

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

Alessandra Cadete Martini

**ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS QUINASES ATIVADAS
POR MITÓGENOS ESPINHAIS NA LESÃO MEDULAR
TRAUMÁTICA EM RATOS**

Florianópolis

2011

Alessandra Cadete Martini

**ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS QUINASES ATIVADAS
POR MITÓGENOS ESPINHAIS NA LESÃO MEDULAR
TRAUMÁTICA EM RATOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Co-orientador: Dr^a. Janice Koepf

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

M386e Martini, Alessandra Cadete

Envolvimento das proteínas quinases ativadas por mitógenos espinhais na lesão medular traumática em ratos [dissertação] / Alessandra Cadete Martini; orientador, Giles Alexander Rae. - Florianópolis, SC, 2011.

102 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Medula espinhal. 3. Proteínas quinases. 4. Apoptose. 5. Atividade motora. I. Rae, Giles Alexander. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz Carlos e Odete, que sempre me apoiaram e entenderam, ou nem sempre entenderam, mas não deixaram de estar ao meu lado. Por me ensinarem o valor do estudo e do trabalho, meu infinito amor, respeito e gratidão.

Ao meu orientador, professor Giles Alexander Rae, pela valiosa orientação e por ser um exemplo de professor e pesquisador. Pelo apoio, por acreditar na minha capacidade em realizar este trabalho e pela amizade, thanks!

À minha co-orientadora, Janice Koepp, pelo apoio, incentivo e amizade. E por acreditar e se dedicar tanto a esse projeto.

À Stefânia Forner, pela cumplicidade em absolutamente todos os momentos. Por me fazer enxergar tudo sempre com outros olhos. “... você ocupa um dos lugares mais bonitos”. Sempre. Aos seus pais, Valério e Damir, pelo carinho, incentivo e exemplo.

Ao meu irmão, Alexandre, e minha cunhada, Alessandra, pelo carinho e compreensão. Em especial meu sobrinho Lucas, que mesmo longe faz meus dias muito mais bonitos.

À Nanica, o cão melhor amigo que alguém pode ter, que faz meus dias mais divertidos e sempre me recebe em casa, depois de um dia exaustivo, como se eu fosse uma super celebridade.

Às meninas do laboratório, Giselle, Lenyta, Daniela e Laurien, e às “ex-colegas” Rafaela, Juliana e Cibelle, por tantas horas de trabalho compartilhadas, sempre agradáveis. Obrigada pela paciência e apoio. Em especial à Ana e à Samilla pela ajuda, pelos desabafos, brincadeiras e amizade.

Aos colegas e amigos do Lafex, por me auxiliarem em tantos experimentos como se eu pertencesse ao laboratório e pela amizade. Em especial à Juliana F. Garcia, Edinéia L. Andrade, Rafael Dutra, Allisson Freire Bento, Maira Cola, Juliana Chaves, Cláudia Figueiredo, Eliziane Patrício, Marianne Manjavachi e Rodrigo Marcon.

Ao professor Edmundo Grisard e seus alunos, em especial à Débora, por auxiliarem com os experimentos de western blot e com o uso do microscópio.

À Juliana G. da Cunha, Aline Garcia e Patrícia V. Abreu por facilitarem minha vida e meus experimentos, em todos os sentidos. Obrigada mesmo! E claro, por tantos almoços compartilhados.

Ao Renato Mussi, pelo empréstimo do tripé que permitiu as filmagens deste trabalho e pela amizade.

Aos funcionários do departamento, especialmente ao Pedro e Murilo, sempre muito solícitos, tornando nossa vida muito mais fácil. Todo meu respeito.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, por contribuírem com a minha formação e por fazerem sua parte para melhorar a educação desse país.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

“I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale”.

Marie Curie

RESUMO

O envolvimento das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) em lesões do sistema nervoso central já foi demonstrado em alguns estudos. Porém, a implicação da ativação dessas proteínas na medula espinhal após a lesão medular traumática necessita de maior esclarecimento. O presente estudo investigou a participação das MAPKs ERK1/2, p38 e JNK no dano espinhal e funcional induzido pela lesão medular traumática em ratos. A compressão da medula espinhal, através da inserção de um cateter de embolectomia no espaço epidural, resultou em uma lesão espinhal caracterizada histologicamente por resposta inflamatória pronunciada, com edema, infiltração de neutrófilos, produção de mediadores inflamatórios e apoptose, associada com comprometimento locomotor significativo. A lesão medular não alterou a expressão protéica total de quaisquer das MAPKs na medula espinhal. Contudo, os níveis de expressão das isoformas fosforiladas de cada MAPK em amostras espinhais de animais lesados apresentaram-se elevadas, em relação às de amostras de animais falso-operados, nos seguintes momentos após indução da lesão: p38 fosforilada em 2 e 6 h, ERK1/2 fosforilada em 2, 6 e 24 h, e JNK fosforilada apresentou uma elevação significativa em 6 e 24 h. Amostras espinhais de animais lesados apresentaram ainda aumento nos níveis das citocinas IL-1 β em 2, 6 e 24 h após a lesão e de TNF- α em 2 h, atividade aumentada da enzima mieloperoxidase (uma medida indireta da infiltração de neutrófilos) em 6, 24 e 72 h, e do número de células apoptóticas em 24 e 72 h após a lesão. A administração intratecal do inibidor seletivo da proteína JNK, o SP600125 (2 injeções de 150 nmol, 1 e 4 h após a lesão medular), reduziu a expressão da proteína JNK fosforilada (mas não de p-38 ou ERK1/2 fosforiladas) e bloqueou a apoptose em 6 h, sem alterar os níveis espinhais de mieloperoxidase. O tratamento com SP600125 acentuou marcadamente a recuperação da atividade locomotora dos animais no transcorrer das primeiras 4 semanas após a lesão, e atenuou os danos histológicos espinhais. Este estudo demonstra o importante envolvimento das MAPKs na lesão medular e aponta a proteína JNK como um importante alvo terapêutico no tratamento da lesão medular traumática, uma vez que um inibidor seletivo desta proteína foi capaz de inibir a apoptose espinhal e potencializar a recuperação da função locomotora.

Palavras-chave: Lesão medular traumática. Proteínas quinases ativadas por mitógenos. Morte celular programada. Recuperação locomotora.

ABSTRACT

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) have been extensively implicated in injuries of the CNS, however the roles played by spinal cord MAPK activation following spinal cord injury (SCI) still remain elusive. Considering that the therapies currently available for treatment of this condition have limited efficacy, the use of animal models of SCI is still mandatory for development of new more effective approaches. The current study investigates the changes in expression of the three main MAPKs, namely ERK1/2, p38 and JNK following traumatic SCI, as well as the role played by spinal JNK in motor impairment following lesion. SCI induced by inflation of a balloon catheter placed in the epidural space at T9-T10, was associated with a marked spinal inflammatory response, histological changes and a pronounced locomotor impairment which subsided only partially over the first 4 weeks. Spinal expression levels of total p38, ERK1/2 and JNK proteins were unchanged after SCI, but levels of the phosphorylated (phospho) forms of each of the MAPKs were enhanced as follows: phospho-p38 MAPK at 2 and 6 h after SCI, phospho-ERK1/2 at 2, 6 and 24 h after SCI, and phospho-JNK at 6 and 24 h after SCI. SCI also increased IL-1 β at 2, 6 and 24 h, TNF- α at 2 h, spinal cord MPO levels at 6, 24 and 72 h and elevated the number of spinal apoptotic cells in the spinal cord at 24 and specially 72 h after the lesion. Notably, intrathecal administration of a specific inhibitor of JNK phosphorylation, SP600125 (2 injections of 150 nmol, given at 1 and 4 h after SCI surgery), reduced the expression of phospho-JNK (but not of phospho-p38 or phospho-ERK1/2) and the number of spinal apoptotic cells at 6 h after SCI, as well as many of the histological signs of spinal injury, but spinal MPO levels were unchanged. Most importantly, restoration of locomotor performance throughout the first 4 weeks following SCI was clearly ameliorated by this same treatment schedule with SP600125. Altogether, the results demonstrate that SCI induces the activation of spinal MAPKs and that, among these, spinal JNK plays a major role in mediating the deleterious consequences of spinal injury, not only at the spinal level, but also those regarding motor function. Moreover, they suggest that inhibition of JNK activation in the spinal cord might hold therapeutic potential for the functional recovery from SCI.

Keywords: Traumatic spinal cord injury, Mitogen-activated protein kinase, Programmed cell death, Locomotor function recovery.

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1 - Anatomia da medula espinhal.....	4
Figura 2 - Fisiopatologia da lesão medular traumática.....	11
Figura 3 - Vias de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs).....	16
Figura 4 - Possíveis substratos das proteínas ERK1/2, JNK 1/2/3 e p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ e principais funções relacionadas a elas.....	20
Figura 5 - Desenho representativo do orifício para exposição da medula e da posição do cateter Fogarty.....	25
Figura 6 - Padronização de um modelo de lesão medular traumática de intensidade moderada.....	33
Figura 7 - Perfil temporal de expressão da MAPK p38 (proteína total e proteína fosforilada), na medula espinhal após a lesão medular traumática.....	34
Figura 8 - Perfil temporal de expressão da proteína ERK1/2 (proteína total e proteína fosforilada), na medula espinhal após a lesão medular traumática.....	35
Figura 9 - Perfil temporal de expressão da proteína JNK (proteína total e proteína fosforilada) na medula espinhal após a lesão medular traumática	36
Figura 10 - Efeito do tratamento com SP600125 150 nmol sobre a expressão das proteínas JNK e JNK fosforilada após a lesão medular traumática.....	37
Figura 11 - Efeito do tratamento com SP600125 150 nmol sobre a expressão das proteínas p38 e p38 fosforilada após a lesão medular traumática.....	37
Figura 12 - Efeito do tratamento com SP600125 150 nmol sobre a expressão das proteínas ERK1/2 e ERK1/2 fosforilada após a lesão medular traumática.....	38
Figura 13 - Alterações histopatológicas da medula espinhal submetida à lesão medular traumática.....	40
Figura 14 - Efeito do tratamento com SP600125 (150 nmol) sobre as alterações histopatológicas da medula espinhal submetida à lesão medular traumática	41

Figura 15 - Níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α na medula espinhal de animais submetidos à lesão medular traumática.....	42
Figura 16 - Efeito da lesão medular traumática sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na medula espinhal e influência do tratamento com SP600125.....	43
Figura 17 - Número de células apoptóticas presentes na medula espinhal de animais submetidos à lesão medular traumática	45
Figura 18 - Efeito do tratamento com SP600125 150 nmol sobre o número de células apoptóticas na medula espinhal de animais submetidos à lesão medular traumática.....	46
Figura 19 - Avaliação do efeito do tratamento com SP600125 sobre a atividade locomotora de animais submetidos à lesão medular traumática através da escala BBB.....	47

LISTA DE TABELAS

pág.

Tabela 1 - Classificação neurológica padrão da lesão medular.....6

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP – Monofosfato de adenosina
ANOVA – Análise de variância
ASK – Quinase reguladora do sinal de apoptose
ATP – Adenosina trifosfato
cDNA – DNA complementar
DMSO - Dimetilsulfóxido
EGF – Fator de crescimento epidermal
E.P.M. – Erro padrão da média
ERK1/2 – Proteína quinase regulada por sinal extracelular
GPCR – Receptor acoplado à proteína G
GRD – Gânglio da raiz dorsal
IL - Interleucina
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
JNK – Proteína quinase c-Jun-NH₂- terminal
kDa – Kilodalton
LPS - Lipopolissacarídeo
MAG - glicoproteína associada à mielina
MAPKs – Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MAPKAPK – proteína quinase ativada por MAPK
MPO - Mieloperoxidase
MKK – Proteína quinase quinase ativada por mitógeno
MKKK – Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno
MKKKK – Proteína quinase quinase quinase quinase ativada por mitógeno
NFκB – Fator nuclear κB
Ng - nanograma
Nmol - nanomol
Omgp - glicoproteína da mielina de oligodendrócitos
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
PBS – Salina tamponada com fosfato
RNA – Ácido ribonucléico
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SAPK – Proteína quinase ativada por estresse
SNC – Sistema Nervoso Central
TRM – Traumatismo raquimedular
TNF – Fator de necrose tumoral
μL - microlitro

SUMÁRIO

	pág.
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Justificativa.....	1
1.2 Sistema Nervoso Central: medula espinhal.....	2
1.3 Lesões medulares.....	5
1.3.1 Lesão Medular Traumática.....	5
1.3.2 Fisiopatologia da lesão medular traumática.....	8
1.3.3 Morte celular após a lesão medular.....	12
1.4 A via de sinalização celular das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs).....	13
1.4.1 Histórico.....	13
1.4.2 Vias de sinalização.....	14
1.4.3 Proteína quinase ativada por sinal extracelular – ERK1/2.....	17
1.4.4 Proteína quinase p38 MAPK.....	18
1.4.5 Proteína quinase c-jun-NH ₂ - terminal – JNK.....	19
1.5 Proteínas quinases ativadas por mitógenos na lesão medular traumática.....	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2. Indução da lesão medular.....	24
3.3 Imunoensaio para detecção das MAPKs.....	25
3.4 Análise histológica da medula espinhal.	27
3.5 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	27
3.6 Medida dos níveis de mediadores inflamatórios.....	28
3.7 Ensaio de TUNEL para detecção de células apoptóticas.....	28
3.8 Avaliação da atividade locomotora.....	29

3.9 Tratamentos farmacológicos.....	30
3.10 Drogas e reagentes....	30
3.11 Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Padronização do modelo de lesão medular traumática moderada....	32
4.2 Influência da lesão medular traumática sobre a expressão de MAPKs na medula espinhal.....	33
4.3 Influência do tratamento com SP600125 sobre a expressão de MAPKs na medula espinhal após a lesão medular traumática.....	36
4.4 Alterações histopatológicas da medula espinhal em decorrência da lesão medular traumática, antes e após o tratamento com SP600125....	38
4.5 Níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α na medula espinhal de ratos submetidos à lesão medular traumática.....	42
4.6 Efeito do tratamento com SP600125 sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na medula espinhal após a lesão medular traumática..	43
4.7 Efeito do tratamento com SP600125 sobre a apoptose de células da medula espinhal após a lesão medular traumática.....	44
4.8 Efeito do tratamento com SP600125 sobre a atividade locomotora de ratos submetidos à lesão medular traumática.....	46
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES	59
7 REFERÊNCIAS.....	61
8 ANEXOS.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

Entre as lesões que podem afetar o ser humano, a lesão medular traumática é uma das lesões mais debilitantes, pois apresenta limitada ou nenhuma recuperação neurológica (THURET et al., 2006). No Brasil, a cada ano surgem 9.000 novos casos aproximadamente (MEYER et al., 2003). Considerando que as terapias disponíveis para tratamento desta condição ainda apresentam eficácia muito limitada, a utilização de modelos experimentais de lesão medular traumática é ainda imprescindível à investigação de abordagens terapêuticas mais efetivas. Buscando identificar novas estratégias terapêuticas para a recuperação funcional de pacientes portadores de lesão medular traumática, iniciou-se em 2008 um projeto estruturante coordenado pelo Prof. Dr. Giles Alexander Rae e pela Dra Janice Koepp, financiado pela Fundação de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica de Santa Catarina – FAPESC intitulado “Desenvolvimento de novas estratégias para tratamento da lesão medular traumática”. O projeto tem como grandes metas a avaliação das alterações fisiopatológicas e moleculares decorrentes da lesão medular traumática em roedores, a modelagem matemática da medula espinhal, a avaliação epidemiológica da população catarinense de portadores de lesão medular e a prototipagem de microchips orgânicos impressos suscetíveis de agir na lesão medular. O presente estudo, que integra o projeto estruturante, teve por meta específica avaliar o envolvimento de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) no dano funcional decorrente da lesão medular traumática em ratos. Neste contexto, primeiramente, a introdução abordará a anatomia e fisiologia do Sistema Nervoso Central (SNC), com foco especial na medula espinhal e na patofisiologia da lesão medular traumática, bem como em aspectos históricos da descoberta das MAPKs, isoformas e funções e a relação das mesmas com a lesão medular traumática. Em seguida, serão apresentados os materiais e métodos utilizados para a realização deste estudo, bem como os resultados obtidos. Por fim, a discussão do estudo versará sobre a participação de MAPKs, em especial da proteína JNK, no dano locomotor induzido pela lesão medular traumática em ratos.

1.2 Sistema Nervoso Central: medula espinhal

O sistema nervoso central é formado pelo encéfalo e a medula espinhal que, embora estejam intimamente relacionados, apresentam significativo grau de independência funcional. A medula espinhal é a porção posterior do neuroeixo que está protegida dentro do canal vertebral. No homem adulto, a medula espinhal mede aproximadamente 45 cm, sendo um pouco menor na mulher. Cranialmente a medula espinhal limita-se com o bulbo, aproximadamente ao nível do forame magno, entre os côndilos occipitais, enquanto que seu limite caudal situa-se entre as vértebras lombares L₁ e L₂. Inferior à extremidade da medula espinhal situa-se o filamento terminal, um feixe de tecido conectivo e glia que conecta a extremidade da medula ao cóccix. Como a medula espinhal não está presente abaixo do nível vertebral L₁, são necessárias aos axônios raízes longas que vão do término da medula espinhal até a saída na coluna vertebral lombossacra. Essas raízes longas formam a cauda equina dentro do canal vertebral inferior. O formato da medula espinhal é de um tubo cilíndrico com duas dilatações denominadas intumescências, uma cervical e outra lombossacral. Ambas as intumescências relacionam-se com os membros superiores e inferiores, respectivamente, e nestas regiões encontramos acúmulos de corpos neuronais (LUNDY-EKMAN, 2008).

A partir da medula espinhal partem 31 pares de nervos espinhais, sendo 8 cervicais, 12 torácicos, 5 lombares e 6 sacrais. Todos esses nervos formam parte do sistema nervoso periférico e emergem da medula espinhal por meio de espaços existentes entre cada vértebra da coluna vertebral. Por meio dessa rede de nervos, a medula espinhal se conecta com as várias partes do corpo, recebendo sinais provenientes da periferia do corpo em direção ao encéfalo, ou na direção oposta, a partir do encéfalo e em direção ao corpo.

A medula possui dois sistemas de neurônios: o sistema descendente que controla funções motoras dos músculos, regula funções como pressão, temperatura e transporta sinais originados no cérebro até seu destino na periferia; o sistema ascendente que transporta sinais sensoriais das extremidades do corpo até a medula e então, até o cérebro. Os corpos celulares dos neurônios se concentram na parte interna da medula denominada substância cinzenta. Por circundar um canal central, a substância cinzenta da medula espinhal apresenta uma forma de H ou borboleta, dividindo-a em corno dorsal e corno ventral (MARTINI, 1992; LUNDY-EKMAN, 2008). Os corpos celulares dos neurônios estão organizados na substância cinzenta em núcleos com funções

específicas, que se estendem ao longo de todo o comprimento da medula. O núcleo sensorial (dorsal) recebe e transmite informação sensorial de receptores periféricos enquanto o núcleo motor (ventral) emite comandos para efetores periféricos. O corno dorsal contém os núcleos sensoriais somáticos e viscerais, enquanto o corno ventral possui o controle motor somático. Na região do corno lateral, que é uma expansão das porções lateral e posterior do corno ventral, encontram-se núcleos contendo neurônios motores viscerais (MARTINI, 1992). A substância branca, situada na periferia, contém colunas de axônios atravessando a medula nas direções cefálica e caudal. Dessa maneira, os feixes axonais que seguem ao longo da superfície dorsal, ventral ou lateral formam a coluna dorsal, ventral e lateral, respectivamente (GUYTON e HALL, 2006; MARTINI, 1992). Tanto a substância cinzenta quanto a substância branca possuem células gliais, que formam uma rede de sustentação aos neurônios. As grandes células gliais são denominadas macróglia e nesta categoria encontram-se três grupos celulares: astrócitos, oligodendrócitos e células de Schwann. Os astrócitos são células de forma estrelada, encontradas em todo o SNC, que participam da sinalização celular e desempenham função nutritiva ao ligar neurônios e capilares sanguíneos. Oligodendrócitos e células de Schwann formam uma cobertura protetora composta de lipídios e proteínas, designada como bainha de mielina, que isola os axônios. Os neurônios do SNC são mielinizados por oligodendrócitos enquanto as células de Schwann mielinizam os neurônios do sistema nervoso periférico. A mielina é um isolante eficaz para os neurônios, protegendo-os do ambiente extracelular. As pequenas células gliais, micróglia, funcionam normalmente como fagócitos e agem como o sistema imunológico do SNC, sendo ativadas no processo de desenvolvimento cerebral e mobilizadas após uma lesão, infecção ou doença (LUNDY-EKMAN, 2008).

Assim, a coluna vertebral, bem como os ligamentos, tendões e músculos circundantes, em conjunto, isolam a medula espinhal do ambiente externo. Além disso, o tecido neural também precisa ser protegido contra as paredes ósseas da coluna. Para isso, membranas especializadas denominadas meninges, são responsáveis por fornecer a estabilidade física e absorção de impacto necessária, além de nutrientes e oxigênio que chegam através de vasos sanguíneos que brotam dentro dessas camadas. Há três camadas meníngeas - dura mater, aracnóide e pia mater - que são contínuas com as meninges cerebrais que circundam o cérebro. A pia mater é separada da aracnóide por um espaço chamado

espaço subaracnóide, que é preenchido pelo líquido cefalorraquidiano (MARTINI,1992;LUNDY-EKMAN,2008).

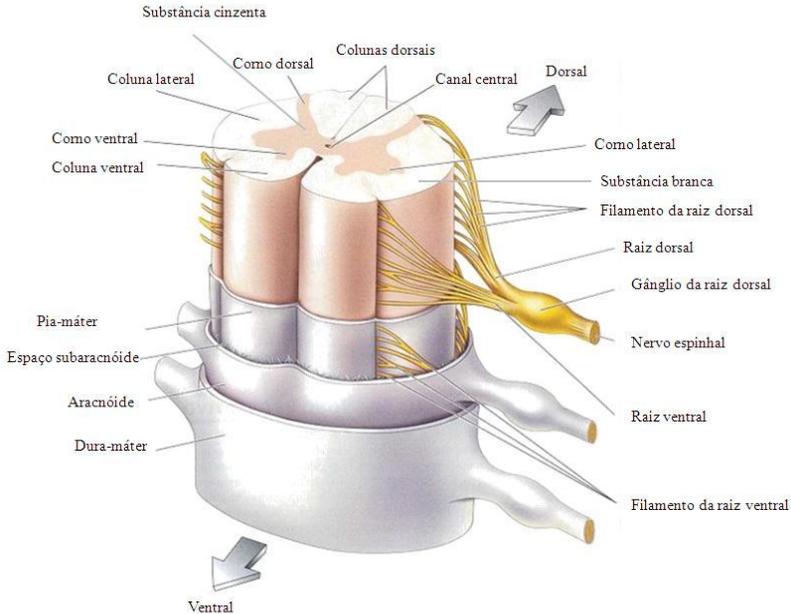


Figura 1. Anatomia da medula espinhal (Adaptado de BEAR *et al.*, 2008).

Quanto às funções da medula espinhal, é comum a considerarmos como sendo apenas uma via de transmissão da informação nervosa, cujo objetivo é enviar impulsos sensoriais oriundos de receptores periféricos ao encéfalo e trazer a partir dele impulsos direcionados à órgãos efetadores e também periféricos. No entanto, sabe-se que a medula espinhal pode participar de reflexos independentemente do cérebro, ou mesmo do encéfalo. Experimentos clássicos, em que a medula espinhal foi seccionada em níveis cervicais, mostram que muitas de suas funções altamente organizadas continuam sendo executadas. Por exemplo, os circuitos neurais intrínsecos da medula espinhal podem ser responsáveis por: movimentos de marcha, reflexos que afastam parte do corpo de objetos que possam causar dor, reflexos responsáveis por enrijecer as pernas para que sustentem o corpo contra a gravidade, reflexos que controlam os vasos sanguíneos locais, movimentos gastrointestinais ou excreção urinária (GUYTON e

HALL, 2006). De fato, os níveis supraespinhais do sistema nervoso geralmente operam, não através do envio de sinais diretamente para a periferia do corpo, mas enviando sinais aos centros de controle da medula espinhal, ou seja, simplesmente comandando estes centros para que possam realizar suas funções (GUYTON e HALL, 2006).

1.3 Lesões medulares

Diferentes tipos de lesões medulares podem ser encontrados, dentre os quais, as Síndromes Medulares Anterior, Posterior ou Central, a Síndrome de Brown-Sequard, Síndrome do Cone Medular e Cauda Equina, que podem ou não ocorrer em decorrência de um trauma, sendo que alguns tipos estão especificamente associados a idosos (ABUL-KASIM et al., 2010). Além disso, outras patologias podem resultar em quadros de lesão medular como Esclerose Múltipla, Esclerose Lateral Amiotrófica, Acidentes Vasculares, Síndrome Pós-Poliomielite, Siringomielia, entre outras. No contexto do presente trabalho, daremos ênfase à lesão medular induzida por trauma.

1.3.1. Lesão Medular Traumática

A lesão medular traumática, ou traumatismo raquimedular - TRM (coluna vertebral e medula espinhal) é uma lesão frequente na vida moderna que acarreta uma síndrome neurológica altamente incapacitante. Mundialmente, a taxa de incidência de lesões da medula espinhal é de 22 ocorrências por milhão de habitantes (ROSSIGNOL et al., 2007). No Brasil, há cerca de 250.000 pacientes com esta condição, somando-se aproximadamente 9 mil novos casos por ano (MEYER et al., 2003). O *National Spinal Cord Injury Statistical Center* (NSCISC) dos Estados Unidos estima que a lesão medular ocorra em cerca de 20% das fraturas da coluna vertebral, e que 10 a 15% dos pacientes apresentem dano neurológico severo com grande morbidade, sendo de 5% a taxa de mortalidade (NSCISC, 2009). Devido a essa elevada incidência e dos custos envolvidos no diagnóstico, tratamento, reabilitação e suporte destes pacientes, esta patologia representa um grande problema socioeconômico. Dados fornecidos pelo relatório anual do NSCISC de 2009 demonstram que a lesão é mais frequente no sexo masculino, representando 80% dos casos, sendo os adultos jovens, na faixa etária de 14 a 40 anos, os mais atingidos. Os acidentes automobilísticos são a principal causa destas lesões, seguido por quedas

de alturas, ferimentos por arma de fogo e traumatismos esportivos, entre os quais se destaca o mergulho em águas rasas (NSCISC, 2009).

A severidade da lesão pode ser definida através de categorias neurológicas. Para isso, a Associação Americana de Lesão Medular (*American Spinal Injury Association – ASIA*) elaborou um formulário de classificação baseado em 28 pontos sensoriais-chave que são testados com um alfinete de segurança. A severidade da lesão é classificada em 5 níveis, de acordo com a Tabela 1:

A – Completa	Nenhuma função motora ou sensitiva está preservada nos segmentos sacrais de S₄-S₅
B – Incompleta	Função sensitiva, mas não motora, está preservada abaixo do nível neurológico e inclui os segmentos sacrais S ₄ -S ₅
C – Incompleta	Função motora está preservada abaixo do nível neurológico, e mais da metade dos músculos-chave abaixo do nível neurológico tem um grau muscular menor que 3
D - Incompleta	Função motora está preservada abaixo do nível neurológico, e pelo menos metade dos músculos-chave abaixo do nível neurológico tem um grau muscular de 3 ou mais
E - Normal	Funções motoras e sensoriais normais

Tabela 1. Classificação neurológica padrão da lesão medular (Adaptado de *American Spinal Injury Association – ASIA*).

O tipo mais comum de lesão é ASIA nível A. Os segmentos vertebrais mais afetados são o segmento cervical 5 (C₅) e o segmento torácico 12 (T₁₂) resultando, respectivamente, em pacientes quadriplégicos (paralisia parcial ou completa dos quatro membros e tronco) e paraplégicos (paralisia parcial ou completa de parte ou ambos os membros inferiores e tronco). Dentre todos os pacientes, menos de 1% apresenta recuperação neurológica completa (ABUL-KASIM et al., 2010).

A intervenção clínica atual se restringe, essencialmente, na estabilização da coluna vertebral, restauração do alinhamento, descompressão da medula espinhal e no uso de doses elevadas de fármacos da classe dos glicocorticóides, tais como metilprednisolona, administrada até oito horas após o trauma (THURET et al., 2006; ABUL-KASIM et al., 2010). A metilprednisolona tem a capacidade de atenuar a resposta neuroinflamatória que se instala imediatamente após a

lesão, reduzir a peroxidação lipídica e preservar a integridade das estruturas neuronais. Porém, alguns estudos clínicos questionam a eficácia do tratamento com o corticóide, intensificando desta forma, a busca por abordagens terapêuticas mais eficazes. Há, ainda, abordagens que buscam restituir ou substituir funções perdidas por meio de transplantes celulares variados (para revisão ver GISZTER, 2008).

Nas últimas duas décadas, os avanços no entendimento da patofisiologia da lesão medular traumática têm conduzido a diversos estudos clínicos de fase I e II. Entre eles, estudou-se a eficácia do tratamento com metilprednisolona, aminoesteróides, gangliosídeo GM1 (Sygen), hormônio liberador de tireotropina, gaciclidina (GK-11, um antagonista de receptores NMDA), naloxona (antagonista opióide) e nimodipina (bloqueador de canais de cálcio do tipo L). Entretanto, estes estudos clínicos não foram conclusivos, pois geraram muitas controvérsias sobre a forma de condução dos mesmos. Vários outros estudos pré-clínicos, utilizando modelos experimentais em animais e pacientes humanos, estão explorando outras intervenções celulares, moleculares, farmacológicas ou não farmacológicas, como a descompressão cirúrgica precoce, estimulação elétrica de campo, estratégias neuroprotetoras como riluzole e minociclina, inativação de inibição de mielina, bloqueando Nogo e Rho – moléculas inibitórias presentes na mielina (SCHWEIGREITER e BANDTLOW, 2006), e o transplante de vários substratos celulares na medula espinhal lesada (para revisão ver LIM e TOW, 2007; HAWRYLUK et al., 2008; GISZTER, 2008).

Nesse sentido, a utilização de modelos experimentais em animais ainda segue sendo fundamental para o desenvolvimento de novas terapias e para maior compreensão da patofisiologia da lesão medular. Estes modelos permitem uma análise profunda das mudanças moleculares e bioquímicas que ocorrem em resposta à lesão de uma maneira que não seria possível ou ética em estudos com humanos. A maioria utiliza roedores por conta da sua praticidade, custo e disponibilidade. Vários destes modelos têm sido desenvolvidos, incluindo aqueles que mimetizam a compressão, contusão e transecção medular. Em 1978, Rivlin e Tator desenvolveram a técnica de compressão por clipe vascular visando simular o deslocamento e pressão contínua da medula que ocorrem frequentemente após as lesões medulares.

Um aparelho de impacto capaz de produzir lesão medular traumática foi apresentado por Bresnahan e colaboradores (1987), porém na época eram observados alguns problemas em relação a

reprodutibilidade do método. Atualmente, quatro impactores são amplamente aceitos como método padrão para a indução de lesões por contusão em roedores: o *Ohio State University* (OSU) impactor; o *Infinite Horizons*; *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* (MASCIS) *Impactor* e *NYU Weight-Drop Device* (LIVERMAN et al., 2005). A contusão pode ser total ou parcial, sendo que a parcial é caracterizada por apenas um dos lados da medula receber o impacto, preservando-se o lado oposto. Os modelos de transecção são usados para simular lacerações da medula espinhal e são feitos, geralmente, utilizando tesouras cirúrgicas. Em sua maioria, esses modelos visam o estudo de regeneração axonal e, portanto, é preciso ter certeza de que todos os axônios foram lesionados, caso contrário o crescimento de axônios intactos pode vir a tornar-se um problema (LIVERMAN et al., 2005).

Outro modelo, padronizado por Vanický e colaboradores (2001), é capaz de induzir a compressão da medula espinhal por meio da inserção de um cateter de embolectomia no espaço epidural dorsal, através de um orifício aberto no arco vertebral torácico 10. Neste modelo, o dano medular pode ser ajustado de acordo com o volume de salina utilizado para inflar o balão do cateter e o tempo de manutenção da compressão.

1.3.2. Fisiopatologia da lesão medular traumática

O dano neurológico decorrente da lesão medular traumática é o resultado da somatória de dois eventos distintos: a lesão mecânica primária e a lesão endógena secundária. Há quatro mecanismos característicos de lesão mecânica primária, sendo mais comum o impacto somado à compressão persistente da medula. Este tipo de lesão ocorre em fraturas por deslocamento ou ruptura aguda do disco medular, quando há um ou mais fragmentos de osso comprimindo a medula. O segundo mecanismo é caracterizado pelo impacto com compressão transitória, como ocorre em pacientes que apresentam alguma patologia cervical preexistente e sofrem lesão por hiperextensão. O alongamento forçado da coluna pode levar ao terceiro tipo de lesão, chamado lesão por hiperextensão, que ocorre por cisalhamento ou estiramento da medula espinhal e/ou do seu suprimento sanguíneo. Finalmente, a laceração ou transecção da medula compreendem o último mecanismo de lesão primária e podem ocorrer por deslocamento severo ou feridas

penetrantes, levando à secção parcial ou total da medula (DUMONT et al., 2001).

O evento imediato resultante da lesão primária consiste na ruptura mecânica do tecido, levando a uma zona hemorrágica de necrose predominantemente localizada na substância cinzenta, devido à consistência e abundante vascularização desta região (PROFYRIS et al., 2004). Em seguida, inicia-se uma lesão endógena secundária (Figura 2) caracterizada por aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica, apoptose glial e neuronal, além de uma complexa resposta neuroinflamatória que persiste por meses ou anos após o trauma inicial (DUMONT et al., 2001; PROFYRIS et al., 2004; FLEMING et al., 2006; DONNELLY et al., 2008). O primeiro sinal destas alterações é o aparecimento de pontos hemorrágicos distantes do sítio da lesão original, como resultado da perda de integridade estrutural dos capilares sanguíneos. Com o tempo, estas petéquias aumentam em número e se unem formando uma volumosa área hemorrágica, maior que o sítio de lesão primária. Este fenômeno é particularmente importante uma vez que a hemoglobina liberada é tóxica às células do SNC, expandindo o volume de tecido neural destruído (REGAN E GUO, 1998; GERZANICH et al., 2009). Relacionado a estes eventos ocorre o infarto tecidual, que propaga a necrose do tecido nervoso e é intensificado por mecanismos como a trombose e o choque neurogênico. Em nível bioquímico e molecular, ocorre a perda da via de glicólise e de fosforilação oxidativa, causando a necrose por depleção de adenosina trifosfato (ATP).

O trauma medular está associado ainda à liberação excessiva de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC, que, especialmente no ambiente hipóxico da medula lesionada, leva ao estímulo exagerado dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, resultando na morte celular por excitotoxicidade. As células da glia também são atingidas, sendo os oligodendrócitos os mais prejudicados, uma vez que apresentam maior permeabilidade ao cálcio e sofrem sensibilização por ciclooxigenase-2, resultando em morte excitotóxica (PROFYRIS et al., 2004; CARLSON et al., 2010). Nos primeiros dias após o traumatismo, a isquemia/reperfusão tecidual aumenta a área lesionada. Durante a isquemia, enzimas presentes nas células endoteliais sofrem proteólise limitada, que resulta na transferência de elétrons às moléculas de oxigênio. Dessa maneira, quando as células endoteliais são expostas novamente ao oxigênio, são geradas espécies reativas de oxigênio (ROS) que, juntamente com aquelas produzidas pelos

neutrófilos e células necróticas, criam um forte estímulo para a morte celular (CARLSON et al., 1998; GUTH et al., 1999; HAUSMANN, 2003). O início das respostas inflamatórias após o trauma também parece estar relacionado à ativação das proteínas quinases ativadas por mitógeno, as quais exercem papel determinante na morte ou sobrevivência neuronal em determinadas situações e a expressão gênica de proteínas pró-inflamatórias (NEARY, 2005).

Durante a lesão endógena secundária, também ocorre ativação das vias inata e adaptativa da resposta imune. Primeiramente, observa-se a presença maciça das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral α (TNF- α). A interleucina-1 β é liberada imediatamente após a lesão pela micróglia e, juntamente com a IL-6 e o TNF- α , podem estimular a expressão umas das outras, levando rapidamente ao aumento dos níveis das três citocinas (ALLAN et al., 2001; PAN et al., 2002). Ao estimularem seus receptores, o TNF- α e a IL-1 β ativam a via de sinalização do fator nuclear κ B (NF κ B). Esta via é crucial por estimular a produção de mediadores inflamatórios como citocinas e prostaglandinas, além da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), entre outros (ALLAN et al., 2001). A expressão aumentada de moléculas de adesão endoteliais, juntamente com outras citocinas e quimiocinas, é capaz de aumentar a transmigração ao tecido medular e ativação de neutrófilos. Conseqüentemente, os neutrófilos aderem às vênulas pós-capilares e migram para o sitio da lesão para realizar a fagocitose dos restos celulares. Após a entrada dos neutrófilos, mediadores pró-inflamatórios os induzem a produzirem suas próprias citocinas, que estimulam a quimiotaxia dos leucócitos, ativam a glia e aumentam o dano neuronal. Além disso, a atividade da enzima mieloperoxidase dos neutrófilos está aumentada, exacerbando a lesão por reperfusão (PROFYRIS et al., 2004; FLEMING et al., 2006; POPOVICH et al., 2008).

As últimas fases da lesão endógena secundária, que podem durar de meses a anos, são caracterizadas pelo desenvolvimento de cistos e formação de uma cicatriz astrogliar. Uma das mudanças mais evidentes é a degeneração Walleriana, que representa a desintegração anterógrada dos axônios que foram seccionados após a lesão. Ela é caracterizada por bainhas de mielina fragmentadas e distorcidas, com alterações no axoplasma (NORENBERG et al., 2004). As respostas astrocíticas têm sido estudadas em diversos modelos experimentais, e os termos “gliose” e “astrogliose” são freqüentemente usados para descrever a hipertrofia celular dos astrócitos e o aumento na produção de filamentos intermediários, caracterizando estas células como

“astrócitos reativos”. Aparentemente, a cicatrização glial é um fator crucial na recuperação de ferimentos no SNC, uma vez que a eliminação do contingente de astrócitos reativos leva ao aumento do tamanho da lesão e a uma perda exagerada de macromoléculas através da barreira hematoencefálica que se encontra comprometida (FAULKNER et al., 2004; MYER et al., 2006). Por conta disso, atualmente acredita-se que a natureza molecular da cicatriz glial, incluindo a produção de moléculas inibitórias pelos astrócitos, é a principal causa de falha na regeneração axonal (FITCH e SILVER, 2008). As teorias que propõem a contribuição dos astrócitos na ausência de regeneração no SNC baseiam-se em três pontos principais: falha em proporcionar um substrato celular apropriado para o crescimento axonal; ausência de fatores apropriados que suportem o crescimento axonal; e, finalmente, a produção de moléculas que inibem o alongamento axonal, como os proteoglicanos (JONES et al., 2003a,b). Além dos astrócitos, a mielina do SNC também produz substâncias capazes de inibir o crescimento de axônios. Estes componentes são a glicoproteína associada à mielina (MAG), a Nogo-A e a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (Omgp). Estas três proteínas estão predominantemente localizadas na porção interna da lamela da bainha de mielina, fazendo contato direto com os axônios (WANG et al., 2002; SCHWEIGREITER E BANDTLOW, 2006; FITCH e SILVER, 2008).

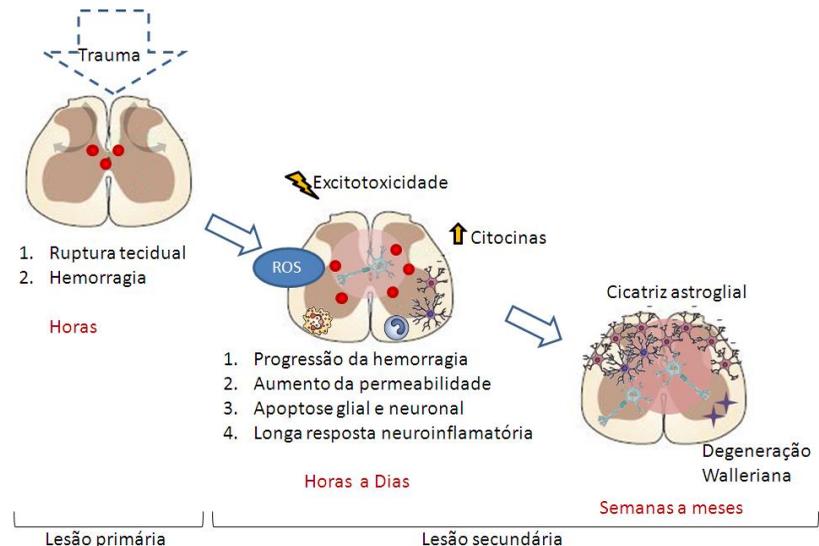


Figura 2. Fisiopatologia da lesão medular traumática.

1.3.3. Morte celular após a lesão medular

A morte celular após a lesão medular pode ocorrer por necrose ou apoptose, sendo os dois eventos distintos entre si. Enquanto o último é caracterizado por retração celular, agregação da cromatina com fragmentação genômica e núcleos picnóticos, a necrose apresenta dilatação celular, com perda de energia e ruptura da homeostase interna (HAUSMANN, 2003). Duas vias principais de sinalização apoptótica foram descritas, sendo a primeira iniciada pela disfunção mitocondrial. Alterações na função da mitocôndria podem ocorrer como resultado da depleção de ATP ou hipóxia, entre outros mecanismos, levando à liberação do citocromo *c* e ativação da via de caspase-9 (uma das caspases iniciadoras da via de apoptose). Esta via é modulada principalmente pelas proteínas Bcl-2 e Bax, que são proteínas anti- e pró-apoptóticas, respectivamente (HAUSSMAN, 2003; ALLAN et al., 2009). A segunda via de sinalização ocorre através da ativação de receptores de morte celular, que são membros da família de receptores do TNF- α e incluem TNFR1, Fas e p75. Estes receptores atraem e ativam as caspases 8 e 10 através de seus domínios intracelulares (GUICCIARDI e GORES, 2009). No SNC, a apoptose envolve predominantemente células não neuronais como os oligodendrócitos, provavelmente como resultado da perda do suporte trófico. Nesse sentido, sabe-se que as proteínas Fas e p75 são ativadas em oligodendrócitos em apoptose e que as caspases 3 e 8 estão ativas durante o pico máximo de ativação de morte celular (CASHA et al., 2001). Considerando que cada oligodendrócito é responsável pela mielinização de axônios diferentes e diversos, sua morte leva à desmielinização de fibras que não haviam sido lesionadas pelo trauma inicial, tornando-as deficientes no processo de condução axonal (LIU et al., 1997; CASACCIA-BONNEFIL, 2000).

Diante da complexa cascata de eventos patofisiológicos descrita acima, as pesquisas dedicadas à lesão medular traumática têm se voltado a estratégias que visam à redução do edema e da produção de radicais livres, o controle da excitotoxicidade e da inflamação, a inibição de apoptose celular, o reparo da desmielinização, a regeneração axonal e restauração da sua condutibilidade e conectividade, a reposição celular, a minimização das disfunções autonômicas, a restauração da coordenação motora, ou o alívio da dor neuropática crônica (para revisão ver THURET et al., 2006, SAMADIKUCHAKSARAEI, 2007). Ademais, a lesão da medula espinhal induzida por contusão em ratos causa mudanças bruscas nos níveis de RNA mensageiro para pelo

menos 165 genes dentro da primeira hora, em especial aqueles que regulam fatores de transcrição, inflamação, sobrevivência celular e excitabilidade da membrana celular (NESIC et al., 2002), o que fornece uma visão conservadora da complexidade dos mecanismos celulares e moleculares associados à condição. Em suma, pode-se observar que existe uma variedade de estudos a serem desenvolvidos em modelos experimentais de lesão medular traumática. Em especial, no contexto deste estudo, parecem relevantes aqueles direcionados à caracterização das vias de sinalização intracelulares envolvidas na manutenção da inflamação, apoptose e morte neuronal.

1.4. A via de sinalização celular das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs)

As MAPKs parecem estar implicadas de maneira importante nas complexas mudanças celulares, bioquímicas e imunes conseqüentes à lesão da medula espinhal (NEARY, 2005). Neste contexto, visando um melhor entendimento sobre estas proteínas sinalizadoras, primeiramente apresentamos um breve histórico sobre as MAPKs, seguido de suas vias de sinalização, isoformas importantes e por fim a participação destas proteínas na lesão medula traumática.

1.4.1. Histórico

O primeiro relato da existência de uma proteína de 42 kDa em diferentes tipos celulares, predominantemente fosforilada no resíduo de tirosina em resposta ao estímulo de fatores de crescimento, se deu em 1983, em um trabalho realizado por Cooper e Hunter. Ao mesmo tempo, serina-treonina quinases ativadas pelo receptor de insulina (IRK), que possui atividade tirosina quinase, estavam sendo caracterizadas, sob a hipótese de que a fosforilação do resíduo de tirosina iria regular a atividade dessas quinases (RAY e STURGILL, 1988; ANDERSON et al., 1990). Ray e Sturgill (1988) também demonstraram que a serina-treonina quinase de 42 kDa isolada de células 3T3-L1 estimuladas com insulina, chamada de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), sofria fosforilação nos resíduos de treonina e tirosina. Logo se percebeu que esta proteína era a mesma que respondia aos fatores de crescimento e que a fosforilação de ambos os resíduos era necessária para a ativação de MAPKs (ROSSOMANDO et al., 1989). Boulton e colaboradores (1990) isolaram o cDNA desta proteína e a renomearam ERK1 (quinase regulada por sinal extracelular 1) devido à variedade de fatores

extracelulares capazes de estimularem-na. O isolamento do cDNA das proteínas ERK2 e ERK3 se deu logo em seguida por Boulton e colaboradores (1991) e permitiu concluir que a seqüência destas proteínas era muito próxima àquela observada nas proteínas Kss1p e Fus3p da *Saccharomyces cerevisiae*, demonstrando uma estreita homologia entre as MAPKs de mamíferos e de leveduras. O conceito de que havia múltiplas MAPKs com distintas funções e regulação surgiu com a descrição de outras vias encontradas inicialmente em leveduras, como a das proteínas HOG1 e MPK1, seguida pela descoberta em metazoários da proteína quinase c-jun-N-terminal / proteína quinase ativada por estresse (JNK/SAPK), enzimas p38 e outras (BREWSTER et al., 1993; HAN et al., 1994; KYRIAKIS et al., 1994; DÉRIJARD et al., 1994). Seis grupos principais de MAPKs foram caracterizados em mamíferos: a proteína quinase regulada por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinase*) ERK1/2, ERK7/8, ERK3/4 e ERK5 (também conhecida como *big map kinase1*, BMK1); a JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) JNK1/2/3 e a p38 (p38 α / β / γ / δ). As proteínas mais estudadas são ERK1/2, ERK5, JNK e p38, sendo que há pouca informação disponível na literatura sobre as ERKs 7/8 e 3/4 (KRISHNA e NARANG, 2008). Estas proteínas sinalizadoras são responsáveis pelo recrutamento de outras proteínas sinalizadoras que, em conjunto, permitem a transmissão de informações acerca do meio extracelular para o núcleo da célula, onde determinam alterações na taxa de transcrição de genes específicos e a ativação de fatores de transcrição (JOHNSON et al., 2002).

1.4.2. Vias de sinalização

As vias de sinalização envolvendo MAPKs são ativadas em resposta a uma ampla variedade de estímulos, incluindo hormônios (por exemplo, insulina e melatonina), fatores de crescimento (por exemplo, PDGF, EGF e neurotrofinas), diversas citocinas inflamatórias e outros estímulos físicos ou químicos (por exemplo, radiação, choque osmótico, isquemia e trauma). Estes estímulos atuam através de diferentes famílias de receptores, como receptores acoplados a proteínas G (GPCR), receptores tirosina quinase, receptores de citocinas e receptores serina-treonina quinase. As MAPKs coordenam diversas funções, como transcrição de genes, síntese protéica, ciclo celular, proliferação, diferenciação e morte celular. Seus alvos podem incluir outras proteínas quinases, fosfolipases, fatores de transcrição ou proteínas do

citoesqueleto (para revisão ver JOHNSON e LAPADAT, 2002; KRISHNA e NARANG, 2008).

As MAPKs são reguladas por cascatas de fosforilação, estabelecendo uma via de ativação seqüencial composta de, no mínimo, três proteínas (Figura 2). A transmissão de sinais através destas cascatas é normalmente iniciada pela ativação de uma pequena proteína G, como a Ras, ou pela interação e ativação de componentes superiores da cascata com proteínas adaptadoras. Então, os sinais são passados ao longo da via, por proteínas quinases citosólicas, organizadas em três a cinco níveis. As quinases de cada nível fosforilam e ativam quinases localizadas abaixo, permitindo uma transmissão controlada e rápida dos sinais para vários alvos nas cascatas. Três dessas proteínas, MAPK quinase quinase (MKKK, também chamada MAP3K ou MEKK), MAPK quinase (MKK ou MAP2K) e MAPKs, são consideradas principais. Já a proteína superior, MAPK quinase quinase quinase (MKKKK ou MAP4K), e a inferior, proteína quinase ativada por MAPKs (MKs ou MAPKAPK), não são indispensáveis para essa cascata de sinalização. Uma vez ativadas, as MAPKs fosforilam resíduos de serina e treonina em seus alvos específicos, nos casos em que estes aminoácidos forem seguidos por uma prolina. Cabe ressaltar que cada um dos níveis das diferentes cascatas é constituído por diversos componentes formados por produtos de genes distintos, e são freqüentemente traduzidos para várias isoformas alternativas. Cerca de 70 genes são conhecidos atualmente como codificadores para, aproximadamente, 200 componentes que formam toda a via das MAPKs. Esta multiplicidade de componentes permite uma regulação e especificidade rigorosas, características importantes dessa via de sinalização (KESHET e SEGER, 2010).

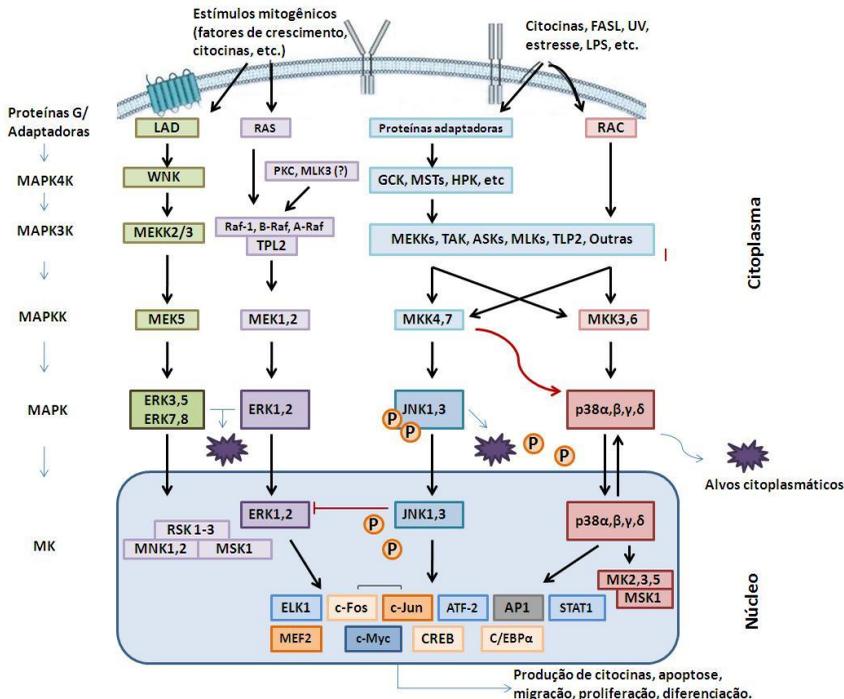


Figura 3. Vias de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Abreviações: API1, *activator protein 1*; ASK, *Apoptosis signal-regulating kinase*; ATF-2, *activating transcription factor 2*; CREB, *cAMP response element-binding*; GCK, *Germinal center kinase*; HPK, *Hematopoietic progenitor kinase*; LAD, *SH2 domain-containing adaptor protein*; MEF, *myocyte enhance factor*; MEK, *MAPK/ERK kinase*; MEKK, *MAPK kinase kinase*; MK, *MAPK-activated protein kinase*; MSK, *mitogen- and stress-activated kinase*; MNK, *MAPK-interacting kinases*; MST - *Mammalian Ste20-like kinase*; PKC, *Protein kinase C*; RSK, *Ribosomal protein s6*; STAT, *signal transducer and activator of transcription*; TAK, *TGF β -activated kinase* (Adaptado de KRISHNA E NARANG, 2008).

A especificidade das MAPKs por seus substratos é também determinada pela presença de um sítio de ligação, freqüentemente situado a uma distância considerável dos sítios de fosforilação. Estes domínios exercem um papel importante não somente na interação entre os componentes e sua ativação, mas também em aumentar a eficácia e especificidade da via (PEARSON et al., 2001; KRISHNA e NARANG, 2008). O primeiro sítio de ligação foi descrito para o substrato da proteína JNK – c-jun – e foi denominado de domínio δ . Outras seqüências relacionadas e chamadas de domínios D foram identificadas em fatores de transcrição e todos esses se caracterizam por resíduos hidrofóbicos contornados por cargas positivas, aumentando a

fosforilação dos substratos pelas MAPKs. Outra classe de sítio de ligação é denominada de DEF (*docking site for ERK and FXFP*) e parece ser reconhecida apenas pela proteína ERK1/2 (FANTZ et al., 2001). As regiões das proteínas que reconhecem e se ligam aos sítios D são denominadas CD (*common docking*) e são resíduos hidrofóbicos e acídicos, necessários para interagir com o domínio D (KRISHNA e NARANG, 2008).

Várias características das MAPKs resultam da sua ativação por cascatas de fosforilação e, de maneira importante, destaca-se o fato de as proteínas intermediárias fornecerem mecanismos de detecção de estímulos vindos de outras vias de sinalização, como a regulação da via do NF- κ B pela MEKK1. Dessa maneira, a regulação da via de MAPK pode representar pontos de regulação de outras vias de sinalização (WIDMANN et al., 1999).

A fosforilação das proteínas é controlada pelas funções opostas das fosfatases, representando um importante meio de controle funcional protéico, uma vez que os efeitos fisiológicos das MAPKs dependem da magnitude e duração da ativação. Os fatores que influenciam a regulação dessas proteínas são diversos, mas a defosforilação pelas fosfatases parece ser o principal meio de diminuição da atividade (MURPHY e BLENIS, 2006). Esse processo pode ocorrer pela ação de fosfatases Ser/Tre, fosfatases Tyr ou por fosfatases duais chamadas MAPK fosfatases.

1.4.3. Proteína quinase ativada por sinal extracelular – ERK1/2

As duas isoformas ERK1 e ERK2, também chamadas p42 e p44, possuem 83% de identidade entre os seus aminoácidos e são amplamente expressas em todos os tecidos, incluindo em células diferenciadas. Ambas isoformas estão envolvidas na regulação da meiose e mitose, além de exercerem funções pós-mitóticas em células diferenciadas, e são ativadas por fatores de crescimento, citocinas, infecções virais, carcinógenos, estresse osmótico, entre outros (RUBINFELD e SEGER, 2005). A via das ERKs é constituída pelas proteínas MAPKKKs A-Raf, B-Raf e Raf-1, as MAPKKs MEK1 e MEK2, além das ERKs 1 e 2 (ROUX e BLENIS, 2004). A ativação desta via ocorre quando estímulos extracelulares provocam um aumento na forma ativa da Ras, uma proteína ligante de GTP. O complexo Ras-GTP ativa então a próxima proteína, Raf, que acaba por fosforilar as proteínas MEKs, cujo papel é ativar ERK1 e ERK2. Depois de ativadas, essas proteínas fosforilam diversos substratos em todos os

compartimentos celulares, incluindo proteínas na membrana, substratos nucleares e proteínas do citoesqueleto, além de outras quinases (Figura 3) (THOMAS e HUGANIR, 2004).

A sinalização pelas proteínas ERK está envolvida com vários mecanismos, como a proliferação celular, dessa maneira implicando sua ação na carcinogênese, além de exercer papel na apoptose, ciclo celular, desenvolvimento e diferenciação celular (para revisão ver KRISHNA e NARANG, 2008). Além disso, sabe-se que a ERK também pode ser ativada nos neurônios em resposta à sinalização glutamatérgica excitatória, sendo capaz de controlar diversas formas de plasticidade sináptica cerebrais envolvidas em processos de aprendizado e memória (ADAMS e SWEATT, 2002).

O desenvolvimento de inibidores específicos das cascatas de MAPKs facilitou a compreensão do papel específico de cada proteína, bem como de seus alvos. Dessa maneira, Dudley e colaboradores (1995) descreveram um inibidor sintético da ERK1/2, o PD 98059, enquanto Favata e colaboradores (1998) descreveram outro composto, mais potente e de estrutura química diferente, o U0126. Ambos parecem atuar prevenindo a ativação da MEK através de sua quinase superior, Raf, apresentando, assim, maior especificidade. Outros inibidores foram descobertos depois, como o PD 184352 e a 3-ciano-4-(fenoxianilina)quinolona, além dos inibidores Ro092210 e L783277 (SEBOLT-LEOPOLD et al., 1999; ZHANG et al., 2000; ENGLISH e COBB, 2002).

1.4.4. Proteína quinase p38 MAPK

Existem quatro isoformas das proteínas p38 MAPKs: α , β , γ e δ . Estímulos químicos e físicos, como estresse oxidativo, radiação, hipóxia e citocinas inflamatórias desencadeiam a ativação de várias MAPKKKs dando início à via de sinalização das proteínas p38. Essas MAPKKKs ativam as proteínas MEK 3 e MEK 6 que ativam apenas p38, sem influenciar a ERK ou a JNK. Enquanto a MEK 6 é capaz de ativar todas as isoformas de p38, a MEK 3 fosforila preferencialmente as isoformas α e β (ENSLEN et al., 2000). O papel da p38 no processo inflamatório tem sido amplamente estudado, uma vez que esta via está envolvida em respostas funcionais de macrófagos e neutrófilos, como quimiotaxia, exocitose granular, aderência e apoptose, bem como na diferenciação de células T (DONG et al., 2002; COOK et al., 2007). Seus alvos principais incluem fatores de transcrição, MKs e proteínas citosólicas (Figura 3) (KRISHNA e NARANG, 2008).

Compostos que se ligam aos sítios de ATP na proteína p38, os piridinil imidazóis, atuam como inibidores das mesmas. Isso ocorre pela presença de um anel fluorofenil nos compostos VK19911, SB203580, SB216995, SB218655 e SB220025, responsáveis por essas ações (ENGLISH e COBB, 2002).

1.4.5. Proteína quinase c-jun-NH₂-terminal – JNK

As proteínas JNK foram originalmente descritas como proteínas quinases ativadas por estresse (SAPKs), sendo renomeadas para enfatizar seu papel na fosforilação e ativação do fator de transcrição c-jun. As isoformas JNK1 e JNK2 são expressas em todos os tecidos, enquanto a JNK3 é restrita ao cérebro, coração e testículos. Essas isoformas podem ser ativadas em resposta aos mais variados estímulos, como citocinas, radiação UV, fatores de crescimento e trauma (JOHNSON E LAPADAT, 2002; KRISHNA E NARANG, 2008). A regulação da via destas proteínas é complexa, uma vez que envolve 13 MAPKKKs. A sinalização inicia com as proteínas MAPKK4 e MAPKK7, que podem ser ativadas por uma grande variedade de fatores, incluindo as MAPKKKs, MEKK1-4, MLK2 e 3, ASK1/2, entre outras. Diferentes MAPKKKs são específicas para diferentes estímulos, como a TAK1 que parece responder a algumas citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (KYRIAKIS E AVRUCH, 2001). Dessa forma, a ativação prolongada da JNK pode influenciar mecanismos celulares importantes como a morte celular e a proliferação celular alterada (LIU e LIN, 2005), enquanto que a sua ativação transitória parece promover a sobrevivência celular (VENTURA et al., 2006).

Os alvos da proteína JNK incluem fatores de transcrição e receptores hormonais nucleares, embora o seu alvo nuclear mais conhecido seja o fator c-jun. Proteínas adaptadoras não nucleares e mitocondriais, como aquelas envolvidas na apoptose, também servem de substrato para essas proteínas (Figura 3).

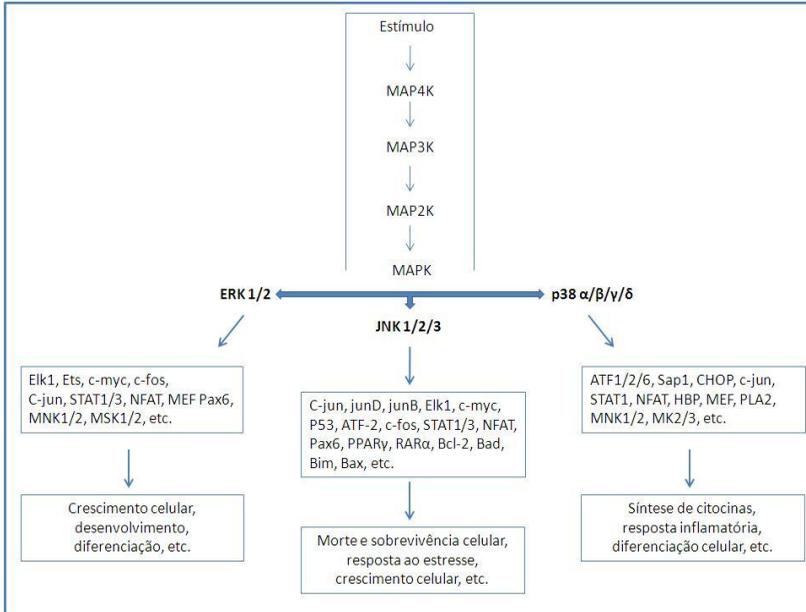


Figura 4. Possíveis substratos das proteínas ERK1/2, JNK 1/2/3 e p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ e principais funções relacionadas a elas. Abreviações: ATF1/2/6, *activating transcription factor 1, 2 e 6*; Bad, *Bcl-2-associated death promoter*; Bax, *Bcl-2 associated X protein*; Bcl-2, *B-cell lymphoma 2*; CHOP, *CREB homologous protein*; Ets, *E-twenty six family*; HBP, *high mobility group-box protein*; MEF, *myocyte enhance factor*; MNK, *MAPK-interacting kinases*; MK, *MAPK-activated protein kinase*; MSK, *mitogen- and stress-activated kinase*; NFAT, *nuclear factor of activated T cells*; PLA2, *phospholipase A2*; PPAR, *peroxisome proliferators-activated receptor*; RAR, *retinoic acid receptor*; Sap1, *SRF accessory protein*; STAT, *signal transducer and activator of transcription*.

Os estudos envolvendo inibidores da proteína JNK são relativamente recentes. Maroney e colaboradores (1998) descreveram a capacidade de uma pequena molécula, CEP-1347, de inibir a proteína JNK1 em cultura de motoneurônios. Já em meados de 2001, foi descrita uma antrapirazolona, o SP600125, que inibiu a fosforilação de c-jun (BENNETT et al., 2001). A inibição da JNK por este composto se dá de maneira reversível, por competição com a ligação do ATP, inibindo a ativação da proteína (BOGOYEVITCH e ARTHUR, 2008). Desde então, alguns trabalhos mostraram a ação deste inibidor em diferentes modelos, valendo ressaltar a inibição de vários eventos pró-apoptóticos, como a ativação da família de proteínas Bcl-2 ou de caspases em um modelo de lesão cerebral por hipóxia/reperfusão (GUAN et al., 2006).

Proteínas de ancoragem conhecidas como JIPs (*JNK-interacting proteins*) formam outro aspecto importante na via desta proteína. A

proteína JIP-1 foi descrita primeiramente por inibir a JNK, prevenindo sua translocação nuclear. Além disso, identificou-se uma seqüência específica crítica para a interação JNK/JIP-1. Atualmente, peptídeos derivados da JIP têm sido usados para inibição da proteína JNK *in vitro*, bem como em células e experimentos *in vivo*, após serem conjugados ao peptídeo Tat para se tornarem permeantes às células (BOGOYEVITCH e ARTHUR, 2008). Estes incluem o inibidor D-JNKI-1 (*D amino acid-containing retroinverso peptide*) que atua competindo com os substratos da proteína, ou seja, impede a ação da proteína sem interferir com sua ativação/fosforilação (BOGOYEVITCH, 2005).

1.5. Proteínas quinases ativadas por mitógenos na lesão medular traumática

Acredita-se que a ativação das MAPKs em lesões traumáticas no SNC seja deflagrada, em grande parte, pelo glutamato e o ATP liberados em grande quantidade em resposta ao trauma mecânico inicial. Estes neurotransmissores exercem ações excitotóxicas sobre neurônios e células gliais, ainda que a ativação dessas proteínas possa também ser dependente de outros eventos secundários. Neary e colaboradores (2003) demonstraram que tanto a apirase, uma ATP difosfohidrolase que converte ATP a AMP, quanto antagonistas de receptores purinérgicos P2, quando adicionados a culturas de astrócitos submetidos à lesão por estiramento foram capazes de reduzir em aproximadamente 75% a expressão de ERK, e outra proteína quinase, a Akt. Dessa forma, sugere-se que diferentes receptores podem sinalizar para diferentes cascatas de proteínas, provavelmente em uma maneira dependente da concentração de ATP liberado (NEARY, 2005).

Em co-culturas de neurônios corticais e microglia, a p38 e a JNK parecem ser importantes na morte neuronal induzida por lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, enquanto que a morte neuronal causada pela IL-1 β parece ser mais dependente de ERK1/2 (XIE et al., 2004). A p38 e a ERK1/2 também estão implicadas no aumento da expressão dos genes para TNF- α e óxido nítrico sintase induzida pelo LPS em culturas de células gliais (BHAT et al., 1998; WANG et al., 2004). Isto sugere que o início das respostas inflamatórias no SNC esteja relacionado à ativação das MAPKs, que exercem papel determinante na morte ou sobrevivência neuronal em determinadas situações e a expressão gênica de proteínas pró-inflamatórias.

Nesse sentido, Genovese e colaboradores (2008) demonstraram que a indução de lesão medular por compressão em camundongos

promoveu o aumento dos níveis espinhais das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α e da enzima mieloperoxidase, nitrosilação de proteínas, além do aumento expressivo dos teores da proteína pró-apoptótica Bax e redução da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e das formas fosforiladas de ERK1/2, p38 e JNK, em 24 horas após a lesão. É importante mencionar que a administração sistêmica de um inibidor das proteínas MAPK3/MAPK1 (PD98059), nas primeiras horas após a lesão, atenuou ou reverteu todas as alterações mencionadas acima bem como o grau de fosforilação das três MAPKs, tendo ainda melhorado a recuperação motora dos animais a partir do quarto dia após a cirurgia. Xu e colaboradores (2006) demonstraram que, através de um mecanismo envolvendo a produção aumentada de óxido nítrico, as vias de sinalização ativadas pelas MAPKs ERK1/2 e p38 contribuem diretamente para a morte neuronal que ocorre na medula espinhal após a lesão medular.

Estes estudos apontam as MAPKs como elementos centrais no desencadeamento da resposta espinhal à lesão traumática, embora não identifiquem qual delas seja responsável por cada uma das conseqüências da lesão. Yu e colaboradores (2010) demonstraram o envolvimento específico da proteína ERK2 na excitotoxicidade por glutamato, no dano tecidual progressivo, bem como na disfunção motora induzida pela lesão medular em ratos submetidos à lesão por contusão. Assim, eles observaram que o bloqueio seletivo da expressão da proteína ERK2, previamente à indução da lesão, reduziu a ativação da caspase-3 e a perda tecidual, além de melhorar a função locomotora avaliada por até seis semanas. Por outro lado, os inibidores da p38 MAPK bloqueiam tanto seus possíveis efeitos benéficos quanto os prejudiciais em animais com lesão medular traumática, considerando os resultados ambíguos demonstrados em poucos estudos (HORIUCHI et al., 2003; STIRLING et al., 2008).

Considerando as funções importantes e complexas que as MAPKs parecem exercer no SNC, especialmente quando submetido ao trauma, fármacos que tem por alvos específicos o bloqueio das ações destas proteínas sinalizadoras podem vir a constituir novas estratégias terapêuticas mais efetivas para o tratamento das seqüelas conseqüentes à lesão medular traumática. Assim, o presente estudo teve como meta principal examinar, em nível pré-clínico, os efeitos de um inibidor seletivo da proteína JNK sobre as alterações moleculares, bioquímicas e funcionais decorrentes da lesão medular traumática em ratos.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral investigar, através de técnicas de bioquímica, biologia molecular, histológicas e de análise comportamental e empregando um inibidor seletivo da proteína JNK, o papel das proteínas quinases ativadas por mitógenos no dano funcional induzido pela lesão medular traumática em ratos.

2.2. Objetivos específicos

Padronizar um modelo de lesão medular induzida por compressão capaz de gerar uma paraplegia de intensidade moderada;

Determinar o decurso temporal de expressão das MAPKs na medula espinhal após a lesão medular, bem como o efeito da inibição da proteína JNK sobre a expressão dessas proteínas.

Analisar os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α na medula espinhal de animais falso-operados ou lesionados;

Investigar a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na medula espinhal de animais falso-operados ou lesionados, antes e após o tratamento com o inibidor seletivo da proteína JNK;

Avaliar o possível envolvimento da via de apoptose em promover a disfunção motora observada após a lesão medular, através da inibição da proteína JNK.

Investigar o efeito da inibição da proteína JNK em promover a recuperação locomotora de animais paraplégicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Os experimentos foram realizados em ratos *Rattus norvegicus* machos, da variedade Wistar, pesando entre 270 – 300 g, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas). Todos os estudos seguiram os termos da Lei Federal nº 11.794, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, bem como as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos da América (Publication No. 85-23, revisado em 1996). Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA, processo nº 23080.008708/2010-41).

3.2. Indução da lesão medular

O modelo de lesão medular utilizado neste estudo foi aquele descrito originalmente por Vanický e colaboradores (2001), com algumas modificações. Inicialmente, os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com uma mistura 1:1 de quetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), seguido de administração intra-muscular de antibiótico de amplo espectro (cloridrato de oxitetraciclina, 300 mg/kg i.m.). Sob completa anestesia, foi realizada tricotomia e assepsia do dorso do animal seguido pela administração subcutânea de anestésico local e vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% + epinefrina 1:50000, Xylestesin®). A seguir, foi realizada uma incisão de aproximadamente 3 cm na linha média da região torácica dorsal e removido o tecido gorduroso presente. O anestésico local foi novamente administrado, por via intramuscular, e a coluna vertebral foi exposta, através da dissecação dos músculos que se inserem nos segmentos vertebrais torácicos 8 a 12, e fixada utilizando-se um fórceps. Através do emprego de uma broca dentária, foi realizada a abertura de um pequeno orifício (diâmetro aproximado de 1,5 mm) entre as vértebras torácicas 9 e 10, permitindo o acesso à medula espinhal. Um cateter Fogarty 2F (Lemaitre Catheters, Burlington, MA, EUA), previamente calibrado e preenchido com salina, foi inserido com cuidado e diretamente no espaço epidural, sem

rompimento da dura máter, até a altura de T9 e inflado até alcançar um diâmetro de 3,0, 3,5, 4,0 ou 4,5 mm. A utilização de diferentes diâmetros permite o ajuste dos níveis de intensidade da lesão medular. Após um período de 1 minuto, o cateter foi desinflado e cuidadosamente removido. Em seguida foi realizada a sutura por planos (muscular e pele). A temperatura corpórea foi mantida constante com auxílio de uma manta aquecedora colocada embaixo do animal. Os animais falso-operados utilizados como controles foram submetidos aos mesmos protocolos descritos acima, porém sem que houvesse a inserção do cateter.

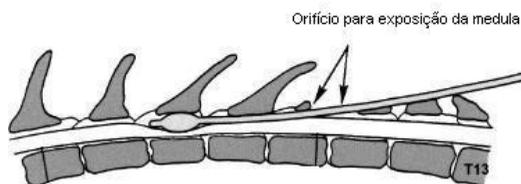


Figura 5. Desenho representativo do orifício para exposição da medula e da posição do cateter Fogarty. (Adaptado de Vanický et al., 1995).

Durante os primeiros 15-20 dias após a cirurgia, as bexigas dos animais lesionados foram esvaziadas manualmente duas vezes ao dia, aplicando-se pressão com os dedos sobre a região do abdômen acima da bexiga urinária do animal, até que fosse restabelecida a micção espontânea. Ainda como parte dos cuidados pós-operatórios, os animais foram mantidos em ambiente limpo e observados diariamente para evitar desconforto e infecção. Os cuidados pré- e pós-operatórios seguiram o protocolo de Santos-Benito et al. (2006), bem como as normas do MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study) e do comitê de ética local (CEUA-UFSC).

3.3. Imunoensaio para detecção das MAPKs

A análise por imunodeteção (ensaio de Western blot) do conteúdo protéico da medula espinhal de animais dos grupos não-operado, falso-operado ou lesionado consistiu em verificar o perfil temporal de expressão dos teores totais e das formas fosforiladas das

proteínas MAPKs ERK1/2, JNK e p38. Nos tempos de 2, 6, 24 e 72 horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂ em câmara apropriada, e o segmento T8-T10 de medula (correspondentes ao sítio da lesão, bem como suas porções rostral e caudal) foi removido. Em seguida, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até sua utilização. Os tecidos coletados foram homogeneizados em tampão contendo HEPES 10 mM pH7,9; KCl 10 mM; MgCl₂ 2 mM; EDTA 1 mM; NaF 1 mM; β-glicerofosfato 10 mM; 1 mM ortovanadato de sódio; ditioneitol 1 mM; aprotinina 10 µg/mL; leupeptina 10 µg/mL; fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM e água deionizada, e em seguida, mantidos em repouso por 15 minutos a 4 °C. Os tecidos homogeneizados foram então centrifugados a 14.000 x g, por 45 minutos a 4 °C, o sobrenadante (correspondente ao extrato citosólico) foi coletado e a concentração de proteínas das amostras dosada pelo método de Bradford. Amostras contendo aproximadamente 50 µg de proteínas foram adicionadas ao tampão SDS-PAGE e separadas por eletroforese em gel de poliácridamida 10% a 100 V. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletroforese, utilizando-se corrente constante de 300 mA, durante 120 minutos. Após a transferência, as membranas foram lavadas em tampão TBS-T (Solução Tris 20mM, pH7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%) e posicionadas no suporte para membrana (Snap i.d. Protein Detection System blot holder, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) dentro do sistema de detecção de proteínas Snap i.d. (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) conectado a uma bomba de vácuo. As membranas foram bloqueadas com tampão TBS-T contendo 1 % de albumina bovina sérica por 20 segundos, sob vácuo. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos anti-JNK (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-pJNK (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-ERK1/2 (1:200, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), anti-pERK1/2 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-p38 MAPK (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ou anti-fosfo-p38 MAPK (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), por 10 minutos, a temperatura ambiente. A bomba de vácuo foi novamente acionada para descartar os anticorpos por aspiração, através de 3 lavagens consecutivas com tampão TBS-T. Em seguida, o vácuo foi novamente desligado e as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários específicos conjugados a uma peroxidase, durante 10 minutos submetidas a 3 lavagens sucessivas com tampão TBS-T. As bandas foram visualizadas por aumento da

quimioluminescência, utilizando o sistema de detecção ECL (Amersham Bioscience Corp., PA, E.U.A). A quantificação da intensidade dos sinais das bandas foi determinada por densitometria, utilizando-se o programa Scion Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

3.4. Análise histológica da medula espinal

A análise histológica da medula espinal foi realizada em animais não-operados, falso-operados e lesionados nos períodos de 2, 6, 24 e 72 horas após o procedimento cirúrgico. Para isto, os animais foram anestesiados e perfundidos intracardiacamente com solução de PBS (phosphate-buffered saline – PBS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e paraformaldeído 4% nos períodos citados acima. Após a perfusão dos animais, a medula espinal (T8 – T10) foi removida, fixada em paraformaldeído 4% por 24 horas e desidratada em etanol 70% por 24 horas, ambas as etapas em temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram emblocadas em parafina, seccionadas (espessura de 5 µm) e coradas com hematoxilina e eosina para posterior avaliação microscópica.

3.5. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A migração de neutrófilos para o sítio da lesão na medula espinal foi quantificada, indiretamente, através da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), de acordo com o método descrito por Souza e colaboradores (SOUZA et al., 2000). Para isso, 2, 6, 24 e 72 horas após o procedimento cirúrgico, a porção da medula espinal correspondente ao sítio da lesão e áreas adjacentes (segmentos T8 a T10) de animais não-operados, falso-operados ou lesionados, foi coletada, homogeneizada em tampão EDTA/NaCl 5% (pH 4,7), e centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi suspenso em tampão 1 (NaCl 0,1 M; NaPO₄ 0,02 M; Na/EDTA 0,015 M; pH 7,4). Posteriormente, foi adicionado NaCl 0,2% e, após 30 segundos, NaCl 1,6% contendo glicose 5 %. A solução foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 4°C e em seguida o precipitado formado foi suspenso em tampão 2 (Na₂PO₄ 0,5 M e 5 % de hexadeciltrimetilamônio (H-TAB); pH 5,4). As amostras obtidas foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente a 10.000 g por 15 minutos a 4°C, e 25 µl do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de atividade da MPO. A reação enzimática foi realizada na

presença de tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM, Na₂PO₄ 80 mM e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,3 mM. A absorbância foi medida por espectrofotometria em 690 nm e os resultados expressos como densidade ótica por miligrama de tecido (SCHNEIDER E ISSEKUTZ, 1996; SOUZA et al., 2000).

3.6. Medida dos níveis de mediadores inflamatórios

Os níveis teciduais de IL-1 β e TNF- α foram avaliados de acordo com a metodologia descrita por Campos et al. (2002), com algumas modificações. Amostras de medula (segmento T8 - T10) foram removidas 2, 6, 24 e 72 horas após o procedimento cirúrgico e homogeneizadas com PBS contendo Tween 20 (0,05 %), fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,1 mM, cloreto de benzometônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, e aprotinina A 2 ng/ml. O homogenato foi centrifugado a 3.000 g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante armazenado a -80 °C até o momento da análise. Os níveis das citocinas foram determinados em ensaios distintos, utilizando-se Kits específicos de ELISA (enzyme immuno sorbent assay, R & D Systems) de acordo com as recomendações do fabricante. A dosagem de proteínas foi realizada segundo o método descrito por Bradford (1976), de modo a ajustar o teor de proteína contido em cada amostra a ser avaliada. Os resultados foram expressos em pg/100 mg de tecido.

3.7. Ensaio de TUNEL para detecção de células apoptóticas

A fragmentação de DNA *in situ* foi detectada utilizando-se kit para TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP Nick End Labelling, G7130, Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Amostras de medula (segmentos T8 - T10) foram removidas 2, 6, 24 e 72 horas após o procedimento cirúrgico, fixadas em paraformaldeído 4% por 24 horas e desidratadas em etanol 70%, a temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram emblocadas em parafina e seccionadas (espessura de 5 μ m). As lâminas contendo os cortes teciduais foram mantidas em estufa a uma temperatura de 70-90 °C até a completa fusão da parafina ao redor dos cortes. Posteriormente, os tecidos foram desparafinizados em xilol (xileno), hidratados por passagens sucessivas em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100, 95, 85, 70 e 50 %, em água destilada). Após a hidratação, os tecidos foram imersos em NaCl 0.85% por 5 minutos em temperatura ambiente, sendo subseqüentemente

lavados em solução tamponada com fosfato (PBS), incubados, por 20 minutos, com 20 µg/mL de Proteinase K e lavados novamente com PBS. Os tecidos foram então cobertos com tampão de equilíbrio por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de uma incubação de 60 minutos com 100 µL de enzima TdT (transferase terminal de deoxinucleotídeos), dentro de uma câmara úmida. A peroxidase endógena foi inativada pela imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio 0,3%, por 5 minutos, a temperatura ambiente, lavando-se a seguir com PBS. Em seguida, foi adicionado 100 µl de streptavidina HRP (1:500) por 30 minutos. Após lavagens sucessivas com PBS, a presença dos fragmentos de DNA foi detectada pela adição do cromógeno estável diaminobenzidina (DAB) com 50 µL de peróxido de hidrogênio. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio invertido (Olympus IX71, Olympus®, Tokio, Japão), em aumento de 40 x, sendo analisados 18 campos compreendendo o sítio da lesão e suas porções distais. As imagens foram registradas com auxílio da câmera Olympus DP72 (Olympus®, Tokio, Japão). Foi analisado um corte histológico de amostra de cada animal, sendo que cada grupo experimental foi constituído de quatro animais. Os resultados foram expressos em média de células positivas por campo analisado. Todos os grupos experimentais foram processados sob as mesmas condições e as configurações para aquisição das imagens foram idênticas para todos os tecidos.

3.8. Avaliação da Atividade Locomotora

A atividade locomotora de cada animal foi avaliada utilizando a escala BBB elaborada para este propósito por Basso, Beattie e Bresnahan (BASSO et al., 1995; JOSHI e FEHLINGS, 2002), descrita em detalhes na Tabela 1. Para tal, o examinador é posicionado de forma a permitir a observação de cada lado do animal através da caixa de observação, a qual consiste em uma parede circular em acrílico transparente, medindo 32,5 cm de altura e 97 cm de diâmetro. Os animais foram avaliados individualmente por um período de 4 minutos a cada dois dias durante 28 dias consecutivos. Os animais que permaneceram imóveis por mais de 15 a 20 segundos foram estimulados por batidas leves na parte externa do campo aberto. Caso não houvesse resposta ao estímulo, o animal era posicionado no centro da caixa de observação, cuidadosamente, para que não houvesse toque na cauda ou

nos membros traseiros do animal, já que isto pode influenciar o desempenho locomotor (BASSO et al., 1995). Todas as sessões de teste foram filmadas por um minuto. O escore obtido foi atribuído pela média de pontuação de cada um dos membros traseiros (esquerdo e direito).

3.9. Tratamentos farmacológicos

Os animais foram tratados, por via intratecal entre L5 e L6, com um inibidor específico da proteína JNK, SP600125, nas doses de 75 nmol e 150 nmol (OBATA et al., 2004; LI et al., 2010), em 1 e 4 horas após a indução da lesão medular. Os respectivos grupos controle foram igualmente submetidos à cirurgia para indução da lesão medular, mas tratados de modo idêntico com os veículos correspondentes (dimetilsulfóxido DMSO 20% em tampão fosfato PBS). Após os tratamentos, todos os experimentos descritos acima foram repetidos em 6 horas após o procedimento cirúrgico.

3.10. Drogas e reagentes

As seguintes drogas foram utilizadas: cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina®, Pfizer, São Paulo, SP, Brasil), quetamina e xilazina (Virbac, São Paulo, SP, Brasil), Xylestesin® (Cristália, Itapira, SP, Brasil), SP600125 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). O inibidor SP600125 foi dissolvido em salina tamponada com fosfato em tabletes (phosphate-buffered saline – PBS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 20% de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha), e então armazenado em tubos plásticos siliconizados e mantidos a -20 °C. O veículo utilizado (PBS contendo 20% de DMSO) não teve nenhum efeito farmacológico nos parâmetros avaliados.

3.11. Análise Estatística

As alterações no perfil de expressão das proteínas e mediadores inflamatórios em amostras de medula proveniente do grupo não-operado, falso-operado ou lesionado foram estatisticamente avaliadas através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. A análise estatística da diferença entre os animais dos grupos controle e tratado foi feita através do teste “t” bicaudal de Student, para amostras não pareadas. Todos os resultados foram

apresentados como média \pm E.P.M. e o nível mínimo de significância foi considerado $P \pm 0,05$ para todas as análises.

4 RESULTADOS

4.1. Padronização do modelo de lesão medular traumática moderada.

Visando a padronização de um modelo de lesão medular de intensidade moderada, os animais foram submetidos durante o procedimento cirúrgico à compressão da medula espinhal por um cateter calibrado para expandir até diferentes diâmetros (3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 mm). Conforme ilustrado na Figura 6, animais falso-operados apresentaram escore máximo de 21 pontos na escala BBB, durante todo o período de avaliação de 28 dias, indicando atividade locomotora normal, com passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação dos dedos, estabilidade do tronco e cauda consistentemente elevada. Por outro lado, todos os grupos submetidos à lesão da medula espinhal apresentaram déficit locomotor completo do trem posterior no segundo dia após o procedimento (escore de 0 pontos). Ao longo das quatro semanas de avaliação, foi observada uma recuperação funcional gradual e parcial, sendo que os escores atingidos no 28º dia foram de $8,2 \pm 0,3$; $6,6 \pm 0,2$; $4,6 \pm 1,3$ e $3,0 \pm 0,2$ para os diâmetros de 3,0, 3,5, 4,0 e 4,5 mm, respectivamente. Considerando que a compressão da medula espinhal pelo cateter inflado em apenas 3 mm resultou em uma lesão traumática de intensidade suficiente para manifestação de uma discreta recuperação funcional ao longo do período de observação, este diâmetro foi selecionado para indução do trauma medular nos experimentos subsequentes.

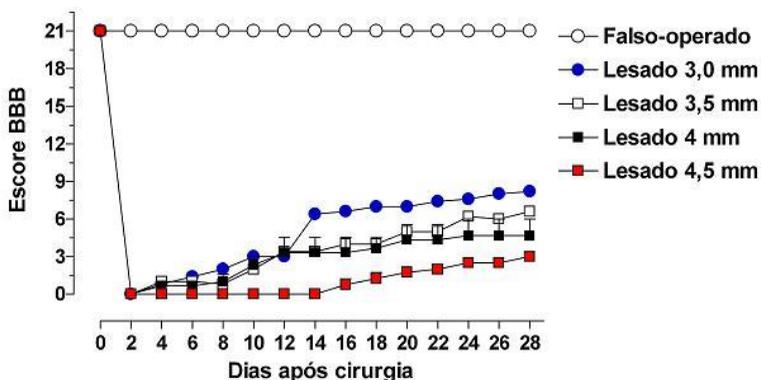


Figura 6. Padronização de um modelo de lesão medular traumática de intensidade moderada. Os animais sofreram compressão da medula espinhal por cateter calibrado com diferentes diâmetros e foram avaliados quanto à atividade locomotora a cada dois dias, e durante 28 dias, através da escala de avaliação locomotora BBB. Cada ponto representa a média \pm e.p.m. de 5 animais. Nos pontos que não mostram e.p.m., este valor é menor que a dimensão do símbolo.

4.2. Influência da lesão medular traumática sobre a expressão de MAPKs na medula espinhal.

Com o objetivo de avaliar o perfil temporal de expressão das MAPKs p38, ERK1/2 e JNK na medula espinhal após a lesão, foram realizados ensaios de Western Blot. Os resultados obtidos demonstram que a lesão medular não alterou a expressão das formas totais de nenhuma das três MAPKs em quaisquer dos momentos examinados (2, 6, 24 e 72 horas). Por outro lado, conforme ilustra a Figura 7, ocorreu um aumento de $322,80 \pm 55,72$ % e $295,84 \pm 10,53$ % na expressão da proteína p38 fosforilada em 2 e 6 horas após o procedimento cirúrgico, em comparação com o respectivo grupo falso-operado.

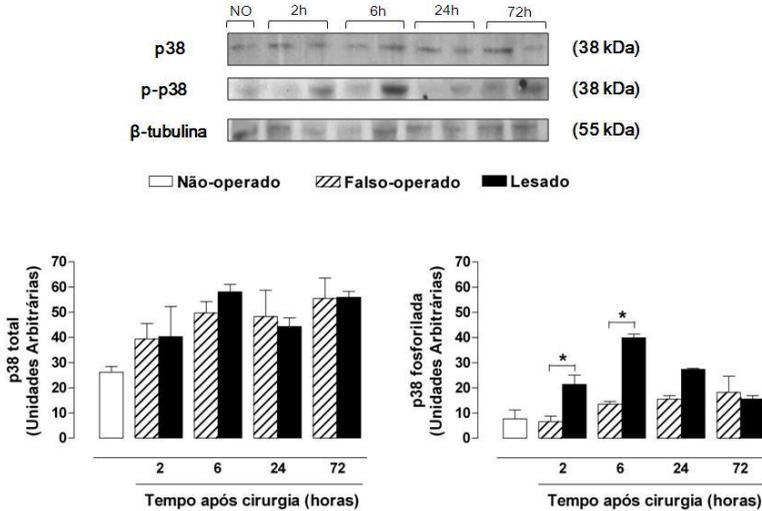


Figura 7. Perfil temporal de expressão da MAPK p38 (proteína total e proteína fosforilada), na medula espinal após a lesão medular traumática. Os gráficos demonstram a expressão das formas total e fosforilada da proteína p38, quantificada por densitometria óptica, na medula espinal de animais dos grupos não-operado, falso-operado e lesado em 2, 6, 24 e 72 horas após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média \pm e.p.m de 4 animais e os valores estão expressos em unidades arbitrárias. Os asteriscos indicam o nível de significância em relação ao respectivo grupo falso-operado. *P < 0,05 (ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni).

Já a expressão da proteína ERK1/2 fosforilada apresentou aumentos significativos em 2, 6 e 24 horas após a lesão (aumentos de $133,89 \pm 7,19$ %, $137,05 \pm 0,51$ % e $139,85 \pm 0,64$, respectivamente), em comparação com os valores correspondentes determinados em amostras de animais falso-operados.

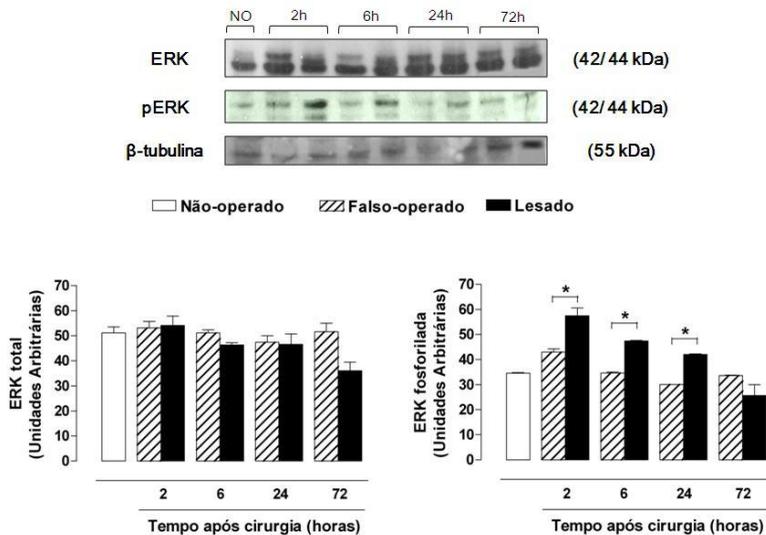


Figura 8. Perfil temporal de expressão da proteína ERK1/2 (proteína total e proteína fosforilada), na medula espinhal após a lesão medular traumática. Os gráficos demonstram a expressão das formas total e fosforilada da proteína ERK1/2, quantificada por densitometria óptica, na medula espinhal de animais dos grupos não-operado, falso-operado e lesado em 2, 6, 24 e 72 horas após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média \pm e.p.m de 4 animais e os valores estão expressos em unidades arbitrárias. Os asteriscos indicam o nível de significância em relação ao respectivo grupo falso-operado. *P<0,05 (ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni).

Por outro lado, a proteína JNK fosforilada (Figura 9) apresentou aumentos significativos em sua expressão nos períodos de 6 e 24 horas (de $467,84 \pm 86,60$ % e $654,65 \pm 82,71$ %, respectivamente). Diante deste aumento muito mais pronunciado para a proteína JNK fosforilada, o qual inicia no período de 6 horas, selecionamos esta MAPK como alvo de interação farmacológica, com o uso de seu inibidor específico, o SP600125.

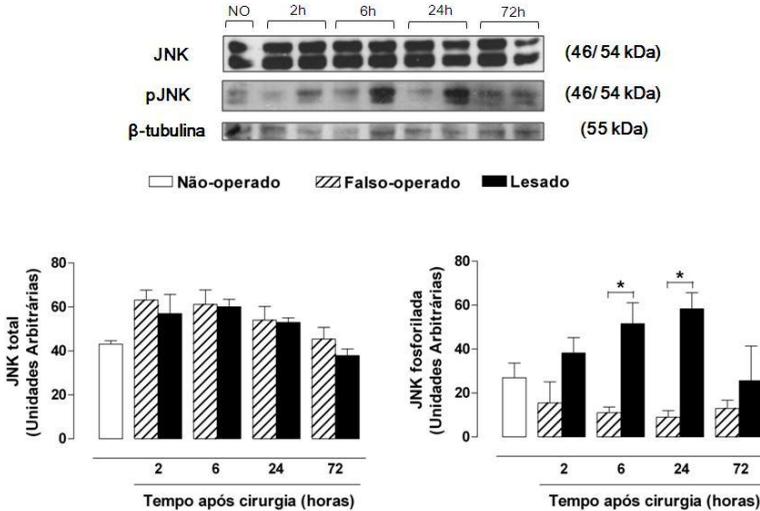


Figura 9. Perfil temporal de expressão da proteína JNK (proteína total e proteína fosforilada) na medula espinal após a lesão medular traumática. Os gráficos demonstram a expressão das formas total e fosforilada da proteína JNK, quantificada por densitometria óptica, na medula espinal de animais dos grupos não-operado, falso-operado e lesado em 2, 6, 24 e 72 horas após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média \pm e.p.m de 4 animais e os valores estão expressos em unidades arbitrárias. Os asteriscos indicam o nível de significância em relação ao respectivo grupo falso-operado. * $P < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni).

4.3. Influência do tratamento com SP600125 sobre a expressão de MAPKs na medula espinal após a lesão medular traumática

Uma vez caracterizado o perfil temporal de expressão das MAPKs, determinamos o tratamento com duas administrações de um inibidor da proteína JNK, o SP600125, na dose de 150 nmol, em 1 e 4 horas após a indução da lesão medular. Tendo em vista o aumento significativo das três proteínas no período de 6 horas após o procedimento cirúrgico, este foi o período determinado para todas as análises posteriores. Assim, notamos que o tratamento com SP600125 150 nmol em 1 e 4 horas após a lesão medular, reduziu, de maneira significativa, a expressão da proteína JNK fosforilada (em $70,18 \pm 6,00\%$), conforme ilustrado na Figura 10. Entretanto, o inibidor da proteína JNK não alterou os teores de p38 e ERK1/2 fosforiladas, como observado nas figuras 11 e 12, respectivamente. Estes resultados demonstram a especificidade do inibidor utilizado, atuando somente sobre a ativação da proteína JNK.

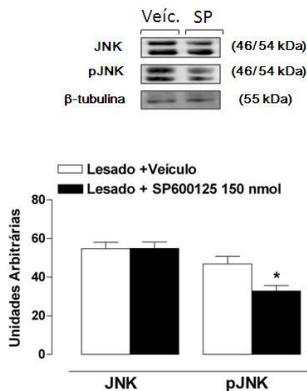


Figura 10. Efeito do tratamento com SP600125 150 nmol sobre a expressão das proteínas JNK e JNK fosforilada após a lesão medular traumática. Os animais receberam duas injeções intratecais de SP600125 150 nmol ou veículo (DMSO 20% em tampão fosfato PBS), em 1 e 4 horas após a indução da lesão medular. O gráfico demonstra a expressão das formas total e fosforilada da proteína JNK, quantificada por densitometria óptica, na medula espinal de animais dos grupos lesado veículo e lesado SP600125, 6 horas após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média \pm e.p.m de 4 animais e os valores estão expressos em unidades arbitrárias. Os asteriscos indicam o nível de significância em relação ao grupo lesado veículo. * $P < 0,05$ (Teste t bicaudal de Student para amostras não-pareadas).

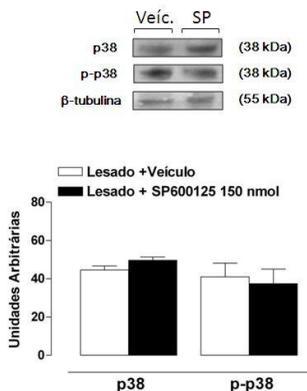


Figura 11. Efeito do tratamento com SP600125 150 nmol sobre a expressão das proteínas p38 e p38 fosforilada após a lesão medular traumática. Os animais receberam duas injeções intratecais de SP600125 150 nmol ou veículo (DMSO 20% em tampão fosfato PBS), em 1 e 4 horas após a indução da lesão medular. O gráfico demonstra a expressão das formas total e fosforilada da proteína p38, quantificada por densitometria óptica, na medula espinal de animais dos grupos lesado veículo e lesado SP600125, 6 horas após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média \pm e.p.m de 4 animais e os valores estão expressos em unidades arbitrárias. (Teste t bicaudal de Student para amostras não-pareadas).

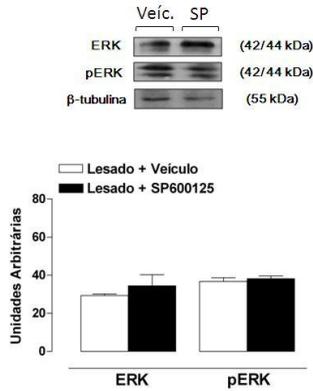


Figura 12. Efeito do tratamento com SP600125 150 nmol sobre a expressão das proteínas ERK1/2 e ERK1/2 fosforilada após a lesão medular traumática. Os animais receberam duas injeções intratecais de SP600125 150 nmol ou veículo (DMSO 20% em tampão fosfato PBS), em 1 e 4 horas após a indução da lesão medular. O gráfico demonstra a expressão das formas total e fosforilada da proteína ERK1/2, quantificada por densitometria óptica, na medula espinhal de animais dos grupos lesado veículo e lesado SP600125, 6 horas após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média \pm e.p.m de 4 animais e os valores estão expressos em unidades arbitrárias. (Teste t bicaudal de Student para amostras não-pareadas).

4.4. Alterações histopatológicas da medula espinhal em decorrência da lesão medular traumática, antes e após o tratamento com SP600125.

Com o propósito de verificar possíveis alterações histopatológicas decorrentes do trauma medular, realizamos a análise histológica qualitativa da medula espinhal. Em comparação à medula espinhal de animais não-operados ou falso-operados, a medula espinhal de animais submetidos à lesão traumática apresentou nos períodos de 2, 6 e 24 horas após o procedimento cirúrgico, extensas áreas hemorrágicas e edema intercelular (Figuras 13).

Após 72 horas, a medula espinhal apresenta áreas extensas de cavitação, características de morte celular, edema intracelular e intercelular, bem como fragmentos celulares em conseqüência de necrose. Além disso, a delimitação entre as substâncias branca e cinzenta não é visível no sítio da lesão.

A análise histológica de amostras de medula espinhal coletadas em 28 dias revelou, nos animais tratados com o veículo do inibidor (Figura 14A e 14C), a presença de uma extensa área de necrose e cavitação tecidual, circundada por células com citoplasma

abundantemente eosinofílico (rosa), as quais caracterizam uma cicatriz astrogliar. Nestes cortes, observou-se a presença marcante de macrófagos e células gliais fusiformes. Por outro lado, em amostras dos animais tratados com o inibidor da proteína JNK, o SP600125 (150 nmol, i.t., em 1 e 4 horas após a indução da lesão medular), observou-se a preservação tecidual da medula espinhal (Figuras 14B e 14D), com redução das áreas de cavitação e de necrose. Nos cortes de medula espinhal destes animais, notou-se ainda a presença de fibras nervosas em regeneração e um número menor de macrófagos.

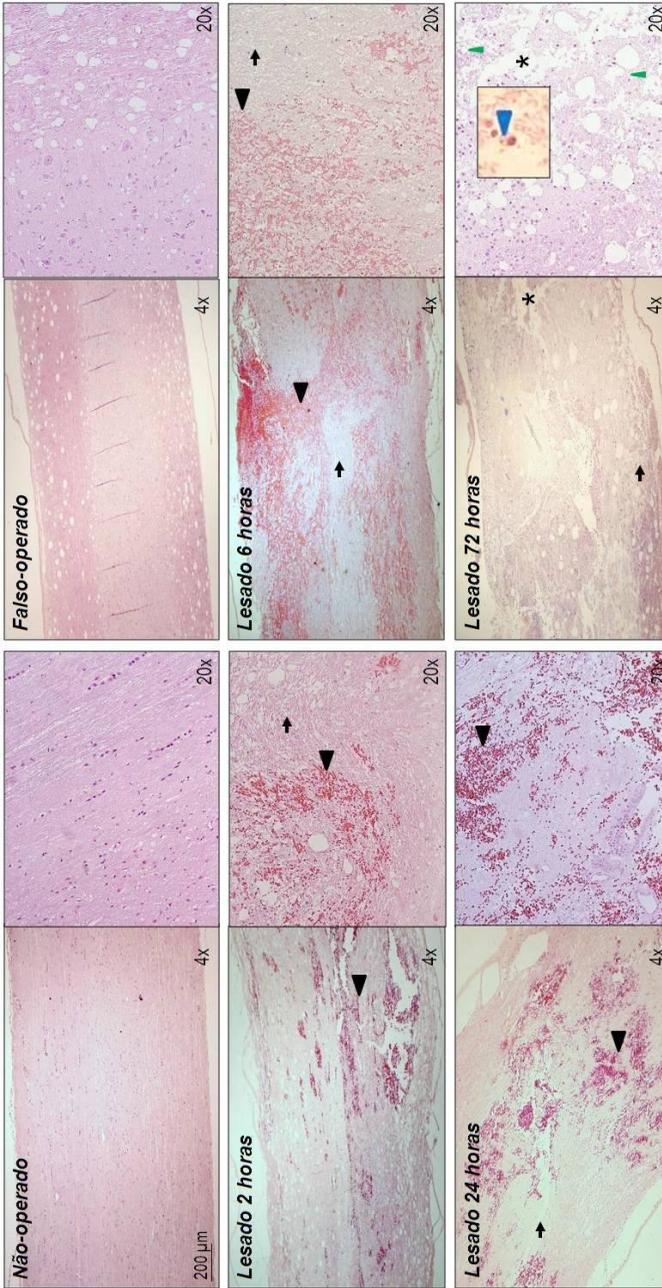


Figura 13. Alterações histopatológicas da medula espinal submetida à lesão medular traumática. Análise histológica realizada em medula espinal de animais não-operados, falso-operados ou lesados. Os símbolos indicam extensas áreas hemorrágicas (▼), edema intercelular (→) e intracelular (▲), áreas de cavitação (*), fragmentos celulares (▲), escala 200 μm. Coloração hematoxilina e eosina. Em cada painel, as imagens à esquerda e à direita são apresentadas em aumentos de 4 e 20 x, respectivamente. Imagem em destaque em aumento de 40x.

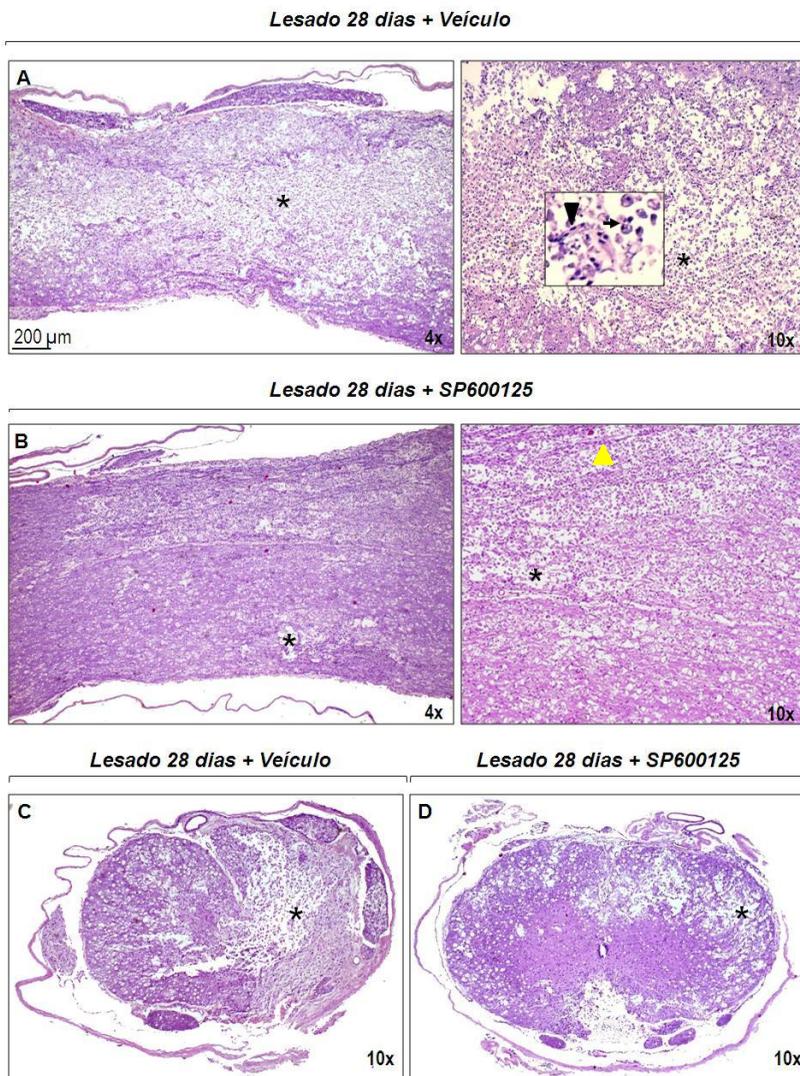


Figura 14. Efeito do tratamento com SP600125 (150 nmol) sobre as alterações histopatológicas da medula espinhal submetida à lesão medular traumática. Análise histológica realizada em cortes longitudinais (A e B) ou transversais (C e D) de medula espinhal, 28 dias após a indução da lesão medular traumática, em animais tratados por via intratecal com veículo (A e C) ou SP600125 150 nmol (B e D), mostrando áreas de necrose e cavitação (*), macrófagos (→), células gliais fusiformes (▲) e fibras em regeneração (*). Coloração hematoxilina e eosina, aumentos de 4 e 10 x, destaque em 20x, escala 200 µm.

4.5. Níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α na medula espinal de ratos submetidos à lesão medular traumática.

Visando investigar o estabelecimento do processo inflamatório decorrente da lesão medular, analisamos os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α na medula espinal de animais submetidos ao traumatismo medular. Conforme ilustra a Figura 15, houve um aumento significativo dos níveis da citocina IL-1 β (A) nos períodos de 2, 6 e 24 horas após o procedimento cirúrgico (411 ± 81 , 466 ± 48 , $286 \pm 38\%$, respectivamente) em comparação aos níveis observados nos animais falso-operados. Já os níveis de TNF- α (B) apresentaram-se significativamente aumentados apenas em 2 horas após a lesão medular ($286 \pm 95\%$), quando comparado ao respectivo grupo falso-operado. Estes resultados indicam o início do processo inflamatório imediatamente após a lesão da medula espinal.

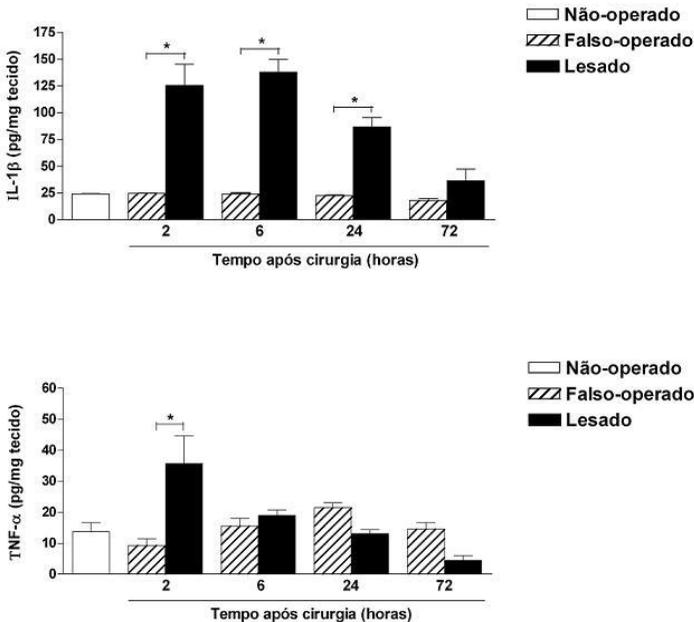


Figura 15. Níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α na medula espinal de animais submetidos à lesão medular traumática. Determinação dos níveis de IL-1 β (A) e TNF- α (B) na medula espinal de animais não-operados, falso-operados ou lesados nos períodos de 2, 6, 24 e 72 horas após a indução da lesão medular. Cada grupo representa a média \pm e.p.m. de 3 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao respectivo grupo falso-operado. * $P < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni).

4.6. Efeito do tratamento com SP600125 sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na medula espinhal após a lesão medular traumática.

Os resultados da figura 16A demonstram que amostras de medula espinhal coletadas de animais submetidos à lesão medular traumática apresentaram aumentos significativos nos níveis da enzima MPO de 417 ± 95 %, 437 ± 82 % e 233 ± 40 % em 6, 24 e 72 horas após o procedimento cirúrgico, respectivamente. Dessa maneira, a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) representa, de forma indireta, a infiltração de neutrófilos na medula espinhal após a lesão medular. O tratamento intratecal com o inibidor SP600125 (150 nmol, 1 e 4 horas após a lesão) não alterou de maneira significativa os níveis dessa enzima mensurados na sexta hora após a lesão (Figura 16B). Este resultado sugere a instalação de um processo inflamatório agudo na medula espinhal, o qual não é revertido pela administração do inibidor da proteína JNK.

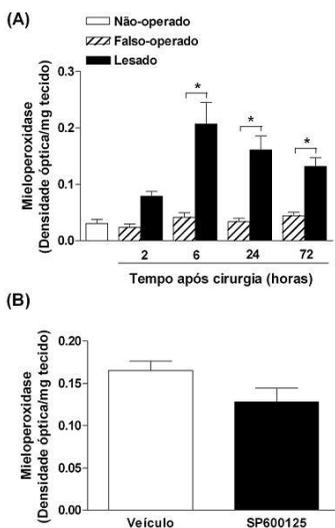


Figura 16. Efeito da lesão medular traumática sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na medula espinhal e influência do tratamento com SP600125. (A) Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase na medula espinhal 2, 6, 24 e 72 horas após a indução da lesão medular. (B) Efeito da administração intratecal do inibidor da JNK SP600125 (150 nmol) ou seu veículo (DMSO 20% em tampão fosfato PBS), 1 e 4 horas após o procedimento cirúrgico, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na medula espinhal, 6 horas após a indução da lesão medular. Cada grupo representa a média \pm e.p.m de 4 a 5 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação ao grupo lesado veículo. * $P < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni).

4.7. Efeito do tratamento com SP600125 sobre a apoptose de células da medula espinhal após a lesão medular traumática.

Visando avaliar a extensão da ocorrência de apoptose no dano tecidual induzido pela lesão medular traumática, foi feita análise de fragmentação de DNA in situ de amostras de medula espinhal após a lesão medular traumática através da técnica de TUNEL. A figura 17 demonstra aumento significativo no número de células apoptóticas na medula espinhal no período de 24 horas e 72 horas após a lesão. Enquanto as médias de células positivas por campo do grupo falso-operado em 24 horas e em 72 horas foram de $0,07 \pm 0,03$ e $0,002 \pm 0,001$, respectivamente, os valores correspondentes mensurados em amostras coletadas do grupo lesado foram de $2,62 \pm 0,76$ e $8,54 \pm 2,07$ células positivas por campo.

O tratamento intratecal de animais lesados, com o inibidor SP600125 (150 nmol), 1 e 4 horas após a lesão medular, reduziu significativamente o número de células apoptóticas na medula espinhal (células positivas por campo: veículo $1,83 \pm 0,33$, SP600125 $0,53 \pm 0,19$; porcentagem de inibição: $71 \pm 11\%$), em 6 horas após o procedimento cirúrgico. Estes resultados são apresentados na Figura 18.

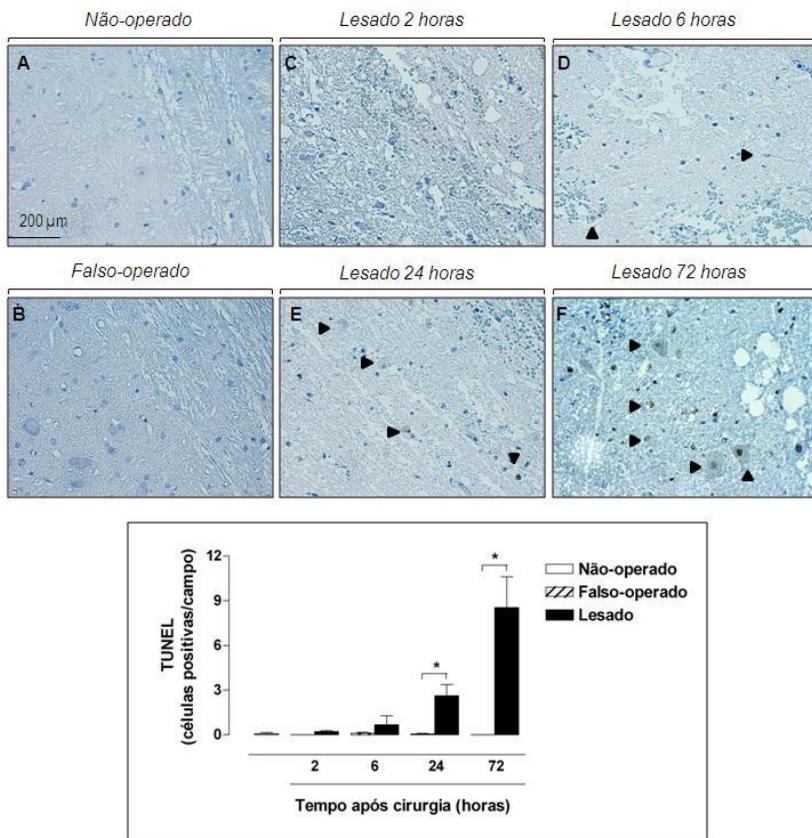


Figura 17. Número de células apoptóticas presentes na medula espinhal de animais submetidos à lesão medular traumática. Análise realizada em cortes longitudinais de medula espinhal de animais não-operados (A), falso-operados (B) ou lesados 2(C), 6(D), 24 (E) ou 72 (F) horas após a indução da lesão medular traumática. As setas apontam para células em apoptose (aumento de 40x, escala 200 μ m). Representação gráfica do número de células positivas por campo analisado. Cada grupo representa a média \pm e.p.m de 4 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em relação ao respectivo grupo falso-operado. *P < 0,05 (Teste t de Student).

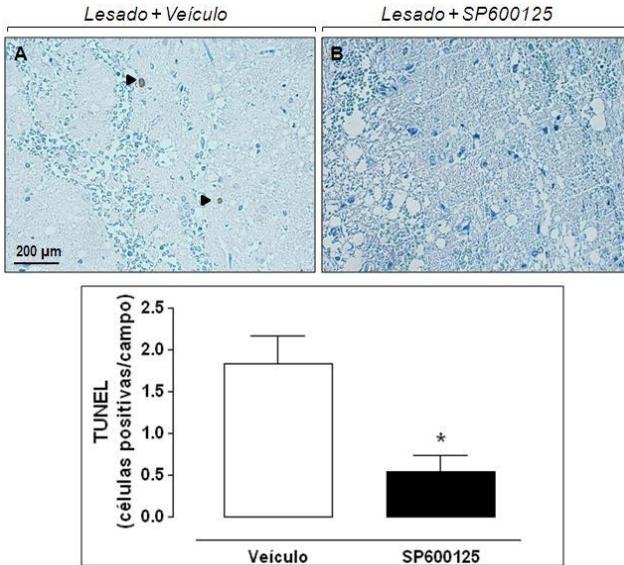


Figura 18. Efeito do tratamento com SP600125 150 nmol sobre o número de células apoptóticas na medula espinhal de animais submetidos à lesão medular traumática. Análise de células apoptóticas na medula espinhal, realizada 6 horas após o procedimento cirúrgico, em cortes longitudinais de medula espinhal de animais lesados e tratados por via intratecal com o inibidor da proteína JNK (SP600125 150 nmol) ou seu veículo (DMSO 20% em tampão fosfato PBS). As pontas de setas apontam para células em apoptose (aumento de 40x, escala 200 µm). O painel C apresenta os resultados médios do número de células positivas encontrado por campo analisado em cada grupo. Os valores representam a média \pm e.p.m de 4 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em relação ao respectivo grupo falso-operado. * $P < 0,05$ (Teste t de Student).

4.8. Efeito do tratamento com SP600125 sobre a atividade locomotora de ratos submetidos à lesão medular traumática.

A extensão da lesão medular induzida por compressão utilizada no presente estudo induz uma paraplegia de grau moderado, quando avaliada através da escala de atividade locomotora BBB, desenvolvida por Basso e colaboradores (1995). Conforme ilustrado na figura 19, já no segundo dia após o procedimento cirúrgico ocorre perda total da atividade locomotora dos membros posteriores dos animais, sendo o escore observado de 0 pontos, ou seja, nenhum movimento observável do membro posterior. Porém, no transcorrer das semanas seguintes ocorre uma recuperação espontânea e parcial dos movimentos, de maneira que os animais lesados tratados com veículo (DMSO 20% em tampão fosfato PBS) atingem um escore médio de $6,8 \pm 0,9$ pontos no

28º dia, o qual é caracterizado por movimento extenso de duas articulações de cada membro posterior e discreto da terceira. De maneira interessante, observamos que o tratamento com o inibidor da proteína JNK, SP600125, na dose de 150 nmol foi capaz de acentuar de maneira significativa a restauração dos movimentos locomotores. O efeito positivo do tratamento com SP600125 (150 nmol) teve início já no quarto dia do pós-operatório e estendeu-se até o final do período de observação, quando o escore BBB médio deste grupo de animais foi de $12,5 \pm 1,88$ pontos. Dessa forma, em relação ao grupo lesado tratado com veículo, a recuperação locomotora promovida pelo inibidor foi de 84 ± 28 %. Por outro lado, a administração de uma dose menor do inibidor, 75 nmol, não melhorou a atividade locomotora dos animais, os quais terminaram o período de avaliação com escore médio de $7,1 \pm 0,7$ pontos.

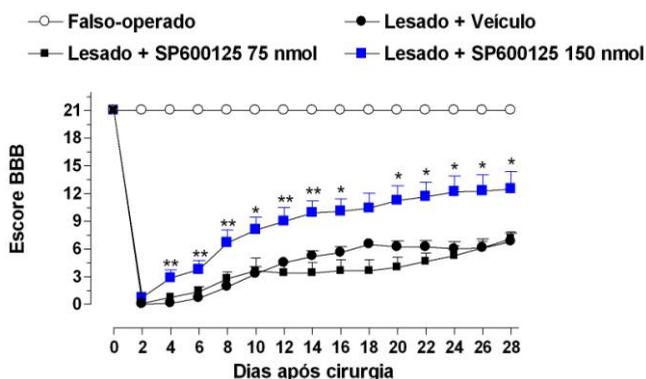


Figura 19. Avaliação do efeito do tratamento com SP600125 sobre a atividade locomotora de animais submetidos à lesão medular traumática através da escala BBB. Os animais receberam duas injeções intratecais de veículo (DMSO 20% em tampão fosfato PBS), SP600125 75 nmol ou SP600125 150 nmol, em 1 e 4 horas após a indução da lesão medular traumática. A avaliação da atividade locomotora foi realizada a cada dois dias e durante 28 dias através da escala de atividade locomotora BBB. Cada grupo representa a média \pm e.p.m. de 6 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo falso-operado. * $P < 0,05$ (Teste U de Mann-Whitney).

5 DISCUSSÃO

A lesão medular traumática constitui uma lesão neurológica altamente incapacitante, a qual demanda elevados custos econômicos e traz impacto significativo na qualidade de vida, produtividade e longevidade dos pacientes. Embora tenham ocorrido avanços importantes no tratamento emergencial e manejo cirúrgico da lesão medular, aliados à maior compreensão da patofisiologia que a envolve, ainda não há um tratamento capaz de reverter os danos neurológicos decorrentes desse trauma. Este estudo, através de um modelo experimental de lesão medular traumática induzido por compressão, apresenta resultados que apontam a MAPK JNK espinhal como um novo alvo terapêutico com potencial para restaurar, de forma seletiva e eficaz, a atividade locomotora de animais com paraplegia moderada.

Primeiramente, buscou-se padronizar um modelo de lesão medular traumática em ratos de intensidade controlável dependente do diâmetro do cateter Fogarty inflado no espaço epidural da medula espinhal. Corroborando os estudos de Vanický e colaboradores (2001), diversos diâmetros alcançados através do preenchimento do balão do cateter com volumes diferentes de salina, geraram intensidades diferentes de paraplegia, de moderada a severa. Com vistas à obtenção de lesões sub-máximas da medula espinhal, foi utilizado um cateter inflado até o diâmetro de 3 mm, correspondente ao volume de 15 µl de salina, o qual gerou uma lesão medular moderada, cujo escore final avaliado pela escala BBB ficou em torno de 8 pontos. Nestes animais, após a paraplegia inicial, foi possível observar uma recuperação limitada e gradual da função motora, que não se completou ao longo das 4 semanas de observação. O déficit neurológico persistente caracterizou-se por recuperação parcial dos movimentos de flexão e extensão. Entretanto, severas anormalidades permaneceram, como no posicionamento das patas posteriores e coordenação motora.

Sabe-se que, após lesões parciais da medula espinhal, tanto mecanismos supraespinhais, quanto espinhais participam da recuperação da locomoção. Teoricamente, dependendo do nível e extensão da lesão, as vias descendentes remanescentes podem assumir as funções da medula espinhal lesionada, relegando os mecanismos espinhais para uma via secundária. Outra alternativa é que essas vias remanescentes promovam a reorganização do circuito espinhal, de maneira que o circuito espinhal gerador de padrão de passos (GPPs) assumam o papel primário na recuperação da locomoção após lesões parciais (LUNDY-EKMAN, 2008; BARRIÈRE et al., 2008; ROSSIGNOL et al., 2009). Os

GPPs espinhais constituem uma rede de neurônios capazes de gerar padrões rítmicos, que contribuem para dar passos por ativarem neurônios motores inferiores, provocando flexão e extensão alternada nos quadris e joelhos, e que podem ser ativados por certas vias que originam no tronco cerebral e descendem até a medula espinhal. Dessa forma, como obtivemos uma paraplegia moderada, na qual realizou-se uma compressão sub-máxima da medula espinhal e não a secção da mesma, vias neuronais remanescentes podem estar contribuindo para a ativação dos GPPs e a consequente resposta de flexão e extensão observada nos animais.

Lesões espinhais por compressão são difusas e geralmente resultam em cavitação central. Normalmente, a recuperação locomotora está inversamente relacionada com o volume de cavitação e a severidade da lesão. A extensão do dano da substância branca, dependendo da intensidade da lesão, é fortemente relacionada à extensão e ao número e à localização dos tratos espinhais lesionados, resultando nos déficits locomotores. Lesões por compressão entre os segmentos vertebrais T₁₃ – L₂ podem prejudicar elementos críticos do GPP para a locomoção de membros posteriores, que parece estar localizado entre os segmentos vertebrais lombares L₁ – L₂, no rato. A recuperação espontânea da locomoção reflete, sem dúvida, mudanças nas interações sensoriais-motoras dentro e entre o GPP espinhal, aferências descendentes supraespinhais e proprioespinhais, bem como no *feedback* sensorial periférico. Assim, embora hajam déficits específicos decorrentes da inativação de determinadas vias funcionais, os animais podem, eventualmente, recuperar padrões locomotores funcionais, permitindo a locomoção (ROSSIGNOL et al., 2008; ROSSIGNOL et al., 2009).

Uma vez obtida uma lesão medular traumática moderada reprodutível e quantificável, passamos a avaliar o perfil temporal de expressão das MAPKs espinhais. As MAPKs, conforme já descrito anteriormente, constituem proteínas ativadas pela fosforilação dual de resíduos específicos de treonina e tirosina, para exercerem múltiplas funções sinalizadoras intracelulares. Existem três MAPKs principais: a ERK1/2, a JNK1/2/3 e a p38 (p38 α / β / γ / δ). A sinalização celular através da cascata de cada proteína é mediada pela fosforilação e ativação de cada um dos níveis sequenciais. Estas cascatas cooperam na transmissão de vários sinais extracelulares e, assim, controlam um grande número de processos celulares distintos, e até opostos, como a proliferação, diferenciação, sobrevivência e crescimento celular, além de respostas ao estresse e apoptose (KESHET E SEGER, 2010). O início das respostas inflamatórias após o trauma medular também parece estar relacionado à

ativação das MAPKs, as quais exercem papel determinante na morte ou sobrevivência neuronal em determinadas situações e a expressão gênica de proteínas pró-inflamatórias (NEARY, 2005). Nesse sentido, Genovese e colaboradores (2008) demonstraram que a administração sistêmica de um inibidor das proteínas MAPK3/MAPK1 (PD98059), nas primeiras horas após a lesão medular induzida por compressão em camundongos, atenuou o aumento dos níveis espinhais das formas fosforiladas de ERK1/2, p38 e JNK, em 24 horas após a lesão, tendo ainda melhorado a recuperação motora dos animais a partir do quarto dia após a cirurgia.

Nossos resultados mostraram que a lesão da medula espinhal não induziu qualquer alteração na expressão protéica espinhal das formas totais das MAPKs, quando comparadas aos níveis determinados em amostras de animais não operados ou falso-operados. De fato, alguns estudos demonstraram que a indução da lesão medular não altera a expressão espinhal das formas totais das proteínas JNK e p38 (NAKAHARA et al., 1999), ou ERK1/2 (XU et al., 2006), em modelos de lesão medular induzida por cilindro compressor e transecção total, respectivamente. Por outro lado, a lesão medular promove o aumento da ativação dessas proteínas, elevando os níveis de expressão das proteínas fosforiladas, nas primeiras horas após o trauma medular. Xu e colaboradores (2006), utilizando um modelo de lesão medular induzido através da transecção total da medula espinhal de ratos, demonstraram aumento nos níveis da proteína ERK1/2 fosforilada entre 1 e 3 horas após a transecção, permanecendo elevada nos períodos de 6 e 24 horas. Os autores demonstraram ainda um aumento na expressão da proteína p38 fosforilada entre 1 e 3 horas, permanecendo significativamente elevada nos períodos de 6, 12 e 24 horas após a lesão. De forma interessante, em nosso modelo experimental, observou-se um aumento na expressão da proteína ERK1/2 fosforilada similar àquele descrito por Xu e colaboradores (2006). No entanto, a proteína p38 fosforilada apresentou-se significativamente elevada somente em 2 e 6 horas após a lesão. Esta diferença no perfil de expressão da proteína p38 provavelmente se deve à variação do modelo de lesão medular utilizado. Segundo Yin e colaboradores (2005), a expressão da proteína JNK fosforilada parece aumentar em 1 hora após a indução da lesão medular por impacto em ratos, permanecendo elevada nos períodos de 4, 24 e 72 horas. Em nosso estudo a expressão desta proteína aumentou significativamente e de forma muito pronunciada ($467,84 \pm 86,60$ % e $654,65 \pm 82,71$ %, respectivamente) em 6 e 24 horas após a indução da lesão. Nesse sentido, nossos resultados mostram, de maneira inédita, o

aumento da expressão espinhal das formas fosforiladas das três MAPKs nos períodos de 2, 6, 24 e 72 horas após a indução da lesão medular por compressão através de um cateter do tipo Fogarty, sugerindo a ativação aguda destas proteínas em decorrência do trauma medular.

As cascatas de MAPKs são ativadas por um amplo número de estímulos extracelulares e, assim, governam um extenso número de processos celulares. O fato de que as mesmas cascatas podem regular diferentes processos de sinalização, às vezes opostos, traz à tona a questão de como a especificidade de cada via é determinada. Atualmente, cinco mecanismos de especificidade para cada via das MAPKs foram propostos e incluem: 1) duração e força do sinal – regulados basicamente por fosfatases específicas; 2) número variado de componentes em cada nível; 3) interações com proteínas de ancoragem – que facilitam a sinalização e direcionam as MAPKs para suas localizações celulares (i.e. micro-domínios) apropriadas, e também para seus ativadores e reguladores; 4) interação com outras cascatas – como NF- κ B, PI3K-Akt, entre outras; 5) além da compartimentalização – antes da ativação a maioria dos componentes está no citosol, translocando, após a ativação, para o núcleo e também para outros compartimentos para executar suas ações (KESHET E SEGER, 2010).

Baseados no aumento pronunciado dos níveis espinhais da proteína JNK fosforilada após a lesão medular, quando comparada às outras duas MAPKs, selecionamos seu inibidor seletivo, o SP600125 como ferramenta farmacológica para avaliar a importância desta MAPK na extensão da lesão secundária que se segue à lesão medular traumática. A inibição da ativação da proteína JNK pelo SP600125 se dá de forma reversível por competição com o sítio de ligação do ATP (BOGOYEVITCH E ARTHUR, 2008). A estrutura central catalítica das quinases apresenta uma estrutura bi-lobular, que compreende um pequeno domínio N-terminal e um grande domínio C-terminal. Entre esses dois domínios, encontra-se o sítio de ligação do ATP, juntamente com a porção que conecta os domínios. O anel de adenina do ATP interage com esse sítio, e os grupos ribose e trifosfato se ligam a um canal que se estende para a região de ligação do complexo inibidor-substrato. Assim, o inibidor SP600125 é capaz de inibir a reação de fosforilação, que é a etapa limitante da qual são liberados os produtos ADP e a proteína fosforilada (CHICO et al., 2009).

Nossos resultados comprovam a seletividade de ação do inibidor na dose utilizada (150 nmol, duas injeções intratecais, em 1 e 4 horas após o procedimento cirúrgico), uma vez que foi observada a redução somente da proteína JNK fosforilada, não havendo alteração nas

proteínas p38 ou ERK1/2 fosforiladas. Entretanto, cabe ressaltar aqui que Repici e colaboradores (2009) demonstraram, através da utilização de outro inibidor da proteína JNK, o D-JNKI-1, o qual impede a ligação da proteína JNK fosforilada em seus alvos, uma possível modulação cruzada (*cross-talk*) entre as vias sinalizadoras de JNK e ERK. Eles observaram que, em neurônios corticais, a inibição da proteína JNK não alterou a expressão da proteína p38, mas foi capaz de ativar, de maneira dose-dependente, a via de sinalização da proteína ERK1/2. Estes achados são particularmente importantes ao considerarmos o fato dessa proteína exibir efeitos duais, podendo promover tanto a morte como a sobrevivência celular, em determinadas ocasiões. A idéia de que as ações da ERK podem, eventualmente, ser opostas àquelas exercidas pela p38 e JNK na apoptose celular foi primeiramente introduzida por Xia e colaboradores (1995), mas alguns trabalhos recentes têm se dedicado à esta discussão (para revisão ver LU E XU, 2006; SAWE et al., 2008; TSUDA et al., 2011). Assim, uma possível explicação para o efeito neuroprotetor do SP600125 observado em nosso estudo, o qual será discutido adiante nesta mesma seção, seria não somente a redução da ativação da proteína JNK, com conseqüente inibição de sua atuação em seus alvos específicos, mas também a ativação de vias de sobrevivência celular moduladas por outras proteínas, tais como a ERK1/2. Entretanto, faz-se necessário experimentos adicionais para melhor elucidar este fato.

Para uma melhor definição dos efeitos esperados com a inibição da fosforilação da proteína JNK, se faz necessário um entendimento aprofundado dos substratos dessa proteína e suas ações. Apesar disso, poucos estudos se dedicaram a delinear todos os alvos fisiologicamente relevantes nesta via. Com mais de 50 substratos já identificados, sabe-se que a proteína JNK é uma serina/treonina quinase direcionada por um resíduo de prolina, e que o reconhecimento do substrato da JNK freqüentemente envolve a interação de um domínio ligante de JNK de cada substrato com o sítio de ligação na porção C-terminal da JNK. Enquanto este reconhecimento dual do substrato pode aumentar a seletividade, ainda não se definiu os fatores necessários para eventos mediados pela fosforilação da proteína JNK, bem como a necessidade de um sítio de ligação dentro do substrato. Entretanto, considerando os papéis desempenhados pelos alvos da proteína JNK em células eucarióticas, essa proteína continua sendo implicada na regulação da morte/sobrevivência celular, além de outros eventos intracelulares (BOGOYEVITCH e KOBE, 2006; BOGOYEVITCH et al., 2010).

A lesão secundária decorrente do trauma medular envolve mecanismos vasculares, iônicos, bioquímicos, inflamatórios e celulares. Todos estes ocorrem concomitantemente, são inter-relacionados e potencializam um ao outro (DUMONT et al., 2001; PROFYRIS et al., 2004; FLEMING et al., 2006; DONNELLY et al., 2008). Através de análises histológicas, demonstramos alterações teciduais marcantes na medula espinhal decorrentes da lesão medular traumática. Assim, observamos alterações vasculares caracterizadas pela presença de extensas áreas de hemorragia e edema intercelular entre 2 e 24 horas após a lesão medular. Após 72 horas, a medula espinhal não apresentou mais áreas hemorrágicas, mas passou a apresentar além do edema intercelular, edema intracelular, juntamente com áreas extensas de necrose e restos celulares.

A isquemia da medula espinhal leva à redução imediata do seu fluxo sanguíneo, o qual se intensifica nas primeiras horas e dura por 24 horas, e é determinado por uma combinação de fatores locais e sistêmicos. Esta interrupção sanguínea pode ser seguida por uma hiperemia ou reperfusão, ocasionada pela redução do pH, aumentando a área da lesão ao promover o influxo de radicais livres e outras substâncias citotóxicas. A hemorragia na substância cinzenta ocorre nos primeiros 5 minutos após o trauma e determina a redução na perfusão tecidual local. Ela afeta, inicialmente, a porção central da medula espinhal e, progressivamente, através da expansão do hematoma, atinge a substância branca. O edema vasogênico ocorre como resultado da lesão endotelial secundária, a qual determina o aumento da permeabilidade vascular. Este evento pode durar por mais de 15 dias, e está relacionado com o aparecimento da necrose não-hemorrágica da substância branca (AMARAL, 2010). Com a expansão da hemorragia e do edema, as substâncias branca e cinzenta se dilatam, perdendo a definição. Neste estágio da lesão secundária, a necrose é acompanhada por apoptose com degeneração de diferentes tipos celulares (PROFYRIS et al., 2004).

Após a administração do inibidor de fosforilação da proteína JNK, e ao final de 28 dias de avaliação dos animais submetidos à lesão medular traumática, foram realizadas novas análises histológicas da medula espinhal. Estas análises permitiram verificar a preservação tecidual da medula espinhal dos animais tratados com o inibidor SP600125. De fato, alguns trabalhos já demonstraram o possível efeito neuroprotetor desse mesmo inibidor de JNK na lesão cerebral hemorrágica, por reduzir a perda de células neuronais (OHNISHI et al., 2007), na lesão cerebral isquêmica (GUAN et al., 2006) e em doenças

neurodegenerativas pela supressão das vias de apoptose (YESTE-VELASCO et al., 2009). Nossos resultados mostraram uma clara redução da perda celular após a inibição da proteína JNK fosforilada, a qual se deve, provavelmente, à prevenção da morte celular programada.

Concomitante às alterações teciduais, demonstramos a instalação de um processo inflamatório agudo na medula espinhal, o qual é caracterizado pelo aumento exacerbado da atividade da enzima MPO, um indicador do influxo de neutrófilos, e pelos níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Os neutrófilos desempenham papel importante na patogênese da lesão secundária induzida pela lesão medular traumática. Em adição às suas funções como fagócitos, os neutrófilos liberam enzimas histolíticas, espécies reativas de oxigênio e fatores pró-inflamatórios, levando ao aumento da inflamação e necrose teciduais. Além disso, já foi demonstrado que a atividade da enzima MPO é um indicador exclusivo da extensão da infiltração pós-traumática de neutrófilos (TAOKA et al., 1997; BERIL GOK et al., 2007). Dessa maneira, nossos resultados mostraram um aumento significativo nos níveis da enzima MPO entre 6 e 72 horas após a lesão medular. De fato, Taoka e colaboradores (1997) demonstraram que, após a compressão por peso da medula espinhal, a atividade da enzima MPO está aumentada em 6 e 24 horas após a lesão. Ademais, Qiao e colaboradores (2006) mostraram a presença maciça de neutrófilos na medula espinhal 24 horas após a contusão medular, sendo que os níveis destas células começam a decair 72 horas após o trauma, corroborando nossos resultados.

Além do aumento nos níveis da enzima MPO, observamos também um aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , de 6 a 72 horas após a lesão, e TNF- α , apenas em 2 horas. No SNC, citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β e o TNF- α , podem causar danos à barreira hematoencefálica, liberar óxido nítrico, a partir do endotélio vascular, aumentar o número de moléculas de adesão envolvidas na adesão de leucócitos e induzir edema vasogênico. Além disso, elas desempenham papel fundamental na ativação glial e no recrutamento de leucócitos (STREIT et al., 1997; ALLAN e ROTHWELL, 2001). As citocinas atuam como ativadores diretos da via de sinalização que envolve a JNK. Após o dano tecidual, os níveis de citocinas aumentam, não somente no tecido lesionado, mas também no gânglio da raiz dorsal (GRD) e na medula espinhal. Em culturas de neurônios do GRD, a JNK é ativada principalmente por TNF- α e IL-1 β . Na medula espinhal, essas citocinas são produzidas, principalmente, pelas células gliais, embora também haja produção pelos neurônios

(GAO e JI, 2008). Neste sentido, Streit e colaboradores (1997) demonstraram um aumento dos níveis da IL-1 β em 6, 24 e 72 horas após contusão da medula espinhal, corroborando nossos resultados, e dos níveis de TNF- α em 1 hora após a lesão medular, sendo que o nível desta citocina apresentou-se reduzido 6 horas após a lesão. Mais recentemente, Koopmans e colaboradores (2009) também demonstraram uma elevação nos níveis de TNF- α em 1 hora após a lesão medular. Estes estudos suportam nossos achados, os quais mostram um aumento significativo da concentração desta citocina em amostras coletadas 2 horas após a lesão, que decaí a níveis basais já em 6 horas e nos períodos subsequentes.

No entanto, considerando que o inibidor da fosforilação da proteína JNK não foi capaz de reduzir de maneira significativa os níveis da enzima MPO, podemos concluir que o influxo de neutrófilos para o sítio da lesão da medula espinhal está sendo controlado por uma via independente da proteína JNK fosforilada. Neste sentido, Thornton e colaboradores (2010) demonstraram, em culturas de endotélio cerebral, que a citocina IL-1 β foi capaz de induzir a ativação rápida e transitória das proteínas p38 e JNK, além de induzir o recrutamento nuclear do fator nuclear NF- κ B. Além disso, o estudo relatou que a migração transendotelial de neutrófilos, induzida pela citocina IL-1 β , não foi reduzida pelo inibidor da proteína JNK, sugerindo que o influxo de neutrófilos seria estimulado pela via do NF- κ B. Sabendo que o tratamento com SP600125, não foi capaz de reduzir totalmente os níveis espinhais da proteína fosforilada (ao menos em 6 horas), podemos deduzir que uma fração da proteína ainda seria capaz de exercer alguma ação sobre seus alvos específicos, como por exemplo o c-jun, levando à produção de citocinas e migração de neutrófilos. Entretanto, serão necessários experimentos adicionais demonstrando o efeito direto do inibidor sobre a expressão de citocinas.

Após a lesão da medula espinhal, os mecanismos envolvidos na lesão secundária promovem a morte de células gliais e neuronais, com consequente degeneração de fibras nervosas. Diversas evidências sugerem que parte substancial da morte celular após a lesão medular ocorre através da morte celular programada, ou apoptose. A apoptose é caracterizada por uma série de alterações à arquitetura das células, que contribuem não apenas para a morte celular, mas que também as preparam para remoção por fagócitos e previnem respostas imunes indesejáveis. Grande parte das reações que ocorrem durante a fase de destruição da apoptose são coordenadas por caspases, membros da

família de cisteína proteases, as quais podem iniciar ou efetuar, propriamente, a destruição das células (TAYLOR et al., 2008).

Diversos estudos têm demonstrado o papel central da proteína JNK na regulação da apoptose em patologias do SNC, como na doença de Alzheimer e isquemia cerebral. De modo geral, a ativação prolongada da proteína está, geralmente, associada com a morte celular, enquanto que a ativação transitória está envolvida nas vias de proliferação e sobrevivência celular. Neste sentido, a ativação do fator de transcrição c-jun e da caspase-3 parece constituir evento fundamental na morte neuronal mediada pela proteína JNK (BRJNIC et al., 2010). Em relação à lesão medular traumática, poucos trabalhos demonstram o envolvimento desta proteína na via de apoptose. De maneira importante, Yin e colaboradores (2005) demonstraram que a lesão medular por impacto causou um aumento substancial na expressão de *dp5* (*death protein 5*), uma proteína indutora de apoptose neuronal, membro da família Bcl-2. Em paralelo aos períodos de expressão de *dp5*, a proteína JNK e seu alvo principal, c-jun, sofreram fosforilação, sugerindo que a ativação de JNK é responsável, ao menos em parte, pelo aumento da expressão de *dp5* induzida pela lesão medular, bem como, pela ativação de caspase-3 e a subsequente apoptose observada naquele estudo. Neste sentido, Genovese e colaboradores (2009) demonstraram efeitos protetores da administração sistêmica de CGS 21680, um agonista de receptores A_{2A} para adenosina, em camundongos com lesão medular induzida por clipe vascular. Este agonista reverteu, de maneira importante, o aumento da fosforilação da proteína JNK, além de atenuar também o aumento da enzima MPO e da expressão do fator NF-κB, com maior recuperação da função motora, embora não tenha sido avaliado seus efeitos sobre a expressão das formas fosforiladas das demais MAPKs.

No presente estudo, através do método de TUNEL, observamos um aumento no número de células apoptóticas na medula espinhal em 6 horas após a indução da lesão, tornando-se estatisticamente significativos nos períodos de 24 e 72 horas. Corroborando nossos resultados, Arishima e colaboradores (2006) também demonstraram elevação no número de células apoptóticas nos períodos de 6, 24 e 72 horas, após compressão da medula espinhal com peso. Dessa maneira, demonstramos a indução da morte celular por apoptose no trauma da medula espinhal.

De forma interessante, a administração do inibidor da proteína JNK reduziu por completo o número de células apoptóticas em 6 horas após a lesão medular. A mitocôndria das células constitui um alvo

primário na sinalização pró-apoptótica exercida pela JNK, embora os mecanismos para tal ação não sejam completamente elucidados. Quando sinais para a apoptose são induzidos, a proteína pró-apoptótica Bad, que está presente no citosol de forma inativa, pode ser ativada através da proteína 14-3-3, responsável por mecanismos de sobrevivência e proliferação celular. A defosforilação da proteína Bad promove seus efeitos apoptóticos, o que pode ocorrer através da proteína JNK (SCHEID et al., 1999; NAKAMURA et al., 2002). Neste contexto, Fan e colaboradores (2010) demonstraram que a diminuição dos níveis da proteína Bad fosforilada, a dimerização Bad/14-3-3 e o aumento do citocromo *c* ocorreram em paralelo com o aumento da atividade da JNK. Entretanto, todas essas alterações foram prevenidas pelo inibidor SP600125, demonstrando a proteção efetiva desse inibidor contra a apoptose mitocondrial, na lesão por isquemia/reperfusão da medula espinhal. De maneira similar, a administração intraperitoneal de SP600125, após a lesão cerebral seguida por hemorragia subaracnóide, inibiu a ativação de caspases e a concomitante lesão neuronal, aumentando a preservação da barreira hematoencefálica, reduzindo o edema cerebral, e culminando na recuperação da função neurológica (GUAN et al., 2006; BOGOYEVITCH e ARTHUR, 2008). Outras evidências apontam para a ativação de vias de sobrevivência neuronal, através da inibição da ativação da proteína JNK. Neste sentido, Yeste-Velasco e colaboradores (2009) demonstraram que a utilização de SP600125 induziu a ativação da via da proteína Akt, prevenindo a ativação de proteínas pró-apoptose, induzida por privação de potássio em células granulares do cerebelo.

Por outro lado, a via de sinalização da proteína JNK apresenta uma ativação basal importante, sugerindo seu papel fisiológico no SNC, contribuindo, por exemplo, para o crescimento e brotamento axonal. Apenas a ativação demasiada desta MAPK está associada a eventos patológicos e morte neuronal (REPICI et al., 2007), o que pode explicar os efeitos neuroprotetores demonstrados no presente trabalho advindos da inibição (mas não supressão) da ativação da proteína JNK induzida pela lesão medular traumática.

Há décadas se sabe que todas as alterações induzidas pela lesão da medula espinhal levam a uma condição debilitante que inclui sintomas negativos, como a perda da sensibilidade tátil e de movimentos voluntários, e sintomas positivos, como dor neuropática e espasticidade muscular. Embora alguns pacientes apresentem discreta recuperação espontânea, o que se observa, normalmente, é a permanência dos sintomas. A maioria dos déficits funcionais associados com a lesão

medular decorre da interrupção dos tratos espinhais ascendentes e descendentes. Quando os axônios desses tratos são danificados, os segmentos distais apresentam degeneração Walleriana, impedindo que o segmento proximal se regenere (BRADBURY e Mc MAHON, 2006). Assim, as informações sensoriais ascendentes não atingem os sítios supraespinhais, e os sistemas autonômicos e motores descendentes são desconectados do circuito espinhal caudal, incluindo os GPPs. Atualmente, as pesquisas voltadas à lesão medular tem focado na possibilidade de induzir a regeneração desses sistemas de projeção danificados, para a retomada do circuito original. Nesse sentido, uma possibilidade terapêutica utilizada visa à redução dos mecanismos envolvidos na lesão secundária ao trauma, como a resposta celular imune, inflamação, excitotoxicidade, perda neuronal, entre outros (BRADBURY e Mc MAHON, 2006; DIETZ, 2010).

6 CONCLUSÕES

No presente estudo, demonstramos o efeito neuroprotetor do tratamento intratecal com um inibidor da proteína JNK, o SP600125, na morte celular induzida pela lesão medular. Ao avaliarmos a atividade locomotora dos animais lesados tratados com o SP600125 observamos uma recuperação significativa mais acentuada dos movimentos das patas posteriores no transcorrer das primeiras 4 semanas, caracterizada por passada plantar com suporte de peso e coordenação ocasional ao final do período. Já os animais lesados que não receberam o tratamento finalizam o período de avaliação com apenas movimentos extensos das 3 articulações (quadril, joelho e tornozelo), sem passada plantar com suporte de peso. Barnat e colaboradores (2010) demonstraram o papel da via de sinalização da proteína JNK durante a regeneração axonal em neurônios do GRD. Os autores observaram que a sinalização exercida pela JNK, principalmente pelas isoformas JNK1 e JNK2, é necessária para o prolongamento axonal, uma vez que a sua inibição resultou na retração maciça dos axônios. Além disso, eles demonstraram que a JNK fosforilada está presente no citoplasma de axônios em brotamento ou regeneração, sugerindo uma ação local sobre as proteínas do citoesqueleto. Neste contexto, uma estratégia terapêutica seria prevenir, apenas, a ativação desta via quando decorrente do estresse celular, sem interferir com sua atividade fisiológica (HERDEGEN et al., 1997; BRECHT et al., 2005; REPICI et al., 2007). Cabe ressaltar que a utilização do inibidor SP600125 na dose de 75 nmol foi inefetiva em restaurar a atividade locomotora, sendo que determinar o efeito de doses mais elevadas do inibidor e de outros esquemas de tratamento (i.e. vias alternativas, períodos de administração distintos) é imprescindível para o avanço deste estudo. Além disso, avaliar se o efeito benéfico do SP600125 na recuperação locomotora poderia se prolongar por períodos além de 4 semanas é outra possibilidade ainda inexplorada.

Apesar de a lesão medular estar sendo estudada extensivamente, pesquisas relacionadas ao envolvimento das MAPKs e, em especial, da proteína JNK nessa patologia são de grande interesse, uma vez que estas proteínas sinalizadoras exercem papel fundamental na patofisiologia da lesão medular. Nesse sentido, demonstramos que a lesão da medula espinhal induz a ativação das MAPKs p38, ERK e, de maneira importante, da proteína JNK, gerando alterações histológicas significativas no sítio da lesão. Além disso, há um aumento nos níveis de citocinas inflamatórias e no influxo de neutrófilos. Como consequência, a lesão medular traumática induz morte celular na medula

espinhal, elevando o número de células apoptóticas no tecido. Assim, demonstramos o envolvimento da proteína JNK espinhal no dano funcional induzido pela lesão medular traumática aonde, através da utilização de um inibidor da ativação da proteína JNK, observamos não somente a redução da ativação dessa proteína, mas também uma diminuição no número de células apoptóticas, atenuando assim, a morte celular e o dano tecidual, e conseqüentemente acentuando a recuperação da atividade locomota. É importante ressaltar que os resultados positivos alcançados com a administração intratecal do SP600125 em 1 e 4 horas após a indução da lesão medular traumática são promissores pois, se o modelo pré-clínico utilizado possuir valor preditivo para a situação clínica, a janela terapêutica para a aplicação de um inibidor da ativação da proteína JNK torna-se factível.

Sendo assim, a utilização de inibidores dessa proteína, capazes de reduzir a expressão de JNK induzida pelo estresse, sem afetar sua atividade fisiológica, poderia constituir uma nova alternativa terapêutica no tratamento da lesão medular traumática.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUL-KASIM, K., STRÖMBECK, A., SUNDGREN, P.C. SPINAL CORD INJURIES. IN: BERKOVSKY, T.C. **Handbook of Spinal Cord Injuries**. New York: Nova Science Publishers, 483 – 499, 2010.

ADAMS, J.P., SWEATT, J.D. J. Molecular Psychology: Roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 42:135–6, 2002.

ALLAN, S.M., ROTHWELL, N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nature Rev Neurosci.**, 2(10):734-44, 2001.

ALLAN, L.A., CLARK, P.R. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. **FEBS Journal**, 276: 6063–6073, 2009.

AMARAL, S.H. Physiopathology of spinal cord injury. In: **Handbook of Spinal Cord Injuries**. New York: Nova Science Publishers, 681 – 691, 2010.

ANDERSON, N. G., MALLER, J. L., TONKS, N. K., STURGILL, T.W. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. **Nature**, 343: 651–653, 1990.

ARISHIMA, Y., SETOGUCHI, T., YAMAURA, I., YONE, K., KOMIYA, S. Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats. **Spine**, 1;31(21):2432-8, 2006.

ASIA, American Spinal Injury Association. In <http://www.asia-spinalinjury.org/> Acesso em 28 de novembro 2010.

BARRIÈRE, G., LEBLOND, H., PROVENCHER, J., ROSSIGNOL, S. Prominent role of the spinal central pattern generator in the recovery of locomotion after partial spinal cord injuries. **J Neurosci.**, 9;28(15):3976-87, 2008.

BARNAT, M., ENSLEN, H., PROPST, F., DAVIS, R.J., SOARES, S., NOTHIAS, F. Distinct roles of c-Jun N-terminal kinase isoforms in neurite initiation and elongation during axonal regeneration. **J Neurosci.**, 9;30(23):7804-16, 2010.

BASSO, D.M., BEATTIE M.S., BRESNAHAN J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J Neurotrauma**, 12: 1-21, 1995.

BEAR, M.F., CONNORS, B.W., PARADISO, M.A. **Neurociências: Desvendando o sistema nervoso**. Tradução: Dalmaz,

C., Gonçalves, C.A.S., Göttfried, C., Zancan, D., Quillfeldt, J.A., Elena, M.A., Rosat, R.M., Souza, T.M. 3^a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BENNETT, B.L., SASAKI, D.T., MURRAY, B.W., O'LEARY, E.C., SAKATA, S.T., XU, W., LEISTEN, J.C., MOTIWALA, A., PIERCE, S., SATOH, Y., BHAGWAT, S.S., MANNING, A.M., ANDERSON, D.W., SP600125, an anthranyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 98: 13681–13686, 2001.

BERIL GOK, H., SOLAROGLU, I., OKUTAN, O., CIMEN, B., KAPTANOGLU, E., PALAOGU, S. Metoprolol treatment decreases tissue myeloperoxidase activity after spinal cord injury in rats. **J Clin Neurosci.**, 14(2):138-42, 2007.

BHAT, N.R., ZHANG, P., LEE, J.C., HOGAN, E.L. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. **J Neurosci.**, 18: 1633–1641, 1998.

BOGOYEVITCH, M.A. Therapeutic promise of JNK ATP-noncompetitive inhibitors. **Trends Mol Med.**, 11(5):232-9, 2005.

BOGOYEVITCH MA, KOBE B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. **Microbiol Mol Biol Rev.**, 70(4):1061-95, 2006.

BOGOYEVITCH, M.A., ARTHUR, P.G. Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JunK no more? **Biochim Biophys Acta**, 1784(1):76-93, 2008.

BOGOYEVITCH, M.A., NGOEI, K.R., ZHAO, T.T., YEAP, Y.Y., NG, D.C. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. **Biochim Biophys Acta.**, 1804(3):463-75, 2010.

BOULTON, T.G., YANCOPOULOS, G.D., GREGORY, J.S., SLAUGHTER, C., MOOMAW, C., HSU, J., COBB, M.H. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control, **Science**, 249:64–67, 1990.

BOULTON, T.G., NYE, S.H., ROBBINS, D.J., IP, N.Y., RADZLEJEWSKA, E., MORGENBESSER, S.D., DEPINHO, R.A., PANAYOTATOS, N., COBB, M.H., YANCOPOULOS, G.D. ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. **Cell**, 65:663–675, 1991.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 74:3805-3809, 1976.

BRADBURY, E.J., MCMAHON, S.B. Spinal cord repair strategies: why do they work? **Nat Rev Neurosci.**, 7(8):644-53, 2006.

BREWSTER, J.L., VALOIR, T., DWYER, N.D., WINTER, E., GUSTIN, M.C. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. **Science**, 259:1760-1763, 1993.

BRECHT, S., KIRCHHOF, R., CHROMIK, A., WILLESEN, M., NICOLAUS, T., RAIVICH, G., WESSIG, J., WAETZIG, V., GOETZ, M., CLAUSSEN, M., PEARSE, D., KUAN, C.Y., VAUDANO, E., BEHRENS, A., WAGNER, E., FLAVELL, R.A., DAVIS, R.J., HERDEGEN, T. Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. **Eur J Neurosci.**, 21(2):363-77, 2005.

BRNJIC, S., OLOFSSON, M.H., HAVELKA, A.M., LINDER, S. Chemical biology suggests a role for calcium signaling in mediating sustained JNK activation during apoptosis. **Mol Biosyst.**, 10:6(5):767-74, 2010.

CAMPOS, M. M., DE SOUZA, G. E., RICCI, N. D., PESQUERO, J.L., TEIXEIRA, M.M., CALIXTO, J.B. The role of migrating leukocytes in IL-1 beta-induced up-regulation of kinin B(1) receptors in rats. **Br. J. Pharmacol.**, 135: 1107-1114, 2002.

CARLSON, S.L., PARRISH, M.E., SPRINGER, J.E., DOTY, K., DOSSETT, L. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. **Exp. Neurol.**, 151(1): 77-88, 1998.

CARLSON, N.G., ROJAS, M.A., REDD, J.W., TANG, P., WOOD, B., HILL, K.E., ROSE, J.W. Cyclooxygenase-2 expression in oligodendrocytes increases sensitivity to excitotoxic death. **J Neuroinflammation**, 7(25), 2010.

CASACCIA-BONNEFIL, P. Cell death in the oligodendrocyte lineage: A molecular perspective of life/death decisions in development and disease. **Glia**, 29:124-135, 2000.

CASHA, S., YU, W.R., FEHLINGS, M.G. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. **Neuroscience**, 103: 203-218, 2001.

CHICO, L.K., VAN ELDIK, L.J., WATTERSON, D.M. Targeting protein kinases in central nervous system disorders. **Nat Rev Drug Discov.**, 8(11):892-909, 2009.

COOPER, J. A., T. HUNTER. Identification and characterization of cellular targets for tyrosine protein kinases. **J. Biol. Chem.** 258: 1108-1115, 1983.

COOK, R., WU, C.C., KANG, Y.J., HAN, J. The role of the p38 pathway in adaptive immunity. **Cell Mol Immunol.**, 4(4):253-9, 2007.

DÉRIJARD, B., HIBI, M., WU, I-H., BARRETT, T., SU, B., DENG, T., KARIN, M., DAVIS, R.J. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. **Cell**, 76:1025–1037, 1994.

DIETZ, V. Behavior of spinal neurons deprived of supraspinal input. **Nat Rev Neurol.**, 6(3):167-74, 2010.

DONNELLY D., POPOVICH P.G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. **Exp Neurol.**, 209(2): 378 – 388, 2008.

DONG, C., DAVIS, R.J., FLAVELL, R.A. MAP kinases in the immune response. **Annu Rev Immunol.**, 20:55-72, 2002.

DUDLEY, D.T., PANG, L., DECKER, S.J., BRIDGES, A.J., SALTIEL, A.R. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. **Proc Natl Acad Sci**, 15;92(17):7686-9, 1995.

DUMONT, R.J., OKONKWO, D.O., VERMA, S., HURLBERT, R.J., BOULOS, P.T., ELLEGALA, D.B., DUMONT, A.S. Acute spinal cord injury, Part I: Pathophysiologic mechanisms. **Clin Neuropharmacol.**, 24(5): 254 – 256, 2001.

ENSLEN, H., BRANCHO, D.M., DAVIS, R.J. Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. **EMBO Journal**, 15;19(6):1301-11, 2000.

FAN, J., XU, G., NAGEL, D.J., HUA, Z., ZHANG, N., YIN, G. A model of ischemia and reperfusion increases JNK activity, inhibits the association of BAD and 14-3-3, and induces apoptosis of rabbit spinal neurocytes. **Neurosci Lett.**, 12;473(3):196-201, 2010.

FANTZ, D.A., JACOBS, D., GLOSSIP, D., KORNFELD, K. Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal regulated kinase to phosphorylate specific residues. **J Biol Chem.**, 276(29): 27256–27265, 2001.

FAULKNER, J.R., HERRMANN, J.E., WOO, M.J., TANSEY, K.E., DOAN, N.B., SOFRONIEW, M.V. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. **J Neurosci.**, 3;24(9):2143-55, 2004.

FAVATA, M.F., HORIUCHI, K.Y., MANOS, E.J., DAULERIO, A.J., STRADLEY, D.A., FEESER, W.S., VAN DYK, D.E., PITTS, W.J., EARL, R.A., HOBBS, F., COPELAND, R.A., MAGOLDA, R.L., SCHERLE, P.A., TRZASKOS, J.M. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. **J Biol Chem.**, 17;273(29):18623-32, 1998.

FITCH, M.T., SILVER, J. Glial cells, inflammation, and CNS trauma. Modulation of the inflammatory environment after injury can lead to long-distance regeneration beyond the glial scar. In: Kordower, J.H., Tuszynski, M.H. **CNS Regeneration**. Basic Science and Clinical Advances, 2^o ed., Academic Press, London, 60 – 82, 2008.

FLEMING J.C., NORENBERG, M.D., RAMSAY, D.A., DEKABAN, G.A., MARCILLO, A.E., SAENZ, A.D., PASQUALE-STYLES, M., DIETRICH, W.D., WEAVER, L.C. The cellular inflammatory response in human spinal cord after injury. **Brain**, 129: 3249 – 3269, 2006.

GAO, Y.J., JI, R.R. Activation of JNK pathway in persistent pain. **Neurosci Lett.**, 437: 180–183, 2008.

GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol.**, 119(3):493-501, 1992.

GERZANICH, V., WOO, S.K., VENNEKENS, R., TSYMBALYUK, O., IVANOVA, S., IVANOV, A., GENG, Z., CHEN, Z., NILIUS, B., FLOCKERZI, V., FREICHEL, M., SIMARD, J.M. *De novo* expression of Trpm4 initiates secondary hemorrhage in spinal cord injury. **Nat Med**, 15(2): 185 – 191, 2009.

GENOVESE T., ESPOSITO E., MAZZON E., MUIA C., DI PAOLA R., MEL, R., BRAMANTI P., CUZZOCREA S. Evidence for the Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways in the Development of Spinal Cord Injury. **J. Pharm. Exp. Ther.**, 325:100–114, 2008.

GENOVESE T, MELANI A, ESPOSITO E, MAZZON E, DI PAOLA R, BRAMANTI P, PEDATA F, CUZZOCREA S. The selective adenosine A2A receptor agonist CGS 21680 reduces JNK MAPK activation in oligodendrocytes in injured spinal cord. **Shock**, 32(6):578-85, 2009.

GISZTER, S. F. Spinal cord injury: present and future therapeutic devices and prostheses. **Neurotherapeutics**, 5: 147-62, 2008.

GUAN, Q.H., PEI, D.S., LIU, X.M., WANG, X.T., XU, T.L., ZHANG, G.Y. Neuroprotection against ischemic brain injury by SP600125 via suppressing the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. **Brain Res.**, 30;1092(1):36-462, 2006.

GUICCIARDI. M.E., GORES, G.J. Life and death by death receptors. **The FASEB Journal**, 23: 1625 – 1637, 2009.

GUTH, L., ZHANG, Z., STEWARD, O. The unique histopathological responses of the injured spinal cord. Implications for neuroprotective therapy. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 890: 366 – 384, 1999.

GUYTON, A.C., HALL, J.E. Funções motoras da medula espinhal; os reflexos espinhais. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAN, J., LEE, J-D., BIBBS, L., ULEVITCH, R.J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**, 265:808–811, 1994.

HAUSMANN O.N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. **Spinal Cord**, 41: 369–378, 2003.

HAWRYLUK G.W., ROWLAN J., KWON B.K., FEHLING M.G. Protection and repair of the injured spinal cord: a review of completed, ongoing, and planned clinical trials for acute spinal cord injury. **Neurosurg Focus**, 25: 1-16, 2008.

HORIUCHI, H., OGATA, T., MORINO, T., CHUAI, M., YAMAMOTO, H. Continuous intrathecal infusion of SB203580, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, reduces the damage of hind-limb function after thoracic spinal cord injury in rat. **Neurosci Res.**, 47(2):209-17, 2003.

HERDEGEN, T., SKENE, P., BÄHR, M. The c-Jun transcription factor--bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. **Trends Neurosci.**, 20(5):227-31, 1997.

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

JOSHI M, FEHLINGS M.G. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology. **J Neurotrauma**, 19(2): 175-190, 2002a.

JOSHI M, FEHLINGS M.G. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 2: Quantitative neuroanatomical assessment and analysis of the relationships between axonal tracts, residual tissue and locomotor recovery. **J Neurotrauma**, 19(2): 191-203, 2002b.

JONES, L.L., MARGOLIS, R.U., TUSZYNSKI M.H. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. **Exp. Neurology**, 182(2): 399 – 411, 2003a.

JONES, L.L., SAJED, D., TUSZYNSKI M.H. Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: A balance of permissiveness and inhibition. **J Neurosci.**, 23(28): 9276 – 9288, 2003b.

JOHNSON, G.L., LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, 298: 1911-2, 2002.

KESHET, Y, SEGER, R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. **Methods Mol Biol.** 661:3-38, 2010.

KEYSE, S. M. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. **Curr. Opin. Cell Biol.** (12): 186–192, 2000.

KOOPMANS, G.C., DEUMENS, R., BUSS, A., GEOGHEGAN, L., MYINT, A.M., HONIG, W.H., KERN, N., JOOSTEN, E.A., NOTH, J., BROOK, G.A. Acute rolipram/thalidomide treatment improves tissue sparing and locomotion after experimental spinal cord injury. **Exp Neurol.**, 216: 490–498, 2009.

KRISHNA M., NARANG H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cell. Mol. Life Sci.**, 65, 3525 – 3544, 2008.

KYRIAKIS, J.M., BANERJEE, P., NIKOLAKAKI, E., DAI, T., RUBIE, E.A., AHMAD, M.F., AVRUCH, J., WOODGETT, J.R. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. **Nature**, 369:156–160, 1994.

KYRIAKIS, J.M., AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol. Rev.**, 81(2): 807-69, 2001.

LI X, SAHBAIE P, ZHENG M, RITCHIE J, PELTZ G, MOGIL JS, CLARK JD. Expression genetics identifies spinal mechanisms supporting formalin late phase behaviors. **Mol Pain**, 11;6:11, 2010.

LIM, P.A., TOW, A.M. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. **Ann Acad Med Singapore**, 36(1):49-57, 2007.

LIVERMAN, C.T., ALTEVOGT, B.M., JOY, J.E., JOHNSON, R.T. Tools for assessing spinal cord injury and repair. In: **Spinal Cord Injury: Progress, Promise, and Priorities**. 1^a ed., The National Academies Press, Washington D.C., 64 – 94, 2005.

LIU, X.Z., XU, X.M., HU, R., DU, C., ZHANG, S.X., MCDONALD, J.W., DONG, H.X., WU, Y.J., FAN, G.S., JACQUIN, M.F., HSU, C.Y., CHOI, D.W. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. **J Neurosci.**, 17(14):5395–5406, 1997.

LIU, J., LIN, A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. **Cell Res.**, 15(1):36-42, 2005.

LUNDY-EKMAN, L. **Neurociências: fundamentos para reabilitação**. Tradução: Mundim, F.D.; Oliveira, N.G.; Santos, R.R.; Robaina, T.F.; Varga, V.R.S. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

MARTINI, F. The nervous system: The spinal cord and spinal nerves. In: **Fundamentals of anatomy and physiology**. 2^a ed. Prentice Hall, 1992.

MARONEY, A.C., GLICKSMAN, M.A., BASMA, A.N., WALTON, K.M., KNIGHT, E. JR., MURPHY, C.A., BARTLETT, B.A., FINN, J.P., ANGELES, T., MATSUDA, Y., NEFF, N.T., DIONNE, C.A. Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway. **J Neurosci.**, 1;18(1):104-11, 1998.

MEYER F., VIALLE L., VIALLE E., BLEGGI-TORRES L., RASERA E., LEONEL I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, 18: 203-207, 2003.

MURPHY, L. O., BLENIS, J. MAPK signal specificity: The right place at the right time. **Trends Biochem. Sci.** (31): 268–275, 2006.

MYER, D.J., GURKOFF, G.G., LEE, S.M., HOVDA, D.A., SOFRONIEW, M.V. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. **Brain**, 129(Pt 10):2761-72, 2006.

NAKAHARA, S., YONE, K., SAKOU, T., WADA, S., NAGAMINE, T., NIYAMA, T., ICHIJO, H. Induction of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) after spinal cord injury in rats: possible involvement of ASK1-JNK and -p38 pathways in neuronal apoptosis. **J Neuropathol Exp Neurol.**, 58(5):442-50, 1999.

NAKAMURA M, NAKAKIMURA K, MATSUMOTO M, SAKABE T. Rapid tolerance to focal cerebral ischemia in rats is attenuated by adenosine A1 receptor antagonist. **J Cereb Blood Flow Metab.**, 22(2):161-70, 2002.

NEARY, J.T., KANG, Y., WILLOUGHBY, K.A., ELLIS, E.F. Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. **J Neurosci.**, 15;23(6):2348-56, 2003.

NEARY, J.T. Protein kinase signaling cascades in CNS trauma. **IUBMB Life**, 57(11): 711-8, 2005.

NORENBERG, M.D., SMITH, J., MARCILLO, A. The pathology of human spinal cord injury: Defining the problems. **J Neurotrauma**, 21(4): 429 – 440, 2004.

NSCISC, National Spinal Cord International Statistical Center. Annual report for the spinal cord injury model system. In <http://www.nscisc.uab.edu>. Acesso em 28 de novembro 2010.

OBATA K, YAMANAKA H, KOBAYASHI K, DAI Y, MIZUSHIMA T, KATSURA H, FUKUOKA T, TOKUNAGA A, NOGUCHI K. Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. **J Neurosci.**, 10;24(45):10211-22, 2004.

OHNISHI, M., KATSUKI, H., FUJIMOTO, S., TAKAGI, M., KUME, T., AKAIKE, A. Involvement of thrombin and mitogen-activated protein kinase pathways in hemorrhagic brain injury. **Exp Neurol.**, 206(1):43-52, 2007.

PAN, J.Z., NI, L., SODHI, A., AGUANNO, A., YOUNG, W., HART, R.P. Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokine mRNAs in spinal cord following contusion. **J Neurosci Res.**, 68(3):315-22, 2002.

PEARSON, G., ROBINSON, F., GIBSON, T.B., XU, B., KARANDIKAR, M., BERMAN, K., COBB, M. H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Rev.**, 22(2): 153–183, 2001.

POPOVICH, P.G., LONGBRAKE, E.E. Can the immune system be harnessed to repair the CNS? **Nat Rev Neurosci.**,9(6):481-93, 2008.

PROFYRIS, C., CHEEMA, S. S., ZANG, D. W., AZARI, M. F., BOYLE, K., PETRATOS, S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. **Neurobiol. Dis.** 15: 415–436, 2004.

QIAO, F., ATKINSON, C., SONG, H., PANNU, R., SINGH, I., TOMLINSON, S. Complement plays an important role in spinal cord injury and represents a therapeutic target for improving recovery following trauma. **Am J Pathol.**,169(3):1039-47, 2006.

RAY, L.B., STURGILL, T.W. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 85: 3753-3757, 1988.

REGAN, R.F., GUO, Y. Toxic effect of hemoglobin on spinal cord neurons in culture. **J Neurotrauma**, 15(8): 645 – 653, 1998.

REPICI, M., CENTENO, C., TOMASI, S., FORLONI, G., BONNY, C., VERCELLI, A., BORSELLO, T. Time-course of c-Jun N-terminal kinase activation after cerebral ischemia and effect of D-JNKII on c-Jun and caspase-3 activation. **Neuroscience**, 30;150(1):40-9, 2007.

REPICI, M., MARE, L., COLOMBO, A., PLOIA, C., SCLIP, A., BONNY, C., NICOD, P., SALMONA, M., BORSELLO, T. c-Jun N-terminal kinase binding domain-dependent phosphorylation of mitogen-activated protein kinase kinase 4 and mitogen-activated protein kinase kinase 7 and balancing cross-talk between c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways in cortical neurons. **Neuroscience**, 3;159(1):94-103, 2009.

RIVLIN, A.S., TATOR, C.H. Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. **J Neurosurg.**, 49(6):844-53, 1978.

ROSSIGNOL, S., SCHWAB, M., SCHWARTZ, M., FEHLINGS, M.G. Spinal cord injury: time to move? **J Neurosci.**, 27(44):11782–11792, 2007.

ROSSIGNOL S, BARRIÈRE G, FRIGON A, BARTHÉLEMY D, BOUYER L, PROVENCHER J, LEBLOND H, BERNARD G. Plasticity of locomotor sensorimotor interactions after peripheral and/or spinal lesions. **Brain Res Rev.**, 57(1):228-40, 2008.

ROSSIGNOL S, BARRIÈRE G, ALLUIN O, FRIGON A. Re-expression of locomotor function after partial spinal cord injury. **Physiology**, 24:127-39, 2009.

ROSSOMANDO, A.J., PAYNE, D.M., WEBER, M.J., STURGILL, T.W. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 86: 6940-6943, 1989.

ROUX, P.P., BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiol Mol Biol Rev.**, 68(2): 320–344, 2004.

RUBINFELD, H., SEGER, R. The ERK cascade: A prototype of MAPK signaling. **Mol Biotechnol.**, 31(2): 151-174, 2005.

SANTOS-BENITO, F. F., MUNOZ-QUILES, C., RAMON-CUETO, A. Long-term care of paraplegic laboratory mammals. **J Neurotrauma**, 23: 521-36, 2006.

SAMADIKUCHAKSARAEI, A. An overview of tissue engineering approaches for management of spinal cord injuries. **J. Neuroengineer. Rehab.**, 4: 1 – 16, 2007.

SCHEID, M.P., SCHUBERT, K.M., DURONIO, V. Regulation of BAD phosphorylation and association with Bcl-xL by the MAPK/Erk kinase. **J. Biol. Chem.**, 274 : 31108–31113, 1999.

SCHNEIDER T., ISSEKUTZ, A. C. Quantitation of eosinophil and neutrophils infiltration into rat lung by specific assays for eosinophil peroxidase and mieloperoxidase. **J. Immunol. Methods**, 198: 1-14, 1996.

SCHWEIGREITER, R., BANDTLOW, C.E. Nogo in the Injured Spinal Cord. **J Neurotrauma**, 23: 384–396, 2006.

SEBOLT-LEOPOLD, J.S., DUDLEY, D.T., HERRERA, R., VAN BECELAERE, K., WILAND, A., GOWAN, R.C., TECLE, H., BARRETT, S.D., BRIDGES, A., PRZYBRANOWSKI, S., LEOPOLD, W.R., SALTIEL, A.R. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. **Nat Med.**, 5(7):810-6, 1999.

SILVER, J., MILLER, J.H. Regeneration beyond the glial scar. **Nat Rev Neurosci.**, 5(2):146-56, 2004.

SOUZA D. G., COUTINHO S. F., SILVEIRA M. R., CARA, D.C., TEIXEIRA, M.M. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 403: 121-128, 2000.

STIRLING, D.P., LIU, J., PLUNET, W., STEEVES, J.D., TETZLAFF, W. SB203580, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, fails to improve functional outcome following a moderate spinal cord injury in rat. **Neuroscience**, 31;155(1):128-37, 2008.

STREIT, W.J., SEMPLE-ROWLAND, S.L., HURLEY, S.D., MILLER, R.C., POPOVICH, P.G., STOKES, B.T. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. **Exp Neurol.**, 152(1):74-87, 1998.

TAOKA, Y., OKAJIMA, K., UCHIBA, M., MURAKAMI, K., KUSHIMOTO, S., JOHNO, M., NARUO, M., OKABE, H., TAKATSUKI, K. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. **Neuroscience**, 79(4):1177-82, 1997.

TAYLOR, R.C., CULLEN, S.P., MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 9(3):231-41, 2008.

THEODOSIOU, A., ASHWORTH, A. MAP kinase phosphatases. **Genome Biol.**, 3 (7): 1 – 10, 2002.

THOMAS, G.M., HUGANIR, R.L. MAPK cascade signaling and synaptic plasticity. **Nat Rev Neurosci.**, 5: 173 – 183, 2004.

THURET, S., MOON, L.D., GAGE, F.H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. **Nat Rev Neurosci.**, 7(8): 628-43, 2006.

TODA, T., SHIMANUKI, M., YANAGIDA, M. Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases, **Genes Dev.**, 5:60–73, 1991.

VANICKÝ, I., URDŽÍKOVÁ, L., SAGANOVÁ, K., CÍZKOVÁ, D., GÁLIK, J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. **J Neurotrauma**, 18: 1399-1407, 2001.

VENTURA, J.J., HÜBNER, A., ZHANG, C., FLAVELL, R.A., SHOKAT, K.M., DAVIS, R.J. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. **Mol Cell.**, 3;21(5):701-10, 2006.

WANG KC, KOPRIVICA V, KIM JA, SIVASANKARAN R, GUO Y, NEVE RL, HE Z. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. **Nature**, 27;417(6892):941-4, 2002.

WANG, M.J., JENG, K.C., KUO, J.S., CHEN, H.L., HUANG, H.Y., CHEN, W.F., LIN, S.Z. c-Jun N-terminal kinase and, to a lesser extent, p38 mitogen-activated protein kinase regulate inducible nitric oxide synthase expression in hyaluronan fragments- stimulated BV-2 microglia. **J Neuroimmunol.**, 146: 50–62, 2004.

WIDMANN, C., GIBSON, S., JARPE, M.B., JOHNSON, G.L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol Rev.**, 79(1): 143 – 180, 1999.

XIE, Z., SMITH, C.J., VAN ELDIK, L.J. Activated glia induce neuron death via MAP kinase signaling pathways involving JNK and p38. **Glia**, 45:170–179, 2004.

XIA, Z., DICKENS, M., RAINGEAUD, J., DAVIS, R. J., AND GREENBERG, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science**, 270, 1326–1331, 1995.

XU Z., WANG B.R., WANG X., KUANG F., DUAN X.L., JIAO X.Y., JU, G ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase mediate iNOS-induced spinal neuron degeneration after acute traumatic spinal cord injury. **Life Sci.**, 79: 1895–1905, 2006.

YESTE-VELASCO, M., FOLCH, J., CASADESÚS, G., SMITH, M.A., PALLÀS, M., CAMINS, A. Neuroprotection by c-Jun

NH2-terminal kinase inhibitor SP600125 against potassium deprivation-induced apoptosis involves the Akt pathway and inhibition of cell cycle reentry. **Neuroscience**, 31;159(3):1135-47, 2009.

YIN, K.J., KIM, G.M., LEE, J.M., HE, Y.Y., XU, J., HSU, C.Y. JNK activation contributes to DP5 induction and apoptosis following traumatic spinal cord injury. **Neurobiol Dis.**, 20(3):881-9, 2005.

YU C.G., YEZIERSKI R.P., JOSHI A., RAZA K., LI Y., GEDDES J.W. Involvement of ERK2 in traumatic spinal cord injury. **J Neurochem.**, 113(1): 131-42, 2010.

ZHANG, N., WU, B., POWELL, D., WISSNER, A., FLOYD, M.B., KOVACS, E.D., TORAL-BARZA, L., KOHLER, C. Synthesis and structure-activity relationships of 3-cyano-4-(phenoxyanilino)quinolines as MEK (MAPKK) inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett.**, 18;10(24):2825-8, 2000.

8 ANEXOS

Escala BBB de avaliação locomotora (BASSO et al., 1995).

Movimento do Membro Posterior						Posição do Tronco		Abdome	Movimento da Pata Dianteira				Pisada		C o o r d e n a ç ã o	Liberação dos Dedos		Posição Predominante da Pata				I n d u s t r i a b i l i d a d e	Cauda			
Quadril		Joelho		Tornozelo		Lado	Apoio		Balanço	Apoio da Pata		Dorsal		Plantar		E	D	Contato Inicial		Elevação						
E	D	E	D	E	D					Sem Suporte de Peso	Com Suporte de Peso	E	D	E				D	E	D	E			D	E	D
0	0	0	0	0	0	E	D	Arrastando	E	D	E	D	E	D	0	0	0	0	0	0*	0*	I	I	I	I	Para Cima (elevada)
S	S	S	S	S	S	Central	E								D	Paralelo	E	D	E	D	O	O	O	O	O	
E	E	E	E	E	E			Alto	E	D	F	F	F	F							F	F**	F**	C	C	C

Rato: _____ Data / / 200 _____ Dias Pós-Operatório _____ Pontuação Esquerdo: _____ Direito _____

Movimento		+	Pisada Dorsal > 4 passos da pata posterior	0	Nunca (0%)	I	Rotação Interna
0	Nenhum	*	Liberação < 50%	O	Ocasional (< 50%)	E	Rotação Externa
S	Suave (discreto)	**	Dedos Arrastando > 4 passos da pata posterior	F	Frequente (51-94%)	P	Paralelo
E	Extenso			C	Consistente (95-100%)		

Pontuação	Definições operacionais de categorias e atributos
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.
1	Movimento discreto (<50% da amplitude) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou joelho.
2	Movimento extenso (>50% da amplitude) de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreto de uma outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior.
8	Pedalada (movimento rítmico do membro posterior) sem suporte de peso <u>ou</u> apoio plantar da pata sem suporte de peso.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) ou passada dorsal ocasional (0 – 50% do tempo), freqüente (50 – 94% do tempo) ou consistente (95 – 100% do tempo) com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
11	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.

12	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
13	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação freqüente dos membros anterior e posterior.
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície bem como antes de liberar os dedos no final da fase de apoio <u>ou</u> passada plantar freqüente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre freqüentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre freqüentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e da liberação dos dedos.
18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.
20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, a cauda consistentemente elevada.

DEFINIÇÕES

Discreta	Movimento parcial da articulação, inferior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Extensa	Movimento parcial da articulação, superior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Pedalada	Movimento rítmico do membro posterior no qual suas três articulações estão estendidas, em seguida completamente flexionadas e novamente estendidas, o animal geralmente inclina-se lateralmente, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, nenhum suporte de peso corpóreo é evidente por toda a pata posterior.
Sem suporte de peso	Nenhuma contração dos músculos extensores do membro posterior durante pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Com suporte de peso	Contração dos músculos extensores do membro posterior durante a pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Passada plantar	A pata está em contato plantar com suporte de peso, em seguida ocorre o movimento do membro para frente até ser restabelecido o contato plantar com suporte de peso.
Passada dorsal	O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo do passo.
Coordenação dos membros anterior e posterior	Para todo o passo do membro anterior ocorre um passo do membro posterior e os membros posteriores se alternam.
Ocasional	Menos do que ou igual à metade das vezes, < ou igual a 50%.
Frequente	Mais do que a metade, mas não sempre, 51 – 94%.
Consistente	Quase sempre ou sempre, 95 – 100%.
Instabilidade do tronco	Lateralização do peso que causa oscilação de um lado a outro ou colapso parcial do tronco.
