UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA DE PÓS-GRADUACÃO I. B.

RAFAEL COFIÑO DE SÁ

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA SOBRE NEURÔNIOS SENSORIAIS DOS GÂNGLIOS DA RAIZ DORSAL DE RATOS NEONATOS APÓS A SECÇÃO DO NERVO CIÁTICO

Este ex	emplar corresponde à reusça
ca tes MFA1	e defendida pelo(a) candidan an (GPINO BC SAL
	Bergone
níov	ada pela Comissão Julgados

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, área de Fisiologia, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Francesco Langone

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C654a	Cofiño de Sá, Rafael, 1980- Avaliação morfológica e imunoistoquímica do efeito da administração de melatonina sobre neurônios sensoriais dos gânglios da raiz dorsal de ratos neonatos após da seção do nervo ciático / Rafael Cofiño de Sá. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.
	Orientador: Francesco Langone. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Gânglio da raiz dorsal. Melatonina. Células receptoras sensoriais. Langone, Francesco,1950 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Morphologic and immunohistochemical evaluation of the effect of melatonin administration on dorsal root ganglia sensorial neurons of newborn rats after sciatic nerve transection Palavras-chave em Inglês: Dorsal root ganglia Melatonin Sensory receptor cells Área de concentração: Fisiologia Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular Banca examinadora: Francesco Langone [Orientador] Elenice Aparecida de Moraes Ferrari Simone Aparecida Teixeira Data da defesa: 23-02-2007 Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular Campinas, 23 de fevereiro de 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francesco Langone (Orientador)

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Assinatura natura Jexeria

Profa. Dra. Anna Maria Fernandes

Profa. Dra. Simone Aparecida Teixeira

Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas

Assinatura

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	10
3.1 Animais e Experimentais	10
3.2 Procedimentos cirúrgicos para secção do nervo ciático	10
3.3 Tratamento	11
3.4 Obtenção do material biológico para processamento histológico	11
3.5 Quantificação dos neurônios sensitivos e análise do diâmetro nuclear	12
3.6 Análises imunoistoquímicas	13
3.7 Análise Estatística	14
4. RESULTADOS	15
4.1 Análise Macroscópica dos DRG	15
4.2 Contagem dos neurônios sensitivos e análise do diâmetro nuclear	16
4.3 Análise imunoistquímica para Bax	18
4.4 Análise imunoistquímica para Bcl-2	19

4.5 Análise imunoistquímica para nNOS	19
4.6 Análise imunoistquímica para SOD1	20
4.6 Análise imunoistquímica para SOD2	20
5. DISCUSSÃO	32
5.1 Efeito da axotomia da população neuronal do DRG	32
5.2 Análises imunistoquímicas para a proteína Bax	34
5.3 Análises imunistoquímicas para a proteína Bcl-2	36
5.4 Análises imunistoquímicas para a enzima nNOS	37
5.4 Análises imunistoquímicas para a enzima SOD1 e SOD2	40
5.4 Ação neuroprotetora do neurohormônio melatonina	41
6. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

RESUMO

A secção do nervo ciático em ratos neonatos pode induzir morte neuronal no gânglio da raiz dorsal (DRG). A perda neuronal dependeria da idade do animal, da severidade da lesão e do tipo de neurônio acometido (GILLARDON et al, 1996). A morte de neurônios sensoriais submetidos a axotomia poderia envolver a produção de óxido nítrico (NO) e seus derivados (CLOWRY, 1993; YICK et al, 1998). A molécula de NO, por possuir um elétron desemparelhado em seu orbital externo, é um radical livre que pode interagir com diversas moléculas intracelulares, inclusive com outros radicais livres. (DAWSON et al., 1993). No meio intracelular, os radicais livres podem inibir a respiração mitocondrial, causar peroxidação de lípides da membrana celular e induzir apoptose. No presente estudo, ratos com dois de vida (P2) foram submetidos a secção unilateral do ciático e tratados diariamente com o neurohôrmonio antioxidante melatonina durante cinco dias. Nos neurônios dos gânglios L4 e L5 foram avaliados a imunorreatividade e distribuição tecidual das proteínas Bax e Bcl-2, da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase (nNOS) e das isoformas 1 e 2 da superóxido dismutase (SOD1 e 2). A análise macroscópica dos gânglios L4 e L5 de ratos submetidos à secção unilateral do nervo ciático em P2 evidenciou diminuição dos gânglios ipsilaterais à axotomia, cinco dias após a lesão. Tal fato sugere atrofia destes últimos em decorrência do estímulo lesivo periférico. A melatonina poderia exercer efeito neuroprotetor sobre neurônios de grande diâmetro nuclear, uma vez que nos animais tratados foram observados aumento da imunomarcação para a proteína antiapoptótica Bcl-2 e para as enzimas anti-oxidantes SOD1 e SOD2. A secção do nervo ciático em ratos neonatos (P2) aumenta a imunorreatividade para nNOS cinco dias após a lesão em neurônios de pequeno diâmetro nuclear, e o tratamento com melatonina não altera este padrão. Os neurônios de pequeno diâmetro nuclear poderiam agir de modo

neuroprotetor parácrino aumentando a produção de NO, mas o mecanismo preciso ainda não foi estabelecido.

ABSTRACT

Section of sciatic nerve in neonatal rats may induce neuronal death in the dorsal root ganglia (DRG). Neuronal loss would depend on the age of the animal, severity of injury and type of neuron (GILLARDON et al, 1996). Death of sensorial neurons submitted to sciatic transection could involve nitric oxide (NO) production and its derivatives (CLOWRY, 1993; YICK et al, 1998). NO molecule has an unpaired external orbital electron and is considered a free radical. It may interact with various intracellular molecules, including other free radicals. (DAWSON et al., 1993). Inside the cell, free radicals may cause inhibition of mitocondrial respiration, lipid peroxidation of the cellular membrane and induce apoptosis. In the present study, newborn rats (P2) were subjected to unilateral sciatic nerve transection and received daily treatment with antioxidant melatonin from P2 to P7. Imunohistochemical detection and tissue distribution of Bax and Bcl-2; neuronal isoform of nitric oxide sintase (nNOS); and of superoxide dismutase isoforms 1 and 2 (SOD1 and 2) in L4 and L5 DRG neurons were evaluated. Macroscopic analysis of L4 and L5 DRG on rats submitted to sciatic nerve unilateral transection at P2 evidenced reduction on same side lesion ganglia, five days after injury. Such fact suggests atrophy of DRG as a result of peripheral harmful stimulus. Melatonin could exert neuroprotective effect on large nuclear diameter neurons, since treated animals increased immunostaining for anti-apoptotic protein Bcl-2 and antioxidant enzymes SOD1 and SOD2. Transection of sciatic nerve in newborn rats (P2) increases immunostaining for nNOS in small nuclear diameter neurons five days after lesion injury, and treatment with melatonin does not alter this pattern. Small nuclear diameter neurons could act in paracrine fashion increasing NO production, but specific mechanism remains unclear.

LISTA DE ABREVIATURAS

- % Porcentagem
- < Menor
- > Maior
- µm Micrômetro
- 6-OHDA 6-hidroxidopamina
- ANOVA Análise de Variância
- Bak Proteína pró-apoptótica
- Bax Proteína pró-apoptótica
- Bcl-2 Proteína anti-apoptótica
- Bcl-x Proteína anti-apoptótica
- Ca²⁺ Íon de Cálcio
- CaM Cofator Calmodulina
- DNA Ácido Desoxirribonucléico
- DRG Gânglio da Raiz Dorsal
- eNOS Isoforma Endotelial da nNOS
- EPM Erro Padrão da Média
- g Grama
- h Hora
- H2O2 Peroxidase
- i.p. Intraperitoneal

- IHQ Imunoistoquímica
- iNOS Isoforma Induzível da nNOS
- ISN Índice de Sobrevivência Neuronal
- L4- Segmento lombar 4
- L5 Segmento lombar 5
- M-Molar
- mg/ Kg Miligrama por Kilograma
- ml Mililitro
- mm Milímetro
- MPTP 1-metil-4-feniltetrahidropiridina
- mRNA Ácido Ribonucléico Mensageiro
- NaCl Cloreto de Sódio
- NGF Fator de Crescimento do Nervo
- NGF trkA Receptor para NGF
- NISSL Coloração de Cresil Violeta
- nNOS Isoforma Neuronal da nNOS
- NO Óxido Nítrico
- NOS Oxido Nítrico Sintase
- O2+ Superóxido
- °C Grau Celsius
- ONOO⁻ Peroxinitrito
- P2-Idade Pós-Natal de Dois Dias
- P7 Idade Pós-Natal de Sete Dias
- SNC Sistema Nervoso Central

- SNP Sistema Nervoso Periférico
- SOD Enzima Superóxido Dismutase
- SOD 1 Isoforma Citosólica da SOD ligadas à íons de Cobre e Zinco
- SOD 2 Isoforma da SOD ligada à íons de Manganês
- SOD 3 Isoforma da SOD ligada à íons de Cobre e Zinco
- TUNEL terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling
- V:V Volume por Volume

W – Watts

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Disposição dos cortes coletados nas lâminas e respectiva análise histológica... 12

Tabela 2 -	Média	dos	valores	de	ISN	no	DRG	L4	para	todos	os	grupos
	experin	nentai	s		•••••	•••••		•••••			•••••	16
Tabela 3 -	Média	dos	valores	de	ISN	no	DRG	L5	para	todos	os	grupos
	experin	nentai	S					•••••				17

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Imagens do DRG de L4 a L6 de um animal do grupo salina	15
Figura 2 -	Imagens do DRG de L4 a L6 de um animal do grupo salina	15
Figura 3 -	Representação gráfica dos valores de ISN para o DRG L4 expresso na	
	tabela 2	16
Figura 4 -	Representação gráfica dos valores de ISN para o DRG L5 expresso na	
	tabela 3	17
Figura 5 -	Imagem de um corte histológico de gânglio com coloração de Nissl do grupo	
	controle P7	18
Figura 6 -	Imunoistoquímica para Bax	22
Figura 7 -	Imunoistoquímica para Bcl-2	24
Figura 8 -	Imunoistoquímica para SOD1	26
Figura 9 -	Imunoistoquímica para SOD2	28
Figura 10-	Imunoistoquímica para nNOS	30
Figura 11 -	- Ilustração esquemática da ação protetora do NO após lesão do nervo	39

1. INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Periférico (SNP) é composto por uma rede extensa e complexa de nervos que ligam o sistema nervoso central (SNC) a diversas partes do corpo. Tais nervos são constituídos por milhares de axônios, sendo que cada axônio parte de um único neurônio. Os neurônios que conduzem informações da periferia para o SNC são denominados aferentes ou sensitivos. Aqueles que transmitem impulsos do SNC para músculos ou glândulas são denominados motores ou eferentes. Os nervos raquianos são formados pela união de duas raízes que emergem lateralmente da medula espinhal: a raiz posterior ou dorsal, constituída por fibras sensitivas, e a raiz anterior ou ventral, composta por fibras motoras. Os corpos celulares dos neurônios sensitivos do nervo situam-se no gânglio da raiz dorsal (DRG, do inglês *dorsal root ganglia*). Já os corpos celulares dos neurônios motores do nervo localizam-se na medula (BEAR, *et al.*, 2002).

De acordo com Lawson e colaboradores (1992), os neurônios do DRG podem ser classificados em grandes ou pequenos. Os primeiros são caracterizados por apresentar diâmetro nuclear de aproximadamente 20µm. Por sua vez, os neurônios pequenos possuem núcleo com cerca de 10µm de diâmetro. Os neurônios grandes emitem axônios mielinizados, e estão relacionados com a recepção de estímulos mecânicos. Os pequenos possuem axônios pouco mielinizados ou amielínicos e estão relacionados com captação de estímulos mecânicos, térmicos e dolorosos. (LAWSON *et al.*, 1992; BELMONTE & CERVERO, 1996).

Em roedores, os neurônios sensitivos se desenvolvem durante o período embrionário e pós-natal. O desenvolvimento adequado do sistema nervoso requer eliminação seletiva e programada de neurônios gerados durante o período embrionário (OPPENHEIM, 1991). Durante a fase neurogênica, ocorre o mecanismo de morte celular denominado apoptose, principal fenômeno fisiológico determinante do número final de neurônios por depletar parte da população neuronal (KERR *et al.*, 1972; OPPENHEIM, 1985). Os neurônios que permanecem após esta farão contato com seus respectivos órgãosalvo e receberão aporte neurotrófico adequado, garantindo sua sobrevivência (LEVI MONTALCINI, 1987; OPPENHEIM, 1991; OPPENHEIM *et al.*, 1993, LOWRIE & VRBOVÁ, 92). Desta forma, o número total de neurônios no DRG é estabelecido durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal precoce. No entanto, eventos lesivos podem alterar este ambiente, levando a perda celular e, consequentemente, déficit funcional.

Sabe-se que a lesão de um nervo periférico pode causar prejuízos funcionais e morfológicos severos. Especificamente, a secção (axotomia) do nervo ciático de roedores é um modelo experimental utilizado para se estudar os mecanismos envolvidos na morte neuronal induzida por lesão nervosa (ROSENFELD *et al.*, 1997). A quantidade de neurônios sensitivos do DRG que morrem em decorrência de secção axonal, é maior no período neonatal do que na fase adulta (ALDSKOGIUS & RISLING, 1981; TESSLER *et al.*, 1985; SNIDER, 1992, OLIVEIRA, 1997). Acredita-se que fatores neurotróficos produzidos por células de Schwann do coto proximal do nervo seccionado garantiram a sobrevivência da maior parte dos neurônios lesados nos animais adultos. No entanto, tal aporte trófico não estaria disponível para os neurônios no período neonatal (LOWRIE MB & VRBOVÁ G, 1992; KOLIATSOS et al., 1994). Os fatores neurotróficos são proteínas caracterizadas pela seletividade de sua ação sobre diferentes populações neuronais, tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. Um destes é o fator de crescimento do nervo (NGF), presente nos territórios alvo de neurônios sensoriais, de onde é capturado pelos terminais axônicos destas células e transportados até o corpo celular, onde exerce seus

efeitos tróficos (LEVI-MONTALCINI & HAMBURGER, 1951, 1987; RICH *et al*, 1987). De fato, os neurônios do DRG são sensíveis a perda do aporte de NGF durante um período transitório *in útero* (VOGELBAUM *et al*, 1998). Experimentos em que foram realizados auto-imunização de cobaias grávidas contra NGF evidenciaram 85% de perda de neurônios do DRG da prole, o que resultou em perda de função sensorial (JOHNSON *et al*, 1980). Por outro lado, a suplementação exógena do NGF preveniu a morte celular de neurônios sensitivos durante o desenvolvimento neuronal em aves (HAMBURGUER & YIP, 1984).

Ainda que os eventos relacionados com a perda celular induzida pela secção de nervo periférico sejam pouco conhecidos até o presente, alguns autores reportaram evidências sugestivas da ocorrência de apoptose (LOWRIE & LAWSON, 2000; BAHADORI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002). A apoptose é um processo de morte celular que envolve uma complexa rede de vias bioquímicas que normalmente garantem o balanço homeostático entre sobrevivência e morte celular (CHOWDHURY et al, 2006). Constitui um processo ativo de auto-destruição celular caracterizado morfologicamente por retração ou encolhimento citoplasmático; condensação da cromatina; fragmentação nuclear e do DNA; e formação de corpos apoptóticos (WYLLIE, 1981; WYLLIE, 1984). Além de possuir papel importante no desenvolvimento, a apoptose também regula uma variedade de eventos fisiológicos que ocorrem ao longo da vida: renovação tecidual; atrofia tecidual induzida por hormônios; eliminação de células inflamatórias; e a evolução de tecido de granulação para tecido cicatricial (CHOWDHURY et al., 2006). Poucos estudos buscaram compreender com mais detalhes o fenômeno de apoptose induzida por axotomia no DRG (OLIVEIRA et al., 1997; GROVES et al. 1997). Estes autores reportaram a presença de neurônios apoptóticos no DRG após secção do nervo ciático de ratos, através da técnica que

detecta fragmentação de DNA *in situ* conhecida por TUNEL (do inglês, *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling*).

As proteínas da família da Bcl-2 são importantes reguladoras do processo de morte celular no sistema nervoso central. Dentre os componentes desta família, Bcl-2 e Bcl-xL exercem papel anti-apoptótico. Por sua vez, as proteínas Bax e Bak têm papel pró-apoptótico. Particularmente, Bax e Bcl-2 regulam a ocorrência de apoptose em resposta a privação de fatores neurotróficos. O desequilíbrio nos níveis de expressão dessas moléculas, isto é, predomínio dos agentes pró-apoptóticos sobre os inibidores da morte celular, determinaria perda neuronal (LINDSTEN *et al.*, 2005).

Recentemente, diversos autores associaram a morte de neurônios submetidos a axotomia à produção de radicais livres, como o óxido nítrico (NO) e seus derivados (ARVIDSSON *et al.*, 1986 CLOWRY 1993; MARIOTTI *et al.*, 1997; ESTÉVEZ *et al.*, 1998; YICK *et al.*, 1998; BURNAND et al., 2004; ROGÉRIO *et al.*, 2005). Os radicais livres são moléculas com um elétron desemparelhado em seu orbital externo, fato que determina sua reatividade sobre diversas moléculas como proteínas, lipídios, ácidos nucléicos e açúcares levando ao prejuízo das funções celulares (McCORD *et al.*, 1969).

O NO é produzido pela óxido nítrico sintase (NOS). Esta enzima atua catalisando a conversão de L-arginina em L-cirtrulina e NO. Até hoje, foram identificadas três isoformas distintas da NOS: neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS). Elas se diferenciam quanto à dependência de íons cálcio (Ca^{2+}) para que o cofator calmodulina (CaM) se ligue à enzima. O nível celular de Ca^{2+} tem importante papel na regulação da função catalítica das isoformas neuronal e endotelial, enquanto que a atividade da iNOS é menos sensível a variações na concentração de Ca^{2+} (ALDERTON *et al.*, 2001 BRUCKDORFER, 2005).

Sabe-se que a expressão de nNOS é regulada durante o desenvolvimento. Nos estágios iniciais da embriogênese, antes mesmo do crescimento dos neuritos, todos os neurônios expressam nNOS (BREDT & SNYDER, 1994). A expressão de nNOS neste período de desenvolvimento embrionário parece ser inversa a expressão do receptor para NGF trkA (THIPPESWAMY & MORRIS, 1998). Em 2002, utilizando culturas de neurônios do DRG, os mesmo autores verificaram que o NGF diminui a expressão da nNOS. Especificamente, os neurônios do DRG cessariam a produção de nNOS enquanto os receptores para NGF estivessem ativados. Outros autores mostraram que a secção periférica dos axônios sensitivos induz os neurônios do DRG a produzirem nNOS (ZHANG et al, 1993), mas apenas aqueles neurônios de menor tamanho e que possuem a capacidade de expressar neuropeptídeos (ZHANG et al., 1993; JAIN et al., 2000). Além disso, sabe-se que a produção de NO em neurônios pequenos do DRG axotomizados acarreta em síntese de cGMP nas células satélites da glia (THIPPESWAMY & MORRIS, 2001). Os mesmos pesquisadores relatam ainda que nem todas as células satélites que se encontram ao redor dos neurônios nNOS-positivos produzem cGMP; enquanto que a maioria dos neurônios grandes que não expressam nNOS são envolvidos por células da glia produtoras de cGMP. Esta relação sugere um papel das células da glia na sobrevivência neuronal após evento deletério.

O NO pode se ligar a diversas moléculas presentes nos neurônios, até mesmo com outros radicais livres como o superóxido (O₂-) (BREDT & SNYDER, 1994; GROSS & WOLIN, 1995; DAWSON & DAWSON, 1996). O O₂- tem como principal fonte a respiração mitocondrial e pode exercer efeitos deletérios, os quais são diminuídos em condições fisiológicas por um sistema antioxidante intracelular. McCord e Fridovich, em 1969, descreveram pela primeira vez a enzima superóxido dismutase (SOD), uma proteína que possui íons cobre e zinco em sua estrutura e cuja função é catalisar a dismutação do O₂-. A dismutação é um tipo de reação para a decomposição dos radicais livres: no processo, dois radicais livres iguais reagem, gerando produtos não radicalares. A SOD reduz o O₂- a peróxido de hidrogênio, que é transformado em água pela ação da glutationa peroxidase. Atualmente são conhecidas três isoformas da SOD: a SOD 1, citosólica ligada a íons cobre e zinco; a SOD 2, presente na matriz mitocondrial e ligada a íons manganês; e a SOD 3, extracelular localizada principalmente na matriz extracelular e também ligada a íons cobre e zinco (ROSENFELD *et al.*, 1997).

Quando existe um desequilíbrio entre a produção e a eliminação do ânion superóxido, com predomínio da produção (estresse oxidativo), pode ocorrer a reação do NO com o O₂-. Esta reação leva a grande produção de peroxinitrito (ONOO⁻), que é relacionado com extensos danos celulares como a quebra e fragmentação do DNA, a peroxidação de lipídeos da membrana, a inibição da respiração mitocondrial, a oxidação de algumas proteínas e a indução de apoptose em neurônios (LIPTON & NICOTERA, 1998; SHEN *et al.*, 1998).

Recentemente, evidenciou-se que os efeitos deletérios dos radicais livres no sistema nervoso central podem ser reduzidos pela melatonina (N-acetyl-5-methoxytriptamina) (para revisão vide Reiter, 1998). Nos vertebrados a glândula pineal é a principal fonte desta substância, que também pode ser produzida por outras estruturas, incluindo a retina (PANG & ALLEN, 1986) e intestino (HUETHER *et al.*, 1992). A função primordial deste neurohormônio é a sincronia dos ritmos circadianos do organismo com os períodos de claro/escuro do meio externo (REITER, 1998).

A melatonina desempenha papel neuroprotetor e antioxidante de maneira direta, pois interage com radicais livres e os inativa; e de maneira indireta, pois aumenta a produção de moléculas antioxidantes celulares e modula a atividade de outras produtoras de espécies reativas de oxigênio (REITER *et al.*, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

Em condições fisiológicas, a melatonina inibiu a atividade da nNOS em neurônios cerebelares e hipocampais de ratos (POZO et al., 1994; BETTAHI et al., 1996). Em altas concentrações (doses farmacológicas), estimulou enzimas antioxidantes, como a glutationa peroxidase em cérebro de ratos (BARLOW-WALDEN et al., 1995). O tratamento com melatonina diminuiu a incidência de infartos cerebrais induzidos pela administração de Lcisteína em camundongos (YAMAMOTO & TANG 1996). Segundo Yamamoto (1996), o mecanismo de ação da L-cisteína envolveria a superprodução de NO determinando assim, intensa peroxidação de lipídeos. Observou-se que este neurohormônio protege neurônios do hipocampo e estriado de camundongos e ratos tratados com MPTP (1-metil-4feniltetrahidropiridina) ou 6-OHDA (6-hidroxidopamina), compostos oxidantes utilizados para a indução da doença de Parkinson em animais (ACUÑA-CASTREVIEJO et al., 1997). Experimentos de Rogério e colaboradores (2005) mostraram que a melatonina protege motoneurônios acometidos pela axotomia nervosa periférica de fato, a administração deste neurohormônio aumentou a expressão da SOD1 na intumescência lombar de ratos neonatos submetidos à secção do ciático, enquanto que nos ratos apenas lesados houve diminuição da expressão desta enzima. Por fim, até o presente, pouco se investigou a respeito da ação da melatonina sobre neurônios do DRG. Ayar e colaboradores (2001) reportaram papel neuroprotetor desta substância sobre tais células in vitro, ao verificarem redução da concentração intracelular de cálcio e da ocorrência de morte celular por excitotoxicidade.

Assim, é necessária maior compreensão dos eventos celulares que ocorrem nos neurônios sensitivos do DRG após a secção do nervo ciático. A premissa deste estudo é investigar a distribuição tecidual da nNOS, SOD1, SOD2, Bax e Bcl-2 em DRG de ratos neonatos íntegros ou submetidos a secção do ciático durante a primeira semana de vida pósnatal. Além disso, será investigado se a administração da melatonina altera tal expressão tecidual e se possui efeito neuroprotetor sobre os neurônios lesados.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Investigar mecanismos participantes do processo de morte neuronal no gânglio da raiz dorsal de ratos neonatos submetidos à secção do nervo ciático e possível alteração dos mesmos após administração de melatonina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar quantitativamente a perda de neurônios nos gânglios L4 e L5 de ratos neonatos submetidos à secção do nervo ciático em P2, cinco dias após a lesão.
- Investigar se a administração diária de melatonina garante a sobrevivência de neurônios nos gânglios L4 e L5 de ratos neonatos após à secção do ciático em P2, cinco dias após a lesão.
- Estudar a distribuição tecidual da nNOS nos gânglios L4 e L5 de ratos neonatos submetidos à secção do nervo ciático em P2, após a lesão e tratamento com melatonina.
- Estudar a distribuição tecidual da SOD1 e SOD2 nos gânglios L4 e L5 de ratos neonatos submetidos à secção do nervo ciático em P2, após a lesão e tratamento com melatonina.
- Estudar a distribuição tecidual da Bax e Bcl-2 nos gânglios L4 e L5 de ratos neonatos submetidos à secção do nervo ciático em P2, após a lesão e tratamento com melatonina.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1- Animais e grupos experimentais

As análises experimentais foram realizadas em ratos Wistar com idade pós-natal de dois dias (P2) fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Os animais foram mantidos junto à mãe durante todo o período experimental (5 dias). No 7º dia de vida (P7) foram sacrificados. Durante todo o período, foram deixados sob condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro) e temperatura (21ºC). Os animais amamentavam-se sem restrição de horário e *ad libitum*.

Os ratos neonatos foram repartidos em grupos de acordo com a prática de axotomia periférica do nervo ciático e administração de melatonina, além do tempo de sobrevida após a lesão. Desta forma, os grupos do experimento foram:

- 1) Grupo Controle P2 (n=5): animais íntegros (sem axotomia) sacrificados em P2.
- 2) Grupo Controle P7 (n=6): animais íntegros sacrificados em P7.
- <u>Grupo Salina (n=6)</u>: animais submetidos a secção unilateral do ciático (P2), tratados com veículo de diluição de melatonina (NaCl 0,9% + etanol 5%) e sacrificados em P7.
- <u>Grupo Melatonina (n=6)</u>: animais submetidos a secção unilateral do ciático (P2), tratados com melatonina e sacrificados em P7.

3.2- Procedimentos cirúrgicos para a secção do nervo ciático

Todos os animais com idade P2 foram anestesiados por hipotermia e imediatamente posicionados em decúbito lateral sob microscópio cirúrgico (DF Vasconcelos, M90). A incisão cirúrgica foi feita na coxa esquerda e, afastando-se a musculatura, o nervo ciático foi exposto e seccionado (micro tesoura Vannas, Steel Inox-S.OF3212) ao nível do tendão obturador. Com a finalidade de evitar eventos regenerativos devido ao contato entre os cotos nervosos, foi removido um segmento de 3mm do coto distal. 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 12 e 14 horas.

3.3- Tratamento

A administração da melatonina foi realizada apenas nos animais do Grupo Melatonina (vide item 3.1) 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 à secção do ciático, a melatonina foi aplicada em dose única no mesmo horário (14:00 h), durante 5 dias.

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. Os animais do Grupo Salina (vide item 3.1) receberam como tratamento apenas o veículo de diluição, também com dose proporcional ao peso.

3.4- Obtenção do material biológico para processamento histológico

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 3% (0,1ml/20g, i.p), submetidos a toracotomia e perfundidos com paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M

pH 7,4. Em seguida, os animais foram eviscerados e mantidos na mesma solução fixadora por 24 h (4° C). Após, procedeu-se à identificação e dissecação dos gânglios da raiz dorsal L4 e L5, sob lupa (Carls Weiss 256). Tais gânglios foram estudados, pois a maior parte das fibras sensitivas do nervo ciático é proveniente destas estruturas (SCHMALBRUCH, 1987). Em seguida, o material foi desidratado em etanol 70% e processado para inclusão em parafina.

Foram coletados cortes seriados com 7µm de espessura, em lâminas sinalizadas e gelatinizadas, sem desprezar corte algum. A cada seqüência de sete lâminas, os cortes foram submetidos aos processamentos histológicos indicados na Tabela 1.

Lâmina	Fixador	Cortes	Análise		
1	gelatina	1,8,15,22,29,36	NISSL		
2	silano	2,9,16,23,30,37	IHQ - Bcl-2		
3	silano	3,10,17,24,31,38	IHQ - Bax		
4	gelatina	4,11,18,25,32,39	NISSL		
5	silano	5,12,19,26,33,40	IHQ - SOD1		
6	silano	6,13,20,27,34,41	IHQ - SOD2		
7	silano	7,14,21,28,35,42	IHQ - nNOS		

TABELA 1: Disposição dos cortes coletados nas lâminas e respectiva análise histológica.

Nissl = coloração de Cresil Violeta; IHQ = imunoistoquímica.

3.5- Quantificação dos neurônios sensitivos e análise do diâmetro nuclear

Coloração com cresil violeta foi realizada para a contagem de neurônios sensitivos dos DRG L4 e L5 bilaterais. Para tal quantificação, foram usados 10 cortes centrais de cada DRG e foram considerados apenas neurônios sensitivos com nucléolo evidente e localizados dentro de uma área pré-determinada de 500 x 700 µm. Esta metodologia previne a contagem dupla de um único neurônio, pois há um espaçamento de 3 ou 4 cortes entre os neurônios analisados. Além disso, garante que a contagem foi realizada dentro da mesma área total para cada gânglio analisado. A razão entre o número de neurônios contados do lado lesado e o lado normal foi calculada para cada animal e representada pelo índice de sobrevivência neuronal (ISN). Esta coloração também permitiu a avaliação do diâmetro nuclear e disposição dos diversos tipos dos neurônios sensitivos.

3.6 Análises Imunoistoquímicas

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

Para a realização das imunomarcações, os cortes foram desparafínizados em xilol e re-hidratados em bateria crescente de álcoois e, em seguida, lavados em água destilada. Nos cortes destinados à detecção de SOD2, nNOS, Bcl-2 e Bax, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de H202 (10 volumes) e metanol (3:97, v/v) por 15 minutos. Para a localização da SOD1, efetuou-se tal bloqueio com solução de H202 (10 volumes) e tampão fosfato 10 mM pH 6,0 (3:97, v/v) por 40 minutos. A recuperação antigênica foi realizada empregando-se solução Tris-HCI 50 mM pH 9,5 e uréia 5% (SOD2, nNOS,) ou tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 (Bcl-2 e Bax), em forno microondas (900W) por 10 minutos. Para SOD1, utilizou-se tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 a 95°C por 5 minutos. Em seguida, foi feito bloqueio dos grupos aldeídos com tampão Tris-Glicina

0,1M por 30 minutos e, em seguida, bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de leite em pó desnatado (5%) em tampão PBS pH 7,4 por 1 hora. Os cortes foram incubados com anticorpo primário, diluído em tampão de bloqueio (SOD1 (1:1000), SOD2 (1:50), nNOS (1:100), Bc1-2 (1:200) e Bax (1:200)) em câmara úmida por 12 horas à temperatura ambiente. O anticorpo secundário apropriado (Calbiochem, 402100 (SOD) ou Rockland, 611-1602 (NOS, Bcl-2 e Bax); 1:200) foi aplicado por 2 horas, a temperatura ambiente. A imunorreatividade foi amplificada através de complexo avidina-biotina (Vectastain ABC kit, Vector) por 1 hora.

Por fim, a marcação foi revelada através de reação de peróxido de hidrogênio com diaminobenzidina e as lâminas foram montadas (Entelan, Merck).

3.7 Análise Estatística

Todos os resultados da contagem foram expressos como médias±EPM, e foram submetidos a análise de variância (ANOVA), p<0,05, empregando o programa GraphPad InStat® 3.0.

4. Resultados

4.1 Análise Macroscópica dos DRG.

Após a dissecção dos animais foi possível observar qualitativamente a diferença entre o diâmetro externo dos gânglios do lado não lesado e o lesado (Figs. 1 e 2), tanto nos grupo Melatonina quanto no Salina. O lado ipsilateral a lesão apresenta aspecto atrófico.



Figura 1: Imagem do DRG de L4 a L6 de um animal do Grupo Salina. O lado ipsilateral a lesão apresenta gânglios de menor diâmetro quando comparado ao contralateral. Linha tracejada utilizada para facilitar a comparação qualitativa em L5.Barra = 3 mm.



Figura 2: Imagem do DRG L5 de um animal do Grupo Salina. O lado ipsilateral a lesão apresenta gânglios de menor diâmetro quando comparado ao contralateral. Linha tracejada utilizada para facilitar a comparação qualitativa em L5.Barra = 3 mm.

4.2 Contagem dos neurônios sensitivos e análise do diâmetro nuclear.

Na Tabela 2 e Figura 3 são apresentados respectivamente os valores médios e a representação gráfica do Índice de Sobrevivência Neuronal (ISN) calculado para o gânglio L4 nos diferentes grupos estudados. Independentemente da condição experimental, do tratamento administrado ou tempo de sobrevida não foi observada diferença estatística entre os grupos de animais (p>0,05).

Grupo	Média ISN (L4)
Melatonina (n=6)	$1,057 \pm 0,064$
Salina (n=6)	$1,030 \pm 0,076$
Controle (n=6)	$1,100 \pm 0,098$
Jovem (n=5)	$1,038 \pm 0,086$

Tabela 2: Média dos valores de ISN no DRG L4 para todos os grupos experimentais. Os valores estão expressos em média±EPM. p>0,05.



Figura 3: Representação gráfica dos valores de ISN para o DRG L4 expresso na tabela 2. Todos os grupos experimentais estão representados.

Grupo	Média ISN (L5)
Melatonina (n=6)	$1,007 \pm 0,121$
Salina (n=6)	$0,992 \pm 0,061$
Controle P7 (n=6)	$0,964 \pm 0,192$
Controle P2 (n=5)	$0,945 \pm 0,034$

Tabela 3: Média dos valores de ISN no DRG L5 para todos os grupos experimentais. Os valores estão expressos em média±EPM. p>0,05.



Figura 4: Representação gráfica dos valores de ISN para o DRG L5 expressos na tabela 3. Todos os grupos experimentais estão representados.

Constatou-se uma variedade grande no diâmetro nuclear dos neurônios de gânglios L4 e L5 de todos os grupos com 7 dias de sobrevida. Foi possível identificar neurônios de diversos tamanhos nos animais P7, sendo que os maiores apresentavam aproximadamente 20µm de diâmetro, os intermediários cerca de 13µm os menores cerca de 9µm. Nos animais P2, o número de neurônios grandes se apresentou menor, mas também se encontrou 20µm como medida máxima de diâmetro. Os neurônios menores, no entanto mediam aproximadamente 5µm de diâmetro (Figura 5).



<u>Figura 5</u>: Imagem de corte histológico de gânglio com coloração de Nissl do Grupo Controle. Todos os grupos apresentaram o mesmo padrão. Seta verde: neurônio pequeno. Seta amarela: neurônio intermediário. Seta vermelha: neurônio grande. Barra = 100µm.

4.3 Análise imunoistoquímica para Bax.

O padrão de marcação foi o mesmo em todos os grupos: citoplasmático granular. Não foi observado diferença no padrão de imunomarcação para Bax quando se comparou os neurônios localizados no centro e na periferia do DRG.

Dentre os grupos, o Controle P2 apresentou intensidade de marcação maior quando comparado aos animais dos outros grupos, em ambos os DRG bilateralmente. A marcação foi mais evidente nos neurônios menores. Nos animais do Grupo Melatonina, apenas os neurônios com diâmetro nuclear de valor intermediário (aproximadamente 13µm) entre o dos grandes (20µm) e pequenos (9µm) apresentaram marcação mais intensa, sendo a imunorreatividade comparavelmente menor nos pequenos e grandes. O lado lesado apresentou um discreto aumento na marcação, tanto em L4 quanto em L5.

Tanto o Grupo Salina quanto o Controle P7 apresentaram o mesmo padrão de marcação bilateralmente, tanto em L4 quanto em L5. Especificamente, os neurônios com diâmetro nuclear intermediário apresentaram-se mais intensamente marcados que os grandes e pequenos (Figura 6).

4.4 Análise imunoistoquímica para Bcl-2.

O padrão de imunorreatividade para Bcl-2 foi citoplasmático e difuso e se mostrou semelhante entre todos os grupos experimentais. Os neurônios localizados no centro do DRG apresentaram maior intensidade de marcação quando com parados aqueles localizados na periferia.

Particularmente, foi possível identificar no Grupo Melatonina que a imunorreatividade para Bcl-2 foi maior nos neurônios pequenos e intermediários, com aspecto granular e distribuição predominantemente perinuclear, sem diferença entre o lado ipsi e o contralateral à lesão. Por sua vez, a marcação nos neurônios grandes foi menos intensa. Os padrões descritos para os diferentes tipos neuronais não foram alterados pela axotomia. O lado lesado apresentou marcação mais intensa em neurônios grandes quando comparado com o lado não lesado.

Ao analisar o Grupo Controle P7 e o Grupo Salina, evidenciou-se marcação moderada nos neurônios pequenos e médios, e marcação leve nos neurônios grandes, bilateralmente.

O Grupo Controle P2 apresenta intensidade de marcação aumentada em alguns neurônios grandes e médios (Figura 7).

4.5 Análise imunoistoquímica para nNOS.

O padrão da marcação se mostrou semelhante em todos os grupos experimentais, ocorrendo homogeneamente no citoplasma.

Os animais tratados com melatonina apresentaram maior intensidade de marcação nos neurônios médios e pequenos, localizados na porção central do DRG, em ambos os lados. Pode-se observar um discreto aumento da intensidade da marcação nestes tipos neuronais no lado lesado e apenas em L4.

Os animais do Grupo Salina apresentaram resultados semelhantes aos obtidos no Grupo Melatonina, mas pode-se evidenciar marcação também em L5 do lado lesado. Notou-se em ambos os grupos um aumento na intensidade da marcação quando comparado o lado lesado com o não lesado.

Os animais do Grupo Controle e os do Grupo Jovem não apresentaram marcação evidente para nNOS, independentemente do lado analisado (Figura 10).

4.6 Análise imunoistoquímica para SOD1.

O padrão de marcação para esta enzima foi citoplasmático e difuso em todos os tipos neuronais e grupos experimentais.

Nos animais tratados com melatonina foi possível identificar um aumento discreto de marcação no lado lesado, principalmente em L5 e em neurônios grandes. No entanto, em alguns cortes pode-se observar um aumento da intensidade também em L4, do lado íntegro. Nos animais do Grupo Salina a marcação foi semelhante em ambos os lados e gânglios.

Nos animais do Grupo Controle P7 do Grupo Controle P2 não foram observadas diferenças na intensidade da marcação. (Figura 8)

4.7 Análise imunoistoquímica para SOD2.

À semelhança da isoforma SOD1, o padrão de marcação para SOD2 também foi citoplasmático, porém foram verificadas granulações difusas principalmente nos neurônios com diâmetro nuclear intermediário. Nos animais tratados com melatonina foi possível observar aumento na intensidade da marcação nos neurônios intermediários tanto em L4 quanto em L5 do lado lesado, em comparação com o lado íntegro.

Nos animais do Grupo Salina, do Grupo Controle e do Grupo Jovem observou-se marcação principalmente em neurônios de pequeno e médio diâmetro, sendo que não foram verificadas diferenças com relação a este padrão dentre tais grupos estudados (Figura 9).



Figura 6. Imunoistoquímica para Bax.



Figura 6. Imunoistoquímica para Bax (Continuação). Imagem representativa de neurônios do DRG imunoreagidos para Bax. O padrão de marcação foi o mesmo em todos os grupos: citoplasmático granular. A,B L4D de animal do Grupo Controle P2. Apresentou intensidade de marcação maior quando comparado aos animais dos outros grupos, em ambos os DRG bilateralmente. A marcação foi mais evidente nos neurônios de diâmetro nuclear menores.C,D L4E de animal do Grupo Controle E,F L4D de animal de Grupo Salina. Tanto o Grupo Salina quanto o Controle P7 apresentaram o mesmo padrão de marcação bilateralmente, tanto em L4 quanto em L5. Especificamente, os neurônios com diâmetro nuclear intermediário apresentaram-se mais intensamente marcados que os grandes e pequenos. Aumento de imunorreatividade em neurônios de pequeno e médio diâmetro nuclear. G,H LAE de animal do Grupo Salina. Aumento de imunorreatividade em neurônios pequenos e médios. I,J e KL L5D e L5E, respectivamente, de animal do Grupo Melatonina. apenas os neurônios com diâmetro nuclear de valor intermediário (aproximadamente 13µm) entre o dos grandes (20µm) e pequenos (9µm) apresentaram marcação mais intensa, sendo a imunorreatividade comparavelmente menor nos pequenos e grandes. O lado lesado apresentou um discreto aumento na marcação, tanto em L4 quanto em L5. Barra: A,C,E,G,I,K 200µm; B,D,F,H,J,L 100 µm.



Figura 7. Imunoistoquímica para Bcl-2.



Figura 7. Imunoistoquímica para Bcl-2 (Continuação). O padrão de imunorreatividade para Bcl-2 foi citoplasmático e difuso e se mostrou semelhante entre todos os grupos experimentais. Os neurônios localizados no centro do DRG apresentaram maior intensidade de marcação quando com parados aqueles localizados na periferia A,B L4D de animal do Grupo Controle P2. Apresenta intensidade de marcação aumentada em alguns neurônios grandes e médios C,D L4E de animal do Grupo Controle P7 E,F L4D de animal de Grupo Salina. Grupo Controle P7 e o Grupo Salina, evidenciou-se marcação moderada nos neurônios pequenos e médios, e marcação leve nos neurônios grandes, bilateralmente.G,H L4E de animal do Grupo Salina. Aumento de imunorreatividade em neurônios pequenos e médios. I,J e KL L5D e L5E, respectivamente, de animal do Grupo Melatonina. A imunorreatividade para Bcl-2 foi maior nos neurônios pequenos e intermediários, com aspecto granular e distribuição predominantemente perinuclear, sem diferença entre o lado ipsi e o contralateral à lesão. Por sua vez, a marcação nos neurônios grandes foi menos intensa. Os padrões descritos para os diferentes tipos neuronais não foram alterados pela axotomia. O lado lesado apresentou marcação mais intensa em neurônios grandes quando comparado com o lado não lesado. Barra: A,C,E,G,I,K 200µm; B,D,F,H,J,L 100 µm.



Figura 7. Imunoistoquímica para SOD 1.



Figura 8. Imunoistoquímica para SOD 1 (Continuação). O padrão de marcação para esta enzima foi citoplasmático e difuso em todos os tipos neuronais e grupos experimentais. **A,B** L4D de animal do Grupo Controle P2. Não possível identificar alteração do padrão **C,D** L4E de animal do Grupo Controle P7. Não possível identificar alteração do padrão.**E,F** L4D de animal de Grupo Controle P7. Não possível identificar alteração do padrão.**E,F** L4D de animal de Grupo Controle P7. Não possível identificar alteração do padrão.**E,F** L4D de animal de Grupo Controle P7. Grupo Controle P7 e o Grupo Salina, evidenciou-se marcação moderada nos neurônios pequenos e médios, e marcação leve nos neurônios grandes, bilateralmente.**G,H** L4E de animal do Grupo Salina. Nos animais do Grupo Salina a marcação foi semelhante em ambos os lados e gânglios **I,J e KL** L5D e L5E, respectivamente, de animal do Grupo Melatonina. Pudemos observar um aumento discreto de marcação no lado lesado, principalmente em L5 e em neurônios grandes. No entanto, em alguns cortes pode-se observar um aumento da intensidade também em L4, do lado íntegro. Barra: A,C,E,G,I,K 200µm; B,D,F,H,J,L 100 µm



Figura 9. Imunoistoquímica para SOD 2.



Figura 9. Imunoistoquímica para SOD2 (Continuação). Imagem representativa de neurônios do DRG imunoreagidos para SOD2. Padrão de marcação citoplasmático com granulações difusas predominantemente em neurônios de diâmetro nuclear intermediário. **A,B** L4D de animal do Grupo Controle P2. Não houve alteração do padrão descrito. **C,D** L4E de animal do Grupo Controle. Não houve alteração do padrão descrito. **E,F** L4D de animal de Grupo Salina. Aumento de imunorreatividade em neurônios de pequeno e médio diâmetro nuclear. **G,H** L4E de animal do Grupo Salina. Aumento de imunorreatividade em neurônios de pequeno e médio. **I,J e KL** L5D e L5E, respectivamente, de animal do Grupo Melatonina. Neurônios com diâmetro nuclear intermediário apresentam imunorreatividade aumentada. Barra: A,C,E,G,I,K 200µm; B,D,F,H,J,L 100 µm.



Figura 10. Imunoistoquímica para nNOS.



Figura 10. Imunoistoquímica para nNOS (Continuação). O padrão da marcação se mostrou semelhante em todos os grupos experimentais, ocorrendo homogeneamente no citoplasma.**A**,**B** L4D de animal do Grupo Controle P2. Não houve marcação. **C**,**D** L4E de animal do Grupo Controle. Não houve marcação. **E**,**F** L4D de animal de Grupo Salina. Aumento de imunorreatividade em neurônios de pequeno e médio diâmetro nuclear. **G**,**H** L4E de animal do Grupo Salina. Os animais do Grupo Salina apresentaram resultados semelhantes aos obtidos no Grupo Melatonina, mas pode-se evidenciar marcação também em L5 do lado lesado. Notou-se em ambos os grupos um aumento na intensidade da marcação quando comparado o lado lesado com o não lesado. **I,J e KL** L5D e L5E, respectivamente, de animal do Grupo Melatonina. Grupo apresetou maior intensidade de marcação nos neurônios médios e pequenos, localizados na porção central do DRG, em ambos os lados. Pode-se observar um discreto aumento da intensidade da marcação nestes tipos neuronais no lado lesado e apenas em L4. Barra: A,C,E,G,I,K 200µm; B,D,F,H,J,L 100 µm.

5. Discussão

5.1 Efeito da axotomia sobre a população neuronal do DRG.

Para analisar o efeito da secção do nervo ciático sobre a população neuronal, foi feita a contagem dos nucléolos evidentes em neurônios pertencentes aos gânglios L4 e L5. O experimento contou com duas formas de controle: 1) o Grupo Controle P7, composto por animais sem lesão nervosa; e 2) o lado contra lateral à lesão nos animais axotomizados. Os resultados do Índice de Sobrevivência Neuronal (ISN) não mostraram diferença significativa entre os animais de grupos submetidos à lesão (melatonina e salina) e os não lesados (p>0,05).

De acordo com diversos estudos, a axotomia causa alterações plásticas nos fenótipos de alguns neurônios do DRG e morte celular em outros (ARVIDSON *et al.* 1986; BAHADORI *et al.* 2001; KISHI *et al.*, 2002; TANDRUP *et al.*, 2000). Por outro lado, alguns estudos mostram que não existe perda neuronal, ou que esta é apenas relativa (KNYIHÄR & CSILLIK, 1976; TESSLER *et al.*, 1985; YGGE, 1989). Outros estudos relatam morte neuronal extensa, entre 20 a 60% da população total dos neurônios do gânglio (ALDSKOGIUS & ARVIDSSON, 1978; ARVIDSSON *et al.*, 1986, YGGE, 1987). Estudos com animais adultos que relacionam morte e sobrevida neuronal após lesão relatam haver morte a partir da primeira semana pós-secção, sendo o pico de morte neuronal no 2º mês (YU *et al.*, 2002, HART *et al.*, 2002). Por sua vez, Whiteside e colaboradores (1998), em experimento com ratos neonatos, observaram pico de morte entre o 1º e o 3º dia após lesão. Como possíveis explicações para a discrepância entre os resultados quantitativos encontrados na literatura, podem-se considerar a variabilidade de espécies utilizadas nos experimentos; a idade do animal no momento da lesão; diferenças

no tipo, severidade e localização da lesão; alterações no tamanho e forma dos neurônios; e abordagem técnica usada para se avaliar aspectos morfológicos e número de neurônios.

No presente estudo, o método utilizado para se quantificar a população neuronal dos gânglios estudados baseou-se em índice (Índice de Sobrevivência Neuronal, ISN) calculado a partir do total de neurônios contados no lado lesado e não lesado em cortes histológicos seriados e com espaçamento regular entre eles. Esta forma de análise, conquanto permitiu o estudo histológico e imunoistoquímico do mesmo espécime considerado para a análise quantitativa pode ter influenciado negativamente tal análise. De fato, não se pode excluir que a região delimitada em cada gânglio (amostrada nos dez cortes centrais avaliados) pode não ter representado grupos neuronais suscetíveis à lesão. Especificamente, os neurônios localizados na periferia do gânglio podem ser suscetíveis a secção do nervo e apresentar maior extensão de morte quando comparado aqueles mais centrais. Neste caso, apenas a contagem de todos os neurônios do gânglio permitiria notar possível perda neuronal. Coggeshall (1992) investigou diferentes metodologias de quantificação de neurônios do gânglio e sugeriu que para quantificar estas células adequadamente é necessário fazer uma reconstrução digital tridimensional da estrutura. Esta reconstrução requer cortes finos e seriados de todo o gânglio sem desprezar corte algum, um procedimento complexo que consome todo o material e impossibilita a realização de outras análises. Diante desta dificuldade, Gundersen e colaboradores (1988a) e Sterio (1994) descreveram a técnica de análise estereológica, que utiliza probabilidades geométricas e proporciona análise quantitativa relativamente mais simples, confiável e reproduzível; sendo possível avaliar a morfologia normal, números reais e mesmo degeneração e perda neuronal no gânglio. Dentre os diferentes métodos de análise quantitativa de neurônios de gânglios da raiz dorsal, o disector (Sterio, 1984) é considerado adequado para quantificar tais neurônios. Neste método, cortes seriados e paralelos são coletados aos pares (denominados pares de *disector*) com espaçamento irregular dentro dos limites do gânglio. O par *disector* é constituído por um corte de referência e outro corte espelho (corte subjacente). Os nucléolos para contagem são identificados no corte de referência, e, se possível, localizados no corte espelho. Apenas aqueles presentes no corte de referência, mas não no corte espelho são denominados de *tops*. A soma de todos os *tops* dividida pela soma do volume dos cortesde referência caracteriza a densidade de neurônios no gânglio. Esta estimativa de densidade pode ser multiplicada pelo volume do gânglio, e o valor encontrado é a estimativa do número de neurônios na estrutura.

Embora nossos resultados não tenham indicado numericamente perda neuronal, foi possível identificar macroscopicamente uma diminuição no diâmetro dos gânglios após dissecação, quando comparados o lado lesado e o não lesado (figura 1). A dissecação dos gânglios L4 e L5 dos animais íntegros não evidenciou esta diferença. Desta forma, pode-se sugerir que ocorreu uma significativa atrofia do gânglio, provavelmente devida a perda neuronal decorrente da axotomia.

5.2 Análises Imunoistoquímicas para a proteína Bax.

Foi avaliada a imunomarcação para a proteína pró-apoptótica Bax nos diversos grupos experimentais. Em todos eles o padrão de marcação se mostrou citoplasmático, discreto e granular. Não foi possível identificar diferenças quanto à marcação dos neurônios localizados no centro e na periferia em todos os grupos. Este padrão na marcação está de acordo com o observado por Gillardon e colaboradores (1996), que encontraram aumento na marcação apenas em neurônios pequenos, com padrão citoplasmático e granular difuso.

Os animais do Grupo Controle P2 apresentaram intensidade maior de marcação quando comparado aos outros grupos, em ambos os gânglios. Este dado é condizente com os encontrados por Guillardon e colaboradores (1996) e Thippeswammy em 2001 A presença da Bax no Grupo Contole P2 sugere a ocorrência de morte celular decorrente de apoptose durante este período pós-natal.

No grupo melatonina não houve diferença significativa entre o lado lesado e o não lesado. A intensidade da marcação se encontrou pouco aumentada nos neurônios médios quando comparados aos outros neurônios de tamanhos diferentes. No entanto, estes neurônios parecem expressar Bax de maneira constitutiva, pois não foi possível identificar diferença entre o lado lesado e não lesado. De qualquer modo, a melatonina parece não apresentar mecanismo protetor via alterações na expressão de Bax.

Burnard e colaboradores (2004), ao estudar os mecanismos envolvidos na resposta frente injúria nervosa sensitiva em modelo de diabetes experimental, não observaram alterações na expressão das proteínas relacionadas a apoptose. Como explicação, propõem que o tempo de vida do animal no momento da lesão é importante, isto é, para diferentes idades em que o animal fosse lesado corresponderiam perdas neuronais de diferentes extensões. Gillardon e colaboradores, em 1996, observaram que a imunomarcação para Bax foi intensificada apenas seis dias após a lesão, concomitante com o início da fase de degeneração dos neurônios. Contudo, os autores utilizaram animais com 3 semanas de vida no momento da lesão, o que reforça a hipótese acima mencionada de Burnard e colaboradores.

Os animais do Grupo Salina e do Grupo Controle não apresentaram diferença significativa na imunomarcação para Bax. Estudos do nosso laboratório mostram aumento da síntese de mRNA para Bax na intumescência lombar e o numero de células Baxpositivas no corno dorsal ipsilateral, um dia após a lesão (ROGÉRIO *et al.*, 2006). No presente estudo, a análise foi realizada cinco dias após a lesão. É possível que tais alterações possam ter ocorrido nas células dos gânglios da raiz dorsal e não tenham sido detectadas devido ao tempo de sobrevida avaliado. Desta forma, a lesão realizada no presente estudo parece não ser responsável por alterar a distribuição tecidual desta proteína cinco dias após o estímulo lesivo. Finalmente, experimentos que investiguem alterações da expressão da Bax após lesão em diferentes idades e após diferentes tempos de sobrevida no presente modelo experimental são necessários.

5.3 Análises Imunoistoquímicas para a proteína Bcl-2.

No presente estudo foi possível evidenciar aumento de marcação (citoplasmática, difusa e moderada) para Bcl-2 nos neurônios em região central do gânglio quando comparados aqueles localizados na periferia. Este fato sugere que neurônios do gânglio da raiz dorsal expressam constitutivamente diferentes proteínas durante o desenvolvimento, de acordo com suas distintas funções e/ou distribuição espacial. Foi possível observar prevalência de marcação em neurônios médios e pequenos, e rara marcação nos neurônios grandes no Grupo Melatonina, independente do gânglio observado. O lado lesado apresentou leve aumento de imunomarcação para Bcl-2 em neurônios grandes, o que pode indicar resposta neuroprotetora desta substância apenas para esta classe de neurônios. Não foi identificado aumento na imunomarcação nos neurônios grandes do gânglio do lado lesado no Grupo Salina, desprovidos de tratamento neuroprotetor.

Os animais do grupo Controle P2 não apresentaram marcação aumentada em neurônios grandes e médios, mas tal proteína anti-apoptótica parece ser expressa de maneira constitutiva durante o desenvolvimento pós-natal recente.

É possível que a morte nos neurônios sensitivos após lesão ocorra por via apoptótica independente da regulação pela Bcl-2. Bahadori e colaboradores (2001) relatam haver fagocitose de neurônios que morreram por apoptose no gânglio após axotomia, o que impossibilita a identificação em análises imunistoquímicas.

5.4 Análises Imunoistoquímicas para a enzima nNOS.

Os resultados relativos a imunomarcação para nNOS sugerem que, no período pós natal recente, esta enzima não possui papel fundamental em condições fisiológicas. De fato, os animais íntegros do Grupo Controle P2 e do Grupo Controle P7 não apresentaram marcação para nNOS. Entretanto, a axotomia do nervo ciático induziu o aumento da expressão desta enzima. Nos animais do Grupo salina e Melatonina foi possível evidenciar aumento na marcação quando foram comparados o lado lesado com o não lesado.

Em estudo que acompanhou o desenvolvimento embrionário, Thippeswammy (2002) descreve a importância do NO durante a fase neurogência do desenvolvimento. De acordo com o autor, os neurônios do DRG *in útero* expressam intensamente nNOS. Assim, é possível inferir que o NO possui papel relacionado com a manutenção celular durante o desenvolvimento dos neurônios do DRG. Finalmente, após o nascimento, período em que o aporte trófico aos neurônios sensitivos é garantido em parte por fatores sintetizados na periferia (principalmente o NGF), a expressão de nNOS.

Assim, pode-se sugerir que os neurônios do gânglio atravessam fases distintas nas quais os fatores neurotróficos desempenham diferentes funções. Durante a primeira fase neurogênica e de crescimento dos neuritos - os neurônios do gânglio não são dependentes de fatores neurotróficos periféricos para a sobrevivência. O NO parece desempenhar papel importante, pois se evidencia um aumento na expressão de nNOS (BREDT & SNIDER, 1994). Numa fase seguinte, ao estabelecer contato com a periferia, os neurônios recebem aporte neurotrófico dos órgãos-alvo por eles inervados e se tornam dependentes deste aporte para sobrevivência, diminuindo a expressão de nNOS. Como dependem dos fatores neurotróficos periféricos para sobrevivência, os neurônios do DRG iniciam uma competição por regiões fornecedoras deste aporte. É nessa fase de competição que evidencia-se a redução no número total de neurônios. Após o término desta fase competitiva, é estabelecido o número total de neurônios do DRG. Nesta fase do desenvolvimento, considera-se que as células de Schwann exercem importante papel para manutenção da a sobrevivência dos neurônios, visto que também sintetizam fatores neurotróficos.

Thipeswammy (2002 e 2005) sugere que os neurônios pequenos possuem papel fundamental na sobrevivência neuronal. Este autor relatou que, após secção do nervo, os neurônios menores apresentam aumento na expressão de nNOS, resultado que corrobora com os resultados encontrados em nosso estudo. Ainda, segundo Thipeswammy (2002 e 2005), o NO possuiria efeito neuroprotetor autócrino nos neurônios menores, provavelmente por inibir a síntese de Bax e a ativação da caspase. O NO sintetizado nos neurônios pequenos se difundiria de maneira parácrina para os neurônios grandes e ativaria o cGMP nas células satélites da glia. As células satélites desempenhariam efeito neuroprotetor sobre os neurônios grandes por inibir a síntese de moléculas pró-apoptóticas (Figura 10).



Figura 11. Ilustração esquemática da ação neurpoprotetora do NO após lesão do nervo. A axotomia determinaria perda de aporte trófico (NGF) proveniente dos tecidos alvo, o que resultaria em aumento da expressão de nNOS nos neurônios pequenos. O NO atuaria aumentando os níveis de cGMP nas células satélites, que exerce efeito neuroprotetor sobre os neurônios grandes. (THIPPESWAMMY & MORRIS, 2002)

No presente estudo, não foram obtidos resultados semelhantes aos descritos por outros autores que relatam morte neuronal em gânglio da raiz dorsal após lesão nervosa periférica (ALDSKOGIUS & ARVIDSSON, 1978; ARVIDSSON *et al.*, 1986, YGGE, 1987; WHITESIDE et al., 1998). Por outro lado, resultados descritos por outros autores corroboram nossos achados relativos à não detecção de perda neuronal. Durante o período de desenvolvimento pós-natal, os neurônios do gânglio se tornam menos suscetíveis à falta de suporte de NGF, contrariando a dependência por este fator neurotrófico verificada no período embrionário (RICH *et al*, 1984). De fato, estudos *in vitro* demonstram que os neurônios do gânglio embrionários necessitam de NGF para sobreviver. A retirada de NGF no 15º dia de desenvolvimento embrionário (E15), resultou em morte celular por apoptose

(TONG *et al*, 1996). Tal fato sugere dependência de aporte neurotrófico relacionada com a idade e época do desenvolvimento. A retirada de fatores neurotróficos precocemente no período embrionário E10 resulta em extensa morte neuronal, em comparação com a retirada em período mais tardio (E21) ou no período pós-natal; neste último caso, induzida através de axotomia do nervo (TONG *et al*, 1997). O mecanismo molecular que explica a menor suscetibilidade neuronal a estímulos lesivos em períodos mais tardios do desenvolvimento ainda é desconhecido.

Thippeswammy e Morris (2002) sugerem que após secção periférica axonal no período pós-natal, os neurônios do gânglio são desprovidos de NGF proveniente dos tecidos alvo. De maneira semelhante ao período *in utero*, aumentam a expressão de nNOS e consequentemente a síntese de NO. Esta resposta parece acontecer apenas nos neurônios que expressam receptores trkA. Em conseqüência do aumento na síntese de NO, as células da glia sintetizam cGMP, que parece estimular a produção de NGF para promover a sobrevivência neuronal e estimular possível regeneração axonal.

5.5 Análises Imunohistoquímicas para a enzima SOD 1 e SOD 2.

Com padrão de marcação citoplasmático difuso, a imunomarcação para SOD1 foi notada em todos os neurônios grandes e pequenos de todos os grupos, independentemente da lesão. Especificamente, tal imunorreatividade foi discreta nos neurônios dos animais íntegros (Grupos Controle P7 e Controle P2).

Nos animais tratados com melatonina foi possível identificar um aumento na intensidade de marcação do lado lesado, principalmente em L5 e em neurônios grandes. Este achado pode ter sido conseqüente a diferentes respostas que os diversos tipos de neurônios possuem frente a um estimulo lesivo. Neste caso, a SOD1 poderia estar desempenhando papel protetor anti-oxidante nos neurônios de maior tamanho, provavelmente estimulado pela ação da melatonina (ROGÉRIO *et al.*, 2005).

A marcação para SOD2 se mostrou semelhante à da SOD1 e parece ser expressa de forma constitutiva nos neurônios. Os animais do Grupo Melatonina apresentaram aumento na imunoreatividade desta isoforma apenas em neurônios intermediários, o que sugere ação antioxidante específica para esta classe de neurônios.

5.6 Ação neuroprotetora do neurohormônio Melatonina

Até o presente, não existem na literatura trabalhos sobre o papel antioxidante direto da melatonina sobre neurônios do gânglio da raiz dorsal. No entanto, Ayar e colaboradores (2001) reportaram ação neuroprotetora deste neurohormônio sobre tais tipos celulares. Estes autores investigaram a ação da melatonina sobre os canais de cálcio ativados por altavoltagem e a concentração intracelular de cálcio (Ca²⁺) em cultura de neurônios do DRG de ratos neonatos. A administração exógena de melatonina inibiu os canais de cálcio ativados por altavoltagem de maneira dose-dependente. Sendo assim, a melatonina seria capaz de prevenir perda neuronal por excitotoxicidade, uma vez que altos níveis de cálcio intracelular podem desencadear processo de morte celular mediado inclusive por aumento de síntese de radicais livres. Tal ação caracterizaria um papel antioxidante indireto da melatonina sobre os neurônios do gânglio da raiz dorsal.

Finalmente, o presente estudo não permitiu evidenciar efeito neuroprotetor da melatonina sobre os neurônios do gânglio da raiz dorsal, cinco dias após a secção do ciático de ratos neonatos P2. Futuras análises baseadas em estímulos lesivos realizados em animais com diferentes idades e tempos de sobrevida poderiam evidenciar perda neuronal

determinada pela secção do nervo ciático, bem como possível efeito neuroprotetor da melatonina no presente modelo experimental.

CONCLUSÕES

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO D, COTO-MONTI MG, ORTIZ GG, REITER RJ. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. Life Sci., 60, PL23-PL29. (1997).
- ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. **Biochem. J.** 357: 593-615. (2001).
- ALDSKOGIUS H, RISLING M, Effect of sciatic neurectomy on neuronal number and size distributions in L7 kittens. **Experimental Neurology** 74: 597-04. (1981).
- ARVIDSSON J, YGGE J, GRANT G. Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat. **Brain Research**,; 373: 15-21 (1986).
- AYAR A, MARTIN DJ, OZCAN M, KELESTIMUR H. Melatonin inhibits high voltage activated calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurons. Neuroscience Letters., 313 (1-2):73-7. (2001).
- BAHADORI MH, AL-TIRAIHI T, VALOJERDI MR. Sciatic nerve transection in neonatal rats induces apoptotic neuronal death in L5 dorsal root ganglion. Journal of Neurocytology 30: 125-30. (2001).
- BARLOW-WALDEN LR, REITER RJ, ABE M, PABLOS M, MENENDEZ-PELAEZ A, ACHEN, LD, POEGGELER B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity, **Neurochem. Int.**, 26, 497-502. (1995).
- BELMONTE C, F. CERVERO. Neurobiology of Nociceptors. Oxford University Press, Oxford. (1996).

- BEAR MF, CONNORS BW, PARADISO, MA. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2ª edição.Ed. Artmed, Porto Alegre-R. (2002).
- BETTAHI I, POZO D, OSUNA C, REITER RJ. ACUÑA-CASTROVIEJO D, GUERRERO JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. **J. Pineal Res**. 20, 205-210. (1996).
- BONDOK AA, SANSONE FM. Retrograde and transganglionic degeneration of sensory neurons after a peripheral nerve lesion at birth. **Exp. Neurol.**, 86:322-330 (1984).
- BREDT DS, SNYDER SH. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. Neuron 13: 301–313. (1994).
- BREDT DS, SNYDER SH. Nitric oxide: a physiological messenger molecule. Annu Rev Biochem 63:175-95. (1994).
- BRUCKDORFER R. The basis oabout nitric oxide. Mol Aspects Med 26 (1-2): 3-31. (2005).
- BURNAND RC, PRICE SA, McELHANEY M, BARKER D, TOMLINSON DR. Expression of axotomy-induced and apoptosis-related genes in sensory nerves of rats with experimental diabetes. **Brain Res Mol Brain Res.** Dec 20; 132 (2): 235-40. (2004).
- CHELYSHEV YA, RAGINOV IS, GUSEVA DS, MASGUTOV RF. Survival and Phenotypic Characteristics of Axotomized Neurons in Spinal Ganglia. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, Vol. 35, No. 5, 457-61. (2005).
- CHOWDHURY I, THARAKAN B, BHAT GK. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. Cellular & Molecular Biology Letters. (2006).

- CLARKE PGH. Apoptosis versus necrosis, how valid is a dichotomy for neurons? In Cell Death and Diseases of the Nervous System pp 3-28. Totowa, NJ: Humana Press.
- CLOWRY GJ. Axotomy induces NADPH diaphorase activity in neonatal but not adult motoneurons. **Neuroreport** 5:361-364. (1993).
- COGGESHALL RE. Law of separation of function of the spinal roots. **Physiological Reviews** 60: 716–755. (1980).
- COGGESHALL RE. A consideration of neural counting methods. **Trends in Neuroscience** 15, 211–212. (1992).
- DAWSON VL, DAWSON TM, BARTLEY DA, UHL GR, SNYDER SH. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. J Neuroscience 13: 2651-61. (1996).
- DECKWERTH TL, ELLIOTT JL, KNUDSON CM, JOHNSON Jr EM, SNIDER WD, KORSMEYER SJ. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. **Neuron** 17:401–411 (1996).
- DECKWERTH TL, EASTON RM, KNUDSON CM, KORSMEYER SJ, JOHNSON Jr EM Placement of the BCL-2 family member BAX in the death pathway activated by NGF deprivation of sympathetic neurons. **Soc Neurosci Abstr** 23:772.9 (1997).
- DEVOR M, GOVRIN-LIPPMANN R. Neurogenesis in adult rat dorsal root ganglia. Neuroscience Letters 61: 189-94 (1985).
- ESTÉVEZ AG, SPEAR N, MANUEL SM, RADI R HENDERSON CE, BARBEITO L, BECKMAN JS. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. **J Neuroscience** 18(3): 923-31. (1998).
- FINOCCHIARO LME, ARTZ ES, 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).

- FRIDOVICH I. Superoxide anion radical (O2-), superoxide dismutase, and related matters.J Biol Chem 272: 18515-17. (1997).
- GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEM-SAMSSON SA. Identification of cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol.**,119: 493-501. (1992).
- GIBBS FP, VRIEND J, The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology.*, 109(5), 1796-1798. (1981).
- GILLARDON F, KLIMASCHEWSKI L, WICKERT H, KRAJEWSKI S, REED JC, ZIMMERMANN M. Expression pattern of candidate cell death effector proteins Bax, Bcl-2, Bcl-X, and c-Jun in sensory and motor neurons following sciatic nerve transection in the rat. Brain Research 739: 244–250 (1996).
- GROSS SS, WOLIN MS. Nitric oxide pathophysiological mechanisms. Annu Rev Physiol. 57: 737-769. (1995).
- GROVES MJ, CHRISTOPHERSON T, GIOMETTO B, SCARAVILLI F. Axotomyinduced apoptosis in adult rat primary sensory neurons. Journal of Neurocytology26: 615-624. (1997).
- GUNDERSEN HJ, BAGGER P, BENDTSEN T, EVANS SM, KORBO L, MARCUSSEN N, MÜLLER A, NIELSEN K, NYENGAARD JR, PAKKENBERG B, SÖRENSEN FB, VESTERBY A, WEST MJ. The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. APMIS 96: 857–881 (1988a).
- GUNDERSEN HJ, BENDTSEN T, KORBO L, MARCUSSEN N, MÜLLER A, NIELSEN K, NYENGAARD JR, PAKKENBERG B, SÖRENSEN FB, VESTERBY A &

WEST MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS 96**, 379–394. (1988b)

- HAM J, BABIJ C, WHITFIELD J, PFARr CM, LALLEMAND D, YANIV M, RUBIN LL A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. **Neuron** 14:927–939 (1995).
- HAMBURGER V, YIP JW Reduction of experimentally induced neuronal death in spinal ganglia of the chick embryo by nerve growth factor. J Neuroscience 4:767–774. (1984).
- HART AM, BRANNSTROM T, WIBERG M, TERENGHI G. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination. **Exptl.Brain Res** 142-3: 308–318. (2002).
- HUETHER G, POEGGELER B, REIMER A, GEORGE A. Effect of triptophan administration on circulationg melatonin levels in chicks and rats: Evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. Life Sci., 51, 945-953. (1992).
- JAIN RK, THIPPESWAMY T, MORRIS R. Nitric oxide synthase induction in dorsal root ganglion neurones following peripheral nerve section occurs selectively in calcitonin gene-related peptide containing neurones. Eur. J. Neurosci. 12: 433. (2000).
- JOHNSON F, GIULIVI C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. Mol Aspects Med. (2005) 26: 340-52.JOHNSON Jr EM, RICH KM, YIP HK. The role of NGF in sensory neurons *in vitro*. Trends Neurosci; 9:33–37. (1986).
- JOO WS, JIN BK, PARK CW, MAENG SH, KIM YS, Melatonin increases striatal dopaminergic function in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuroreport.*, 9(18): 4123-4126. (1998).

- KERR, JFR. Shrinkage Necrosis: a distinct mode of cellular death. J. Pathology, , 105:13-20. (1971).
- KERR JFR, WYLLIE Ah, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 26:239–257. (1972).
- KIM YS, JOO WS, JIN BK, CHO YH, BAIK HH, PARK CW, Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. *Neuroreport.*, 9 (10),2387-2390. (1998).
- KNYIHÄR E, CSILLIK B, Effect of peripheral axotomy on the fine structure and histochemistry of the Rolando substance: degenerative atrophy of central processes of pseudounipolar cells. **Exp. Brain Res**.26, 73-87. (1976).
- LEVI-MONTALCINI R. The nerve growth factor: Thirty-five years later, EMBO J. 6, 1145-1154 (1987).
- LAWSON, SN. (1992). Morphological and biochemical cell types of sensory neurons.
 Sensory Neurons: Diversity, Development, and Plasticity. S.A. Scott, Ed.: 27– 59.Oxford University Press, Oxford (1992).
- LIPTON SA, NICOTERA P. Calcium, free radicals and exocitins in neuoronal apoptosis. Cell Calcium 23 (2): 165-71. (1998).
- LINDSTEN T, ZONG WX, THOMPSON CB. Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. **The Neuroscientist.** 11(1): 10-6, (2005).
- LOWRIE MB, LAWSON SJ. Cell death of spinal interneurones. **Prog. Neurobiol.** 61: 543-555 (2000).
- LOWRIE MB, VRBOVÁ G, Dependence of postnatal motoneurones on their targets: review and hypothesis. **TINS**, 15(03): 80 84. (1992).

- MARIOTTI R, PENG ZC, KRISTENSSON K, BENTIVOGLIO M. Age dependence induction of nitric oxide synthase activity in facial motonuerons after axotomy. Exp. Neurology 145: 361-70. (1997).
- MENÉNDEZ-PELÁEZ A. Melatonin and other indoles in the rodent Harderian gland:
 Regulation and physiological significance. Advances in Pineal Research,
 R.J.Reiter, A. Lukaszyk, eds. Jonh Libbey, London, pp. 75-80. (1990).
- OLIVEIRA AL, RISLING M, DECKNER M, LINDHOLM T, LANGONE F, CULLHEIM S. Neonatal sciatic nerve transaction induces TUNEL labeling of neurons in the rat spinal cord and DRG. **Neuro Report** 8:2637-40. (1997).
- OLIVEIRA AL, RISLING M, NEGRO A, LANGONE F, CULLHEIM S. Apoptosis of spinal interneurones induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. J. Compl. Neurol. 447: 381-93, (2002).
- OPPENHEIM RW. Naturally occurring cell death during neurodevelopment. Trends Neuroscience; 8:487–493. (1985).
- OPPENHEIM RW, Cell death during development of the nervous system, Ann. Reviews of Neuros., 14, 453-501, (1991).
- OPPENHEIM RW, PREVETTE D, HAVERKAMP LJ, HOUENOU L, YIN QW, 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).
- PANG, S.F., ALLEN, A.E., Extrapineal melatonin in the retina: Its regulation and physiological function. Pineal Research Reviews. R.J.Reiter, ed. Alan Liss, New York. pp. 137-145, (1986).

- POZO D, REITER RJ, CALVO JP, GUERRERO JM, Physiological concentrations of melatonin inibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. Life Sci., 55, PL455-PL460. (1994).
- POPKEN GJ, FAREL PB. Reliability and validity of the physical dissector method for estimating neuron numbers. Journal of Neurobiology 31 (2): 166-74. 1996.
- REITER RJ, Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin, **Prog. Neurobiol.** 56, 359-384. (1998).
- REITER RJ, TAN DX, OSUNA C, GIOTTO EJ. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Biomed. Sci.**, 7:444-58. (2000).
- RICH KM, YIP HK, OSBORNE PA, SCHMIDT RE, JOHNSON Jr EM. Role of nerve growth factor in the adult dorsal root ganglia neuron and its response to injury. J Comp Neurol., 230:110-118. (1984).
- RODRIGUEZ C, MAYO JC, SAINZ RM, ANTOLIN I, HERRERA F, MARTIN V, REITTER RJ. Regulation of antioxidant enzymes : a significant role for melatonin. J Pineal Re. 36: 1-9, (2004).
- ROGÉRIO F, TEIXEIRA SA, SOUZA QUEIROZ L; DE NUCCI G; LANGONE F. Expression of isoform of nitric oxide synthase in spinal neurons of neonatal rats after sciatic nerve transection. **Neuroscience letters**,; 307:61-64. (2001).
- ROGÉRIO F, SOUZA QUEIROZ L , TEIXEIRA AS, OLIVEIRA ALR, NUCCI G; LANGONE F. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. **Brain research**; 926: (1-2): 33-41. (2002).
- ROGÉRIO F, TEIXEIRA AS, REZENDE ACS, COFIÑO DE SÁ R, QUEIROZ LS, DE NUCCI G, MUSCARÁ MN, LANGONE F. Superoxide dismutase isoforms 1 and 2

in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transaction and melatonin treatment. **Dev. Brain research**; 154: 217-225. (2005).

- ROGÉRIO F. Ação da melatonina sobre a morte neuronal induzida pela secção do nervo ciático em ratos neonatos. **Tese de Doutorado/UNICAMP.** (2006)
- ROSENFELD J, COOK S, JAMES R. Expression of superoxide dismutase following axotomy. **Exp. Neurology**; 147:37-47. (1997).
- SAVILL J, FADOK V HENSON P, HASLET C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. **Immunology today** 131-36. (1993).
- SCHMALBRUCH H. The number of neurons in dorsal root ganglia L4-L6 of the rat. The Anatomical Record; 219:315-322. (1987).
- SHEN YH, WANG XL, WILCKEN DEL. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. **FEBS Lett** 433: 125-31. (1998).
- SHI TJ, TANDRUP T, BERGMAN E, XU ZQD, ULFHAKE B, HÖKFELT T. Effect of peripheral nerve injury on dorsal root ganglion neurons in the c57 bl/6j mouse: marked changes both in cell numbers and neuropeptide expression. Neuroscience,105-1: 249-263. (2001).
- SHI TJ, HOLMBERG K, XU ZQ. Effect of peripheral nerve injury on cGMP and nitric oxide synthase levels in rat dorsal root ganglia: time course and coexistence. Pain 78: 171–180. (1998).
- SNIDER WD, ELLIOT JL, YAN Q. Axotomy-induced neuronal death during development. Journal of neurobiology 23:1231-1246. (1992).

- STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary articles using the disector. **Journal of Microscopy** 134: 127–136 (1984).
- TANDRUP T, WOOLF CJ, COGGESHALL RE. Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve. The journal of comparative neurology422:172–180 (2000).
- TANDRUP T, Unbiased estimates of number and size of rat dorsal root ganglion cells in studies of structure and cell survival. **Journal of Neurocytology** 33:173–192 (2004).
- TESSLER A, HIMES BT, KRIEGER NR, MURRAY M, GOLDBERGER ME. Sciatic nerve transaction produces death of dorsal root ganglion cells and reversible loss of substance P in spinal cord. **Brain Research** 332: 209-18. (1985).
- THIPPESWAMY T, MCKAY JS, QUINN J, MORRIS R. Either nitric oxide or nerve growth factor is required for dorsal root ganglion neurons to survive during embryonic and neonatal development. Brain Res Dev Brain Res. 8;154 (2):153-64. (2005).
- THIPPESWAMY T, MORRIS R. Evidence that nitric oxide induced synthesis of cGMP occurs in a paracrine but not autocrine fashion and that the site of its release can be regulated: studies in dorsal root ganglia *in vivo* and *in vitro*. **Nitric Oxide 5**(2): 1000-1006. (2001).
- THIPPESWAMY T, MORRIS R. Evidence for developmental changes in the role of nitric oxide (NO) in dorsal root ganglion (DRG) neurones in the rat. **J. Physiol. 509P:** 82P–183P. (1998).
- TONG JX, EICHLER ME, RICH KM. Intracellular calcium levels influence apoptosis in mature sensory neurons after trophic factor deprivation. Exp Neurol 138:45–52. (1996).

- TONG JX, VOGELBAUM MA, DRYZMALA R, RICH KM. Radiationinduced apoptosis in post-mitotic DRG neurons. J Neurocytol, 26:771–777. (1997).
- VOGELBAUM M, TONG JX, RICH KM. Developmental Regulation of Apoptosis in Dorsal Root Ganglion Neurons. The Journal of Neuroscience, November 1, 18(21):8928–8935. (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).
- WELLER M, SCHULZ JB, WULLNER U, LOSCHMANN PA, KLOCKGETHER T, DICHGANS J. Developmental and genetic regulation of programmed neuronal death. Journal of neuronal transmission. 50: 115-23. (1997).
- WHITESIDE G, DOYLE CA, HUNT SP, MUNGLANI R. Differential time course of neuronal and glial apoptosis in neonatal rat dorsal root ganglia after sciatic nerve axotomy. Eur. Journal of Neurosc. 10: 3400-08. (1998).
- WU W, LI L. Inhibition of nitric oxide synthase reduces motoneuron death due to spinal root avulsion. **Neurosci. Lett** 153: 121-24. (1993).
- WU Y, LI Y, LIU H, 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).
- WYLLIE, AH. Cell death: A new classification separating apoptosis from necrosis. CellDeath in Biology and Pathology. P9-34. London: Chapman & HA11. (1981).
- WYLLIE AH, MORRIS RG, SMITH AL, DUNLOP D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. Journal of Pathology 142: 76-77. (1984).

- YAMAMOTO HA, YANG HW. Melatonin attenuates L-cyanide-induced seizures and lipid peroxidation in the brain of mice. J. Pineal Res. 21, 108-113. (1996).
- YAO R, COOPER GM Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. **Science** 267:2003–06. (1995).
- YELESWARAM K, McLAUGHLIN LG, KNIPE JO, SCHABDACH D, Pharmacokinestics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *J. Pineal Res.*, 22, 45-51. (1997).
- YICK LW, WU W, SO KF WONG SY. Time course of NOS expression and neuronal death in Clarke's nucleus following traumatic injury in adult rat spinal cord. Neuroscience Lett. 155-58. (1998).
- YGGE, J. Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. **Brain Res**., 478, 193-195. (1989).
- YU A, CHELYSHEV B, RAGINOV IS. Post-traumatic survival of spinal ganglion neurons during stimulation of nerve regeneration. Byull. Éksperim. Biology 134-6: 597–599.
 (2002).
- ZHANG, X., V. VERGE, H.Z. WIESENFELD. Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. J. Compar. Neurol. 335: 563–575. (1993).