

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Débora Vieira Dantas

**EFEITO DA MELATONINA NA SOBREVIVÊNCIA DE
MOTONEURÔNIOS ESPINHAIS E REGENERAÇÃO AXONAL
EM RATOS NEONATOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular na área de: Fisiologia e Biofísica

Orientador Prof. Dr. Francesco Langone

2004

Data da Defesa: 18 de Novembro de 2004

Banca Examinadora:

Prof. Dr. (orientador) _____

Profa. Dr. - _____

Profa. Dra. - _____

DEDICATÓRIA

A Deus, criador da vida

Aos meus pais, com seus rígidos princípios, completo de amor, que nortearam minha vida

Ao Deivisson, que em todos os momentos esteve presente, sendo amigo, companheiro e que
somou uma parte muito especial à minha vida

“A vocês... meu imenso amor e meu sincero agradecimento”.

Agradecimentos

O meu profundo e sincero agradecimento aos que de maneira direta ou indireta esteve abrindo portas imensuráveis para o meu conhecimento científico. De alguma maneira sendo testemunha do meu extenso aprendizado que vai além do plano material. Acredito que este período não seria pleno sem o apoio e o auxílio de todos, que de alguma forma compartilhou seu saber.

Ao Prof. Dr. Francesco Langone, que em todos os momentos me auxiliou com seu amplo conhecimento, com sua incrível capacidade de discernimento e com seu poder de estimular mentes pensantes.

Ao Prof. Dr. Cláudio Antônio Barbosa de Toledo por me acolher e compartilhar seu local de trabalho com tanto respeito, seriedade, educação e paciência.

A Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari por dispor inúmeras vezes seu laboratório, ajudando desta forma na produção do trabalho.

Aos colegas de laboratório pela companhia, ajuda, simpatia, pelos constantes estímulos e pelas amizades sinceras, que tanto facilitou a realização e o enriquecimento do nosso trabalho.

Ao Departamento de Fisiologia e Biofísica da Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, pela constante prestação de serviço.

Ao Departamento de Histologia da Pós-graduação em Biologia Celular, pelo carisma e disposição em ajudar.

Sumário

Resumo	vi
Abstract	viii
1. Introdução	
1.1 Considerações preliminares sobre a geração, sobrevivência e maturação dos motoneurônios.....	01
1.2 A morte dos motoneurônios induzida pela axotomia.....	03
1.3 O papel dos fatores neurotróficos na sobrevivência e maturação dos motoneurônios.....	05
1.4 A atividade excitatória e a formação de óxido nítrico.....	09
1.5 As doenças neurodegenerativas e a morte neuronal.....	14
1.6 Melatonina como neuroprotetor.....	15
2. Objetivos	20
3. Materiais e métodos	21
4. Resultados	27
5. Discussão	40
6. Conclusão	54
7. Referências Bibliográficas	56

Resumo

A morte neuronal pode ser induzida em roedores nas primeiras semanas neonatal após a axotomia pelo esmagamento ou secção do nervo periférico. Tem-se aventada a hipótese de que a interrupção do aporte de fatores neurotróficos, sintetizados pelas células alvo seja a principal causa da morte destas células. Acredita-se que a ausência desses fatores favoreça a ocorrência de reações intracelulares, levando ao aumento da produção de radicais livres e conseqüente morte celular. A par desses relatos sugere-se que os motoneurônios tornam-se mais vulneráveis aos efeitos excitotóxicos na privação desses agentes neurotróficos. Assim, diferentes substâncias antioxidantes e inibidoras da biossíntese de radicais livres vêm sendo testadas em diferentes modelos experimentais no intuito de promover a sobrevivência das células neuronais e regeneração axonal após processo lesivo. Recentemente, evidenciou-se importante efeito antioxidante da melatonina em diversos sistemas biológicos. Por sua natureza altamente lipofílica, tem fácil acesso ao sistema nervoso central, onde foi demonstrada sua capacidade de inibir a ação de radicais livres induzida por substâncias oxidantes em ratos adultos. Experimentos realizados em nosso laboratório mostraram que a melatonina, administrada na dose de 1,0mg/Kg exerceu eficaz ação neuroprotetora sobre os motoneurônios axotomizados em ratos neonatos (P2). Com objetivo de melhor compreender a participação desta substância neuroprotetora durante o tratamento prolongado com a mesma, técnicas de marcação retrógrada foram utilizadas para identificação e contagem do grupamento motor do nervo ciático. Foi obtido um número maior de motoneurônios marcados com traçador retrógrado nos animais tratados com melatonina após 30 e 60 dias pós-lesão. Análises quantitativas foram realizadas nos axônios regenerados do nervo tibial. Verificamos que a ação neuroprotetora capacitou os neurônios sobreviventes a acelerar o processo de regeneração de suas fibras mielínicas após o esmagamento, quando os diferentes tempos de sobrevida foram comparados. Porém, não houve diferença significativa no número computado de axônios entre os animais tratados com melatonina ou veículo após 23 e 53 dias de lesão. Observamos que a melatonina e sua ação contra a

formação de radicais livres não foi capaz de manter um número significativo de motoneurônios sobreviventes quando comparado aos animais normais.

Abstract

Neuronal death can be induced in rats in the early postnatal period after peripheral nerve crush or transection. Peripheral neurotrophic support interruption might facilitate intracellular reactions which increases production of free radicals by the demised cells, leading to neuronal cell death. Many reports suggest that motoneurons become vulnerable to excitotoxic effects due to deficiency of neurotrophic factors provision. Consequently, different types of antioxidants substances and/or inhibitors of free radicals biosynthesis have been tested in different experimental models in order to promote survival and regeneration of motoneurons after lesion. Recently, an important antioxidant effect of melatonin was observed in several biological systems. Given that melatonin is a lipophilic molecule, it can effortlessly break the hematoencephalic barrier and reach the central nervous system, where it's capacity on inhibit free radicals action induced by oxidant substances on adult rats was demonstrated. Our own previous experiments showed the effective neuroprotective action of melatonin (1,0mg/Kg, sc) on axotomised motoneurons of newborn rats. To investigate the later protective role of melatonin, retrograde labeling techniques were performed after axotomy for identification and counting of neurons from the motor pool of the sciatic nerve. A significant number of labeled cells were found in animals treated with the neurohormone after 30 and 60 days postlesion. The quantitative analysis of regenerating axons in tibial nerve verified that melatonin's neuroprotective action allowed the surviving neurons to accelerate the regeneration process of their myelinated fibres after crush. However, there was no significant difference on the number of axons between vehicle and melatonin treated animals after 23 and 53 days postlesion. We also observed that the efficacy of melatonin against free radicals production was not able to maintain a considerable number of surviving motoneurons, when compared to normal animals.

1. INTRODUÇÃO

1.1- Considerações preliminares sobre a geração, sobrevivência e maturação dos motoneurônios

O número de motoneurônios medulares presentes no indivíduo adulto é determinado por mecanismos finamente regulados durante as fases embrionária e pós-natal. Esses mecanismos estão implicados na eliminação de grande parte das células nervosas formadas durante a neurogênese e na diferenciação destas em neurônios motores (Kumo, 1990). A redução do número de neurônios gerados ocorre principalmente através da morte celular denominada apoptose, que é induzida pela ativação de vários genes e síntese de proteínas específicas, sendo então, eliminadas sem a ocorrência de um desencadeamento inflamatório. Por sua vez, os motoneurônios que permaneceram íntegros a este fenômeno biológico estabelecerão contatos sinápticos funcionais com outros neurônios e com seus respectivos órgãos-alvo (Hamburger, 1958; Levi Montalcini, 1987; Oppenheim, 1991; Oppenheim et al.,1993).

Acredita-se que a sobrevivência e conseqüente maturação dos motoneurônios durante o desenvolvimento embrionário dependa da interação destas células no seu contato sináptico com as fibras musculares (Oppenheim, 1991; Burls et al., 1991; Lowrie & Vrbová, 1992) e com as células de Schwann (Riethmacher et al.,1997; Grieshammer et al., 1998). Neste sentido, Riethmacher et

al. (1997) mostraram que embriões de camundongos homozigotos para mutação no gene que codifica o receptor erbB3 da neuroregulina, não desenvolviam células de Schwann e apresentavam uma redução significativa na população de motoneurônios espinhais (79%). Este achado destacou a idéia de que as células de Schwann seriam tão importante quanto o contato com seu órgão alvo. Por sua vez, Grieshammer et al. (1998) verificaram nos embriões de camundongos transgênicos, cujas células musculares foram eliminadas pela expressão de um fragmento da toxina diftérica, a perda de quase toda a população de motoneurônios espinhais. Além disto, os autores observaram que outros sinais tróficos produzidos por fontes não musculares, como as células de Schwann, sustentaram apenas 10% dos motoneurônios até o período embrionário E18. Estes dados reforçaram a hipótese de que os motoneurônios gerados durante a embriogênese são primariamente dependentes do suporte trófico derivado do alvo e posteriormente dos fatores tróficos derivados da interação desta com as células de Schwann (Sendtner et al., 2000).

Baseado nisto, acredita-se que esta dependência dos motoneurônios das células musculares parece não se restringir somente à fase de desenvolvimento embrionário, mas se estende ao período imediatamente pós-natal. Diversos autores obtiveram evidências de que os motoneurônios mesmo após o nascimento continuam ainda dependentes desta interação, competindo por uma quantidade limitada de agentes neurotróficos sintetizados nas fibras musculares que, através de transporte axonal retrógrado, são enviados ao corpo celular (Lanser et al., 1986; Oppenheim, 1991; Lowrie & Vrbová, 1992; Greensmith et al., 1994; Jacobson et

al.,1997). De fato, é bem conhecido que a secção e o esmagamento de nervos em ratos neonatos, entre P0 e P7, resulta na morte dos motoneurônios, sugerindo que o suporte trófico fornecido pelas células de Schwann não seja suficiente para garantir a sobrevivência destes neurônios durante esse período (Greensmith & Vrbová, 1992, 1996).

Além disso, Greensmith et al. (1994) sugeriram que a sinalização provinda do alvo poderia aumentar a atividade da enzima acetil-colina transferase (ChAT), necessária para a síntese de acetilcolina (Ach) nos neurônios motores. Esses achados levaram Greensmith & Vrbová (1996) a considerar que a sobrevivência e a maturação dos motoneurônios seria dependente desta indução para a produção do neurotransmissor, que se iniciaria após o estabelecimento da atividade sináptica na junção neuromuscular. Tal processo levaria estas células para a fase de maturação, resultando num estado relativamente independente do órgão alvo no que diz respeito ao fornecimento de fatores neurotróficos (Vrbová & Lowrie, 1989; Sendtner et al., 1990; Greensmith & Vrbová, 1992; Oppenheim et al., 1995; Greensmith et al.,1994, 1996; Greensmith & Vrbová 1996; Greensmith et al., 2000).

1.2- A morte dos motoneurônios induzida pela axotomia

A lesão axonal dos neurônios motores periféricos pela desconexão entre o corpo neuronal e o alvo muscular podem provocar a perda de praticamente todos os motoneurônios presentes na medula espinhal, semelhante ao que acontece no

período embrionário durante o processo de morte celular programada (Motoy Kuno, 1990; Greensmith & Vrbová, 1992, 1996).

Conforme já referido, após o nascimento e durante a primeira semana pós-natal, os motoneurônios de roedores ainda apresentam-se morfológica e funcionalmente imaturos (Greensmith & Vrbová, 1992). A axotomia provocada pela secção ou esmagamento do nervo periférico neste período induz uma rápida e maciça perda desses neurônios. Neste processo as células imaturas entram em estado de degeneração sem a ocorrência de cromatólise, momento este em que o corpo celular apresenta-se edemaciado e excentricidade do núcleo. Segundo Schmalbruch (1984) a ausência deste processo de cromatólise nos motoneurônios imaturos seria devido à incapacidade de sua maquinaria celular em sintetizar proteínas citoplasmáticas para a regeneração axonal. Ao contrário dos neonatos, a mesma lesão reproduzida nos animais adultos não induz morte dos motoneurônios (Lowrie et al., 1982, 1987; Greensmith & Vrbová, 1992).

Apesar disto, os motoneurônios maduros respondem a axotomia com uma reversível cromatólise, devido à contínua síntese de componentes do citoesqueleto, tais como neurofilamentos e microtúbulos, podendo assim, iniciar o processo de regeneração e crescimento de neurites (Prince et al., 1990).

Baseado nas diferentes características dos efeitos da axotomia durante o desenvolvimento e na idade adulta, presume-se que a rápida morte dos motoneurônios em ratos neonatos se deva à interrupção da fase de interação trófica e funcional com as suas fibras musculares (Sendtner et al., 1990;

Greensmith & Vrbová, 1992; Oppenheim et al., 1995; Greensmith et al., 1994, 1996).

Devemos destacar neste processo, esta particular importância da interação trófica entre os motoneurônios e as células musculares durante o desenvolvimento, já que estas células são a fonte primordial de agentes neurotróficos para a sobrevivência nesta fase.

1.3- O papel dos fatores neurotróficos na sobrevivência e maturação dos motoneurônios

Os fatores neurotróficos são proteínas caracterizadas pela seletividade de sua ação sobre diferentes populações neuronais do sistema nervoso central e periférico. Um paradigma dessas moléculas é o fator de crescimento do nervo (NGF), presente nos territórios alvo de neurônios simpáticos e sensoriais, de onde é capturado pelos terminais axônicos destas células e transportados até o corpo celular, exercendo aí seus efeitos tróficos (Levi-Montalcini e Hamburger, 1951, 1987; Rich et al., 1987).

Nas últimas décadas, foram identificados outros fatores neurotróficos, bem como as populações neuronais sobre as quais exerce sua ação específica (Terenghi G. 1999; Sendtner et al., 2000). Dentre os fatores que exercem ação trófica sobre motoneurônios estão diversas neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), as neurotrofinas 3 (NT-3), 4/5 (NT-4/5) e 6 (NT-6) (Barde et al., 1978; Ernfors et al., 1990; Berkemeier et al., 1991; Vantini & Skaper,

1992; Terenghi G. 1999). Outros importantes fatores neurotróficos que atuam sobre os motoneurônios são o fator neurotrófico ciliar (CNTF) e o fator inibitório de leucemia (LIF) da família das citocinas, assim como os fatores de crescimento semelhante à insulina 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) e o fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFb) (Yamamori et al., 1989; Vantini & Skaper, 1992; Terenghi G. 1999; Sendtner et al., 2000). Mais recentemente, verificou-se que o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), identificado a princípio como um fator de sobrevivência e diferenciação de neurônios dopaminérgicos *in vitro*, é também um potente promotor da sobrevivência de motoneurônios *in vivo* e neurônios autonômicos (Lin et al., 1993; Henderson et al., 1994; Zurn et al., 1994; Oppenheim et al., 1993, 1995; Sendtner et al., 2000)

Dentre os estudos sobre o grau de dependência das células neuronais a diferentes moléculas neurotróficas, Arakawa et al. (1990) mostraram que as citocinas CNTF e FGFb foram mais potentes que o NGF, BDNF e NT-3 em garantir a sobrevivência de motoneurônios embrionários de pintainhos cultivados *in vitro*. Por sua vez, Sendtner et al. (1990, 1992), realizando estudos *in vivo* verificaram em ratos neonatos com 2 dias de vida (P2) que as moléculas de CNTF e NT-3 causaram expressivo efeito protetor sobre motoneurônios, observado 7 dias após a secção do nervo ciático. Estudos *in vivo*, realizados por vários outros autores, mostraram também que o BDNF foi capaz de reduzir a morte de motoneurônios após axotomia em ratos neonatos e após a avulsão de raízes ventrais em animais já em fase adulta (Yan et al., 1992; Sendtner et al., 1992; Henderson et al., 1993; Novitskov et al., 1995).

Com o objetivo de comparar os efeitos protetores de várias neurotrofinas e citocinas *in vivo*, Vejsada et al. (1995) investigaram a ação neurotrófica do NGF, NT-3, NT-4/5, BDNF, CNTF e LIF quando administrados localmente após a secção do nervo ciático em ratos neonatos (P3). Uma semana após a lesão, as neurotrofinas, com exceção do NGF, aumentaram a sobrevivência dos motoneurônios de maneira mais potente que as citocinas CNTF e LIF. Porém, o resgate destas células foi apenas transitório, pois um número significativo de motoneurônios continuou a morrer após a segunda semana da lesão, mesmo sendo administrado um suporte de BDNF e/ou CNTF através de injeções subcutâneas repetidamente, por um período superior a 2 semanas.

Conforme já referido, o GDNF também foi identificado como um potente promotor da sobrevivência de motoneurônios *in vivo*. Além disso, recentemente Boyd & Gordon, (2003) mostraram que o GDNF é muito mais potente do que o BDNF na promoção da regeneração axonal motora após secção do nervo tibial em ratos adultos. Esse achado concorda com estudos anteriores de que o GDNF em relação ao BDNF apresenta maior eficiência na neuroproteção dos motoneurônios, tanto em células de pintainhos durante o desenvolvimento (Oppeinheim et al., 1995), quanto em neonatos, após a lesão do nervo ciático (Vejsada et al., 1998). Boyd & Gordon, (2003) observaram ainda que o tratamento combinado de GDNF e BDNF aumentou significativamente o número de motoneurônios que regeneraram seus axônios, mostrando que, embora a ação neurotrófica destas moléculas se realize por vias intracelulares distintas, elas podem se potencializar.

Outra ação importante dos fatores neurotróficos sobre os neurônios motores é sua capacidade de induzir a regulação da atividade colinérgica dos mesmos (Greensmith et al., 2000). Dados que fundamentam esta hipótese, foram obtidos através do tratamento de culturas de motoneurônios com BDNF, NT-3 e CNTF, que levou ao aumento da atividade da enzima colina-acetil-transferase (ChAT), nessas células (Martinou et al., 1992; Wong et al., 1993; Zurn et al., 1994). Por sua vez, Chiu et al. (1994) observaram que a redução da enzima ChAT, provocada pela secção do nervo hipoglosso em ratos adultos, poderia ser impedida pela aplicação do BDNF na extremidade do coto proximal. Também Kishino et al. (1997) verificaram que a administração intratectal do BDNF após a avulsão das raízes espinhais de ratos adultos reduziu a atrofia celular e aumentou a síntese da enzima ChAT. Segundo os autores, os resultados também indicaram que o BDNF apresentou a capacidade de estimular o crescimento axonal dos neurônios motores periféricos.

O conjunto de dados obtidos até o momento sobre a natureza dos fatores neurotróficos sugere que seu papel na biologia dos motoneurônios derive da sua ação conjunta e coordenada, quer durante o desenvolvimento, quer após eventos lesivos (Sendtner et al., 2000). Portanto, em particular, Lowrie & Vrbová (1992) e Ju et al., (1994) relatam a possibilidade da ausência destes fatores não ser necessariamente a única causa de morte celular nos motoneurônios imaturos lesados. Acredita-se que a axotomia tem atribuído maior vulnerabilidade dos motoneurônios aos efeitos excitotóxicos. Estes efeitos promovidos por certos aminoácidos provindo dos terminais axônicos que chegam no corpo celular do

neurônio, podem levar o aumento da produção de radicais livres após eventos lesivos (Lowrie & Vrbová, 1992; Ju et al. 1994; Greensmith et al., 1994).

1.4- A atividade excitatória e a formação de óxido nítrico

O glutamato é um dos aminoácidos excitatórios presente em níveis milimolares na substância cinzenta do sistema nervoso central (SNC). Os altos níveis deste aminoácido estão tipicamente concentrados nos terminais nervosos. Após a sua liberação, um mecanismo de captação dependente de energia rapidamente o remove da fenda sináptica. A finalidade deste mecanismo segundo Choi (1988) é evitar a exposição prolongada dos neurônios a esta ação excitatória. De fato, Lucas & Newhouse (1957) e Onley (1969) já tinham verificado que a administração exógena do glutamato provoca degeneração de neurônios da retina e em outras regiões do SNC. Esses achados levaram à hipótese excitotóxica das ações do glutamato (Onley et al., 1971). Em alguns episódios de hipoxemia ou isquemia, a redução da captação deste aminoácido combinada com o seu efluxo, derivada da despolarização dos neurônios glutamatérgicos, pode levar ao aumento deste neurotransmissor na fenda sináptica, gerando o efeito excitotóxico (Choi, 1988).

O glutamato atua sobre 3 tipos de receptores; Kainato, AMPA e NMDA. O Kainato e o AMPA quando ativados abrem seus canais iônicos voltagem-dependente, iniciando um fluxo de íons Na⁺ e K⁺ com conseqüente despolarização da membrana neuronal. Tal ação despolarizante estimula a ativação do receptor

NMDA que se encontra bloqueado pelo íon Mg^{+2} voltagem-dependente. Por sua vez, quando ativado libera o bloqueio do Mg^{+2} , permitindo assim, a atuação excitatória do glutamato e a abertura de canais iônicos permeáveis tanto para o Na^{+} como para Ca^{+2} .

Novelli et al. (1988); Nowak et al. (1984) acreditam que a produção energética intracelular (ATP) permita a funcionalidade da bomba ATPases Na^{+}/K^{+} , a qual é responsável pela manutenção do potencial de repouso. Este equilíbrio iônico, segundo os autores mantém os canais do receptor NMDA bloqueado pelo Mg^{+2} . Neste sentido, Novelli et al. (1988) demonstraram que a transição do glutamato de um neurotransmissor para uma molécula neurotóxica foi facilitada quando a energia celular foi diminuída em culturas de neurônios cerebelares. Segundo seus achados, a privação de energia, pela ausência de glicose ou na presença de um inibidor da bomba de Na^{+}/K^{+} , impediu o bloqueio do íon Mg^{+2} sobre os canais iônicos deste receptor. Esta alteração levou a redução da atividade da bomba iônica envolvida na manutenção do potencial de repouso, prolongando desta forma, a fase de despolarização. Tal fato permite que as células neuronais permaneçam em constante padrão de excitabilidade sináptica.

Alguns autores relataram que certas condições traumáticas e patológicas envolvendo a depleção de energia podem reduzir a eficácia dos neurônios em corrigir perturbações induzida pela exposição ao glutamato, propiciando o aumento na síntese de radicais livres e levando à morte neuronal (Schulz et al., 1995; Coyle & Puttfarcken, (1993). De fato, acredita-se que a morte dos motoneurônios submetidos a axotomia pode levar ao aumento da produção de óxido nítrico (NO) e

radicais livres derivados deste composto (Clowry, 1993; Wu & Li, 1993; Wu et al., 1995; Novikov et al., 1995, 1997; Rossiter, 1996; Yu, 1997; Mariotti et al., 1997; Estevéz et al., 1998; Yick et al., 1998)).

Durante a liberação do glutamato, quando ocorre redução da captação do mesmo ou a alteração da sensibilidade do seu receptor, tais distúrbios podem promover a atuação excessiva deste neurotransmissor sobre o receptor NMDA (N-methyl-D-aspartato), aumentando a concentração de Ca^{2+} no interior da célula. Acredita-se que este receptor seja a base importante para a atuação neurotóxica do neurotransmissor glutamato em uma variedade de desordens neurológicas (Novelli et al., 1988; Dawson et al., 1991). Portanto, este aumento intracelular de Ca^{2+} , citado acima, estimula a expressão da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (nNOS) (Dawson et al., 1991). Tal mecanismo segundo Reiter (1998), resulta na produção do NO a partir da nNOS, e o mesmo inicia uma cascata de reações as quais podem levar à destruição neuronal (Reiter, 1998).

A molécula de NO, por possuir um elétron desemparelhado em seu orbital pode interagir com diversas moléculas intracelulares, inclusive outros radicais livres como o superóxido (O_2^-) (Bredt & Snyder, 1994; Gross & Wolin, 1995; Dawson & Dawson, 1996). Neste caso, é produzido peroxinitrito (ONOO^-), ao qual atribuí-se uma ação deletéria, como peroxidação de lipídeos nas membranas, inibição da respiração mitocondrial e indução de apoptose em neurônios (Dawson et al., 1993; Bonfoco et al., 1995; Gilad et al., 1997; Leist & Nicotera, 1998; Lipton & Nicotera, 1998).

Tem-se observado que em ratos neonatos ou adultos a expressão de NOS em motoneurônios medulares, normalmente encontra-se ausente ou muito baixa (Valtschanoff et al., 1992; Dun et al., 1993; Novikov et al., 1995). Em 1993, empregando a técnica da NADPH-d (nicotinamida dinucleotídeo fosfato diaforase), Clowry evidenciou que a secção do nervo ciático em ratos com um dia de vida (P1), provocou um aumento desta enzima nos motoneurônios do grupamento lateral da intumescência lombar, o que foi correlacionado com a degeneração e morte dos mesmos. Wu et al. (1995) verificaram que a degeneração de motoneurônios cervicais, provocada por avulsão das raízes ventrais de ratos P1 e P8, era antecedida pela expressão de nNOS nessas células. Tal expressão foi evidenciada pela técnica da NADPH em 5, 10 e 15 dias após a lesão. Em 1996, Rossiter et al., também observaram aumento da expressão da nNOS em neurônios motores no núcleo do nervo facial após a secção deste em ratos P1. A fragmentação de DNA nos motoneurônios, indicação de apoptose, antecedia o aumento de expressão da nNOS nestas células, sugerindo que o NO ou seus metabólitos não seriam desencadeadores do apoptose neste modelo, embora, pudessem contribuir para o seu desenvolvimento. Outras observações semelhantes foram feitas por Mariotti et al. (1997), ao estudarem a indução da NOS no núcleo do nervo facial em ratos recém-nascidos (P0) 1, 2 e 4 dias após a axotomia.

Notamos, portanto, que estes diferentes resultados podem ser atribuídos aos diferentes períodos de maturação dos motoneurônios do nervo facial e dos nervos espinhais, além da susceptibilidade à privação de fatores neurotróficos (Lowrie & Vrbova, 1992).

Nos ratos adultos parece haver uma correlação entre a privação desses fatores neurotróficos com o aumento da produção de NO e morte de motoneurônios axotomizados. O papel dos fatores neurotróficos na regulação da nNOS foi evidenciado por Wu et al. (1995). Após avulsão de raízes ventrais de ratos adultos, a expressão dessa enzima nos motoneurônios lesados foi inibida pela administração de BDNF e GDNF. Estes fatores possuem baixa expressão no nervo ciático normal, a qual aumenta significativamente após a secção deste (para revisão vide Terenghi, 1999).

Novikov et al. (1995) também relataram que a administração de BDNF em ratos adultos cujas raízes ventrais do segmento medular L5 foram avulsionadas, reduziu significativamente a expressão da nNOS nos motoneurônios lesados. Observações realizadas em culturas primárias de motoneurônios embrionários de ratos privados de BDNF revelaram o aumento da expressão da nNOS (Estévez et al., 1998). Aproximadamente 60% destes neurônios entraram em apoptose 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 [manganese tetrakis (4-benzoyl acid) porphyrin], uma molécula de ação intracelular similar a SOD (superóxido dismutase), impediu a morte dos motoneurônios provocada pela ausência de BDNF. Estes autores propuseram que a privação de fatores neurotróficos levaria ao aumento da expressão da nNOS nos motoneurônios embrionários cultivados e, conseqüentemente, à maior produção de peroxinitrito, o qual induziria apoptose.

Esse mecanismo verificado pela literatura, tem sido enfocado também como o principal responsável pela morte neuronal nos insultos neuropatológicos.

1.5- As doenças neurodegenerativas e a morte neuronal

Alguns processos de perda neuronal observados na sintomatologia clínica em humanos tem sido provenientes de quadros relacionados com as patologias neurodegenerativas. Essa perda é comumente encontrada nas doenças de Alzheimer, Huntington, Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS). A etiopatologia dessas moléstias ainda é desconhecida (Oppenheim et al., 1995), porém, várias hipóteses surgiram com a finalidade de esclarecer o seu mecanismo de ação. Acredita-se que durante o processo fisiopatológico a ausência ou defeito da interação trófica entre os neurônios e seus alvos estariam contribuindo para estas desordens (Appel, 1981; Snider & Johnson, 1989). Por outro lado, tem-se considerado também que os danos oxidativos que se iniciam durante processo de envelhecimento forneçam um papel importante para o desencadeamento neuropatológico destas doenças (Reiter, 1998). Portanto, acredita-se que estes distúrbios possam estar envolvidos separadamente ou em combinação para o surgimento dos danos neurológicos (Coyle & Puttfarcken, 1993).

A questão etiológica para identificar as causas e o tratamento efetivo para as condições devastadoras dessas doenças, ainda é diversificada. Acredita-se, porém, que o estresse oxidativo tenha uma influência primordial sobre essas complexas síndromes neurológicas (Halliwell, 1992; Olanow, 1993; Reiter, 1998).

Dentro deste contexto geral de degeneração e destruição neuronal, várias substâncias vêm sendo testadas com a finalidade de inibir a biossíntese de radicais livres e seus conseqüentes danos oxidativos, além de fornecer suporte para a sobrevivência neuronal.

1.6- Melatonina como neuroprotetor

A melatonina vem ganhando espaço importante entre as substâncias utilizadas como protetoras das células neuronais. Há evidências de que os efeitos deletérios dos radicais livres no sistema nervoso central podem ser reduzidos pela melatonina (N-acetyl-5-methoxytryptamina) (para revisão vide Reiter, 1998). Nos vertebrados a glândula pineal é a principal fonte desta indolamina, mas também pode ser produzida por uma variedade de outros tecidos, incluindo a retina (Pang & Allen, 1986), intestino (Huether et al., 1992), glândulas Harderianas (Menéndez-Peláez, 1990) e leucócitos mononucleares (Finocchiaro et al., 1988).

Classicamente a melatonina foi referida como agente regulador para a transmissão de informações fotoperiódicas e como modulador do ciclo reprodutivo (Reiter, 1980). Contudo, recentemente foi descoberto que este neurohormônio é um eficiente neutralizador de radicais livres e antioxidante (Hardeland et al., 1993; Reiter et al., 1993; Reiter et al., 1995). Em condições fisiológicas a melatonina inibe a atividade da nNOS em neurônios cerebelares e hipocámpais de ratos (Pozo et al., 1994; Bettahi et al., 1996), e as doses farmacológicas estimulam enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase em cérebro de ratos (Barlow-Walden et

al., 1995). Verificou-se que o tratamento com melatonina diminui a incidência de infartos cerebrais induzidos pela administração de L-cisteína em camundongos (Yamamoto & Tang 1996). Segundo Yamamoto (1996), o mecanismo de ação da L-cisteína envolveria a superprodução de NO determinando assim, uma intensa peroxidação de lipídeos. Observou-se que este neurohormônio protege neurônios do hipocampo e *striatum* 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-Castreviejo et al., 1997).

A melatonina é capaz de reduzir as lesões degenerativas em cérebros de ratos que receberam injeções de ácido kaínico (Giusti et al., 1997). Este composto é agonista de um subtipo de receptor ionotrópico de glutamato, e é capaz de induzir excitotoxicidade nos neurônios em culturas, através da geração de radicais livres (Dykens et al., 1987; Puttarcken et al., 1993). Dentro deste contexto, Manev et al., (1996) analisaram as concentrações fisiológicas da melatonina e observaram que tais concentrações também podem reduzir os danos causados pelo ácido kaínico no sistema límbico de ratos, embora, em menor grau do que as doses farmacológicas. Confirmando este dado, Giusti et al., (1996) sugeriram que o uso das doses farmacológicas pode permitir que o SNC esteja provido com concentrações biologicamente ativas desta indolamina. De fato, tem verificado a redução da concentração fisiológica da melatonina durante o envelhecimento, o que pode tornar os neurônios mais susceptíveis à ação deletéria dos radicais livres (Reiter et al., 1997).

Outros experimentos mostraram que este composto tem ação antioxidante em células nervosas mantidas em culturas. A adição desta substância em culturas de células granulares de cerebelo de rato, tratadas previamente com ácido kaínico, diminuiu a ocorrência de morte celular (Giusti et al., 1997). Semelhantemente, o tratamento de neurônios em culturas com melatonina reduziu a ocorrência de apoptose induzida por 6-hidroxidopamina (Mayo et al., 1998). Esta neurotoxina provoca seus efeitos deletérios através da produção de radicais livres (Cohen & Heikkila, 1974).

Dentre todas essas atuações que definem esta indolamina como neuroprotetora, seu mecanismo de ação no corpo celular é ainda incerto. Sabe-se que a atuação da mesma na regulação de ritmos biológicos seria mediada por receptores de membrana (Vanecek et al., 1998). Acredita-se, porém, que sua ação antioxidante ocorra difusamente no núcleo e no citosol já que, por sua natureza lipofílica, este neurohormônio poderia difundir-se facilmente pelas membranas fosfolipídicas e se acumular em todos os compartimentos celulares, incluindo o núcleo (Costa et al., 1995; vide revisão Reiter, 1993; Reiter et al., 1997).

Recentemente, empregando-se o modelo da secção do nervo ciático em ratos neonato, verificou-se que o tratamento com melatonina reduziu a perda de motoneurônios induzida pela lesão periférica (Rogério et al., 2002). Especificamente, a morte de motoneurônios pós-axotomia, avaliada 5 dias após a lesão, foi reduzida significativamente pelo tratamento com esta substância nas doses de 1, 5, e 10 mg/Kg. Por outro lado, a imunomarcção para nNOS não evidenciou diferenças na expressão desta enzima entre os motoneurônios

ipsilaterais e contralaterais a axotomia, independente da dose empregada. O mesmo resultado foi observado também nos animais que não foram tratados com melatonina. Portanto, a perda neuronal observada neste modelo experimental, no quinto dia pós-lesão, parece não ser decorrente da ação direta da nNOS das células lesadas. Porém de alguma maneira a melatonina esteve agindo contra a atuação do estresse oxidativo.

Outros autores também já haviam constatado essa ação da melatonina observada por Rogério et al (2002). Barlow-Walden et al. (1995) observaram aumento da atividade da glutathione peroxidase (GSH_Px) cerebral em ratos tratados com melatonina. Esta enzima, importante protetora neuronal contra o estresse e danos oxidativos (Mirault et al., 1994), diminuiria a formação de radicais livres hidroxil, pois converteria peróxido de hidrogênio, precursor do hidroxil, em água. Okatani et al., (2000) demonstraram aumento de atividade da GSH-Px e da superóxido dismutase (SOD) em cérebro de fetos de ratos cujas mães receberam melatonina. A SOD, por sua vez, sendo uma importante enzima antioxidante que utiliza o ânion superóxido como substrato, catalisaria a síntese de peróxido de hidrogênio, o qual poderia ser convertido em água pela GSH-Px ou pela catalase desfazendo assim, sua ação tóxica.

Além destas reações intracelulares dos radicais livres, a morte celular induzida pela axotomia pode também ser favorecida pela ativação de células gliais que quando ativadas podem diferenciar-se em macrófagos e exercer função citotóxica, liberando moléculas geradoras de ações oxidativas. No entanto, em muitas investigações a melatonina tem protegido o SNC dos danos causados pelos

radicais livres e por uma variedade de toxinas que incluem MPTP, peptídeo β -amiloíde e lesões por isquemia e reperfusão (Li et al., 2002; Shen et al., 2002; Pappolla et al., 2002; Pei et al., 2002). Todos esses relatos, portanto, conferem a melatonina o papel neutralizador de radicais livres e antioxidante.

A par destas observações, alguns trabalhos têm mostrado que os motoneurônios axotomizados que sobrevivem à lesão tendem a regenerar seus axônios. Por outro lado, Chan et al.(2002) mostraram que motoneurônios de ratos neonatos (P1 e P7) nos quais as raízes espinhais ventrais foram avulsionadas, não se mostraram capacitados em regenerar suas fibras axonais no interior de enxertos de nervos periféricos autólogos. Além disso, esse tipo de lesão é bem mais severo do que a axotomia produzida pelo esmagamento do nervo, por localizar-se próximo à região do corpo celular do neurônio. Outros autores, portanto, verificaram que os neurônios motores sobreviventes após o esmagamento do nervo ciático de ratos neonatos foram eficientes em atingir as fibras musculares e restabelecer as junções mioneurais, mesmo não tendo recebido nenhum tratamento (Domizio et al.,1981; Naidu et al., 1996). Porém, esta regeneração axonal e reinervação mioneural ocorrida após a lesão foi extremamente pobre, sem nenhuma ação funcional, principalmente nos músculos de contração rápida, como o extensor longo dos dedos (Lowrie et al., 1982; Gorio et al., 1983; Naidu et al., 1996). Entretanto, diversos autores vêm mostrando que o tratamento de ratos neonatos (P3-P5) com moléculas neurotróficas ou estimulantes da regeneração axonal, após o esmagamento do nervo ciático, melhora quantitativamente a reinervação muscular

(Baumgartner & Shine, 1998; Gorio et al., 1998; Vergani et al., 1998; Mousavi et al., 2002).

Baseado nas características peculiares do efeito neuroprotetor da melatonina, é possível supor que os motoneurônios protegidos por esta indolamina e sobreviventes à lesão possam ser capazes de regenerar seus axônios.

De acordo com os fatos, podemos notar que o uso da melatonina vem ganhando um amplo espaço nas estratégias terapêuticas, podendo ser considerado um eficiente tratamento farmacológico contra a formação de radicais livres e contra doenças neurodegenerativas associadas a este processo. Porém, é importante inquirir se após uma axotomia em neonatos, a neuroproteção provinda deste neurohormônio possa contribuir para a sobrevivência prolongada dos motoneurônios e regeneração de suas fibras nervosas periféricas danificadas.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Baseados nas propriedades terapêuticas atribuídas a melatonina sobre as células neuronais, este trabalho teve como objetivo geral investigar o efeito neuroprotetor desta indolamina sobre motoneurônios axotomizados em ratos neonatos (P2).

Como objetivos específicos, nos propusemos:

- Investigar se a administração diária da melatonina é capaz de garantir a sobrevivência e regeneração axonal de motoneurônios 30 dias após esmagamento do nervo ciático de ratos neonatos (P2).
- Investigar se a administração da melatonina por 30 dias, a partir do esmagamento do nervo ciático em ratos neonatos, é capaz de garantir a sobrevivência e regeneração axonal dos motoneurônios 60 dias após a lesão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais e grupos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar com idade de dois dias (P2) fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Os animais foram mantidos junto à mãe durante todo o período de amamentação (por 22 dias) e após, foram separados de acordo com sexo e distribuídos em grupos de no máximo 5 animais por gaiola. Durante todo o período, foram deixados sob condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro) e temperatura (21°C). Foram estabelecidos 2 grupos experimentais com 6 subgrupos (n=5), de acordo com o tipo de tratamento e tempo de sobrevivência (Tabela 1). Os animais tratados com melatonina (A)

receberam doses de 1mg/kg, como descrito no item 3.3, e os animais (B) que receberam apenas o veículo de diluição.

TABELA 1: Divisão dos grupos experimentais em subgrupos de tratamento e animais normais para o estudo da ação neuroprotetora da melatonina após o esmagamento do nervo ciático em ratos recém nascidos.

Grupo	Subgrupo (n=5)	Esmagamento do nervo ciático	Tratamento com Melatonina	Idade ao final do experimento
1	1A	SIM	SIM	30 DIAS
	1B	SIM	NÃO	30 DIAS
	1C	NÃO	NÃO	30 DIAS
2	2A	SIM	SIM	60 DIAS
	2B	SIM	NÃO	60 DIAS
	2C	NÃO	NÃO	60 DIAS

3.2- Procedimentos cirúrgicos para a lesão do nervo ciático

Os animais dos subgrupos "A" e "B" com idade P2, foram anestesiados por hipotermia e imediatamente posicionados em decúbito lateral sob microscópio cirúrgico (DF Vasconcelos, M90). A pele da coxa esquerda foi incisada e, afastando-se a musculatura, o nervo ciático foi exposto. Com auxílio de microtesoura (Vannas, Steel Inox-S.OF3212) o nervo foi dissecado até sua emergência no forame isquiático, onde se realizou a lesão. O nervo ciático foi esmagado empregando-se uma pinça de ponta fina com travas, desenhada especialmente para esse fim, por duas vezes seguidas durante 15 segundo cada.

Após esse procedimento o nervo foi examinado em grande aumento (24X) para avaliar a integridade do epineuro, sendo descartados aqueles que apresentaram evidente interrupção anatômica do mesmo. Em seguida, a musculatura foi reposicionada e a pele suturada com fio de seda 8-0 (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 e 14 horas.

3.3- Tratamento com melatonina

A administração da melatonina foi realizada em todos os animais 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 cirurgia, imediatamente após, 1 hora e 2 horas após a mesma. A partir do dia seguinte ao esmagamento do ciático, a melatonina foi aplicado em dose única no mesmo horário (14:00 h), durante 30 dias. Para os animais controle que receberam doses equivalentes do veículo de diluição, seguiu-se o mesmo protocolo de tratamento.

De acordo com os resultados obtidos em experimentos prévios em nosso laboratório (Rogério *et al.*, 2001, 2002), e conforme dados sobre a farmacodinâmica e a farmacocinética da melatonina em ratos adultos (Gibbs & Vriend, 1981; Yeleswaram *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Joo *et al.*, 1998) e neonatos (Weinberg, 1981), a dose empregada foi de 1,0 mg/kg por via subcutânea.

3.4- Procedimentos para marcação, contagem e morfometria dos motoneurônios

Após o período de 23 e 53 dias a partir da lesão, o animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina (160mg/kg) e cloridrato de xilazina (32mg/kg), (20mg e 4mg respectivamente; 0,15ml/100g peso corpóreo, i.p.) e o nervo ciático esquerdo foi seccionado na altura média da coxa. Na extremidade livre do coto proximal foi implantado um tubo de polietileno contendo gel-foan embebido com 1µl de solução de Amina Dextrana Biotinilada (BDA - peso molecular 3000, 20% em tampão citrato de sódio). Durante este procedimento, um segmento (4mm) do coto distal do nervo ciático foi removido e depositado em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2% e paraformaldeído 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4), para posterior processamento e inclusão em resina (item 4.5). Os animais íntegros (sem lesão) dos subgrupos "C", com idade igual aos dos grupos "A" e "B", foram processados da mesma maneira.

Sete dias após o implante dos tubos contendo BDA, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 3% (60mg/Kg i.p.) e perfundidos transcardiacamente com salina 0,9%, seguida de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Após esse procedimento, foram eviscerados e mantidos na mesma solução fixadora por 24 horas. A seguir, a intumescência lombar da medula espinhal foi dissecada e transferida para a solução de sacarose de 20 e 30% (tampão fosfato de sódio 0,1 M; pH 7,3) à 4°C por 24 horas simultaneamente. Após

este tratamento de crioproteção os espécimes foram congelados diretamente no criostato (Leica CM1850) em modo *PELTIER* à temperatura de 65°C negativos.

Cortes seriados e longitudinais da intumescência lombar com espessura de 30µm foram obtidos no criostato. Os cortes foram coletados em tampão fosfato de sódio (0,1M e pH 7,4) e processados para evidenciar os motoneurônios marcados com BDA.. Inicialmente, foram tratados em peróxido de hidrogênio (5ml/100ml de tampão fosfato 0.1M, pH 7.4) durante 30 minutos. A seguir, foram lavados com tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) por 30 minutos sob agitação. Após a lavagem, os cortes foram incubados com complexo Avidina–Biotina (Vectastain ABC Kit, VECTOR Labs) por período de 1 hora. Ao final desse processo, foram novamente lavados em tampão fosfato (0,1M; pH 7,4) por 30 minutos e reagidos com diaminobenzidina (DAB; 25mg/100ml tampão fosfato 0,1M; pH 7,4) durante 5 minutos. A adição de peróxido de hidrogênio (200µl) por 10 minutos permitiu a visualização dos motoneurônios contendo BDA.

Os cortes assim processados, foram coletados em lâminas histológicas, contra-corados com Giemsa, desidratados e montadas com Entelan (Merck). Todos os corpos celulares marcados com BDA foram identificados e contados ao microscópio de luz com aumento final de 40 vezes. O número obtido foi corrigido empregando-se os fatores derivados da fórmula de Abercrombie (1946).

Para a análise do tamanho do corpo celular dos motoneurônios marcados, 50 células em cada animal foram aleatoriamente escolhidas sob a intumescência lombar. O número total de neurônios motores de cada subgrupo experimental (n=5)

foi então avaliado e o diâmetro médio calculado através do programa analisador de imagens SigmaScan Pro v.3.0.

3.5- Procedimentos para processamento e contagem dos axônios mielínicos

Os nervos coletados em solução de Karnovsky foram mantidos nesse fixador por 48 horas a 4°C. Logo em seguida, lavados em tampão fosfato (0,1M pH 7,4; 3x20minutos) e pós-fixados por um período de 2 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído (1:1) em tampão fosfato (0,2M; pH7,4).

Ao final da pós-fixação, os nervos foram lavados em água destilada, desidratados em gradiente crescente de acetona e embebidos numa mistura (1:1) de resina (Epon) e acetona, por 24 horas. Após esse procedimento os espécimes foram transferidos para uma solução de resina pura por mais 4 horas. Em seguida, incluídos e levados à estufa a 60°C por 72 horas. Com o material polimerizado, cortes transversais semifinos (3µm) foram obtidos com auxílio de um ultramicrótomo (LKB, Bromma 8800), equipado com navalha de vidro. Os cortes foram coletados em lâminas e corados em uma solução aquosa de azul de toluidina (0,5%).

Para a contagem das fibras axonais mielínicas, os cortes imediatamente após a coloração, foram visualizados ao microscópio óptico sob objetiva de imersão e digitalizados com auxílio do programa Leica IM50.iaa Image Manager. Após esses procedimentos, os axônios do nervo tibial foram contados com o auxílio do programa SigmaScan Pro v. 3.0.

3.6- Análises Estatísticas

Os valores obtidos na contagem (média±erro-padrão) dos motoneurônios e das fibras axonais mielínicas foram submetidos à avaliação estatística através da análise da variância, segundo o teste de Student Neumann-Keuls, $p < 0,05$, empregando o programa GraphPad InStat® 3.0.

4. RESULTADOS

4.1- Marcação dos motoneurônios com Amina Dextrana Biotinilada (BDA)

O emprego do BDA como marcador neuronal no nosso modelo experimental exigiu que determinássemos o tempo necessário para o seu transporte até o corpo celular dos motoneurônios. Este procedimento foi indispensável para a identificação precisa do grupo desses neurônios da intumescência lombar, cujos axônios contribuem na formação do nervo ciático.

Observamos inicialmente que o transporte retrógrado do traçador durante períodos menores a uma semana, não foi suficiente para produzir uma marcação adequada. De tal maneira que nos animais sacrificados ao terceiro dia após a aplicação do BDA, o traçador estava ausente ou em pequenas quantidades nos motoneurônios (Fig.1a). Por outro lado, quando permitimos que os animais

sobrevivessem por sete dias após a aplicação do BDA verificamos um denso acúmulo deste composto nestas células neuronais motoras apresentando uma coloração marrom, em aspecto granular, cuja distribuição permaneceu confinada no citoplasma, sem a presença desta pigmentação no núcleo. As células que foram marcadas apresentavam clara nitidez de seus corpos celulares, típica de neurônios multipolares com extensos processos dendríticos acompanhado de suas ramificações. A morfologia exibida por essas células, já descrita acima, permitiu apurar com exatidão, sua localização e contagem na intumescência lombar dos animais estudados (Fig.1b).

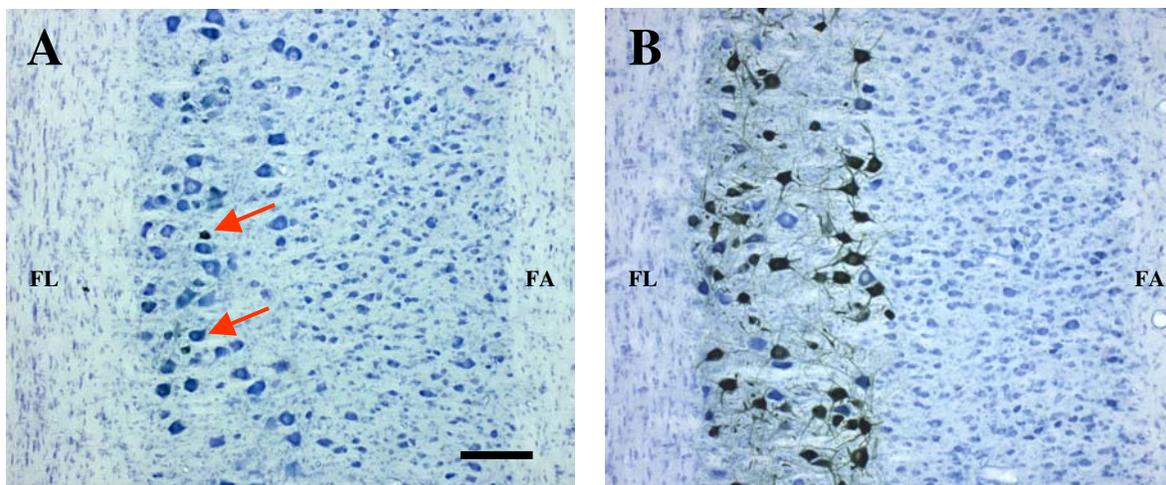


Figura 1. Cortes longitudinais da intumescência lombar de animais normais reagidos para detecção dos motoneurônios contendo BDA, 3 dias (A) e 7 dias (B) após a aplicação do traçador. Note em A a presença de apenas alguns motoneurônios contendo BDA (seta). Em B pode-se observar um grande número de motoneurônios contendo denso acúmulo desse traçador, distribuído no corpo e prolongamentos. Contracoloração com Giemsa. Barra = 90 μ m. FA- Funículo Anterior, FL- Funículo lateral

4.2- Distribuição e contagem dos motoneurônios na intumescência lombar

A investigação da sobrevivência neuronal 30 dias após o esmagamento do nervo ciático revelou que nos animais tratados com melatonina, as células marcadas com BDA encontravam-se distribuídas na porção mais caudal da medula lombar, entre o nível do segmento de L4 e L5. Sua distribuição topográfica dentro desses segmentos foi uniforme e semelhante ao observado nos animais normais. Ao contrário, no subgrupo tratado com veículo os motoneurônios se encontravam dispersos dentro desses mesmos segmentos e a frequência de células com fraca marcação foi maior que a observada nos animais tratados com melatonina e nos animais normais. Contudo, os motoneurônios marcados com BDA em ambos subgrupos lesados apresentavam características morfológicas semelhantes às observadas nos animais normais, exibindo extensos processos dendríticos e ramificados (Fig. 2).

A contagem foi realizada sem exclusão de células, independente da intensidade da marcação, da visualização do nucléolo ou do tamanho do soma neuronal. O número de motoneurônios contendo BDA entre os animais tratados com melatonina (301 ± 69 ; $n=6$) e os animais tratados com o veículo de diluição (141 ± 89 ; $n=6$; $p < 0,05$) revelaram diferenças estatisticamente significantes. Esses valores corresponderam, respectivamente, a 25% e 12% dos motoneurônios presentes nos animais normais (1216 ± 11 , $n=6$). (Fig.4)

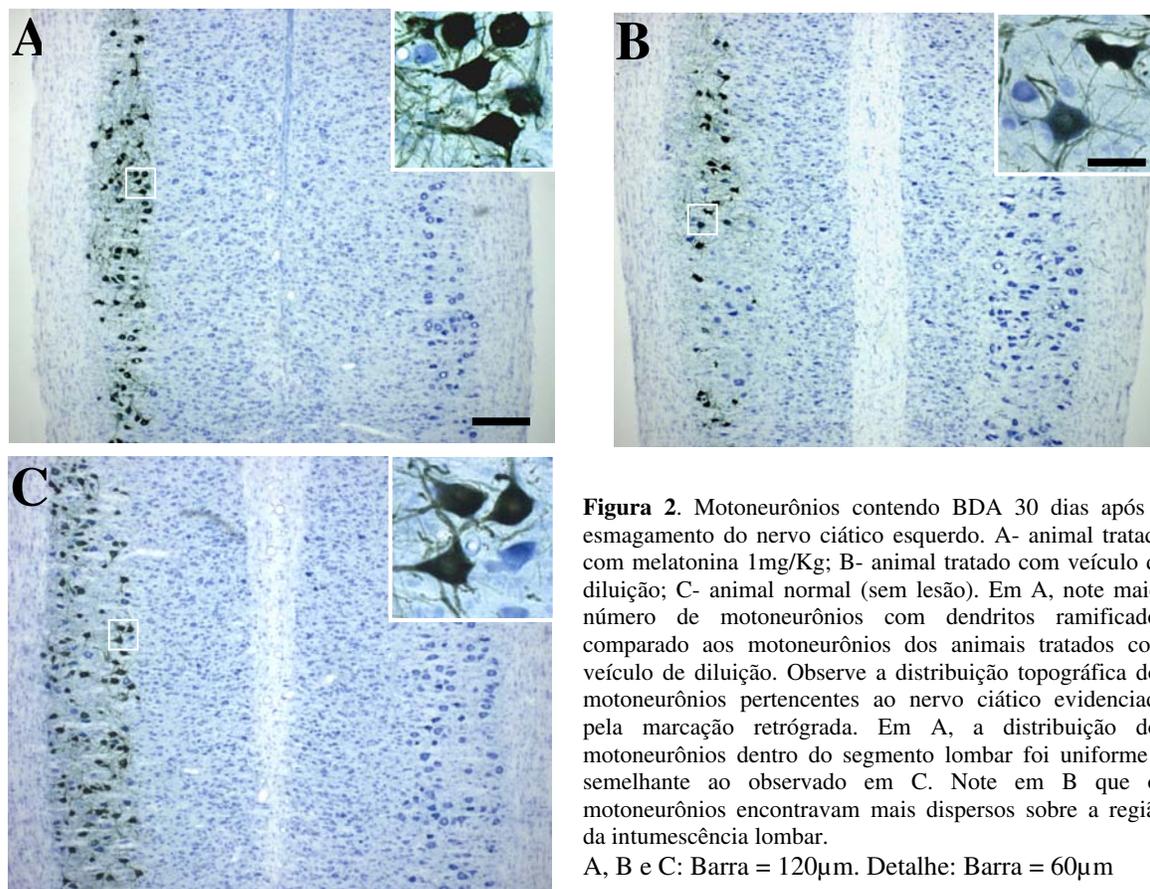


Figura 2. Motoneurônios contendo BDA 30 dias após o esmagamento do nervo ciático esquerdo. A- animal tratado com melatonina 1mg/Kg; B- animal tratado com veículo de diluição; C- animal normal (sem lesão). Em A, note maior número de motoneurônios com dendritos ramificados comparado aos motoneurônios dos animais tratados com veículo de diluição. Observe a distribuição topográfica dos motoneurônios pertencentes ao nervo ciático evidenciada pela marcação retrógrada. Em A, a distribuição dos motoneurônios dentro do segmento lombar foi uniforme e semelhante ao observado em C. Note em B que os motoneurônios encontravam mais dispersos sobre a região da intumescência lombar.

A, B e C: Barra = 120 μ m. Detalhe: Barra = 60 μ m

No grupo de 60 dias após o esmagamento do nervo ciático, a observação da intumescência lombar também revelou a presença de motoneurônios contendo BDA, distribuídos principalmente na região dos segmentos de L4 e L5. No subgrupo tratado com melatonina essas células estavam mais densamente agrupadas que nos animais tratados com veículo. De tal forma que a distribuição topográfica dos motoneurônios foi semelhante ao observado no grupo de 30 dias após a lesão em ambas situações experimentais. Contudo, a marcação dos motoneurônios nestes animais tratados com melatonina ou veículo foi menos intensa ao observado nos animais de 30 dias. Ou seja, em um animal tratado com

melatonina e/ou veículo ocorriam desde células com intensa reação para localização do traçador até células pouco marcadas (Fig. 3).

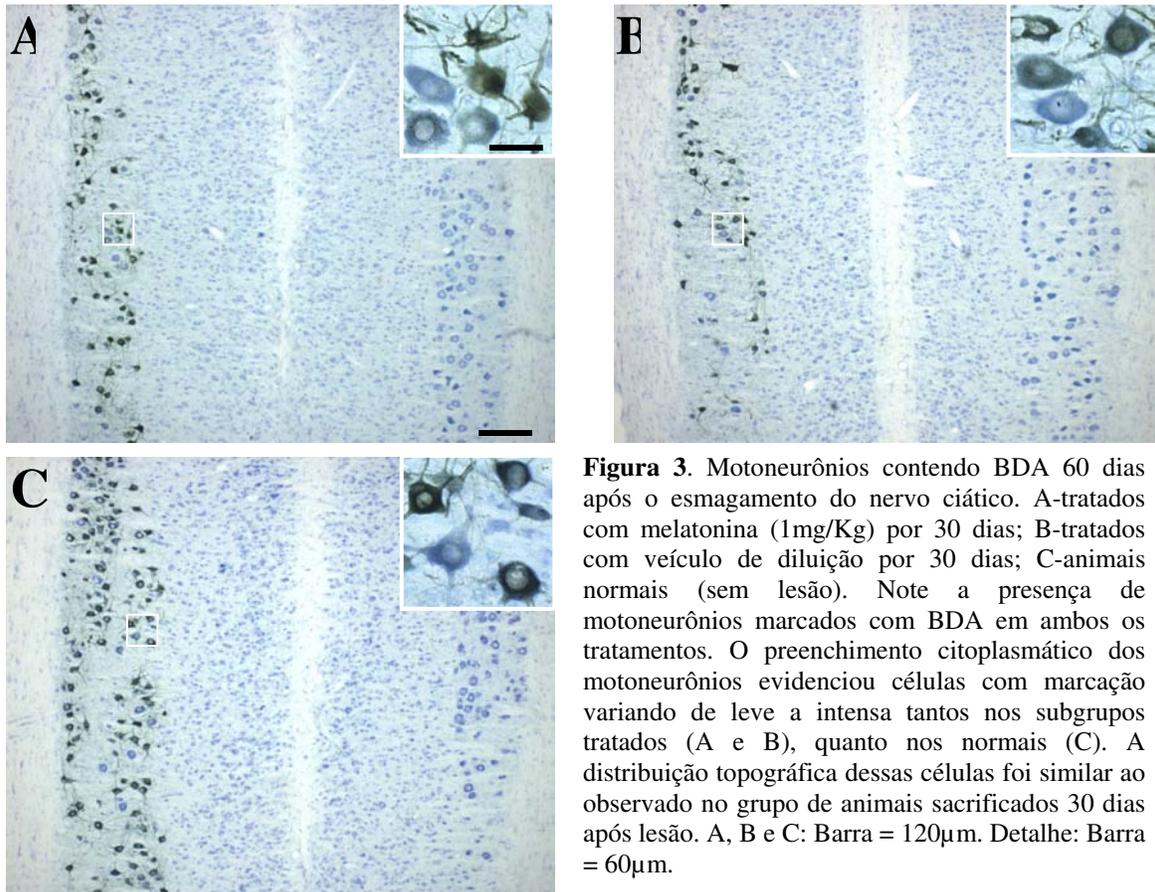


Figura 3. Motoneurônios contendo BDA 60 dias após o esmagamento do nervo ciático. A-tratados com melatonina (1mg/Kg) por 30 dias; B-tratados com veículo de diluição por 30 dias; C-animais normais (sem lesão). Note a presença de motoneurônios marcados com BDA em ambos os tratamentos. O preenchimento citoplasmático dos motoneurônios evidenciou células com marcação variando de leve a intensa tanto nos subgrupos tratados (A e B), quanto nos normais (C). A distribuição topográfica dessas células foi similar ao observado no grupo de animais sacrificados 30 dias após lesão. A, B e C: Barra = 120µm. Detalhe: Barra = 60µm.

Todas as células neuronais que apresentavam pigmentações citoplasmáticas, semelhantemente à regra utilizada nos animais de 30 dias entraram na contagem. Porém, não houve diferença estatística no número de motoneurônios contendo BDA no subgrupo tratado com melatonina (277 ± 56 ; $n=4$) quando comparado ao número computado nos animais tratados com veículo (213 ± 68 ; $n=5$). Esses valores foram inferiores ao registrado nos subgrupos de

animais normais (1158 ± 56 ; $n=6$; $p < 0,001$) e corresponderam, respectivamente, a 24% e 19% dos motoneurônios presentes nestes últimos (Fig.4)

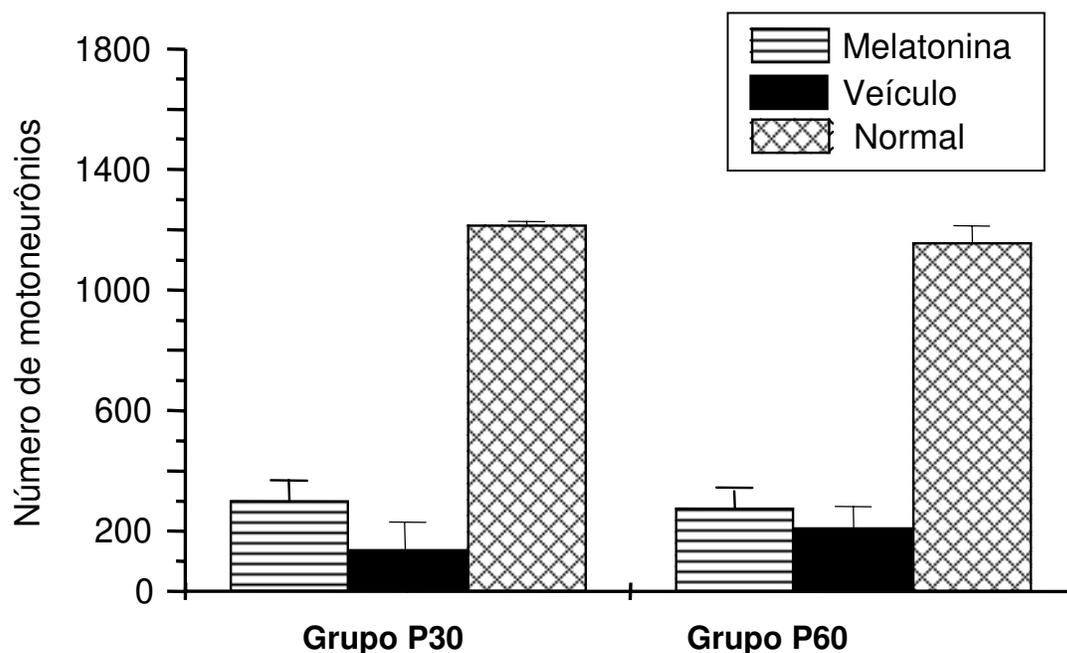


Figura 4. O gráfico mostra a contagem dos motoneurônios ao longo da intumescência lombar, 30 e 60 dias após o esmagamento do nervo ciático. Observe que o número de motoneurônios computados nos animais tratados com melatonina 30 dias após a lesão (301 ± 69 ; $n=6$) foi significativamente maior ($p < 0,05$) aos animais tratados com veículo (141 ± 89 ; $n=6$). Note que no grupo de 60 dias, o número de motoneurônios contendo BDA nos animais tratados com melatonina (277 ± 56 ; $n=4$) não foi significativo ao computado nos animais tratados com veículo (213 ± 68 ; $n=5$). Os valores encontrados em ambos os grupos foram inferiores ao registrado nos animais normais.

A comparação do número de motoneurônios marcados com o traçador entre os animais que sobreviveram por 30 e 60 dias após axotomia não revelou diferenças estatísticas significantes, independentemente do tipo de tratamento em que os animais foram submetidos. Porém, no subgrupo tratado com melatonina houve uma tendência de redução no número de motoneurônios contendo BDA entre os

diferentes tempos de sobrevivência. Ao contrário, no subgrupo de animais tratados com o veículo essa tendência foi de aumento.

4.3- Morfometria dos motoneurônios marcados com BDA

Após os 30 dias de lesão, o diâmetro médio dos motoneurônios sobreviventes a axotomia foi de $35,3 \pm 5,0 \mu\text{m}$ e $34,2 \pm 4,8 \mu\text{m}$, nos animais tratados com melatonina ou veículo, respectivamente. Por sua vez, nos animais normais esse parâmetro apresentou o valor de $37,3 \pm 5,1 \mu\text{m}$. A análise estatística mostrou que os motoneurônios nos animais tratados com melatonina ou veículo possuíam diâmetro estatisticamente diferente ao observado nos animais normais ($p < 0,001$). (Fig.5).

Nos animais sacrificados 60 dias após lesão, o diâmetro médio dos motoneurônios foi de $37,7 \pm 6,3 \mu\text{m}$ e $37,6 \pm 6,4 \mu\text{m}$, para os tratados com melatonina ou veículo, respectivamente. Nos animais normais de mesma idade dos animais lesados, o diâmetro dos motoneurônios foi de $38,6 \pm 7,5 \mu\text{m}$. Ao contrário do observado nos animais sacrificados após 30 dias da lesão, não houve diferença estatística das dimensões do corpo celular dos motoneurônios entre os animais axotomizado e os normais. (Fig.6)

A análise estatística dos valores obtidos revelou que os motoneurônios que tenderam a aumentar de diâmetro com o tempo, apresentavam diferença significativa ($p < 0,001$) quando os subgrupos de tratamento, entre os animais sacrificados após 30 e 60 dias foram comparados. Observamos que entre os

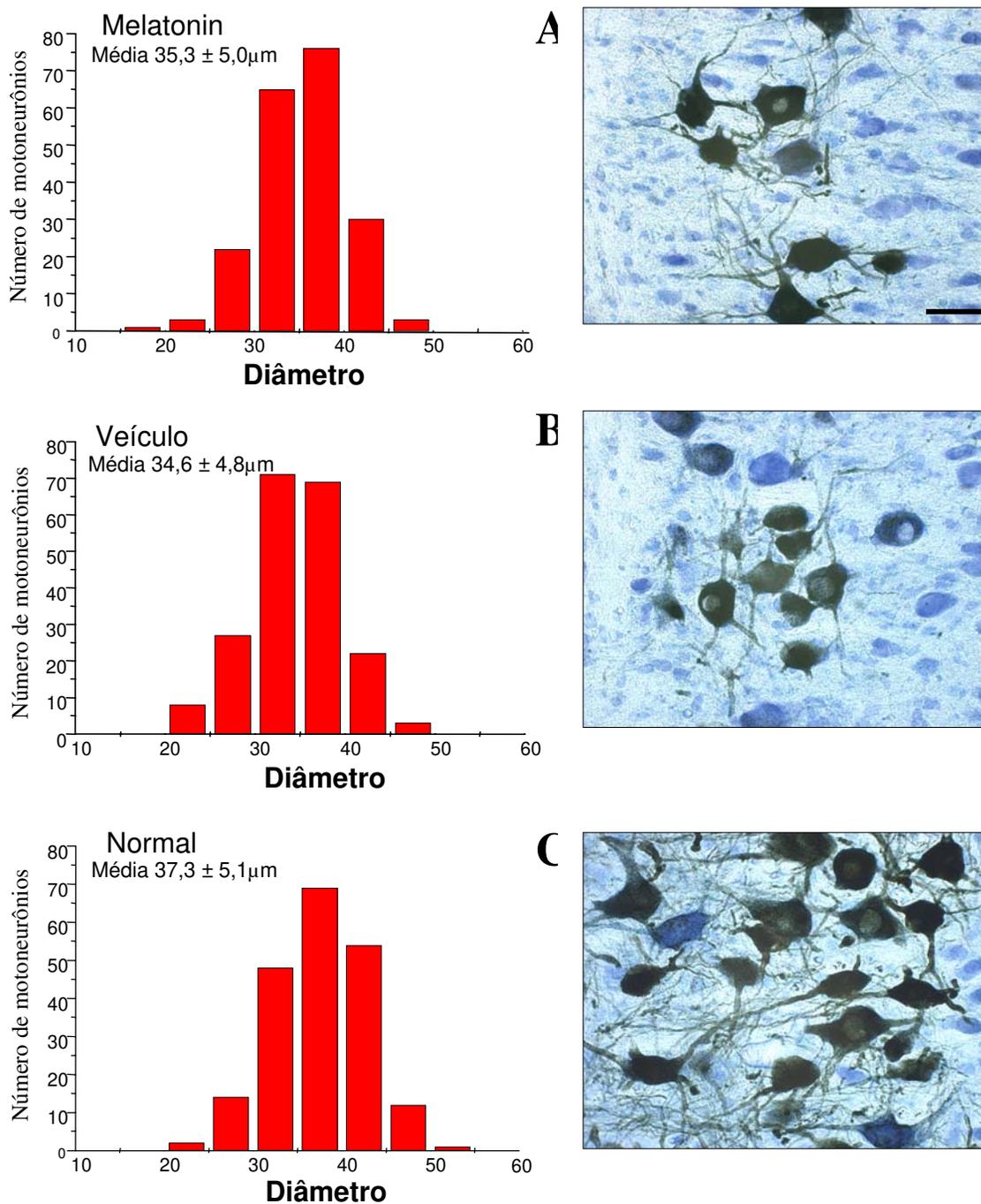


Figura 5. Os gráficos mostram a distribuição dos valores do diâmetro dos corpos celulares dos motoneurônios marcados com BDA, 30 dias após a lesão nos animais tratados com melatonina 1mg/Kg; veículo de diluição e animais normais. A análise morfométrica mostrou que os motoneurônios marcados e sobreviventes à lesão apresentavam diâmetro inferior ao observado nos animais normais ($p < 0,05$). As figuras A, B e C correspondem a uma das áreas amostradas para a avaliação morfométrica em cada situação experimental, respectivamente. Barra = $30 \mu\text{m}$

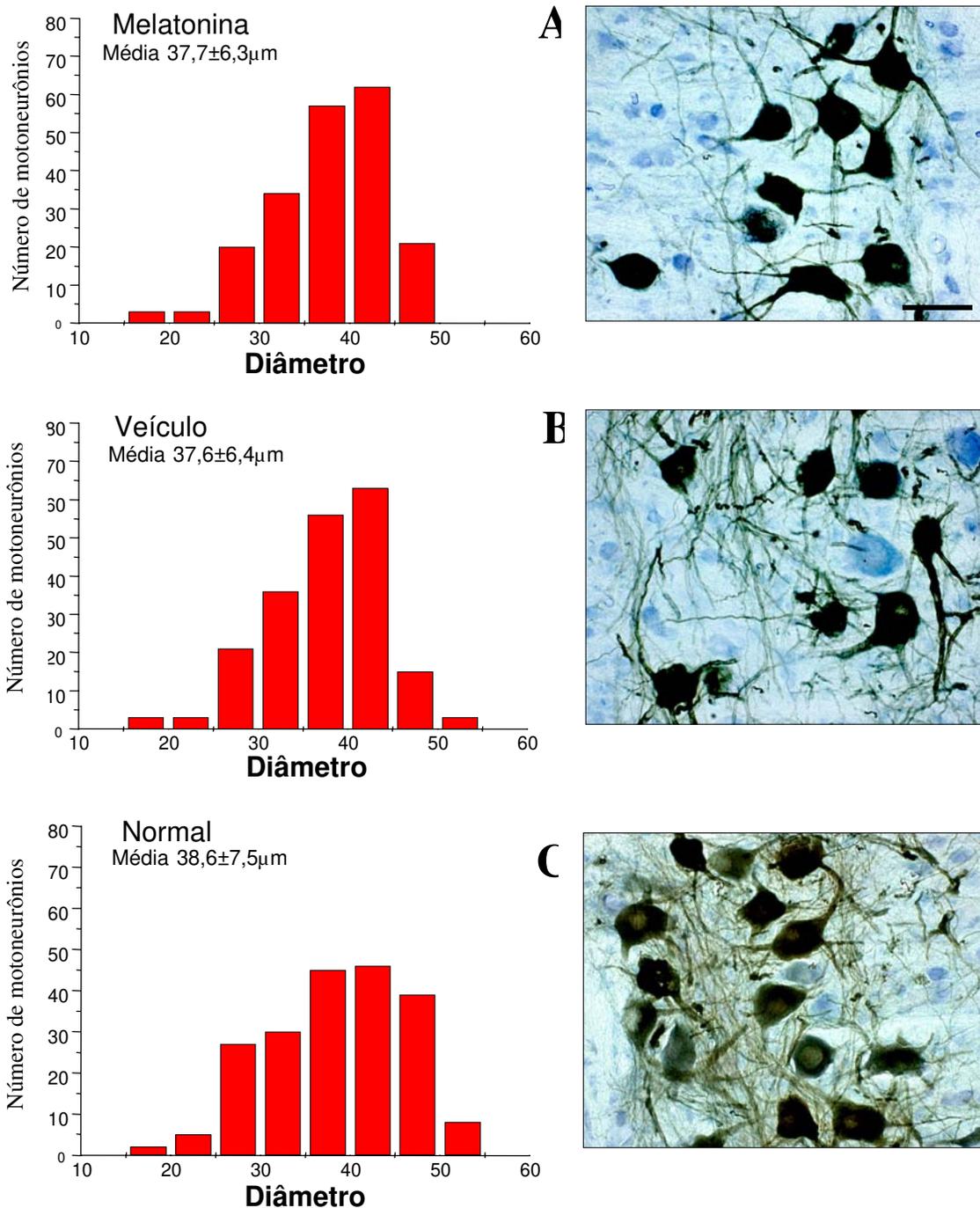


Figura 6. Os graficos mostram a distribuição dos valores do diâmetro dos corpos celulares dos motoneurônios marcados com BDA, 60 dias após a lesão nos animais tratados com melatonina 1mg/Kg; veículo de diluição e animais normais. A análise morfométrica não mostrou diferença entre a média do diâmetro dos corpos celulares dos animais lesados e animais normais. As figuras A, B e C correspondem a uma das áreas amostradas para a avaliação morfométrica em cada situação experimental, respectivamente. Barra = $30 \mu\text{m}$

mais normais com idades correspondentes aos dos subgrupos lesados não houve diferença significativa ($p < 0,05$).

4.4- Análise qualitativa e quantitativa do nervo tibial

A observação dos cortes histológicos dos nervos tibiais obtidos a partir da porção distal ao esmagamento, 23 e 53 dias após a lesão, revelou a presença de axônios mielínicos regenerados, tanto nos subgrupos tratados com melatonina, quanto nos tratados com veículo. Grande número desses axônios possuía calibre menor e bainha de mielina mais delgada que os observados nos subgrupos de animais não lesados. Porém, foi observado que nos animais tratados com melatonina, as fibras mielínicas apresentavam morfologia similar aos axônios dos animais normais (Fig.7). A análise qualitativa dos cortes corados com azul de toluidina evidenciou também um aumento da vascularização nos nervos regenerados quando comparados aos nervos normais. Embora, esse aumento da quantidade de vasos tenha ocorrido tanto no perineuro como no endoneuro, neste último tecido conjuntivo o aumento foi particularmente evidente. (Fig.8)

A contagem do número total de axônios mielínicos no nervo tibial mostrou que 23 dias após a lesão, os animais tratados com melatonina (3065 ± 116 ; $n=4$) não apresentavam diferença significativa ($p < 0,05$) no número de axônios mielínicos regenerados quando comparados com os animais tratados com veículo (2711 ± 156 ; $n=4$).

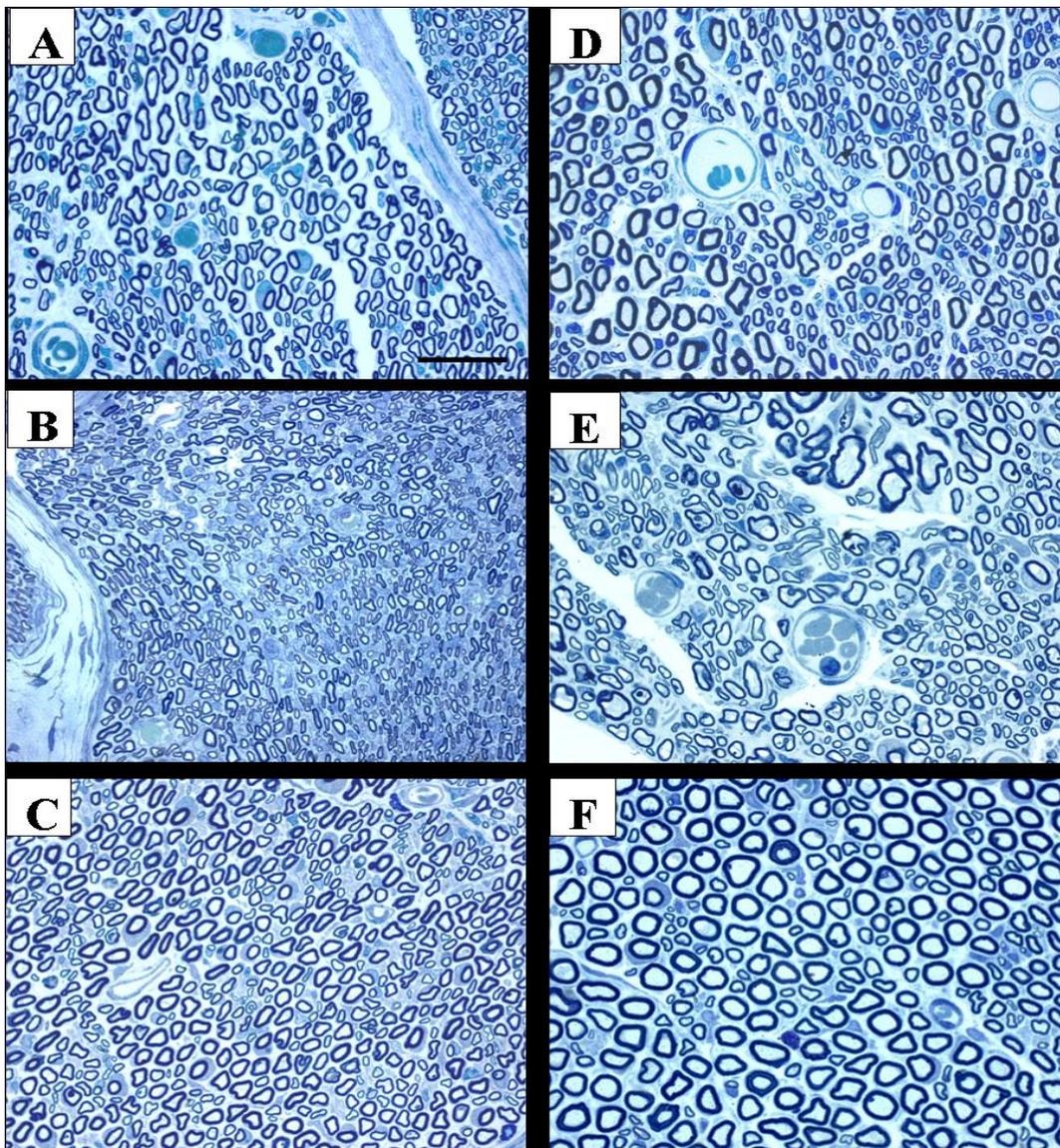


Figura 7. Cortes do nervo tibial 23 dias (A, B, C) e 53 dias (D, E, F) após o esmagamento do nervo ciático esquerdo, corados com azul de toluidina. A e D-animais tratados com melatonina 1mg/kg; B e E-animais tratados com veículo de diluição; C e F-animais normais. Observe a presença de axônios mielínicos de menor calibre nos animais lesados (A, B, D e E) independente do tratamento. Note nestes, uma bainha de mielina mais delgada em relação aos animais normais. Nos animais tratados com melatonina, os axônios apresentam um padrão morfológico mais próximo do normal. Observe a diferença de calibre das fibras axonais nos animais normais com 23 e 53 dias de vida (C e F, respectivamente). Barra = 50 μ m.

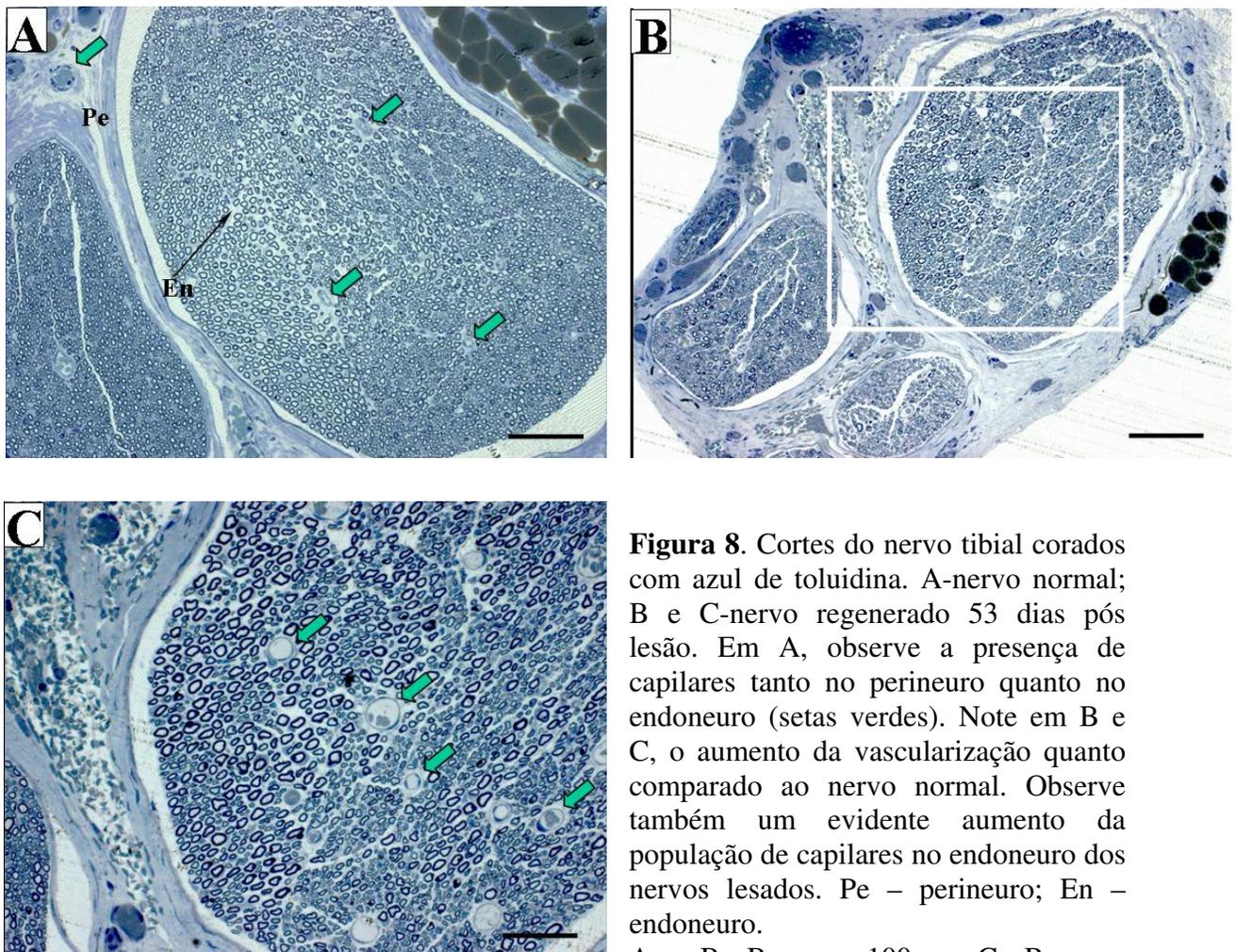


Figura 8. Cortes do nervo tibial corados com azul de toluidina. A-nervo normal; B e C-nervo regenerado 53 dias pós lesão. Em A, observe a presença de capilares tanto no perineuro quanto no endoneuro (setas verdes). Note em B e C, o aumento da vascularização quanto comparado ao nervo normal. Observe também um evidente aumento da população de capilares no endoneuro dos nervos lesados. Pe – perineuro; En – endoneuro.

A e B: Barra = 100 μ m. C: Barra = 50 μ m.

Observamos que o mesmo ocorre no grupo 53 dias após a lesão entre os animais tratados com melatonina (3409 ± 208 ; $n=6$) e veículo (3750 ± 185 ; $n=6$). Contudo, este subgrupo tratado com veículo apresentou um aumento de fibras mielínicas regeneradas quando comparado aos animais de 23 dias após a lesão com o mesmo tratamento ($p < 0,05$). Por outro lado, o número total de axônios mielínicos do nervo tibial dos animais normais foi significativamente superior

($p < 0,001$) aos dos animais lesados, em ambos os grupos e tempos de sobrevivida.

(Fig.9)

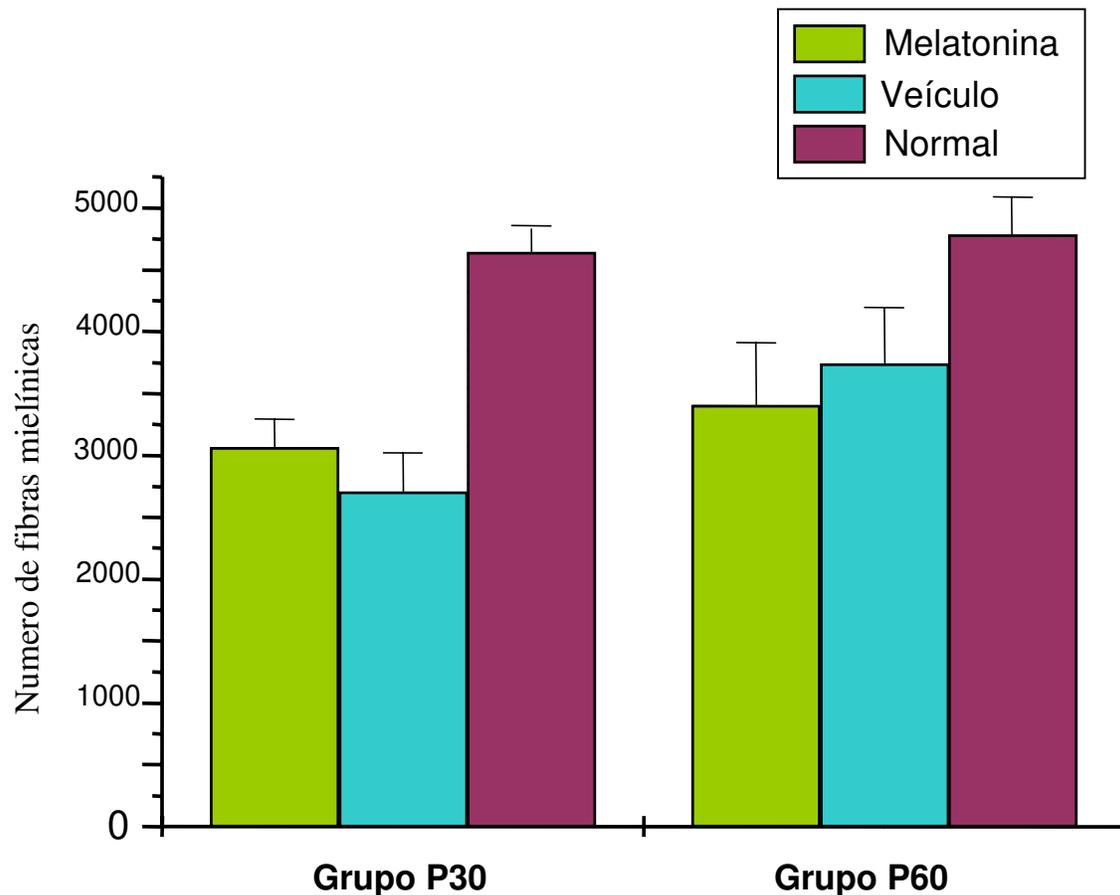


Figura 9. O gráfico mostra a contagem do número de axônios mielínicos de nervo tibial 23 dias (grupo P30) e 53 dias (grupo P60) após a lesão do nervo ciático. Observe que 23 dias após a lesão os animais tratados com melatonina (3065 ± 116 ; $n=4$) não apresentavam diferença significativa no número de fibras regeneradas quando comparados com os animais tratados com veículo (2711 ± 156 ; $n=4$). Note que o mesmo ocorreu 53 dias após a lesão (melatonina: 3409 ± 208 ; $n=6$. Veículo: 3750 ± 185 ; $n=6$), embora os animais tratados com veículo exibiram aumento no número de fibras mielínicas regeneradas quando comparados aos animais desse mesmo grupo 23 após a lesão ($p < 0,05$). O número de fibras mielínicas nos animais normais P30 (4645 ± 94 ; $n=4$) e P60 (4787 ± 123 ; $n=6$) foi maior que aos animais lesados em ambos os grupos ($p < 0,001$).

5. DISCUSSÃO

5.1- O efeito da melatonina após 30 e 60 dias da lesão do nervo periférico

Nossos resultados mostraram que administração da melatonina por um período de 30 dias manteve um número significativo de motoneurônios intensamente marcados quando comparado aos animais tratados com veículo. Esta observação sugere que o tratamento com esta indolamina favoreceu a sobrevivência dos motoneurônios e a respectiva regeneração de seus axônios, pois estes foram capazes de transportar eficientemente o traçador até o soma neuronal. Vale destacar que para a observação destes resultados foi importante a padronização da metodologia para marcação dos motoneurônios através do transporte axonal retrógrado da Amino Dextrono Biotinilado (BDA).

De fato, com a otimização dessa técnica foi possível localizar os motoneurônios cujos axônios contribuem na formação do nervo ciático, bem como avaliar com precisão quais destes neurônios sobreviveram a axotomia e efetivamente regeneraram seus axônios. O número de motoneurônios por nós computado em animais normais foi semelhante aos obtidos por outros autores empregando diversos traçadores retrógrados e diferentes modelos experimentais (Swett et al., 1986; Vejsada et al., 1995). Assim, nossos resultados mostraram que o modelo metodológico empregado para a aplicação e detecção do BDA nos motoneurônios após secção de um nervo periférico foi eficiente por descrever

com precisão o número e a posição destas células ao longo da intumescência lombar. Tal técnica provê um bom modelo para avaliar quantitativamente a sobrevivência dos motoneurônios e a regeneração axonal após os danos lesivos.

É interessante notar que motoneurônios que regeneraram seus axônios, tratados com melatonina, acumularam maior quantidade de BDA no seu citoplasma do que os animais normais. De fato, Bowe et al. (1988) observaram que diferenças morfológicas entre os neurônios motores que regeneram seus axônios e controles podiam ser evidenciadas pela intensidade do traçador retrógrado HRP acumulado no citoplasma destas células. Além disso, os neurônios regenerados apresentavam processos dendríticos mais espessos. Segundo esses autores, os neurônios lesados que regeneraram seus axônios apresentavam um aumento na sua capacidade de captação e transporte axoplasmático retrógrado do traçador. Nossas observações reforçam essa hipótese e são mais uma evidência do efeito neuroprotetor da melatonina, já que os motoneurônios sobreviventes conseguiram regenerar e manter a integridade do seu transporte axonal.

Acredita-se que a ação neuroprotetora da melatonina se deva ao fato desta molécula tornar os motoneurônios menos vulnerável aos efeitos lesivos induzidos pela axotomia. Diversos estudos têm mostrado que a mesma poderia estar atuando de forma indireta sobre a expressão gênica de enzimas antioxidantes (Menendez-Pelaez et al., 1991, 1993; Antolin et al., 1996; Pozo et al., 2002). Essas enzimas fazem parte do sistema de defesa celular e atuam contrabalançando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Reiter,

1998). Por sua vez, Mayo et al., (2002) investigaram o mecanismo pelo qual a melatonina poderia estar regulando a expressão ou a ação das enzimas antioxidativas, usando culturas de células dopaminérgicas como modelo experimental. Segundo os autores, este neurohormônio atuaria como indutor da síntese de proteínas com a capacidade de regular a expressão gênica das enzimas antioxidativas, tais como a CuZnSOD, MnSOD e a GSH-PX.

Embora, se saiba que a estimulação da expressão gênica destas enzimas ocorra em concentrações nanomolares da melatonina em culturas de células, o mecanismo envolvido na regulação desta expressão pela ação desta indolamina *in vivo*, ainda não foi precisamente determinado (Mayo et al., 2002, Rodriguez et al., 2004).

Além desta ação indireta da melatonina sobre o estresse oxidativo, a mesma atua também eliminando os radicais livres por reagir diretamente com estes compostos, neutralizando-os, mudando assim o estado redox das células lesadas (Clerch et al., 1993).

Nossos resultados mostraram também que a interrupção do tratamento com melatonina, após 30 dias de administração contínua, não foi deletéria à sobrevivência dos motoneurônios. Acreditamos que estas células motoras após resistirem aos insultos oxidativos com o auxílio da melatonina foram capazes de regenerar seus axônios e contactar com seu órgão alvo, passando a receber deste o suporte necessário para sobrevivência na ausência deste neurohormônio.

De fato, a par do estresse oxidativo, outra causa de morte que provavelmente fragiliza os motoneurônios diante dos insultos produzidos pelos radicais livres é a privação do aporte neurotrófico provindo do alvo (Kuno et al., 1990; Sendtner et al., 1990; Lowrie & Vrbová, 1992; Sendtner et al., 1992; Yan et al., 1992). Os fatores neurotróficos são proteínas sintetizadas nos tecidos alvos e distribuídas ao soma neuronal via transporte retrógrado, onde exercem seus importantes efeitos para diferenciação e sobrevivência neuronal (Terenghi, 1999).

A desconexão da interação neuromuscular durante o desenvolvimento pós-natal priva os motoneurônios da ação destas moléculas, interrompendo sua maturação morfofuncional. Além disso, mesmo após a interrupção, o soma e dendritos destas células continuam a receber intensos estímulos sinápticos excitatórios provindos da circuitaria espinhal (Navarrete & Vrbová, 1983; O'Donoghue et al., 1993; Greensmith et al., 1994).

Acredita-se que o excesso de estímulos sinápticos e neurotransmissores liberados sobre os motoneurônios axotomizados e imaturos possam contribuir para o processo de morte celular após a axotomia neonatal (Lowrie & Vrbová, 1992; Navarrete & Vrbová, 1983; Greensmith et al., 1994). O glutamato tem sido considerado um mediador excitatório importante para os motoneurônios nesta fase de desenvolvimento (Lowrie & Vrbová, 1992; Greensmith et al., 1994). Esta consideração abriu caminhos para se averiguar a presença do receptor glutamatérgico NMDA e sua ativação durante a fase neonatal. A presença deste receptor foi constatada tanto em motoneurônios em período desenvolvimento

quanto nos maduros (Hughes et al., 1997). Em 1986, O'Brien & Fischbach, observaram a presença deste receptor NMDA nos motoneurônios jovens e relacionaram sua ativação à atividade locomotora. Este achado, sugere que o glutamato estaria envolvido na excitotoxicidade neuronal por uma alteração metabólica subsequente à lesão.

Tem-se observado que a distribuição dos receptores NMDA sobre a membrana neuronal parece diminuir a sensibilidade dos motoneurônios aos efeitos excitotóxicos durante o desenvolvimento pós-natal (Lowrie & Vrbová, 1992; Greensmith et al., 1994). No caso dos motoneurônios, a organização e a síntese destes receptores podem ser influenciados pelo contato com o órgão alvo e posterior ação neurotrófica. A ausência de tal contato pode interromper o estabelecimento desta organização, favorecendo a susceptibilidade das células lesadas aos estímulos excitatórios (Lowrie & Vrbová, 1992; Greensmith et al., 1994).

Uma das principais conseqüências do exacerbado "input" excitatório é a formação de radicais livres nas células neuronais motoras. Sabe-se que o glutamato atua sobre vários tipos de receptores ionotrópicos como Kainato, AMPA e NMDA. A ativação dos receptores Não-NMDA (AMPA e Kainato) contribui fortemente para o aumento do fluxo de Ca^{2+} intracelular através dos receptores NMDA (Hughes et al., 1997). A alta concentração de Ca^{2+} citosólico, participa do desencadeamento de uma cascata de reações metabólicas, como a ativação da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico síntase (nNOS). Este fato poderia contribuir para o aumento da produção de NO e formação de

peroxinitrito, com conseqüente morte neuronal (Estevez et al. 1998). Esta ação seria o motivo de considerar este receptor NMDA o responsável pelos efeitos excitotóxicos do glutamato.

O uso da melatonina em nosso modelo experimental, teve por finalidade averiguar sua ação protetora em longo prazo sobre os motoneurônios axotomizados, uma vez que a causa da morte seria devido a maior vulnerabilidade destas células a ação tóxica dos radicais livres. Nossos resultados mostram que a melatonina como um antioxidante pode ter atuado auxiliando a célula a suportar o estresse oxidativo após a axotomia quando comparado ao tratamento apenas com veículo. Porém, a porcentagem de morte neuronal mesmo após a administração deste antioxidante foi grande, cerca de 70% a 80% após 30 e 60 dias da lesão, quando os mesmos foram comparados com os animais normais. Observações realizadas por Rogério et al. (2002), ao contrário, revelaram que o tratamento agudo com melatonina garantiu a sobrevivência de 80% de motoneurônios após 7 dias da secção do nervo ciático de ratos neonatos. Este achado, mostra que a melatonina atuou de maneira mais eficaz nas primeiras semanas pós-natal, período este, em que a formação de radicais livres seria o fator crucial para a morte destas células. Com o intuito de averiguar a possível ação oxidativa na morte neuronal nas primeiras semanas após a lesão, Rogério et al.(2002), analisaram a expressão da nNOS nos motoneurônios axotomizados. Segundo estes autores não houve diferença na expressão da nNOS entre os animais controle e tratados com melatonina. Foi notado que os motoneurônios que sobreviveram não expressaram essa enzima,

sugerindo que a nNOS não esteja envolvida na morte ou sobrevivência neuronal, neste modelo experimental. Podemos então supor que uma outra via de produção de radicais livres ou possivelmente de NO esteja participando da morte dos motoneurônios. O fato é que a melatonina mostrou-se um eficiente neuroprotetor, confirmando sua ação antioxidante. Este achado parece afirmar que a lesão no período neonatal tende a promover a morte destas células neuronais através da ação de radicais livres.

Os nossos resultados, porém, mostram que a melatonina administrada cronicamente não foi capaz de assegurar a sobrevivência dos motoneurônios. Desta forma é possível que exista um outro fator contribuindo para a morte neuronal após essas primeiras semanas de lesão. Este fator parece ser realmente, a ausência do aporte de moléculas neurotróficas, as quais acreditamos ser fundamentais e essenciais para sobrevivência dos motoneurônios durante a fase neonatal.

Baumgartner e Shine (1998) investigaram a recuperação permanente dos motoneurônios após a lesão do nervo facial em ratos neonatos. Os autores observaram que o tratamento desses animais com adenovirus carreador do gene para o fator neurotrófico GDNF garantiu a sobrevivência de 40 e 30% dos motoneurônios axotomizados após 4 e 20 semanas da lesão, respectivamente. Por sua vez, Aszmann et al. (2002) estudaram o efeito do GDNF e do BDNF sobre motoneurônios de ratos recém nascidos após esmagamento proximal do plexo braquial. Segundo seus achados, os fatores tróficos aplicados separadamente após a lesão não apresentavam nenhum efeito protetor sobre os

motoneurônios. Porém, quando o tratamento foi realizado com a combinação de ambas moléculas ocorria um número significativo de motoneurônios sobreviventes. Assim, embora vários experimentos demonstrem a ação específica de um determinado fator trófico na sobrevivência neuronal e regeneração axonal é importante destacarmos que os motoneurônios e outras células neuronais necessitem de uma atuação sinérgica de múltiplos fatores neurotróficos (Terenghi, 1999). Tal atuação é precisamente regulada pela expressão de seus receptores durante uma determinada fase de desenvolvimento, regulando assim a atividade neuronal desde o desenvolvimento embrionário até sua conseqüente maturação (Terenghi, 1999; Sendtner et al., 2000).

Neste contexto, como a maturação dos motoneurônios depende destes fatores, é plausível considerar que as células privadas do seu aporte neurotrófico não estejam biologicamente preparadas para sobreviverem dentro de uma complexa rede de estímulos sinápticos após axotomia. Assim, mesmo administrando um composto neuroprotetor como a melatonina durante longo tempo os motoneurônios imaturos continuariam a morrer. Ainda, nossas observações sugerem que mesmo protegendo-os da ação excitotóxica e do estresse oxidativo, estas células não sejam capazes de, por exemplo, sintetizar proteínas do citoesqueleto, que são necessárias no processo de regeneração axonal e conseqüente captação e transporte de fatores tróficos para o corpo celular.

Dando suporte a esta hipótese, outro ponto importante notado em nosso estudo refere-se ao fato de que após 30 dias da lesão os motoneurônios regenerados apresentavam dimensões menores que os animais normais. Esta diferença desapareceu após 60 dias. De fato, diversos autores mostraram que em ratos adultos jovens o tamanho do soma das células neuronais aumenta após a axotomia (Grafstein, 1975; Bowe et al., 1988).

Neste contexto, a não ocorrência de cromatólise em nosso modelo experimental, segundo mostrado por Schmalbruch (1984) sugere que os motoneurônios que conseguiram sobreviver ao insulto oxidativo e foram capazes de contactar com seu alvo periférico, passaram a receber suporte trófico desta interação, restaurando assim suas características morfológicas. Diversos autores mostram que a resposta do pericário à lesão axonal, caracterizada por uma alteração morfológica aguda retorna ao normal após a regeneração das fibras axonais (Lieberman, 1971; Bowe et al., 1988). Acredita-se que a ausência da resposta do corpo neuronal à reação axonal pela lesão não permita a regeneração de suas fibras, pois o suporte metabólico para tal processo seria dependente da reação de cromatólise que ocorre no pericário após a lesão (Grafstein, 1975; Aldskogius & Kozlova 1998). De acordo com o observado, a axotomia em nosso modelo foi realizada em animais neonatos e, segundo Schmalbruch (1984) o processo de cromatólise neste caso não acontece, pois estas células se encontram funcionalmente imaturas para sintetizar toda a maquinaria bioquímica responsável pela reação axonal. Portanto, não está claro como estas células poderiam sobreviver e regenerar seus axônios. Podemos

supor que o tipo de lesão utilizado em nosso modelo experimental não garantiu a axotomia completa das fibras axonais, permitindo que algumas sobrevivessem. Estas células sobreviventes, portanto, mantiveram precariamente recebendo uma mínima quantidade de fatores tróficos devido à alteração do citoesqueleto axonal conseqüente à lesão. Esta baixa quantidade pode ter induzindo o corpo celular ainda imaturo a sintetizar proteínas responsáveis pelo processo de regeneração axonal. E a melatonina, neste contexto, foi eficiente em promover a diminuição da vulnerabilidade destes motoneurônios lesados aos estímulos excitatórios, dando a eles condições e tempo para que pudessem regenerar seus axônios e assim sendo possível captar uma quantidade compatível de suporte neurotrófico para a sua sobrevivência permanente.

É importante referir que a lesão por esmagamento utilizado em nosso modelo garante a integridade das estruturas perineurais, o que facilita o alongamento axonal durante o período de regeneração e posterior conexão com o tecido alvo.

5.2- Regeneração dos motoneurônios sobreviventes

Os achados obtidos sobre a atuação da melatonina após o tratamento crônico dos motoneurônios levaram-nos a averiguar se esta ação protetora capacitou estas células a regenerar suas fibras axonais. Em nossos resultados observamos um grande número de axônios de pequeno calibre na área do nervo

tibial, que acreditamos ser o brotamento axonal das fibras mielinizadas em processo de regeneração. Schmalbruch et al., (1988) observaram que no início, após a axotomia ocorre um aumento do número de fibras mielínicas com conseqüente formação de vários prolongamentos neuríticos quando comparado ao nervo normal (Morris et al., 1972; Schmalbruch et al., 1988). Tal fato, nos levou a destacar um ponto importante em nossos resultados. Os achados mostraram que após 4 e 8 semanas de lesão, esse aumento do número de fibras mielinizadas no nervo em regeneração de ambos os tratamentos não foi maior quando comparado ao animal sem lesão. Ao contrário, Jenq & Coggeshall (1985) encontraram, 8 semanas após o esmagamento, 25% a mais de fibras mielinizadas no nervo ciático quando comparado ao nervo contra-lateral. Baseado nisto, podemos supor que boa parte das fibras mielínicas que regeneraram em nosso experimento, provêm dos motoneurônios que sobreviveram à lesão. Por outro lado, observamos que o número destes motoneurônios após 30 e 60 dias de lesão foi muito baixo, o que gerou um déficit na quantidade de fibras regeneradas quando comparada ao nervo normal. Porém, não devemos esquecer que mesmo assim, o número computado destes axônios foi grande em relação à perda de motoneurônios. Neste caso, devemos levar em conta que o grande número destas fibras mielinizadas deva fazer parte do componente sensitivo do nervo periférico.

Outra explicação plausível para o baixo contingente de fibras quantificadas encontradas em nossos resultados em relação ao nervo normal, se deva ao fato dos motoneurônios que conseguiram sobreviver, estabelecerem

com sucesso o contato com seu respectivo alvo, favorecendo a redução no número de neurites em crescimento. Em 1988, Schmalbruch et al. observaram que a grande proporção de axônios mielinizados nos nervos regenerados era eventualmente a mesma próxima ao local do esmagamento, levando os autores a sugerirem que alguns ramos axonais em regeneração fossem transitórios. Tal fato, acontece quando os múltiplos neuritos que se ramificam não estabelecem contato com seu alvo periférico. Esta ausência de conexão faz com que as fibras em excesso que ficaram fora da interação neuromuscular sejam eliminadas (Fawcett & Keynes, 1990).

Nós observamos nos dados obtidos que a sobrevivência dos motoneurônios induzida pela melatonina possibilitou a rápida regeneração dos seus axônios. Tal fato foi notado quando os subgrupos tratados com esta indolamina não apresentavam diferenças no número de fibras quantificadas entre os períodos de 23 e 53 dias de sobrevivência, ao contrário do que foi observado nos tratados com veículo. Baseado nisso, é plausível supor que a regeneração dos axônios já havia sido completada durante os 23 dias de lesão nos animais que foram tratados com melatonina, enquanto, as fibras mielínicas do subgrupo tratado com veículo continuaram a regenerar após este período, pois o número de axônios encontrado 53 dias após a lesão foi maior. Este fato, corrobora com a nossa consideração acima, pois a rapidez com que os axônios entram em processo de regeneração garante maior possibilidade de contactar com sucesso no seu respectivo alvo (Hobson et al., 2000; Fawcett & Keynes, 1990).

Durante o processo regenerativo, observamos que o grande número de axônios que se ramificaram encontravam-se atroficos e alguns apresentavam uma fina e delgada bainha de mielina após os 23 e 53 dias de lesão. Bray et al., (1974) observaram que axônios mielínicos após os 3 primeiros meses de lesão encontram-se ainda mais finos e delgados do que nos nervos normais. Os autores sugerem que esta alteração morfológica seja conseqüente da remodelação da bainha de mielina. Porém, os mesmos autores observaram que após o período de 9 meses da lesão, os prolongamentos neuríticos e suas fibras, já haviam sido totalmente mielinizadas e apresentavam-se aparentemente normais. Neste sentido, Fields et al., (1989) relataram que os axônios regenerados tendem a apresentar uma bainha de mielina mais delgada do que os observados nos normais, embora, muitos axônios regenerados de pequeno calibre possam apresentar anormalidades na remodelação desta bainha.

Em nossos resultados podemos ressaltar que apesar das alterações morfológicas encontradas nas fibras mielínicas regeneradas, nos animais que foram tratadas com melatonina, estas apresentavam morfologia semelhante aos das fibras axonais normais.

Outros fatores, portanto, podem interferir nos eventos do processo de regeneração. Acredita-se que o crescimento axonal dependa também do processo de vascularização (Weerasuriya, 1990; Best & Mackinnon, 1994). Trabalho realizado por Hobson et al. (2000) em que utilizaram fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em ratos Lewis com 7 e 8 semanas de vida após a secção do nervo ciático mostrou que a regeneração dos vasos

sanguíneos, em resposta à administração do VEGF aumentou o crescimento axonal e a proliferação das células de Schwann. Nós observamos em nossos resultados que o nervo em regeneração apresentava no seu microambiente endoneural grande número de capilares quando comparado com o nervo normal. Portanto, é razoável supor a influência deste grande número de capilares sanguíneos com a regeneração das fibras mielínicas, apesar desta interação fisiológica ainda permanecer desconhecida (Hobson et al., 1997, 2000).

Finalmente, os nossos resultados evidenciaram que o tratamento com melatonina, embora garanta a sobrevivência de um número significativo de motoneurônios na primeira semana após axotomia (Rogério et al., 2002), não é suficiente para manter a sobrevivência destas células por tempos mais prolongados. Contudo, os motoneurônios que conseguiram sobreviver pela ação desta indolamina após 30 e 60 dias podem levar a reinervação de um importante contingente de fibras musculares, considerando a capacidade que os mesmos tiveram de regenerar seus axônios. Assim, é razoável supor que essa molécula possa ser um coadjuvante relevante no tratamento de lesões nervosas periféricas agudas como, por exemplo, as produzidas em intercorrências obstétricas durante o nascimento.

6. CONCLUSÕES

6.1 Conclusões

O tratamento em longo prazo com melatonina permitiu a sobrevivência de um maior número de motoneurônios axotomizados comparativamente aos animais tratados com veículo de diluição. Porém, 30 e 60 dias após a lesão este número de motoneurônios foi significativamente inferior ao observado nos animais normais.

Os motoneurônios sobreviventes foram capazes de regenerar seus axônios. Porém, não houve diferença significativa no número computado de fibras axonais mielínicas entre os animais tratados com melatonina ou veículo. Observamos que este número não foi equivalente à quantidade de motoneurônios sobreviventes.

O grande número de axônios mielínicos em relação ao pequeno número de motoneurônios contendo BDA pode ser explicado pelo fenômeno de brotamento axonal e pelo fato de que um contingente destes axônios seja proveniente de neurônios sensitivos que provavelmente tenham sobrevivido à lesão.

Além destes resultados, nossos achados dão suporte as evidências da importância que o alvo muscular confere aos motoneurônios na fase de desenvolvimento. Enfatizando que esta importância produzida pela conseqüente interação destas células com o seu alvo, garante sua sobrevivência dentro de uma complexa circuitária neuronal na medula espinhal que também se encontra em processo de desenvolvimento. Tal estabelecimento torna-se fundamental pela captação de fatores neurotróficos que advém do local desta interação. Fatores que são definitivamente primordiais e indispensáveis para a sobrevivência neuronal, pois sinalizam mediadores intracelulares responsáveis por tal processo, além de tornarem os motoneurônios resistentes aos insultos excitatórios o que provavelmente é uma das causas de morte neuronal.

Assim, o uso de uma substância com ação neuroprotetora produzida pela sua propriedade antioxidante, não foi capaz de impedir a morte dos motoneurônios durante os períodos de 30 e 60 dias após a lesão. Este dado evidencia que tal ação conferida a melatonina, não seja suficientemente capaz de compensar a ausência ou a baixa disponibilidade de moléculas neurotróficas importantes para a sobrevivência dos motoneurônios durante o período pós-axotomia em ratos recém nascidos.

Sugerimos portanto, que a aplicação da melatonina como um tratamento adjunto com os fatores neurotróficos possa ser uma intervenção terapêutica que

contribua de maneira efetiva no tratamento das lesões nervosas periféricas provendo a sobrevivência neuronal e conseqüentemente melhora na recuperação funcional.

7. REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE, M., Estimation of nuclear population from microtome sections. **Anat. Rec.**, 94, 239-247, (1946)

ANTOLIN I, RODRIGUEZ C, SAINZ RM *ET AL.*, Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. **FASEB J.**, 10, 882-890, (1996)

ALDSKOGIUS, H., KZLOVA, E.N., Central neuron-glia and glial-glia interactions following axon injury, **Progr. Neurobiol.** 55, 1-26, (1998)

APPEL, S.H., A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, Parkinsonism and Alzheimer disease. **Ann. Neurol.**, 10 (6). 499-505, (1981)

ARAKAWA, Y., SENDTNER, M., and THOENEN, H., Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. **The Journal of Neuroscience.** 10(11), 3507-3515, (1990)

ACUÑA-CASTROVIEJO, D., COTO-MONTI, M.G., ORTIZ, G.G. AND REITER, R.J., Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. **Life Sci.**, 60, PL23-PL29, (1997)

ASZMANN, O.C., KORAK, K.J., KROPF, N., FINE, E., AEBISCHER, P., FREY, M., Simultaneous GDNF and BDNF application leads to increased motoneurons survival and improved functional outcome in an experimental model for obstetric brachial plexus lesions. **Plast. Reconstr. Surg.**, 15; 110(4), 1066-1072, (2002)

BARLOW-WALDEN, L.R., REITER, R.J., ABE, M., PABLOS, M., MENENDEZ-PELAEZ, A., CHEN, L.-D., POEGGELER, B., Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity, **Neurochem. Int.**, 26, 497-502, (1995)

- BAUMGARTNER, B.J., SHINE, H.D., Permanent rescue of lesioned neonatal motoneurons and enhanced axonal regeneration by adenovirus-mediated expression of glial cell-derived neurotrophic factor. **J. Neurosci. Res.**, 54(6), 766-777, (1998)
- BEST, T.J., MACKINNON, S.E., Peripheral nerve revascularization: a current literature review. **Journal of Reconstructive Microsurgery**. 10, 193-204, (1994)
- BETTAHI, I., POZO, D., OSUNA, C., REITER, R.J., ACUÑA-CASTROVIEJO, D., GUERRERO, J.M., Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. **J. Pineal Res.** 20, 205-210, (1996)
- BREDT, D.S., SNYDER, S.H., Nitric oxide, a physiological messenger molecule, **Annu. Rev. Biochem.** 63, 175-195, (1994)
- BONFOCO, E., KRAINIC, D., ANKARCORONA, M., NICOTERA, P., LIPTON, S.A., Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide / superoxide in cortical cell cultures, **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 92. 7162-7166, (1995)
- BOYD, J.G. AND GORDON, T., Glial cell line-derived neurotrophic factor and Brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo. **Exp. Neurol.** 183, 610-619, (2003)
- BOWE, C.M., YU, C.H. and WAXMAN, S.G., Morphological changes in spinal motor neurons giving rise to long-term regenerated sciatic nerve axons. **Brain Research**, 463, 69-77, (1988)
- BURLS, A., SUBRAMANIAM, K., LOWRIE, M.B., VRBOVÁ, G., Absence of nerve muscle interaction influences the survival of developing motoneurons, **Euro. J. Neuroscience** 3, 216-221, (1991)
- COHEN, G. AND HEIKKIA, R., The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl by 6-hydroxy-dopamine, dialuric acid and related cytotoxic species. **J. Biol. Chem.** 250, 2447-2452, (1974)
- CHAN, Y.M., WU, W., YIP, H.K., SO, K.F., Development of the regenerative capacity of postnatal axotomized rat spinal motoneurons. **Neuroreport.**, 13(8):1071-4, (2002)
- CHOI, D.W., Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system, **Neuron** 1, 623-634, (1988)
- CLOWRY, G. J.C., Axotomy induces NADPH diaphorase activity in neonatal but not adult motoneurons. **NeuroReport**, 5, 361-364, (1993)
- CHIU, A.Y., CHEN, E.W. AND LOERA, S., Distinct neurotrophic responses of axotomized motor neurons to BDNF and GDNF in adult rats, **NeuroReport** 5, 693-696, (1994)
- COYLE, J.T. AND PUTTFARCKEN, P., Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders, **Science** 262, 689-695, (1993)

- COSTA, E.J.X., LOPES, R.H. AND LAMY-FREUND, M.T., Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. **J. Pineal Res.** 19, 123-126, (1995)
- 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)
- CLERCH LB, MASSARO D. Tolerance of rats to hyperoxia. Lung antioxidant enzyme gene expression. **J Clin Invest**; 91: 499-508, (1993)
- DAWSON, T.M., BREDT, D.S., FOTUHI, M., HWANG, P.M. AND SNYDER, S.H., Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues, **Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.** 88, 7797-7801, (1991)
- DAWSON, D., AND ENCEL N., Melatonin and sleep in humans. **J. Pineal Res.** 15, 1-12 (1993)
- DYKENS, J.A., STERN, A., TRENKNER, E., Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury. **J. Neurochem.**, 49(4), 1222-1228, (1987)
- DUN, N.J., DUN, S.L., WU, S.Y., FORSTERMANN, U., Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands. **Neurosci. Lett.**, 158 (1), 51-54, (1993)
- 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 trofic factor deprivation. **J. Neurosci.** 18, 923-931, (1998)
- FAWCETT, J.W., KEYNES, R.J., Peripheral nerve regeneration. **Annual Revue of Neuroscience**, 13, 43-60, (1990)
- FINOCCHIARO, L.M.E., ARTZ, E.S., FERNÁNDEZ-CASTELO, S., CRISCUOLO, M., FINKELMAN, S., NAHMOD, V., Serotonin and melatonin synthesis in peripheral mononuclear cells: Stimulation by interferon γ as part of an immunomodulatory pathway. **J. Interferon Res.**, 8, 705-716, (1988)
- FIELDS, R.D., LE BEAU, J.M., LONGO, F.M., ELLISMAN, M.H., Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Progress in Neurobiology**, 33, 87-134, (1989)
- FINNOCHIARO, L.M.E. AND GLIKIN, G.C., Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. **J. Pineal Res.** 24, 22-34, (1998)
- GIBBS, F.P., VRIEND, J., The half-life of melatonin elimination from rat plasma. **Endocrinology.** 109(5), 1796-1798, (1981)
- GIUSTI, P., LIPARTITI, M., FRANCESCHINI, D., SHIAVO, N., FLOREANI, M. AND MANEV, H., Neuroprotection by melatonin from Kainate-induced excitotoxicity in rats. **FASEB J.**, 10, 891-896, (1996)

-
- GIUSTI, P., LIPARTITI, M., GUSELLA, M., FLOREANI, M. AND 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)
- GILAD, E., CUZZOCREA, S., ZINGARELLI, B., SALZMAN, A.L., SZABO, C., Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. **Life Sci.**, 60 (10), PL169-174, (1997)
- GREENSMITH, I. AND VRBOVÁ, G., Alterations of nerve muscle interaction during postnatal development influence motoneuron survival in rats, **Dev. Brain Res.** 69, 125-131, (1992)
- GREENSMITH, L., HASAN, H.I. AND VRBOVÁ, G., Nerve injury increases the susceptibility of motoneurons to N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the developing rat, **Neuroscience** 58, 727-733, (1994)
- GREENSMITH L., VRBOVA G., Motoneurone survival: a functional approach. **Trends Neurosci.** 19, 450-455, (1996)
- GRIESHAMMER, U., LEWANDOSKI, M., PREVETTE, D., OPPENHEIM, R.W., MARTIN, G.R., PETTMANN, B., HENDERSON, C.E., Muscle-specific cell ablation conditional upon Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice leads to massive spinal and cranial motoneuron loss neuronal cell death, **Neuron.** 20, 633-647, (1998)
- GROSS, S.S., WOLIN, M.S., Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annu Rev. Physiol.**, 57, 737-769, (1995)
- GORIO A, CARMIGNOTO G, FINESSO M, POLATO P, NUNZI MG., Muscle reinnervation--II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neuroscience.** 8(3),403-16, (1983)
- GORIO A., VERGANI L., DE TOLLIS, DI GIULIO A. M., TORSELLO A., CATTANEO L. AND MULLER E. E., Muscle reinnervation following neonatal nerve crush. Interactive effects of glycosaminoglycans and insulin-like growth factor-I. **Neuroscience.** 82(4), 1029-1037, (1998)
- HAMBURGER, V., Regression versus peripheral control of differentiation in motor hyperplasia, **Am. J. Anat.** 102, 365-410, (1958)
- HALLIWELL, B., Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem,** 59 (5), 1609-1623, (1992)
- HARDELAND, R., REITER, R.J., POEGGELER, B. AND TAN, D.X., The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidante protection and formation of bioactive substances. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 17, 347-357, (1993)
- HENDERSON, C.E., CAMU, W., METTLING, C., GOUIN, A., POULSEN, K., KARIHALOO, M., RULLAMAS, J., EVANS, T., MCMAHON, S.B., ARMANINI, M.P., BERKEMEIER, L., PHILLIPS, H.S. AND ROSENTHAL, A., Neurotrophic promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud, **Nature** 363, 266-270, (1993)

HENDERSON, C.E., PHILIPPS, H.S., POLLOCK, R.A., DAVIES, A.M., LEMEULLE, C., ARMANINI, M.P., GDNF: a potent survival factors for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. **Science** 266, 1062-1064, (1994)

HOBSON, M.I., BROWN, R., GREEN, C.J., TERENCEHI, G., Inter-relationships between angiogenesis and nerve regeneration a histochemical study. **British Journal of Plastic Surgery**. 50, 125-131, (1997)

HOBSON, M.I., GREEN, C.J., TERENCEHI, G., VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. **J. Anat.**, 197, 591-605, (2000)

HUETHER, G., POEGGELER, B., REIMER, A., GEORGE, A., Effect of triptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: Evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. **Life Sci.**, 51, 945-953, (1992)

HUGHES, P.E., ALEXI, T. and SCHREIBER, S.S., A role for the tumor suppressor gene p53 in regulating neuronal apoptosis. **Neuroreport**, 8, 5-12, (1997)

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(18), 4123-4126, (1998)

JU, W.Y.H., HOLLAND, D.P. AND TATTON, W.G., (-)- Deprenyl alters the time course of death of axotomized motoneurons and the hypertrophy of neighboring astrocytes in immature rats, **Exp. Neurol**. 126, 233-246, (1994)

KUMO M., Target dependence of motoneural survival: the current status. **Neurosci. Res.** 9, 155-172, (1990)

KISHINO, A., ISHIGE, Y., TATSUNO, T., NAKAYAMA, C., NOGUGHI, H., BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth, **Exp. Neurol**. 144, 273-286, (1997)

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 (10), 2387-2390, (1998)

LANSER ME, CARRINGTON JL, FALLON JF., Survival of motoneurons in the brachial lateral motor column of limbless mutant chick embryos depends on the periphery. **J. Neuroscience.**, 6(9), 2551-2557, (1986)

LEIST, M. AND NICOTERA, P., Apoptose, excitotoxicity and neuropathology. **Exp. Cell Res.**, 239, 183-201, (1998)

LEVI-MONTALCINI, R., The nerve growth factor: Thirty-five years later, **EMBO J.** 6, 1145-1154 (1987)

LIEBERMAN, A.R., Some factors affecting retrograde neuronal responses to axonal lesions. In **R. Bellairs and E.G. Gray (eds): Essays on the Nervous System. A Festschrift for Professor J.Z. Yong Oxford: Clarendon Press**, pp 71-105, (1974)

- LIPTON, S.A., ROSENBERG, P.A., Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N. Engl J. Med.**, 330 (9), 613-622, (1994)
- LIPTON, S.A., NICOTERA, P., Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. **Cell Calcium**, 23 (2-3), 165-170, (1998)
- Li, X.Y., Gu, J., Lu, S.D., et al., Melatonin attenuates MPTP-induced dopaminergic neuronal injury associated with scavenging hydroxyl radical. **J. Pineal Res**, 32, 47-53, (2002)
- LOWRIE, M.B., KRISHMAN, S. AND VRBOVÁ, G., Recovery of slow and fast muscles following nerve injury during early postnatal development in the rat, **J. Physiol. (Lond)** 331, 51-66, (1982)
- LOWRIE, M. B., AND VRBOVÁ, G., Dependence of postnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. **TINS**, 15(03): 80 – 84, (1992)
- LUCAS, D.R. AND NEWHOUSE, J.P., The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina, **Arch. Ophthalmol.** 58, 193-204, (1957)
- MENÉNDEZ-PELÁEZ, A., Melatonin and other indoles in the rodent Harderian gland: Regulation and physiological significance. **In: Advances in Pineal Research, R.J.Reiter, A. Lukaszyn, eds. Jonh Libbey, London**, pp. 75-80, (1990)
- MANEV, H.UZ.T., KHARLAMOV, A., CAGNOLI, C. M., FRANCESCHINI, D. AND GIUSTI, P., *In vitro* protection against kainate-induced apoptosis by the pineal hormone melatonin: effects of exogenous melatonin and circadian rhythm. **Restr. Neurol. Neurol. Neurosci.** 9, 251-256, (1996)
- MANEV, H.UZ.T., KHARLAMOV AND JOO, J. Y., Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin-deficient rats. **FASEB J.** 10, 1546-1551, (1996b)
- MARIOTTI, R., PENG, Z.C., KRISTENSSON, K., BENTIVOGLIO, M., Age-dependent induction of nitric oxide synthase activity in facial motoneurons after axotomy. **Exp. Neurol**, 145 (2-Pt 1), 361-370, (1997)
- MAYO, J.C., SAINZ, R.M., URIA, H., ANTOLIN, I., ESTEBAN. M. M. AND RODRIGUEZ, C., Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson diseases. **J. Pineal Res.** 24, 179-192 (1998a)
- MAYO, J.C., SAINZ, R.M., URIA, H., ANTOLIN, I., ESTEBAN. M. M. AND RODRIGUEZ, C., Inhibition of cell proliferation: a mechanism likely to mediate prevention of neuronal cell death by melatonin, **J. Pineal Res.** 24, 179-192 (1998b)
- MAYO JC, SAINZ RM, ANTOLIN I *ET AL.* Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. **Cell Mol Life Sci**, 59, 1706-1713, (2002)
- MENENDEZ-PELAEZ A, RODRIGUEZ C, DOMINGUEZ P. 5-Aminolevulinatesynthase mRNA levels in the Harderian glands of Syrian hamsters: correlation with porphyrin concentrations and regulation by androgens and melatonin. **Mol Cell Endocrinol** , 80, 177-182, (1991)

MENENDEZ-PELAEZ A, POEGGELER B, REITER RJ *ET AL.* Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. **J Cell Biochem**, 53, 373-382, (1993)

MESENGE, C., MARGAILL, I. VERRECCHIA, C., ALLIX, M., BOULU, R.G. AND PLOTKINE, M. Protective effect of melatonin in a model of traumatic brain injury in mice. **J. Pineal Res. In press.** (1998).

MORRIS, J.H., HUNDSON, A.R., WEDDEL, G., A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. II. The development of the regenerating unit. **Zellforsch Mikrosk Anat.** 124 (1), 103-130 (1972)

NAIDU M. D. K., SUBRAMANIAN K. AND VRBAVA G., Re-inervação of muscles after nerve in neonates. **Rest. Neurol. Neurosci.** 10, 35-42, (1996)

MOUSAVI K, MIRANDA W, PARRY DJ. Neurotrophic factors enhance the survival of muscle fibers in EDL, but not SOL, after neonatal nerve injury., **Am J Physiol Cell Physiol.** 283(3),C950-9, (2002)

NOVELLI, A., REILLY, J.A., LYSKO, P.G. AND HENNEBERRY, R.C., Glutamate becomes neurotoxicity via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced, **Brain Res.** 451, 205-212, (1988)

NOWAK, L., BREGESTOVSKI, P., ASCHER, P., HERBET, A., and PROCHIANTZ, A., Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. **Nature (Lond)**, 307, 462-465, (1984)

NOVIKOV, L., NOVIKOVA, L. AND 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)

OLNEY, J.W., Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate, **Science** 164, 719-721, (1969)

OLNEY, J.W., HO, O.L., AND RHEE, V., Cytotoxic effects of acidic and Sulphur containing amino acids on the infants mouse central nervous system. **Exp. Brain Res.**, 14, 61-76, (1971)

OLANOW, C.W., A radical hypothesis for neurodegeneration. **Trends Neurosci.**, 16 (11), 439-444, (1993)

OPPENHEIM, R.W., Cell death during development of the nervous system, **Ann. Reviews of Neuros.**, 14, 453-501, (1991)

OPPENHEIM, R.W., PREVETTE, D., HAVERKAMP, L.J., HOUENOU, L., YIN, Q.W. AND MCMANAMAN, J., Biological studies of a putative avian muscle-derived neurotrophic factor that prevents naturally occurring motoneuron death in vivo, **J. Neurobiology** 24, 1065-1079. (1993)

- O' DONOGHUE, D.L., POFF, C.R.D. and BLOCK, J.J., A chronic neonatal N-methyl-D-aspartate receptor antagonism with MK-801 increases the number of corticospinal cells retained into adulthood in the rat. **Neurosci. Lett.**, 158, 143-146, (1993)
- OPPENHEIM, R.W., HOUENOU, L.J., JOHNSON, J.E., LIN, L.F., LI, L., LO, A.C., NEWSOME, A.L., PREVETTE, D.M., WANG, S., Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF, **Nature** 373, 344-346, (1995)
- OKATANI, Y., WAKATSUKI, A., KANEDA, C., melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain, **J. Pineal Res.** 28, 89-96, (2000)
- PANG, S.F., ALLEN, A.E., Extrapineal melatonin in the retina: Its regulation and physiological function. *In: Pineal Research Reviews. R.J.Reiter, ed. Alan Liss, New York.* pp. 137-145, (1986)
- PAPPOLLA, M.A., SIMOVICH, M.J., BRYANT-THOMAS, T, ET AL., The neuroprotective activities of melatonin against the Alzheimer beta-protein are not mediated by melatonin membrane receptors. **J. Pineal Res.**, 32, 135-142, (2002)
- PEI, Z., PANG, S.F., CHEUNG, R.T., Pretreatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in rat middle cerebral artery occlusion stroke model. **J. Pineal Res.**, 32, 168-172, (2002)
- PRESTIGIE, M.C., Differentiation, degeneration and the role of the periphery: Quantitative considerations. In F.O. Schmitt (Ed): **The Neurosciences 2nd Study Program, New York: The Rockefeller University Press**, pp. 73-82 (1970)
- POPRATILOFF, A., KHARAZIA, V.N., WEINBERG, R.J., LAONIPON, B., RUSTIONI, A., Glutamate receptors in spinal motoneurons after sciatic nerve transection, **Neuroscience**. 74, 953-958, (1996)
- 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)
- POZO D, GUERRERO JM, CALVO JR. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit LPS-stimulated MIP-1 alpha production and mRNA expression. **Cytokine**, 18, 35-42, (2002)
- PUTTFARCKEN, P.S., GETZ, R.L., COYLE, J.T., KAINIC acid-induced lipid peroxidation: protection with butylated hydroxytoluene and U78517F in primary cultures of cerebellar granule cells. **Brain Res.**, 624(1-20), 223-232, (1993)
- Rich, K.M., Luszczynski, J.R., Osborne, P.A., Johnson, E.M. JR., Nerve growth factor protects adult sensory neurons from cell death and atrophy caused by nerve injury. **J. Neuroscience** 16, 261-268, (1987)
- ROSSITER, J. P., RIOPELLE, R. J. AND BISBY, M. A., Axotomy induced apoptotic cell death of neonatal rat facial motoneurons: time course analysis and relation to NADPH-diphosphorase activity. **Exp. Neurol.**, 138, 33-44, (1996)

RIETHMACHER, D., SONNENBERG-RIETMACHER, E., BRINKMANN, V., VAMAAI, T., LEWIN, G.R., BIRCHMEIER, C., Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the Erb-B3 receptor, **Nature** 725-730, (1997)

REITER, R.J., RICHARDSON, B.A., JOHNSON, L.Y., FERGUSON, B.N. AND DINH, D.T., Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. **Science**, 210, 1372-1373, (1980)

REITER, R.J., POEGGELER, B., TAN, D.X., CHEN, L.D., MANCHESTER, L.C., GUERRERO, J.M., Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring receptor. **Neuroendocrinol. Lett.** 15, 103-116, (1993)

REITER, R.J., MELCHIORRI, D., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., BARLOW-WALDEN, L.R., CHUANG, J.L., ORTIZ, G.G. AND ACUÑA-CASTROVIEJO, D., A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. **J. Pineal Res**, 18, 1-11, (1995)

REITER, R.J., TANG, L., GARCIA, J.J., MUNOZ-HOYOS, A., Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology, **Life Sci.** 60, 2255-2271, (1997)

REITER, R.J., Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin, **Prog. Neurobiol.** 56, 359-384, (1998)

ROGÉRIO, F. TEIXEIRA, S.A., QUEIROZ, L.S., NUCCI, C., LANGONE, F., Expression of neuronal isoform of nitric oxide synthase in spinal neurons of neonatal rats after sciatic nerve transaction. **Neuroscience Letters**, 307, 61-64, (2001)

ROGÉRIO, F., QUEIROZ, L.S., TEIXEIRA, S.A., OLIVEIRA, A.L.R., NUCCI, G., LANGONE, F., Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transaction. **Brain Research**, 926, 33-41, (2002)

SCHMALBRUCH, H., Motoneuron death after sciatic nerve section in newborn rats, **J. Comp. Neurol.** 224, 252-258, (1984)

SCHMALBRUCH H., The effect of peripheral nerve injury on immature motor and sensory neurons and on muscle fibres. Possible relation to the histogenesis of Werdnig-Hoffmann disease. **Rev Neurol (Paris)**, 144, 721-9, (1988)

SWETT, J.E., WIKHOLM, R.P., BLANKS, R.H.I., SWETT, A.L., CONLEY, L.C., Motoneurons of the rat sciatic nerve. **Experimental Neurology**, 93, 227-252, (1986)

SENDTNER, M., KREUTZBERG, G.W. AND THOENEM, H., Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy, **Nature** 345, 440-441, (1990)

SENDTNER, M., STOCKL, K.A., THOENEN, I., Synthesis and localization of ciliary's neurotrophic factor in the sciatic nerve of adult rat after lesion and during regeneration. **J. Cell. Biol.**, 118: 139- 148, 1992.

SENDTNER, M., PEI, G., BECK, M., SCHWIEZER, U., WIESE, S., Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors, **Cell Tissue Res.** 301, 71-84, (2000)

SCHULZ, J.B., HENSHAW, D.R., SIWEK, D., JENKINS, B.G., FERRANTE, R.J., CIPPOLONI, P.B., KOWALL, N.W., ROSEN, B.R. AND BEAL, M.F., Involvement of free radicals in excitotoxicity in vitro, **J. Neurochem.** 64, 2239-2247, (1995)

SNIDER, W.D., JOHNSON, E.M. JR., Neurotrophic molecules. **Ann Neurol.**, 26 (4), 489-506, (1989)

SHEN, Y.X, XU, S.Y., WEI, W, ET AL., The protective effects of melatonin from oxidative damage induced by amyloid beta-peptide 25-35 in middle-aged rats. **J. Pineal Res.**, 32, 85-89, (2002)

TERENGI, G., Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J. Anat**, 194 (Pt 1), 1-14, (1999) – Review

VALTSCHANOFF, J.G., WEINBERG, R.J., RUSTIONI, A., NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. **J. Comp Neurol**, 321 (2), 209-222, (1992)

VANECEK J., Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol Rev.** 1998 78(3),687-721, (1998) Review.

VEJSADA, R., SAGOT, Y., AND KATO, C., Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo, **Euro. J. Neuroscience** 7, 108-115, (1995)

VEJSADA, R., TSENG, J.L., LINDSAY, R.M.,ACHESEN, A., AEBISCHER, P., KATO, A.C., Synergistic but transient rescue effects of BDNF and GDNF on axotomized neonatal motoneurons, **Neuroscience** 84, 129-139. (1998)

VERGANI, L., DI GIULIO, A.M., LOSA, M., ROSSONI, G., MULLER, E.E., GORIO, A., Systemic administration of insulin-like growth factor decreases motor neuron cell death and promotes muscle reinnervation. **J. Neurosci.**, 54(6), 840-7, (1998)

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)

WEERASURIYA, A., Patterns of changes in endoneurial capillary permeability and vascular space during nerve regeneration. **Brain Res.** 510, 135-139, (1990)

WONG, V., ARRIAGA, R., IP, N.Y. AND LINDSAY, R.M., The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5, but not NGF, up-regulate the cholinergic phenotype of developing motor neurons, **Euro. J. Neuroscience** 5, 466-474, (1993)

WU, Y., LI, Y., LIU, H. AND WU, W., Induction of nitric oxide synthase and motoneuron death in newborn and early postnatal rats following spinal root avulsion, **Neurosci. Lett.**, 194, 109-112, (1995)

YAN, Q., ELLIOT, J.L. AND SNIDER, W.D., Brain-derived neurotrophic factor rescue spinal motor neurons from axotomy-induced cell death, **Nature** 360, 753-755, (1992)

YAMAMOTO, H.A. AND YANG, H.W., melatonin attenuates L-cyanide-induced seizures and lipid peroxidation in the brain of mice. **J. Pineal Res.** 21, 108-113 (1996)

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)

YU, W.H.A., Regulation of nitric oxide syntase expression in motoneurons following nerve injury, **Dev. Neurosci.**, 19, 247-254, (1997)

ZURN, A.D., BAETGE, E.E., HAMMANG, J.P., TAN, S.A., AEBISCHER, P., Glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons, **NeuroReport** 6, 113-118, (1994)