury, a well described series of events, known as Wallerian degeneration (WD), occurs in the distal segment of the injured nerve (Beirowsky et al., 2005; Waller, 1850). The loss of connection between the cell body and the axon terminal is damaging not only to the neuron itself but also to the corresponding innervated muscle and, therefore, affects both motor neuron integrity and limb function (Dyck et al., 1984).

Although PNS neurons have an intrinsic regenerative capacity, regeneration is often compromised or limited by factors such as the severity of the lesion and the distance between the site of injury and the target organ. Blocking axonal degeneration should be an integral part of the development of novel approaches to preserve nerve structure and to optimize conditions for regeneration following trauma. In fact, functional impairment of target muscles can result if nerve regeneration takes too long to complete. Axonal preservation may be a crucial antidegenerative strategy than can not only rescue axons from axoplasmic disintegration but also, as a consequence, protect neuron cell bodies from death and accelerate regeneration. Moreover, blocking degeneration potentially opens a time window in which pro-regenerative therapeutics can be introduced. Surprisingly, however, few studies so far have effectively explored anti-degenerative approaches in

the development of treatments for nerve trauma. Strategies have been proposed to limit the progression of WD (Araújo-Couto et al., 2004; Camins et al., 2006; Zhai et al., 2003), to support axon re-growth after complete transection (Battiston et al., 2005; Hattori et al., 2008; Pereira Lopes et al., 2006), to bridge disconnected neural stumps (Meek and Coert, 2002), to improve cell survival (e.g., through the use of N-acetylcysteine as a safe pharmaceutical agent that protects cells from oxidative damage; West et al., 2007; Moschou et al., 2008; Reid et al., 2009) and promote recovery of limb function (Bregman et al., 2002; Bregman et al., 1997; Lee et al., 2005). However, effective strategies to block axonal degeneration are still lacking.

2,4-Dinitrophenol (DNP) is a classical uncoupler of mitochondrial oxidative phosphorylation (Parascandola, 1974) with newly recognized neuroprotective actions (for reviews, see De Felice and Ferreira, 2006; De Felice et al., 2007). We recently demonstrated that DNP stimulates neuronal differentiation and neurite outgrowth in primary cortical and hippocampal neuronal cultures, as well as in a neuroblastoma cell line, and that this effect is at least in part related to increased neuronal levels of cAMP (Wasilewska-Sampaio et al., 2007). Significantly, modulation of cAMP levels has been proposed as a possible strategy to promote regeneration and functional recovery in spinal cord injury (Hanson et al., 1998; Qiu et al., 2002; Pearse et al., 2004). Other recent studies have shown neuroprotective actions of DNP against different types of neuronal injury (De Felice et al., 2001, 2004; Maragos et al., 2003; Jin et al., 2004; Pandya et al., 2007). Taken together, these previous findings suggested that DNP might exert a protective effect against degeneration of peripheral nerve.

The current work was driven by the hypothesis that DNP could block axon degeneration *in vivo* and rescue neurons from death following a crushing injury to peripheral nerve. Results showed a significant reduction in post-injury axonal

degeneration in sciatic nerves of DNP-treated animals, verified by morphometric, ultrastructural and immunocytochemical assays probing important proteins related to cell survival such as amyloid precursor protein (APP) and Neuregulin-1 (Nrg1), which is directly involved in axonal myelination. Importantly, limb function was significantly preserved in DNP-treated versus untreated injured animals. These findings suggest that DNP can be a novel small-molecule adjuvant in the development of therapeutic approaches in nerve injury.

Materials and Methods

DNP solutions and animal treatments: DNP (Sigma, St. Louis, MO) solutions were prepared daily at a final concentration of 20 μM in phosphate buffer saline (PBS), filtered through 0.45 μm Millipore filters and kept at room temperature and protected from light until use. Twenty adult female Swiss mice (approximate weight 30 g) were randomly divided into four experimental groups: (1) control group, which was maintained under the same conditions as the other groups but did not undergo any surgical procedures; (2) vehicle group, which was subjected to sciatic nerve injury and received four intraperitoneal (IP) injections of 0.5 ml of PBS (immediately after, 12 h, 24 h and 36 h post-injury); (3) “DNP 2” group, which was subjected to sciatic nerve injury and received two IP injections of 0.5 ml of 20 μM DNP solution (immediately after and 24 h post-injury); (4) “DNP 4” group, which was subjected to sciatic nerve injury and received four IP injections of 0.5 ml of 20 μM DNP solution (immediately after, 12 h, 24 h and 36 h post-injury). Animals used in the functional assay (see “Results”) received a 0.5 ml injection of 20 μM DNP (or PBS vehicle) immediately after surgery and then once a week for 6 weeks.

Surgical procedures: Surgeries were always performed in the morning period with controlled light and temperature. All animals were deeply anesthetized with ketamine (100 mg/kg), xylazine (5 mg/kg) and atropine (0.2 mg/kg) by intramuscular injection. The left hind limb was tricotomized, the sciatic nerve was exposed at mid-thigh and was clipped using a 10 g aneurism clip (Kent Scientific Corp., Torrington, CT) for 1 minute. Initial experiments demonstrated that this injury promoted extensive degeneration of the majority of sciatic nerve fibers after 48 hours (data not shown). Animals were sutured, received the first dose of DNP (or vehicle) and were returned to individual cages with food and water *ad libitum*. All procedures were in agreement with and were approved by the Committee for Ethics on Animal Experimentation of the Federal University of Rio de Janeiro (Protocol # IBQM 023).

Light and electron microscopy: After DNP treatment, animals were sacrificed and subjected to transcardiac perfusion with 4% p-formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Sciatic nerves were dissected and a 1 mm-long segment of the distal portion of the injured nerve located 1 mm away from the lesion site was additionally fixed by overnight immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer. Corresponding dorsal root ganglia and the proximal segments of sciatic nerves were immersed in the same fixative solution used in perfusion. The glutaraldehyde-fixed material was processed for light and electron microscopy as described below.

Nerves were removed from glutaraldehyde, washed in 0.1 M Na-cacodylate and post-fixed in 1% OsO₄ in 0.1 M Na-cacodylate buffer containing 5 mM CaCl₂ and 0.8% potassium ferricyanide. Nerves were then washed, dehydrated in acetone and embedded in Epon. Semi-thin sections were collected on glass slides and stained with 1% toluidine blue solution for morphometric analysis. Ultra thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and were imaged on a Zeiss 900 electron microscope operated at

80 kV. In order to allow proper quantitative analysis and reduce possible experimental biases, samples were imaged and documented in a standardized fashion. Briefly, we used 300 mesh microscopy grids (RMS Ultramicrotome MT6000-XC, RMS Inc., EUA) and the upper left corners of twenty individual mesh were photographed at 7,000 x magnification for each grid. Using axonal cytoskeleton integrity as the ultrastructural criterion for axonal degeneration, two independent observers performed a double-blinded counting of intact axons, partially degenerated axons, completely degenerated axons and axons with myelin alterations for each experimental condition.

Formalin-fixed material was processed for immunofluorescence microscopy. L4 and L5 dorsal root ganglia and proximal nerve segments from each injured sciatic nerve were washed in 0.1 M phosphate buffer, incubated in 30% sucrose overnight and immersed in Tissue-Tek OCT compound for cryosectioning in a Leica CM1850 cryostat. Twelve μm thick cryosections were washed in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0, permeabilized with 0.01% Triton X-100, blocked with 50 mM NH_4Cl and, subsequently, with 1% and 3% BSA. Sections were incubated overnight with anti-APP (Chemicon, Billerica, MA) or anti-neuregulin (Neomarkers, Fremont, CA) antibodies followed by 40 minute incubation with Alexa 555-conjugated anti-mouse IgG (Molecular Probes, Eugene, OR).

Immunofluorescence assays were performed using the same antibodies and dilutions for all experimental groups. Image acquisition parameters and conditions were rigorously the same for all samples. Eighteen images were acquired on a Nikon TE300 microscope from both injured and uninjured (contralateral to the compression injury) nerves for each of the five animals used in each experimental group. The same protocol was used in nerve sections immunostained for either APP or Nrg1. For each animal, each set of eighteen images was grouped into a single montage panel using NIH Image J

software (Abramoff et al., 2004). This panel was then converted into an 18 bit image and the integrated fluorescence intensity of the whole panel was measured after appropriate thresholding. Thus, integrated fluorescence intensities shown on Figs. 4g and 5g represent results obtained from a total of 90 images per experimental condition.

Morphometry: Toluidine blue-stained semi-thin sections were observed through a 100x objective and images were acquired as described above. Five animals were used per experimental group and two hundred fibers from each animal were randomly imaged, totaling one thousand fibers per condition. Total fiber and axon areas were manually measured using Image J (NIH) software specifically calibrated to our microscope's final magnification. The ratio between axon and fiber areas, known as G ratio, was used as a morphofunctional index that is directly related to nerve fiber electric conductance and myelin thickness (Gillespie and Stein, 1983).

Functional assay: Mice were tested for limb function using the walking track test in a wooden corridor 5 cm wide by 30 cm long covered with a 140 g/m² paper strip, as previously described (Varejão et al., 2001, 2004). Animals were allowed to explore and walk freely in the walking track test corridor for 5 min per day for at least one week before surgical procedures. This training was crucial to avoid unwanted animal stops during the paper stripe crossing. After surgery, animals were allowed to recover from anesthesia and were submitted to the walking track test. The test was repeated once a week for 6 weeks. Animals had their hind paws painted with non-toxic ink immediately before crossing the wooden corridor, so as to record their footprints for later analysis. The distance between the first and fifth toes of the injured limb's paw was used as a parameter to evaluate loss of limb function following injury (Bozkurt et al., 2008). Footprints from the uninjured limb of each animal were used as controls.

Statistical analysis: Statistical significances of differences between experimental groups were analyzed by ANOVA using GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA). A *p* value of 0.05 was regarded as significant and all results are expressed as means \pm SEM.

Results

DNP blocks axon degeneration following a crushing injury: Sciatic nerves from control, uninjured mice presented a mixture of myelinated and unmyelinated fibers. Myelinated fibers were characterized by a thick and continuous myelin sheath and by axons presenting normal cytoskeleton content. Unmyelinated fibers, on the other hand, were difficult to characterize by light microscopy and were further investigated by electron microscopy (see below). In uninjured animals, nerve cross-sections were filled with fibers presenting no indication of degeneration (**Fig. 1a**). Forty eight hours after injury, sciatic nerves from mice that received vehicle injections exhibited extensive areas of edema and a significant decrease in fiber density (**Fig. 1e**). The sizes and shapes of fibers in sciatic nerves from vehicle-treated injured animals were considerably more heterogeneous than in nerves from control mice and exhibited morphologies suggestive of on-going Wallerian degeneration. Inspection of nerves from animals in the “DNP 2” group (which received two IP injections of DNP immediately after and 24 h after injury) revealed clear reductions in edema and in signs of degeneration; however, the sizes and shapes of fibers were still more heterogeneous than in control nerves (**Fig. 1i**). Remarkably, nerves from the “DNP 4” group of mice (which received five IP injections of DNP immediately after, 12 h, 24 h and 36 h after injury) presented almost no indication of fiber degeneration and very little or no edema (**Fig. 1m**).

Toluidine blue-stained semi-thin sections of injured and uninjured nerves were used to measure the areas of myelinated fibers and the corresponding axon areas. Fiber and axon areas are defined by the outer and inner limits of the myelin sheath, respectively. Figure 1 shows distributions of fiber and axon areas obtained from quantitative analysis of 1,000 fibers from five animals (200 fibers from each animal) for each experimental group. Uninjured nerves presented fairly homogeneous distributions of axon areas (centered about $6 \mu\text{m}^2$) and myelinated fiber areas (centered about $9 \mu\text{m}^2$; **Fig. 1, panels b,c**). By contrast, nerves from vehicle-treated injured animals presented very broad distributions of both axon and fiber areas (**Fig. 1, panels f,g**). The distributions of fiber and axon areas were considerably more homogeneous in the “DNP 2” group of injured mice (**Fig. 1, panels j,k**) and were virtually indistinguishable from the distributions in uninjured control animals in the “DNP 4” group (**Fig. 1, panels n,o**).

The ratio between axon and fiber areas (known as G ratio) defines a useful morphofunctional index that is related to the efficiency of impulse conduction by the nerve (28). Optimal conduction is observed at G ratios close to 0.5 and deviations from this value predict defective conductance and impaired nerve function (28). Figure 1d shows that, as expected, uninjured nerves presented a distribution of G ratios ranging from 0.3 to 0.5. A marked shift in the distribution of G ratios to lower values was observed in the vehicle-treated group of injured animals (**Fig. 1h**). Interestingly, the distributions of G ratios were considerably preserved in the “DNP 2” and, especially, in the “DNP 4” groups of injured mice (**Fig. 1, panels l and p**, respectively). Another way to perform the G ratio analysis is to calculate the mean value of G ratio in each experimental condition. Figure 1q shows that uninjured fibers presented a mean G ratio of 0.38 ± 0.07 . At 48 hours post-injury, mean G ratio values of 0.27 ± 0.04 , 0.36 ± 0.01 and 0.41 ± 0.01 were obtained for vehicle-treated, “DNP 2” and “DNP 4” groups,

respectively. Taken together, these results showed that DNP treatment preserved tissue architecture, reduced edema and prevented fibers from entering WD, resulting in morphological and functional preservation of the injured nerves.

Nerve fiber ultrastructure is preserved by DNP: Disruption of the cytoskeleton and of the integrity of the myelin sheath are ultrastructural criteria for axon degeneration and functional impairment. Transmission electron microscopy analysis of uninjured nerves showed well preserved myelinated fibers with axons completely filled with cytoskeleton components (microtubules and neurofilaments) and surrounded by thick, electron dense ring-shaped myelin sheaths (**Fig. 2a**). Mitochondria profiles were easily found embedded in the axoplasm and showed well defined cristae. Unmyelinated fibers (Remak bundles) were observed in many regions of the nerve and showed a similar axoplasmic content. At 48 h post-injury, partially and completely degenerated axons, presenting partial or complete degradation of cytoskeleton components, respectively, were abundantly found in nerve sections (**Fig. 2b**). Degraded or abnormal myelin sheaths were frequently observed in injured nerves (**Fig. 2c**). Unmyelinated fibers were also observed and presented prominent alterations in cytoskeleton content (**Fig. 2b**). Macrophage and neutrophil infiltration into the distal segment of the degenerating nerve are critical steps in WD and, as expected, those cell types were indeed found in injured nerves of all the animals used in this study (**Fig. 2b**).

Based on quantitative analysis of fiber ultrastructure (see “Materials and Methods”), fibers were classified as normal, partially degenerated, completely degenerated or fibers exhibiting myelin abnormalities. Even though normal fibers were present in all experimental groups, their abundance differed sharply between groups. Control, uninjured nerves presented, on average, 120 ± 4 normal fibers counted in

twenty independent microscopic fields (N = 5 animals; **Fig. 3a**). At 48 h post-injury, there was a massive reduction to an average of 12 ± 2 normal fibers (counted in 20 microscopic fields per animal; N = 5) in the vehicle-treated injured group, representing a 90% decrease compared to control animals. Significantly, DNP treatment preserved axons from degeneration in a dose-dependent manner (**Fig. 3a**).

Conversely, while we did not find any partially or completely degenerated fibers in the uninjured control group, nerves from vehicle-treated injured animals presented 30 ± 3 partially (**Fig. 3b**) and 26 ± 3 completely degenerated fibers (**Fig. 3c**). Numbers of partially and completely degenerated fibers were significantly decreased in the “DNP 2” and “DNP 4” groups (**Fig 3b,c**).

Similar results were obtained when the number of fibers exhibiting myelin abnormalities was analyzed (**Fig. 3d**). Control uninjured nerves showed no cases of myelin abnormalities (in 20 independent microscopic fields analyzed per animal; N = 5), whereas nerves from vehicle-treated injured animals showed large numbers of fibers with myelin alterations. Compared to vehicle-treated animals, nerves from the “DNP 2” group presented a 25% reduction and those from the “DNP 4” group presented a 60% reduction in the number of fibers exhibiting myelin alterations.

Expression of APP and neuregulin 1 is preserved in DNP-treated nerves:

Neuronal APP mediates cell adhesion to substrate and to glial cells (Breen et al., 1991) and its expression is elevated during degenerative events (Wallace et al., 1993). In peripheral nerves, adhesion to Schwann cells determines the thickness of the myelin sheath (Falls, 2003). A key axonal signaling molecule involved in regulating the thickness of the myelin sheath is neuregulin 1 (Nrg1), a growth factor that anchors to specific ligands in the Schwann cell membrane (Michailov et al., 2004). Given the important roles played by these proteins in cell survival, adhesion and myelination, we

evaluated APP and neuregulin levels by immunohistochemistry in the proximal segments of both injured and uninjured nerves. Compared to uninjured (contralateral) sciatic nerves, a significant reduction in APP immunoreactivity was observed in injured nerves from vehicle-treated animals 48 hours post-injury (**Fig. 4a,b**). Quantitative immunofluorescence analysis showed that injury reduced APP labeling by 42% compared to the uninjured side (**Fig. 4g**) and administration of DNP prevented the reduction in APP labeling (**Fig. 4c-g**). In fact, APP immunoreactivities in injured nerves from DNP-treated mice were slightly higher than the levels in uninjured nerves. Uninjured (contralateral) nerves from vehicle-, DNP3- and DNP5-treated animals presented no significant differences in APP labeling.

Similar results were observed with neuregulin1 (Nrg1) staining (**Fig. 5**). Injured nerves presented a 50% decrease in Nrg1 staining compared to uninjured nerves from vehicle-treated animals (**Fig. 5g**) and this reduction was blocked by DNP treatment.

As a control, we performed experiments following exactly the procedures described above and immunolabeling nerve sections for neurofilament. Because the proximal segment of the injured nerve does not undergo Wallerian degeneration, the axonal cytoskeleton would not be expected to exhibit significant changes under these experimental conditions. Indeed, results showed no alteration in immunostaining for neurofilament, suggesting that changes in APP and Nrg1 immunoreactivities were not part of a global, generalized alteration in staining for proteins in the proximal segment of sciatic nerves (Supp. Fig. 1).

DNP up-regulates APP expression in dorsal root ganglia neurons: The cell bodies of sensory neurons whose fibers constitute the sciatic nerve are located in the L4 and L5 dorsal root ganglia (DRG). Because DNP treatment was found to preserve APP

expression in the proximal segments of injured nerves, we further sought to examine APP expression in DRG in injured animals.

Figure **6a,b** shows typical staining for APP in dorsal root ganglion cells. Neither satellite cells nor Schwann cells presented staining for APP and similar results were obtained for both L4 and L5 ganglia (data not shown). Cell bodies from both injured and uninjured nerves presented a punctate perinuclear staining pattern for APP, showing that injury itself did not alter the APP immunolabeling pattern after 48 hours. DRG neurons from DNP-treated mice showed increased punctate APP staining around the nuclei and, in some cases, close to cell boundaries (**Fig. 6c-f**), with a more prominent effect in nerves from the “DNP4” group than from the “DNP2” group.

Changes in APP expression were further analyzed by calculating integrated fluorescence intensities in panels containing twenty images per experimental group. Panels g and h show integrated immunofluorescence intensities (normalized by cell numbers) for APP immunostaining in DRG corresponding to injured and uninjured nerves. Compared to vehicle-treated animals, DRG from DNP-treated animals presented significant increases in APP immunoreactivity.

DNP treatment attenuates post-injury decline in limb function: Limb function was assessed following injury using a walking track test (see “Methods”). Figure **7a** shows typical examples of footprints of the left hind limb from animals belonging to the four experimental groups used in the present study. At 6 weeks post-injury, a dramatic reduction was verified in toe spread (i.e., the distance between the first and fifth toes) of the injured limb in vehicle-treated animals, whereas DNP 2- and DNP 4-treated animals presented partial and complete preservation, respectively, of the distance between toes.

Measurements of toe spread (specifically the distance between the first and fifth toes) were used as a parameter for evaluation of limb function as previously proposed

(Bozkurt et al., 2008). Following sciatic injury, animals were submitted to a walking track test once a week for 6 weeks and their toe spreads were measured (**Fig. 7b**). As expected, uninjured animals maintained a constant toe spread (averaging 1 cm) during the 6 weeks of investigation. By contrast, vehicle-treated injured animals presented a progressive decrease in toe spread over the course of six weeks. Interestingly, injured mice from the DNP2- and DNP4-treated groups exhibited significantly less reduction in toe spread, indicating that DNP treatment attenuated limb functional loss in the weeks following injury.

We note that during the six weeks of treatment, DNP-treated animals showed no signs of weight loss (Supp. Fig. 2) or behavioral alterations, indicating that, at the low doses utilized, DNP did not induce mitochondrial uncoupling or generalized toxicity.

Discussion

Following traumatic nerve injury, the distal segments of injured axons undergo Wallerian degeneration (WD). This process can also be triggered by ischemia, metabolic disorders and neurodegenerative diseases, suggesting a common mechanism underlying these pathologies. Strategies to prevent or block WD could lead to a better understanding of mechanisms of neurodegeneration, ischemia and trauma of the nervous system and to the development of novel therapeutic drugs for these conditions. Despite this obvious importance, anti-degenerating strategies still constitute a neglected target for pharmacological therapy.

Peripheral nerve injury results in loss of motor and sensory functions. Different strategies have been proposed to prevent degeneration and/or to improve fiber regeneration following injury. Although recent studies have reported promising results, effective anti-degenerative approaches are still lacking. We now demonstrate that DNP blocks sciatic nerve degeneration following compression injury. We also show that DNP treatment preserves the levels of APP and Nrg1, proteins implicated in neuronal survival and myelination, in injured nerves and protects against limb loss of function following injury.

The first ultrastructural alteration in WD is a progressive disintegration of the cytoskeleton in the distal stump of the injured nerve. The current results show that DNP treatment rescued a significant number of myelinated fibers from undergoing WD. Blockade of cytoskeleton degradation constitutes a possible mechanism for preservation of the axoplasm. We recently reported that DNP increases levels of microtubule-associated protein tau in primary neurons in culture (Wasilewska-Sampaio et al., 2005). Tau stabilizes microtubules by interacting with tubulin to promote its assembly. Indeed,

one of the main functions of tau is to regulate the stability of axonal microtubules (Drubin and Kirshner, 1986; Weingarten et al., 1975). It is, thus, possible that stabilization of axonal cytoskeleton in the nerves of DNP-treated animals is related to increased tau expression.

DNP has also been shown to increase intracellular levels of cAMP in neurons (De Felice et al., 2007; Wasilewska-Sampaio et al., 2005). cAMP is an important cellular second messenger and is involved in many signaling cascades including cell survival pathways (Hanson et al., 1998). Interestingly, elevated cAMP levels have been shown to abrogate myelin-MAG inhibition of neurite outgrowth in mature neurons (Cai et al., 2001) and to promote increased neurite extension and neuronal differentiation (Wasilewska-Sampaio et al., 2005). Moreover, increased cAMP levels up-regulate expression of APP (Lee et al., 1997), likely explaining the increase in APP levels in sciatic nerves from DNP-treated animals (see below). These observations suggest that another mechanism by which DNP promotes neuronal survival and preserves axonal ultrastructure may be related to increased cAMP levels.

Although, at high concentrations, DNP is a well known mitochondrial uncoupler, we have previously demonstrated that at low concentrations (up to 20 μ M) DNP does not affect neuronal viability (De Felice et al., 2001) and does not cause mitochondrial uncoupling or interfere with cellular respiration in a neuronal cell line and in hippocampal neurons (Wasilewska-Sampaio et al., 2005; Sebollela et al., in preparation). In addition, we have found that 20 μ M DNP does not cause any changes in ATP production or mitochondrial redox activity (as measured by MTT reduction) in primary neurons in culture (Sebollela et al., 2009). Moreover, assuming that DNP would be uniformly distributed in the mouse organism, an estimated overall

concentration of 0.3 μ M DNP can be calculated upon intraperitoneal injection of the doses used in the present study. It seems unlikely, therefore, that this low dose of DNP would result in mitochondrial uncoupling in mice. In this regard, we note that mice treated with IP injections of DNP for up to 6 weeks showed no signs of weight loss or behavioral alterations, which would be expected upon mitochondrial uncoupling.

In addition, DNP was also administered to humans as part of weight reduction programs during the 1930s but due to case reports related to its medical use including cataracts, gastrointestinal, cardio-respiratory and other types of complications, and even deaths in 1938 the U.S. Food and Drug Administration (FDA) banned the use of DNP even when used under medical supervision (Tainter et al., 1935; De Felice and Ferreira, 2006).

Results also showed that DNP preserves the expression of APP and Nrg1 in injured sciatic nerves. APP is involved in a number of important neuronal processes including growth, differentiation and survival (reviewed in Gralle and Ferreira, 2007). Furthermore, APP increases neuronal adhesion to substrate and to glial cells (Breen et al., 1991) and its expression is elevated during degenerative events (Wallace et al., 1993). Preserved APP expression in the proximal segments of injured sciatic nerves and in dorsal root ganglia from DNP-treated animals may help to prevent propagation of degenerative signaling by maintaining and strengthening axon/Schwann cell interactions.

Preserved Nrg1 expression in DNP-treated animals may be directly related to preservation of conductance (as indicated by the G ratio) in injured nerves. Nrg1 plays important roles in the development of the nervous system and in neurodegeneration (Falls, 2003). One of the most important functions of Nrg1 is in the control of myelin thickness and of the axon/myelin ratio in the PNS (Michailov et al., 2004). Results thus

suggest that preservation of APP and Nrg1 expression induced by DNP treatment may play an important role in the stabilization of the cytoarchitecture and function of nerve fibers.

The sciatic function index (SFI) has been described as a reliable indicator of limb functional preservation or recovery (Bain et al., 1989; de Medinaceli et al., 1982). Among several possible ways to evaluate SFI (Bain et al., 1989; de Medinaceli et al., 1982; Dijkstra et al., 2000), we have used toe spread measurements which show the highest correlation with any other functional recovery index (Bozkurt et al., 2008). Results showed that DNP treatment significantly attenuated the decrease in SFI that takes place over the course of several weeks post-injury. Corroborating the SFI results, we also found that DNP-treated animals presented normal G ratio values, similar to uninjured control animals.

In conclusion, DNP prevents sciatic nerve degeneration after a crushing injury by blocking cytoskeleton degradation and by preserving the expression of APP and Nrg1, proteins that play key roles in neuronal survival and myelination. DNP treatment also prevented mitochondrial abnormalities and limb functional loss following injury. These results argue that DNP can be used as a tool in the development of novel therapeutic approaches for treatment of nerve trauma and neurodegenerative diseases.

Acknowledgements: We thank Ms. Diana Pontes for her contribution to morphometry and immunofluorescence experiments, Dr. Paulo R. Louzada for suggestions and valuable insight into the nerve injury model and Dr. Fernanda G. De Felice for critical reading of this manuscript. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro and Instituto Nacional de Neurociência Translacional.

Author Disclosure Statement:

No competing financial interests exist.

References

Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J., Ram, S. J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11, 36-42.

Araújo Couto, L., Sampaio Narciso, M., Hokoç, J. N., and Blanco Martinez, A. M. (2004). Calpain inhibitor 2 prevents axonal degeneration of opossum optic nerve fibers. *J Neurosci Res.* 77, 410-419.

Bain, J. R., Mackinnon, S. E., and Hunter, D. A. (1989). Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast. Reconstr. Surg.* 83, 129-138.

Battiston, B., Geuna, S., Ferrero, M., and Tos, P. (2005). Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery* 25, 258-267.

Beirowski, B., Adalbert, R., Wagner, D., Grumme, D. S., Addicks, K., Ribchester, R. R., and Coleman, M. P. (2005). The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves. *BMC Neurosci.* 1, 6-6.

Bozkurt, A., Tholl, S., Wehner, S., Tank, J., Cortese, M., O'Dey, D., Deumens, R., Lassner, F., Schügner, F., Gröer, A., Smeets, R., Brook, G., and Pallua, N. (2008). Evaluation of functional nerve recovery with Visual-SSI—A novel computerized

approach for the assessment of the static sciatic index (SSI). *J. Neurosci. Methods*, 170, 117-122.

Brand, M. D. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* 35, 811-820.

Breen, K. C., Bruce, M., and Anderton, B. H. (1991). Beta-amyloid precursor protein mediates cell-cell and cell-surface adhesion. *J. Neurosci. Res.* 28, 90-100.

Bregman, B. S., Coumans, J. V., Dai, H. N., Kuhn, P. L., Lynskey, J., McAtee, M., and Sandhu, F. (2002). Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury. *Prog Brain Res.* 137, 257-273.

Bregman, B. S., McAtee, M., Dai, H. N., and Kuhn, P. L. (1997). Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp. Neurol.* 148 (2), 475-494.

Cai, D., Shen, Y., De Bellard, M., Tang, S., and Filbin, M. T. (2001). Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J. Neurosci.* 21, 4731-4739.

Camins, A., Verdaguer, E., Folch, J., and Pallàs, M. (2006). Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Reviews.* 12, 135-148.

Coleman, M. P., and Perry, H. (2002). Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *TRENDS in Neurosci.* 25, 532-537.

De Felice, F.G., Houzel, J.C., Garcia-Abreu, J., Louzada, P.R.Jr., Afonso, R.C., Meirelles, M.N., Lent, R., Neto, V.M., and Ferreira, S.T. (2001). Inhibition of Alzheimer's disease beta-amyloid aggregation, neurotoxicity, and in vivo deposition by nitrophenols: Implications for Alzheimer's therapy. *FASEB J.* 15, 1297-1299.

De Felice, F. G., Vieira, M. N., Saraiva, L. M., Figueroa-Villar, J. D., Garcia-Abreu, J., Liu, R., Chang, L., Klein, W. L., e Ferreira, S. T. (2004). Targeting the neurotoxic species in Alzheimer's disease: inhibitors of Aβ oligomerization. *FASEB J.*, 18, 1366-1372.

De Felice, F. G., and Ferreira, S. T. (2006). Novel neuroprotective, neuritogenic and anti-amyloidogenic properties of 2,4-dinitrophenol: the gentle face of Janus. *IUBMB Life* 58 (4), 185-191.

De Felice, F. G., Wasilewska-Sampaio, A. P., Barbosa, A. C., Gomes, F. C., Klein, W. L., e Ferreira, S. T. (2007). Cyclic AMP enhancers and Aβ oligomerization blockers as potential therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*, 4, 263-271.

de Medinaceli, L., Freed, W. J., and Wyatt, R., J. (1982). An index of functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp. Neurol.* 77, 634-643.

Dijkstra, J. R., Meek, M. F., Robinson, P. H., and Gramsbergen, A. (2000). Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J. Neurosci. Methods*, 96, 89-96.

Ding, Q., Dimayuga, E. and Keller, J. N. (2006). Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS. *Antioxid. Redox. Signal.* 8, 163-172.

Drubin, D. G., and Kirshner, M. W. (1986). Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.*, 103, 2739-2746.

Dyck, P. J., Nukada, H., Lais, C. A., and Karnes, J. (1984). Permanent axotomy: a model of chronic neuronal degeneration produced by axonal atrophy, myelin remodeling and regeneration. In *Perypheral Neuropathy* (Dick, P. J., Thomas, P. K., Lambert, E. H., and Bunge, R., eds) pp. 660-690, Philadelphia: WB Saunders.

Falls, D. L. (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp. Cell. Res.*, 284, 14-30.

Finn, J. T., Weil, M. Archer, F., Siman, R., Srivivasan, A., and Raff, M. C. (2000). Evidence that Wallerian degeneration and localized axon degeneration induced by local neurotrophin deprivation do not involve caspases. *J. Neurosci.* 20, 1333-1341.

Gillespie M. J., and Stein R. B. (1983). The relationship between axon diameter, myelin thickness and conduction velocity during atrophy of mammalian peripheral nerves. *Brain Res.* 259, 41-56.

Gralle, M., and Ferreira, S. T. (2007). Structure and functions of the human amyloid precursor protein: The whole is more than the sum of its parts. *Prog. Neurobiol.* 82, 11-32.

Hanson, M. G., Jr., Shen, S., Wiemelt, A. P., Mc Morris, F. A., and Barres, B. A. (1998). Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro. *J. Neurosci.* 18, 7361-7377.

Hattori, T., Matsuyama, Y., Sakai, Y., Ishiguro, N., Hirata, H., and Nakamura, R. (2008). Chondroitinase ABC enhances axonal regeneration across nerve gaps. *J Clin Neurosci.* 15, 185-191.

Jin, Y., McEwen, M. L., Nottingham, S. A., Maragos, W. F., Dragicevic, N. B., Sullivan, G. and Springer, J. E. (2004). The mitochondrial uncoupling agent 2,4-dinitrophenol improves mitochondrial function, attenuates oxidative damage, and increases white matter sparing in the contused spinal cord. *J. Neurotrauma* 21, 1396-1404.

Lee, A. C., Yu, V. M., Lowe III, J. B., Brenner, M. J., Huntter, D. A., Mackinnon, S.E., and Sakiyama-Elbert, S.E. (2005). Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 184, 295-303.

Lee, R. K., Araki, W., and Wurtman, R. J. (1997). Stimulation of amyloid precursor protein synthesis by adrenergic receptors coupled to cAMP formation. *PNAS*. 94, 5422-5426.

Lin, M. T., and Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 443, 787-795.

Lipton, S.A., and Rosenberg, P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders, *N. Engl. J. Med.* 330, 613–622.

Maragos, W.F., Rockich, K.T., Dean, J.J., and Young, K.L. (2003). Pre- or posttreatment with the mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates striatal quinolinate lesions. *Brain Res.* 966, 312-316.

Mattson, M. (2003). Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders, *Neuromolec. Med.* 3, 65–94.

Meek, M. F. and Coert, J. H. (2002). Clinical use of nerve conduits in peripheral nerve repair: review of the literature. *J. Reconstr. Microsurg.* 18, 97-109.

Michailov, G. V., Sereda, M. W., Brinkmann, B. G., Fischer, T. M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M. H., and Nave, K. A. (2004). Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science*, 304, 700-703.

Moschou, M., Kosmidis, E. K., Kaloyianni, M., Geronikaki, A., and Theophilidis, G. (2008) In vitro assessment of the neurotoxic and neuroprotective effects of N-acetyl-L-cysteine (NAC) on the rat sciatic nerve fibers. *Toxicol. In Vitro*, 22, 267-274.

Pandya, J. D., Pauly, J. R., Nukala, V. N., Sebastian, A. H., Day, K. M., Korde, A. S., Maragos, W. F., Hall, E. D., and Sullivan, P. G. (2007). Post-Injury administration of mitochondrial uncouplers increases tissue sparing and Improves behavioral outcome following traumatic brain injury in rodents. *J. Neurotrauma* 24, 798-811.

Parascandola, J. (1974). Dinitrophenol and bioenergetics: a historical perspective. *Mol. Cell Biochem.* 5, 69-77.

Pearse, D. D., Pereira, F. C., Marcillo, A. E., Bates, M. L., Berrocal, Y. A., Filbin, M. T. and Bunge, M. B. (2004). cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med.*, 10, 610-616.

Pereira Lopes, F. R., Camargo de Moura Campos, L., Dias Corrêa, J. Jr., Balduino, A., Lora, S., Langone, F., Borojevic, R., e Blanco Martinez, A. M. (2006). Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Exp. Neurol.*, 198, 457-468.

Qiu, J., Cai, D., Dai, H., McAtee, M., Hoffman, P. N., Bregman, B. S. and Filbin, M. T. (2002). Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 34, 895-903.

Reid, A. J., Shawcross, S. G., Hamilton, A. E., Wiberg, M., and Terengui, G. (2009) N-acetylcysteine alters apoptotic gene expression in axotomised primary sensory afferent subpopulations. *Neurosci. Res.*, 65, 148-155.

Sebollela, A. Freitas-Corrêa, L., Oliveira, F. F., Mendes, C. T., Wasilewska-Sampaio, A. P., Camacho-Pereira, J., Galina, A., Brentani, H., Passetti, F., De Felice, F. G., Dias-Neto, E., Ferreira, S. T. (2009) Expression profile of rat hippocampal neurons treated with the neuroprotective compound 2,4-Dinitrophenol: Up-regulation of cAMP signaling genes. *Neurotox. Res.*, (Epub ahead of print).

Stys, P. (2005). General mechanisms of axonal damage and its prevention. *J. Neurolol. Sci.* 233, 3-13.

Sullivan, P. G., Dragicevic, N. B., Deng, J., Bai, Y., Dimayuga, E., Ding, Q., Chen, Q., Bruce-Kelle, A. J., and Keller, J. N. (2004). Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondrial turnover. *J. Biol. Chem.* 20, 20699-20707.

Tainter, M.L., Stockton, A. B. and Cutting, W. C. (1935) Dinitrophenol in the treatment of obesity: Final report, *JAMA*, 105, 332-337.

Varejão, A. S., Meek, M. F., Ferreira, A. J., Patrício, J. A., Cabrita, A. M. (2001). Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J. Neurosci. Methods.* 108, 1–9.

Varejão, A. S., Melo-Pinto, P., Meek, M. F., Filipe, V. M., Bulas-Cruz, J. (2004). Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol. Res.* 26, 186-194.

Wallace, W., Ahlers, S.T., Gotlib, J., Bragin, V., Sugar, J., Gluck, R., Shea, P. A., Davis, K. L., and Haroutunian, V. (1993). Amyloid precursor protein in the cerebral cortex is rapidly and persistently induced by loss of subcortical innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 8712-8716.

Waller, A. (1850). Experiments on the section of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alternatives produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 140, 423-429.

Wasilewska-Sampaio, A.P., Silveira, M.S., Holub, O., Goecking, R., Gomes, F.C.A., Moura Neto, V., Linden, R., Ferreira, S.T., and De Felice, F.G. (2005). Neuritogenesis and neuronal differentiation promoted by 2,4-dinitrophenol, a novel anti-amyloidogenic compound, *FASEB J.* 19, 1627-1636.

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., and Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1858-1862.

West, C. A., Hart, A. M., Terenghi, G., and Wilberg, M. (2007) Analysis of the dose-response of N-acetylcysteine in the prevention of sensory neuronal loss after peripheral nerve injury, *Acta Neurochir. Suppl.* 100, 29-31.

Zhai, Q., Wang, J., Kim, A., Liu, Q., Watts, R., Hoopfer, E., Mitchison, T., Luo, L., and He, Z. (2003). Involvement of the Ubiquitin-Proteasome system in the early stages of Wallerian degeneration. *Neuron* 39, 217-225.

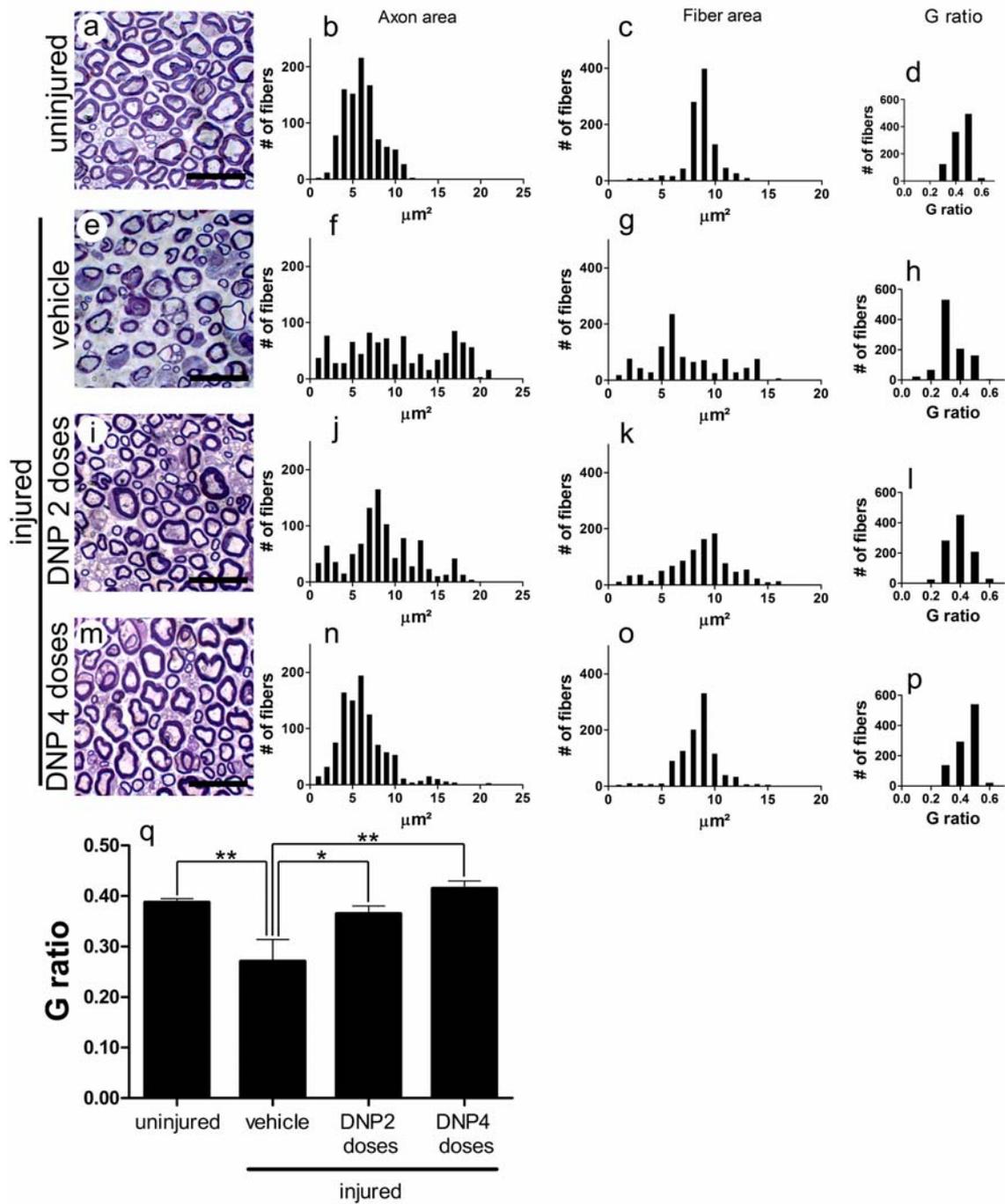


Figure1

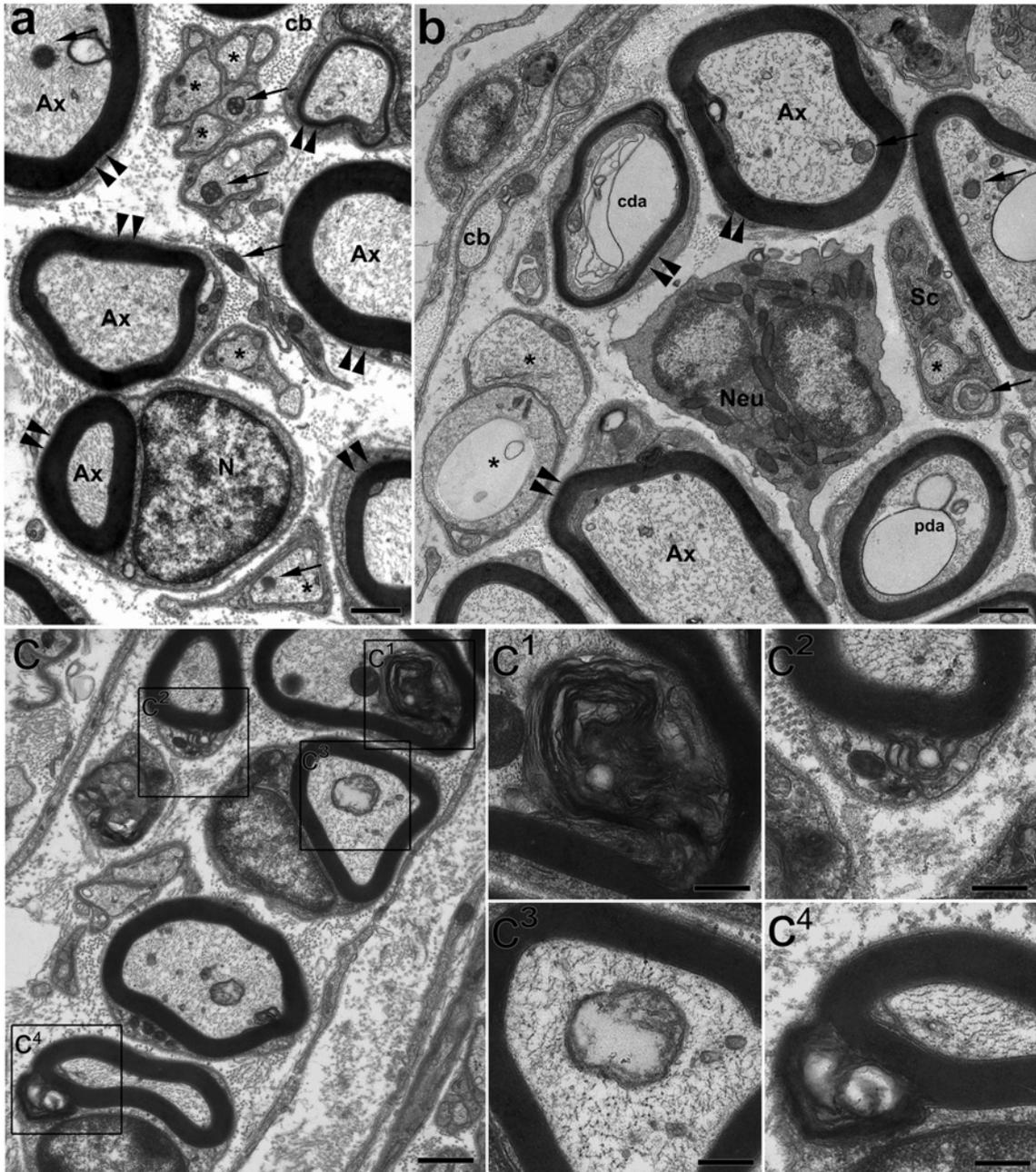


Figure2

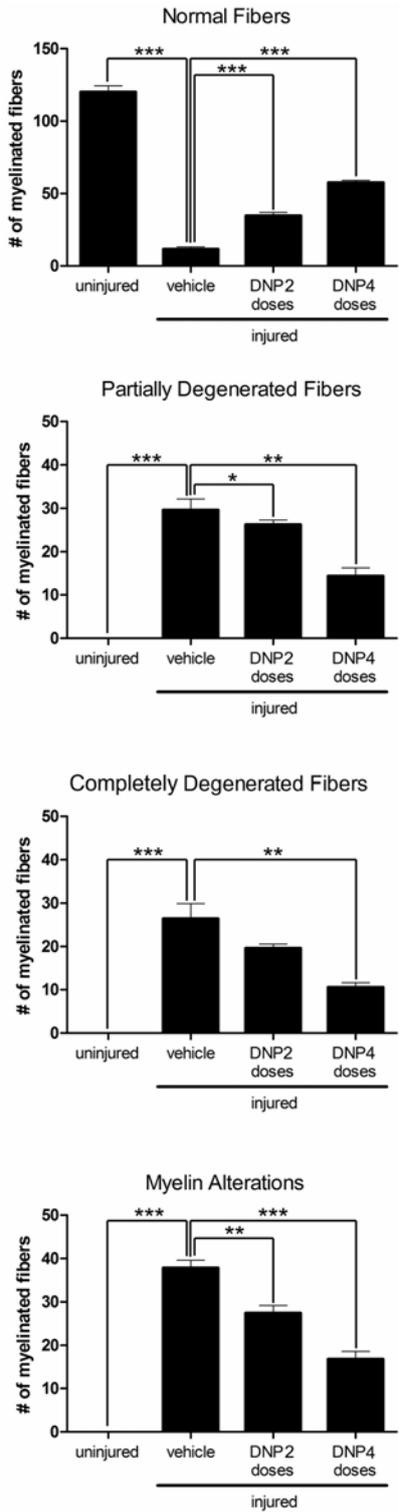


Figure3

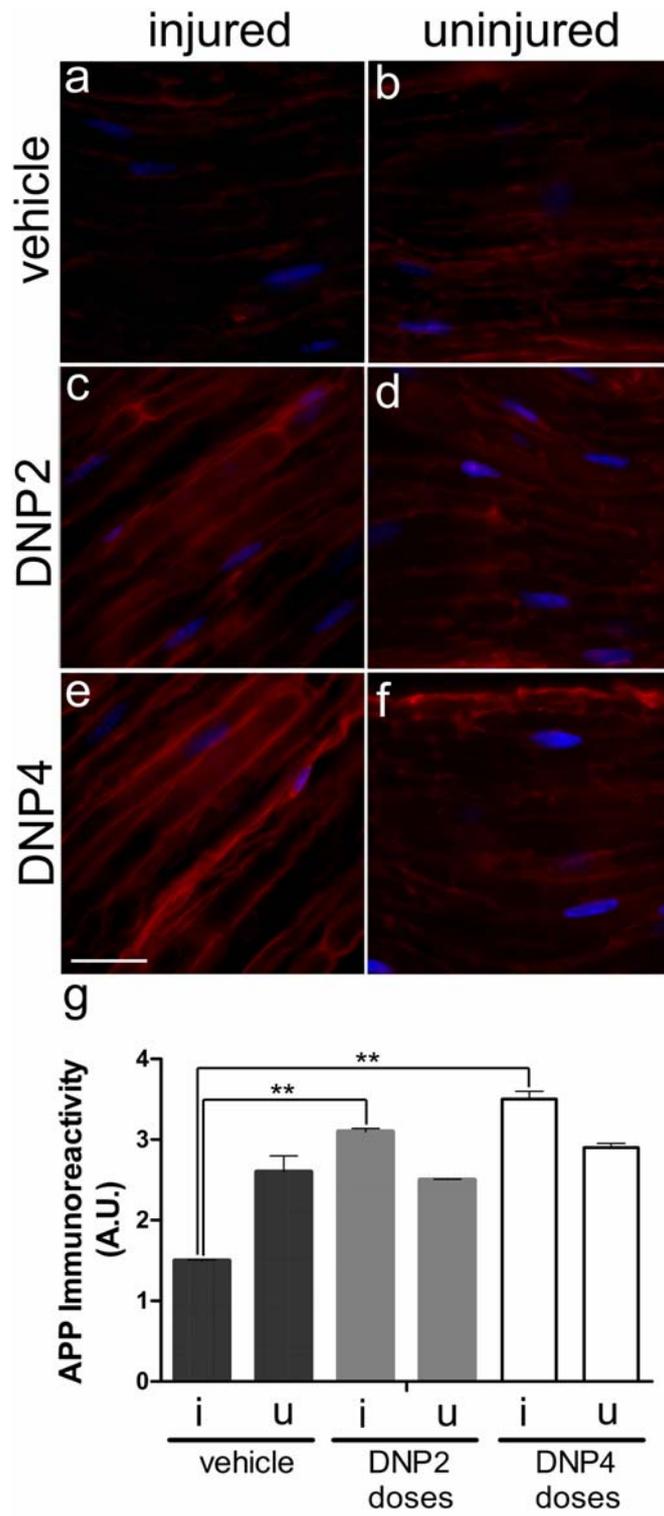


Figure 4

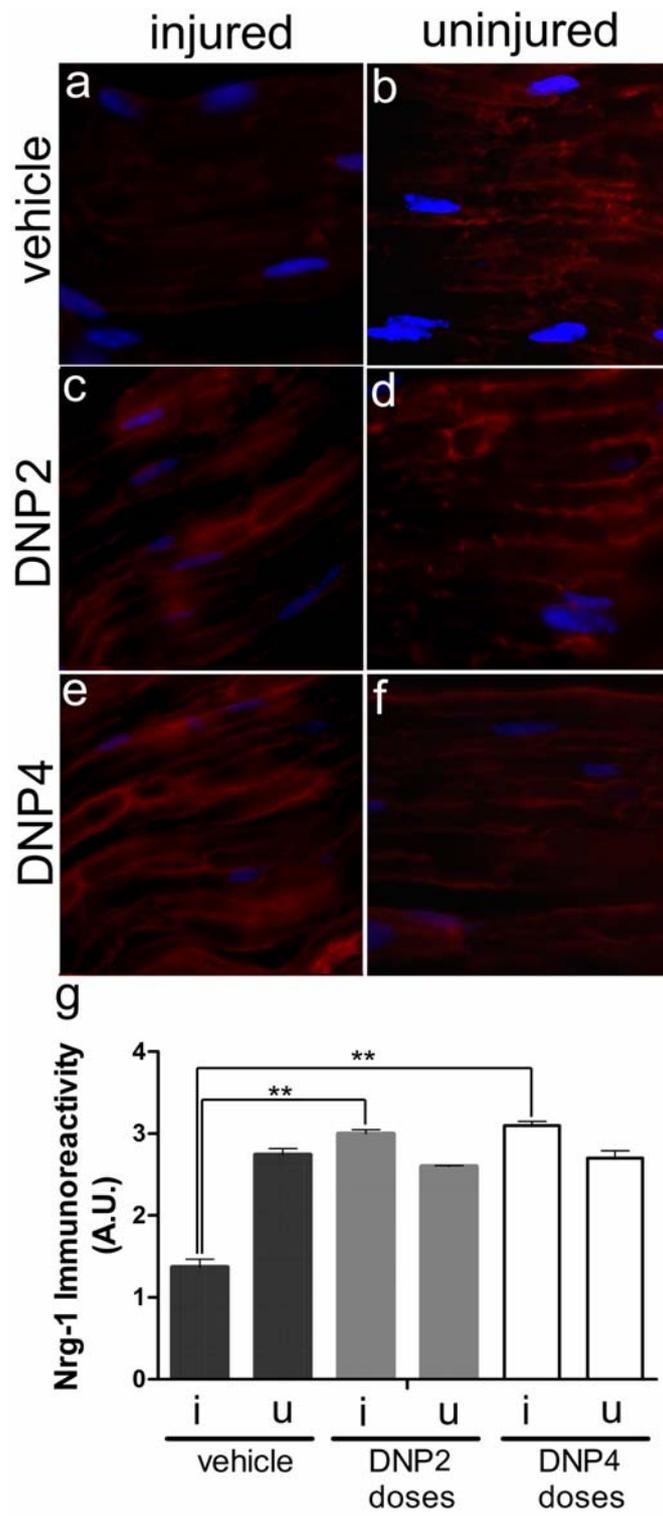


Figure 5

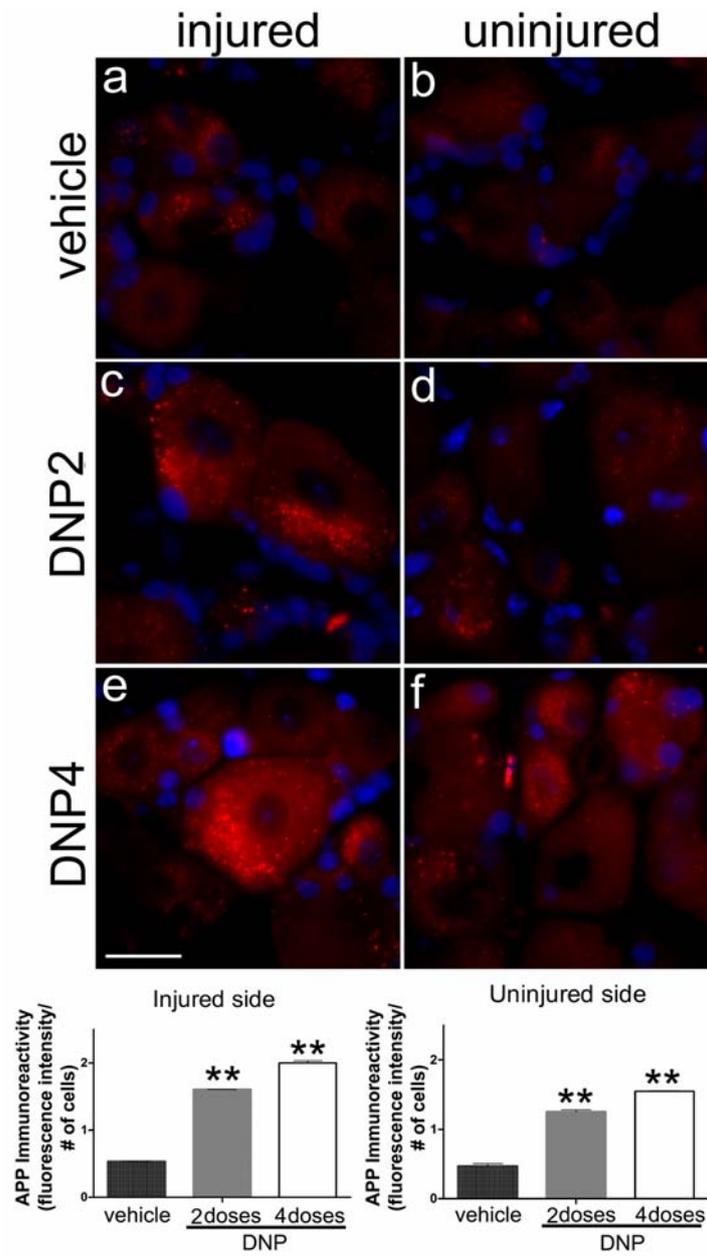


Figure 6

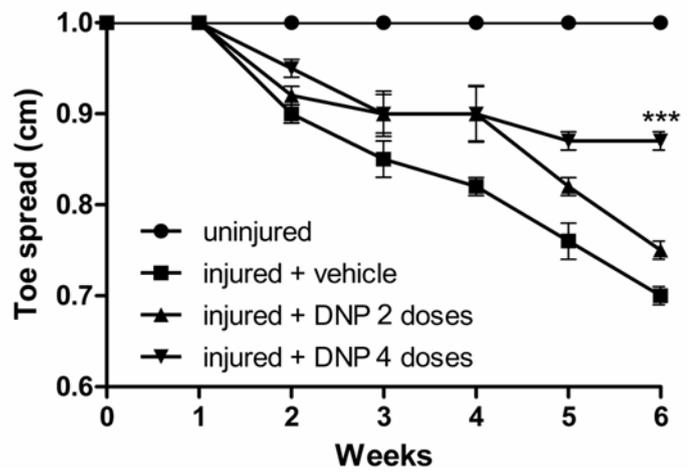
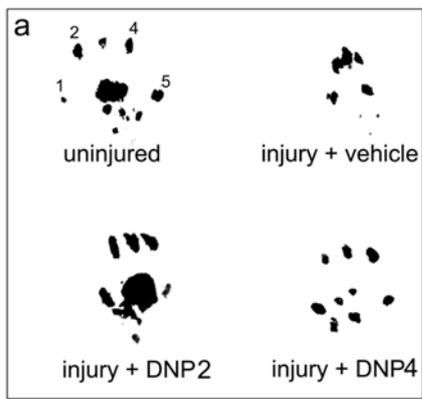
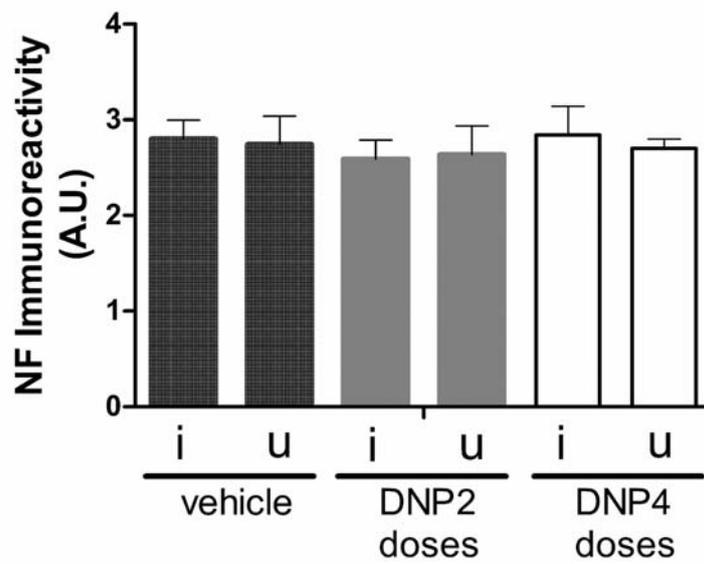
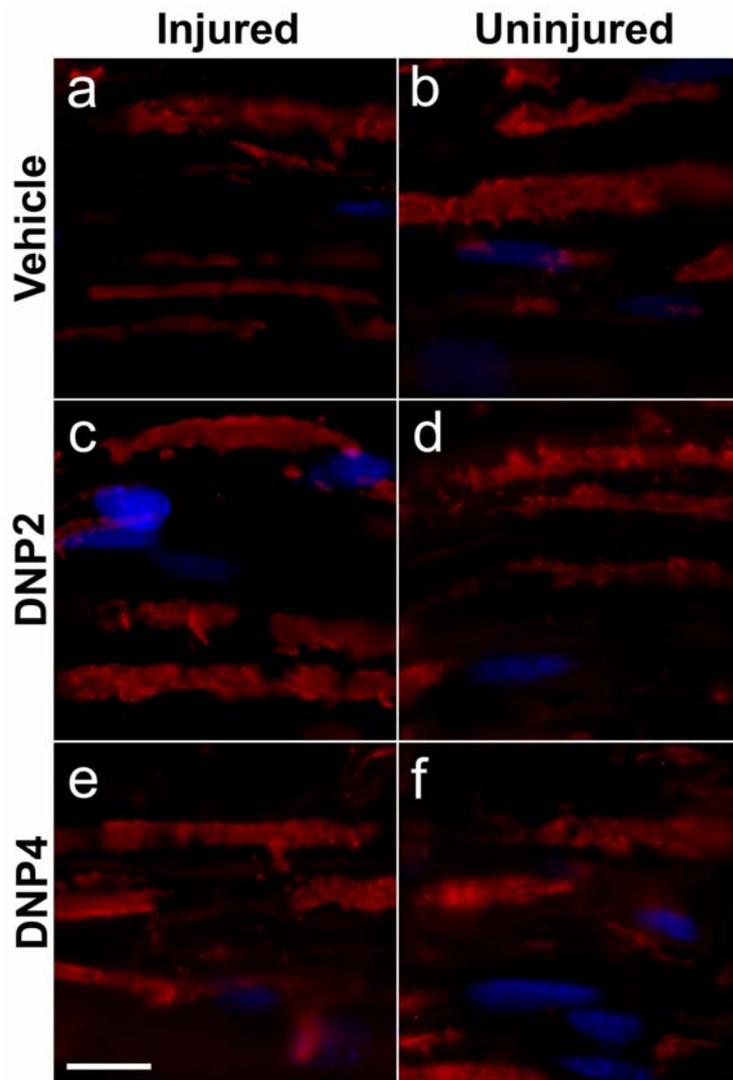
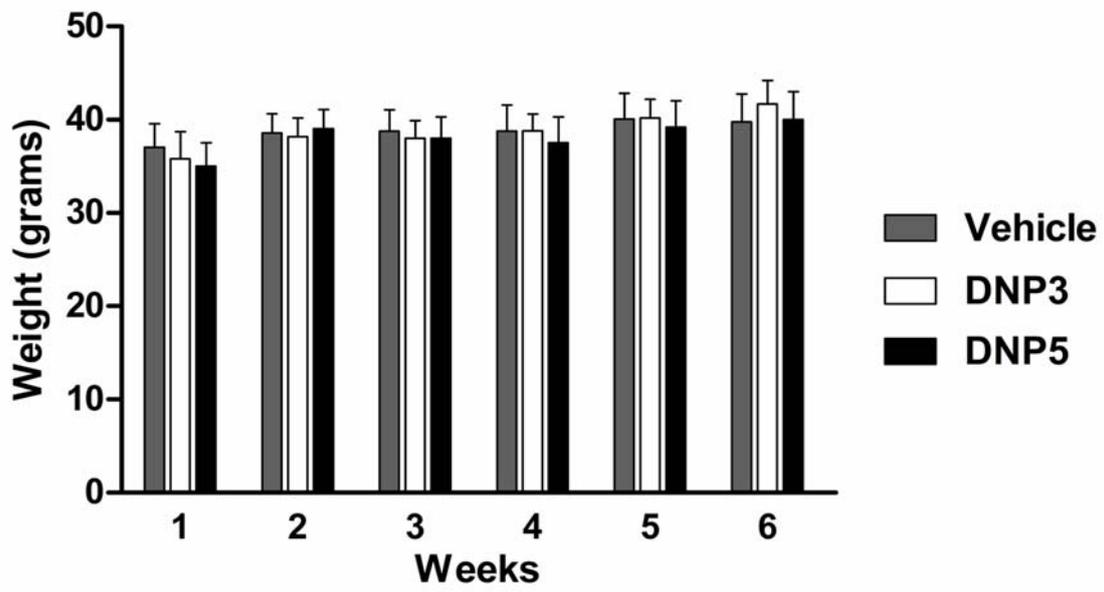


Figure 7



Supplemental figure 1



Supplemental figure 2

Figure Legends

Figure 1: Morphometric analysis of sciatic nerves after injury. Representative semi-thin transversal sections of sciatic nerves from (a) uninjured animals, (e) vehicle-treated injured animals, (i) DNP2-treated injured animals, and (m) DNP4-treated injured animals. Axon and fiber areas from different experimental groups are shown as follows: (b and c) uninjured animals, (f and g) vehicle-treated injured animals, (j and k) DNP2-treated injured animals, and (n and o) DNP4-treated injured animals. Panels d, h, l and p show, respectively, the distributions of G ratios for the four experimental groups listed above. Panel q shows mean G ratio values for the four experimental groups. (*) and (**) indicate $p = 0.05$ and $p = 0.01$, respectively. Scale bar = 40 μm .

Figure 2: Ultrastructural analysis of sciatic nerve. (a) Representative electron micrograph of a transversal section of an uninjured sciatic nerve presenting myelinated (Ax) and unmyelinated (*) axons completely filled with cytoskeleton and mitochondria (arrows). Schwann cells myelinating axons (arrow heads) and extracellular space was filled with collagen bundles (cb). (b) Injured nerve showing normal axons (Ax), completely degenerated axons (cda) and partially degenerated axons (pda). Collagen bundles (cb), myelinating (arrow heads) and unmyelinating Schwann cells (Sc), mitochondria (arrows) and neutrophils (Neu) are also visible. (Panel C and insets) Injured nerves presenting structural alterations in myelin, such as internal (c^1) and external (c^2 and c^4) unwrapping, and mitochondrial swelling (c^3). Scale bars: (a-c) = 1 μm ; (c^1 - c^4) = 500 nm.

Figure 3: Quantitative analysis of normal and altered myelinated fibers. Twenty independent electron micrographs were analyzed per animal in each experimental group and fibers were classified (see “Methods”) as normal, partially degenerated, completely degenerated or fibers exhibiting myelin abnormalities as indicated in the different panels. (*), (**) and (***) indicate statistically significant differences ($p = 0.05$, $p = 0.01$ and $p = 0.001$, respectively).

Figure 4: APP immunoreactivity in proximal segments of injured sciatic nerves. Panels a-f show representative images of APP immunofluorescence labeling in proximal segments of sciatic nerves from vehicle-treated (a,b), DNP2-treated (c,d) or DNP4-treated (e,f) injured animals. Panel g shows results from quantitative analysis of APP immunofluorescence. (**) indicates statistically significant difference ($p = 0.01$). Scale bar = 10 μm .

Figure 5: Neuregulin1 immunoreactivity in proximal segments of injured sciatic nerves. Panels a-f show representative images of Nrg1 immunofluorescence labeling in proximal segments of sciatic nerves from vehicle-treated (a,b), DNP2-treated (c,d) or DNP4-treated (e,f) injured animals. Panel g shows results from quantitative analysis of Nrg1 immunofluorescence. (**) indicates statistically significant difference ($p = 0.01$). Scale bar = 10 μm .

Figure 6: APP immunoreactivity in dorsal root ganglion neurons. Representative images are shown for APP immunolabeling in neuronal cell bodies in DRG from both injured (left column) and uninjured (right column) nerves. Graphs show integrated

immunofluorescence intensities normalized by cell numbers. (**) indicates statistically significant ($p = 0.01$) differences compared to vehicle-treated injured animals. Scale bar = 10 μm .

Figure 7: Paw finger-printing and sciatic function assay. Panel a: Left uppermost image is a representative print from an uninjured left hind paw with numbered toes (number 5 is the thumb). Other images are representative prints from the left hind paws of vehicle-treated, DNP2-treated or DNP4-treated injured animals (six weeks after injury), as indicated. Panel b: Limb loss of function was measured through a six week period. Curves correspond to toe spreads measured in different experimental groups, as indicated. (***) indicates statistically significant difference ($p = 0.001$).

Supplemental Figure 1: Neurofilament immunoreactivity in proximal segments of injured sciatic nerves. Panels a-f show representative images of NF immunofluorescence labeling in proximal segments of sciatic nerves from vehicle-treated (a,b), DNP2-treated (c,d) or DNP4-treated (e,f) injured animals. Panel g shows results from quantitative analysis of NF immunofluorescence. Scale bar = 10 μm .

Supplemental Figure 2: Animal weights during six weeks of DNP treatment following a crush injury. All animals were weighted after the walking track test once a week during six weeks. No weight loss was observed and there was no difference among the vehicle (gray bars) and the DNP2 (white bars) and DNP4 (black bars) treated groups.

2. Resultados adicionais

2.1. Acompanhamento do peso dos animais

Como descrito na Introdução, o DNP é um conhecido desacoplador da fosforilação oxidativa, e já foi até mesmo prescrito para tratamentos para emagrecimento em humanos. No presente estudo, o peso corporal de todos os animais foi monitorado uma vez a cada semana durante 6 semanas e não foi observada nenhuma diferença entre os grupos tratados com DNP e veículo (Fig. 06).

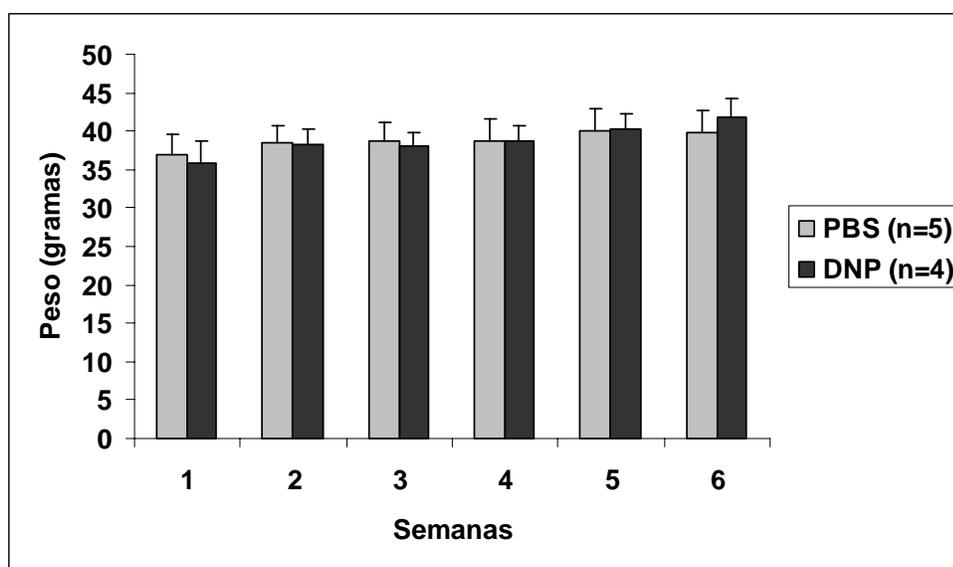


Fig. 06 – Análise do peso dos animais tratados com DNP ou PBS em um período de seis semanas. Não há diferença entre os dois grupos observados e também não há perda de peso ao longo do período.

2.2. Morfologia mitocondrial

Análise ultraestrutural revelou que todas as mitocôndrias presentes nos nervos não lesionados apresentaram membranas internas e externas muito bem definidas e íntegras (Fig. 7a e a'). Entretanto, após a lesão foi observada a presença de mitocôndrias com severas alterações morfológicas (Fig. 7b e b'). Além de um grande inchamento (“swelling”) mitocondrial, as cristas mitocondriais apresentaram rupturas. De maneira interessante, foi

observado que o tratamento com 3 doses de DNP protegeu as mitocôndrias das drásticas alterações causadas pelo esmagamento do nervo (Fig. 7c e c'). Esse resultado foi ainda mais notável no grupo DNP 5, no qual a ultraestrutura mitocondrial encontrava-se praticamente inalterada em relação aos controles não-lesionados (Fig. 7d e d'). Em todos os grupos estudados, não foi observada nenhuma alteração mitocondrial nas células de Schwann.

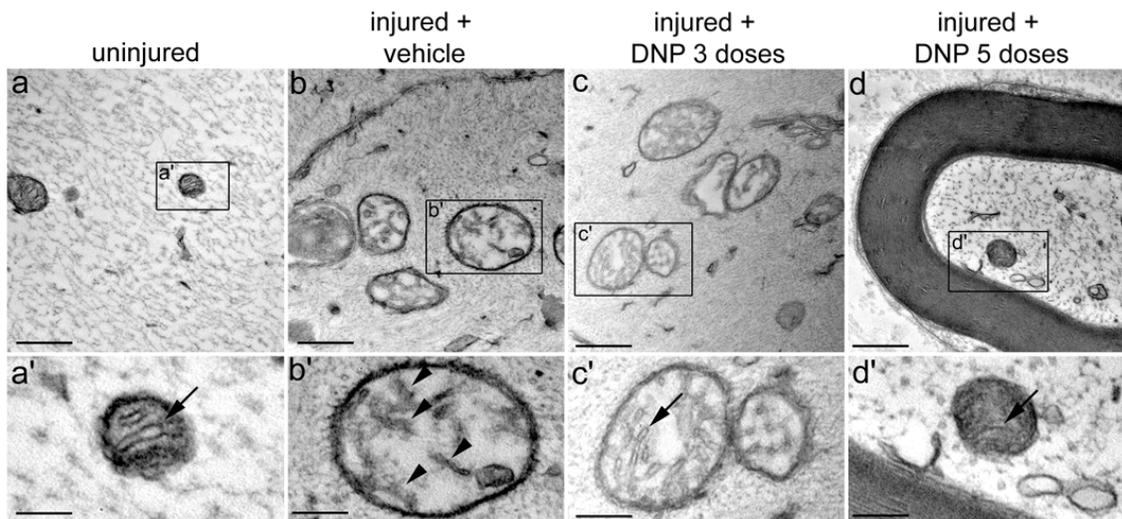


Fig. 7 – Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a ultraestrutura mitocondrial de nervos lesionados e não lesionados. É possível ver as mitocôndrias íntegras nos animais não lesionados (a e a'). Após a lesão observamos a formação de edema mitocondrial e perda de organização das cristas nos animais tratados com veículo (b e b'). O tratamento com 3 doses de DNP impediu parcialmente a formação de edema (c e c') e o tratamento com 5 doses de DNP impediu completamente o aparecimento de alterações ultraestruturais nas mitocôndrias dos nervos lesionados (d e d'). Barra em a -d = 1 μ m e a' - d' = 500 nm.

2.3. Índice de função do nervo ciático após transecção

A transecção do nervo ciático caracteriza a completa perda de conexão dos axônios com o corpo dos neurônios presentes no GRD. Espera-se, nesse tipo de lesão, que o animal perca completamente a função do membro lesionado e a recupere lentamente em função do tempo, nesse estudo ao longo de oito semanas.

Após a transecção, os cotos proximal e distal foram posicionados dentro de um tubo de polipropileno com 0.5 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro interno, havendo um espaço de 3 mm entre as extremidades dos cotos. O registro das distâncias entre os dedos das patas lesionada e não lesionada foi feito da mesma forma descrita acima para o ensaio de função do ciático. No entanto, ao invés de simplesmente medir a distância entre o primeiro e o quinto dedo, foi calculado o índice de função do ciático (IFC) (Fig. 08), desenvolvido por De Medinaceli (1982) e adaptado por Bain e cols. (1989) e Hare e cols. (1992):

$$\text{IFC} = (-38.3 \times \text{FCP}) + (109.5 \times \text{FEE}) + (13.3 \times \text{FEI}) - 8.8$$

onde:

$$\text{FCP} = \frac{\text{CPL} - \text{CPN}}{\text{CPN}} \quad \text{FEI} = \frac{\text{EIL} - \text{EIN}}{\text{EIN}}$$

$$\text{FEE} = \frac{\text{EEL} - \text{EEN}}{\text{EEN}}$$

Fig. 08 – Fórmula do IFC, na qual utilizamos a distância entre o terceiro dedo e o calcanhar (comprimento da pata; CP); a distância entre o primeiro e o quinto dedo (espalhamento externo; EE) e a distância entre o segundo e o quarto dedo (espalhamento interno; EI). Essas medidas foram obtidas tanto para a pata lesionada (CPL, EEL e EIL) quanto para a pata não lesionada (CPN, EEN e EIN).

Neste experimento, foi observada uma diferença significativa somente na segunda semana após a lesão, quando o grupo tratado com DNP apresentou menor perda de função. Entretanto, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos veiculo e DNP após oito semanas de tratamento (Fig. 09).

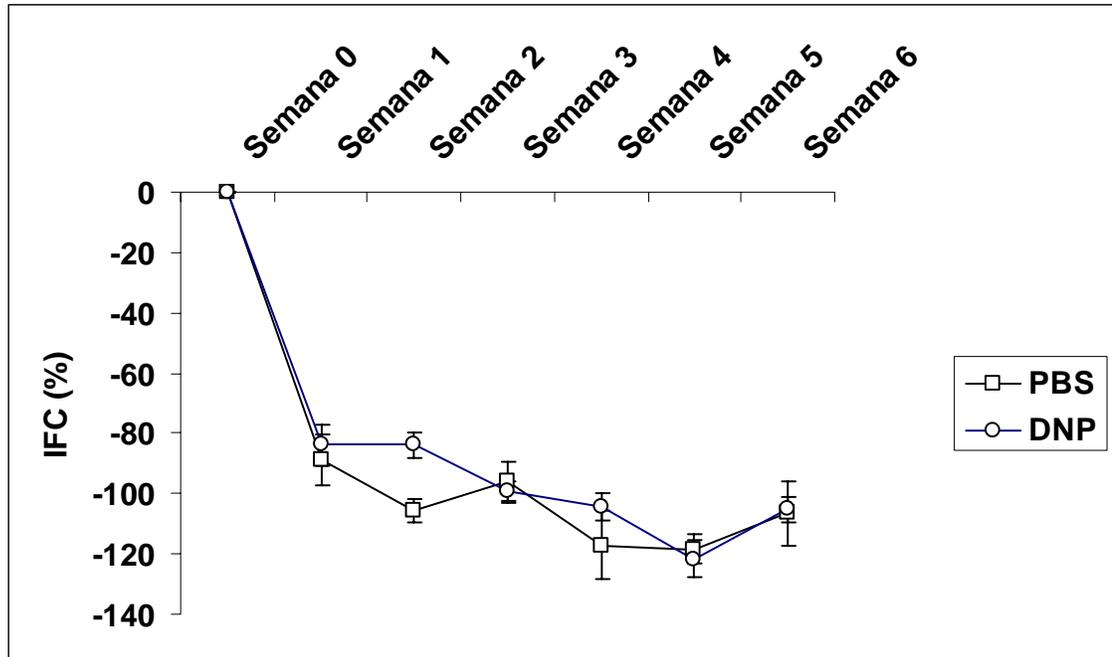


Fig. 09 – Gráfico do Índice de Função do Ciático (IFC). Os animais foram avaliados por seis semanas após a lesão e somente na segunda semana foi observada uma leve diferença entre os dois grupos.

2.4. Análise cinemática da caminhada após transecção do nervo ciático

Após a transecção do nervo, os animais foram colocados em uma caixa de papelão medindo 5 cm x 30 cm x 100 cm (l x c x a) devidamente coberta com papel branco. Uma janela de vidro foi posicionada em uma das laterais, possibilitando a visualização lateral do animal durante uma caminhada (Fig. 10). Todos os animais foram filmados lateralmente durante uma caminhada em ambos os lados 1 dia, 1 semana, 3 semanas e 6 semanas após a lesão e analisados posteriormente com o programa Image J (Abramoff e cols., 2004).

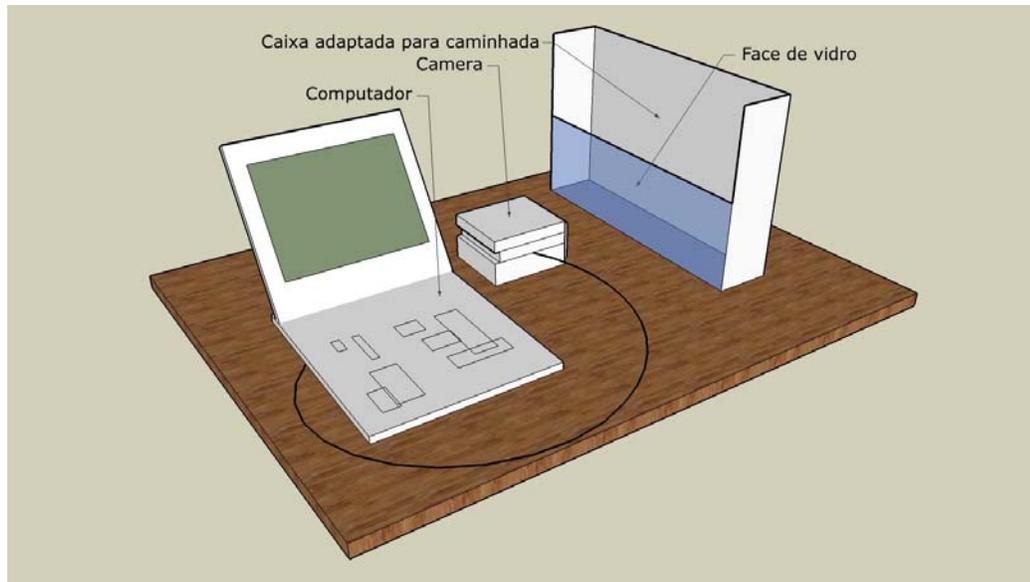


Fig. 10 – Desenho do sistema montado para adquirir os dados cinemáticos da caminhada dos animais após lesão.

As análises cinemáticas são também de grande utilidade, pois mostram se o animal de alguma maneira está compensando o movimento de passada se apoiando em alguma outra parte da perna que não seja a região plantar da pata e tornam possível a medida do arco de movimento do calcanhar do animal (Fig. 11). Não foi observada nenhuma diferença entre os grupos tratados com DNP e veículo no caso dos experimentos com lesão por transecção do ciático (Fig. 12).



Fig. 11 – Seqüência de imagens adquiridas com o sistema descrito acima. O animal foi filmado com o calcanhar marcado com tinta preta. Essa marcação era seguida digitalmente em cada imagem da seqüência.

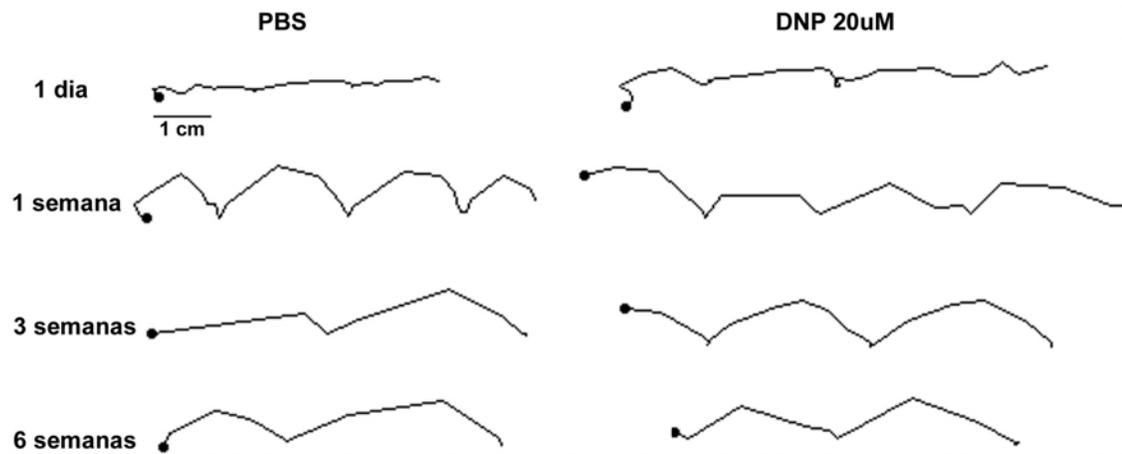


Fig. 12 – Perfil lateral de caminhada de animais lesionados durante seis semanas. Não há diferença no movimento do calcanhar da pata lesionada entre os animais tratados com DNP e PBS quando comparados no mesmo período.

Discussão

Durante muitos anos, o homem viveu sob o estigma de que lesões no sistema nervoso seriam irreparáveis ou irreversíveis. Os avanços da tecnologia e do conhecimento sobre o corpo humano como um todo possibilitaram nossa sobrevivência e melhoraram nossa qualidade de vida radicalmente. Talvez a fronteira tecnológica e epistemológica mais próxima atualmente seja a do sistema nervoso, que envolve ambigualmente não só a utilização de técnicas de última geração como a quebra de paradigmas seculares.

Podemos encontrar hoje uma gama de propostas metodológicas para frear ou impedir a degeneração do sistema nervoso central e do periférico após diferentes tipos de insultos. Contudo, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na neuroproteção ou na regeneração dos nervos ainda se encontram no centro de uma nebulosa e as técnicas e metodologias utilizadas para reparar as lesões ainda não mostraram eficácia total. Dentro desse contexto, há a necessidade de melhor compreender os fenômenos inerentes aos diversos insultos ao qual o sistema nervoso está sujeito e encontrar maneiras de amenizá-los, revertê-los ou até mesmo impedi-los.

Algumas estratégias tem sido propostas para limitar a progressão da DW como, por exemplo, a utilização de inibidores de calpaína e proteasoma, principais mecanismos de degradação dos constituintes celulares (Zhai e cols., 2003; Araujo Couto e cols., 2004; Camins e cols., 2006). A utilização de tubos feitos de diferentes tipos de materiais conectando o coto distal e o proximal de um nervo após uma transecção completa ajuda a reduzir a tensão feita no nervo em casos em que exista um espaço grande entre os cotos, melhora a reorganização das fibras e sustenta a regeneração axonal de forma direcionada, evitando a formação de neuromas (Meek e Coert, 2002, Battiston e cols., 2005; Pereira

Lopes e cols., 2006). Tornar permissivo o ambiente através do qual o nervo deve regenerar também é uma estratégia que vem apresentando resultados animadores. O uso de condroitinase ABC, por exemplo, estimula a regeneração de nervos por sua capacidade de eliminar os proteoglicanos de sulfato de condroitina presentes nos feixes nervosos (tanto centrais quanto periféricos) que impedem o crescimento axonal (Zuo e cols., 1997; Hattori e cols., 2008). A sobrevivência celular e a recuperação da função do nervo são eventos diretamente relacionados. A administração de fatores de crescimento e fatores neurotróficos, como o NGF, potencializam os mecanismos anti-apoptóticos e evitam que haja acentuada morte neuronal. Dessa maneira, as chances do indivíduo recuperar a função dos membros lesionados aumentam consideravelmente (Lee e cols., 2005; Bregman e cols., 1997, 2002).

Por outro lado, o desenvolvimento de novos materiais e técnicas cirúrgicas, como a utilização de polímeros bio-absorvíveis e cola de fibrina ao invés de sutura com nylon ou monofilamento (Terziz e cols., 1997; Nakamura e cols., 2004), ajudou muito na recuperação tecidual e funcional de membros lesionados, evitando, na maioria dos casos, a necessidade de realização de transplantes de nervos autólogos, o que fatalmente resulta em ter que lesionar intencionalmente outro membro para obtenção de um segmento de nervo a ser transplantado (Heath e Rutkowski, 1998; Evans, 2000).

Apesar do grande avanço nas técnicas, materiais e conhecimento acerca da DW, a regeneração nervosa ainda é lenta (cerca de 1 mm por dia em humanos), resultando em respostas secundárias à lesão, como, por exemplo, a atrofia da musculatura e perda de sensibilidade e movimento. Preservar a estrutura do nervo mesmo após uma lesão seria de extrema utilidade no que diz respeito à diminuição do tempo em que a musculatura ficaria

desprovida de inervação e também diminuiria o tempo de tratamento necessário para que o indivíduo pudesse reassumir suas atividades.

O neurônio, unidade funcional do sistema nervoso, é uma célula encontrada em todos os metazoários, desde moscas, lagostas, ornitorrincos, baleias azuis e o homem. Seus constituintes permitem que seja altamente especializado e sua incrível capacidade de formar uma intrincada rede nos fez dominar todos os ambientes desse planeta. Muito se comenta sobre a morte dos neurônios e seu efeito direto na cognição, movimentação e interface com o mundo ao redor do indivíduo, mas o prólogo dessa estória é, frequentemente, negligenciado. Os eventos envolvidos na degeneração nervosa são, obviamente, inerentes à natureza morfológica, bioquímica e fisiológica do neurônio. No presente trabalho, mostramos que a degeneração do citoesqueleto axonal após uma lesão por esmagamento é um marco importante no conjunto de eventos que podem culminar na morte dos neurônios e no desaparecimento total do nervo, o que incapacitaria o indivíduo para o resto da vida.

Os microtúbulos presentes no axônio funcionam como filamentos com características estruturais e funcionais: ao mesmo tempo em que ajudam a definir a forma do axônio, participam diretamente do transporte de vesículas tanto do corpo celular aos terminais axônicos quanto no sentido inverso. Alterações na estabilidade dinâmica dos microtúbulos podem ter um efeito drástico no funcionamento celular, interferindo diretamente no transporte de vesículas e proteínas.

Os animais tratados com DNP mostraram uma resistência à degeneração dos axônios presentes nos nervos lesionados. As medidas de área total da fibra, da área do axônio e o cálculo do *G ratio* mostraram que a citoarquitetura neuronal foi significativamente preservada, nos animais tratados com DNP, em comparação com os

animais do grupo lesionado controle. A análise ultraestrutural revelou também que os componentes do citoesqueleto axonal foram preservados. Dentre as análises morfométricas realizadas nesse estudo, a que mais chama a atenção é sem dúvida o cálculo do *G ratio*. Trata-se de uma medida morfofuncional que traduz a relação entre a espessura da bainha de mielina e o calibre do axônio. Essa relação determina a qualidade do impulso nervoso transmitido por uma determinada fibra e, portanto, o controle motor ou a função sensorial desempenhados por um nervo (Rushton, 1951; Bishop e cols., 1971).

Uma possível explicação para o efeito anti-degenerativo do DNP decorre da capacidade deste composto de induzir aumento nos níveis neuronais da proteína tau, como anteriormente descrito por nosso grupo (Wasilewska-Sampaio e cols., 2005). Embora a proteína tau não tenha sido diretamente investigada nesse estudo, sua importância na manutenção da estabilidade dos microtúbulos nos leva a suspeitar de que haja uma ligação entre a preservação da citoarquitetura dos microtúbulos nos axônios lesionados dos animais tratados com DNP e a expressão ou níveis de fosforilação da proteína tau.

Como mencionado acima, o tratamento com DNP preservou o citoesqueleto dos axônios nos nervos lesionados. É importante notar, entretanto, que não apenas a morfologia geral, mas também a quantidade de fibras mielinizadas foi significativamente preservada nos nervos de animais tratados com DNP. Vale ressaltar aqui a importância desta análise não só do ponto de vista descritivo, mas também da eficácia do tratamento: toda a área dos cortes transversais dos nervos nos diferentes grupos experimentais foi inspecionada, excluindo, dessa maneira, um possível viés decorrente da observação em uma região em que preferencialmente existissem mais fibras normais. A quantificação do percentual de fibras preservadas, parcialmente degeneradas ou totalmente degeneradas presentes nos nervos submetidos à lesão nos dá uma visão espacial e temporal ampla do

curso da degeneração. Observamos a presença de fibras normais em todos os grupos experimentais. Isso indica que, em uma lesão moderada (ver “Materials and Methods” do manuscrito em anexo), há um grupo de fibras que, talvez por ser mais espesso, é intrinsecamente mais resistente à aplicação de força mecânica. Já as fibras parcialmente ou completamente degeneradas foram menos abundantes nos animais tratados com DNP do que nos animais lesionados e tratados apenas com veículo, refletindo a capacidade desse composto de preservar o citoesqueleto e, por sua vez, a integridade celular.

As células de Schwann, extremamente importantes no funcionamento de nervos periféricos e um dos componentes principais durante um evento degenerativo devido à sua participação na fagocitose dos debrís celulares, também foram preservadas nos animais tratados com DNP. Mostramos que a quantidade de bainhas de mielina apresentando alterações morfológicas (i.e., presença de vacúolos no citoplasma e perda da compactação da membrana na região internodal, o que interfere diretamente no diâmetro total da fibra e influi na capacidade de transmissão do impulso nervoso) foi significativamente menor nos animais lesionados tratados com DNP do que nos lesionados que não receberam administração de DNP (Fig. 3 do manuscrito anexado).

A relação entre o axônio e as células de Schwann é, como descrito anteriormente, fundamental para o funcionamento do nervo. Durante a DW, o citoesqueleto do axônio é degradado, influenciando diretamente em sua capacidade de regular seu calibre, o que interfere na sinalização com as células de Schwann e, conseqüentemente, em seu comportamento face a uma situação de injúria. Em nossos resultados, se compararmos a quantidade de fibras parcialmente e totalmente degeneradas com a quantidade de fibras com bainha de mielina alteradas, podemos observar que há uma relação entre os dois gráficos (Fig. 3 do manuscrito). Sendo assim, é possível que a preservação do citoesqueleto axonal provocada

pelo tratamento com DNP influencie também nos efeitos apresentados pelas células de Schwann inerentes a DW.

O DNP é um conhecido desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial. Sendo assim, poderia ser esperado que o principal alvo de sua ação fossem as mitocôndrias. O desacoplamento permite que o transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial aconteça sem a produção de ATP, aumentando, dessa maneira, a taxa metabólica basal (revisto em De Felice e Ferreira, 2006). Quando há desacoplamento mitocondrial, um dos principais efeitos é a perda de peso do animal. De fato, essa característica levou o DNP a ser usado como uma droga para perda de peso em humanos na década de 30 (Parascandola, 1974). Resultados apresentados em trabalhos anteriores de nosso grupo indicaram que as concentrações de DNP utilizadas não alcançaram os níveis em que ocorre o efeito desacoplador (Wasilewska-Sampaio e cols., 2005; De Felice e Ferreira, 2002, 2006; De Felice e cols., 2007). A concentração total utilizada no presente trabalho (0.18 mg DNP/Kg e 0.30 mg DNP/Kg, considerando os grupos experimentais DNP3 e DNP5, respectivamente) é baixa quando comparada aos trabalhos citados acima. Por um lado, estas observações sugerem que os mecanismos protetores do DNP não se devem a um efeito desacoplador. Por outro lado, no entanto, mesmo que houvesse um pequeno desacoplamento, este poderia ser benéfico contra um possível estresse oxidativo decorrente da perda da homeostasia mitocondrial durante a DW.

A mitocôndria é um dos principais desencadeadores dos danos decorrentes de insultos neuronais (Tatsuta e Langer, 2008) e uma das maiores fontes celulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) sob condições fisiológicas e patológicas (Brand, 2000). A produção de EROs é um dos principais elementos na degeneração de fibras nervosas (Lipton e cols., 1994; Mattson, 2003). Sendo assim, uma relação interessante com o

trabalho publicado por Jin e colaboradores (2004) é o fato de que a diminuição nos efeitos deletérios de EROs no trauma de medula pode estar associada à preservação da estrutura e função das mitocôndrias (Brand, 2000). No presente trabalho, observamos que as mitocôndrias axonais não sofreram edema e também não apresentaram alterações ultraestruturais no grupo tratado com 5 doses de DNP. O citoesqueleto axonal também foi preservado nesse grupo. Estes resultados sugerem a interpretação de que o DNP proteja as células do dano mitocondrial e, conseqüentemente, iniba a ativação do sistema ubiquitina proteasoma mediado por estresse mitocondrial (Sullivan e cols., 2004; Ding e cols., 2006).

No sistema nervoso, a principal discussão acerca da interpretação dos efeitos neuroprotetores do DNP se dá pelo seu possível efeito desacoplador da fosforilação oxidativa. De fato, muitos estudos demonstram que desacoplamentos brandos poderiam proteger as células de diversos tipos de insultos (Stout e cols., 1998) e proteger os neurônios contra morte após um trauma (Sullivan e cols., 2004). Como discutido anteriormente, a perda de peso seria um efeito proeminente do desacoplamento mitocondrial; no entanto, esse efeito não foi observado ao longo de seis semanas de tratamento sistêmico com DNP (Fig 06, “Resultados Adicionais”), o que não exclui a possibilidade de estar havendo um desacoplamento brando, capaz de proteger os nervos de insultos oxidativos.

Recentemente, o DNP tem sido usado como uma ferramenta no estudo da degeneração nervosa. Jin e cols. (2004) mostraram que ratos pré-tratados com 5 mg DNP/Kg administrado por via intraperitoneal 15 minutos antes de uma lesão na medula espinhal apresentaram redução significativa na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), peroxidação lipídica e oxidação protéica, além de preservar a bioenergética mitocondrial e a substância branca na medula. Maragos e colaboradores (2003) mostraram

que o DNP protege os neurônios da toxicidade causada por injeção intraestriatal de ácido quinolinico e De Felice e colaboradores (2001 e 2004), utilizando culturas primárias de neurônios hipocâmpais de embriões de rato, descreveram um efeito protetor do DNP contra a neurotoxicidade do peptídeo β -amilóide. Apesar dos diversos exemplos apresentados acima mostrarem que o DNP possui um componente neuroprotetor, é preciso ainda esclarecer exatamente em que mecanismos está interferindo.

Tanto no sistema nervoso central quanto no periférico pode-se promover neuroproteção de diversas formas. A inibição de proteínas que participam da morte neuronal ou impedem seu crescimento após uma lesão e a administração de fatores de crescimento neuronal ou mensageiros intracelulares (como o AMPc) são as mais abordadas em trabalhos experimentais (Cai e cols., 1999; Ming e cols., 1997; Song e cols., 1997, 1998). Um estudo recente de nosso grupo demonstrou que o DNP é capaz de aumentar os níveis intracelulares de AMPc (Wasilewska-Sampaio e cols., 2005). Essa molécula, por sua vez, induz, dentre vários outros efeitos, um aumento na transcrição de uma proteína extremamente importante para o desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso, a proteína precursora amilóide (APP). Como descrito na Introdução, a APP é uma proteína com muitas funções e, dependendo de seu processamento proteolítico, pode participar de processos envolvidos na regeneração ou degeneração neuronal (revisado em Gralle e Ferreira, 2007). Em nosso modelo de lesão, constatamos que a imunomarcagem para APP em cortes longitudinais de nervo ciático lesionado diminui em relação ao nervo não lesionado, e que o tratamento com DNP aumenta expressivamente essa marcação 48 horas após a lesão. O mesmo resultado é observado nos gânglios da raiz dorsal (GRD). O aumento da imunomarcagem para APP tanto no nervo quanto nos GRDs mostra que, no tratamento com DNP, não só os axônios lesionados mas também os corpos celulares dos

neurônios devem receber estímulos para a produção de componentes que auxiliem na proteção da célula e na sua reconstrução.

Um efeito similar foi verificado na imunomarcação para neuregulina-1 (Nrg1). A Nrg1 controla, dentre outras funções (ver Introdução), a espessura da bainha de mielina. Sendo assim, é de se esperar que, durante a degeneração de uma fibra mielinizada, ocorra um desequilíbrio na quantidade dessa proteína. Nossos resultados mostraram um resgate na expressão de Nrg1 em nervos de animais tratados com DNP, fornecendo um suporte molecular para os resultados morfométricos discutidos no início desse capítulo.

Embora a demonstração da preservação da estrutura das fibras, em conjunto com a manutenção da estrutura mitocondrial e o aumento nos níveis de proteínas importantes para o funcionamento e sobrevivência do neurônio, sejam argumentos que sugerem que o tratamento com DNP preservou o nervo ciático frente à lesão, na verdade, o que todo e qualquer tratamento para lesões nervosas tem por objetivo é demonstrar uma melhoria funcional, seja ela cognitiva ou motora. Buscamos, então, através da medida do espalhamento dos dedos da pata do membro lesionado, mostrar que a perda de função dos animais tratados com DNP pode ser diminuída significativamente em comparação com animais tratados somente com o veículo. Esse modelo é interessante pois mostra, em um curso temporal rápido, os efeitos deletérios de uma lesão simples e que pode incapacitar um indivíduo caso não haja acompanhamento e tratamento adequados.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com 5 doses de DNP diminui significativamente a perda da função do nervo ciático quando comparado com o grupo que recebeu apenas o veículo ou com o tratamento com 3 doses de DNP. Essa análise reflete de maneira funcional os resultados apresentados neste trabalho e fortalece nossa hipótese de que a preservação da arquitetura tecidual do nervo, juntamente com o aumento na marcação

de proteínas importantes para a mielinização e sobrevivência neuronal, são efeitos positivos do DNP quando administrado após uma lesão por esmagamento.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a utilização do DNP como um agente anti-degenerativo pode abrir uma janela temporal para o tratamento, em que terapias pró-regenerativas possam ser usadas em conjunto para melhorar a recuperação funcional do membro e diminuir o tempo de recuperação do indivíduo.

Sumário dos Resultados

- O tratamento com DNP impede, de maneira dose-dependente, a progressão da degeneração Walleriana em animais que sofreram lesão por esmagamento do nervo ciático.
- Nos animais tratados com DNP, o citoesqueleto dos axônios dos nervos lesionados e a morfologia mitocondrial são preservados após lesão por esmagamento.
- O tratamento com DNP promove aumento na imunomarcação de proteínas relacionadas com sobrevivência neuronal (APP) e mielinização (Nrg1) nos segmentos proximais dos nervos lesionados, e da imunoreatividade para APP nos corpos celulares neuronais presentes nos ganglios de raiz dorsal L4 e L5 .
- Animais tratados com DNP apresentam menor perda de função motora do membro inervado pelo nervo ciático lesionado quando comparados a animais não tratados.

Conclusão

- A administração sistêmica de DNP após uma lesão por esmagamento em nervo periférico pode abrir uma janela de tratamento para que seja aplicado no indivíduo lesionado alguma estratégia pró-regenerativa, diminuindo os danos degenerativos secundários e aumentando a probabilidade de uma melhor recuperação funcional do membro lesionado.

Referências

- Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J., Ram, S. J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36-42.
- Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein α -secretases. *J. Neurosci. Res.* **74**, 342-352.
- Araújo Couto, L., Sampaio Narciso, M., Hokoç, J. N., and Blanco Martinez, A. M. (2004) Calpain inhibitor 2 prevents axonal degeneration of opossum optic nerve fibers. *J. Neurosci Res.* **77**, 410-419.
- Bain, J. R., Mackinnon, S. E., Hunter, D. A. (1989) Functional evaluations of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast. Reconstr. Surg.*, **83**, 129-136.
- Bandtlow, C. E. e Schwab, M. E. (2000) NI-35/250/Nogo-A: a neurite growth inhibitor restricting structural plasticity and regeneration of nerve fibers in the adult vertebrate CNS. *Glia*, **29**, 175-181.
- Battiston, B., Geuna, S., Ferrero, M., and Tos, P. (2005) Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery* **25**, 258-267.
- Bishop, G. H., Clare, M. H. e Landau, W. M. (1971) The relation of axon sheath thickness to fiber size in the central nervous system of vertebrates. *Int. J. Neurosci.*, **2**, 69-77.
- Brand, M. D. (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* **35**, 811-820.
- Breen, K. C., Bruce, M., e Anderton, B. H. (1991) Beta-amyloid precursor protein mediates cell-cell and cell-surface adhesion. *J. Neurosci. Res.* **28**, 90-100.
- Bregman, B. S., Coumans, J. V., Dai, H. N., Kuhn, P. L., Lynskey, J., McAtee, M., and Sandhu, F. (2002) Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury. *Prog Brain Res.* **137**, 257-273.
- Bregman, B. S., McAtee, M., Dai, H. N., and Kuhn, P. L. (1997) Neurotropic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp. Neurol.* **148** (2), 475-494.
- Cai, D., Shen, Y., De Bellard, M., Tang, S., Filbin, M. T. (1999) Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron*, **22**, 89-101.

- Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B. S., Filbin, M.T. (2001) Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J. Neurosci.*, **21**, 4731-4739.
- Camins, A., Verdaguer, E., Folch, J., and Pallàs, M. (2006) Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Reviews*. **12**, 135-148.
- Chen, Y., and Tang, B. L. (2006) The amyloid precursor protein and postnatal neurogenesis/neuroregeneration. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **341**, 1-5.
- Coleman, M., Perry, V. (2002) Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *Trends Neurosci.*, **25**, 532–537.
- Conforti, L., Tarlton, A., Mack, T. G., Mi, W., Buckmaster, E. A., et al. (2000) A Ufd2/D4Cole1e chimeric protein and overexpression of Rbp7 in the slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11377–11382.
- De Felice, F.G., Houzel, J.C., Garcia-Abreu, J., Louzada, P.R.Jr., Afonso, R.C., Meirelles, M.N., Lent, R., Neto, V.M., e Ferreira, S.T. (2001) Inhibition of Alzheimer's disease beta-amyloid aggregation, neurotoxicity, and in vivo deposition by nitrophenols: Implications for Alzheimer's therapy. *FASEB J.*, **15**, 1297-1299.
- De Felice, F.G. and Ferreira, S.T. (2002) Beta-amyloid production, aggregation, and clearance as targets for therapy in Alzheimer's disease, *Cell. Mol. Neurobiol.* **22**, 545–563.
- De Felice, F. G., Vieira, M. N., Saraiva, L. M., Figueroa-Villar, J. D., Garcia-Abreu, J., Liu, R., Chang, L., Klein, W. L., e Ferreira, S. T. (2004) Targeting the neurotoxic species in Alzheimer's disease: inhibitors of Abeta oligomerization. *FASEB J.*, **18**, 1366-1372.
- De Felice, F. G., and Ferreira, S. T. (2006) Novel neuroprotective, neuritogenic and anti-amyloidogenic properties of 2,4-dinitrophenol: the gentle face of Janus. *IUBMB Life*, **58**, 185-191.
- De Felice, F. G., Wasilewska-Sampaio, A. P., Barbosa, A. C., Gomes, F. C., Klein, W. L., e Ferreira, S. T. (2007) Cyclic AMP enhancers and Abeta oligomerization blockers as potential therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*, **4**, 263-271.
- De Medinaceli, L., Freed, W. J., e Wyatt, R. J. (1982) An index of the functional condition of the rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp. Neurol.*, **77**, 634-643.
- Ding, Q., Dimayuga, E. e Keller, J. N. (2006) Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS. *Antioxid. Redox. Signal.* **8**, 163-172.

- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., e Haass, C. (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.*, **5**, 486-488.
- Evans, G. R. (2000) Challenges to nerve regeneration. *Semin. Surg. Oncol.* **19**, 312–318.
- Fanarraga, M. L., GriYths, I. R., Zhao, M., e Duncan, I. D. (1998). Oligodendrocytes are not inherently programmed to myelinate a speciWc size of axon. *J. Comp Neurol.* **399**, 94–100.
- Falls, D. L. (2003) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp. Cell. Res.*, **284**, 14-30.
- Ferreira, S. T., Vieira, M. N. N., e De Felice, F. G. (2007) Soluble Protein Oligomers as Emerging Toxins in Alzheimer’s and Other Amyloid Diseases. *IUBMB Life*, **59**, 332-345.
- Fields, R. D., Schwab, M. E., e Silver, J. (1999) Does CNS myelin inhibit axon regeneration? *Neuroscientist*, **5**, 12-18.
- Filbin, M. T. (2003) Myelin associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 703-713.
- Finn, J.T., Weil, M., Archer, F., Siman, R., Srinivasan, A., e Raff. M.C. (2000) Evidence that Wallerian degeneration and localized axon degeneration induced by local neurotrophin deprivation do not involve caspases. *J. Neurosci.*, **20**, 1333–1341.
- Gao, Y., Nikulina, E., Mellado, W., e Filbin, M. T. (2003) Neurotrophins elevate cAMP to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase-dependent inhibition of phosphodiesterase. *J. Neurosci.*, **23**, 11770-11777.
- George, R., e Griffin, J. W. (1994) Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radicotomy model. *Exp. Neurol.*, **129**, 225-236.
- George, E. B., Glass, J. D., Griffin, J. W. (1995) Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J. Neurosci.*, **15**, 6445-6454.
- Glass, J. D. (2004) Wallerian degeneration as a window to peripheral neuropathy. *Journal of the Neurological Sciences*, **220**, 123-124.
- Gralle, M., e Ferreira, S. T. (2007) Structure and functions of the human amyloid precursor protein: The whole is more than the sum of its parts. *Progress in Neurobiology*, **82**, 11-32.

- Green, B. B. (1954) The formation from the Schwann cell surface of myelin in the peripheral nerves of chick embryos. *Exp. Cell Res.* **7**, 558–562.
- Griffin, J. W., George, E. B., Hsieh, S. T., e Glass, J. D. (1995). Axonal degeneration and other disorders of the axonal cytoskeleton. Em *The Axon*, S.W. Waxman, J.D. Kocsis, e P.K. Stys, ed. (New York: Oxford University Press), pp. 375–390.
- Haass, C. (2004) Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* **23**, 483-488.
- Hagg, T., e Oudega, M. (2006) Degenerative and Spontaneous Regenerative Processes after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*, **23**, 263-280.
- Hanson, M. G., Jr., Shen, S., Wiemelt, A. P., Mc Morris, F. A., e Barres, B. A. (1998) Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro. *J. Neurosci.* **18**, 7361-7377.
- Hare, G. M. T., Evans, P. J., Mackinnon, S. E., Best, T. J., Bain, J. R., Szalai, J. P., e Hunter, R. T. (1992) Walking track analysis: A long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast. Reconstr. Surg.*, **89**, 251-258.
- Hattori, T., Matsuyama, Y., Sakai, Y., Ishiguro, N., Hirata, H., and Nakamura, R. (2008) Chondroitinase ABC enhances axonal regeneration across nerve gaps. *J. Clin. Neurosci.* **15**, 185-191.
- Heath, C. A., e Rutkowski, G. E. (1998) The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. *Trends Biotechnol.* **16**, 163–168.
- Ho, W. H., Armanini, M. P., Nuijens, A., Phillips, H. S., e Osheroff, P. L. (1995) Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14523–14532.
- Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B, Bruce D Trapp, B. D., e Yan, R. (2006) Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat. Neurosci.*, **9**, 1520-1525.
- Jin, Y., McEwen, M. L., Nottingham, S. A., Maragos, W. F., Dragicevic, N. B., Sullivan, G. and Springer, J. E. (2004) The mitochondrial uncoupling agent 2,4-dinitrophenol improves mitochondrial function, attenuates oxidative damage, and increases white matter sparing in the contused spinal cord. *J. Neurotrauma* **21**, 1396-1404.
- Kandel, E. R. (2000) *The Brain and Behavior*. Em: *Principles of neural science*, Editado por Eric R. Kandel, James H. Schwartz e Thomas M. Jessel, Ed. McGraw-Hill, EUA. pp. 8.

- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., e Muller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, **325**, 733-736.
- Koeppen, A. H. (2004) Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J. Neurol. Sci.*, **220**, 115-117.
- Koo, E.H., Sisodia, S.S., Archer, D.R., Martin, L.Y., Weidemann, A., Beyreuther, K., Fischer, P., Masters, C.L., Price, D.L. (1990) Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 1561-1565.
- Lee, A. C., Yu, V. M., Lowe III, J. B., Brenner, M. J., Huntter, D. A., Mackinnon, S.E., and Sakiyama-Elbert, S.E. (2005) Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp. Neurol.* **184**, 295-303.
- Lent, R. (coordenador) (2008) A Estrutura do Sistema Nervoso. Em Neurociência da Mente e do Comportamento. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, pp. 19-40.
- Lipton, S.A., e Rosenberg, P.A. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders, *N. Engl. J. Med.* **330**, 613-622.
- Luo, L., e O'Leary, D. D. M. (2005) Axon retraction and degeneration in development and disease. *Ann. Rev. Neurosci.*, **28**, 127-156.
- Machado, A. B. M. (2003) Anatomia Macroscópica do Telencéfalo. Em: *Neuroanatomia Funcional*, 2º Edição. Ed. Atheneu, São Paulo. pp. 59-73.
- Mack, T. G., Reiner, M., Beirowski, B., Mi, W., Emanuelli, M., et al. (2001) Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/Nmnat chimeric gene. *Nat. Neurosci.*, **4**, 1199-206.
- Maragos, W.F., Rockich, K.T., Dean, J.J., and Young, K.L. (2003) Pre- or posttreatment with the mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates striatal quinolinate lesions. *Brain Res.* **966**, 312-316.
- Mattson, M. P. (1994) Secreted forms of beta-amyloid precursor protein modulate dendritic outgrowth and calcium responses to glutamate in cultured embryonic hippocampal neurons. *J. Neurobiol.* **25**, 439-450.
- Mattson, M. (2003) Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders, *Neuromolec. Med.* **3**, 65-94.
- Meek, M. F. and Coert, J. H. (2002) Clinical use of nerve conduits in peripheral nerve repair: review of the literature. *J. Reconstr. Microsurg.* **18**, 97-109.

- Michailov, G. V., Sereda, M. W., Brinkmann, B. G., Fischer, T. M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M. H., e Nave, K. A. (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science*, **304**, 700-703.
- Ming, G. L., Song, H. J., Beringer, B., Holt, C. E., Tessier-Lavigne, M., e Poo, M. M. (1997) cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron*, **19**, 1225-1235.
- Monti, B., Berteotti, C., e Contestabile, A. (2006) Subchronic rolipram delivery activates hippocampal CREB and arc, enhances retention and slows down extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, **31**, 278-286.
- Moore, K. L. e Dalley, A. F. (1999) Anatomia Orientada para a Clínica 4° ed. Ed. Lippincott Williams & Wilkins Inc. USA, pp. 493-495.
- Morin, P.J., Abraham, C.R., Amaratunga, A., Johnson, R.J., Huber, G., Sandell, J.H., Fine, R.E. (1993) Amyloid precursor protein is synthesized by retinal ganglion cells, rapidly transported to the optic nerve plasma membrane and nerve terminals, and metabolized. *J. Neurochem.*, **61**, 464-473.
- Nakamura, T., Inada, Y., Fukuda, S., Yoshitani, M., Nakada, Itoi, S., Kanemaru, S., Endo, K., e Shimizu, Y. (2004) Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Res.* **1027**, 18-29.
- Nikulina, E., Tidwell, J. L., Dai, H. N., Bregman, B. S., e Filbin, M. T. (2004) The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8786-8790.
- Nishimura, I., Takazaki, R., Kuwako, K., Enokido, Y., and Yoshikawa, K. (2003) Upregulation and antiapoptotic role of endogenous Alzheimer amyloid precursor protein in dorsal root ganglion neurons. *Exp. Cell Res.* **286**, 241-251.
- Pandya, J. D., Pauly, J. R., Nukala, V. N., Sebastian, A. H., Day, K. M., Korde, A. S., Maragos, W. F., Hall, E. D., and Sullivan, P. G. (2007) Post-injury administration of mitochondrial uncouplers increases tissue sparing and improves behavioral outcome following traumatic brain injury in rodents. *J. Neurotrauma* **24**, 798-811.
- Papp, H., Pakaski, M., e Kasa, P. (2002) Presenilin-1 and the amyloid precursor protein are transported bidirectionally in the sciatic nerve of adult rat. *Neurochem. Intl.*, **41**, 429-435.
- Parascandola, J. (1974) Dinitrophenol and bioenergetics: a historical perspective. *Mol. Cell Biochem.* **5**, 69-77.

- Pearse, D. D., Pereira, F. C., Marcillo, A. E., Bates, M. L., Berrocal, Y. A., Filbin, M. T., e Bunge, M. B. (2004) cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat. Med.*, **10**, 610-616.
- Pereira Lopes, F. R., Camargo de Moura Campos, L., Dias Corrêa, J. Jr., Balduino, A., Lora, S., Langone, F., Borojevic, R., e Blanco Martinez, A. M. (2006) Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Exp. Neurol.*, **198**, 457-468.
- Perry, V. H., Brown, M. C., e Gordon, S. (1987) The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *J. Exp. Med.* **165**, 1218-1223.
- Qiu, J., Cai, D., e Filbin, M. T. (2000) Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. *Glia*, **29**, 166-174.
- Raff, M.C., Whitemore, A.V., e Finn, J.T. (2002) Axonal self destruction and neurodegeneration. *Science*, **296**, 868-871.
- Ramon y Cajal, S. (1928) “Degeneration and Regeneration of the Nervous System” (R. M. May, trans.). Oxford University Press, London.
- Rushton, W. A. H. (1951) A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J. Physiol.*, **115**, 101-122.
- Samii, A., Carvalho, G. A., e Samii, M. (2003) Brachial Plexus Injury: Factors affecting functional outcome in spinal accessory nerve transfer for the restoration of elbow flexion. *J. Neurosurg.*, **98**, 307-312.
- Sandvig, A., Berry, M., Barret, L., Butt, A., e Logan, A. (2004) Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*, **46**, 225-251.
- Schlaepfer, W. W., e Bunge, R. P. (1973) The effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. *J. Cell Biol.*, **59**, 456-470.
- Siegel, A. e Sapru, H. N. (2006) *Essencial Neuroscience*. Lippincott Williams & Wilkins Inc. USA, pp. 4-140.
- Skulachev, V. P. (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1336**, 100-124.
- Snell, R. S. (2006) *Clinical Anatomy by Systems*. Lippincott Williams & Wilkins Inc. USA, pp. 272-273.
- Song, H. J., Ming, G. L., e Poo, M. M. (1997) cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature*, **388**, 275-279.

- Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., e Poo, M. (1998) Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science*, **281**, 1515-1518.
- Stichel, C. C., Hermmans, S., Luhmann, H. J., Lausberg, F., Niermann, H., D'Urso, D., Servos, G., Hartwig, H. G., e Muller, H. W. (1999) Inhibition of collagen IV deposition promotes regeneration of injured CNS axons. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 632-646.
- Stoll, G., Trapp, B. D., e Griffin, J. W. (1989) Macrophage function during Wallerian degeneration of the rat optic nerve: clearance of degenerating myelin and Ia expression. *J. Neurosci.*, **9**, 2327-2335.
- Stoll, G., Jander, S., e Myers, R. (2002) Degeneration and Regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J. Periph. Nerv. Sys.* **7**, 13-27.
- Storey, E., Katz, M., Brickman, Y., Beyreuther, K., e Masters, C. L. (1999) Amyloid precursor protein of Alzheimer's disease: evidence for a stable, full-length, transmembrane pool in primary neuronal cultures. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 1779-1788.
- Stout, A. K., Raphael, H. M., Kanterewicz, B. I., Kann, E. e Reynolds, I. J. (1998) Glutamate-induced neuronal death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat. Neurosci.* **1**, 366-373.
- Sullivan, P. G., Dragicevic, N. B., Deng, J., Bai, Y., Dimayuga, E., Ding, Q., Chen, Q., Bruce-Kelle, A. J., e Keller, J. N. (2004) Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondrial turnover. *J. Biol. Chem.* **20**, 20699-20707.
- Tatsuta, T., e Langer, T. (2008) Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J.* **27**, 306-314.
- Teng, F. Y. H. e Tang, B. L. (2006) Axonal regeneration in adult CNS neurons – signaling molecules and pathways. *J. Neurochem.*, **96**, 1501-1508.
- Terzis, J. K., Sun, D. D., e Thanos, P. K. (1997) History and basic science review: past, present and future of nerve repair. *J. Reconstr. Microsurg.* **13**, 215–225.
- Trapp, S. D., e Kidd, G. J. (2004) Structure of the myelinated axon. Em: Myelin biology and disorders, Vol I. ed. Elsevier. pp. 3-5.
- Vartanian, T., Goodearl, A., Viehover, A., Fischbach, G. (1997) Axonal neuregulin signals cells of the oligodendrocyte lineage through activation of HER4 and Schwann cells through HER2 and HER3. *J. Cell. Biol.*, **137**, 211–220.

- Vaudry, D., Chen, Y., Ravni, A., Hamelink, C., Elkahloun, A. G., e Eiden, L. E. (2002) Analysis of the PC12 cell transcriptome after differentiation with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *J. Neurochem.*, **83**, 1272-1284.
- Wallace, W., Ahlers, S.T., Gotlib, J., Bragin, V., Sugar, J., Gluck, R., Shea, P. A., Davis, K. L., and Haroutunian, V. (1993) Amyloid precursor protein in the cerebral cortex is rapidly and persistently induced by loss of subcortical innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8712-8716.
- Waller, A. (1850) Experiments on the section of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alternatives produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **140**, 423-429.
- Wasilewska-Sampaio, A.P., Silveira, M.S., Holub, O., Goecking, R., Gomes, F.C.A., Moura Neto, V., Linden, R., Ferreira, S.T., e De Felice, F.G. (2005) Neuritogenesis and neuronal differentiation promoted by 2,4-dinitrophenol, a novel anti-amyloidogenic compound, *FASEB J.* **19**, 1627-1636.
- Willem, M., Garratt, A. M., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., e Haass, C. (2006) Control of peripheral nerve myelination by the β -secretase BACE1. *Science*, **314**, 664-666.
- Xia, W., Zhang, J., Perez, R., Koo, E.H., Selkoe, D.J. (1997) Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 8208-8213.
- Zhai, Q., Wang, J., Kim, A., Liu, Q., Watts, R., Hoopfer, E., Mitchison, T., Luo, L., e He, Z. (2003) Involvement of the Ubiquitin-Proteasome System in the Early Stages of Wallerian Degeneration. *Neuron*, **39**, 217-225.
- Zuo, J., Hernandez, Y. J. e Muir, D. (1997) Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite-inhibiting activity is up-regulated following peripheral nerve injury, *J Neurobiol* **34**, 41-54.

Curriculum vitae

Rodrigo Furtado Madeiro da Costa

Casado, brasileiro, 31 anos
Rua João Afonso, 87a - Humaitá
CEP 22261-040 - Rio de Janeiro - RJ
Tel. residencial: (21) 2539-6316
Tel. celular: (21) 9584-1300
E-mail: biomadeiro@yahoo.com.br / madeiro@bioqmed.urfj.br

Formação acadêmica

Desde 2005 – Aluno de Doutorado do Programa de Bioquímica e Biofísica Celular do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Conceito 7 da CAPES)

2004/2005 - Mestre em Ciências Morfológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Conceito 7 da CAPES)

1998/2001 - Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Santa Úrsula (Bacharelado e Licenciatura). (Conceito A no Exame Nacional de Cursos do MEC)

Idiomas

Fluência em inglês (nível avançado para leitura, conversação e escrita).

Conversação e compreensão razoável do espanhol.

Experiência acadêmica

Desde 2005 - UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Laboratório de Doenças Neurodegenerativas

Orientador: Dr. Sergio Teixeira Ferreira e Dr^a. Ana Maria Blanco Martinez

Cargo: Aluno de Pós-Graduação, nível doutorado

Desenvolvimento de tese de doutorado intitulada “Efeito do 2,4 - dinitrofenol contra a degeneração do nervo ciático em camundongos”. Manipulação de animais para experimentação, métodos de perfusão intra-aórtica para fixação *in vivo*, métodos de avaliação biomecânica e utilização de criostato para obtenção de cortes congelados de tecido, preparo e manutenção de culturas primárias de neurônios periféricos murinos, utilização de microscopia confocal e eletrônica de transmissão. Bolsista CNPq.

2002/2005 - INCa - Instituto Nacional de Câncer - Laboratório de Biologia Estrutural

Orientador: Dr. José Andrés Morgado Díaz e Dr^a. Marlene Benchimol

Cargo: Estagiário (Aperfeiçoamento científico e Mestrado)

Aperfeiçoamento em técnicas modernas no estudo da célula como: Cultivo de células epiteliais em garrafas de polipropileno, fracionamento sub-celular, dosagem de proteínas por espectrofotometria, SDS-PAGE, western blotting, análise de resistência transepitelial e microscopia eletrônica de transmissão de células orientadas em monocamada (polarizadas). Dissertação de mestrado intitulada “Modificações no complexo juncional de células Caco-2 após interação com *Trichomonas vaginalis*” sendo desenvolvida neste instituto através do Programa de Pós Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Bolsista INCa.

1999/2002 - Laboratório de Ultraestrutura Celular - Universidade Santa Úrsula

Orientador: Dra. Marlene Benchimol

Cargo: Estagiário (Iniciação científica)

Aprendizado em técnicas modernas de biologia celular. Preparo de soluções e reagentes, manipulação em câmaras de fluxo laminar e capela de gases tóxicos, cultivo de protozoários parasitas em meio axênico, congelamento de células, microscopia óptica (campo claro, contraste de fase, campo escuro, contraste interferencial diferencial, microscopia de polarização e imunofluorescência), microscopia eletrônica de transmissão e varredura, ultramicrotomia e crioultramicrotomia, imunocitoquímica em cortes de resina ultrafinos e criocortes, aquisição e processamento de imagens digitais, técnicas de revelação e ampliação fotográfica. Bolsista CNPq.

1998/1999 - Laboratório de Ecologia de Nécton - Universidade Santa Úrsula

Orientador: Dra. Josefina Reyna Kurtz

Cargo: Estagiário (Iniciação científica)

Estudo de comunidades nectônicas, dinâmica populacional, análise de conteúdo estomacal de peixes nectônicos e bentônicos, bioestatística, ecologia animal, biologia marinha e oceanografia química, física e biológica.

1998 - Instituto de Ecodesenvolvimento da Baía de Ilha Grande

Cargo: Estagiário (Iniciação científica)

Estudo da biologia e do cultivo de moluscos bivalves. Análises morfométricas, estatísticas e de populações associadas. Estudo do impacto da implantação de sistemas de cultivo no ambiente e suas relações com a população local.

Trabalhos publicados

Carneiro, V. C., de Moraes Maciel, R., de Abreu da Silva, I. C., da Costa, R. F., Paiva, C. N., Bozza, M. T. Fantappiè, M. R. (2009) The extracellular release of *Schistosoma mansoni* HMGB1 nuclear protein is mediated by acetylation. Biochem. Biophys. Res. Comm., 390, 1245-1249.

Maciel, R. M., Madeiro da Costa, R. F., Oliveira, F. M. B., Rumjanek, F. D., Fantappiè, M. R. Protein acetylation sites mediated by *Shistosoma mansoni* GCN5. Biochem. Biophys. Res. Com., 370: 53-56, 2008.

De Meis, L., Arruda, A. P., Madeiro da Costa, R. F., Benchimol, M. Identification of a Ca²⁺-ATPase in brown adipose tissue mitochondria. Regulation of thermogenesis by ATP and Ca²⁺. J. Biol. Chem., 281 (24): 16384-16390, 2006.

De Meis, L., Oliveira, G. M., Arruda, A. P., Santos, R., Madeiro da Costa, R. F., Benchimol, M. The thermogenic activity of rat brown adipose tissue and rabbit white muscle Ca²⁺ ATP-ase. IUBMB Live., 57 (4/5): 337-345, 2005.

Madeiro da Costa, R. F., De Souza, W., Benchimol, Alderete, J. F., M. and Morgado Díaz, J. A. *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. Cell Res., 15 (9): 704-716, 2005.

Madeiro da Costa, R. F. and Benchimol, M. The effect of drugs on cell structure of *Tritrichomonas foetus*. Parasitol. Res., 92: 159-170, 2004.

Apresentações em congressos

Madeiro da Costa, R. F., Pontes, D. A., Martinez, A. M. B., Ferreira, S. T. Effect Of 2,4-Dinitrophenol In Sciatic Nerve Degeneration. 5th World Congress for Neurorehabilitation, SARA Network of Rehabilitation Hospitals, Brasília, DF, 2008.

Madeiro da Costa, R. F., Pontes, D. A., Martinez, A. M. B., Ferreira, S. T. Efeito protetor do 2,4 dinitrofenol contra a degeneração do nervo isquiático após esmagamento. II Semana de Pós-Graduação de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2008.

Carneiro, V. C., Maciel, R. M., Silva, I. C. A., Madeiro da Costa, R. F., Rumjanek, F. D., Fantappi , M. R. The role of acetylation in *Schistosoma mansoni* HMGB1 Protein. XI Simpósio Internacional sobre Esquistossomose. Salvador, BA, 2008.

Madeiro da Costa, R. F., Pontes, D. A., Martinez, A. M. B., Ferreira, S. T. Effect Of 2,4-Dinitrophenol In Sciatic Nerve Degeneration. I Congresso IBRO/LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica, Arma o dos Búzios, RJ, 2008.

Madeiro da Costa, R. F., Pontes, D. A., Martinez, A. M. B., Ferreira, S. T. Effect Of 2,4-Dinitrophenol In Sciatic Nerve Degeneration. European Life Scientist Organization Meeting. Nice, France, 2008.

Carneiro, V. C., Maciel, R. M., Silva, I. C. A., Bozza, M., Madeiro da Costa, R. F., Rumjanek, F. D., Fantappi , M. R. Esquistossomose: proteína HMGB1 como potente alvo terapêutico. In: XI Encontro Anual do Grupo Arthromint, 2007, Ouro Preto - MG. XI Encontro Anual do Grupo Arthromint, 2007.

Carneiro, V. C., Maciel, R. M., Silva, I. C. A., Bozza, M., Madeiro da Costa, R. F., Rumjanek, F. D., Fantappi , M. R. Esquistossomose: proteína HMGB1 como potente alvo terapêutico. In: XXIX Jornada Giulio Massarani de Inicia o Científica da UFRJ, 2007, Rio de Janeiro. XXIX Jornada Giulio Massarani de Inicia o Científica da UFRJ, 2007

Madeiro da Costa, R. F., Martinez, A. M. B., Ferreira, S. T. Efeito do 2,4-Dinitrofenol na degenera o do nervo ciático. 1st Semana de Pós Gradua o de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Centro de Ciências da Saúde, Rio de Janeiro, RJ, 2007.

Madeiro da Costa, R. F., Martinez, A. M. B., Ferreira, S. T. Effect Of 2,4-Dinitrophenol In Sciatic Nerve Degeneration. 1st South American Workshop on Advanced Fluorescence Microscopy Techniques. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Pitanga, R. G., Costa, R. M., Mietto, B. S., Moura Campos, L. C., Langone, A., Lora, S., Coelho-Sampaio, T. L., Martinez, A. M. B. Effect of Acid Laminin in the Ciatic Nerve Regeneration. XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Arma o dos Búzios, RJ, 2007.

Mietto, B. S., Madeiro, R., Ferreira, S. T., Martinez, A. M. B., Estudo preliminar do Efeito do 2,4-dinitrofenol (DNP) na regenera o do nervo ciático. 1^a Jornada Científica do Hospital Central do Exército, Rio de Janeiro, RJ, 2006.

Mietto, B. S., Madeiro, R., Ferreira, S. T., Martinez, A. M. B., Estudo preliminar do Efeito do 2,4-dinitrofenol (DNP) na regenera o do nervo ciático. II Congresso do Programa Institucional de Bolsas de Inicia o Científica (PIBIC / CNPq / USU), Rio de Janeiro, RJ, 2006.

Maciel, R. M., Silva, I. C. A., Oliveira, F. M. B., Madeiro da Costa, R. F., Furtado, D., Dutra, D. L. S., Rumjanek, F. D., Fantappi , M. R. Chromatin remodeling in *Schistosoma mansoni*: involvement of cofactors. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e de Biologia Molecular.  guas de Lindóia, MG, 2006.

Carneiro, V. C., Maciel, R. M., Silva, I. C. A., Oliveira, F. M. B., Madeiro da Costa, R. F., Bozz, M. T., Rumjanek, F. D., Fantappi , M. R. Schistosomiasis: High Mobility Group B1 protein as a potential therapeutic target. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e de Biologia Molecular.  guas de Lindóia, MG, 2006.

R. M. Costa, J. M. Diaz, W. de Souza, M. Benchimol. Modifications at the Junctional Complex of Caco-2 Cells After *Trichomonas vaginalis* Interaction. 44th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Washington DC, EUA, Dezembro de 2004.

Fernandes, S. S., Redondo, P. A., Oliveira, S. S., Deir  de Carvalho, A., Goto- Sliva, L., Leve, F., Madeiro, R., de Souza, W and Morgado-Diaz, J. A. Evidence that PKA play a regulatory role in the assembly of the golgi complex in HT-29 cells. XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microan lise, Caxambu, MG, 2003.

Madeiro, R., Ribeiro, K. and Benchimol, M. Observation of microtubules of *Tritrichomonas foetus* after treatment with paclitaxel (taxol) and nocodazol. XXVII Encontro Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas e XVI Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia, Caxambu, MG, 2000.

Seminários

“Efeito protetor do 2,4 dinitrofenol contra a degenera o do nervo ciático após esmagamento”. Ciclo de Palestras do Programa Avançado de Neurociências. 2008

Neurodegenera o X Neuroregenera o. VI Semana de Biologia e Meio Ambiente da Universidade Santa Úrsula. 2006.

Experiência didática

Monitoria no curso: Técnicas Modernas no Estudo de Microorganismos Parasitas realizado no período de 27 de janeiro a 09 de fevereiro de 2003 no Laboratório de Ultraestrutura Celular da Universidade Santa Úrsula sob a coordena o da Prof^a Marlene Benchimol com o apoio do PROEP/CAPES.

Monitoria no curso: Imunocitoquímica Ultraestrutural e Crioultramicrotomia realizado no período de 8 a 13 de março de 2004 no Laboratório de Ultraestrutura Celular da Universidade Santa Úrsula sob a coordena o da Prof^a Marlene Benchimol com o apoio do CNPq/PROSUL.

Curso de Microscopia Óptica para alunos de iniciação científica e pós-graduação realizado no período de 3 a 17 de junho de 2004 na coordenação de pesquisa do Instituto Nacional do Câncer.

Cursos de mergulho autônomo básico, avançado, Nitrox, Trimix, Computadores de Mergulho e Tabelas Multi-nível e Identificação de seres Marinhos seguindo as normas e procedimentos da Professional Diving Instructors Corporation (PDIC).

Informações adicionais

Experiência em Windows NT/98/2000/XP, Adobe Photoshop CS, Office, Image Java, KS 300/400, 3D studio, SWISHmax, K3CCD, Globals for Images e Spectroscopy, Prisma e Internet em geral.

Instrutor especialista de mergulho autônomo pela Professional Diving Instructors Corporation (PDIC) desde 2002.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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