UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FÁBIO ROGÉRIO

AÇÃO DA MELATONINA SOBRE A MORTE NEURONAL INDUZIDA PELA SECÇÃO DO NERVO CIÁTICO EM RATOS NEONATOS

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. FRANCESCO LANGONE

2006

UNIDAO NEI CHAI	E ABC	mp
	R63	2
V	EX	
TOMBO	BCI 700-	20
PROC.	16.123.	06
C		1
PREÇO	400	
DATA	3:9.0	0

BUB 1D: 386448

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

R63a	Rogério, Fábio Ação da melatonina sobre a morte neuronal induzida pela secção do nervo ciático em ratos neonatos / Fábio Rogério Campinas, SP: [s.n.], 2006.
	Orientador: Francesco Langone. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Ratos neonatos. Melatonina. Neurônios motores. Nervo ciático. Apoptose. Langone, Francesco. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Título.

Título em inglês: Action of melatonin on neuronal death induced by sciatic nerve transection in neonatal rats.

Palavras-chave em inglês: Neonatal rats; Melatonin; Motor neurons; Sciatic nerve; Apoptosis.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Francesco Langone, Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Roger Frigério Castilho, Luiz Roberto Giorgetti de Britto, Carol Fuzeti Elias. Data da defesa: 21/07/2006.

Data da Defesa: 21 / 07 / 06

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Francesco Langone (Orientador)

Profa. Dra. Ana Maria Blanco Martinez

Profa. Dra. Carol Fuzeti Elias

Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto

Prof. Dr. Roger Frigério Castilho

Profa. Dra. Anna Maria Fernandes

Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Assinatura

Assinatura

Asinatura

1-11-Assinatura

Koya F Los Glis Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Osmar e Isabel, a constante presença e o irrestrito apoio em todas as etapas da minha vida e, especialmente, ao longo da minha formação acadêmica.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Francesco Langone, pela amizade e dedicação durante os anos em que trabalhamos juntos, não só neste projeto, mas também em minha Iniciação Científica, a qual serviu de base para o presente trabalho. Agradeço especialmente a constante confiança em mim depositada para conduzir o andamento dos estudos e as abordagens para investigação, o que contribui de forma inestimável para minha formação como pesquisador.

Agradeço à Dra. Simone Aparecida Teixeira pela boa vontade e a paciência com que me ensinou as técnicas de imunoistoquímica e de dosagem de atividade enzimática. Agradeço particularmente a inabalável disposição com que sempre participou deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz pela gentileza com que sempre analisou os textos iniciais dos artigos científicos originados deste estudo. Principalmente, agradeço o valioso auxílio na versão dos textos para a língua inglesa.

Agradeço ao Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira por disponibilizar o espaço e a infra-estrutura do Laboratório de Genômica e Expressão do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP para realização das reações de RT-PCR.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará por disponibilizar as instalações e equipamentos do Laboratório de Farmacologia Bioquímica dos Radicais Livres do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP para os experimentos de dosagem de atividade enzimática.

Agradeço ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares pelo fundamental auxílio na análise estatística dos resultados deste estudo.

V

Agradeço à Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, à Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos e à Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes pelas valiosas sugestões no meu exame de qualificação.

Agradeço à Profa. Dra. Ana Maria Blanco Martinez, à Profa. Dra. Carol Fuzeti Elias, ao Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto e ao Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, pelos preciosos comentários e pertinentes sugestões durante a defesa desta Tese.

Agradeço ao Alexandre César Santos de Rezende, ao André Schwambach Vieira, ao César Renato Sartori, à Cristiane Lucia de la Hoz, à Débora Vieira, à Fernanda Campos Pelágio, à Fernanda Hussein, ao Gustavo Facchini e ao Rafael Cofiño de Sá, amigos do Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela sincera amizade e agradável convivência. Agradeço especialmente ao Alexandre e ao André pela pronta e fundamental colaboração em diversos experimentos.

Agradeço ao Hamilton Jordão Júnior e à Carla Cristina Judice Maria, amigos do Laboratório de Genômica e Expressão do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP, por terem me ensinado e auxiliado durante a técnica de RT-PCR.

Agradeço à Sra. Léa de Magalhães do Laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pelo apoio técnico no início deste trabalho.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo auxílio nas tarefas burocráticas e pela boa convivência.

Agradecimentos Institucionais

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pelo fundamental auxílio durante minha formação acadêmica. Especificamente, sou grato pela concessão das bolsas de Iniciação Científica (99/11345-0) e de Doutorado Direto (03/03717-1), bem como do Auxílio à Pesquisa (01/06991-1), essenciais para o início e desenvolvimento deste estudo no Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Agradeço ao Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da UNICAMP – FAEP/UNICAMP – pelo importante auxílio (582/01) no presente trabalho.

<u>ÍNDICE</u>

Resumo	ix
Abstract	X
Abreviaturas	xi
Introdução	1
Objetivos	13
Procedimentos Experimentais	15
Resultados	27
Artigo Científico 1	
Artigo Científico 2	
Artigo Científico 3	59
Discussão Geral e Conclusões	94
Referências Bibliográficas	112

<u>RESUMO</u>

Morte neuronal pode ser induzida em ratos neonatos por axotomia periférica. A privação de fatores tróficos sintetizados por células alvo seria uma importante causa, pois favoreceria a ocorrência de estresse oxidativo. No presente estudo, ratos com dois dias de vida (P2) foram submetidos a secção unilateral do ciático, tratados diariamente com o antioxidante melatonina e sacrificados entre P2 e P7, período em que ocorre maior perda celular. Na intumescência lombar, foram avaliadas a expressão e distribuição tecidual das isoformas 1 e 2 da superóxido dismutase (SOD1 e 2), das isoformas neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) da óxido nítrico sintase (NOS) e da Bax e Bcl-2 (indutora e supressora da morte celular, respectivamente). Também foram investigadas a atividade da NOS e fragmentação de DNA. Cinco dias depois da lesão, a axotomia determinou perda de 55% dos motoneurônios. Após o mesmo período, o tratamento com melatonina garantiu a sobrevivência de 75% dos neurônios acometidos. Um dia depois da axotomia, a expressão da SOD1 foi reduzida em 25% nos ratos lesados. Por outro lado, a administração de melatonina aumentou a síntese desta enzima em 25%. A axotomia elevou a atividade da nNOS e eNOS 1 e 6 horas após a lesão. A melatonina aumentou a atividade da nNOS e eNOS e diminuiu a da iNOS no terceiro dia. Os níveis de mRNA e de células positivas para Bax e a ocorrência de quebra de DNA aumentaram no primeiro dia. Esta última foi reduzida pelo tratamento com melatonina. A axotomia não alterou a expressão e imunomarcação para iNOS e para Bcl-2, nem aumentou a imunorreatividade para Bax em motoneurônios. O efeito neuroprotetor e antioxidante da melatonina no presente modelo experimental suporta sua investigação em alterações neurológicas associadas com estresse oxidativo.

<u>ABSTRACT</u>

Neuronal death may be induced in neonatal rats by peripheral axotomy. Deprivation of trophic factor produced by target cells would play a role, since it would favor oxidative stress. In the present study, rats at an age of two days postnatally (P2) were subjected to unilateral sciatic transection, daily treatment with the antioxidant melatonin and sacrificed at time points ranging from P2 to P7, when the majority of the axotomised cells is lost. Expression and immunohistochemical detection of superoxide dismutase isoforms 1 and 2 (SOD 1 and 2) were investigated in the lumbar enlargement. Neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) isoforms of nitric oxide synthase (NOS) and Bax and Bcl-2 (cell death promoter and suppressor, respectively) were also evaluated. Finally, NOS activity and DNA fragmentation were assessed. Five days after lesion, 55% of the axotomised motoneurons died. Melatonin rescued 75% of the injured motoneurons. On the first day, SOD1 expression was reduced by 25% in axotomised rats, whereas melatonin administration yielded an increase of 25% in such expression. nNOS and eNOS activity rose at 1 and 6 hours after lesion. Melatonin increased nNOS and eNOS activity and reduced iNOS catalytic rate on the third day. Bax mRNA levels, number of Bax-positive cells and DNA fragmentation augmented on the first day. The latter was decreased by melatonin. Axotomy did not alter immunostaining for and expression of iNOS and Bcl-2. In addition, the injury did not induce Bax expression in motoneurons. The neuroprotective and antioxidant effect of melatonin in the present experimental model support the investigation of this neurohormone in neurological diseases associated with oxidative stress.

<u>ABREVIATURAS</u>

- 6-OHDA 6-Hidroxidopamina
- **BDNF** Brain Derived Neurotrophic Factor
- BH₄ Tetrahidrobiopterina
- BSA Albumina Sérica Bovina
- CaM Calmodulina
- cDNA Ácido Desoxirribonucléico complementar
- **CNTF** Ciliary Neurotrophic Factor
- **DEPC** Dietilpirocarbonato
- dpm dosagem por minuto
- EDTA Ethylenediamine Tetraacetic Acid
- EGTA Ethylene Glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N'N'-Tetraacetic Acid
- eNOS Óxido Nítrico Sintase endotelial
- FAD Dinucleotídeo de Flavina e Adenina
- FMN Mononucleotídeo de Flavina
- GAPDH Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
- IDO Índice de Densidade Óptica
- iNOS Óxido Nítrico Sintase induzível
- ISN Índice de Sobrevivência Neuronal
- L-NAME L-Nitro Arginina Metil Ester
- MPTP 1-Metil-4-Feniltetrahidropiridina
- mRNA Ácido Ribonucléico mensageiro
- MSR Motoneuron Survival Ratio

NADPH - forma reduzida do Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

- NMDA N-Metil-D-Aspartato
- nNOS Óxido Nítrico Sintase neuronal
- NOS Óxido Nítrico Sintase
- NT-3 Neurotrophin-3
- **ODR** Optical Density Ratio
- PMSF Phenylmethylsulfonyl Fluoride
- RT-PCR Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
- SOD1 Superóxido Dismutase 1
- **SOD2** Superóxido Dismutase 2
- TBAP Manganese–Tetrakis (4-Benzoyl Acid) Porphyrin
- TUNEL Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling



Nos mamíferos, a morte de motoneurônios ocorre naturalmente durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal. Em roedores, perda de grande parte destes neurônios pode ser induzida pela secção de nervos periféricos durante a primeira semana de vida neonatal (Lowrie e Vrbová, 1992; Rogério et al., 2002). A morte celular, tanto durante a fase embrionária quanto após o nascimento, seria desencadeada principalmente pela interrupção do aporte de moléculas neurotróficas produzidas pelas células alvo aos neurônios lesados (Kashihara et al., 1987; Kuno, 1990; Sendtner et al., 1990; Lowrie e Vrbová, 1992; Sendtner et al., 1992; Yan et al., 1992; Greensmith e Vrbová, 1996), mas os mecanismos não estão esclarecidos.

Nos últimos anos, a morte de motoneurônios submetidos a axotomia tem sido associada à produção de radicais livres, como o óxido nítrico (NO) e seus derivados (Clowry, 1993; Wu e Li, 1993; Wu et al., 1995; Novikov et al., 1995 e 1997; Rossiter, 1996; Yu, 1997; Mariotti et al., 1997; Estévez et al., 1998; Yick et al., 1998). O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Tal enzima catalisa a reação de Larginina, NADPH (forma reduzida do nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e oxigênio, produzindo L-citrulina, NADP⁺ e óxido nítrico (NO). Estruturalmente, a NOS é uma proteína homodimérica que utiliza como cofatores tetrahidrobiopterina (BH₄), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), mononucleotídeo de flavina (FMN), grupo heme e cálcio. Cada monômero é constituído de (1) um domínio catalítico oxigenase que contém um grupo heme e BH₄ e (2) um domínio redutase que contém FMN, FAD e uma seqüência consenso que se liga a calmodulina (CaM). Os elétrons doados pelo NADPH ao domínio redutase são conduzidos através das flavinas (carreadores redox) até o domínio oxigenase. A ocorrência deste fluxo de elétrons depende da ligação do complexo Ca/CaM ao domínio redutase. No domínio oxigenase, os elétrons interagem com a BH4 e com o átomo de ferro do grupo heme, reduzindo-o do estado férrico (Fe^{3+}) ao ferroso (Fe^{2+}) . Como conseqüência ocorre a oxidação da L-arginina. Os produtos desta reação (NO e L-citrulina) são sintetizados na proporção estequiométrica de 1:1 (Nishida et al., 1998; Alderton et al., 2001; Bruckdorfer, 2005).



Representação da estrutura de um monômero da NOS e da reação por ela catalisada (Fe: átomo de ferro do grupo heme; adaptado de Alderton *et al.*, 2001).

Até o presente, três isoformas distintas da NOS foram bem identificadas: neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS). Todas as isoformas têm como cofatores essenciais heme, FMN, FAD, CaM e BH₄ e, como substratos, NADPH e O₂. No entanto, elas se diferenciam quanto à dependência de íons cálcio (Ca²⁺) para que o cofator CaM se ligue à enzima. A ligação da CaM a nNOS e a eNOS é um processo dependente de Ca²⁺ e reversível. Por outro lado, a ligação da CaM a iNOS é essencialmente independente de Ca²⁺ e irreversível. Assim, o nível celular de Ca²⁺ tem papel importante na regulação da função

catalítica das isoformas neuronal e endotelial, enquanto que a atividade da iNOS é regulada principalmente pela taxa de síntese desta proteína, a qual é muito menos sensível a variações na concentração de Ca^{2+} (Nishida e Montellano, 1998; Alderton et al., 2001; Bruckdorfer, 2005).

A molécula de NO, por possuir um elétron desemparelhado em seu orbital externo, pode interagir com diversas moléculas intracelulares, inclusive outros radicais livres como o superóxido (Bredt e Snyder, 1994; Gross e Wolin, 1995; Dawson e Dawson, 1996). O superóxido é produto natural do metabolismo celular, sendo a cadeia respiratória mitocondrial uma importante fonte. Os efeitos lesivos do superóxido são minimizados em condições basais por um sistema enzimático antioxidante intracelular. A superóxido dismutase (SOD) é uma importante enzima deste sistema e catalisa a conversão do superóxido a peróxido de hidrogênio, o qual é transformado em água por ação da catalase e glutationa peroxidase. Três isoformas da SOD são expressas em mamíferos: a SOD citosólica ligada a íons cobre e zinco (SOD1), a SOD presente na matriz mitocondrial e ligada a íons manganês (SOD2) e a SOD extracelular localizada principalmente na matriz extracelular e também ligada a íons cobre e zinco (SOD3). Por sua vez, estímulos danosos também estão associados à síntese de superóxido, em níveis maiores que aqueles do metabolismo em condições fisiológicas (Fridovich, 1997; Johnson e Giulivi, 2005). Nas ocasiões em que há maior produção que eliminação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo), a reação do NO com o superóxido leva à produção de grande quantidade de peroxinitrito. Várias ações deletérias são atribuídas ao peroxinitrito, como peroxidação de lipídeos de membranas, quebra e fragmentação do DNA, inibição da respiração mitocondrial, oxidação de proteínas e indução de apoptose em neurônios

(Dawson et al., 1993; Bonfoco et al., 1995; Gilad et al., 1997; Leist e Nicotera, 1998; Lipton e Nicotera, 1998; Shen et al., 1998).

Diversos autores têm reportado a ocorrência de morte de motoneurônios, tanto in vitro quanto em ratos submetidos a axotomia, em condições de estresse oxidativo. Estévez et al. (1998) observaram aumento da expressão da nNOS em culturas primárias de motoneurônios embrionários de rato quando estas foram privadas de BDNF (do inglês, brain derived neurotrophic factor). Aproximadamente 60% destes neurônios morreram entre 18 e 24 horas após o estabelecimento da cultura. A adição de L-nitro arginina metil ester (L-NAME), um inibidor da nNOS, ou de manganês TBAP (do inglês, manganese-tetrakis (4-benzoyl acid) porphyrin), uma molécula de ação intracelular similar à SOD, impediu a morte dos motoneurônios provocada pela ausência de BDNF. Estes autores propuseram que a privação de fatores neurotróficos levaria a aumento da expressão da nNOS nos motoneurônios cultivados e, possivelmente, à maior produção de peroxinitrito, o qual induziria apoptose.

Clowry (1993), ao empregar a técnica da NADPH-diaforase (reação histoquímica usada para demonstrar a nNOS), evidenciou que a transecção do nervo ciático na porção média da coxa de ratos com um dia de vida (P1), provoca aumento acentuado desta enzima nos neurônios motores do grupamento lateral da intumescência lombar, o que foi correlacionado com degeneração e morte dos mesmos. Wu et al. (1995) verificaram que a degeneração de motoneurônios cervicais, provocada por avulsão de raízes ventrais de ratos P1 e P8, era antecedida pela expressão de nNOS nessas células. Tal expressão foi evidenciada pela técnica da NADPH-diaforase 5, 10 e 15 dias após a lesão. Rossiter et al. (1996) também observaram aumento da reatividade para NADPH-diaforase em neurônios motores no núcleo do facial após a transecção deste nervo em ratos P1. Observações

semelhantes foram feitas por Mariotti et al. (1997), ao estudarem a indução da NOS no núcleo do facial de ratos recém-nascidos (P0) 1, 2 e 4 dias após axotomia.

Em ratos adultos, também há evidências de correlação entre privação de fatores neurotróficos, estresse oxidativo e morte de motoneurônios axotomizados. O papel dos fatores neurotróficos na regulação da nNOS foi evidenciado por Novikov et al (1995). A administração de BDNF a ratos cujas raízes ventrais do segmento medular L5 foram avulsionadas reduziu significativamente a expressão da nNOS, identificada através da técnica da NADPH-diaforase, nos motoneurônios lesados.

Até o presente não constam dados na literatura sobre a expressão das isoformas endotelial e induzível da NOS na medula espinhal ou tronco encefálico de ratos neonatos ou adultos, tanto em condições fisiológicas quanto após axotomia de nervo periférico.

Por sua vez, alterações na expressão e/ou atividade da SOD foram observadas após lesões traumáticas nervosas em ratos. Rosenfeld et al. (1997) relataram aumento da expressão e atividade da SOD2 em motoneurônios da intumescência lombar de ratos adultos após secção do ciático. Yu (2002) verificou que a avulsão do ciático, também de ratos adultos, reduziu a imunorreatividade para SOD1 nos motoneurônios axotomizados. Não há relatos prévios sobre a resposta da SOD no sistema nervoso central de ratos neonatos após axotomia de nervos periféricos.

Apesar das alterações da expressão e/ou atividade enzimática(s) descrita(s) após lesão traumática nervosa em ratos neonatos ou adultos, sabe-se que apenas os neonatos perdem considerável quantidade de motoneurônios quando submetidos a secção do ciático. Em ratos adultos, a morte dos neurônios motores só ocorre quando a axotomia é realizada próxima ao corpo celular, como após avulsão de raízes nervosas. Acredita-se que fatores neurotróficos produzidos pelas células de Schwann do coto proximal do nervo seccionado garantiriam a sobrevivência da maior parte dos neurônios lesados nos animais adultos. No entanto, tal aporte trófico não estaria disponível para os motoneurônios no período neonatal (Lowrie e Vrbová, 1992; Koliatsos et al., 1994).

Em roedores neonatos, a morte neuronal determinada pela secção do nervo ciático e aquela observada normalmente durante o desenvolvimento têm sido descritas como apoptóticas (Lowrie e Lawson, 2000; Oliveira et al., 2002). Apoptose é um processo de morte celular caracterizado morfologicamente por condensação da cromatina, fragmentação do DNA e nuclear, retração citoplasmática e formação de corpos apoptóticos. Diversas moléculas participantes dos eventos intracelulares que levam a apoptose foram identificadas. Especificamente, as proteínas da família da Bcl-2 são importantes reguladoras do processo de morte celular no sistema nervoso central. Dentre tais proteínas, a Bcl-2 tem o reconhecido papel de promover a sobrevivência celular e a Bax exerce principalmente ação pró-apoptótica. Com relação à distribuição intracelular destas moléculas, a Bcl-2 localiza-se principalmente na superfície citoplasmática do envelope nuclear e de diferentes organelas, como mitocôndria e retículo endoplasmático. A Bax, em condições basais, pode ser encontrada no citosol ou na membrana mitocondrial externa. Após estímulos danosos, como a privação de fatores tróficos ou estresse oxidativo, esta proteína é ativada. A Bax citosólica se transloca para a superfície da mitocôndria e, em conjunto com a Bax que se encontrava nesta organela, desencadeiam a liberação de citocromo c para o citosol. O citocromo c liberado liga-se ao fator ativador de protease próapoptótico. Este complexo se associa com formas inativas de caspases, enzimas citosólicas proteolíticas, constituindo o apoptossomo. Tal associação promove a ativação rápida e sequencial de várias caspases. Dentre as consequências destes eventos moleculares que levam ao colapso celular, observa-se a fragmentação internucleossomal do DNA. Por sua vez, a Bcl-2 é capaz de inibir a ação deletéria da Bax pela formação de heterodímeros, os quais impedem a ação da proteína pró-apoptótica na mitocôndria (Adams e Cory, 1998; Castagne et al., 1999; Yuan e Yankner, 2000; Lossi e Merighi, 2003).

Os estudos sobre a expressão de Bax e Bcl-2 em ratos submetidos a lesão nervosa traumática periférica foram realizados principalmente em animais adultos. Após a secção do hipoglosso ou do ciático, verificou-se que a sobrevivência dos neurônios lesados estava associada ao aumento dos níveis de Bcl-2 e à diminuição da expressão da Bax (Gillardon et al., 1996; Baba et al., 1999). Com relação à análise de tais proteínas em ratos neonatos axotomizados, somente a detecção imunoistoquímica da Bax foi relatada até o presente. Tiraihi e Rezaie (2003) reportaram diferentes padrões de imunomarcação para esta molécula em neurônios motores do grupamento ventrolateral da intumescência lombar de ratos cujo nervo ciático foi seccionado na primeira semana de vida pós-natal. Tais padrões seriam representativos de estágios precoces ou tardios do processo de morte celular.

Várias substâncias têm sido testadas para diminuir a ocorrência de morte neuronal devido aos efeitos deletérios de radicais livres em diferentes modelos experimentais. Especificamente, nos últimos anos, foram apresentadas evidências de que a ação citotóxica das espécies reativas de oxigênio no sistema nervoso central pode ser reduzida pela administração de melatonina (para revisão vide Reiter, 1998).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio derivado do aminoácido triptofano e, em mamíferos, sabe-se que sua produção ocorre na glândula pineal, na retina e no trato gastrointestinal. Classicamente, este hormônio é conhecido por sua ação reguladora dos ritmos circadianos do organismo, sincronizando-os com o ciclo externo de dia/noite, e por seu efeito inibitório sobre a maturação gonadal (Fraschini et al., 1995). Apesar de o papel antioxidante da melatonina ser de descoberta recente, considera-se que esta

substância pode exercê-lo de forma direta, ao interagir com radicais livres e inativá-los, ou de forma indireta, ao modular a expressão de moléculas integrantes do sistema antioxidante celular (Reiter et al., 2000; Rodriguez et al., 2004). Acredita-se que a melatonina atue como antioxidante direto através da doação de elétrons a radicais livres. Especificamente, tal mecanismo já foi proposto com relação aos radicais hidroxil e superóxido (Reiter, 1998). Além disso, é possível que tal ação ocorra de maneira irrestrita ao nível intracelular, ou seja, tanto no núcleo quanto no citosol. Esta possibilidade reside no fato de a melatonina ser altamente lipofílica, o que lhe permite se difundir facilmente pelas membranas celulares. Sobre o papel antioxidante indireto do neurohormônio, as vias intracelulares envolvidas são desconhecidas. Mecanismos propostos envolvem a ativação de receptores de membrana que, por intermédio de proteínas G, modulariam a produção de segundos-mensageiros (como AMP cíclico) e/ou ativariam cascatas de fosforilação de proteínas intracelulares. Tais eventos culminariam na ativação ou inibição de fatores de transcrição, regulando a expressão gênica de enzimas antioxidantes (Costa et al., 1995; Finnochiaro e Glikin, 1998).

Em concentrações fisiológicas, a melatonina inibiu a atividade da nNOS em neurônios cerebelares e hipocampais de ratos adultos (Pozo et al., 1994; Bettahi et al., 1996). Diminuição na incidência de infartos cerebrais induzidos pela administração de L-cisteína em camundongos tratados com melatonina foi verificada por Yamamoto e Tang (1996). Segundo Yamamoto (1996), o mecanismo de ação da L-cisteína envolveria superprodução de NO determinando intensa peroxidação de lipídeos. A melatonina protegeu neurônios do hipocampo e do estriado de camundongos e ratos tratados com MPTP (1-metil-4-feniltetrahidropiridina) ou 6-OHDA (6-hidroxidopamina), compostos oxidantes utilizados para a indução da doença de Parkinson em animais (Acuña-Castroviejo et al., 1997; Joo et al., 1998). A melatonina também foi capaz de reduzir as lesões

degenerativas em cérebros de ratos que receberam injeções de ácido caínico (Giusti et al., 1997). Este composto é agonista de um subtipo de receptor ionotrópico de glutamato e é capaz de induzir excitotoxicidade em neurônios em cultura através da geração de radicais livres (Dykens et al., 1987; Puttfarcken et al., 1993). Concentrações fisiológicas de melatonina reduziram os danos causados pelo ácido caínico no sistema límbico de ratos, embora em menor grau que doses farmacológicas (Manev et al., 1997). Okatani et al. (2000) demonstraram aumento de atividade da SOD e da glutationa peroxidase em cérebro de fetos de ratos cujas mães receberam melatonina. Baydas et al. (2005) reportaram que a administração diária de melatonina reduziu os níveis protéicos de Bax e a fragmentação de DNA no hipocampo de ratos adultos que receberam dieta rica em homocisteína. Altas concentrações plasmáticas deste aminoácido são associadas a maior susceptibilidade de neurônios a estímulos deletérios oxidantes. De fato, tais autores observaram que ratos com níveis plasmáticos elevados de homocisteína e que não receberam melatonina apresentaram maior expressão protéica da Bax no hipocampo.

Outros experimentos também evidenciam a ação antioxidante da melatonina em culturas de células nervosas. Adição de melatonina em culturas de células granulosas cerebelares de rato, tratadas previamente com ácido caínico, diminuiu a ocorrência de morte celular (Giusti et al., 1997). O tratamento de neurônios em cultura com melatonina reduziu a ocorrência de apoptose induzida por 6-hidroxidopamina (Mayo et al., 1998). A melatonina protegeu neurônios piramidais do hipocampo em culturas primárias tratadas com Mg^{2+} livre, que parece participar da síntese de radicais livres em níveis tóxicos pela ativação de canais NMDA (N-metil-D-aspartato) (Skaper et al., 1998).

Recentemente, empregando o modelo da secção unilateral do nervo ciático em ratos neonatos (P2), verificamos que o tratamento com melatonina protegeu a população de

10

neurônios motores acometidos pela axotomia nervosa periférica. Especificamente, a administração subcutânea de melatonina nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg reduziu de forma similar e significativa a morte de motoneurônios avaliada cinco dias após a lesão. Por outro lado, a investigação da nNOS por técnica imunoistoquímica não evidenciou diferenças na expressão desta enzima entre os motoneurônios ipsilaterais e contralaterais à axotomia após o mesmo tempo de sobrevida, independentemente da dose empregada. Resultado semelhante de imunomarcação foi observado em animais lesados e que não foram tratados com melatonina (Rogério et al., 2002).

Ao contrário de nossos achados, Chang et al. (2000) verificaram aumento da reatividade para NADPH-diaforase/nNOS em motoneurônios do núcleo do hipoglosso de ratos adultos após secção periférica do nervo, sendo os maiores níveis detectados catorze dias depois da lesão. Além disso, foi observado efeito atenuante e dose-dependente da melatonina (intraperitoneal; 5 e 100 mg/kg) sobre tal reatividade, entre o sétimo e o vigésimo primeiro dias pós-axotomia.

É provável que os mecanismos de morte neuronal envolvidos no modelo experimental que estudamos e naquele investigado por Chang et al. (2000) sejam diferentes. De fato, a maioria dos neurônios motores de ratos neonatos cujo nervo ciático foi seccionado em P2 morre durante a primeira semana após a lesão. Com relação aos motoneurônios do hipoglosso de ratos adultos axotomizados, grande parte das células acometidas sobrevive. Além disso, nestes animais, a perda neuronal é constatada depois de tempos de sobrevida mais longos, em comparação com ratos neonatos (para revisão vide Lowrie e Vrbová, 1992). Estes resultados variáveis poderiam ser atribuídos a diferentes graus de suscetibilidades à privação de fatores neurotróficos ou a características específicas das regiões do sistema nervoso central onde se encontram os corpos celulares dos neurônios

acometidos, ou seja, tronco encefálico (Chang et al., 2000) ou intumescência lombar (Rogério et al., 2002).

Desta forma, pode-se verificar que é necessária maior investigação acerca dos eventos envolvidos na perda de neurônios motores de ratos neonatos submetidos a secção do ciático em P2, apesar de a morte celular secundária a este tipo de lesão ser fenômeno bem conhecido. Assim, o presente estudo tem como objetivo investigar as isoformas da NOS e da SOD, as proteínas reguladoras da morte celular Bax e Bcl-2 e a ocorrência de fragmentação de DNA na intumescência lombar neste modelo experimental, durante a primeira semana pós-lesão. Além disso, será analisado o efeito do tratamento com melatonina sobre tais moléculas e a quebra de DNA com a finalidade de se investigar ações desta substância que possam contribuir com o entendimento do seu papel neuroprotetor.



OBJETIVO GERAL:

Estudar mecanismos moleculares envolvidos na morte de motoneurônios da intumescência lombar de ratos neonatos após axotomia periférica e possível modulação dos mesmos pelo tratamento com melatonina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Quantificar a perda de motoneurônios na intumescência lombar de ratos neonatos submetidos a secção unilateral do nervo ciático em P2, durante a primeira semana póslesão;
- Avaliar efeito protetor do tratamento com melatonina sobre a morte de neurônios motores na intumescência lombar de ratos neonatos submetidos a secção unilateral do ciático em P2, durante a primeira semana pós-lesão;
- Analisar a expressão e distribuição tecidual da SOD1 e SOD2 na intumescência lombar de ratos neonatos após axotomia unilateral do ciático em P2 e administração de melatonina, durante a primeira semana pós-lesão;
- Analisar a expressão e distribuição tecidual da nNOS, eNOS e iNOS, assim como a atividade da NOS dependente e independente de cálcio, na intumescência lombar de ratos neonatos após axotomia unilateral do ciático em P2 e administração de melatonina, durante a primeira semana pós-lesão;
- 5) Analisar a expressão e distribuição tecidual da Bax e Bcl-2 na intumescência lombar de ratos neonatos após axotomia unilateral do ciático em P2 e administração de melatonina, durante a primeira semana pós-lesão
- 6) Quantificar a ocorrência de fragmentação de DNA na intumescência lombar de ratos neonatos após axotomia unilateral do ciático em P2 e administração de melatonina, durante a primeira semana pós-lesão.

Procedimentos Experimentais

1. <u>Animais e grupos experimentais</u>

Foram empregados ratos neonatos Wistar com dois dias de vida (P2), deixados junto à mãe durante todo o período experimental. Os animais foram mantidos sob condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro) e temperatura (21°C).

Os ratos neonatos foram divididos em grupos considerando-se a realização de axotomia periférica do nervo ciático, administração de melatonina e tempo de sobrevida após a lesão. Desta forma, foram estudados os seguintes grupos experimentais: (1) animais submetidos a axotomia e tratados com melatonina, (2) animais submetidos a axotomia e tratados com o veículo de diluição da melatonina e (3) animais controles íntegros, sem qualquer manipulação cirúrgica ou tratamento farmacológico. Os tempos de sobrevida após a secção do ciático e o número de animais avaliados estão indicados nos capítulos seguintes.

2. <u>Procedimentos cirúrgicos para a secção do nervo ciático</u>

Os animais foram anestesiados por hipotermia e colocados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico (DF Vasconcelos, M90). O nervo ciático esquerdo foi exposto e seccionado ao nível do tendão do obturador. A fim de impedir o contato entre os cotos nervosos, foi removido um segmento de aproximadamente 3 milímetros do coto distal. A seguir, a musculatura foi reposicionada e a pele suturada com fio de seda 7-0 (Ethicon). Os animais foram colocados em local aquecido até despertarem da anestesia. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no mesmo período do dia, entre 13:00 e 14:00 horas.

3. <u>Tratamento</u>

A preparação e administração da melatonina foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Kim *et al.* (1998). A melatonina foi dissolvida em solução de 5% etanol absoluto:salina (v:v) e administrada 1 hora antes da axotomia, imediatamente após a cirurgia, 1 hora e 2 horas depois da lesão. A partir do dia seguinte à secção do ciático, a melatonina foi administrada em dose única no mesmo horário (13:00 – 14:00 horas) por até 4 dias, dependendo do tempo de sobrevida de cada grupo experimental.

De acordo com resultados de experimentos prévios feitos em nosso laboratório (Rogério *et al.*, 2002) e, conforme dados sobre a farmacocinética e a farmacodinâmica da melatonina em ratos adultos (Gibbs & Vriend, 1981; Yeleswaram *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Joo *et al.*, 1998) e neonatos (Weinberg, 1981), foi empregada a dose de 1,0 mg/kg por via subcutânea. Os animais tratados apenas com o veículo de diluição receberam volumes de solução proporcionais ao seu peso corporal.

4. <u>Obtenção dos espécimes para processamento histológico</u>

Após anestesia com pentobarbital sódico 3% (0,1ml/20g, i.p.), os animais foram submetidos a toracotomia e perfundidos com paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Em seguida, os animais foram eviscerados e mantidos na mesma solução fixadora por 24 h, a 4° C. A intumescência lombar da medula espinhal foi então dissecada, desidratada em etanol e processada para inclusão em parafina.

De cada intumescência lombar foram coletados cortes seriados transversais de 8 µm em lâminas silanizadas. Para cada série de 11 cortes seguidos coletados, uma série seguinte de 22 cortes foi descartada.

5. Quantificação dos motoneurônios

Coloração com cresil violeta foi realizada para a contagem de motoneurônios da região lombar correspondente aos segmentos do nervo ciático. Para tal quantificação, foram usados 20 cortes de cada animal e foram considerados apenas motoneurônios com nucléolo evidente (Wu & Li, 1993). A razão entre o número de motoneurônios contados no lado lesado e no lado normal (ou no lado esquerdo e no direito, para os controles íntegros) foi calculada para cada animal e representada pelo índice de sobrevivência neuronal (ISN). A coloração com cresil violeta também permitiu a avaliação qualitativa do corpo celular dos motoneurônios (tamanho, posição do núcleo e hipercromia).

6. <u>Procedimentos imunoistoquímicos</u>

Para a detecção imunoistoquímica da SOD1, SOD2, nNOS, eNOS, iNOS, Bcl-2 e Bax foram utilizados os seguintes anticorpos primários policionais: anti-SOD1 (Calbiochem, 574597), anti-SOD2 (Calbiochem, 574596), anti-nNOS (BD Transduction, N31030), anti-eNOS (Santa Cruz, sc-654), anti-iNOS (Santa Cruz, sc-651), anti-Bcl-2 (Santa Cruz, sc-492) e anti-Bax (Santa Cruz, sc-526).

Para a realização das imunomarcações, os cortes foram desparafinizados em xilol e re-hidratados em bateria decrescente de álcoois e, em seguida, lavados em água destilada. Nos cortes destinados à detecção de SOD2, nNOS, eNOS, iNOS, Bcl-2 e Bax, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de H_2O_2 (10 volumes) e metanol (3:97, v/v) por 15 minutos. Para a localização da SOD1, efetuou-se tal bloqueio com solução de H_2O_2 (10 volumes) e tampão fosfato 10 mM pH 6,0 (3:97, v/v) por 40 minutos. A recuperação antigênica foi realizada empregando-se solução Tris-HCl 50 mM pH 9,5 e uréia 5% (SOD2, nNOS, eNOS, iNOS) ou tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 (Bcl-2 e Bax), em

forno microondas (900W) por 10 minutos. Para SOD1, utilizou-se tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 a 95°C por 5 minutos. Em seguida, foi feito bloqueio dos grupos aldeídos com tampão Tris-Glicina 0,1 M por 30 minutos e, em seguida, bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de leite em pó desnatado (5%) em tampão PBS pH 7,4 por 1 hora. Os cortes foram incubados com anticorpo primário, diluído em tampão de bloqueio (SOD1 (1:1000), SOD2 (1:50), nNOS (1:100), eNOS (1:300), iNOS (1:300), Bcl-2 (1:200) e Bax (1:200)) em câmara úmida por 12 horas à temperatura ambiente. O anticorpo secundário apropriado (Calbiochem, 402100 (SOD) ou Rockland, 611-1602 (NOS, Bcl-2 e Bax); 1:200) foi aplicado por 2 horas, a temperatura ambiente. A imunorreatividade foi amplificada através de complexo avidina-biotina (Vectastain ABC kit, Vector) por 1 hora. Por fim, a marcação foi revelada através de reação de peróxido de hidrogênio com diaminobenzidina e as lâminas foram montadas (Entelan, Merck).

7. <u>Detecção das células com fragmentação de DNA</u>

A fragmentação de DNA foi detectada através da técnica de TUNEL (do inglês, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; Gavrieli et al., 1992), utilizando-se o TdT-FragELTM DNA Fragmentation Detection Kit (QIA33, Oncogene).

Os cortes foram desparafinizados em xilol, re-hidratados em bateria decrescente de álcoois e lavados em tampão Tris-salina (TBS; Tris 20mM, NaCl 140mM, pH 7,6) durante 5 minutos. A seguir, os cortes foram permeabilizados com proteinase K (20mg/ml; 1:100 em tampão Tris pH 8,0) por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após, a peroxidase endógena foi inativada com H₂O₂ (10 volumes) e metanol (3:97, v/v) por 5 minutos, à temperatura ambiente. Os cortes foram transferidos para câmara úmida, cobertos com tampão de equilíbrio (cacodilato de sódio 1,0M, Tris 0,15M, BSA 1,5mg/ml, CoCl₂ 3,75mM, pH 6,6) diluído 1:5 em água destilada e incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, o tampão de equilíbrio foi substituído pela solução de reação (nucleotídeos biotinilados e enzima TdT; 10µl/corte), os cortes foram cobertos com Parafilm® e incubados por 90 minutos a 37°C. Em seguida, aplicou-se o tampão de parada (EDTA 0,5M pH 8,0) por 5 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram cobertos com tampão de bloqueio (4% BSA, PBS 10 mM, pH 7,4) e incubados por 10 minutos, à temperatura ambiente.Para revelação da reação, removeu-se o tampão de bloqueio, adicionou-se solução do conjugado estreptoavidina-peroxidase (30 minutos, à temperatura ambiente) e, em seguida, solução de diaminobenzidina (15 minutos, à temperatura ambiente). Finalmente, os cortes foram contracorados com verde de metila e montados (Permount, Fisher).

8. Quantificação das células Bax-positivas ou com fragmentação de DNA

A contagem das células positivas para Bax ou fragmentação de DNA foi feita na hemimedula ipsilateral à lesão ou, no caso dos controles íntegros, na esquerda. Foram avaliados seis cortes por animal (Lawson et al., 1997; Oliveira *et al.*, 1997 e 2002). As regiões que correspondem aproximadamente às lâminas de Rexed I-VI (corno dorsal) e IX (grupo ventrolateral de motoneurônios) do nível lombar foram identificadas com o auxílio de atlas histológico (Molander e Grant, 1995).

9. <u>Obtenção dos espécimes para determinação da atividade da NOS e análise de</u> expressão protéica ou gênica

Após cada tempo de sobrevida, os animais foram anestesiados por hipotermia e decapitados. A intumescência lombar foi rapidamente removida, pesada, congelada em nitrogênio líquido e mantida a -80°C.

10. Determinação da atividade da NOS

A atividade da NOS foi determinada pelo método de conversão da [³H]L-arginina para [³H]L-citrulina conforme Hiki *et al.* (1992). Inicialmente, a intumescência lombar congelada foi homogeneizada em 5 volumes de tampão de incubação gelado (Tris-HCl 50mM pH 7.4), contendo L-citrulina 1mM, 10 µg/mL de leupeptina, 10 µg/mL de inibidor de tripsina derivada de soja, 2 µg/mL de aprotinina e 1 mM de PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride). Cinquenta microlitros de amostra foram incubados em um meio que continha 2 mM de CaCl₂, 1 mM de NADPH, 10 µM de L-arginina contendo 100,000 dpm de [2,3,4,5-³H]L-arginina mono hidrocloreto e os cofatores calmodulina (CaM; 10 µg/ml), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD; 10 µM) e tetrahidrobiopterina (BH₄; 100 µM) em um volume final de 100 µL a temperatura de 37°C, durante 30 minutos. Todos os reagentes foram preparados em tampão de incubação (sem PMSF e L-citrulina). Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1 ml de tampão HEPES 20 mM, pH 5.4 contendo 1mM de EGTA e 1 mM de EDTA. As amostras foram aplicadas em colunas contendo 0,6 ml de resina de troca iônica (tipo aniônica forte, Dowex AG 50X-8). Os eluatos foram recolhidos em viais de cintilação. Em seguida, as colunas foram lavadas com 1 ml adicional de tampão HEPES e os eluatos foram combinados com os anteriores.

Após a adição de 10 ml de líquido de cintilação a radioatividade foi medida durante 1 min em espectrômetro de cintilação. As contagens foram corrigidas por subtração do "branco" (onde o homogenato de tecido foi adicionado após o tampão HEPES). Para o cálculo das atividades enzimáticas, as contagens (em dpm, dosagem por minuto) foram relacionadas à atividade total (os conteúdos destes tubos receberam [2,3,4,5-³H]L-arginina mono hidrocloreto diretamente nos viais de cintilação) pela fórmula:

pmol L-cit/min = 1000 x (dpm amostra - dpm branco) / dpm totais / 30

onde 1000 é a quantidade de L-arginina adicionada à mistura de incubação (em pmols), dpm e 30 é o tempo de incubação (em min).

Paralelamente a cada ensaio, foram realizados controles farmacológicos da atividade enzimática que consistem na omissão do CaCl₂ e na adição de 1 mM de EGTA no meio de incubação (a fim de caracterizar o tipo de NOS, isto é, cálcio- dependente ou independente) e na adição de 1 mM de L-NAME (inibição específica para a NOS).

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976) e a atividade da NOS foi expressa como pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína.

11. Análise de expressão protéica da SOD1 e SOD2

As amostras de medula lombar foram primeiro homogeneizadas em 250 μ l de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo 1 mM de PMSF. Cento e trinta microlitros de cada amostra (concentração de proteínas totais de 4 mg/ml) foram diluídas com 30 μ l de tampão de Laemmli e fervidas por 10 min. Após centrifugação a 10.000 g por 30 segundos, as proteínas totais de cada amostra (5 e 25 μ g/amostra para SOD1 e SOD2,

22

respectivamente) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) com 0.1% de lauril sulfato de sódio (SDS-PAGE; Laemmli, 1970). Tal separação foi realizada com tampão Tris (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1%) pH 8,3, a 100 V, por aproximadamente 1 hora. Em seguida, as bandas foram transferidas por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (100 V) em tampão Tris (25 mM), glicina (192 mM), SDS (0,1%) e etanol (18%) por 1 hora. Após, as membranas foram mantidas em solução de bloqueio (0,2% de caseína em tampão TBS-T) por 1 hora. A seguir, as membranas foram incubadas a 18°C com anticorpo primário policional diluído em solução de bloqueio (anti-SOD1, Calbiochem, 574597, 1:2000; ou anti-SOD2, Calbiochem, 574596, 1:500), por 18 horas. As membranas foram então incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído em solução de bloqueio (Calbiochem, 402100, 1:4000) por 2 horas. Em seguida, as bandas reativas foram identificadas através de ensaio quimioluminescente (West Pico, Pierce). A intensidade das bandas foi estimada por análise densitométrica (ChemiImager-Alpha Innotech Corporation).

12. <u>Análise de expressão gênica da nNOS, eNOS, iNOS, Bax e Bcl-2</u>

A análise da expressão gênica foi realizada através da técnica da reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa (RT-PCR), conforme Wong *et al.* (1994).

Para extração do RNA total, todos os procedimentos iniciais para a extração da medula lombar foram realizados com material cirúrgico tratado com RNase Away (Invitrogen, #10328-011) para evitar contaminação das amostras com RNase exógena. Cada amostra foi homogeneizada em 500µl de Trizol (Invitrogen, #15596-026) no interior de tubo livre de RNase e centrifugada (12.000 rpm, 4°C, 10 min). O sobrenadante foi

recolhido, mantido em banho-maria (30°C, 5 min) e acrescido de 100µl de clorofórmio. Depois de nova centrifugação (12.000 rpm, 4°C, 15 min), 250µl de álcool isopropílico foram adicionados ao sobrenadante recolhido, seguido de agitação por inversão e manutenção das amostras a -80°C, por no mínimo 2 horas, para precipitação do RNA. Em seguida, cada amostra foi centrifugada (12.000 rpm, 4°C, 15 min) e o precipitado, ressuspendido em 50µl de água DEPC. Desta solução contendo RNA, utilizou-se 2µl para quantificação em espectofotômetro. A integridade do RNA total obtido foi avaliada por eletroforese em gel de agarose contendo formaldeído (Ausubel *et al.*, 1998). Após quantificação por espectofotometria, a concentração de RNA total em cada amostra foi ajustada para aproximadamente 250 ng/µl.

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o kit RevertAidTM H Minus M-uLV Reverse Transcriptase. (Fermentas Life Sciences, #EP0451). Conforme especificações do fabricante para produção de 20µl de solução de cDNA por amostra, 5µl de água DEPC, 5µl de RNA total e 1µl de oligo(dT)₁₈ (100µM, 500ng/µl) foram aquecidos a 70°C por 5 minutos. Em seguida, 2µl de dNTP (10mM), 4µl de tampão de reação (5X reaction buffer) e 2µl de água DEPC foram acrescentados e aquecidos a 37°C por 5 minutos. Após, adicionou-se 1µl de enzima transcriptase reversa e a reação ocorreu por 1 h a 42°C. Finalmente, o cDNA total de cada amostra foi quantificado em espectofotômetro e a concentração ajustada para aproximadamente 700 ng/µl.

Para cada PCR (volume final de 20µl), foram utilizados: 1µl de cDNA, 2µl de tampão de reação (Tris-HCl 100 mM pH8,5 e KCl 500mM), 0,8µl de MgCl₂ 50mM, 0,4µl de dNTP 10mM, 1,0 µl de primer forward (F) 10 µM, 1,0 µl de primer reverse (R) 10µM, 13,3µl de água destilada autoclavada e 0,5µl de Taq polimerase (Taq DNA polymerase,
LGC Biotecnologia, #13-10500; 5U/µl). O programa de amplificação compreendeu desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos primers por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Após o último ciclo, as amostras foram submetidas a extensão final a 72°C por 7 minutos. Em experimentos distintos foram determinados o número de ciclos da PCR e a temperatura de anelamento (Tm) para cada conjunto de primers, considerando-se a faixa de amplificação linear da curva de saturação (Jiang *et al.*, 2004) e a constituição de cada seqüência de oligonucleotídeos, respectivamente (Tabela 1). Utilizou-se como controle interno a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), devido à sua expressão fisiológica e constante na intumescência lombar de ratos neonatos (Piehl *et al.*, 1998).

Os produtos de PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5µg/ml de brometo de etídio. Os géis foram fotografados e a densidade óptica de cada banda foi determinada usando-se o software Image Master VDS (Amersham Biosciences). Após, calculou-se a razão entre os valores densitométricos das bandas dos produtos de cada gene estudado e do controle interno (GAPDH) da mesma amostra. Tal razão foi denominada Índice de Densidade Óptica (IDO).

Cana	Primers	Tamanho	Tm	Cialag	
Gelle	Seqüências	Ref	(bp)	(°C)	CICIOS
GAPDH	F: 5'CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'	Wong et al.	306	63	29
	R: 5'AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'	(1994)			
Bax	F: 5'AAG AAG CTG AGC GAG TGT CT-3'	Han et al.	361	59	29
	R: 5'CAA AGA TGG TCA CTG TCT GC-3'	(1996)			
Bcl-2	F: 5'GTA TGA TAA CCG GGA GAT CG-3'	Sato et al.	612	58	32
	R: 5'AGC CAG GAG AAA TCA AAC AG-3'	(1994)			
nNOS	F: 5'CCC CGT CCT TTG AAT ACC AG-3'	Swain et al.	560	67	30
	R: 5'CCG AGA GCC GAG GCC GAA CA-3'	(1997)	500		
eNOS	F: 5'GGA AGA TGT TCC AGG CTA CAA-3'	Kawai et al.	904	58	33
	R: 5'TAG AGA TGG TCC AGT TGG GAG-3'	(1995)			
iNOS	F: 5'ACA ACA GGA ACC TAC CAG CTC A-3'	Lyons et al.	651	63	33
	R: 5'GAT GTT GTA GCG CTG TGT GTC A-3'	(1992)			

Tabela 1 – Especificações dos primers, temperatura de anelamento (Tm) e número de ciclos usados nas PCRs.

13. <u>Análise Estatística</u>

Para cada tempo de sobrevida estudado, a avaliação estatística do ISN, do número de células Bax ou TUNEL-positivas, da atividade da NOS cálcio-dependente ou independente, da expressão protéica das isoformas da SOD e do IDO para Bax, Bcl-2 e isoformas da NOS foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Duncan (SAS[®] GLM procedure; SAS Institute). Para se avaliar a diferença entre as médias, adotou-se um nível de significância de 5%.

Resultados

Artigos Científicos

Artigo Científico 1

"Superoxide dismutase isoforms 1 and 2 in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin treatment"

Neste artigo, são apresentados os resultados referentes à expressão protéica das isoformas 1 e 2 da superóxido dismutase (SOD) na intumescência lombar de ratos submetidos à secção do ciático no segundo dia de vida após o nascimento (P2). São reportados também os efeitos da melatonina sobre a população de motoneurônios lesados e a expressão da SOD.

Em diferentes tempos de sobrevida ao longo da primeira semana após a axotomia, o padrão de imunomarcação da SOD1 nos motoneurônios foi invariavelmente citoplasmático difuso. A distribuição da SOD2 foi semelhante à da SOD1 nos motoneurônios em P2. De P3 a P7, a marcação da SOD2 foi citoplasmática puntiforme. Os padrões de imunomarcação observados não foram alterados pela lesão nervosa periférica e/ou tratamento com melatonina. Por outro lado, a administração de melatonina reduziu em 75% a perda neuronal observada no primeiro e no quinto dia após a lesão. Além disso, análise por *Western Blot* um dia após a axotomia detectou redução da expressão da SOD1 e aumento da mesma em animais lesados que receberam veículo de diluição apenas ou melatonina, respectivamente. Não foram verificadas diferenças na expressão da SOD2 nas condições experimentais avaliadas. Concluindo, foram observados (1) diferentes padrões de distribuição da SOD2 durante o desenvolvimento pós-natal de motoneurônios e (2) indução da SOD1 na intumescência lombar após a administração de melatonina a ratos neonatos submetidos à secção do nervo ciático.



Available online at www.sciencedirect.com



Developmental Brain Research 154 (2005) 217-225

Research report

DEVELOPMENTAL BRAIN RESEARCH

www.elsevier.com/locate/devbrainres

Superoxide dismutase isoforms 1 and 2 in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin treatment

Fábio Rogério^a, Simone A. Teixeira^b, Alexandre César Santos de Rezende^a, Rafael Cofiño de Sá^a, Luciano de Souza Queiroz^c, Gilberto De Nucci^b, Marcelo Nicolás Muscará^b, Francesco Langone^{a,*}

^aDepartment of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil ^bDepartment of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences 1 (ICB1), University of São Paulo, USP, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil ^cDepartment of Pathology, State University of Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

> Accepted 18 October 2004 Available online 16 January 2005

Abstract

Oxidative stress has been implicated in motoneuron death secondary to axotomy in the neonatal period. We studied the effect of sciatic transection at P2 on the motoneuron population in the lumbar enlargement of newborn rats looking for a protective role of daily doses of the antioxidant melatonin. The animals were allowed to survive from P2 to P7, and the spinal cords were processed for immunohistochemistry for superoxide dismutase (SOD) isoforms 1 and 2 and nitric oxide synthase (nNOS) (at 2, 3, 5, and 7 days post-natum), histological neuron counting and immunoblotting for the SOD isoforms (both at 2, 3, and 7 days post-natum). Melatonin reduced by 75% motoneuron loss due to axotomy at P3 and P7. Neither sciatic transection nor melatonin induced any detectable changes in the immunoreactivity patterns of the enzymes. SOD1 was expressed diffusely in the cytoplasm of neurons and ependyma and in the nuclei of presumed glial cells from P2 to P7. SOD2 was detected in neurons and ependyma and its expression was similar to SOD1 at P2 but decreased later to a spotty cytoplasmic pattern in motoneurons. nNOS was localized to the cytoplasm of a few small cells in the ventral and dorsal horns and around the central canal. Immunoblotting at 1 day postaxotomy detected a significant increase in SOD1 expression in melatonin-treated axotomized rats and a decrease in controls after axotomy and vehicle. Blotting for SOD2 did not show significant changes between groups at any time. This study provides the first evidence that SOD2 immunostaining pattern varies during motoneuron postnatal development and that melatonin alters the expression of SOD1 in the present model of peripheral nerve injury. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Theme: Development and regeneration *Topic:* Neuronal death

Keywords: Neonatal rat; Axotomy; Motoneuron; Melatonin; Superoxide dismutase; Nitric oxide synthase

1. Introduction

Axonal transection is a useful model to study cell death in rat spinal motoneurons in the neonatal period. When performed during the first postnatal week axotomy may determine loss of approximately 60% of injured motoneur-

* Corresponding author. Fax: +55 19 37886185.

E-mail address: langone@unicamp.br (F. Langone).

ons [16]. In adult rats such cell loss does not happen [11,16]. Interruption of incoming neurotrophic factors may lead to production of free radicals such as superoxide and nitric oxide (NO) resulting in apoptosis [6]. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS), which produces NO, is known to be induced 1 week after lesion in avulsioned hypoglossal/ sciatic or crushed vagal neurons of adult rats [28]. However, that enzyme was not detected by immunohistochemistry in transectioned sciatic motoneurons of neonatal rats at the fifth day after lesion [22], when an increase in the number of

NADPH-diaphorase (NADPH-d)-positive motoneurons was reported [7]. NADPH-d is a histochemical method often used to demonstrate nNOS [26]. Intracellular antioxidant systems like superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase are vital in controlling free radicals arising from both normal metabolism and oxidative stress, but the importance of these protective mechanisms in the neonatal period is less known. Evidence suggests that CuZn and Mn isoforms of SOD (SOD1 and 2, respectively) play a role in neuronal homeostasis. Mutant forms of SOD1 are associated with progressive degeneration and death of motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis and experimental models of this disease [3]. In adult rats, lumbar motoneuron axotomy increases synthesis and activity of SOD2 [24]. SOD2-deficient mice present spongiform degeneration of cerebral cortex, hypertrophic cardiomyopathy, liver fatty change, and early neonatal death [17].

We recently showed that melatonin is capable of decreasing motoneuron loss and the associated astrocytic response in neonatal rats after sciatic transection [23]. This neurohormone is known to be an effective free radical scavenger and to act as a stimulant of physiological antioxidant systems [20,21]. In addition, the lipophylic nature of melatonin and its antiapoptotic effect make it promising for therapy of neurologic degenerative diseases [8,20].

In this paper we studied the expression of SOD1 and 2 in rat lumbar spinal cord during the first postnatal week under physiological conditions and after motoneuron peripheral axotomy at P2. In addition, because we have not detected nNOS in lumbar motoneurons at the fifth day after sciatic transection [22], we used immunohistochemistry to investigate whether nNOS would be induced at earlier time points after lesion. We focused on the temporal and spatial relation of those SOD isoforms with the presence of nNOS in motoneurons, since dissimilarity between the expression of these enzymes has been described in different groups of lesioned motoneurons in adult rats [28], but not in neonatal animals. Finally, we examined whether the neuroprotective effect of melatonin could be related to variations in the expression of SOD1 and 2 in the axotomized cells.

2. Materials and methods

2.1. Surgical protocol, melatonin treatment, and experimental groups

Wistar rats aged 2 days postnatally (P2) were anaesthetized by hypothermia through immersion in crushed ice for 3–5 min [19]. The left sciatic nerve was transectioned at mid-thigh level and a short segment of the distal stump was removed to avoid axonal regeneration [10]. No surgical procedure (skin incision or sciatic section) elicited painful response (movements or sounds). Animals were allowed to recover from anesthesia under an incandescent lamp and were returned to their mothers. Animal holding was approved by the Committee on Animal Care of the State University of Campinas (protocol 509-1).

Melatonin (Sigma; 1 mg/kg) was dissolved in absolute ethanol–saline (5:95, v/v) and administered subcutaneously, as previously described [1,5,23]. The pups received melatonin 1 h prior to axotomy, immediately following the procedure, and then at 1 h, 2 h, and once daily for 4 days. Animals were sacrificed at 1 h, 6 h, 1 day, 3 days, or 5 days after lesion. For the last three times, the last dose of melatonin or vehicle was given on the day before sacrifice. For each time point, control rats were used as follows: some were axotomized and given dilution vehicle only, others were axotomized and received no additional treatment and still others were kept intact. Animal numbers per group at each time point were 5 for immunohistochemistry and cresyl violet staining and 3 for Western blot analysis.

2.2. Tissue preparation for histological assessment

At the end of each survival period, the rats were anaesthetized with sodium pentobarbital 3% (0.1 ml/20 g; ip) and perfused through the left ventricle with saline followed by 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. Each lumbar enlargement was postfixed in the same fixative for 24 h at 4 °C, dehydrated with ethanol, and infiltrated with paraffin. Serial transverse sections (8 μ m) were cut. Of every six sections the second and fifth were stained with cresyl violet (Sigma); the first, third, and sixth were reacted for SOD1, nNOS, and SOD2, respectively. After every 6-section series 22 sections were discarded.

2.3. Motoneuron counting

Melatonin protective action was assessed by motoneuron counting in cresyl violet stained sections (20 per animal). Cell counting was undertaken blind to treatment and performed at 1 h, 1 day, and 5 days postaxotomy. The initial time points were set to investigate the occurrence of motoneuron death during the first 24 h after lesion. Only large multipolar motoneurons of the ventrolateral group containing a clearly visible nucleolus were counted, as previously described [9].

2.4. Immunohistochemistry

For each antigen, we performed preliminary tests to establish the best combination of endogenous peroxidase blocking and antigen retrieval method. Briefly, the sections were deparaffinized with xylene and passed through graded alcohols. For nNOS and SOD2 immunostaining, endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide/ methanol for 15 min. Afterwards, the sections were microwaved at a power setting of 900 W (15 min or 6 min,

respectively, in 50 mM Tris-HCl buffer (containing 5% urea) at pH 9.5). For SOD1 immunohistochemistry, after endogenous peroxidase blocking (3% hydrogen peroxide/10 mM phosphate buffer at pH 6.0, 40 min), sections were water bathed in a preheated retrieval solution (10 mM citrate buffer at pH 6.0) for 5 min at 95 °C. Primary antibody either to nNOS (BD Transduction Lab., cat#610310; 1:100), SOD2 (Calbiochem, cat#574596; 1:50), or SOD1 (Calbiochem, cat#574597; 1:1000) was incubated overnight with the sections at room temperature (RT; 20 °C) in a moist chamber. The appropriate secondary antibody was applied for 2 h at RT. For SOD1 and 2, a peroxidase-conjugated secondary antiserum (Calbiochem, cat#402100; 1:200) was used and immunoreactivity was visualized through diaminobenzidine (DAB; 0.5 mg/ml). For nNOS, sections were incubated in biotinylated secondary antibody (Rockland Lab., cat#611-1602; 1:200), covered with peroxidaseconjugated streptavidin solution (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) for 1 h and processed for DAB reaction (0.5 mg/ml).

2.5. Western blot

After the appropriate survival intervals, the animals were anaesthetized by hypothermia and sacrificed. The lumbar spinal cord was rapidly removed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Spinal cord samples were sonicated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, with protease inhibitors, on ice. Colorimetric protein assay was performed according to Bradford [4] (Bio-Rad kit, USA). Spinal cord homogenate proteins (5 and 25 µg/lane to SOD1 and SOD2, respectively) were separated by SDS-PAGE electrophoresis (15% polyacrylamide) according to Laemmli [13] and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane by electroblotting (100 V, 1 h). After the blockade of nonspecific binding sites with 0.2% casein, the membranes were incubated with the above specified primary antibody either to SOD1 (1:2000) or SOD2 (1:500) overnight at 4 °C. The membranes were washed with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and incubated with secondary antibody (Calbiochem, cat#402100; horseradish peroxidaseconjugated rabbit anti-sheep, 1:4000). A chemiluminescent assay (West Pico, Pierce, USA) was used to identify the immunoreactive bands. Intensities of the bands were estimated by densitometric analysis (ChemiImager-Alpha Innotech Corporation, USA).

2.6. Statistical analysis

In cresyl violet stained sections, the ratio between the number of motoneurons counted in the operated and control sides (or in the left and right sides of intact animals) was defined as Neuronal Survival Ratio (NSR). In axotomized animals, the unoperated contralateral side of the spinal cord was used as control. To assess the influence of treatment and time on NSR, a two-way ANOVA was performed using the SAS[®] GLM procedure (SAS Institute, Cary, North Carolina; 1987). Treatment and Time were considered factors in the analysis. The response variable was NSR. For each time, a one-way ANOVA was performed. The treatment was considered the factor and NSR the response variable. To test for differences among time means, the Duncan multiple comparisons test was performed. For each treatment, a oneway ANOVA was performed. The time was considered the factor and NSR the response variable. To test for differences among treatment means, the Duncan multiple comparisons test was performed. The same analyses were performed for densitometric values obtained after Western blot method. The ANOVA and Duncan tests were used at the 5% level to assess differences between means.

3. Results

3.1. Motoneuron counting

At 1 h after lesion there was no statistical difference among the NSR values of all groups studied ($F_{3,16} = 1.61$, P = 0.2260). The number of motoneurons surviving axotomy decreased progressively in longer experimental times. However, neuronal loss was reduced by melatonin treatment. At 1 day NSR of melatonin-treated animals was significantly higher than that of rats treated with the dilution vehicle or submitted only to transection ($F_{3,16} = 23.34$, P < 0.0001). The same was observed at 5 days after lesion ($F_{3,16} = 19.39$, P < 0.0001). In unlesioned animals, the numbers of motoneurons in the left and right sides of the lumbar enlargement did not differ statistically at any time ($F_{2,12} = 0.47$, P = 0.6332) (Table 1).

3.2. Immunohistochemistry for SOD1, SOD2, and nNOS

Immunostaining pattern for SOD1 was intense and similar in all groups at all survival times, irrespective of axotomy or pharmacological treatment (melatonin or vehicle). This isoform was homogeneously distributed in the cytoplasm of motoneuron perikarya and proximal branches. Smaller neurons in all Rexed laminae and ependymal cells stained

Neuronal sur	rvival ratio	(NSR) at 1	h, 1	day, and	15	days	postaxotomy
--------------	--------------	------------	------	----------	----	------	-------------

Groups	Neuronal survival index				
	Time after lesion				
	1 h	1 day	5 days		
Melatonin $(n = 5)$	0.97 ± 0.03	$0.96 \pm 0.02*$	0.74 ± 0.04 *		
Vehicle $(n = 5)$	0.89 ± 0.06	0.76 ± 0.03	0.52 ± 0.06		
Untreated $(n = 5)$	0.92 ± 0.05	0.72 ± 0.04	0.56 ± 0.03		
Unlesioned $(n = 5)$	1.01 ± 0.01	1.00 ± 0.03	0.97 ± 0.05		

Melatonin-treated animals showed NSR significantly higher than that of rats treated with the dilution vehicle or submitted only to transection (untreated) at 1 day and 5 days (*P < 0.0001). Data are expressed as mean \pm SEM.



Fig. 1. Transverse sections of lumbar spinal cord immunoreacted for SOD1. Axotomized rats treated with vehicle (A, B; E, F) or melatonin (C, D) and sacrificed 1 h (A, B), 6 h (C, D), or 3 days (E, F) after sciatic transection (A, C, and E: contralateral side; B, D and F: lesioned side). Diffuse cytoplasmic pattern of SOD1 in neurons (arrow and inset in B). Structures in both gray and white matter suggestive of glial nuclei (arrowhead in B) are also reactive. No difference in SOD1 immunostaining pattern is seen between contralateral and lesioned sides. Immunostaining pattern for SOD1 observed at 1 day and 5 days after lesion had essentially similar appearance. Scale bars: 100 μ m (A–F), 25 μ m (inset).

similarly. A few structures suggestive of glial nuclei were also marked in gray and white matter (Figs. 1, 3 and 4).

Immunoreactivity for SOD2 varied in different intervals. At 1 h and 6 h after axotomy there was dense and diffuse cytoplasmic staining in perikarya and proximal dendrites of motoneurons, as well as in smaller neurons and ependymal cells. At 1, 3, and 5 days, immunostaining in motoneurons appeared as discrete, somewhat sparse granules in the cytoplasm. Smaller neurons were marked less intensely or not at all. Ependymal cells exhibited cytoplasmic staining at all times. No structures resembling glial nuclei were marked. However, as observed in SOD1 immunostaining, neither axotomy nor melatonin treatment determined changes in the pattern of SOD2 immunoreactivity at any of the studied time points (Figs. 2 and 4).

Positivity for nNOS was seen only in a few cells around the central canal, dorsal horn, and in small neurons in the anterior horn. Motoneurons, identified by counterstaining immunoreacted sections with haematoxylin, were not marked. Similarly to SOD1 and 2, neither axotomy nor melatonin changed nNOS immunostaining at any time (Fig. 3).

Fig. 2. Transverse sections of lumbar spinal cord immunoreacted for SOD2. Axotomized rats (A–H) treated with melatonin (A, B; C, D; G, H) or vehicle (E, F) and sacrificed 1 h (A, B), 6 h (C, D), 1 day (E, F), or 3 days (G, H) after sciatic transection (A, C, E, G: contralateral side; B, D, F, H: lesioned side). (I and J) Unlesioned control rat at 7 days post-natum (5 days postaxotomy control rat). (A–D) Diffuse cytoplasmic staining for SOD2 in motoneurons and other cells in the gray matter. (E–J) SOD2 cytoplasmic staining appears as discrete spots in motoneurons and is no more detectable in the other cells in the gray matter. No difference in SOD2 immunostaining pattern is observed between control and lesioned sides at all time points studied, irrespective of lesion or melatonin treatment. Scale bars: 150 μ m (A–J), 25 μ m (insets).





Fig. 3. Transverse sections of lumbar spinal cord immunoreacted for nNOS (A–F and H) or SOD1 (G) and counterstained with hematoxylin. Axotomized rats treated with melatonin (A, B; E, F) or vehicle (C, D) and sacrificed 6 h (A, B), 1 day (C, D), or 3 days (E, F) after sciatic transection (A, C, and E: contralateral side; B, D, and F: lesioned side). In the anterior horn, the neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) was only seen in some small cells without morphological features or distribution of motoneurons (arrowhead and inset in D). (G and H) Sections of the lesioned side of the same animal 1 h after sciatic nerve transection only. Note the expression of SOD1 in motoneurons of the ventrolateral group (G), but no detectable nNOS in these cells (H). nNOS-positive cells are seen around the central canal (arrowheads in H). These findings were also observed at 5 days postaxotomy, irrespective of melatonin treatment and/or sciatic transection. Scale bars: 200 μm (A–H), 25 μm (inset).

3.3. Western blot for SOD1 and SOD2

At 1 h and 5 days after lesion, SOD1 protein levels were similar in all groups ($F_{2,6} = 3.86$, P = 0.0835 and $F_{2,6} = 1.29$, P = 0.3410, respectively). However, at 1 day postaxotomy SOD1 expression increased significantly in

melatonin-treated rats and decreased in vehicle administered pups, compared with control and vehicle groups and with control and melatonin groups, respectively ($F_{2,6} = 82.49$, P < 0.001) (Fig. 5).

Western blot for SOD2 showed hardly detectable bands with approximate molecular weight of 24 kDa, the molecular



Fig. 4. Central canal of the lumbar spinal cord of rats treated with melatonin and sacrificed 5 days (A) or 1 h (B) after lesion. Apical region of ependymal cells reacts for both SOD1 (A) and SOD2 (B). The same patterns were observed in all the other experimental groups. Scale bar: $25 \ \mu m$ (A, B).

weight of SOD2. For that reason, it was not possible to determine band intensity through densitometric analysis at any studied time. A positive control (adult rat liver lysate) was used for identifying the bands (Fig 5).

4. Discussion

4.1. Melatonin neuroprotective action

We have previously reported the neuroprotective effect of melatonin on neonatal motoneurons 5 days after sciatic transection [23]. In the present study, we observed this effect at a shorter experimental time point. In melatonintreated animals, NSR was significantly higher than in vehicle-treated or axotomized only pups at day 1 and day 5. Moreover, NSR of melatonin-treated rats did not differ from intact rats at day 1, suggesting that this neurohormone plays a protective role on neonatal axotomized motoneurons earlier than we noticed before. To investigate possible mechanisms of action of melatonin in the present model, we performed immunohistochemistry for SOD1, SOD2, and nNOS and Western blot analysis for SOD isoforms.

4.2. Immunohistochemical detection of SOD1, SOD2, and nNOS

We examined immunohistochemically SOD1, SOD2, and nNOS at 1 h, 6 h, 1 day, 3 days, or 5 days after sciatic transection, since approximately 60% of the lesioned motoneurons are lost until the fifth day after such lesion at P2 [23]. Our results show that constitutive immunoreactivity for SOD1 in motoneurons during the first postnatal week is cytoplasmic, diffuse, intense, and virtually unaltered by sciatic transection at P2. That agrees with observations in adult rat motoneurons after section or crushing of the sciatic or facial nerves [24,27,28]. However, sciatic nerve avulsion in adult rats did reduce SOD1 immunoreactivity in motoneurons [28]. Thus, the physiological immunostaining pattern of this isoform appears to be independent of CNS maturity but seems influenced by the intensity of the lesion.

Regarding nNOS, irrespective of peripheral transection, this enzyme was not observed in motoneurons and was localized to the cytoplasm of a few small cells in the ventral and dorsal horns and around the central canal at all studied times. These findings were not changed by melatonin treatment and lend support to the hypothesis we previously put forward that immature sciatic motoneurons do not produce nitric oxide through nNOS 1 week after axotomy performed at P2 [22,23].

However, it remains debatable whether nNOS plays a role in axotomized motoneuron death during the first neonatal week. He et al. [9] observed that motoneurons of the sciatic pool transectioned at P1 were NADPH-d positive, but negative at P5, and there was no statistically significant difference between neuronal loss in animals operated at P1 or P5. Conversely, Clowry [7] observed NADPH-d reactivity coincident with sciatic motoneuron loss after axotomy at P1. We believe that during the first postnatal week nNOS might be induced in motoneurons only after sciatic section done earlier than P2 and that its expression is not responsible for death of motoneurons injured at P2 or P5.

The constant expression of SOD1 contrasted with the absence of nNOS both in normal and damaged motoneurons from P2 to P7. In motoneurons of adult animals submitted to sciatic avulsion, Yu [28] found that the decrease in SOD1 immunoreactivity was coupled with induction of nNOS as the experiment progressed, whereas with nerve crushing the results were similar to our immunohistochemical findings. These differences suggest that the intensity of the traumatic lesion is a major determinant for the detection of SOD1 and nNOS by immunohistochemistry at any age.

The present study reports for the first time that the morphological appearance of SOD2 expression varies during early postnatal development from a diffuse to a speckled cytoplasmic pattern both in operated and control animals. The functional significance of this variation is unclear, though it is probably related to motoneuron maturation and unaffected by sciatic transection or melatonin treatment. In axotomized motoneurons of adult rats there is induction (rather than decrease) of SOD2 1-2 weeks after lesion [24,27,28]. It is admitted that axotomized adult motoneurons receive neurotrophic factors from Schwann cells at the damaged area [25]. This might help motoneurons survive longer after axotomy, in time to allow induction of SOD2, which would counteract the oxidative stress induced by axotomy. Conversely, neonatal neurons may not have such peripheral support and undergo cell death before induction of SOD2 can take place [12,16].



Fig. 5. Representative Western blot for SOD1 (A) or SOD2 (B) in spinal cord homogenates obtained from controls and vehicle or melatonin-treated rats. (A) SOD1 protein levels were similar in all groups at 1 h and 5 days postaxotomy, but decreased at 1 day after lesion in vehicle-treated rats. On the other hand, at the latter time point, melatonin administration increased SOD1 expression (**P < 0.001 vs. control and vehicle groups; ***P < 0.001 vs. control and melatonin groups). (B) Western blot for SOD2 using spinal cord homogenates 1 day after axotomy. Since SOD2 bands (approximate molecular weight of 24 kDa) were faint and hardly detectable at all the studied times, it was not possible to perform densitometric analyses (+: positive control).

As regards ependyma, both SOD isoforms appear essential to its homeostasis, since enzyme expression remained virtually unaltered throughout the experiment. The same may be hypothesized for SOD1 and presumable glial cells, since nuclear positivity for this isoform was already demonstrated in astrocytes of adult rats [15].

4.3. Western blot for SOD1 and SOD2

Western blot analysis was performed to further characterize the expression of SOD isoforms detected by immunohistochemistry. Considering that (1) SOD1 immunostaining did not vary during the study, (2) SOD2 immunoreactivity did not change between 1 h and 6 h and between 1 and 5 days postaxotomy, and (3) vehicle-treated or axotomized only rats showed similar NSR, we studied spinal cords of melatonin- or vehicle-treated pups and intact controls at 1 h, 1 day, and 5 days after lesion.

Although we have not observed qualitative changes in SOD1 expression in any of the studied groups using immunohistochemistry, Western blot technique evidenced quantitative differences in the levels of this protein at the first day postaxotomy induced both by sciatic transection, as observed in vehicle-treated control rats, and by melatonin treatment. As it may be inferred from SOD1 protein levels of control animals and from the immunostaining pattern, the physiological expression of SOD1 is high in the lumbar spinal cord. This fact could have limited the immunohistochemical technique for showing the variations in enzyme level that we have detected by immunoblotting 1 day postaxotomy, that is, an increase of 25% after melatonin administration and a decrease of 25% determined by axotomy. In spite of the mechanism of SOD1 reduction after nerve lesion being presently unknown, such reduction would favor superoxide accumulation, oxidative stress, and motoneuron death [14]. On the other hand, the rise in SOD1 levels determined by melatonin at the first day after lesion suggests a possible mechanism of action for this substance in the present model, as such rise correlates with the higher ratio of surviving cells we observed by motoneuron counting in melatonin-treated rats. The increase in SOD1 expression would enhance dismutation of superoxide produced by neurotrophic factor deprivation [6]. In addition, it is possible that the neurohormone protects axotomized motoneurons by increasing the activity of SOD and glutathione peroxidase [18], stimulating the synthesis of antioxidant compounds as glutathione [2], and directly scavenging oxygen-derived free radicals [8].

Regarding SOD2, this enzyme was hardly identified by immunoblotting. We tested spinal cord homogenates with different concentrations and varied primary antibody dilutions but obtained only very faint bands or none at all. Our immunohistochemical findings had preliminarily suggested that SOD2 was expressed at lower levels compared with SOD1, irrespective of axotomy and/or melatonin administration. However, probably because of the small amount of this enzyme in the neonatal spinal cord, densitometric analysis was not possible at any of the studied times. For that reason we could not have quantitative confirmation of the physiological reduction of SOD2 in rat lumbar cord in the first postnatal week, noted by immunohistochemistry. The fact that the expression of SOD2 is normally low and remains unaltered by the experimental procedures does not exclude a role for this enzyme in the cellular antioxidant defense system during the neonatal period. It may suggest that SOD2 acts in support of SOD1, since the latter is expressed at higher levels.

In conclusion, our results with immunoblotting showing alterations in the expression of SOD1 by melatonin treatment warrant further investigation of this agent in models of neurologic disease associated with oxidative stress.

Acknowledgments

The technical assistance given by Ms. Léa de Magalhães is gratefully acknowledged. The authors wish to thank Dr. A. X. Linhares for help with the statistical analysis. This work was supported by grants from FAPESP (01/06991-1) and from FAEP/UNICAMP (582/01). F. Rogério is supported by a doctoral scholarship from FAPESP (03/03717-1).

References

- [1] I. Antolín, C. Rodríguez, R.M. Saínz, J.C. Mayo, H. Uría, M.L. Kotler, M.J. Rodríguez-Colunga, D. Tolivia, A. Menéndez-Peláez, Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes, FASEB J. 10 (1996) 882–890.
- [2] G. Baydas, R.J. Reiter, V.S. Nedzvetskii, P.A. Nerush, S.V. Kirichenko, Altered glial fibrillary acidic protein content and its degradation in the hippocampus, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin, J. Pineal Res. 33 (2002) 134–139.
- [3] J.S. Beckman, A.G. Estévez, J.P. Crow, L. Barbeito, Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS, Trends Neurosci. 24 (2001) S15–S20.
- [4] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
- [5] S. Capsoni, B.M. Stankov, F. Fraschini, Reduction of regional cerebral blood flow by melatonin in young rats, NeuroReport 6 (1995) 1346–1348.
- [6] V. Castagné, M. Gautschi, K. Lefevre, A. Posada, P.G.H. Clarke,

Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system, Prog. Neurobiol. 59 (1999) 397–423.

- [7] G.J. Clowry, Axotomy induces NADPH diaphorase activity in neonatal but not adult motoneurones, NeuroReport 5 (1993) 361–364.
- [8] E. Gilad, S. Cuzzocrea, B. Zingarelli, A. Salzman, C. Szabó, Melatonin is a scavenger of peroxinitrite, Life Sci. 60 (1997) PL169-PL174.
- [9] B.P. He, S.S.W. Tay, S.K. Leong, Motoneuronal death without expression of NADPH-diaphorase activity after sciatic nerve cut in 5-day-old mice, Brain Res. 733 (1996) 125-128.
- [10] Y. Kashihara, M. Kuno, Y. Miyata, Cell death of axotomized motoneurones in neonatal rats, and its prevention by peripheral reinnervation, J. Physiol. 386 (1987) 135–148.
- [11] V.E. Koliatsos, D.L. Price, Axotomy as an experimental model of neuronal injury and cell death, Brain Pathol. 6 (1996) 447–465.
- [12] M. Kuno, Target dependence of motoneural survival: the current status, Neurosci. Res. 9 (1990) 155–172.
- [13] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (1970) 680-685.
- [14] M. Leist, P. Nicotera, Apoptosis, excitotoxicity and neuropathology, Exp. Cell Res. 239 (1998) 183–201.
- [15] J. Lindenau, H. Noack, H. Possel, K. Asayama, G. Wolf, Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS, Glia 29 (2000) 25–34.
- [16] M.B. Lowrie, G. Vrbová, Dependence of postnatal motoneurones on their targets: review and hypothesis, Trends Neurosci. 15 (1992) 80-84.
- [17] S. Melov, J.A. Schneider, B.J. Day, D. Hinerfeld, P. Coskun, S.S. Mirra, J.D. Crapo, D.C. Wallace, A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase, Nat. Genet. 18 (1998) 159–163.
- [18] Y. Okatani, A. Wakatsuki, C. Kaneda, Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain, J. Pineal Res. 28 (2000) 89–96.
- [19] C.B. Phifer, L.M. Terry, Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents, Physiol. Behav. 38 (1986) 887–890.
- [20] R.J. Reiter, Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin, Prog. Neurobiol. 56 (1998) 359–384.
- [21] C. Rodríguez, J.C. Mayo, R.M. Saínz, I. Antolín, F. Herrera, V. Martin, R.J. Reiter, Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin, J. Pineal Res. 36 (2004) 1–9.
- [22] F. Rogério, S.A. Teixeira, L. de Souza Queiroz, G. de Nucci, F. Langone, Expression of neuronal isoform of nitric oxide synthase in spinal neurons of neonatal rats after sciatic nerve transection, Neurosci. Lett. 307 (2001) 61–64.
- [23] F. Rogério, L. de Souza Queiroz, S.A. Teixeira, A.L.R. Oliveira, G. de Nucci, F. Langone, Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection, Brain Res. 926 (2002) 33–41.
- [24] J. Rosenfeld, S. Cook, R. James, Expression of superoxide dismutase following axotomy, Exp. Neurol. 147 (1997) 37–47.
- [25] G. Terenghi, Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors, J. Anat. 194 (1999) 1–14.
- [26] W.T. Wu, Expression of nitric-oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry, Exp. Neurol. 120 (1993) 153–159.
- [27] T. Yoneda, S. Inagaki, Y. Hayashi, T. Nomura, H. Takagi, Differential regulation of manganese and copper/zinc superoxide dismutases by the facial nerve transection, Brain Res. 582 (1992) 342–345.
- [28] W.H.A. Yu, Spatial and temporal correlation of nitric oxide synthase expression with CuZn-superoxide dismutase reduction in motor neurons following axotomy, Ann. N. Y. Acad. Sci. 962 (2002) 111–121.

Artigo Científico 2

"Nitric oxide synthase mRNA expression and activity in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic transection and melatonin administration"

No presente artigo, são descritas as observações sobre a expressão gênica, detecção imunoistoquímica e atividade da óxido nítrico sintase (NOS) na intumescência lombar de ratos depois da secção do ciático no segundo dia de vida (P2) e após a administração de melatonina.

Expressão gênica e atividade das três isoformas da NOS (neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS)) foram verificadas em animais intactos ou axotomizados. Particularmente, tanto a nNOS quanto a iNOS foram observadas em pequenas células do parênquima medular. Em nenhum momento após a axotomia, a nNOS foi observada em motoneurônios. A eNOS foi detectada apenas em células endoteliais. A lesão do ciático não alterou os achados de imunomarcação das três isoformas, a expressão gênica da nNOS e iNOS nem a atividade da NOS cálcio-independente (iNOS), em todos os tempos de sobrevida estudados. Por outro lado, a lesão reduziu os níveis de mRNA para eNOS no quinto dia depois da axotomia e aumentou a atividade da NOS cálcio-dependente (nNOS e eNOS) 1 e 6 horas pós-lesão. O tratamento com melatonina não mudou a expressão da NOS, mas aumentou a atividade da NOS cálcio-dependente e reduziu a da cálcio-independente no terceiro dia. Desta forma, (1) a expressão da NOS é constitutiva na intumescência lombar de ratos neonatos, (2) não é induzida pela secção do ciático e (3) a melatonina é capaz de modular transitoriamente a atividade da NOS cálcio-dependente e da cálcio-independente.

NITRIC OXIDE SYNTHASE mRNA EXPRESSION AND ACTIVITY IN LUMBAR SPINAL CORD OF NEONATAL RATS AFTER SCIATIC TRANSECTION AND MELATONIN ADMINISTRATION

Fábio Rogério ^a, Simone Aparecida Teixeira ^b, Hamilton Jordão Júnior ^c, Carla Cristina Judice Maria ^c, André Schwambach Vieira ^a, Alexandre César Santos de Rezende ^a, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira ^c, Marcelo Nicolás Muscará ^b, Francesco Langone ^a

^a Department of Physiology and Biophysics, State University of Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

^b Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences 1 (ICB 1), University of
 São Paulo, USP, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

^c Department of Genetics and Evolution, State University of Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

ABSTRACT

Sciatic axotomy in rats aged 2 days postnatally (P2) causes extensive death of lumbar motoneurons. Excessive production of nitric oxide (NO) by injured motoneurons has been associated with demise of such cells. NO may be produced by three isoforms of nitric oxide synthase (NOS): neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS). We investigated NOS expression and NO synthesis in the lumbar enlargement of rats after sciatic transection at P2 and treatment with the antioxidant melatonin. At time points ranging from P2 to P7, the expression of each isoform was assessed by RT-PCR and immunohistochemistry; catalytic rates of calcium-dependent (nNOS, eNOS) and independent (iNOS) NOS were measured by the conversion of [³H]L-arginine to [³H]Lcitrulline. All NOS isoforms were expressed and active in unlesioned controls. nNOS and iNOS were detected in a few small cells throughout the parenchyma; the former was not seen in motoneurons. Only endothelial cells were positive for eNOS. Axotomy did not change these immunohistochemical findings, nNOS and iNOS mRNA expression and calcium-independent activity at all survival times. However, sciatic transection reduced eNOS mRNA levels at P7 and increased calcium-dependent activity at 1h and 6h. Melatonin did not alter NOS expression but augmented the calcium-dependent NOS activity and reduced the calcium-independent catalysis at 72h. These results indicate that NOS isoforms are constitutive in the neonatal lumbar enlargement and are not overexpressed after sciatic axotomy. Changes in NO synthesis determined by axotomy and melatonin in the current model are discussed considering some beneficial and deleterious effects that NO may have.

KEYWORDS: Neonatal rats, Sciatic transection; NOS isoforms; RT-PCR; Immunohistochemistry; NOS activity.

40

1. INTRODUCTION

Spinal neuron loss may be caused by peripheral axotomy in neonatal rats (Lowrie and Vrbová, 1992; Lowrie and Lawson, 2000). Oxidative stress consequent to blockage of trophic support provided by glial cells and target organs is considered to be a possible mechanism (Castagné et al., 1999). Particularly, nitric oxide (NO) has been associated with death of motoneurons cultured in the absence of brain-derived neurotrophic factor (Estévez et al., 2002). NO is produced by nitric oxide synthase (NOS), which catalyzes the conversion of L-arginine to an equimolar ratio of L-citrulline and NO. This reaction requires O₂ and NADPH as cosubstrates. Tetrahydrobiopterin (BH₄), FAD, FMN, heme and calmodulin (CaM) are cofactors. Three NOS isoforms have been identified: neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS). As regards CaM binding to the enzyme, activity of the isoforms may be classified as calcium dependent (nNOS and eNOS) or independent (iNOS) (Alderton et al., 2001).

Melatonin, the major hormone of the pineal gland, was recently found to be an antioxidant agent. Specifically, this substance was considered to regulate NO production in the central nervous system, since it reduced NOS activity in the cerebellum and hypothalamus of rats (Pozo et al., 1994; Bettahi et al., 1996). In addition, we have identified a neuroprotective action of this neurohormone on lumbar motoneurons of neonatal rats after sciatic axotomy. Melatonin reduced the neuronal loss consequent to the peripheral injury and increased protein levels of the antioxidant superoxide dismutase 1 in the lumbar enlargement (Rogério et al., 2002, 2005).

In previous studies regarding sciatic transection in newborn rats, we investigated nNOS in the axotomised motoneurons, since other authors have reported its induction in lesioned motoneurons of adult animals and/or associated nNOS with cell death (Wu et al.,

41

1994; Chang et al., 2000; Yu, 2002). In spite of verifying motoneuron loss, we did not detect such isoform immunohistochemically in the injured cells 1 and 5 days following axotomy (Rogério et al., 2002, 2005). Here, in order to complement our previous observations, we combined RT-PCR, immunohistochemistry and enzymatic activity measurement to investigate the three NOS isoforms during the first week after lesion, the time range in which peripheral sciatic section in neonatal rats determines death of most axotomised motoneurons (Lowrie and Vrbová, 1992; Rogério et al., 2005). We also examined whether melatonin would play its neuroprotective role in the present model by modulating NOS expression and/or activity.

2. MATERIALS AND METHODS

Wistar rats (two days of age, P2) were anesthetized by hypothermia (Phifer and Terry, 1986) and the left sciatic nerve was transected at mid-thigh level. Regeneration was prevented by removing a short segment of the distal stump. Pups were returned to their mothers and allowed to survive from P2 to P7. Subcutaneous doses of melatonin (Sigma; 1mg/kg; dissolved in 5% absolute ethanol/saline) were given 1h before transection, immediately after surgery, 1h and 2h later and once daily until P6 (Capsoni et al., 1995). Control groups were either submitted to axotomy and administered vehicle or kept intact. Experimental procedures were approved by the Committee on Animal Care of the State University of Campinas (protocol 509-1).

Histological detection of NOS isoforms was performed at 6h, 1 day, 3 days and 5 days postaxotomy (n=5 per group). Animals were anesthetized with sodium pentobarbital 3% (0.1ml/20g; i.p.) and perfused through the left ventricle with saline followed by 4%

paraformaldehyde in phosphate buffer. Each lumbar enlargement was dissected, processed for paraffin embedding and serially cut (8µm). For immunostaining, the sections were incubated in primary antibody to nNOS (BD Transduction, 610310; 1:100), eNOS (Santa Cruz, sc-654; 1:300) or iNOS (Santa Cruz, sc-651; 1:100) overnight at 20°C and then in biotinylated secondary antiserum (Rockland, 611-1602; 1:200). After covering the sections with peroxidase-conjugated streptoavidin solution (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories), immunoreactivity was observed through diaminobenzidine (DAB; 0.5mg/ml).

NOS mRNA levels were semiquantitatively assessed by reverse transcriptasepolymerase chain reaction (RT-PCR). At 1, 3 or 5 days after transection, pups (n=6 or 3 per axotomised or unlesioned groups, respectively) were anesthetized by hypothermia, had the lumbar enlargement dissected and were decapitated. Total RNA was isolated by TRIzol reagent (Invitrogen, 15596-026) and reverse transcription was performed with the RevertAidTM H Minus M-uLV Reverse Transcriptase kit (Fermentas Life Sciences, EP0451), following the manufacturers' protocol. Samples were normalized to 700 ng/µl to perform amplifications with similar amounts of total cDNA. PCR was performed with primers for nNOS (F: 5'CCCCGTCCTTTGAATACCAG-3'; R: 5'CCGAGAGCCGAGGCCGAACA-3'; 560 bp; (Swain et al., 1997)), eNOS (F: 5'GGAAGATGTTCCAGGCTACAA-3'; R: 5'TAGAGATGGTCCAGTTGGGAG-3'; 904 bp; (Kawai et al., 1995)), iNOS (F: 5'ACAACAGGAACCTACCAGCTCA-3'; R: 5'GATGTTGTAGCGCTGTGTGTCA-3'; 651 bp; (Lyons et al., 1992)) or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; F: 5'CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'; R: 5'AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'; 306 bp; (Wong et al., 1994)). GAPDH was used as internal control because of its physiological expression in the neonatal rat spinal cord (Piehl et al., 1998). Each reaction (20 µl) contained 1 µl of cDNA, 2 µl of 10X PCR buffer (500 mM KCl/100 mM Tris-HCl pH8.5), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 µl of each primer (10 µM) and 2.5 U of Taq DNA polymerase (LGC Biotecnologia, 13-10500; 5U/µl). Amplification protocol was: initial denaturation (5 min, 94°C); repeated cycles of denaturation (30 s, 94°C), annealing (45 s, 67°C (nNOS), 58°C (eNOS) or 63°C (iNOS, GAPDH)), extension (1 min, 72°C) and final extension (7 min, 72°C). Number of cycles was selected from the exponential range for each primer pair (Jiang et al., 2004): 29 (GAPDH), 30 (nNOS) or 33 (eNOS, iNOS). PCR products were electrophoresed through 1% agarose gel containing ethidium bromide (0.5µg/ml). Gels were visualized under UV light, photographed and optical densities of the bands were analyzed using the Image Master VDS software (Amersham Biosciences). Ratio between band densities of the targetgene and GAPDH was defined as Optical Density Ratio (ODR).

For NOS activity assays, animals were sacrificed as described for RT-PCR. At 1h, 6h, 1 day, 3 days or 5 days postaxotomy (n=6-8 per group), lumbar enlargements were dissected, frozen in liquid nitrogen and stored (-80°C). NOS activity was quantified through the conversion of [³H]L-arginine to [³H]L-citrulline (Hiki et al., 1992). Samples were homogenized in 5 volumes of the solution: 50mM Tris-HCl pH 7.4 with 1mM L-citrulline, leupeptin (10 μ g/mL), soybean trypsin inhibitor (10 μ g/mL), aprotinin (2 μ g/mL) and 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride. Fifty μ l were incubated (30 min, 37°C) in 2 mM CaCl₂, 1 mM NADPH, 10 μ M L-arginine containing 100,000 dpm of L-[2,3,4,5-³H]arginine monohydrochloride, CaM (10 μ g/ml), 10 μ M FAD, 100 μ M BH₄. Reaction was stopped with 1 ml of 20 mM HEPES pH 5.4 with 1 mM EGTA and 1 mM EDTA.

44

Samples were applied onto a resin column (Dowex AG 50X-8), supernatants were collected in vials with scintillation liquid and the radioactivity was quantified. Pharmacological controls consisted of either omission of CaCl₂ and addition of 1mM EGTA (to determine calcium-independent NOS) or addition of 1 mM L-NAME. Protein content was determined (Bradford, 1976) and activity was expressed as picomoles of L-citrulline produced per minute and per milligram of protein.

Differences in ODR and activity at each survival time were evaluated by ANOVA followed by the Duncan's test (SAS[®] GLM procedure; SAS Institute). Statistical significance was assumed for p<0.05.

3. RESULTS

Immunostaining for nNOS was noted only in the cytoplasm of some small cells close to the central canal and in the ventral and dorsal horns. Neither axotomy nor melatonin administration altered these findings at any of the analyzed time points. nNOS mRNA levels did not differ among the groups at 1, 3 and 5 days after lesion (1 day: $F_{2,12}=2.62$, p=0.11; 3 days: $F_{2,12}=1.54$, p=0.25; 5 days: $F_{2,12}=2.48$, p=0.13). eNOS was immunohistochemically detected in the endothelium of vessels in the spinal parenchyma and adjacent to the lumbar enlargement such as the anterior spinal artery and the posterior spinal vein. This pattern was seen in all groups at any time postaxotomy, irrespective of sciatic transection or melatonin treatment. eNOS mRNA levels were similar in all groups at 1 and 3 days but were reduced in axotomised rats at 5 days (1 day: $F_{2,12}=0.14$, p=0.87; 3 days: $F_{2,12}=0.18$, p=0.84; 5 days $F_{2,12}=4.35$, p=0.04, vs controls). iNOS immunoreactivity was hardly observed or not at all from 6h to 3 days. At day 5, it was faint, cytoplasmic and

granular in small cells. A few vessels in the parenchyma were also marked for iNOS. This pattern was shown by all groups, regardless of lesion or melatonin treatment. iNOS mRNA did not vary among the groups at each time after the injury (1 day: $F_{2,12}=2.89$, p=0.09; 3 days: $F_{2,12}=0.02$, p=0.98; 5 days: $F_{2,12}=0.00$, p=1.00) (Fig. 1).

Calcium-dependent NOS activity of lesioned animals treated with vehicle was significantly higher than that of unlesioned pups at 1h and 6h (1h: $F_{2,20}=30.85$, p<0.0001; 6h: $F_{2,17}=20.57$, p<0.0001), whereas similar levels were noted at 1, 3 and 5 days. Results of melatonin group were analogous to those of vehicle group except at 3 days, when catalytic rates of the former were significantly increased, in comparison with vehicle and intact groups ($F_{2,18}=5.63$, p=0.01). Calcium-independent NOS activity varied among the groups at day 3, when homogenates from rats receiving melatonin showed significantly decreased levels compared with vehicle and control groups ($F_{2,18}=5.68$, p=0.01). At the other time points, neither melatonin nor axotomy altered such activity (Fig. 2).

4. DISCUSSION

Our findings that the three NOS isoforms are detectable and active in unlesioned controls suggest that NO plays a physiological role in the lumbar enlargement of rats during the first postnatal week. Indeed, several functions have been ascribed to this molecule in the central nervous system (CNS) such as neurotransmission, synaptic plasticity and control of blood cerebral flow (Huang and Lo, 1998). Particularly, targeted disruption of genes in adult mice showed that nNOS is necessary for the maintenance of spinal motoneurons and that eNOS and nNOS regulate neurotransmitter release in the brain (Kano et al., 1998; Keilhoff et al., 2004). The fact that iNOS mRNA, protein and activity were also noticed in unlesioned rats puts forth a constitutive role for this isoform in the neonatal lumbar spinal

cord. To our knowledge, there are no previous works regarding the detection and possible function of iNOS in this region of the CNS of intact newborn rodents. On the other hand, a constitutive expression of this isoform was reported in the nasal airways of humans and was supposedly associated with a bacteriostatic effect (Lundberg et al., 1995).

Regarding axotomised pups that received only dilution vehicle, nNOS and iNOS mRNA levels did not vary in comparison with intact animals at the first, third and fifth day postaxotomy. A significant reduction in eNOS gene expression was observed in lesioned pups at the fifth day. Immunohistochemical findings of nNOS and eNOS did not change from P2 to P7, irrespective of the lesion. iNOS immunolabeling was detected only on the fifth day and, similarly to the other isoforms, was not altered by transection. Taken together, these results indicate that none of the three NOS isoforms is upregulated in the lumbar enlargement of neonatal rats during the first week after sciatic transection. Regarding nNOS expression, our results are in agreement with previous observations based on in situ hybridization analyses that sciatic transection performed in P3 rats failed to induce mRNA of this isoform in the injured neurons on the first, third and seventh days after lesion (Piehl et al, 1998). Conversely, the present study is not in agreement with results of others that nNOS is expressed by axotomised motoneurons (Wu, 1993; Wu et al., 1994; Chang et al., 2000; Yu, 2002). Such discrepancy could be accounted for by differences concerning the techniques used to identify the enzyme, type of lesion and/or age of animals. nNOS has been identified in damaged neurons by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase histochemistry, which not always corresponds precisely to this isoform (Wu, 1993; Xu et al., 2000). Lesion models more intense than peripheral transection such as nerve avulsion may be severe enough to upregulate NOS following neuronal injury (Wu, 1993; Wu et al., 1994; Yu, 2002). Unlike neonatal motoneurons,

mature ones express nNOS in response to a harmful stimulus, as detected by immunohistochemistry (Wu et al., 1994; Yu, 2002; Chang et al., 2000), suggesting an agedependent regulation of nNOS gene.

About the other NOS isoforms, eNOS mRNA synthesis was downregulated in axotomised animals comparing with intact controls on the fifth day. This may have led to blood flow reduction (Huang and Lo, 1998), which would impair maintenance of injured motoneurons surviving to axotomy and other cells. However, at the same time point, there were no immunohistochemical and catalytic differences between these groups suggestive of reduced perfusion. Specifically, such decreased expression does not seem to be essential to motoneuron loss in the present model because most of transected neurons die during the first twenty-four hours after lesion (Rogério et al., 2005). As to iNOS, while it has been frequently described as inducible by harmful stimuli (Kroncke et al., 2000), our results do not support a similar response of this isoform in the neonatal spinal cord as iNOS mRNA levels and calcium-independent activity in axotomised groups treated with vehicle were similar to those of controls at all the studied time points.

Calcium-dependent NOS activity in rats receiving only vehicle was higher than that measured in controls at the first and sixth hours. Considering that the method we used quantifies both nNOS and eNOS activities and that NO plays both toxic and beneficial roles, it is difficult to firmly establish the physiological implication of such finding. NO may be toxic when it reacts with other free radicals like superoxide and produces peroxynitrite, which causes cell death. In contrast, NO is also considered to play beneficial roles as regulating tissue perfusion and neurotransmission (Bredt, 1999; Kroncke et al., 2000). We previously observed in the present experimental model that the majority of lesioned motoneurons are lost and protein levels of superoxide dismutase 1 are reduced at the first day postaxotomy (Rogério et al, 2005). Thus, it may be hypothesized that the initial increment in calcium-dependent activity is harmful as peroxynitrite synthesis would be favored.

We observed an effect of melatonin on both calcium-dependent and calciumindependent NOS activities on the third day after lesion. The neurohormone may have reached an optimal plasmatic concentration to modulate NOS activity at this survival time as its metabolism is delayed in neonatal rats at P5 (Weinberg, 1981). The mechanism by which this compound regulates NO synthesis in the current conditions is unknown. Our results suggest that the neurohormone does not alter the expression of NOS isoforms and, unlike previously reported by others (Pozo et al., 1994; Bettahi et al., 1996), does not depend on calcium to change NOS activity. In fact, melatonin was able to interfere with NOS catalytic rates in the presence or absence of calcium. These transitory changes in NOS activity may not have deleterious consequences on the transected cells. We previously verified that axotomised neonatal rats which received melatonin showed a higher number of surviving motoneurons in the lumbar enlargement five days after lesion, compared with rats treated with dilution vehicle only (Rogério et al., 2002, 2005). Finally, melatonin did not prevent augmented NO synthesis at one and six hours. As discussed above, NO production during this period may be predominantly harmful. A possible compensatory action of this antioxidant could be by increasing superoxide dismutase 1 expression (Rogério et al., 2005).

In conclusion, the three isoforms of NOS are constitutively expressed in the lumbar enlargement of neonatal rats from P2 to P7 and are not upregulated after peripheral sciatic transection. Particularly, motoneurons do not express nNOS under normal conditions or following direct injury. Axotomy alters calcium-dependent NOS activity at the first and sixth hours after lesion and melatonin modulates NO synthesis on the third day. Since NO may have both beneficial and cytotoxic effects, it is essential to analyze changes in NO synthesis taking into account the physiological context in which they occur.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to Dr. A. X. Linhares for his assistance with statistical analysis. We are also grateful to Dr. L. S. Queiroz for his comments on this manuscript. This study was supported by grants from FAPESP (01/06991-1). F. Rogério, A.S. Vieira and A.C.S. Rezende are supported by scholarships from FAPESP (03/03717-1, 05/51335-6 and 04/14210-8).

REFERENCES

- W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, Biochem. J. 357 (2001) 593-615.
- I. Bettahi, D. Pozo, C. Osuna, R.J. Reiter, D. Acuna-Castroviejo, J.M. Guerrero, Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus, J. Pineal Res. 20 (1996) 205-210.
- M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.
- D.S. Bredt, Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology, Free Radic. Res. 31 (1999) 577-596.
- S. Capsoni, B.M. Stankov, F. Fraschini, Reduction of regional cerebral blood flow by melatonin in young rats, Neuroreport 6 (1995) 1346-1348.
- V. Castagné, M. Gautschi, K. Lefevre, A. Posada, P.G.H. Clarke, Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system, Progr. Neurobiol. 59 (1999) 397-423.
- H.M. Chang, E.A. Ling, J.H. Lue, C.Y. Wen, J.Y. Shieh, Melatonin attenuates neuronal NADPH-d/NOS expression in the hypoglossal nucleus of adult rats following peripheral nerve injury, Brain Res. 873 (2000) 243-251.
- A.G. Estévez, A. Kamaid, J.A. Thompson, T.L. Cornwell, R. Radi, L. Barbeito, J.S. Beckman, Cyclic guanosine 5' monophosphate (GMP) prevents expression of neuronal nitric oxide synthase and apoptosis in motor neurons deprived of trophic factors in rats, Neurosci. Lett. 326 (2002) 201-205.

- K. Hiki, R. Hattori, C. Kawai, Y. Yui, Purification of insoluble nitric oxide synthase from rat cerebellum, J. Biochem. 111 (1992) 556-558.
- P.L. Huang, E.H. Lo, Genetic analysis of NOS isoforms using nNOS and eNOS knockout animals, Prog. Brain Res. 118 (1998) 13-25.
- K.W. Jiang, F. Gao, Q.X. Shui, Z.S. Yu, Z.Z. Xia, Effect of diazoxide on regulation of vesicular and plasma membrane GABA transporter genes and proteins in hippocampus of rats subjected to picrotoxin-induced kindling, Neurosci. Res. 50 (2004) 319-329.
- T. Kano, M. Shimizu-Sasamata, P.L. Huang, M.A. Moskowitz, E.H. Lo, Effects of nitric oxide synthase gene knockout on neurotransmitter release in vivo, Neuroscience 86 (1998) 695-699.
- N. Kawai, D.B. Bloch, G. Filippov, D. Rabkina, H.C. Suen, P.D. Losty, S.P. Janssens,
 W.M. Zapol, S. Monte, K.D. Bloch, Constitutive endothelial nitric oxide synthase gene expression is regulated during lung development, Am. J. Physiol. 268 (1995) L589-L595.
- G. Keilhoff, H. Fansa, G. Wolf, Neuronal NOS deficiency promotes apoptotic cell death of spinal cord neurons after peripheral nerve transection, Nitric Oxide 10 (2004) 101-111.
- K.D. Kroncke, C.V. Suschek, V. Kolb-Bachofen, Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity, Antioxid. Redox Signal. 2 (2000) 585-605.
- M.B. Lowrie, G. Vrbová, Dependence of postnatal motoneurones on their targets: review and hypothesis, Trends Neurosci. 15 (1992) 80-84.
- M.B. Lowrie, S.J. Lawson, Cell death of spinal interneurons, Prog. Neurobiol. 61 (2000) 543-555.
- J.O.N. Lundberg, T. Farkas-Szallasi, E. Weitzberg, J. Rinder, J. Lidholm, A. Anggåard, T. Hökfelt, J.M. Lundberg, K. Alving, High nitric oxide production in human paranasal sinuses, Nature Medicine 1 (1995) 370-373

- C.R. Lyons, G.J. Orloff, J.M. Cunningham, Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line, J. Biol. Chem. 267(1992) 6370-6374.
- C.B. Phifer, L.M. Terry, Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents, Physiol. Behav. 38 (1986) 887–890.
- F. Piehl, H. Hammarberg, G. Tabar, T. Hokfelt, S. Cullheimm, Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat motoneurons depends on age and type of injury, Exp. Brain. Res. 119 (1998) 191-204.
- D. Pozo, R.J. Reiter, J.P. Calvo, J.M. Guerrero, Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum, Life Sci. 55 (1994) PL455-PL460.
- F. Rogério, L.S. Queiroz, S.A.Teixeira, A.L.R. Oliveira, G. Nucci, F. Langone, Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection, Brain Res. 926 (2002) 33-41.
- F. Rogério, S.A. Teixeira, A.C.S. Rezende, R.C. Sá, L.S. Queiroz, G. Nucci, M.N. Muscará, F. Langone, Superoxide dismutase isoforms 1 and 2 in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin treatment, Brain Res. Dev. Brain Res. 154 (2005) 217-225.
- M.G. Swain, T. Le, A.W. Tigley, P. Beck, Hypothalamic nitric oxide synthase is depressed in cholestatic rats, Am. J. Physiol. 272 (1997) G1034-1040.
- U. Weinberg, Evidence that melatonin retention by the neonatal rat is greatly increased as compared to the adult: a novel biochemical mechanism, Brain Res. 217 (1981) 221-224.

- H. Wong, W.D. Anderson, T. Cheng, K.T. Riabowol, Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "primer-dropping" method, Anal. Biochem. 223 (1994) 251-258.
- W.T. Wu, Expression of nitric-oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry, Exp. Neurol. 120 (1993) 153-159.
- W. Wu, F.J. Liuzzi, F.P. Schinco, A.S. Depto, Y. Li, J.A. Mong, T.M. Dawson, S.H. Snyder. Neuronal nitric oxide synthase is induced in spinal neurons by traumatic injury, Neuroscience 61 (1994) 719-726.
- M. Xu, Y.K. Ng, S.K. Leong, Neuroprotective and neurodestructive functions of nitric oxide after spinal cord hemisection, Exp. Neurol. 161 (2000) 472-480.
- W.H. Yu, Spatial and temporal correlation of nitric oxide synthase expression with CuZnsuperoxide dismutase reduction in motor neurons following axotomy, Ann. N. Y. Acad. Sci. 962 (2002) 111-121.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Immunostaining and representative RT-PCR for NOS isoforms in the lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy. Transverse sections of the lumbar enlargement immunoreacted for nNOS (A-C), eNOS (F-H) or iNOS (K-M) and counterstained with hematoxylin (A-C) or methyl green (F-H). Sections marked for iNOS were not counterstained. Lesioned animals treated with dilution vehicle and sacrificed 3 (A–C) or 5 (F–H; K–M) days after transection (A, F, K and M: contralateral side; B, G and L: ipsilateral side). nNOS was noted in small cells in the ventral (arrow and inset in B) and dorsal horns and around the central canal (arrow and inset in C). nNOS mRNA levels (D-E) did not differ among the groups at 1, 3 and 5 days postaxotomy. eNOS was seen in endothelial cells like those of the spinal parenchyma (F and G) and anterior spinal artery (H). eNOS mRNA expression (I–J) did not vary at 1 and 3 days but was decreased in axotomised pups at day 5 (*p=0.04, vehicle and melatonin groups vs control). iNOS was detected in small cells (arrow and inset in M, dorsal horn) and some vessels in the spinal parenchyma (K, anterior horn). iNOS mRNA levels (N and O) were similar among the groups at 1, 3 and 5 days. No motoneuron (counterstained in A and B and indicated by arrows in G and K) was positive for any of the isoforms. Neither sciatic section nor melatonin changed the immunostaining patterns at any of the studied time points. DNA ladder: 100 bp, the most intense band corresponds to 500 bp; C: unlesioned control, V: vehicle, M: melatonin, ODR: optical density ratio, AU: arbitrary units, bp: base pairs. Scale bars: 50 µm (A–C; F, G; K–M), 15 µm (H) and 10 µm (insets).

Figure 2 – NOS activity measured in the lumbar enlargement of neonatal rats at 1h, 6h, 1 day, 3 days and 5 days after sciatic transection. Data are presented as means \pm SEM. At

each time point, means with different letters are statistically different. Calcium-dependent activity (A) of lesioned groups was significantly higher than that of controls at 1h (p<0.0001, vehicle and melatonin vs control) and 6h (p<0.0001, vehicle and melatonin vs control). Melatonin administration increased the catalytic rates at 3 days (p=0.01, melatonin vs control and vehicle). Calcium-independent activity (B) in axotomised animals was similar to that of controls except at 3 days, when it was reduced by the administration of the neurohormone (p=0.01, melatonin vs control and vehicle).





Figure 2

Artigo Científico 3

"Bax and Bcl-2 expression and TUNEL labeling in lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy and melatonin treatment"

Neste artigo, são relatados os achados sobre a expressão gênica e imunomarcação da Bax e Bcl-2 e identificação das células com fragmentação de DNA pela técnica de TUNEL na intumescência lombar de ratos neonatos após a secção do ciático em P2 e tratamento com melatonina. A imunorreatividade para Bax foi intensa em pequenas células distribuídas pela substância cinzenta. Os motoneurônios apresentaram tênue marcação citoplasmática. Em ratos lesados que receberam apenas veículo de diluição, houve aumento dos níveis de mRNA para Bax e do número das pequenas células Bax-positivas na hemimedula dorsal ipsilateral à lesão um dia após a axotomia, em comparação com animais íntegros. Neste mesmo período, verificou-se resultado similar com relação ao número dos núcleos TUNEL-positivos. Em nenhum momento pós-axotomia, notou-se mudança na imunorreatividade para Bax e positividade para a reação de TUNEL em motoneurônios. Marcação para Bcl-2 foi detectada no citoplasma dos motoneurônios e das demais células da intumescência lombar e, como observado para os níveis de mRNA para Bcl-2, não foi alterada pela secção do ciático A administração de melatonina reduziu a perda de motoneurônios 1, 3 e 5 dias pós-lesão e o número de núcleos TUNEL-positivos 1 dia depois da secção do ciático, em comparação com os animais axotomizados e tratados somente com veículo. Assim, (1) a secção do ciático em P2 aumenta a expressão de mRNA e a quantidade de células marcadas para Bax e o número de núcleos TUNEL-positivos na intumescência lombar de ratos neonatos e (2) a melatonina protege os motoneurônios axotomizados sem alterar a expressão de Bax e Bcl-2 nestas células.

BAX AND BCL-2 EXPRESSION AND TUNEL LABELING IN LUMBAR ENLARGEMENT OF NEONATAL RATS AFTER SCIATIC AXOTOMY AND MELATONIN TREATMENT

Fábio Rogério ^a, Hamilton Jordão Júnior ^b, André Schwambach Vieira ^a, Carla Cristina Judice Maria ^b, Alexandre César Santos de Rezende ^a, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira ^b, Francesco Langone ^a

^a Department of Physiology and Biophysics, State University of Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil
^b Department of Genetics and Evolution, State University of Campinas, UNICAMP, 13083-

970, Campinas, SP, Brazil
ABSTRACT

Peripheral axotomy in neonatal rats induces neuronal death. We studied the anti-apoptotic protein Bcl-2 and cell-death promoter Bax in spinal cord of neonatal rats after sciatic transection and treatment with melatonin, a neuroprotective substance. Pups were unilaterally axotomised at P2 and received melatonin (1 mg/kg; sc) or vehicle 1h prior to lesion, immediately after, at 1h, 2h and then once daily. Rats were sacrificed at 3h, 6h, 24h, 72h and 5 days postaxotomy. Intact animals were used as controls. Lumbar enlargement was processed for Nissl staining, immunohistochemistry and RT-PCR for Bax or Bcl-2 and TUNEL reaction. Motoneurons (MN) of lesioned (L) and normal (N) sides were counted and MN survival ratio (MSR=L/N) was calculated. Bax and Bcl-2 showed cytoplasmic immunoreactivity (IR). Bax IR was noticeable in small cells but less evident in MN. In unlesioned pups, some Bax-positive small cells (B+) and TUNEL-positive nuclei (T+) were mainly seen in the dorsal horn. In lesioned animals given vehicle, Bax mRNA levels and numbers of B+ and T+ were increased in comparison with intact controls at 24h postaxotomy. The basal IR for Bax in MN was not changed by axotomy. Bcl-2 IR was noted in all cells and, like Bcl-2 mRNA, was unaltered after lesion. Melatonin reduced MN loss at 24h, 72h and 5 days and T+ at 24h after lesion but did not interfere with Bax or Bcl-2 expression. These results suggest that (1) sciatic transection at P2 increases Bax mRNA and the amount of B+ and T+ in the lumbar enlargement, (2) Bax IR in immature MN is not altered by axotomy and (3) melatonin protects MN and dorsal horn cells through a mechanism independent of Bax and Bcl-2.

KEYWORDS: Neonatal rats; Sciatic transection; Cell death; Bax; Bcl-2; Melatonin

1. INTRODUCTION

Programmed cell death plays an essential role to eliminate the excess of neurons produced within the period of neurogenesis. In rodents, such cell loss takes place mainly during the embryonic life but is also observed in the early neonatal period. In both developmental stages, trophic factors from the innervated organs and cells of the central nervous system (CNS) are considered to support neuronal survival. Specifically, motoneurons and interneurons of the lumbar enlargement of rats continue to be dependent on trophic inputs after birth. In fact, sciatic nerve transection, which would lead to disruption of trophic inputs, triggers loss of these neuronal cells when performed during the first postnatal week (Lowrie and Vrbová, 1992; Lowrie and Lawson, 2000; Oliveira et al., 2002).

Irrespective of being programmed or induced by sciatic axotomy, neuronal death in the lumbar spinal cord of neonatal rats has been described as apoptotic (Lowrie and Lawson, 2000; Oliveira et al., 2002). Apoptosis is a process of cell death morphologically characterized by chromatin condensation, DNA and nuclear fragmentation, cytoplasmic shrinkage and formation of apoptotic bodies (Lossi and Merighi, 2003). Proteins of the Bcl-2 family have been shown to regulate cell death in the CNS. Among these proteins, Bcl-2 acts by promoting cell survival and Bax plays a pro-apoptotic role. Bcl-2 is placed on the mitochondrial outer membrane, while Bax might be either on the same membrane or in the cytosol. During the process of cellular demise, activated Bax translocates to the mitochondria and triggers molecular pathways (e.g. cytochrome c release, apoptosome formation and caspase activation), which lead to cell loss. Bcl-2 inhibits its counterpart by heterodimerization with Bax preventing cell death. Finally, the intracellular balance between Bcl-2 and Bax determines the cell fate (Adams and Cory, 1998). Previous studies regarding Bax and Bcl-2 expression after peripheral axotomy have focused on adult rats and showed that neuronal survival after lesion is associated with increase in Bcl-2 levels and downregulation of Bax (Gillardon et al, 1996; Baba et al., 1999). To our knowledge, only immunohistochemical detection of Bax has been performed to investigate the consequences of the same injury in neonatal rats (Tiraihi and Rezaie, 2003).

In the last decade, melatonin was shown to reduce apoptotic cell death in the CNS (Reiter, 1998). Pharmacological doses of the neurohormone reduced DNA fragmentation in dopaminergic neurons of the substantia nigra and striatum of rodents treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) or 6-hydroxy-dopamine, neurotoxins used to induce Parkinson's disease-similar signs in animals (Acuña-Castroviejo et al., 1997; Joo et al., 1998; Ortiz et al., 2001; Antolin et al., 2002). Recently, we reported the neuroprotective effect of daily administration of melatonin on lumbar motoneurons of the sciatic pool of neonatal rats after unilateral nerve transection (Rogério et al., 2002).

In the present work, we studied the expression of Bax and Bcl-2 and DNA fragmentation in the lumbar enlargement of rats after sciatic transection performed during the first postnatal week. Additionally, aiming to better understand the mechanisms of action of melatonin in this model, we investigated such apoptotic events after sciatic axotomy and administration of the neurohormone.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Surgical procedures, melatonin treatment and experimental groups

Two-day-old rats (P2) were deeply anesthetized by hypothermia, as previously described (Phifer and Terry, 1986). The left sciatic nerve was exposed and cut at mid-thigh level. A short segment of the distal stump was removed to prevent axonal regeneration.

After recovering from anesthesia, the pups were returned to their mothers. Surgical procedures were approved by the Committee on Animal Care of the State University of Campinas (protocol # 509-1).

Melatonin treatment was based on previous protocols (Capsoni et al., 1995; Joo et al., 1998; Antolín et al., 2002). Specifically, melatonin (Sigma; 1mg/kg) dissolved in absolute ethanol:saline (5:95, v/v) was subcutaneously given 1 h prior to sciatic lesion, immediately after the surgery, at 1 h and 2 h postaxotomy and once daily for the following 4 days. A control group was submitted to sciatic axotomy and treated in the same way with dilution vehicle only. Animals were killed at 3 h, 6 h, 1 day, 3 days or 5 days postlesion. Considering the three latter time points, the last dose of melatonin or vehicle was administered on the day before sacrifice. Intact control rats, submitted to neither surgical procedures nor vehicle treatment, were sacrificed at ages corresponding to the postaxotomy studied time points: P2 (3 and 6 h after lesion), P3 (1 day), P5 (3 days) or P7 (5 days).

Numbers of animals per group at each time point were 5 for cresyl violet staining and immunohistochemistry and 3 for TUNEL technique. For RT-PCR, such numbers were 6 (melatonin or vehicle-treated rats) and 3 (intact controls).

2.2 Sample dissection for histological assessment and motoneuron counting

After each survival period, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital 3% (0.1ml/20g; i.p.) and transcardially perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. The lumbar spinal cord was dissected, embedded in paraffin and serial sections (8 µm) were obtained. Of every 7 sections the first, fourth and seventh were stained with cresyl violet. The fifth and sixth were immunoreacted for Bax or

Bcl-2, respectively. The third was used for TUNEL labeling. Twenty-two sections were discarded after every 7-section series.

After cresyl violet staining, motoneurons of the ventrolateral group of the lumbar enlargement were counted (twenty sections per rat). Neuronal counting was performed blind to treatment. Only large multipolar motoneurons with a clearly visible nucleolus were considered (Clowry, 1993). In axotomised animals, the unoperated contralateral side of the spinal cord was used as control. The ratio between the number of motoneurons counted in the operated and control sides (or in the left and right sides of intact animals) was defined as Motoneuron Survival Ratio (MSR).

2.3 Immunohistochemistry for Bax and Bcl-2, TUNEL reaction protocol and assessment of Bax- or TUNEL-positive cells

For immunostaining procedures, endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide/10 mM PBS pH 6.0 for 15 min. Afterwards, the sections were microwaved in 10 mM citrate buffer pH 6.0 and incubated overnight with primary antibody either to Bax or Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology; rabbit polyclonal; cat# sc-526 (P-19) and sc-492 (N-19), respectively) applied in 1:200 dilution at 20°C. The sections were incubated with biotinylated secondary antibody (Rockland, cat#611-1602; 1:200; 1 h), covered with peroxidase-conjugated streptavidin solution (Vector Laboratories; Vectastain ABC kit; 1 h) and processed for DAB reaction (0.5mg/ml). Any cell type showing cytoplasmic staining was considered positive for qualitative analysis.

TUNEL reaction (Gavrieli et al., 1992) was performed with the TdT-FragEL[™] DNA Fragmentation Detection Kit (cat#QIA33, Oncogene Research Products) according to the manufacturer's instructions. All steps were performed at 20°C, except TdT enzyme reaction. In brief, sections were deparaffinized and permeabilized with proteinase K/10 mM Tris pH 8.0 (1:100; 20 min). Endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂/methanol (5 min). The sections were incubated with equilibration buffer (30 min), then with TdT enzyme solution (90 min, at 37° C) and after with stop buffer (5 min). Labeled DNA was detected by applying blocking buffer (10 min) followed by peroxidase-conjugated streptoavidin solution (30 min) and DAB reaction. Methyl Green was used as counterstain.

For each animal, six sections were used for counting the small Bax- (Fig. 4) or TUNEL-positive cells in the side ipsilateral to the axotomy (or in the left side of intact controls) (Lawson et al., 1997). Sections were examined with the aid of an atlas (Molander and Grant, 1995) to identify the regions which approximately correspond to Rexed laminae I-VI (dorsal horn) and IX (ventrolateral group of motoneurons) of the lumbar level.

2.4 Semiquantitative analysis of Bax mRNA and Bcl-2 mRNA by RT-PCR

At 1, 3 or 5 days postaxotomy the rats were anesthetized by hypothermia and, after immediate dissection of the lumbar enlargement, were decapitated. Total RNA from the lumbar enlargement was isolated by using TRIzol reagent (Invitrogen, #15596-026), chloroform and isopropyl alcohol following the manufacturer's protocol. Total RNA (1.5 µg) was transcribed to cDNA with the RevertAidTM H Minus M-uLV Reverse Transcriptase kit (Fermentas Life Sciences, #EP0451), as recommended by the manufacturer. Finally, all samples (20 µl) were normalized to 700 ng/µl so that PCRs were performed with similar amounts of total cDNA. PCR (total volume of 20 µl) was performed for 5'AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT-3'; with primers Bax (F: R: 5'CAAAGATGGTCACTGTCTGC-3'; Han et al., 1996), Bcl-2 (F: 5'GTATGATAACCGGGAGATCG-3'; R: 5'AGCCAGGAGAAATCAAACAG-3'; Sato

66

et al., 1994) or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; F: 5'CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'; R:

5'AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'; Wong et al., 1994). GAPDH was used as internal control due to its physiological expression in the neonatal rat lumbar spinal cord (Piehl et al., 1998). Each PCR contained: 1 µl of cDNA, 2 µl of 10X PCR buffer (500 mM KCl/100 mM Tris-HCl pH8.5), 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1.0 µl of each primer (10 µM) and 2.5 U of Taq DNA polymerase (LGC Biotecnologia, #13-10500; 5U/µl). Amplification program was performed as follows: initial denaturation for 5 min at 94°C; repeated cycles of denaturation for 30 s at 94°C, annealing for 45 s at 59°C (Bax), 58°C (Bcl-2) or 63°C (GAPDH), extension for 1 min at 72°C and final extension for 7 min at 72°C. Number of PCR cycles for each primer pair was chosen from the linear amplification range identified by plotting the optical density of the PCR products versus number of cycles, as previously described (Jiang et al., 2004). Thus, amplification was performed with 29 (Bax and GAPDH) or 32 (Bcl-2) cycles. Expected size for PCR products were: 361 bp (Bax), 612 bp (Bcl-2) and 306 bp (GAPDH). The amplified fragments were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and observed by ethidium bromide staining (0.5µg/ml). Gels were visualized under UV light and photographed. Optical densities of the bands were determined by using the Image Master VDS software (Amersham Biosciences). The ratio between the optical density of the target-gene band and GAPDH band for each sample was defined as Optical Density Ratio (ODR).

67

2.5 Statistical analysis

For each time point, differences in MSR, Bax- or TUNEL-positive cell counting and ODR for Bax and Bcl-2 were assessed by ANOVA followed by the Duncan's test (SAS[®] GLM procedure; SAS Institute). P values less than 0.05 were considered significant.

3. RESULTS

3.1 Motoneuron quantification

At 3 and 6 h postaxotomy there was no statistical difference among motoneuron survival ratio (MSR) of all groups ($F_{2,12}$ =1.06, p=0.3756 and $F_{2,12}$ =0.75, p=0.4949, respectively). On the other hand, at 1, 3 and 5 days after sciatic transection MSR of vehicle treated animals was significantly reduced compared with intact controls (1 day: $F_{2,12}$ =25.45, p<0.0001; 3 days: $F_{2,12}$ =49.09, p<0.0001; 5 days: $F_{2,12}$ =19.42, p=0.0002). Such reduction was prevented by melatonin administration. On the first day after lesion MSR of melatonin-treated rats was similar to that of intact controls. On the third and fifth days that similarity was no longer observed, however MSR was higher in melatonin treated group than in vehicle given group ($F_{2,12}$ =49.09, p<0.0001 and $F_{2,12}$ =19.42, p=0.0002, respectively) (Figs. 1 and 2).

3.2 Bax and Bcl-2 expression after sciatic axotomy and melatonin administration

Expression of Bax and Bcl-2 was investigated by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry.

Bax mRNA levels were significantly higher in lesioned animals in comparison with the respective controls at 1 and 3 days after sciatic transection ($F_{2,12}$ =12.45, p=0.0012 and $F_{2,12}$ =4.32, p=0.0387, respectively). No statistical difference was observed among the

groups at 5 days postaxotomy ($F_{2,12}=3.65$, p=0.0577). Immunohistochemistry for Bax showed intensely marked small cells in the spinal parenchyma of both intact and lesioned groups. At 1 day after axotomy, the total number of these cells significantly rose in the ipsilateral lumbar enlargement of lesioned animals in comparison with controls, irrespective of melatonin treatment ($F_{2,6}=7.06$, p=0.0265). Such rise was mainly observed in the dorsal horn. At the other time points, the total number of Bax-positive cells in the axotomised groups was not statistically different from that observed in controls. Particularly, Bax immunostaining in motoneurons was cytoplasmic and faint. This finding did not change after sciatic section or melatonin administration and was essentially the same at all time points (Figs. 3, 4 and 5).

Bcl-2 mRNA was similar in all groups at each time point (1 day: $F_{2,12}=0.96$, p=0.4089; 3 days: $F_{2,12}=2.32$, p=0.1406; 5 days: $F_{2,12}=1.97$, p=0.1815). Bcl-2 was immunohistochemically detected in the cytoplasm of motoneurons and other smaller cell types. At all time points, the most intense reaction was observed in motoneurons. This immunoreactivity pattern did not alter after each survival time, irrespective of axotomy or melatonin treatment (Figs. 3 and 6).

3.3 Detection of TUNEL-positive cells following sciatic transection and melatonin treatment

DNA fragmentation was detected by the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) technique. TUNEL-labeled cells were localized to the grey matter and mainly in the dorsal horn of both control and lesioned groups. At 1 day after lesion, the total number of marked cells significantly increased in vehicle treated rats, compared with melatonin given and intact animals ($F_{2,6}$ =36.91, p=0.0004). Particularly, the

increase in the number of TUNEL-stained cells was mainly observed in the dorsal horn. Melatonin administration prevented this rise in comparison with vehicle treatment ($F_{2,6}=31.03$, p=0.0007), keeping the number of stained cells similar to that of intact controls. At 3 h, 6 h, 3 days and 5 days postaxotomy the number of labeled cells did not differ between the groups. TUNEL-positive cells were hardly ever observed in the sciatic motoneuron pool (ventrolateral group) and showed no morphological features suggestive of motoneurons (Figs. 7 and 8).

4. DISCUSSION

4.1 Bax and Bcl-2 expression and TUNEL labeling in the lumbar enlargement of intact rats and after sciatic axotomy at P2

Both mRNA and immunoreactivity for Bax were detected in the lumbar enlargement of intact or lesioned pups. The protein was noticeably marked in isolated small cells localized to ventral and dorsal horns and was faintly seen in motoneurons. Particularly, Bax immunostaining pattern in the latter cells was not changed after sciatic section. The constitutive and unaltered expression of Bax in motoneurons of neonatal rats that we report here is in agreement with prior observations in spinal motoneurons of adult rodents (Krajewski et al., 1994; Gillardon et al., 1996). The functional importance of such expression is not known. However, beneficial roles of Bax on neuronal maintenance were reported by others. CNTF-dependent ciliary neurons injected with a Bax vector and overexpressing this molecule were rescued when cultured in the absence of that growth factor (Middleton et al., 1996). Sun and Oppenheim (2003) observed that axotomised sciatic motoneurons of neonatal Bax-knockout mice survived longer than those of the wild controls but underwent severe atrophy.

The fact that Bax was not upregulated in axotomised motoneurons in the current study disagrees with previous observations. Tiraihi and Rezaie (2003) reported a diverse range of immunostaining patterns for Bax in motoneurons after sciatic transection in newborn rats. Such difference between this work and ours may have occurred because we performed the injury at P2 and the other authors at P5. Moreover, our results that the faint immunoreactivity for Bax in neonatal motoneurons remained virtually unaltered after axotomy suggest that enhanced expression of Bax is not an essential step of the death process of such cells. In fact, evidence by others also suggests that loss of certain types of motoneuron does not seem to be mainly dependent on Bax action. Jacob et al. (2005) studied the spinal nucleus of the bulbocavernosus (SNB) and the retrodorsolateral nucleus (RDLN) of the lower lumbar spinal cord of bax-/- adult mice by immunolabeling motoneurons with SMI-32, an antibody that binds to neurofilament H. The authors reported that SNB motoneuron number of bax-/- males was analogous to that of bax+/+ male controls. Conversely, the same mice with bax deletion showed an increased motoneuron number in the RDLN, compared with bax+/+ males. Finally, bax-/- females had more motoneurons in both nuclei, in comparison with bax +/+ females. Thus, factors such as the CNS region where the cells are localized and/or external influences on distinct neuronal groups (like hormonal action) may also determine motoneuron survival.

On the other hand, Bax might have acted as a pro-apoptotic element in other cell types in the present study. In intact controls the majority of the intensely marked small cells was observed at P2, when naturally occurring cell death in rat lumbar spinal cord reaches one of its highest degrees in the neonatal period (Lawson et al., 1997; Lowrie and Lawson, 2000). Moreover, axotomy increased not only Bax mRNA levels but also the number of Bax-positive cells in the ipsilateral dorsal horn one day after lesion, compared with

unlesioned pups. Another finding that reinforces the apoptotic role of Bax in our investigation is that most cells with fragmented DNA in unlesioned or axotomised rats were noted at P2–P3 and in the superficial laminae. In addition, intensely stained Bax-positive cells and TUNEL marked cells were morphologically similar (small and round), thus suggesting that most cells with fragmented DNA completed the death process after having expressed high levels of Bax. Finally, on the third day postaxotomy, a small but significant rise in Bax mRNA expression was noted in axotomised rats. However, this latter rise did not correspond with the counting of immunostained cells. Bax might have been associated with cell death in the dorsal horn during the first three days after lesion. Consequently, such cellular loss could have reduced the number of Bax-positive cells quantified in the immunoreacted sections.

As stated above, the majority of TUNEL-positive cells in unlesioned rats was also noted at P2–P3. Probably, these cells with fragmented DNA were in process of physiological death during the neonatal period. It is possible that these marked cells correspond to neurons (interneurons or projection neurons). Indeed, Lawson et al. (1997) used specific markers to either neuronal cells (neuron specific enolase and protein gene product 9.5, PGP-9.5) or glia (glial fibrillary acidic protein) to identify the cells undergoing programmed death in the lumbar spinal cord of uninjured neonatal rats at P2 and only apoptotic neurons were detected. Regarding axotomised pups, the number of TUNELpositive cells significantly increased in the ipsilateral dorsal horn of vehicle treated rats one day after lesion, compared with melatonin treated and control animals. Axotomy may have led to neuronal loss, as previously reported by Lawson and Lowrie (1998) after crushing the sciatic nerve of P2 rats and identifying the dying cells with PGP-9.5. Such cell loss would be consequent to deafferentation of dorsal horn neurons. Specifically, degeneration of transected sciatic sensitive fibers and their central processes would impair peripheral trophic factor supply to cells in the dorsal region of the ipsilateral hemicord (Murray et al., 1990; Whiteside et al., 1998)

Despite the fact that motoneuron loss was observed from one to five days postaxotomy in cresyl violet-stained sections, TUNEL-positive cells were rarely seen in the sciatic motoneuron pool of lesioned animals. Regarding the first day after injury, this result is at variance with previous observations from Oliveira et al. (1997, 2002), who detected a small but significant rise in the number of TUNEL-marked cells in the ventral horn of rats after sciatic transection at P2. Such difference could be attributed to the short duration of immature motoneuron death following peripheral axotomy. Lawson and Lowrie (1998) reported that the majority of motoneurons with fragmented DNA was observed one day after sciatic crush performed in rats at P2 and estimated that the cell death process would last 2 hours. We cannot rule out the possibility that the dying cells we observed in the ventral horn are interneurons. If so, our result that most of the TUNEL-positive cells were seen in the dorsal horn ipsilateral to axotomy suggests that interneurons of the ventral horn would be less susceptible to peripheral trophic deprivation than the dorsal ones. In fact, spinal interneuron survival may depend on afferents not only from sensitive fibers of dorsal root ganglion but also from cellular inputs within the spinal cord (Lowrie and Lawson, 2000).

mRNA levels and immunostaining for Bcl-2 were observed in the lumbar enlargement of intact controls and were not altered by sciatic axotomy. The constitutive expression of Bcl-2 in virtually all cell types of unlesioned animals might be related to its recognized function of supporting cellular survival (Dubois-Dauphin et al., 1994; Lossi and Merighi, 2003). As regards axotomised rats, it is possible that a slight increase in Bcl-2 expression occurred without being detected by immunohistochemistry. In this case, Bcl-2 would have favored the maintenance of transected motoneurons and/or small Bax-positive cells. Particularly, the latter would have been prevented from finishing the cell death process. Another possibility is that few cells did overexpress Bcl-2. However, such fact would not have been verified by RT-PCR, since this technique determines total mRNA levels of the whole lumbar enlargement. Irrespective of these possible events, our results showing no changes in mRNA levels and immunostaining pattern for Bcl-2 in motoneurons suggest that a significant increase in Bcl-2 expression is not essential for rescuing axotomised immature lumbar motoneurons, as observed in other neuronal types. Dietz et al. (2001) reported that the number of ganglion cells present in the retina of bcl-2-/- or wild type adult mice was similar after optic nerve axotomy. Allsopp et al. (1993) studied neuronal cells from chicken embryo in vitro and observed that NGF, BDNF or NT-3 dependent-sensory neurons were protected from apoptosis by microinjection of a Bcl-2 expressing vector, when cultured in the absence of these neurotrophic factors. On the other hand, CNTF-dependent ciliary neurons were not rescued by this vector after being deprived of CNTF. The authors concluded that there may be different neuronal cell death pathways that would be related or not to Bcl-2 action and the trophic factors on which the cells depend. Since axotomised sciatic motoneurons of neonatal rats are protected by CNTF (Sendtner et al., 1990), other anti-apoptotic molecules (for review see Adams and Cory, 1998) might have been upregulated as a response to the injury in the present experimental model.

4.2 Effect of melatonin on motoneuron survival, Bax and Bcl-2 expression and TUNEL staining following sciatic transection

Melatonin administration significantly protected the axotomised motoneurons. This effect was particularly noted on the first day after sciatic transection inasmuch as MSR of treated animals was similar to that of the intact controls. Conversely, at the same time point MSR of vehicle treated pups was reduced by 25%. Despite the progressive neuronal loss, MSR of melatonin-treated animals was higher than that of rats that received only the dilution vehicle. Therefore, such protective action of melatonin seems to be more effective during the first day after lesion.

Melatonin administration prevented the rise in the number of TUNEL-positive cells in the ipsilateral dorsal horn one day after lesion, compared with vehicle treated group. However, the neurohormone did not alter the number of Bax-positive cells at the same time point. In the apoptotic pathway, activation of Bax is considered to happen before DNA breakup (Isenmann et al., 1997; Sun and Oppenheim, 2003). It may be hypothesized that during the first twenty-four hours postaxotomy melatonin rescued the greater part of Baxpositive cells by acting on other molecules of the apoptotic pathway. Thus, such cells would have been prevented from reaching a latter stage of the death process (DNA fragmentation). Consequently, less TUNEL-positive cells would be seen at day one.

Finally, mRNA levels and immunostaining for Bax and Bcl-2 were similar in axotomised groups at each studied time point, irrespective of melatonin treatment. As discussed about Bcl-2 expression, it is possible that the neurohormone played a role on Bax and/or Bcl-2 synthesis not detected by the techniques we employed. While such role cannot be definitely excluded, we propose that the protective action of melatonin reported in the present study does not significantly alter Bax or Bcl-2 expression.

In conclusion, our findings suggest that both physiological and axotomy-induced cell death in the dorsal horn of neonatal rat lumbar enlargement is associated with Bax expression. However, such expression does not seem to be related to motoneuron demise. Melatonin not only protected axotomised motoneurons but also reduced the loss of dorsal horn cells one day after lesion. In both cases, the mechanism of action of the neurohormone is not related to changes in Bax or Bcl-2 expression.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to Ms. Léa de Magalhães for technical assistance, Dr. A.X. Linhares for helping with the statistical analysis and R. Cofiño de Sá for collaborating with TUNEL labeling. We are also grateful to Dr. L.S. Queiroz for his comments on this manuscript. This study was supported by research grants from FAPESP (01/06991-1) and FAEP/UNICAMP (582/01). F. Rogério, A.S. Vieira and A.C.S. Rezende are supported by scholarships from FAPESP (03/03717-1, 05/51335-6 and 04/14210-8).

REFERENCES

- Acuña-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Gaia Monti, M., Ortiz, G.G., Reiter, R.J., 1997. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. Life Sci. 60, PL23-29.
- Adams, J.M., Cory, S., 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 281, 1322-1326.
- Allsopp, T.E., Wyatt, S., Paterson, H.F., Davies, A.M., 1993. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. Cell 73, 295-307.
- Antolin, I., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Brio, M.L., Herrera, F., Martin, V., Rodriguez, C., 2002. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. Brain Res. 943, 163-173.
- Baba, N., Koji, T., Itoh, M., Mizuno, A., 1999. Reciprocal changes in the expression of Bcl-2 and Bax in hypoglossal nucleus after axotomy in adult rats: possible involvement in the induction of neuronal cell death. Brain Res. 827, 122-129.
- Capsoni, S., Stankov, B.M., Fraschini, F., 1995. Reduction of regional cerebral blood flow by melatonin in young rats. Neuroreport 6, 1346-1348.
- Clowry, G.J., 1993. Axotomy induces NADPH diaphorase activity in neonatal but not adult motoneurones. Neuroreport 5, 361-364.
- Dietz, G.P., Kilic, E., Bahr, M., Isenmann, S., 2001. Bcl-2 is not required in retinal ganglion cells surviving optic nerve axotomy. Neuroreport 12, 3353-3356.
- Dubois-Dauphin, M., Frankowski, H., Tsujimoto, Y., Huarte, J., Martinou, J.C., 1994. Neonatal motoneurons overexpressing the bcl-2 protooncogene in transgenic mice are protected from axotomy-induced cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3309-3313.

- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Bem-Samsson, S.A., 1992. Identification of cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol. 119, 493-501.
- Gillardon, F., Klimaschewski, L., Wickert, H., Krajewski, S., Reed, J.C., Zimmermann, M., 1996. Expression pattern of candidate cell death effector proteins Bax, Bcl-2, Bcl-X, and c-Jun in sensory and motor neurons following sciatic nerve transection in the rat. Brain Res. 739, 244-250.
- Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D., White, E., 1996. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. Genes Dev. 10, 461-477.
- Isenmann, S., Wahl, C., Krajewski, S., Reed, J.C., Bähr, M., 1997. Up-regulation of bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat. Eur. J. Neurosci. 9, 1763-1772.
- Jacob, D.A., Bengston, C.L., Forger, N.G., 2005. Effects of bax gene deletion on muscle and motoneuron degeneration in a sexually dimorphic neuromuscular system. J. Neurosci. 25, 5638-5644.
- Jiang, K.W., Gao, F., Shui, Q.X., Yu, Z.S., Xia, Z.Z., 2004. Effect of diazoxide on regulation of vesicular and plasma membrane GABA transporter genes and proteins in hippocampus of rats subjected to picrotoxin-induced kindling. Neurosci. Res. 50, 319-329.
- Joo, W.S., Jin, B.K., Park, C.W., Maeng, S.H., Kim, Y.S., 1998. Melatonin increases striatal dopaminergic function in 6-OHDA-lesioned rats. Neuroreport 9, 4123-4126.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Miyashita, T., Wang, H.G., Reed, J.C., 1994. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. Am. J. Pathol. 145, 1323-1336.

- Lawson, S.J., Davies, H.J., Bennett, J.P., Lowrie, M., 1997. Evidence that spinal interneurons undergo programmed cell death postnatally in the rat. Eur. J. Neurosci. 9, 794-799.
- Lawson, S.J., Lowrie, M.B., 1998. The role of apoptosis and excitotoxicity in the death of spinal motoneurons and interneurons after neonatal nerve injury. Neuroscience 87, 337-348.
- Lossi, L., Merighi, A., 2003. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. Prog. Neurobiol. 69, 287-312.
- Lowrie, M.B., Vrbová, G., 1992. Dependence of postnatal motoneurones on their targets: review and hypothesis. Trends Neurosci. 15, 80-84.
- Lowrie, M.B., Lawson, S.J., 2000. Cell death of spinal interneurones. Prog. Neurobiol. 61, 543-555.
- Middleton, G., Nunez, G., Davies, A.M., 1996. Bax promotes neuronal survival and antagonises the survival effects of neurotrophic factors. Development 122, 695-701.
- Molander, C., Grant, G., 1995. Spinal cord cytoarchitecture. In The Nervous System, G. Paxinos, ed. Academic Press, San Diego, p. 1136.
- Murray, M., Wang, S.D., Goldberger, M.E., Levitt, P., 1990. Modification of astrocytes in the spinal cord following dorsal root or peripheral nerve lesions. Exp. Neurol. 110, 248-257.
- Oliveira, A.L.R., Risling, M., Deckner, M., Lindholm, T., Langone, F., Cullheim, S., 1997. Neonatal sciatic nerve transection induces TUNEL labeling of neurons in the rat spinal cord and DRG. Neuroreport 8, 2837-2840.
- Oliveira, A.L.R., Risling, M., Negro, A., Langone, F., Cullheim, S., 2002. Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. J. Comp. Neurol. 447, 381-393.

- Ortiz, G.G., Crespo-Lopez, M.E., Moran-Moguel, C., Garcia, J.J., Reiter, R.J., Acuña-Castroviejo, D., 2001. Protective role of melatonin against MPTP-induced mouse brain cell DNA fragmentation and apoptosis in vivo. Neuroendocrinol. Lett. 22, 101-108.
- Phifer, C.B., Terry, L.M., 1986. Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. Physiol. Behav. 38, 887–890.
- Piehl, F., Hammarberg, H., Tabar, G., Hokfelt, T., Cullheim, S., 1998. Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat motoneurons depends on age and type of injury. Exp. Brain Res. 119, 191-204.
- Reiter, R.J., 1998. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. Prog. Neurobiol. 56, 359-384.
- Rogério, F., Queiroz, L.S., Teixeira, S.A., Oliveira, A.L.R., Nucci, G., Langone, F., 2002. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. Brain Res. 926, 33-41.
- Sato, T., Irie, S., Krajewski, S., Reed, J.C., 1994. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl-2 protein. Gene 140, 291-292.
- Sendtner, M., Kreutzberg, G.W., Thoenen, H., 1990. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. Nature 345, 440-441.
- Sun, W., Oppenheim, R.W., 2003. Response of motoneurons to neonatal sciatic nerve axotomy in Bax-knockout mice. Mol. Cell Neurosci. 24, 875-886.
- Tiraihi, T., Rezaie, M.J., 2003. Apoptosis onset and Bax protein distribution in spinal motoneurons of newborn rats following sciatic nerve axotomy. Intern. J. Neurosci. 113, 1163-1175.

- Whiteside, G., Doyle, C.A., Hunt, S.P., Munglani, R., 1998. Differential time course of neuronal and glial apoptosis in neonatal rat dorsal root ganglia after sciatic nerve axotomy. Eur. J. Neurosci. 10, 3400-3408.
- Wong, H., Anderson, W.D., Cheng, T., Riabowol, K.T., 1994. Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "primer-dropping" method. Anal. Biochem. 223, 251-258.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Motoneuron Survival Ratio (MSR) at 3 h, 6 h, 1 day, 3 days and 5 days after axotomy. At the three later time points, melatonin administration significantly prevented neuronal loss observed in the group treated only with dilution vehicle (1 day: melatonin = 1.01 ± 0.10 , vehicle = 0.76 ± 0.04 ; 3 days: melatonin = 0.82 ± 0.04 , vehicle = 0.61 ± 0.03 ; 5 days: melatonin = 0.77 ± 0.02 , vehicle = 0.53 ± 0.08). On the first, third and fifth day after lesion, different letters correspond to statistical differences (p<0.001 for all comparisons at each time point). Data are presented as mean ± SEM.

Figure 2 – Transverse sections of lumbar spinal cord stained with cresyl violet. Lesioned animals treated with melatonin (A, B, G, H) or dilution vehicle only (C, D, I, J) and sacrificed at 6 h (A – D) or 3 days (G – J) postaxotomy (A, C, G, I: contralateral side; B, D, H, J: ipsilateral side). Intact controls at P2 (E, F) or P5 (K, L) corresponding to the lesioned groups sacrificed at 6 h or 3 days after sciatic transection, respectively (E, K: right side; F, L: left side). At 6 h, the number of surviving motoneurons observed in both contralateral and ipsilateral sides is similar to that of unlesioned rats. Conversely, motoneuron loss ipsilateral to axotomy was evident in vehicle given rats at 3 days and was reduced by melatonin treatment. Scale bar: 100 μ m.

Figure 3 – RT-PCR for Bax and Bcl-2 at 1 day, 3 days and 5 days postaxotomy. In A, representative PCRs for Bax, Bcl-2 and GAPDH (internal control). In B, Bax mRNA expression was significantly higher in axotomised animals at 1 day and 3 days after lesion compared with the intact control rats (1 day: melatonin = 0.75 ± 0.02 , vehicle = 0.72 ± 0.02 , control = 0.58 ± 0.02 , **a**: p=0.0012 vs control; 3 days: melatonin = 0.45 ± 0.02 ,

vehicle = 0.43 ± 0.01 , control = 0.37 ± 0.01 , **b**: p=0.0387, vs control). In C, Bcl-2 mRNA expression was similar in all groups at each time point (M: melatonin, V: vehicle, C: intact control; DNA ladder: 100 bp, the most intense band corresponds to 500 bp; ODR: Optical Density Ratio; AU: arbitrary units).

Figure 4 – Transverse sections of lumbar spinal cord immunoreacted for Bax. Lesioned rats administered dilution vehicle only (A – E) or melatonin (F) and sacrificed at 6 h (A, B, E, F) or 3 days (C, D) postaxotomy (A, C: contralateral side; B, D, E, F: ipsilateral side). Immunostaining for Bax was faint in motoneurons (arrow and inset in D) and intense in small cells from both ventral and dorsal horns (arrows in E and F, respectively). Arrow and inset in E: Bax-positive cell among motoneurons from the ventrolateral group. Motoneuron immunostaining pattern did not change after lesion or melatonin administration. Scale bars: $100 \mu m (A - D)$; 50 $\mu m (E, F)$; 25 μm (insets).

Figure 5 – Number of Bax-positive cells counted in the hemi-spinal cord (A), dorsal horn (B) and ventrolateral group (C) ipsilateral to axotomy. In A, sciatic transection significantly increased the total number of marked cells at 1 day after lesion regardless of melatonin treatment, in comparison with the unlesioned control (melatonin = 24.0 ± 4.4 , vehicle = 27.0 ± 4.1 , control = 9.7 ± 0.3 ; **a**: p=0.0265, vs control). In B, the increase in Bax-positive cells on the first day was predominantly noted in the dorsal horn (melatonin = 19.0 ± 4.0 , vehicle = 24.3 ± 4.3 , control = 5.3 ± 0.3 ; **b**: p=0.0193, vs control). In C, cells immunostained for Bax were rarely observed in the ventrolateral group. No statistical difference among the groups was verified at the other time points. Inset: representative transverse section of the lumbar enlargement (L5, based on Molander and Grant (1995))

comparing the estimated distribution of Rexed laminae and the analyzed regions (total: all ipsilateral laminae; I-VI: dorsal horn; IX: ventrolateral group of motoneurons).

Figure 6 - Transverse sections of lumbar spinal cord immunostained for Bcl-2. Axotomised animals treated with dilution vehicle only and sacrificed at 6 h (A, B) or 3 days (C, D) postaxotomy (A, C: contralateral side; B, D: ipsilateral side). Bcl-2 immunostaining was observed in the cytoplasm of motoneurons (arrow and inset in C) and smaller cells, being more noticeable in the former. This pattern remained unaltered, irrespective of axotomy or melatonin treatment. Scale bars: 100 μ m (A – D); 25 μ m (inset).

Figure 7 - Transverse sections of lumbar spinal cord after TUNEL labeling. Axotomised animals treated with dilution vehicle only (A, B) and sacrificed at 6 h (A) or 3 days (B) postaxotomy (A, B: ipsilateral side). The majority of the positive cells (arrows in A) were found in the dorsal horn in both lesioned and intact animals. TUNEL-labeled cells were rarely seen in the ventrolateral group (arrow and inset in B), in which no typical motoneuron was marked at any time point. Scale bars: 100 μ m (A, B); 25 μ m (inset).

Figure 8 - Number of TUNEL-positive cells counted in the hemi-spinal cord (A), dorsal horn (B) and ventrolateral group (C) ipsilateral to axotomy. In A, the total number of labeled cells was significantly higher in vehicle given rats compared with melatonin treated and intact groups on the first day postaxotomy (melatonin = 8.7 ± 2.5 , vehicle = 19.3 ± 1.1 , control = 11.0 ± 0.0 ; **a**: p=0.0004, vs melatonin and control groups). As shown in B, most of the stained cells were observed in the dorsal horn and melatonin administration kept the number of marked cells similar to that of intact controls (melatonin = 8.0 ± 1.5 , vehicle =

18.3 \pm 0.9, control = 7.7 \pm 0.7; **b**: p=0.0007, vs melatonin and control groups). In C, TUNEL-positive cells were hardly ever found in the ventrolateral group. There was no significant difference among the groups at the other time points. Inset: representative transverse section of the lumbar enlargement (L5, based on Molander and Grant (1995)) comparing the estimated distribution of Rexed laminae and the analyzed regions (total: all ipsilateral laminae; I-VI: dorsal horn; IX: ventrolateral group of motoneurons).



Figure 1



Figure 2

A)



Figure 3



Figure 4



Figure 5



Figure 6



Figure 7



Discussão Geral e Conclusões

A administração de melatonina protegeu significativamente os motoneurônios axotomizados. Tal efeito foi notado principalmente no primeiro dia após a secção do ciático, pois o ISN dos animais que receberam esta substância foi similar àquele dos controles íntegros. Ao contrário, no mesmo tempo de sobrevida, o ISN dos ratos tratados com veículo de diluição apenas estava reduzido em 25%, em comparação com os mesmos controles. Apesar de os animais axotomizados e tratados com melatonina terem apresentado progressiva perda neuronal nos períodos avaliados posteriormente, tal fato ocorreu em menor proporção, considerando-se o grupo lesado que recebeu apenas veículo. Assim, a ação neuroprotetora da melatonina no presente modelo experimental parece ser mais efetiva durante o primeiro dia após a lesão. De forma semelhante, Perry et al. (2004), ao estudarem culturas de neurônios corticais de embriões de ratos em meio rico em agentes antioxidantes (glutationa reduzida, tocoferol, catalase e SOD), verificaram que a sobrevivência das células dependia da presença de tais agentes apenas nas primeiras vinte e quatro horas após a semeadura. De fato, mudança subseqüente dos neurônios para um meio sem antioxidantes não interferiu com a manutenção celular. Em conjunto, os resultados do presente estudo e os de Perry et al. (2004), sugerem que substâncias antioxidantes atuem sobre neurônios durante um curto período após sua administração.

Constatado o efeito neuroprotetor da melatonina sobre motoneurônios de ratos neonatos submetidos a secção do ciático em P2, passaram a ser investigados possíveis efeitos da substância sobre moléculas que participam da defesa celular contra radicais livres ou potencialmente produtoras destas espécies químicas. Especificamente, foram avaliadas as isoformas da SOD e da NOS. Em paralelo a esta abordagem, foram analisadas a expressão basal de tais moléculas e suas respostas durante a primeira semana após o estímulo traumático, uma vez que não constavam na literatura informações sobre as mesmas no modelo experimental aqui estudado.

Com relação às isoformas da SOD, a imunorreatividade observada para SOD1 nos motoneurônios dos animais intactos foi citoplasmática, difusa e intensa. A secção do ciático em P2 não alterou tal padrão durante a semana que se seguiu ao estímulo lesivo. Este fato está de acordo com o observado em neurônios motores de ratos adultos após esmagamento ou secção do ciático ou facial (Yoneda et al., 1992; Rosenfeld et al., 1997; Yu, 2002). Por outro lado, Yu (2002) verificou que a avulsão do ciático de ratos adultos reduziu a imunorreatividade para a SOD1 nos motoneurônios lesados. Desta forma, é possível que a imunomarcação para esta isoforma da SOD em condições fisiológicas seja independente da maturidade do sistema nervoso central, mas seja influenciada pela intensidade da lesão.

Quanto à SOD2, foi verificado no presente trabalho que a imunomarcação para esta proteína variou ao longo da primeira semana de vida pós-natal. Particularmente, o padrão de marcação citoplasmático era inicialmente difuso, porém apresentou distribuição puntiforme após os períodos mais longos estudados, tanto nos animais operados quanto nos controles íntegros. A importância funcional de tal variação é desconhecida. No entanto, parece estar relacionada com o desenvolvimento dos motoneurônios e não ser influenciada pela axotomia do ciático ou tratamento com melatonina. Outros autores reportaram aumento da expressão da SOD2 em neurônios motores de ratos adultos axotomizados, entre uma e duas semanas depois da lesão (Yoneda et al., 1992; Rosenfeld et al., 1997; Yu, 2002). Este aumento poderia proteger as células maduras das conseqüências deletérias do estresse oxidativo desencadeado pela lesão periférica. De fato, esta isoforma da SOD se localiza na matriz da mitocôndria, organela onde haveria grande síntese de radicais livres decorrente do estímulo danoso. Por outro lado, este possível mecanismo protetor não
ocorreria na maior parte dos neurônios motores imaturos da intumescência lombar, uma vez que muitas das células lesadas neste período do desenvolvimento morrem.

Ambas isoformas da SOD parecem ser essenciais à homeostasia das células ependimárias, visto que a imunorreatividade para estas enzimas permaneceu virtualmente inalterada durante o período avaliado neste trabalho. O mesmo pode ser considerado para a SOD1 e prováveis células gliais da intumescência lombar, pois a positividade nuclear para esta isoforma também já foi demonstrada em astrócitos de ratos adultos (Lindenau et al., 2000).

Análises por Western blot foram realizadas para melhor avaliar a expressão das isoformas da SOD. Considerando-se que (1) a imunorreatividade para SOD1 não variou durante o período estudado, (2) a imunomarcação para SOD2 não mudou entre uma e seis horas e entre um e cinco dias pós-axotomia e (3) animais lesados e tratados com veículo de diluição ou somente lesados apresentaram ISN similares, foram avaliadas intumescências lombares de ratos operados e tratados com melatonina ou veículo e de controles íntegros, uma hora, um dia e cinco dias após a lesão.

A análise da SOD1 por Western blot evidenciou diferenças semiquantitativas entre os grupos no primeiro dia após a axotomia. Por sua vez, a investigação imunoistoquímica não revelou alterações no padrão de marcação para esta isoforma em quaisquer dos grupos experimentais. É possível que a técnica histológica não tenha sido sensível para detectar variações devido ao fato de que tal enzima apresentou imunorreatividade intensa nos diferentes tipos celulares da intumescência lombar, em todas as condições e tempos de sobrevida estudados. Especificamente, o estudo da expressão protéica por blot mostrou decréscimo de 25% nos níveis de SOD1 após a secção do ciático e aumento de 25% determinado pela administração de melatonina, em comparação com o grupo controle intacto. Apesar do fato de o mecanismo responsável pela redução da expressão desta isoforma ser desconhecido até o presente, pode-se inferir que tal redução favoreceria a produção e/ou acúmulo de superóxido, estresse oxidativo e morte celular (Leist e Nicotera, 1998). Por outro lado, o aumento da síntese da SOD1 conseqüente ao tratamento com melatonina suporta um possível mecanismo de ação para esta substância no presente modelo experimental. De fato, este resultado foi observado no mesmo tempo de sobrevida em que se verificou o maior índice de motoneurônios sobreviventes após a lesão (um dia). Ainda que tal mecanismo permaneça desconhecido, pode-se propor a hipótese de que a melatonina tenha atuado no presente modelo experimental através de receptores celulares (para revisão vide Rodriguez et al., 2004), o que teria como última conseqüência o aumento da expressão gênica da SOD1. Por fim, a elevação dos níveis desta enzima reduziria a concentração de superóxido, cuja produção estaria favorecida pela privação de fatores tróficos (Castagne et al., 1999).

A SOD2 foi dificilmente detectada pela técnica de Western blot. Os resultados de imunoistoquímica sugerem que esta isoforma seja sintetizada em menores proporções em comparação com a SOD1, independentemente da axotomia ou administração de melatonina. Provavelmente, a pequena quantidade desta proteína na intumescência lombar de ratos neonatos dificultou a análise densitométrica das bandas correspondentes em todos os tempos de sobrevida. Ainda que a expressão da SOD2 seja normalmente baixa e não se altere após os procedimentos experimentais realizados, não se pode excluir a participação desta enzima no sistema antioxidante intracelular no período neonatal. A SOD2 poderia ter um papel complementar à ação da SOD1, pois tanto a imunorreatividade quanto a expressão desta última foram invariavelmente maiores que as da primeira.

Sobre a NOS, a imunomarcação para as isoformas nos animais intactos detectou a nNOS no citoplasma de poucas células pequenas do corno ventral e dorsal e ao redor do canal central em todos os tempos de sobrevida estudados, porém não em motoneurônios. A eNOS foi observada somente em células endoteliais de vasos do parênquima medular e adjacentes à intumescência lombar. A iNOS foi visualizada apenas em P7, em pequenas células do corno ventral e dorsal. Os resultados de que as três isoformas são expressas e ativas nos grupos íntegros sugerem que o NO tenha papel fisiológico na intumescência lombar de ratos durante a primeira semana de vida pós-natal. De fato, várias funções têm sido atribuídas a esta molécula no sistema nervoso central como neurotransmissão, plasticidade sináptica e controle do fluxo sanguíneo cerebral (Huang e Lo, 1998). Estudos em camundongos adultos knockout sugerem que (1) a isoforma neuronal seja necessária à manutenção de interneurônios e motoneurônios medulares, (2) a eNOS contribua com a manutenção neuronal após deleção do gene da nNOS e (3) estas duas isoformas modulem a liberação de neurotransmissores no cérebro (Paakkari e Lindsberg, 1995; Kano et al., 1998; Keilhoff et al., 2004). Com relação à iNOS, o fato de também terem sido detectados mRNA, proteína e atividade desta isoforma nos controles indica papel constitutivo desta enzima na medula lombar de ratos neonatos. Até o presente, não há registros prévios na literatura sobre detecção e/ou possíveis funções da iNOS nesta região do sistema nervoso central de roedores íntegros no período neonatal. Por outro lado, a expressão constitutiva desta isoforma foi descrita nas vias aéreas nasais de humanos e presumivelmente associada com um efeito bacteriostático protetor (Lundberg et al., 1995).

A respeito dos ratos axotomizados que receberam apenas veículo de diluição, não houve diferença entre seus níveis de mRNA para nNOS e iNOS e aqueles dos controles intactos, no primeiro, terceiro e quinto dias pós-axotomia. Redução significante na expressão gênica da eNOS foi observado nos animais lesados no quinto dia. Os achados de imunoistoquímica da nNOS e eNOS não variaram de P2 a P7, independentemente da lesão. Imunomarcação para iNOS foi detectada somente no quinto dia e, semelhante ao descrito para as outras isoformas, não foi alterada pela secção do ciático. Estes resultados demonstram que não há aumento de expressão das três isoformas da NOS na intumescência lombar de ratos neonatos durante a primeira semana após a secção do nervo ciático.

Com relação à nNOS, o fato de não ter sido induzida pela axotomia está de acordo com relatos baseados em estudos de hibridação in situ de que a secção do ciático em ratos P3 não aumentou a síntese de mRNA para esta isoforma nos motoneurônios lesados, um, três e cinco dia após a lesão (Piehl et al., 1998). Por outro lado, os resultados do presente trabalho não estão de acordo com observações prévias de que a nNOS é expressa por motoneurônios axotomizados (Wu, 1993; Wu et al., 1994; Chang et al., 2000; Yu, 2002). Esta discrepância poderia ser justificada por diferentes métodos usados para identificação histológica da nNOS, modelo experimental analisado e idade dos animais estudados. Devido ao fato de a nNOS ser uma diaforase, sua presença em motoneurônios axotomizados tem sido demonstrada através da técnica histoquímica da NADPH-diaforase (Clowry, 1993; Wu, 1993; Novikov et al., 1995; Wu et al., 1995; Rossiter et al., 1996; Mariotti et al., 1997; Xu et al., 2000). No entanto, nem sempre se observa correspondência entre a marcação obtida através deste método e de imunoistoquímica (Callsen-Cencic et al., 1999; Xu et al., 2000). Lesões experimentais mais severas que a secção o ciático, como avulsão de raiz nervosa, poderiam favorecer a expressão da nNOS nos motoneurônios lesados. Considera-se que o aporte trófico proveniente de células de Schwann que circundam o coto proximal de nervos axotomizados contribua com a manutenção temporária dos neurônios lesados. Por outro lado, a tração sofrida pelo neurônio durante a avulsão de raiz nervosa comprometeria as conexões do pericário com outras células do parênquima medular. As aferências sinápticas e tróficas aos motoneurônios no sistema nervoso central são importantes para a sobrevivência destas células. Além disso, o fato de tal lesão não permitir a existência de coto proximal, impediria o suporte trófico periférico para os motoneurônios acometidos (Lowrie e Vrbová, 1992; Wu, 1993, Wu et al., 1994; Yu, 2002). Finalmente, o fato de que motoneurônios de roedores adultos expressam nNOS após estímulo lesivo, ao contrário de ratos P2, sugere diferentes mecanismos de controle da expressão desta isoforma dependentes da idade (Wu et al., 1994; Chang et al., 2000; Yu, 2002). Independentemente do fato de divergirem de estudos de outros autores, os presentes resultados suportam a hipótese que propusemos previamente de que motoneurônios do ciático não produzem NO através da nNOS na primeira semana após axotomia realizada em P2 (Rogério et al, 2002).

Sobre as outras isoformas da NOS, a síntese de mRNA para eNOS apresentou-se diminuída nos ratos lesados cinco dias após a lesão, em comparação com os controles intactos. Este fato poderia ter levado a diminuição do fluxo sangüíneo na intumescência lombar (Huang e Lo, 1998), o que prejudicaria a manutenção dos motoneurônios que sobreviveram à axotomia e dos outros tipos celulares desta região do SNC. Porém, neste mesmo tempo de sobrevida, não foram notadas diferenças sugestivas de redução de perfusão entre os grupos lesados e o intacto, após a análise da imunomarcação para esta enzima e da atividade da NOS dependente de cálcio. Especificamente, esta diminuição da expressão gênica da eNOS parece não ser um evento essencial para a perda de motoneurônios no presente modelo experimental, visto que a maioria das células que foram axotomizadas morrem durante as primeiras vinte e quatro horas após a lesão (Rogério et al., 2005). Por sua vez, apesar de ser freqüentemente descrita como induzível por estímulos

danosos (Kroncke et al., 2000), a iNOS parece não apresentar tal resposta na intumescência lombar de ratos neonatos, uma vez que nem os níveis de mRNA nem a atividade da NOS independente de cálcio nos animais axotomizados foram diferentes daqueles verificados nos controles, em todos os tempos de sobrevida.

A atividade da NOS dependente de cálcio nos ratos axotomizados que receberam apenas veículo foi maior que aquela medida no grupo sem lesão, na primeira e na sexta hora. Considerando-se que o método utilizado quantifica a atividade catalítica das isoformas neuronal e endotelial e que o NO pode exercer funções citotóxicas ou benéficas, as implicações funcionais destes achados devem ser inferidas à luz de outros possíveis eventos simultâneos. O NO pode ter papel citotóxico ao reagir com diversos radicais livres e levar à síntese de outras espécies químicas instáveis, como o peroxinitrito. Ao contrário, ações benéficas do NO são verificadas em processos como neurotransmissão e regulação da perfusão tecidual (para revisões vide Bredt (1999) e Kroncke et al. (2000)). Especificamente, no presente estudo, a maior parte dos motoneurônios lesados morreu durante o primeiro dia após a axotomia, mesmo período em que foram detectados níveis menores da proteína SOD1 (Rogério et al., 2005). Com base nestas observações, pode-se propor a hipótese de que os aumentos da atividade da NOS dependente de cálcio mencionados acima tenham sido deletérios, uma vez que a síntese de peroxinitrito estaria favorecida.

O tratamento com melatonina não alterou os padrões de imunomarcação nem a expressão gênica das isoformas, mas mudou a atividade da NOS cálcio-dependente e da independente no terceiro dia pós-lesão. É possível que o neurohormônio tenha atingido os níveis plasmáticos determinantes de tais mudanças somente após três dias do início do tratamento diário. Conforme relatado por Weinberg (1981), ratos neonatos tendem a reter

melatonina, o que aumentaria seu tempo de atuação e a duração dos efeitos biológicos. O mecanismo pelo qual a substância regularia a síntese de NO nas presentes condições experimentais é desconhecido. Os resultados aqui apresentados mostram que a melatonina não modifica a expressão das isoformas da NOS e, ao contrário do descrito por outros autores (Pozo et al., 1994; Bettahi et al., 1996), não depende de cálcio para alterar a atividade da NOS. De fato, a melatonina modificou a atividade catalítica desta enzima tanto na ausência quanto na presença de cálcio no meio de incubação. Especificamente, tais mudanças na síntese de NO no terceiro dia podem não ter exercido efeitos danosos significativos sobre os motoneurônios da intumescência lombar sobreviventes à axotomia. Tal possibilidade é corroborada pela observação de maior quantidade destas células em animais axotomizados e tratados com melatonina cinco dias após a lesão, em comparação com ratos que receberam apenas veículo. Finalmente, a melatonina não impediu a maior produção de NO uma e seis horas após a axotomia. Considerando o amplo espectro de ações biológicas do NO mencionado acima, tal produção aumentada pode ter sido predominantemente maléfica para as células axotomizadas. Por outro lado, a melatonina poderia ter compensado simultaneamente esta condição de estresse oxidativo ao induzir a expressão da SOD1 (Rogério et al, 2005).

Considerando-se que, no presente trabalho, toda a intumescência lombar foi empregada para as análises de RT-PCR e atividade enzimática, é possível que não tenham sido detectadas mudanças na síntese de mRNA ou de NO em neurônios e/ou outros tipos celulares isolados. Embora estes fatos não possam ser excluídos, é pouco provável que tais mudanças discretas tivessem alterado consideravelmente os presentes achados relacionados à expressão e à atividade catalítica das isoformas da NOS. Também foram avaliadas aqui as proteínas Bax e Bcl-2 e fragmentação de DNA na intumescência lombar, após axotomia do ciático em P2 e administração de melatonina, durante a primeira semana pós-lesão.

mRNA e imunorreatividade para Bax foram detectados na intumescência lombar de animais íntegros ou axotomizados. A imunomarcação para a proteína foi intensa em pequenas células isoladas no corno dorsal e ventral. Nos motoneurônios a reatividade foi citoplasmática, discreta e não se alterou após a lesão. A expressão da Bax em animais intactos sugere presença constitutiva desta proteína na intumescência lombar de ratos neonatos. Especificamente, a presença da Bax em motoneurônios foi observada na medula espinhal de roedores adultos (Krajewski et al., 1994; Gillardon et al., 1996). Apesar de a implicação funcional desta expressão fisiológica de Bax permanecer desconhecida, evidências de outros autores sugerem efeito benéfico da Bax para а sobrevivência/manutenção de neurônios. Middleton et al. (1996) reportaram que neurônios do gânglio ciliar manipulados geneticamente para produzir grande quantidade de Bax apresentaram maior índice de sobrevivência quando cultivados na ausência de CNTF (do inglês, ciliary neurotrophic factor), comparado com neurônios não modificados. Sun e Oppenheim (2003) verificaram que motoneurônios do ciático de camundongos neonatos knockout para o gene bax sobreviveram por mais tempo após secção nervosa, em comparação com controles selvagens. Porém, a ausência de Bax acarretou severa atrofia das células sobreviventes.

O achado de que a expressão da Bax em motoneurônios não aumentou após a lesão contraria as observações de Tiraihi e Rezaie (2003). Estes autores descreveram diversos padrões de imunomarcação para Bax em neurônios motores do ciático de ratos axotomizados em P2 e os associaram com diferentes etapas do processo apoptótico. Uma

104

possível explicação para a divergência entre os resultados prévios e os aqui relatados seria a idade em que os ratos foram submetidos à lesão periférica: P5 e P2, respectivamente. De fato, a densidade e a distribuição celular de muitas moléculas podem variar consideravelmente durante o desenvolvimento pós-natal. Além disso, nossos resultados de que a imunomarcação para Bax em motoneurônios imaturos permaneceu virtualmente inalterada após a axotomia sugere que o aumento da expressão da Bax não seja uma etapa essencial do processo de morte destas células. De fato, evidências de outros autores também sugerem que a perda de certos tipos de motoneurônios parece não ser dependente da ação da Bax. Jacob et al. (2005) estudaram dois grupos distintos de motoneurônios lombares em camundongos adultos selvagens ou knockout para bax: o núcleo do bulbocavernoso (SNB), que inerva o músculo homônimo, e o núcleo retrodorsolateral (RDLN), que inerva principalmente o músculo flexor curto dos dedos. Estes autores observaram que o número de neurônios motores do SNB nos animais machos bax-/- era análogo àquele dos controles machos bax+/+. Porém, os mesmos camundongos com deleção da bax apresentaram aumento no número de motoneurônios do RDLN, comparado com os machos bax+/+. Finalmente, as fêmeas bax-/- apresentaram mais motoneurônios nos dois núcleos, quando comparadas às fêmeas +/+. Assim, fatores como o local do SNC onde os neurônios estão localizados e/ou influências extra-celulares em grupos neuronais distintos, como ação hormonal, podem também influenciar a sobrevivência de motoneurônios.

Por outro lado, a Bax pode ter participado da morte de outros tipos celulares da intumescência lombar. Nos animais intactos, a maior quantidade das pequenas células intensamente positivas para Bax foi verificada em P2, quando o processo de morte celular que ocorre normalmente durante o desenvolvimento atinge os mais altos índices (Lawson et

al., 1997; Lowrie e Lawson, 2000). Além disso, nos ratos lesados, houve aumento da expressão gênica para Bax e do número de células Bax-positivas encontradas no corno dorsal da hemimedula ipsilateral um dia pós-lesão, em comparação com o grupo íntegro. Finalmente, no terceiro dia depois da secção também foram verificados níveis significantemente maiores de mRNA para Bax nos animais axotomizados, em relação ao controle intacto. Porém, não houve diferença significativa entre o número de células Baxpositivas na região dorsal ipsilateral à axotomia e aquele do grupo controle. É possível que o aumento de mRNA para Bax, observado desde o primeiro dia pós-lesão, esteja associado com a perda celular. Assim, tal perda durante os três primeiros dias após a secção do ciático pode ter reduzido o número de células Bax-positivas detectáveis ao final deste tempo de sobrevida. Particularmente, a morte de células do corno dorsal induzida pela axotomia seria consequente à secção de fibras sensitivas do ciático. Tal fato impossibilitaria o aporte de fatores neurotróficos produzidos pelos órgãos inervados aos neurônios ganglionares acometidos, desencadeando degeneração destas células, das suas terminações centrais e de suas células eferentes no sistema nervoso central (Murray et al., 1990). Sabe-se que a sobrevivência de neurônios medulares depende da ação trófica das suas aferências, provenientes das fibras sensoriais primárias e/ou de outros neurônios (Lawson e Lowrie, 1998; Whiteside et al., 1998; Lowrie e Lawson, 2000).

Assim como constatado nos resultados de imunoistoquímica para Bax nos ratos intactos, o maior número de células marcadas pela técnica de TUNEL nestes animais foi verificado no corno dorsal em P2. Este achado é compatível com o descrito por Lawson et al. (1997) e provavelmente corresponde à morte celular fisiológica durante o período neonatal. É possível que estas células com fragmentação de DNA sejam interneurônios ou

106

neurônios de projeção. De fato, Lawson et al. (1997) empregaram marcadores para células neurais (enolase específica neural e PGP-9.5 (do inglês, protein gene product 9.5)) ou glia (GFAP (do inglês, glial fibrillary acidic protein)) para identificar as células em processo de morte programada na intumescência lombar de ratos P2 não lesados e apenas neurônios foram detectados. Por sua vez, os animais axotomizados e tratados com veículo de diluição, apresentaram aumento do número de células com fragmentação de DNA no corno dorsal ipsilateral um dia após a lesão, em comparação com o grupo intacto. A axotomia pode ter levado a perda de neurônios, conforme previamente reportado por Lawson e Lowrie (1998) após esmagamento do ciático de ratos P2 e identificação das células em processo de morte com PGP-9.5. Tal perda celular seria conseqüente à deaferentação de neurônios do corno dorsal. Particularmente, a degeneração das fibras sensitivas do nervo ciático lesado e de seus prolongamentos centrais prejudicaria o aporte trófico às células da região dorsal da hemimedula ipsilateral (Murray et al., 1990; Whiteside et al., 1998).

Apesar de ter sido observada perda de motoneurônios do primeiro ao quinto dia pós-axotomia, raramente foram vistas células TUNEL-positivas no grupamento ventrolateral ipsilateral à lesão. Tal resultado diverge de dados de Oliveira et al. (1997 e 2002) que estudaram morte de motoneurônios após secção do ciático de ratos neonatos. Estes autores relataram aumento discreto, porém significante, do número de células TUNEL-positivas no corno ventral um dia após axotomia realizada em P2. Tal divergência poderia ser explicada pela rápida duração do processo de morte de motoneurônios imaturos após axotomia periférica. Lawson e Lowrie (1998), ao estudar esmagamento do ciático de ratos P2, verificaram a maior quantidade de motoneurônios com fragmentação de DNA um dia depois da lesão e estimaram que o processo de morte de tais células duraria duas horas. Não se pode excluir a hipótese de que as células marcadas pela reação de TUNEL no corno

ventral sejam interneurônios. Sendo assim, o fato de que a maioria delas foram vistas no corno dorsal ipsilateral à axotomia sugere que os interneurônios ventrais seriam menos suscetíveis à interrupção do aporte trófico periférico que os dorsais. De fato, a sobrevivência de interneurônios espinhais pode depender de aferências não só de fibras sensitivas dos gânglios da raiz dorsal mas também de células do próprio parênquima medular (Lowrie e Lawson, 2000).

Com relação à Bcl-2, mRNA e imunomarcação para esta proteína foram detectados nos grupos íntegros e não foram alterados pela axotomia do ciático. Especificamente, a imunorreatividade para Bcl-2 apresentou padrão citoplasmático difuso e intenso em todas as células da intumescência lombar. É possível que a expressão constitutiva de Bcl-2 nos motoneurônios imaturos esteja associada à sua reconhecida função de promover a sobrevivência celular (Dubois-Dauphin et al., 1994; Michaelidis et al., 1996; Lossi e Merighi, 2003). Com relação aos ratos axotomizados, não se pode descartar um discreto aumento na expressão da Bcl-2 não detectado pela técnica de imunoistoquímica. Neste caso, a Bcl-2 poderia ter contribuído com a manutenção dos neurônios lesados, bem como das pequenas células marcadas para Bax. Particularmente, as últimas teriam sido impedidas de completar o processo de morte. Outra possibilidade é que poucas células lesadas tenham apresentado aumento de expressão da Bcl-2. No entanto, tal fato não teria sido detectado através da RT-PCR, visto que esta técnica determina os níveis de mRNA total da intumescência lombar. Independentemente, destes possíveis eventos, os presentes resultados de que não houve mudanças na expressão gênica da Bcl-2 e no padrão de imunomarcação para esta proteína sugerem que um aumento significante na expressão da Bcl-2 não seja imprescindível para a manutenção de neurônios em condições adversas. Dietz et al. (2001) observaram que o número de células ganglionares da retina sobreviventes à axotomia do nervo óptico de camundongos knockout para o gene bcl-2 foi igual ao verificado nos animais selvagens lesados. Allsopp et al. (1993) reportaram que neurônios sensitivos dependentes de NGF (do inglês, nerve growth factor), BDNF ou NT-3 (do inglês, neurotrophin-3) cultivados na ausência destes fatores foram protegidos pela microinjeção de vetores de expressão do gene bcl-2. Porém, o mesmo não ocorreu com neurônios do gânglio ciliar dependentes de CNTF. Os autores concluíram que deve haver pelo menos duas vias de morte celular em neurônios, as quais estariam ou não associadas à ação da Bcl-2 e aos fatores tróficos dos quais a célula depende. Considerando que os motoneurônios axotomizados do nervo ciático de ratos neonatos são recuperados pela administração de CNTF (Sendtner et al., 1990), é possível que, no presente modelo experimental, vias anti-apoptóticas independentes da Bcl-2 (para revisão vide Adams e Cory, 1998) tenham atuado em resposta à axotomia.

O tratamento com melatonina impediu o aumento do número de células TUNELpositivas no corno dorsal ipsilateral um dia após a secção do ciático, comparado com o grupo veículo. No entanto, o neurohormônio não diminui a expressão nem o número de células Bax-positivas neste mesmo período após a lesão. Na seqüência de eventos moleculares da via apoptótica, a ativação da Bax ocorre depois da privação de fatores neurotróficos e antes da fragmentação de DNA (Isenmann et al., 1997; Sun e Oppenheim, 2003). Desta forma, pode-se levantar a hipótese de que, durante as primeiras vinte e quatro horas pós-lesão, a melatonina tenha protegido a maioria das células Bax-positivas atuando sobre outras moléculas pró-apotóticas. Conseqüentemente, menos células TUNEL-positivas foram detectadas no primeiro dia depois da lesão. Independentemente de qual tenha sido seu mecanismo de ação, a melatonina parece exercer efeito protetor transitório sobre as células em processo de morte no corno dorsal, visto que tal efeito não foi mais observado no terceiro dia pós-axotomia.

Finalmente, os níveis de mRNA e os achados imunoistoquímicos para Bax e Bcl-2 foram similares nos grupos axotomizados em todos os tempos de sobrevida estudados, independentemente do tratamento com melatonina. Conforme discutido sobre a expressão da Bcl-2 em animais lesados, ainda que alterações na síntese de Bax e/ou Bcl-2 em células isoladas possam ter sido determinadas pelo neurohormônio e não detectadas pelas técnicas aqui utilizadas, pode-se propor que a ação protetora da melatonina evidenciada no presente estudo não altere significativamente a expressão de Bax ou Bcl-2.

CONCLUSÕES:

- A secção do ciático de ratos em P2 leva a perda de aproximadamente 55% dos motoneurônios lesados, cinco dias após a axotomia. O tratamento com melatonina permite a sobrevivência de 75% dos neurônios motores axotomizados, depois do mesmo tempo de sobrevida;
- A axotomia do ciático em ratos P2 reduz a expressão da SOD1 em 25%, um dia após a lesão. No mesmo período, a administração de melatonina aumenta a síntese desta enzima em 25%. Tal fato evidencia efeito neuroprotetor antioxidante desta substância no presente modelo experimental;
- 3. As isoformas neuronal, endotelial e induzível da NOS têm expressão constitutiva na intumescência lombar de ratos neonatos de P2 a P7 e não são induzidas pela transecção periférica do nervo ciático em P2. A axotomia altera a atividade da NOS dependente de cálcio em tempos curtos após a lesão. A melatonina modula a síntese de NO especificamente no terceiro dia;
- 4. A secção do ciático em ratos P2 eleva a síntese de mRNA para Bax na intumescência lombar e o número de células Bax-positivas no corno dorsal ipsilateral, um dia após a lesão. Porém, não se observa aumento da imunorreatividade para Bax nos motoneurônios axotomizados. A melatonina reduz o número de células com fragmentação de DNA no corno dorsal ipsilateral, um dia após a lesão. O mecanismo protetor desta substância, no presente modelo experimental, não envolve alteração da expressão da Bax e da Bcl-2.

Referências Bibliográficas

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; COTO-MONTES, A.; MONTI, M.G.; ORTIZ, G.G.; REITER, R.J. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. Life Sci., 60(2): 23-29, 1997.
- ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science, 281: 1322-1326, 1998.
- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J., 357(3)**:593-615, 2001.
- ALLSOPP, T.E.; WYATT, S.; PATERSON, H.F.; DAVIES, A.M. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. Cell, 73: 295-307, 1993.
- ANTOLIN, I.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; BRIO, M.L.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; RODRIGUEZ, C. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. **Brain Res., 943**: 163-173, 2002.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Vol. 1, 1998.
- BABA, N.; KOJI, T.; ITOH, M.; MIZUNO, A. Reciprocal changes in the expression of Bcl-2 and Bax in hypoglossal nucleus after axotomy in adult rats: possible involvement in the induction of neuronal cell death. Brain Res., 827: 122-129, 1999.
- BAYDAS, G.; REITER, R.J.; NEDZVETSKII, V.S.; NERUSH, P.A.; KIRICHENKO, S.V. Altered glial fibrillary acidic protein content and its degradation in the hippocampus, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin. J. Pineal Res., 33: 134-139, 2002.

- BAYDAS, G.; REITER, R.J.; AKBULUT, M.; TUZCU, M.; TAMER, S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. **Neuroscience**, **135**: 879-886, 2005.
- BECKMAN, J.S.; ESTÉVEZ, A.G.; CROW, J.P.; BARBEITO, L. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. **Trends Neurosci., 24**: S15-S20, 2001.
- BETTAHI, I.; POZO, D.; OSUNA, C.; REITER, R.J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; GUERRERO, J.M. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. J. Pineal Res., 20: 205-210, 1996.
- BONFOCO, E.; KRAINC, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced respectively by mild and intense insults with NMDA or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 7162-7166, 1995.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248-254, 1976.
- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Annu.Rev. Biochem., 63: 175-195, 1994.
- BREDT, D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. Free Radic. Res., 31: 577-596, 1999.
- BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. Mol. Aspects Med., 26(1-2): 3-31, 2005.

- CALLSEN-CENCIC, P.; HOHEISEL, U.; KASKE, A.; MENSE, S.; TENSCHERT, S. The controcersy about spinal neuronal nitric oxide synthase: under which conditions is it upor down-regulated? **Cell Tissue Res., 295**: 183-194, 1999.
- CAPSONI, S.; STANKOV, B.M.; FRASCHINI, F. Reduction of regional cerebral blood flow by melatonin in young rats. **Neuroreport**, **6**: 1346-1348, 1995.
- CASTAGNE, V.; GAUTSCHI, M.; LEFEVRE, K.; POSADA, A.; CLARKE, P.G.H. Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. **Prog. Neurobiol., 59**: 397-423, 1999.
- CHANG, H.-M.; LING, E.-A., LUE, J.-H.; WEN, C.-Y.; SHIEH, J.-Y. Melatonin attenuates neuronal NADPH-d/NOS expression in the hypoglossal nucleus of adult rats following peripheral nerve injury. **Brain Res.**, **873**: 243-251, 2000.
- CLOWRY, G.J. Axotomy induces NADPH diaphorase activity in neonatal but not adult motoneurones. **Neuroreport**, **5**: 361-364, 1993.
- COSTA. E.J.X.; LOPES, R.H.; LAMY-FREUND, M.T. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. J. Pineal Res., 19: 123-126, 1995.
- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M.; BARTLEY, D.A.; UHL, G.R.; SNYDER, S.H. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. J. Neurosci., 13: 2651-2661, 1993.
- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide in neuronal degeneration. Proc. Soc. Exp.Biol. Med., 211: 33-40, 1996.
- DIETZ, G.P.; KILIC, E.; BAHR, M.; ISENMANN, S. Bcl-2 is not required in retinal ganglion cells surviving optic nerve axotomy. **Neuroreport**, **12**: 3353-3356, 2001.
- DUBOIS-DAUPHIN, M.; FRANKOWSKI, H.; TSUJIMOTO, Y.; HUARTE, J.; MARTINOU, J.-C. Neonatal motoneurons overexpressing the bcl-2 protooncogene in

transgenic mice are protected from axotomy-induced cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**: 3309-3313, 1994.

- DYKENS, J.A; STERN, A; TRENKER. E. Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury. J. Neurochem., 49: 1222-1228, 1987.
- ESTÉVEZ, A.G.; SPEAR, N.; MANUEL, S.M.; RADI, R.; HENDERSON, C.E.; BARBEITO, L.; BECKMAN, J.S. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. J. Neurosci., 18(3): 923-931, 1998.
- ESTÉVEZ, A.G.; KAMAID, A.; THOMPSON, J.A.; CORNWELL, T.L.; RADI, R.; BARBEITO, L.; BECKMAN, J.S. Cyclic guanosine 5' monophosphate (GMP) prevents expression of neuronal nitric oxide synthase and apoptosis in motor neurons deprived of trophic factors in rats. **Neurosci. Lett.**, **326**: 201-205, 2002.
- FINNOCHIARO, L.M.E.; GLIKIN, G.C. Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. J. Pineal Res., 24: 22-34, 1998.
- FRASCHINI, F.; REITER, R.J.; STANKOV, B. The pineal gland and its hormones: fundamentals and clinical perspectives, NATO Asi Series A, Life Sciences, Vol. 277, 1995.
- FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O2⁻), superoxide dismutases, and related matters. J. Biol. Chem. 272: 18515–18517, 1997.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEM-SAMSSON, S.A. Identification of cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol., 119: 493-501, 1992.
- GIBBS, F.P.; VRIEND, J. The half-life of melatonin elimination from rat plasma.
 Endocrinology, 109(5): 1796-1798, 1981.

- GILAD, E.; CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; SALZMAN, A.; SZABÓ, C. Melatonin is a scavenger of peroxinitrite. Life Sci., 60(10): PL169-PL174, 1997
- GILLARDON, F.; KLIMASCHEWSKI, L.; WICKERT, H.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C.; ZIMMERMANN, M. Expression pattern of candidate cell death effector proteins Bax, Bcl-2, Bcl-X, and c-Jun in sensory and motor neurons following sciatic nerve transection in the rat. Brain Res., 739: 244-250, 1996.
- GIUSTI, P.; LIPARTITI; M.; GUSELLA, M.; FLOREANI, M.; MANEV, H. In vitro and in vivo protective effects of melatonin against glutamate oxidative stress and neurotoxicity. Ann. N. Y. Acad. Sci., 825: 79-84, 1997.
- GREENSMITH, L.; VRBOVÁ, G. Motoneurone survival: a functional approach. Trends Neurosci., 19(11): 450-455, 1996.
- GROSS, S.S.; WOLIN, M.S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. Annu. Rev. Physiol., 57: 737-769, 1995.
- HAN, J.; SABBATINI, P.; PEREZ, D.; RAO, L.; MODHA, D.; WHITE, E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. **Genes Dev., 10**: 461-477, 1996.
- HE, B.P.; TAY, S.S.W.; LEONG, S.K. Motoneuronal death without expression of NADPH-diaphorase activity after sciatic nerve cut in 5-day-old mice. Brain Res., 733: 125-128, 1996.
- HIKI, K.; HATTORI, R.; KAWAI, C.; YUI, Y. Purification of insoluble nitric oxide synthase from rat cerebellum. J. Biochem., 111: 556-558, 1992.
- HUANG, P.L.; LO, E.H. Genetic analysis of NOS isoforms using nNOS and eNOS knockout animals. **Prog. Brain Res., 118**: 13-25, 1998.

- ISENMANN, S.; WAHL, C.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C.; BÄHR, M. Up-regulation of bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat. **Eur. J. Neurosci., 9**: 1763-1772, 1997.
- JACOB, D.A.; BENGSTON, C.L.; FORGER, N.G. Effects of bax gene deletion on muscle and motoneuron degeneration in a sexually dimorphic neuromuscular system. J. Neurosci., 25: 5638-5644, 2005.
- JIANG, K.W.; GAO, F.; SHUI, Q.X.; YU, Z.S.; XIA, Z.Z. Effect of diazoxide on regulation of vesicular and plasma membrane GABA transporter genes and proteins in hippocampus of rats subjected to picrotoxin-induced kindling. Neurosci. Res., 50: 319-329, 2004.
- JOHNSON, F.; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health.Mol. Aspects Med., 26: 340-352, 2005.
- JOO, W.S.; JIN B.K.; PARK, C.W.; MAENG, S.H.; KIM, Y.S. Melatonin increases striatal dopaminergic function in 6-OHDA- lesioned rats. **Neuroreport**, **9**: 4123-4126, 1998.
- KANO, T.; SHIMIZU-SASAMATA, M.; HUANG, P.L.; MOSKOWITZ, M.A.; LO, E.H.Effects of nitric oxide synthase gene knockout on neurotransmitter release in vivo.Neuroscience, 86: 695-699, 1998.
- KASHIHARA, Y.; KUNO, M.; MIYATA, Y. Cell death of axotomized motoneurones in neonatal rats, and its prevention by peripheral reinnervation. J. Physiol., 386: 135-148, 1987.
- KAWAI, N.; BLOCH, D.B.; FILIPPOV, G.; RABKINA, D.; SUEN, H.C.; LOSTY, P.D.;
 JANSSENS, S.P.; ZAPOL, W.M.; MONTE, S.; BLOCH, K.D. Constitutive endothelial nitric oxide synthase gene expression is regulated during lung development. Am. J. Physiol., 268: L589-L595, 1995.

- KEILHOFF, G.; FANSA, H.; WOLF, G. Neuronal NOS deficiency promotes apoptotic cell death of spinal cord neurons after peripheral nerve transection. Nitric Oxide, 10(2):101-11, 2004.
- KIM, Y.S.; JOO, W.S.; JIN, B.K.; CHO, Y.H.; BAIK, H.H.; PARK, C.W. Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. Neuroreport, 9: 2387-2390, 1998.
- KOLIATSOS, V.E.; PRICE, W.L.; PARDO, C.A.; PRICE, D. Ventral root avulsion: an experimental model of death of adult motor neurons. J. Comp. Neurol., 342: 35-44, 1994.
- KOLIATSOS, V.E.; PRICE, D.L. Axotomy as an experimental model of neuronal injury and cell death. **Brain Pathol.**, **6**: 447-465, 1996.
- KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; SHABAIK, A.; MIYASHITA, T.; WANG, H.G.; REED, J.C. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. Am. J. Pathol., 145: 1323-1336, 1994.
- KRONCKE, K.D.; SUSCHEK, C.V.; KOLB-BACHOFEN, V. Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. Antioxid. Redox Signal., 2: 585-605, 2000.
- KUNO, M. Target dependence of motoneural survival: the current status. Neurosci. Res.,9: 155-172, 1990.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680–685, 1970.
- LAWSON, S.J.; DAVIES, H.J.; BENNETT, J.P.; LOWRIE, M.B. Evidence that spinal interneurons undergo programmed cell death postnatally in the rat. Eur. J. Neurosci., 9: 794-799, 1997.

- LAWSON, S.J.; LOWRIE, M.B. The role of apoptosis and excitotoxicity in the death of spinal motoneurons and interneurons after neonatal nerve injury. **Neuroscience**, **87**: 337-348, 1998.
- LEIST, M.; NICOTERA, P. Apoptosis, excitotoxicity and neuropathology. Exp. Cell Res.,239: 183-201, 1998.
- LINDENAU, J.; NOACK, H.; POSSEL, H.; ASAYAMA, K.; WOLF, G. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. **Glia**, **29**: 25-34, 2000.
- LIPTON, S.A.; NICOTERA, P. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. Cell Calcium, 23(2,3): 165-171, 1998.
- LOSSI, L.; MERIGHI, A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. **Prog. Neurobiol.**, **69**: 287-312, 2003.
- LOWRIE, M.B.; VRBOVÁ, G. Dependence of postnatal motoneurones on their targets: review and hypothesis. **Trends Neurosci.**, **15**(**3**): 80-84, 1992.
- LOWRIE, M.B.; LAWSON, S.J. Cell death of spinal interneurones. **Prog. Neurobiol., 61**: 543-555, 2000.
- LUNDBERG, J.O.N.; FARKAS-SZALLASI, T.; WEITZBERG, E.; RINDER, J.; LIDHOLM, J.; ÄNGGÅARD, A.; HÖKFELT, T.; LUNDBERG, J.M.; ALVING, K. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. **Nature Medicine**, **1**: 370-373, 1995.
- LYONS, C.R.; ORLOFF, G.J.; CUNNINGHAM, J.M. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. J. Biol. Chem., 267: 6370-6374, 1992.

- MANEV, H.; UZ, T.; GIUSTI, P. Neuroprotective action of the pineal hormone melatonin against excitotoxicity – Receptor abuse-dependent antagonism (RADA). Ann N. Y. Acad. Sci., 825: 85-89, 1997.
- MARIOTTI. R.; PENG, Z.-C.; KRISTENSSON, K.; BENTIVOGLIO, M. Age-dependence induction of nitric oxide synthase activity in facial motoneurons after axotomy. **Exp. Neurol.**, **145**: 361-370, 1997.
- MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; URIA, H.; ANTOLIN, I.; ESTEBAN, M.M.; RODRIGUEZ,C. Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. J. Pineal Res., 24: 179-192, 1998.
- MELOV, S.; SCHNEIDER, J.A.; DAY, B.J.; HINERFELD, D.; COSKUN, P.; MIRRA, S.S.; CRAPO, J.D.; WALLACE, D.C. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. Nat. Genet., 18: 159-163, 1998.
- MICHAELIDIS, T.M.; SENDTNER, M.; COOPER, J.D.; AIRAKSINEN, M.S.; HOLTMANN, B.; MEYER, M.; THOENEN, H. Inactivation of bcl-2 results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development. Neuron, 17:75-89, 1996.
- MIDDLETON, G.; NUNEZ, G.; DAVIES, A.M. Bax promotes neuronal survival and antagonises the survival effects of neurotrophic factors. **Development**, **122**: 695-701, 1996.
- MOLANDER C, GRANT G. Spinal cord cytoarchitecture. In: Paxinos G, editor. The Nervous System. San Diego: Academis Press. 1136 p. 1995.
- MURRAY, M.; WANG, S.D.; GOLDBERGER, M.E.; LEVITT, P. Modification of astrocytes in the spinal cord following dorsal root or peripheral nerve lesions. **Exp. Neurol., 110:** 248-257, 1990.

- NISHIDA, C.R.; MONTELLANO, P.R.O. Electron transfer and catalytic activity of nitric oxide synthases. Chimeric constructs of the neuronal, inducible, and endothelial isoforms. J. Biol. Chem., 273(10): 5566-5571, 1998.
- NOVIKOV, L.; NOVIKOVA, L.; KELLERTH, J.-O. Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and blocks nitric oxide synthase expression in adult rat spinal motoneurons after ventral root avulsion. **Neurosci. Lett., 200**: 45-48, 1995.
- NOVIKOV, L; NOVIKOVA, L; KELLERTH, J-O. Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. **Neuroscince**, **79**: 765-774, 1997.
- OKATANI, Y.; WAKATSUKI, A.; KANEDA, C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. J. Pineal Res., 28(2): 89-96, 2000.
- OLIVEIRA, A.L.; RISLING, M.; DECKNER, M.; LINDHOLM, T.; LANGONE, F.; CULLHEIM, S. Neonatal sciatic nerve transection induces TUNEL labeling of neurons in the rat spinal cord and DRG. **Neuroreport**, **8**: 2837-2840, 1997.
- OLIVEIRA, A.L.; RISLING, M.; NEGRO, A.; LANGONE, F.; CULLHEIM, S. Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. J. Comp. Neurol., 447: 381-393, 2002.
- ORTIZ, G.G.; CRESPO-LOPEZ, M.E.; MORAN-MOGUEL, C.; GARCIA, J.J.; REITER,
 R.J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Protective role of melatonin against MPTP-induced mouse brain cell DNA fragmentation and apoptosis in vivo. Neuroendocrinol. Lett., 22: 101-108, 2001.

- PAAKKARI, I.; LINDSBERG, P. Nitric oxide in the central nervous system. Ann. Med., 27(3): 369-77, 1995.
- PERRY, S.W.; NORMAN, J.P.; LITZBURG, A.; GELBARD, H.A. Antioxidants are required during the early critical period, but not later, for neuronal survival. J. Neurosci. Res., 78: 485-492, 2004.
- PHIFER, C.B.; TERRY, L.M. Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. **Physiol. Behav.**, 38: 887–890, 1986.
- PIEHL, F.; HAMMARBERG, H.; TABAR, G.; HOKFELT, T.; CULLHEIM S. Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat motoneurons depends on age and type of injury. Exp. Brain. Res., 119(2): 191-204, 1998.
- POZO, D.; REITER, R.J.; CALVO, J.P.; GUERRERO, J.M. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. Life Sci., 55: PL455-PL460, 1994.
- PUTTFARCKEN, P.S.; GETZ, R.L.; COYLE, J.T. Kainic acid-induced lipid peroxidation. Protection with butylated hydroxytoluene U7851F in primary cultures of cerebellar granule cells. **Brain Res. 624**: 223-232, 1993.
- REITER, R.J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Prog. Neurobiol., 56**: 359-384, 1998.
- REITER, R.J.; TAN, D.X.; OSUNA, C.; GITTO, E. J. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Biomed. Sci.**, **7**: 444-458, 2000.
- RODRIGUEZ, C.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; ANTOLIN, I.; HERRERA, F.; MARTIN,
 V.; REITER, R.J. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin.
 J. Pineal Res., 36: 1-9, 2004.

- ROGÉRIO, F.; TEIXEIRA, S.A.; SOUZA QUEIROZ, L.; NUCCI, G.; LANGONE, F. Expression of neuronal isoform of nitric oxide synthase in spinal neurons of neonatal rats after sciatic nerve transection. **Neurosci. Lett., 307**: 61-64, 2001.
- ROGERIO, F.; SOUZA QUEIROZ, L.; TEIXEIRA, S.A.; OLIVEIRA, A.L.R.; DE NUCCI, G.; LANGONE, F. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. **Brain Res.**, **926**(1-2):33-41, 2002.
- ROGÉRIO, F.; TEIXEIRA, S.A.; REZENDE, A.C.S.; SÁ, R.C.; QUEIROZ, L.S.; DE NUCCI, G.; MUSCARÁ, M.N.; LANGONE, F. Superoxide dismutase isoforms 1 and 2 in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin treatment. **Dev. Brain Res., 154:**217-225, 2005.
- ROSENFELD, J.; COOK, S.; JAMES, R. Expression of superoxide dismutase following axotomy. **Exp. Neurol., 147**: 37-47, 1997.
- ROSSITER, J.P.; RIOPELLE, R.J.; BISBY, M.A. Axotomy-induced apoptotic cell death of neonatal rat facial motoneurones: time course analysis and relation to NADPH-diaphorase activity. **Exp. Neurol., 138**: 33-44, 1996.
- SATO, T.; IRIE, S.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl-2 protein. **Gene**, **140**: 291-292, 1994.
- SENDTNER, M.; KREUTZBERG, G.W.; THOENEN, H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. **Nature, 345**: 440-441, 1990.
- SENDTNER, M.; HOLTMANN, B.; KOLBECK, R.; THOENEN,H.; BARDE, Y. -A. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. Nature, 360: 757-759, 1992.

- SHEN, Y.H.; WANG, X.L.; WILCKEN, D.E.L. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. **FEBS Lett.**, **433**: 125-131, 1998.
- SKAPER, S.D.; ANCONA, B.; FACCI, L.; FRANCESCHINI, D.; GIUSTI, P. Melatonin prevents the delayed death of hippocampal neurons induced by enhanced excitatory neurotransmission and the nitridergic pathway. **FASEB J., 12**: 725-731, 1998.
- SUN, W.; OPPENHEIM, R.W. Response of motoneurons to neonatal sciatic nerve axotomy in Bax-knockout mice. Mol. Cell Neurosci., 24: 875-886, 2003.
- SWAIN, M.G.; LE, T.; TIGLEY, A.W.; BECK, P. Hypothalamic nitric oxide synthase is depressed in cholestatic rats. **Am. J. Physiol.**, **272**: G1034-1040, 1997.
- TERENGHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. J. Anat., 194: 1-14, 1999.
- TIRAIHI, T.; REZAIE, M.J. Apoptosis onset and Bax protein distribution in spinal motoneurons of newborn rats following sciatic nerve axotomy. Intern. J. Neurosci., 113: 1163-1175, 2003.
- WEINBERG, U. Evidence that melatonin retention by the neonatal rat is greatly increased as compared to the adult: a novel biochemical mechanism. **Brain Res., 217**: 221-224, 1981.
- WHITESIDE, G.; DOYLE, C.A.; HUNT, S.P.; MUNGLANI, R. Differential time course of neuronal and glial apoptosis in neonatal rat dorsal root ganglia after sciatic nerve axotomy. Eur. J. Neurosci., 10: 3400-3408, 1998.
- WONG, H.; ANDERSON, W.D.; CHENG, T.; RIABOWOL, K.T. Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "primer-dropping" method. Anal. Biochem., 223: 251-258, 1994.

- WU, W.; LI, L. Inhibition of nitric oxide synthase reduces motoneuron death due to spinal root avulsion. Neurosci. Lett., 153: 121-124, 1993.
- WU, W.; LIUZZI, F.J.; SCHINCO, F.P.; DEPTO, A.S.; LI, Y.; MONG, J.A.; DAWSON,T.M.; SNYDER, S.H. Neuronal nitric oxide synthase is induced in spinal neurons bytraumatic injury. Neuroscience, 61: 719-726, 1994.
- WU, W.; LI, L.; PENIX, J.O.; GU, Y.; LIU, H.; PREVETTE, D.M. HOUENOU, L.J.; OPPENHEIM, R.W. GDNF and BDNF inhibit the induction of NOS and prevent the death of adult rat spinal motoneurons following root avulsion. Society for neuroscience, 21: 279, 1995.
- WU, W.T. Expression of nitric-oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. **Exp. Neurol., 120**: 153-159, 1993.
- XU, M.; NG, Y.K.; LEONG, S.K. Neuroprotective and neurodestructive functions of nitric oxide after spinal cord hemisection. **Exp. Neurol.**, **161**: 472-480, 2000.
- YAMAMOTO, H.A. Preventive effect of NG-nitro-L-arginine against L-cysteine-induced seizures in mice. **Toxicol. Lett., 84**: 1-5, 1996.
- YAMAMOTO, H.A.; TANG, H.-W. Melatonin attenuates L-cysteine-induced seizures and lipid peroxidation in the brain of mice. J. Pineal Res., 21: 108-113, 1996.
- YAN, Q.; ELLIOTT, J.; SNIDER, W.D. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. **Nature, 360**: 753-755, 1992.
- YELESWARAM, K.; MCLAUGHLIN, L.G.; KNIPE, J.O.; SCHABDACH, D. Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. J. Pineal Res., 22: 45-51, 1997.

- YICK, L.W.; WU, W.; SO, K.F.; WONG, S.Y. Time course of NOS expression and neuronal death in Clarke's nucleus following traumatic injury in adult rat spinal cord. Neurosci. Lett., 241: 155-158, 1998.
- YONEDA, T.; INAGAKI, S.; HAYASHI, Y., NOMURA, T.; TAKAGI, H. Differential regulation of manganese and copper/zinc superoxide dismutases by the facial nerve transection. **Brain Res.**, **582**: 342-345, 1992.
- YU, W.H. Spatial and temporal correlation of nitric oxide synthase expression with CuZn-superoxide dismutase reduction in motor neurons following axotomy. Ann. N. Y. Acad. Sci., 962: 111-121, 2002.
- YU, W.H.A. Regulation of nitric oxide synthase expression in motoneurons following nerve injury. **Dev. Neurosci., 19**: 247-254, 1997.
- YUAN, J.; YANKNER, B.A. Apoptosis in the nervous system. Nature, 407: 802-809, 2000.