

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE DA
ACETILCOLINESTERASE APÓS A SECÇÃO DO NERVO CIÁTICO EM
RATOS E RÃS**

Adarly kroth

**Porto Alegre-RS
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE DA
ACETILCOLINESTERASE APÓS A SECÇÃO DO NERVO CIÁTICO EM
RATOS E RÃS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em ciências Biológicas—Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como Requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas:Fisiologia.

Adarly Kroth

**Orientadora: Profa Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro
Co-orientadora: Profa. Dra. Wania Aparecida Partata**

**Porto Alegre-RS
2009**

*“Aqueles que esperam no Senhor,
renovam as suas forças,
voam alto como águias,
correm e não ficam exaustos,
andam e não se cansam”. Is. 40:31*

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais que acreditarem no meu esforço, e
sempre estiveram perto apesar de toda distância.*

Ao meu irmão Alexsandro (in memorium).

Amo vocês Obrigada....

Agradecimentos

Sempre é preciso saber quando uma etapa chega ao final. Se insistirmos em permanecer nela mais do que o tempo necessário, perdemos a alegria e o sentido das outras etapas que precisamos viver. Encerrando ciclos, fechando portas, terminando capítulos - não importa o nome que damos, importa é deixar no passado os momentos da vida que já se acabaram.

Brahma Kumaris. In “Tempo de Germinar”

Agradeço, a Deus que nos momentos de maior aflição nunca me faltou...

Aos meus pais que em todos os momentos de dúvida, alegrias e tristezas sempre me apoiaram e incentivaram com todo o seu amor e dedicação, aos quais devo toda minha dedicação e zelo...

À minha orientadora, Maria Flávia Marques Ribeiro, pela confiança, orientação, paciência, dedicação, incentivo e amizade. Todo o meu agradecimento por todos os momentos que esteve ao meu lado, passando seu conhecimento muito além da teoria...

Minha co-orientadora Wania Partata que sempre esteve presente durante toda esta fase de minha vida, agradeço pela sua paciência, dedicação, ensinamento e principalmente pela amizade...

À profa. Adriane Belló Klein, pela oportunidade de que um sonho se tornasse realidade ...

Ao Amigo e prof. Jovani Steffani, um dos maiores incentivadores para que este momento fosse conquistado, e por me introduzir neste mundo fabuloso da fisiologia.

À minha querida amiga Susie muito mais que uma colega uma irmã, que sempre esteve ao meu lado. Obrigada pela Amizade...

Às colegas Daiane Janner, pela paciência e incentivo durante todo o período experimental, Maria Helena Jacob, pela amiga e incentivadora. As duas o meu agradecimento pelo apoio em todos esses anos que estivemos juntas.

Às colegas Carolina Kolberg, Andréa Horst, Graziane Antunes, Fabiana Rigon que estiveram sempre presentes nos momentos de alegria e aflição, A cada uma meu agradecimento pela amizade, carinho e compreensão...

A todos os colegas do departamento, pelos momentos que compartilhamos durante esta etapa de minha vida...

Ao laboratório de Neuroproteção e Doença Metabólica da Prof: Dra Angela Wyse, a todos o meu profundo agradecimento, pelo colaboração para que este trabalho fosse realizado.....

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado em todos os momentos de desespero e de alegrias, apoiando, auxiliando, e principalmente se revelando grandes amigos...

Aos alunos de iniciação científica que tem um papel importante para que este trabalho fosse realizado...

Ao programa de pós-graduação em ciências biológicas: fisiologia...

À Capes, pela bolsa concedida, muito obrigada...

A Mel, minha companheira e amiga...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
INTRODUÇÃO.....	1
1. Lesão nervosa periférica.....	2
2. Acetilcolinesterase.....	6
OBJETIVOS.....	13
1. Objetivos específicos	14
MATERIAIS E MÉTODOS	15
1. Animais: Procedência e manutenção.....	16
2. Desnervação Periférica.....	17
3. Grupos experimentais.....	17
4. Obtenção dos tecidos dos animais.....	18
5. Determinação Bioquímica da Atividade da Colinesterase.....	18
6. Dosagem de proteínas.....	19
7. Homogeneização dos tecidos para Western Blot	19
8. Técnica de Western Blot.....	20
9. Análise Estatística.....	22
RESULTADOS.....	24
1. Efeito do tempo de desnervação na atividade e expressão da acetilcolinesterase em rãs e rato.....	25
2. Efeito da desnervação na atividade e na expressão da acetilcolinesterase na medula de rãs e ratos.....	27
3. Efeito da desnervação na atividade e na expressão da acetilcolinesterase nos músculos esqueléticos tibial posticus, de rã, e sóleo de rato.....	29
4. Efeito da desnervação na atividade e na expressão da acetilcolinesterase no músculo esquelético gastrocnêmio de rã e rato.....	31
5. Diferenças entre as espécies na atividade e expressão da acetilcolinesterase na medula lombossacral de rã e rato.....	33
6. Diferenças entre os tipos de músculos esqueléticos de rã e rato.....	35
DISCUSSÃO.....	38
CONCLUSÃO.....	46
PERSPECTIVAs.....	48
REFERÊNCIA BIBLIOGRAFIA.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Atividade (A) e expressão (B) da enzima acetilcolinesterase (AChE) em medula espinal lombossacral de rã e rato submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático (desnervado) ou a manipulação deste nervo sem a sua seção (<i>Sham</i>).....	28
Figura 02	Atividade (A) e expressão (B) da enzima acetilcolinesterase (AChE) em músculo tibial posticus, de rã, e sóleo, de rato, submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático (desnervado) ou a manipulação deste nervo sem a sua seção (<i>Sham</i>).....	30
Figura 03	Atividade (A) e expressão (B) da enzima acetilcolinesterase (AChE) em músculo gastrocnêmio de rã e rato submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático (desnervado) ou a manipulação deste nervo sem a sua seção (<i>Sham</i>).....	32
Figura 04	Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em medula espinal lombossacral de rã e rato submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático (D) ou a manipulação deste nervo sem a sua seção (S).....	34
Figura 05	Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em músculo tibial posticus, de rã, e sóleo, de rato, submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático (D) ou a manipulação deste nervo sem a sua seção (S).....	36
Figura 06	Atividade (A) e expressão (B) da enzima acetilcolinesterase (AChE) em músculos esqueléticos com predomínio de fibras do tipo lenta (FL) e rápida (FR) de rã e ratos.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividade da acetilcolinesterase em medula espinal e músculos sóleo, gastrocnêmio e tibial posticus de ratos e rãs.....	25
Tabela 2	Expressão da acetilcolinesterase em medula espinal e músculos sóleo, gastrocnêmio e tibial posticus de ratos e rãs.....	26

RESUMO

Em mamíferos, a secção de nervo periférico ocasiona alterações na junção neuromuscular, a qual se caracteriza por redução na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) dessa região. Em pintos neonatos, esta condição resulta em diminuição na expressão desta enzima na medula espinal. Todavia, ainda é desconhecido o efeito da lesão axonal sobre a atividade e/ou expressão da AChE na medula espinal de mamíferos, bem como os efeitos desta lesão na medula e junção neuromuscular de anfíbios, os primeiros vertebrados terrestres. Com intuito de fornecer uma análise comparativa sobre a atividade e expressão da AChE após secção do nervo ciático, este trabalho teve como objetivo determinar, em medula espinal lombossacral e em músculos gastrocnêmio e tibial posticus de rã, e gastrocnêmio e sóleo de rato, se há diferença interespecífica na atividade e expressão da AChE nestes tecidos. Além disso, verificar se o tipo de fibra muscular e o tempo de desnervação influenciam estes parâmetros.

Para isso, foram utilizados rãs *Rana catesbeiana* e ratos *Wistar*, adultos, machos, divididos em dois grupos: animais desnervados (nervo ciático seccionado) e *sham* (nervo ciático isolado, mas não seccionado). Três ou dez dias após este procedimento, os animais foram mortos para a obtenção da medula espinal lombossacral e dos músculos gastrocnêmio e sóleo de rato e gastrocnêmio e tibial posticus de rã. Após, os tecidos foram homogeneizados, centrifugados e as proteínas quantificadas. A atividade da AChE foi avaliada pelo método de Ellman e cols. (1961), modificado por Lassiter e cols. (2003), e a expressão da proteína AChE foi determinada pela técnica de Western blot.

A secção do nervo ciático em rãs e ratos aumentou a atividade da AChE, porém não alterou sua expressão na medula espinal lombossacral destes animais. Na comparação entre as duas espécies, as rãs mostraram o dobro da atividade neste tecido antes e após a desnervação em relação aos ratos. A secção nervosa provocou ainda diminuição na atividade da AChE no músculo sóleo de rato, enquanto que no músculo tibial posticus de rã esta atividade não foi alterada, embora ambos sejam músculos compostos por fibras do tipo lentas. Em relação à expressão da AChE nos músculos lentos, esta não foi alterada pelo procedimento experimental em ambas as espécies. Quando comparamos a atividade da AChE nos músculos lentos de rãs e ratos, o músculo sóleo apresentou maior atividade que o músculo tibial posticus, antes e após a desnervação. No músculo gastrocnêmio de rã e rato, tanto na atividade como na expressão da AChE, não houve diferença significativa após a lesão axonal periférica, nem entre as espécies.

Conclui-se, a partir destes resultados que há uma importante diferença interespecífica na atividade da AChE após a secção do nervo ciático, tanto na medula espinal como no músculo esquelético de fibra lenta, mas estes parâmetros não foram influenciados pelo tempo de desnervação. Portanto, uma abordagem funcional mais detalhada é necessária para melhor entendimento e compreensão destas diferenças.

INTRODUÇÃO

1- Lesão nervosa periférica.

A dor tem sido tema de grande interesse para a humanidade desde o início dos tempos, sendo alvo de enormes esforços para entendê-la e controlá-la. Atualmente ela representa um dos principais problemas de saúde, tornando muitos indivíduos incapacitados para o trabalho devido à dor crônica. Deste modo, a dor torna-se também um problema no âmbito econômico (LOESER & BONICA, 2001).

Quando se estuda o tema sensibilidade dolorosa é preciso inicialmente diferenciar dor e nocicepção. A dor trata-se de uma experiência sensorial desagradável, tem caráter subjetivo e, portanto, pode ser relacionada somente aos seres humanos que possuem capacidade de verbalizá-la. A nocicepção, por sua vez, é o mecanismo neural pelo qual estímulos nocivos, de origem térmica, mecânica e/ou química, são transmitidos para o Sistema Nervoso Central (SNC). Portanto, nos trabalhos referentes a esse tema, que utilizam modelos animais, pode-se afirmar que o foco do estudo é a nocicepção (WIESELER-FRANK *et al.*, 2004; LOESER & BONICA, 2001; MILLAN, 1999).

Para a compreensão dos mecanismos envolvidos na codificação e na transmissão nociceptiva são empregadas distintas abordagens experimentais, dentre elas a secção de nervo periférico, a qual constitui um modelo de dor neuropática. Em humanos, a lesão neuropática ou injúria axonal ocorre por diferentes causas, como: acidentes automobilísticos, fraturas, doenças degenerativas e diabetes *mellitus*. A lesão do nervo periférico não induz somente à fraqueza muscular e perda da sensibilidade, mas também leva a respostas adaptativas e à dor neuropática (STOLL, 1999).

As respostas comportamentais que podem ser desencadeadas após a axotomia de nervos periféricos são hiperalgesia (sensibilidade aumentada a estímulos nocivos), alodinia (resposta dolorosa a estímulos normalmente não nocivos), parestesia (diminuição da sensibilidade), disestesia (perda da sensibilidade) e dor espontânea (MILIAN, 1999).

A lesão neuropática é uma lesão mecânica induzida sobre o nervo periférico. No segmento distal à lesão ocorre a interrupção da condução elétrica nervosa, seguida de degeneração Walleriana. No segmento proximal à lesão ocorre formação de cones de crescimento, os quais são formados pela indução dos fatores de crescimento produzidos por diversos tipos celulares, dentre os quais as células de Schwann. A função destas regiões especializadas juntamente com as células de Schwann é de orientar o sentido da regeneração da fibra (SCHRÖDER, 1975; NEITO e VERDÚ, 1998; ZIMMERMANN, 2001). A regeneração nervosa funcional não requer somente o crescimento e alongamento axonal, mas também a síntese mielínica (AKASSOGLAU K, 2002).

Existem diversos modelos experimentais para o estudo das modificações morfofisiológicas decorrentes de uma lesão de nervo periférico. Dentre estes podem ser citadas as lesões nervosas por esmagamento (*crush*) e a secção total do nervo (axotomia). Está demonstrado que a secção de nervo periférico resulta em alterações neuroquímicas e neuroanatômicas importantes em neurônios sensoriais primários, bem como em seus territórios de projeção central (RYDH-RINDER *et al.*, 1996; MA & BISBY, 1998; ZIMMERMANN, 2001). Essas mudanças podem estar envolvidas nos estados anormais de dor subseqüentes à lesão nervosa (MA & BISBY, 1998). A desnervação também

ocasiona mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nos tecidos periféricos inervados por estas fibras, como por exemplo, o tecido muscular esquelético (STOLL, 1999; MISULIS, 1985).

Nestes estudos os mamíferos ainda são os modelos mais empregados. Embora não possuam capacidade de comunicação verbal quando em contato com os estímulos nociceptivos, esses animais exibem respostas motoras similares às dos humanos. Tais respostas permitem inferir a existência de dor (KAVALIERS, 1988; DUBNER, 1983). Os animais não-mamíferos também apresentam respostas comportamentais e fisiológicas aos estímulos nociceptivos (KAVALIERS, 1988). Dessa forma, esses modelos também podem ser empregados em estudos que buscam uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na lesão nervosa periférica. O conhecimento obtido em vertebrados não-mamíferos permitirá esclarecer aspectos evolutivos dessa condição (KAVALIERS, 1988).

Os anfíbios são utilizados em uma grande variedade de estudos científicos. Um aspecto importante para a escolha desses animais como modelos experimentais é a sua grande tolerância às diversas condições ambientais (ROCHA & BRANCO, 1998). Outro ponto que motiva o uso de anfíbios em abordagens experimentais é a similaridade de funcionamento de seus sistemas corporais, inclusive o nervoso, com aqueles dos animais superiores (GUEDES *et al.*, 2004; PARTATA *et al.*, 2002; ADDLI *et al.*, 1988).

Uma espécie de anfíbio muito empregada como modelo experimental é a rã *Rana catesbeiana*, conhecida como rã touro. Este anfíbio aquático, resistente às baixas temperaturas, é típico da região norte dos Estados Unidos,

mas se adaptou às condições climáticas do Brasil, sendo o espécime encontrado em criadouros locais (STARER *et al.*, 1984).

Os axônios dos nervos destes animais, similar ao que é observado em mamíferos, possuem ou não bainha de mielina. De acordo com sua morfologia, velocidade de condução e latência de resposta, as fibras aferentes destes nervos foram classificadas em três tipos: 1) as chamadas fibras do tipo A, que possuem uma espessa bainha de mielina; 2) as chamadas fibras do tipo B, que são envolvidas por uma bainha de mielina pouco espessa; e 3) as chamadas fibras do tipo C, que não possuem envoltório de mielina (STEVENS, 2004). Com relação à nocicepção, os estudos mostraram que os estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos são transmitidos para o sistema nervoso central pelas fibras do tipo B e C (STEVENS, 2004), o que é semelhante ao observado em mamíferos, já que estas fibras de anfíbios assemelham-se, quanto às suas características morfológicas e fisiológicas, às fibras do tipo A delta e C dos mamíferos (GARRY *et al.*, 2004; HAMAMOTO & SIMONE, 2003). Assim, as rãs também constituem bons modelos experimentais para o estudo dos fenômenos morfofisiológicos decorrentes da secção de nervo periférico.

O laboratório de Neurobiologia Comparada desta Universidade vem já há algum tempo empregando como modelo experimental rãs da espécie *Rana catesbeiana*. Nos estudos deste grupo de pesquisa, a secção do nervo ciático provocou alterações peculiares no SNC desta rã, muitas das quais foram similares àquelas observadas em mamíferos (GUEDES, 2002; PARTATA *et al.*, 2002).

Há evidências de que uma das conseqüências da secção do nervo periférico é uma alteração na junção neuromuscular, a qual se caracteriza por

uma redução da atividade da enzima acetilcolinesterase dessa região (LØMO, 1985; TRINKAUS, 2008). Estes estudos foram realizados utilizando principalmente espécies de mamíferos como modelo experimental.

2- Acetilcolinesterase

A região especializada entre a terminação nervosa e a fibra muscular denominada junção neuromuscular (JN) é composta pela membrana pré-sináptica, fenda sináptica e membrana pós-sináptica. Após a chegada do potencial de ação na membrana pré-sináptica, a acetilcolina (ACh) é liberada ligando-se ao receptor colinérgico na membrana pós-sináptica. Esta ligação gera despolarização da placa motora e o potencial de ação desenvolvido gera a contração da fibra muscular.

A acetilcolina, neurotransmissor do SNC e sistema nervoso periférico (SNP), é sintetizada pelos neurônios colinérgicos pela enzima colina-acetiltransferase (ChAT) a partir da colina e do acetil-CoA, sendo armazenada no terminal nervoso. Na presença de um estímulo elétrico, a ACh é liberada na fenda sináptica por exocitose. No SNP, a ACh é o principal neurotransmissor da junção neuromuscular, e sua ação é rápida, sendo rapidamente desligada de seu receptor para a repolarização da membrana pós-sináptica e início de uma nova transmissão do impulso nervoso (SOREQ, 2001; WRIGHT *et al*, 1993). Portanto, uma rápida eliminação da ACh liberada na fenda sináptica é necessária após cada impulso nervoso. Para isto existe na fenda sináptica a enzima acetilcolinesterase (AChE). Os receptores colinérgicos são divididos em dois tipos: nicotínico e muscarínico. O receptor nicotínico é o principal na

junção neuromuscular. Este receptor é encontrado nos gânglios periféricos e no músculo esquelético (TAYLOR, *et al.*, 1998)

A AChE é uma importante enzima regulatória que controla a transmissão do impulso nervoso colinérgico por meio da hidrólise do neurotransmissor excitatório ACh, tanto nas sinapses colinérgicas do SNC quanto nas neuromusculares (TAYLOR, 1994). Entretanto, o papel biológico da AChE não está limitado à transmissão colinérgica, já que essa proteína foi encontrada em altas concentrações em outros locais. Uma demonstração do papel não-colinérgico dessa proteína é a sua presença em neurônios não-colinérgicos (REISS *et al.*, 1966).

Na junção neuromuscular, a AChE é uma grande glicoproteína (MASSOULIE *et al.*, 1982; BRIMIJOIN, 1983; ROTUNDO, 1987; MASSOULIÉ *et al.*, 1993; CRNE- FINDERLE, N. 2005). Esta enzima é sintetizada a partir de um único gene, e, devido aos cortes alternativos em seu mRNA são produzidos três diferentes isoformas, cada uma com uma porção C-terminal diferente: a sináptica (S), a eritropoiética (E) e a *read through* (R) (SOREQ, 2001). Outra nomenclatura que pode ser utilizada para a denominação das isoformas sináptica e eritropoiética está baseada nas propriedades protéicas desta molécula, sendo a mesma denominada em cauda (T) e hidrofóbica (H), respectivamente. As isoformas AChE-T são também conhecidas como globulares (G) e assimétricas (A), e são identificadas por subscritos, indicando o número da subunidade catalítica (SOREQ, 2001). As isoformas globulares da AChE são classificadas em monômeros (G1), dímeros (G2), e tetrâmeros (G4), e estão associadas à membrana por um domínio hidrofóbico (INESTROSA *et al.*, 1987; MASSOULIÉ *et al.*, 1993; TSIM, *et al.*, 1992). Já as isoformas

assimétricas consistem em um (A4), dois (A8), ou três (A12) tetrâmeros catalíticos, ligados a um elemento colágeno de um terminal específico (MASSOULIÉ *et al*, 1982).

A isoforma assimétrica A₁₂ é predominante na junção neuromuscular (HALL 1973; SKETELJ E BRZIN 1985). Ela possui uma subunidade colágeno específica, denominada colágeno Q (ColQ) (MASSOULIÉ *et al*. 1993; KREJCI *et al*, 1991, 1997; DANGER *et al*. 1999; TRINKAUS *et al*, 2008).

Atualmente, existe grande interesse no meio científico pelo papel não-catalítico dessa proteína. Sabe-se hoje que a AChE também está envolvida em funções não-colinérgicas, como proliferação e adesão celular, neurogênese (GRISARU, 1999), regulação da apoptose (DAY, 2002; YANG *et al*, 2002), participando na formação de apoptosomos (PARK, 2004), osteogênese (LAYER, 1990), hematopoiese (LEV-LEHMEN, 1994), sinaptogênese (LAYER, 1991; ZHANG, 2008), além de processos patológicos associados ao estresse (JIANG, 2007) e degeneração de neurônios colinérgicos (COYLE, 1983). As isoformas da AChE participam seletivamente dos processos envolvidos na promoção e atenuação da apoptose por meio de mudanças na expressão e distribuição das isoformas desta enzima (JIANG, 2007).

A isoforma assimétrica tem tido especial atenção por ter um papel importante na interação entre o nervo e o músculo, estando presente não somente na junção neuromuscular, mas também ao longo de toda a fibra muscular (SKETELJ e BRZIN, 1980; KOENIG e RIEGER, 1981). Porém, é muito mais concentrada nas junções neuromusculares de ratos adultos, de onde desaparecem após desnervação e reaparecem com a reinervação (HALL, 1973; VIGNY *et al*, 1976; COLLINS e YOUNKIN, 1982). A isoforma assimétrica

A₁₂ foi detectada em músculos de humanos adultos (CARSON *et al.*, 1979; LØMO, 1985).

Os músculos esqueléticos são heterogêneos em sua composição de fibras. Eles apresentam diferentes tipos de fibras musculares, as quais podem ser grosseiramente classificadas em fibras do tipo rápida (glicolíticas, brancas ou do tipo II) e lentas (oxidativas, vermelhas ou do tipo I). Músculos compostos predominantemente por fibras do tipo rápidas são chamados músculos rápidos ou do tipo II, enquanto aqueles compostos principalmente por fibras lentas são denominados músculos lentos ou do tipo I. As fibras musculares lentas são ativadas tonicamente por impulsos nervosos de baixa frequência, enquanto as fibras musculares rápidas são estimuladas por impulsos curtos e de alta frequência (HENNIG e LØMO, 1985). Os diferentes padrões de impulsos nervosos determinam diferentes características fenotípicas nas fibras musculares rápidas e lentas (VRBOVA *et al.*, 1992).

Na região extrajuncional, a expressão das isoformas assimétricas é quase suprimida durante o amadurecimento dos músculos rápidos de rato, enquanto nos músculos lentos este desaparecimento é apenas parcial (SKETELJ, 1980; SKETELJ *et al.* 1992). Portanto, as isoformas assimétricas da AChE permanecem presentes nas regiões extrajuncionais de músculos lentos na idade adulta, enquanto sua expressão está restrita às junções neuromusculares de músculos rápidos maduros (LAI *et al.* 1986; SKETELJ *et al.* 1992).

Uma complexa regulação de todas as isoformas da AChE nas junções neuromusculares levanta a questão de se, em diferentes estados fisiológicos, esta enzima sináptica é produzida pelo músculo, pelo nervo, ou por ambos. A

produção da AChE aumenta durante o desenvolvimento do sistema nervoso de aves e mamíferos (BETZ *et al.*, 1980; GRISARU *et al.*, 1999, regulada pelo fator de crescimento neural (NGF) (SOREQ 2001). Sabe-se que as isoformas assimétricas e globulares da AChE são sintetizadas em células musculares de rato e de aves (KOENIG e VIGNY, 1978; DE LA PORTE *et al.*, 1986; ROTUNDO, 1990; VALLETTE e MASSOULIÉ, 1991; TSIM *et al.*, 1992), e também é sintetizada e secretada pelas terminações do nervo motor na junção neuromuscular (TSIM *et al.*, 1992).

Atualmente, a compreensão dos mecanismos responsáveis pela regulação da AChE nos músculos é limitada e vários fatores devem ser considerados. Primeiro, o contato do nervo motor com o músculo tem papel importante na manutenção permanente das instruções para a síntese da AChE na placa motora (KOENIG e VIGNY, 1978; LØMO e SLATER, 1980). Em segundo lugar, a atividade muscular desempenha um papel essencial no controle da AChE. A suspensão da atividade muscular pelo bloqueio da transmissão neuromuscular ou da condução neural diminui a atividade desta enzima (DRACHMAN, 1972; RUBIN *et al.* 1980; BUTLER *et al.*, 1978; CANGIANO *et al.*, 1980). Em terceiro lugar, há fortes indícios de que substâncias liberadas pelas terminações do nervo motor podem contribuir para a regulação da AChE na junção neuromuscular (TSIM *et al.*, 1992).

Os tipos de fibras musculares determinam a atividade da AChE, pois o processo de recuperação da atividade desta enzima é dependente do tipo de fibra que predomina naquele músculo (MISULIS, 1985). As fibras rápidas/glicolíticas apresentam maior atividade da AChE do que as fibras lentas/oxidativas (MISULIS, 1985). MISULIS (1985) realizou um estudo com

ratos desnervados em diferentes tempos e analisou dois músculos, o sóleo, composto predominantemente por fibras do tipo lenta, e o extensor digitório longo (EDL), composto principalmente por fibras do tipo rápida. O estudo mostrou que nas duas primeiras semanas após a desnervação ambos os músculos apresentaram diminuição da atividade da AChE, e após 15 dias de desnervação o músculo sóleo apresentou rápida recuperação da atividade quando comparado ao EDL. Esta recuperação foi de aproximadamente 250% do valor obtido inicialmente, enquanto no EDL foi de apenas 80%.

WAN (1997) analisou a expressão da AChE em medula espinal lombar de pintos neonatos em diferentes tempos após a secção do nervo ciático, comparando os lados ipsilateral e contralateral da medula espinal. Após 4 dias de desnervação, houve uma diminuição de 50% na expressão da AChE no lado ipsilateral à lesão. No entanto, após 10 dias houve recuperação da expressão da AChE, a qual retornou ao valor controle. O lado contralateral não apresentou alteração na expressão desta enzima.

A diminuição da expressão da AChE na medula espinal ipsilateral pode ter resultado do trauma no nervo pré-sináptico ou da falta de influência das células musculares alvo, pois fatores derivados dos músculos participam na regulação da expressão gênica do neurônio motor da junção neuromuscular. No entanto, a recuperação da expressão da AChE no neurônio motor após 10 dias da desnervação indica que outros fatores induzidos pela AChE também podem ser ativados nos neurônios lesionados e estes podem ter contribuído para a expressão desta enzima (WAN, 1997).

Com base nestes conhecimentos fica claro que os estudos até agora foram realizados, em sua maior parte, utilizando mamíferos como modelos

experimentais, limitando o conhecimento dos aspectos evolutivos envolvidos nestes mecanismos. Assim, o presente trabalho empregou rãs para a determinação dos efeitos da secção completa unilateral do nervo ciático sobre a atividade e a expressão da enzima AChE em medula espinal e músculos esqueléticos compostos por fibras rápidas e lentas. Com o intuito de trazer subsídios ao conhecimento dos efeitos desta situação experimental em ratos, estes animais também foram utilizados no presente estudo. O emprego de ratos decorreu do fato de que os estudos da literatura usaram músculos sóleo e extensor digitório longo, sendo ainda desconhecidos os efeitos da secção do nervo ciático sobre o padrão de atividade e expressão da AChE no músculo gastrocnêmio e medula espinal de ratos. Para a determinação dos possíveis efeitos temporais na atividade e expressão desta enzima, os animais foram mortos aos 3 e 10 dias após a secção nervosa periférica.

OBJETIVOS

Com intuito de ampliar o conhecimento, e fornecer uma análise comparativa dos efeitos da secção nervosa periférica sobre a atividade e expressão da AChE, este trabalho teve como objetivo determinar, em medula espinal lombossacral e em músculos gastrocnêmio e tibial posticus de rã, e gastrocnêmio e sóleo de rato, se há diferença interespecífica na atividade e expressão da AChE nestes tecidos após esses animais serem submetidos à secção do nervo ciático. Além disso, foi verificado se o tipo de fibra muscular e o tempo de desnervação influenciam estes parâmetros.

1. Objetivos específicos:

- 1) Determinar a atividade e a expressão da acetilcolinesterase na medula espinal de rã e rato submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático, nos intervalos de 3 e 10 dias após a lesão axonal.
- 2) Determinar a atividade e a expressão da acetilcolinesterase em músculos esqueléticos compostos predominantemente por fibras rápidas, gastrocnêmio de rã e rato, submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático, nos intervalos de 3 e 10 dias após a lesão axonal.
- 3) Determinar a atividade e a expressão da acetilcolinesterase em músculos esqueléticos compostos predominantemente por fibras lentas, tibial posticus de rã e sóleo de rato, em animais submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático, nos intervalos de 3 e 10 dias após a lesão axonal.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Animais: Procedência e manutenção

Foram utilizadas rãs *Rana catesbeiana*, adultas, machos, com peso médio de 200 a 250 g. Estes animais foram obtidos do ranário Ranasul localizado em Imbé-RS. Os animais foram trazidos para o Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, onde permaneceram em tanques especiais, localizados em ambiente aberto, contendo água constantemente renovada e uma porção central de terra. Durante o período de permanência, os animais foram alimentados *ad libitum* com ração apropriada. A limpeza dos tanques foi efetuada diariamente.

No período experimental as rãs permaneceram em aquários no laboratório de Neurobiologia Comparada, ICBS-UFRGS. Estes aquários continham 2,0 cm de água, e a limpeza dos mesmos era efetuada todos os dias. Durante todo o período experimental as rãs foram mantidas em temperatura e fotoperíodo que oscilaram de acordo com a temperatura ambiente.

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, com peso médio de 250g, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Os animais foram separados em grupos de no máximo cinco ratos por caixa, com livre acesso à ração e água. Os animais permaneceram em ambiente controlado, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 7 h às 19 h) e temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ \text{C}$.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo processo número 2007768.

2- Desnervação Periférica

Para o procedimento de desnervação periférica, as rãs foram previamente anestesiadas com prilocaína 3% (DFL), na dose de 0,1 mL/kg, e os ratos com solução de ketamina (80mg/kg, Agner União) e xilazina (2 mg/kg, Vetbrands). Para a visualização do nervo ciático do animal, o membro posterior direito foi fixado em uma superfície rígida mediante emprego de um pedaço de esparadrapo, possibilitando a incisão e dissecação dos tecidos moles.

Após a visualização do nervo, o mesmo foi afastado dos tecidos a sua volta com o intuito de deixá-lo completamente isolado e, em seguida, um fio de sutura de algodão foi colocado abaixo do nervo para segurá-lo. Um segmento de aproximadamente 2 mm foi seccionado do nervo, e a incisão suturada com fio de algodão. O tipo de sutura utilizada foi a de Wolff, a mais indicada nos casos de maior tensão (LAZZERI, 1977). Ao final, as rãs foram colocadas em aquários e os ratos em caixas moradias. Estes animais foram mantidos no laboratório nas condições descritas anteriormente durante todo o período experimental. Os ratos e as rãs dos grupos *sham* foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos anteriormente descritos, porém sem a secção do nervo ciático.

3. Grupos experimentais

As rãs *Rana catesbeiana* e os ratos Wistar foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

Animais *sham* (S): animais onde o nervo ciático foi isolado, mas não seccionado. Os animais foram divididos em subgrupos: *sham* 3 dias - mortos 3

dias após a cirurgia; *sham* 10 dias - mortos 10 dias após a cirurgia, sendo cada grupo composto por 5 animais.

Animais desnervados (D): animais onde o nervo ciático foi isolado, e seccionado. Os animais foram divididos em subgrupos: desnervados 3 dias - mortos 3 dias após a cirurgia; *desnervados* 10 dias - mortos 10 dias após a cirurgia, sendo cada grupo composto por 5 animais.

4. Obtenção dos tecidos dos animais

Ao final dos diferentes períodos experimentais considerados neste estudo, os animais foram mortos por decapitação entre 08 e 10 horas da manhã. A medula espinal lombossacral e os músculos gastrocnêmio e sóleo de rato, e gastrocnêmio e tibial posticus de rã, foram rapidamente retirados e imediatamente congelados em gelo seco para posteriormente serem homogeneizados, de acordo com as técnicas para a determinação da atividade da acetilcolinesterase e avaliação da expressão desta enzima pela técnica de Western Blot.

5. Determinação Bioquímica da Atividade da Achetilcolinesterase.

As amostras foram homogeneizadas, na proporção de 1:10 m/v, com tampão fosfato de potássio na concentração de 150 mM e pH 7,5, o qual continha triton 1% e NaCl 0,5 M. Os homogeneizados foram centrifugados a 1.000 x g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e diluído em tampão de homogeneização na seguinte proporção: músculos gastrocnêmio, sóleo e tibial posticus: 1:2 v/v, medula espinal lombossacral: 1:4 v/v. As amostras foram armazenadas a -80° C para posterior determinação da atividade da

acetilcolinesterase pelo método descrito por Ellman e cols (1961), e modificado por Lassiter e cols (2003), o qual é brevemente descrito a seguir.

Após a quantificação das proteínas, as amostras foram utilizadas para determinação da atividade acetilcolinesterase. O meio de incubação, com volume final de 1 mL, continha tampão fosfato de potássio 150 mM, DTNB 1 mM, pH 7,5. Neste meio foi acrescentado 50 μ L de amostra é feita pré-incubação por 3 min, a 25°C, em banho-maria. Logo após, ocorreu adição de acetiltiocolina na concentração de 0,8 mM, iniciada a reação de hidrólise que foi acompanhada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 412 nm, durante 2 min (30/30 s). As análises foram realizadas em duplicatas. A atividade da acetilcolinesterase foi expressa em μ mol da hidrólise da acetiltiocolina por hora e por miligrama de proteína (μ mol ACSCh/h.mg de proteína).

6. Dosagem de proteínas

Para a dosagem das proteínas dos tecidos usados na determinação bioquímica da atividade da acetilcolinesterase, utilizou-se o método descrito por Lowry e colaboradores (1951). Para a técnica de Western Blot, a dosagem de proteínas foi realizada pelo emprego da técnica descrita por Bradford (1976).

7. Homogeneização dos tecidos para Western Blot

A medula espinal lombossacral e os músculos gastrocnêmio e sóleo de rato, e gastrocnêmio e tibial posticus de rã foram homogeneizados em tampão de lise (NaCl 150 mM; Tris 20 mM; EDTA 5mM, Glicerol 10%, NP40

1%) e inibidor de proteases PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonila) na concentração de 1mM em isopropanol.

Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 min a 3.000 x g a 4° C (Sorval RC 5B-rotor, SS-34, Du Pont Instruments, EUA) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -70° C para posterior análise..

8. Técnica de Western Blot

Após a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), foi utilizado o sistema *mini-protein* (Bio-Rad) para a separação das proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE a 10% (gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). As amostras foram preparadas com tampão de carga (Tris 65 mM, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,01%) na concentração de 80µg de proteína /50µL de amostra. Para a identificação do peso molecular das proteínas de interesse, utilizou-se marcador de peso molecular RPN800 (Amersham Pharmacia). Antes de serem submetidas à eletroforese a 120 v por 3 horas, as amostras foram aquecidas a 100° C durante 2 minutos em banho seco (modelo 330-3D, Nova Ética). A eletroforese foi efetuada na presença de tampão de corrida, contendo glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH 8,3. A separação das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra, e pelo marcador de peso molecular. A seguir, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de eletrotransferência em contato com a membrana de nitrocelulose (Hybond, Amersham) e coberto com tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina

192mM e metanol a 20%, pH 8,3). A transferência foi efetuada a 250 mA por aproximadamente 60 minutos.

Para o bloqueio das ligações a proteínas inespecíficas, as membranas foram incubadas com albumina bovina (Sigma) a 1% em TTBS (Tris 20 mM, NaCl 140 mM e Tween 20 a 0,05%) por 60 minutos. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas a 4° C, por no mínimo 12 horas, sob agitação constante, com o anticorpo primário policlonal anti-acetilcolinesterase (Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:250 em TTBS, contendo BSA 2,5% e azida sódica a 1%.

A seguir, as membranas foram lavadas em TTBS (três vezes de 10 minutos cada lavagem) e incubadas com o segundo anticorpo. Este anticorpo era do tipo peroxidado desenvolvido em coelho e usado na diluição de 1:5000 em TTBS. Esta incubação teve duração de duas horas e ocorreu sob agitação constante em temperatura ambiente. Antes de proceder à revelação por quimiluminescência, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS (Tris 20 mM e NaCl 140 mM).

A reação de quimiluminescência ocorreu por meio de sistema de detecção baseado em substratos luminescentes (luminol e ácido p-cumárico), com exposição das membranas a filme radiográfico Hyperfilm (Amersham) por aproximadamente 1 minuto, seguido das incubações nas soluções de revelação: revelador, ácido acético (10%) e fixador (1 minuto cada incubação). Todos os procedimentos de revelação foram realizados em câmara escura.

A autorradiografia gerada foi analisada por meio de analisador de imagem (Image Master VDS, Pharmacia Biotech). A densitometria obtida para as bandas da acetilcolinesterase foi corrigida por uma banda inespecífica

obtida pela coloração com *Red Ponceau S*, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias.

9. Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão da média. Os grupos usados na medida de atividade da acetilcolinesterase tinham 5 animais. Na expressão o número de animais variou de 4 a 5. O cálculo do tamanho da amostra foi baseado nos resultados de um estudo (VUKOVA, 2005), utilizando o programa PEPI 3.0 que indicou 5 animais em cada grupo experimental considerando-se a probabilidade de erro beta de 0,05 (poder estatístico 90%) e nível de significância (erro alfa) de 0,05.

Os resultados da atividade e da expressão da acetilcolinesterase, na medula espinal lombossacral e nos músculos gastrocnêmio e tibial posticus de rã (*Rana catesbeiana*) e gastrocnêmio e sóleo de rato (Wistar) que sofreram secção do nervo ciático 3 e 10 dias, foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) de duas vias. Devido ao fato dos diferentes tempos de desnervação não alterar a atividade e a expressão da acetilcolinesterase, os grupos de três e dez dias foram unidos para a análise dos dados. Quando feito isto, o número de animais em cada grupo foi de 9 a 10, e os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via. O nível de significância (α) adotado foi 0,05. Foi utilizado o programa software SigmaStat 2.0, e o teste *post hoc* de comparações múltiplas de Student-Newmann-Keuls (SNK) sempre que apropriado.

RESULTADOS

1.0 Efeito do tempo de desnervação na atividade e expressão da acetilcolinesterase em rãs e rato.

Na medula espinal lombossacral de rã e rato, os diferentes tempos de desnervação não alteraram a atividade (Tabela 01) e a expressão (Tabela 02) da acetilcolinesterase. Este mesmo resultado foi encontrado na atividade e expressão dessa enzima localizada nos músculos sóleo, gastrocnêmio e tibial posticus dessas espécies de animais, demonstrando que o tempo de desnervação não influenciou esses parâmetros da acetilcolinesterase nos tecidos analisados (Tabelas 01 e 02).

Tabela 01: Atividade da acetilcolinesterase em medula espinal e músculos sóleo, gastrocnêmio e tibial posticus de ratos e rãs.

ATIVIDADE DA AChE ($\mu\text{mol ACSCh/h.mg}$ de proteína)

	3 dias		10 dias		(P < 0,05)
	<i>Sham</i>	Desnervado	<i>Sham</i>	Desnervado	
Rã					
Medula	6,4 \pm 0,66	6,62 \pm 0,56	5,94 \pm 0,20	6,82 \pm 0,19	N S
m. tibial posticus	0,26 \pm 0,03	0,22 \pm 0,03	0,22 \pm 0,04	0,20 \pm 0,03	N S
m. gastrocnêmio	0,30 \pm 0,04	0,30 \pm 0,04	0,25 \pm 0,02	0,23 \pm 0,19	N S
Rato					
Medula	3,51 \pm 0,52	4,05 \pm 0,33	3,23 \pm 0,41	3,62 \pm 0,67	N S
m. sóleo	0,52 \pm 0,20	0,46 \pm 0,16	0,49 \pm 0,04	0,38 \pm 0,06	N S
m. gastrocnêmio	0,21 \pm 0,04	0,24 \pm 0,03	0,27 \pm 0,04	0,25 \pm 0,01	N S

Os animais submetidos à secção completa unilateral do nervo ciático (Desnervado) ou à manipulação deste nervo sem sua secção (*Sham*) 3 e 10 dias após esta intervenção cirúrgica. N= 5 por grupo. Valores representam a média \pm Desvio Padrão da média. $p < 0,05$, ANOVA de duas vias. N S: não significativo.

Tabela 02: Expressão da acetilcolinesterase em medula espinal e músculos sóleo, gastrocnêmio e tibial posticus de ratos e rãs.

EXPRESSÃO AChE/Ponceau (unidades arbitrárias)

	3 dias		10 dias		(P < 0,05)
	<i>Sham</i>	<i>Desnervado</i>	<i>Sham</i>	<i>Desnervado</i>	
Rã					
Medula	116,93 ± 32,87	105,40 ± 15,84	98,81 ± 13,99	111,40 ± 26,11	N S
m. tibial posticus	105,77 ± 13,73	90,57 ± 2,91	104,41 ± 10,15	94,71 ± 6,01	N S
m. gastrocnêmio	130,3 ± 41,07	90,78 ± 18,65	95,63 ± 19,09	103,61 ± 17,47	N S
Rato					
Medula	115,03 ± 15,24	107,71 ± 20,12	97,47 ± 9,28	105,51 ± 14,04	N S
m. sóleo	91,04 ± 25,74	115,27 ± 16,43	105,69 ± 18,94	89,75 ± 12,33	N S
m. gastrocnêmio	133,2 ± 33,43	95,23 ± 20,62	71,66 ± 10,83	81,12 ± 14,83	N S

Os animais submetidos à secção completa unilateral do nervo ciático (*Desnervado*) ou à manipulação deste nervo sem sua secção (*Sham*) 3 e 10 dias após esta intervenção cirúrgica. N= 5 por grupo. Valores representam a média ± Desvio Padrão da média. p<0,05, ANOVA de duas vias. N S: não significativo.

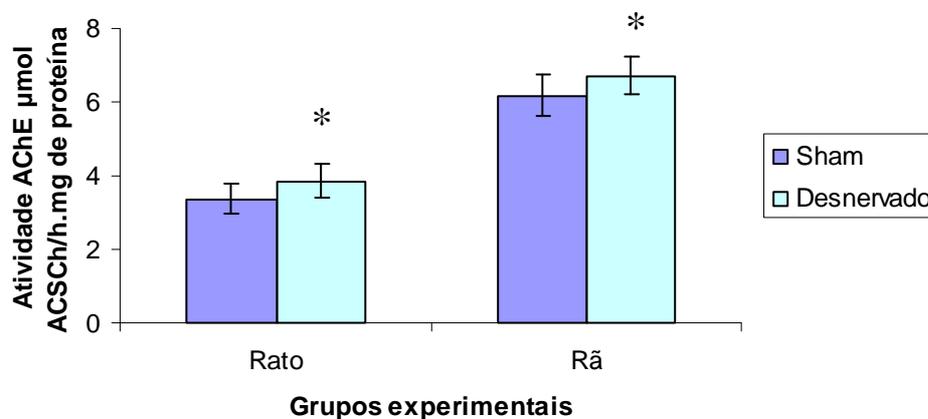
2.0 Efeito da desnervação na atividade e na expressão da acetilcolinesterase na medula de rãs e ratos.

A secção unilateral completa do nervo ciático de rãs ocasionou aumento estatisticamente significativo da atividade da acetilcolinesterase na medula espinal lombossacral destes animais (Fig 01A). Este mesmo efeito ocorreu na medula espinal lombossacral de ratos submetidos a esta mesma condição experimental (Fig 01A) ($F_{3,36}=114,919$, $p < 0,001$).

Diferentemente, a expressão da AChE na medula espinal lombossacral de rã e rato não foi alterada significativamente após o mesmo procedimento experimental (Fig 01B) ($F_{3,28}=0,0374$, $p=0,990$).

A)

Atividade da AChE na medula espinal de rato e ra



B)

Expressão da AchE na medula espinal de rato e rã

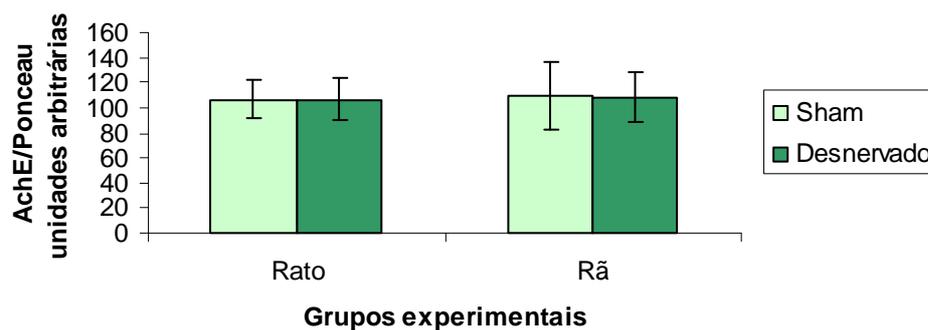


Fig 01. Atividade (A) e expressão (B) da enzima acetilcolinesterase (AChE) em medula espinal lombossacral de rã e rato submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático (desnervado) ou à manipulação deste nervo sem a sua secção (*Sham*). Os histogramas representam a média \pm Desvio Padrão da média, e o número entre parêntese correspondem ao número de animais. * representa diferença significativa quando comparados os grupos desnervado e *sham* de uma mesma espécie ($p < 0,001$, ANOVA de uma via). N= 10 por grupo (atividade da AchE), N=4 a 9 por grupo (expressão da AchE).

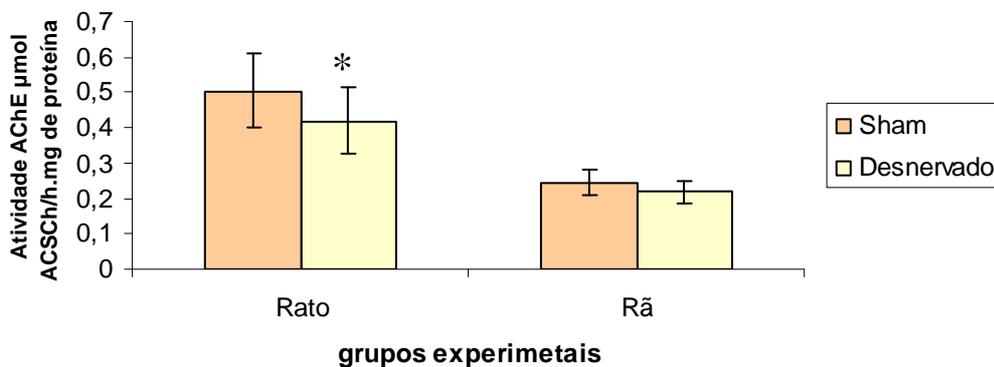
3.0 Efeito da desnervação na atividade e na expressão da acetilcolinesterase nos músculos esqueléticos tibial posticus de rã, e sóleo de rato.

Em rãs, a secção unilateral completa do nervo ciático não provocou modificações significativas na atividade da AChE no músculo tibial posticus (Fig 02A). Em ratos, por sua vez, esta condição experimental ocasionou diminuição significativa da atividade da AChE, e esta redução foi de aproximadamente 22% quando comparada ao grupo de ratos *sham* (Fig 02A) ($F_{3,34}=34,004$, $p < 0,001$).

A expressão da AChE nos músculos tibial posticus de rã e sóleo de rato não foi alterada significativamente após o procedimento experimental (Fig. 02B) ($F_{3,25}=1,285$, $p= 0,301$).

A)

Atividade da AchE nos músculos esqueléticos sóleo e tibial posticus



B)

Expressão da AchE nos músculos esqueléticos sóleo e tibial posticus

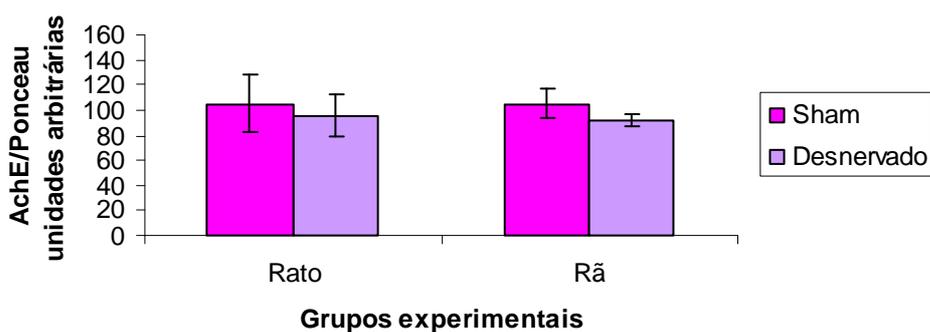


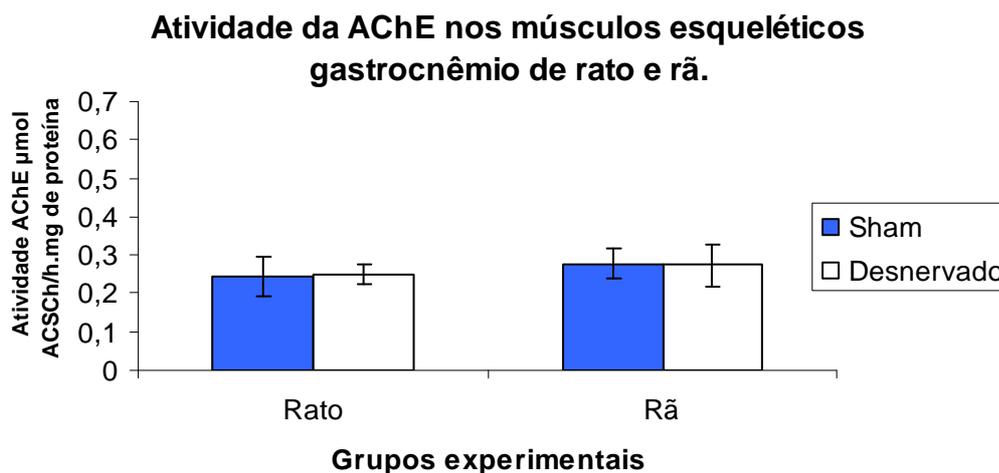
Fig 02. Atividade (A) e expressão (B) da enzima acetilcolinesterase (AChE) em músculo tibial posticus, de rã, e sóleo, de rato, submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático (desnervado) ou a manipulação deste nervo sem a sua secção (*Sham*). Os histogramas representam a média \pm Desvio Padrão da média, e o número entre parêntese correspondem ao número de animais. * representa diferença significativa quando comparados os grupos desnervado e *sham* para uma mesma espécie ($p < 0,001$, ANOVA de uma via). N= 10 por grupo (atividade da AchE), N=4 a 9 por grupo (expressão da AchE).

4.0 Efeito da desnervação na atividade e na expressão da acetilcolinesterase no músculo esquelético gastrocnêmio de rã e rato.

A atividade da acetilcolinesterase no músculo gastrocnêmio de rã com secção unilateral completa do nervo ciático não foi alterada significativamente (Fig 03A). Este mesmo resultado foi observado no músculo gastrocnêmio de rato (Fig 03A) ($F_{3,35}=1,312$, $p=0,286$).

A expressão desta enzima no músculo gastrocnêmio de rã e rato, similar ao que foi encontrado na atividade da AChE neste tecido, não mostrou mudanças estatisticamente significativas após a secção unilateral completa do nervo ciático (Fig 03B) ($F_{3,20}=1,113$, $p=0,367$).

A)



B)

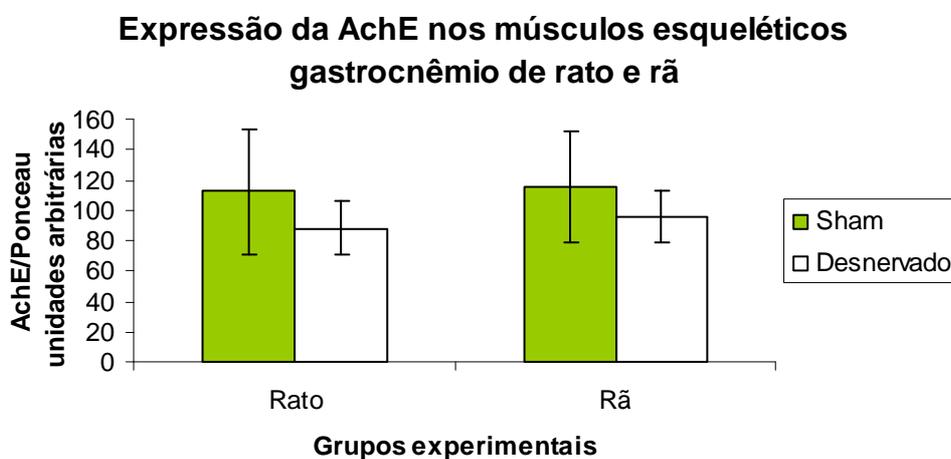


Fig 03. Atividade (A) e expressão (B) da enzima acetilcolinesterase (AChE) em músculo gastrocnêmio de rã e rato submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático (desnervado) ou a manipulação deste nervo sem a sua secção (*Sham*). Os histogramas representam a média \pm Desvio Padrão da média, e o número entre parêntese correspondem ao número de animais. Não houve diferença significativa quando comparados os grupos *sham* e desnervado de uma mesma espécie ($p < 0,001$, ANOVA de uma via). N= 10 por grupo (atividade da AchE), N=4 a 9 por grupo (expressão da AchE).

5.0 Diferenças entre as espécies na atividade e expressão da acetilcolinesterase na medula lombossacral de rã e rato.

A comparação dos resultados da atividade da AChE entre as duas espécies estudadas mostrou que a secção completa unilateral do nervo ciático resultou em acréscimo de aproximadamente 15% na atividade dessa enzima em ambas as espécies (Fig 04).

Um resultado interessante, e que merece ser destacado, é que os valores da atividade da acetilcolinesterase no segmento lombossacral da medula espinal de rãs foi sempre superior aquele obtido nos ratos. Nesses animais, os valores da atividade da AChE foram em torno de 50% menores do que aqueles encontrados nas rãs. Este valor mais elevado das rãs ocorreu tanto nos grupos *sham* como nos animais desnervados (Fig 04). Todavia, não se observa esta diferença de valores entre rãs e ratos quando se compara os resultados obtidos na expressão da AChE (Fig 01B).

Atividade da AChE na medula espinal de rato e rã

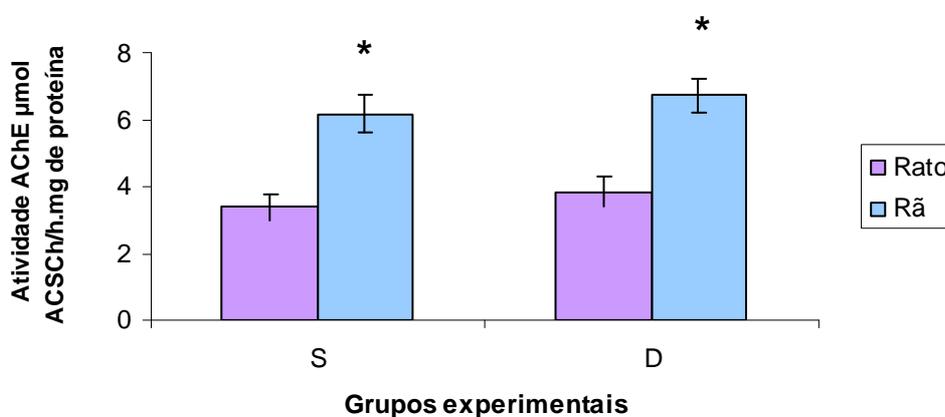


Fig 04. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em medula espinal lombossacral de rã e rato submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático (D) ou à manipulação deste nervo sem a sua secção (S). Note que os valores obtidos em rãs foram sempre superiores àqueles observados nos ratos. Os histogramas representam a média \pm Desvio Padrão da média, e o número entre parêntese correspondem ao número de animais. * representa diferença significativa quando comparados os grupos desnervado e *sham* de rã e rato ($p < 0,001$, ANOVA de uma via). N= 10 por grupo (atividade da AchE).

6.0 Diferenças entre os tipos de músculos esqueléticos de rã e rato.

A comparação dos resultados obtidos para a atividade da AChE nos músculos tibial posticus, de rã, e sóleo, de rato, os quais são compostos predominantemente por fibras do tipo lenta, mostrou que a atividade dessa enzima no músculo sóleo foi sempre maior do que aquela observada no músculo tibial posticus (Fig 06A). Esta diferença esteve sempre em torno de 50% e foi encontrada tanto nos animais do grupo *sham* como nos desnervados (Fig 05). Deve ser lembrado, neste momento, que apenas o músculo sóleo apresentou redução significativa de sua atividade após a secção unilateral completa do nervo ciático (Fig 02A). Enquanto uma diferença foi encontrada na atividade da AChE quando comparados os valores de sua atividade em rãs e ratos, isto não ocorreu com a expressão dessa enzima nestes músculos, cujos valores foram similares entre as duas espécies (Fig 06).

No músculo gastrocnêmio de rã e rato, composto predominantemente por fibras do tipo rápida, a comparação dos resultados entre as duas espécies não revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas tanto na atividade como na expressão da AChE, sendo os valores observados similares entre si nos diferentes grupos de animais (Fig 06).

Atividade da AChE nos músculos esqueléticos sóleo e tibial posticus

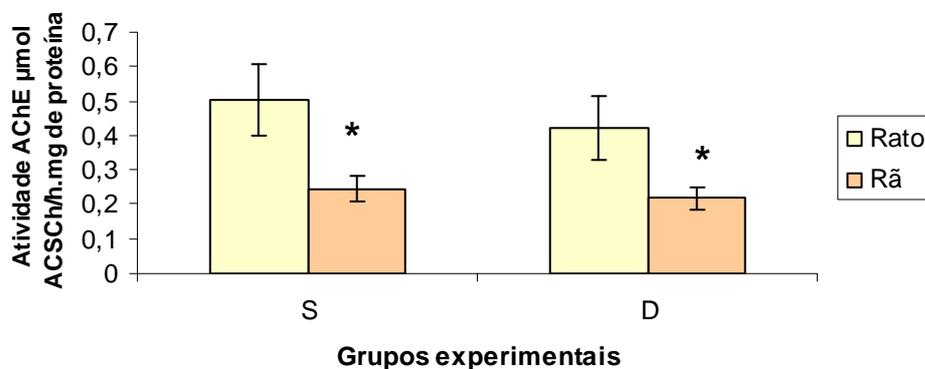
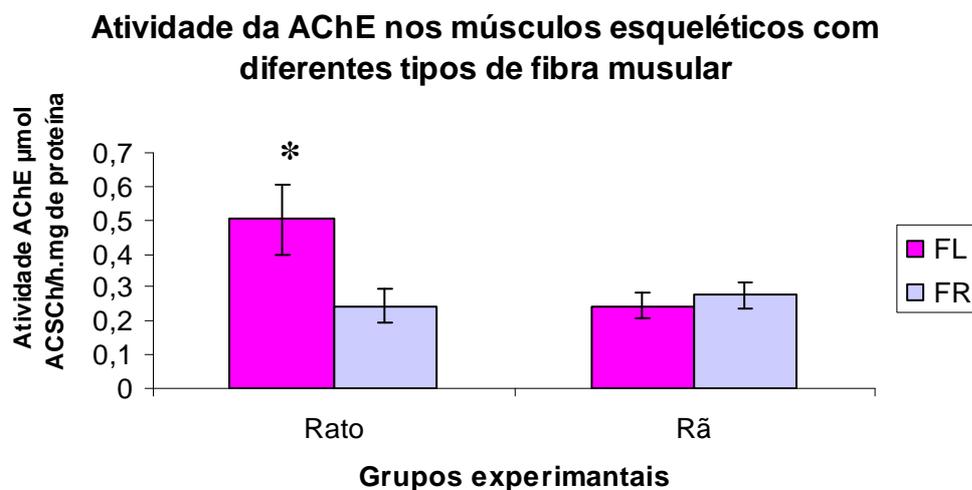


Fig 05. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em músculo tibial posticus, de rã, e sóleo, de rato, submetidos à secção unilateral completa do nervo ciático (D) ou à manipulação deste nervo sem a sua secção (S). Os histogramas representam a média \pm Desvio Padrão da média, e o número entre parêntese correspondem ao número de animais. * representa diferença significativa quando comparados rãs e ratos ($p < 0,001$, ANOVA de uma via). N= 10 por grupo (atividade da AchE).

A)



B)

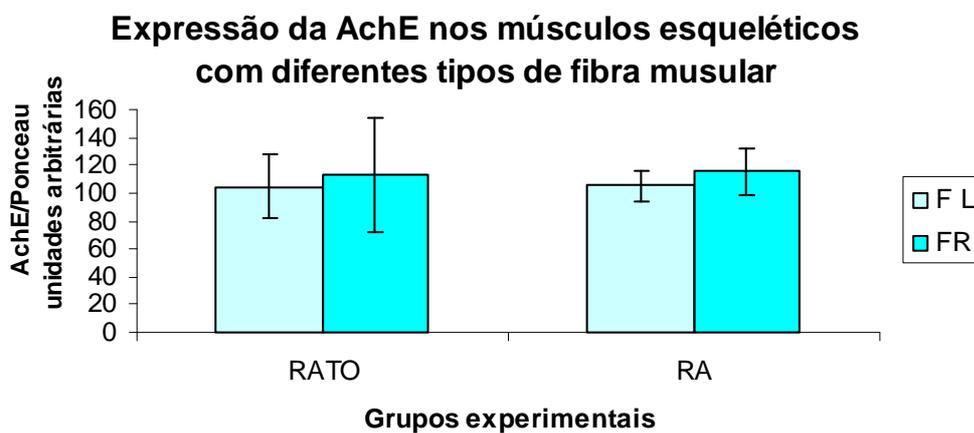


Fig 06. Atividade (A) e expressão (B) da enzima acetilcolinesterase (AChE) em músculos esqueléticos com predomínio de fibras do tipo lenta (FL) e rápida (FR) de rã e ratos. Os histogramas representam a média \pm Desvio Padrão da média, e o número entre parêntese correspondem ao número de animais. * representa diferença significativa entre os tipos de fibras de uma mesma espécie ($p < 0,001$, ANOVA de uma via). N= 10 por grupo (atividade da AchE), N=4 a 9 por grupo (expressão da AchE).

DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a secção do nervo ciático ocasionou aumento na atividade da AChE na medula espinal lombossacral de rãs e ratos, não ocorrendo alterações significativas na expressão desta enzima. Em medula espinal de pintos neonatos, a injúria axonal periférica provocou redução na expressão da AChE apenas no lado ipsilateral à lesão (WAN, 1997). É possível que a expressão inalterada demonstrada em nosso estudo tenha decorrido do fato de que foi utilizado todo o segmento lombossacral da medula espinal de rãs e ratos, não tendo sido feita a separação dos lados ipsilateral e contralateral à lesão. É possível que isto tenha impossibilitado a detecção das possíveis modificações na expressão desta enzima.

Provavelmente o acréscimo da atividade da AChE na medula espinal de rãs e ratos esteja relacionado a uma maior liberação de ACh nesta região induzida pela injúria axonal periférica. Está demonstrado que o transporte axonal de ACh está aumentado na extremidade proximal do nervo após a secção ou o esmagamento do mesmo (O'BRIEN, 1978). Segundo O'BRIEN, (1978), este acréscimo na ACh não seria resultado apenas de síntese local, o que sugere maior atividade na medula espinal. É sabido ainda que vias colinérgicas que finalizam na medula espinal possuem efeito antinociceptivo (FÜRST, 2008; DUSSOR *et al.*, 2004). Estes mecanismos, estando ativados, poderiam contribuir para uma maior atividade da AChE na medula espinal, já que esta enzima é a responsável pela degradação da ACh liberada na fenda sináptica. Isto poderia explicar o aumento da atividade da AChE demonstrada no presente estudo. Contudo, é interessante o fato de que a compressão de nervo periférico induziu menor liberação de ACh no corno dorsal de ratos (SCHECHTMANN *et al.*, 2008). Porém, muitas das respostas oriundas de lesão

nervosa periférica dependem do tipo de modelo que está sendo utilizado (LOESER & BONICA, 2001). Assim, parece interessante determinar o efeito da secção completa de nervo periférico sobre a atividade da ACh na medula espinal.

Em gânglio cardíaco de *Rana pipens*, a desnervação periférica ocasionou aumento na atividade da AChE (STREICHERT e SARGENT, 1990), o que é similar aos resultados do presente estudo. Contudo, esta condição experimental reduziu significativamente a atividade desta enzima em gânglio lombar desta espécie de rã (STREICHERT e SARGENT, 1990). Em nosso estudo foi utilizado segmento lombossacral de medula espinal de *Rana catesbeiana*. Se a diminuição da atividade da AChE fosse característica da região lombar, deveria ter sido observado um resultado similar na medula espinal lombossacral, o que não ocorreu. Assim, a resposta da AChE diante de injúria axonal periférica parece ser específica de cada tipo de tecido, uma vez que os gânglios cardíaco e lombar mostraram respostas diferentes frente a esta condição experimental. Neste contexto, parece plausível sugerir a determinação da atividade desta enzima em outros segmentos da medula espinal, bem como em gânglio da raiz dorsal, para melhor entendimento da atividade regional da AChE frente à lesão axonal periférica.

No presente estudo, a atividade da AChE em medula espinal de rãs foi praticamente 50% superior àquela de ratos. Apesar desta diferença na atividade, a expressão desta enzima foi similar nestas duas espécies. Estudos histoquímicos prévios mostraram que a distribuição da ChAT foi maior em medula espinal de rã do que em ratos (MUÑOZ, 2000). Nestes anfíbios, a reação histoquímica presente no corno ventral foi similar entre rã e rato, porém

aquela do corno dorsal de rã se mostrou mais intensa do que a de rato (MUÑOZ, 2000). É possível que esta diferença seja a responsável pela maior atividade da AChE na medula espinal de rãs. Todavia, estudos complementares são necessários para o esclarecimento desta questão.

Um resultado interessante do presente estudo é que a secção do nervo ciático provocou redução da atividade da AChE no músculo sóleo de rato, mas não ocasionou esta diminuição no músculo tibial posticus de rã, o qual também é predominantemente um músculo do tipo lento e exerce funções similares àquela do sóleo de rato (UNDERHILL, 1978). Apesar desta diferença na atividade, a expressão da AChE não foi alterada significativamente após a lesão axonal periférica nestas duas espécies de vertebrados. A redução observada no músculo sóleo de rato é característica deste músculo e foi mostrada em outros estudos onde o mesmo foi submetido a uma desnervação (TRINKAUS, 2008; MISULIS, 1985; LØMO, 1985). Até o presente momento não é possível explicar a diferença ocorrida na atividade da AChE no músculo lento de rã e rato, sendo necessária a realização de estudos complementares para o esclarecimento desta questão. Todavia, é interessante que o músculo sóleo de rato mostrou atividade da AChE superior àquela do músculo tibial posticus de rã tanto antes como após a lesão axonal. Uma hipótese a ser considerada é a possível diferença na proporção dos tipos de fibras destes músculos. O músculo sóleo apresenta apenas fibras do tipo lentas (ARIANO, 1973). Não se sabe se o músculo tibial posticus possui composição similar. É necessário considerar a possibilidade de ocorrência de diferenças na proporção dos tipos de fibras. Em músculo gastrocnêmio, a porcentagem de fibras rápidas no rato é de 58% (ARIANO, 1973), enquanto em rãs este valor é de 71% (SWEENEY,

2004). No entanto, mesmo tendo percentuais diferentes, a secção completa do nervo ciático não provocou respostas diferentes na atividade e expressão da AChE no músculo gastrocnêmio de rãs e ratos. Tendo este músculo predomínio de fibras rápidas, se esperaria resposta similar àquela do músculo extensor digitário longo (EDL), no qual a secção nervosa periférica ocasionou diminuição na atividade da AChE, sendo esta recuperada após 6 semanas da lesão (MISULIS, 1985). Sabe-se que o músculo EDL apresenta apenas 38% de fibras do tipo rápidas e uma alta proporção de fibras intermediárias (ARIANO, 1973). Assim, é possível que essa heterogeneidade nestes músculos do tipo rápido de rato esteja relacionada com as diferenças encontradas na atividade da AChE.

Além disso, é preciso considerar a possibilidade de que a diferença entre a atividade da AChE no músculo tibial posticus de rã e no sóleo de rato decorra de pequenas modificações na junção neuromuscular destas espécies. Está demonstrado que a inervação motora em músculos da laringe de rãs é muito similar àquela de humanos, mas diferente daquela encontrada em ratos (LIMA-RODRIGUES *et al.*, 2006).

Outra hipótese que deve ser considerada é a de que as diferentes respostas na atividade da AChE mostradas em nosso estudo sejam decorrentes dos padrões de ativação dos músculos. É sabido que a regulação da AChE em fibras musculares lentas e rápidas é regulada principalmente por mecanismo dependente do padrão de ativação das fibras pelo nervo motor. Isto ocorre tanto em ratos (TRINKAUS, 2008) com em rãs (RADZIUKEVICH, 1995). Em músculo sóleo desnervado, a mudança do padrão de ativação tônico de baixa frequência para pulsos fásicos de alta frequência provocou aumento no

mRNA da AChE (TRINKAUS *et al.*, 2008), mostrando o caráter reversível deste mecanismo em função do padrão de ativação neural. Em rãs, o padrão de ativação de fibras musculares tônicas depende da influência do sistema motor tônico (RADZIUKEVICH, 1995). Evidências clínicas e experimentais indicam que em situações de lesão nervosa periférica ocorrem mudanças na expressão de diversos canais iônicos, principalmente em canais de sódio dependentes de voltagem, e estas alterações desempenham importante papel na patogênese da dor neuropática. Estas modificações ocasionam aumento na excitabilidade nervosa (CUMMINS *et al.*, 2007; AMIR *et al.*, 2006). Assim, é possível que esta maior excitação esteja contribuindo para as modificações na atividade da AChE.

É preciso considerar ainda a possibilidade de que os resultados do presente estudo também tenham decorrido das ações extrajuncionais da AChE. A expressão das isoformas assimétricas na região extrajuncional é exclusiva dos músculos lentos, pois nos músculos rápidos ela desaparece logo após o amadurecimento muscular (SKETELJ, 1992). No músculo sóleo, 40% da atividade total da AChE é derivada da região extrajuncional, diferentemente dos músculos rápidos. O que determina essa diferença é a transcrição do ColQ, molécula que é ligada à isoforma assimétrica da AChE presente em toda a extensão da fibra muscular. Possivelmente a atividade extrajuncional da AChE no músculo tibial posticus de rã, pode ser um mecanismo compensatório para as alterações sofridas na região da junção neuromuscular.

Está demonstrado que a AChE é necessária para o desenvolvimento normal do principal trato longitudinal do telencéfalo de *Xenopus*, sendo necessária para o crescimento de neuritos (ANDERSON & KEY, 1999;

STERNFELD *et al*, 1998). Ela também promove a expansão de neuritos em ratos (SOREQ, 2001). A isoforma AChE-R participa na promoção da extensão destes neuritos, e está também diretamente ligada aos mecanismos de proteção celular em situação de estresse agudo (SOREQ, 2001). Possivelmente a AChE-R pode estar ativada em ratos e rãs como uma via de proteção e promoção da regeneração nervosa. Desta forma, é possível que o aumento observado na medula espinal após a secção do nervo ciático seja consequência do papel da AChE durante o processo de reinervação, uma vez que não foi impedido ou dificultado o processo de regeneração no presente estudo. A inexistência de mudanças significativas na expressão desta enzima pode ter decorrido da utilização de anticorpo para apenas uma isoforma da AChE. Assim, é necessária a utilização de anticorpos para as diferentes isoformas para esclarecimento desta questão.

Outro importante regulador da atividade neural e muscular da AChE é o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (TSIM *et al*, 2008). Foi demonstrado que a secção do nervo ciático ocasiona respostas diferentes entre rãs e ratos quanto ao padrão de imunorreatividade deste peptídeo na medula espinal. Em rãs não foi alterado o padrão de distribuição, diferentemente do que se observa na medula espinal de ratos (GUEDES, 2002). É possível que as diferenças entre rãs e ratos mostradas no presente estudo estejam relacionadas também com estas diferenças.

A desnervação em ratos e rãs mostrou um decréscimo significativo na atividade da AChE no músculo sóleo de rato, o que não foi observado no músculo tibial posticus de rã. Possivelmente esta diferença esteja ligada às diferenças no processo regenerativo destes animais. Quando analisamos

macroscopicamente a região da lesão nervosa foram constatadas algumas diferenças em relação ao padrão temporal do processo regenerativo. Após 3 dias de lesão nas rãs, o coto proximal apresentava um neuroma bem desenvolvido com alguns prolongamentos estabelecidos, e nos ratos este mesmo padrão se tornou mais evidente somente após 10 dias de lesão. Essa diferença na recuperação entre as espécies possivelmente tenha relação com a atividade da AChE.

É preciso considerar ainda que os resultados de nosso estudo sejam decorrentes da ativação de vias intracelulares envolvidas no processo de regeneração nervosa. Em ratos, está demonstrado que a secção do nervo ciático ocasiona ativação da via de sinalização da Akt (GUEDES, 2002), a qual é um importante regulador da atividade da AChE (JIANG, 2007). A ativação desta via está diretamente ligada à proteção das células contra a apoptose, outra possibilidade a ser considerada é a participação de fatores neurotróficos. Após a lesão ocorre a liberação de fatores neurotróficos que possuem diferentes funções no processo regenerativo. O NGF é um importante fator neurotrófico liberado pelo nervo motor que age na recuperação do nervo após lesão axonal (JIANG, 2007), e é ativado pela via de sinalização da Akt (JIANG, 2007). Pelo fato da via da Akt estar ativada em ratos, e provavelmente de forma similar em rãs, é possível que o NGF tenha sido ativado e tenha participação nos resultados aqui apresentados.

Com base em nossos resultados e de sua relação com os dados da literatura, fica evidente a necessidade da realização de estudos comparativos enfocando o papel da AChE na injúria axonal periférica para melhor compreensão do papel desta enzima sob uma análise evolutiva.

CONCLUSÃO

Conclui-se, a partir deste estudo, que a secção do nervo ciático ocasiona aumento na atividade da AChE da medula de rã e rato. Esta situação experimental foi capaz de reduzir a atividade desta enzima no músculo sóleo de rato, mas não no tibial posticus de rã e no músculo gastrocnêmio de rã e rato. Além disso, a secção nervosa periférica não induziu mudanças significativas na expressão da AChE da medula espinal e nos diferentes músculos esqueléticos. E a necessidade de uma abordagem funcional mais detalhada dos efeitos da secção do nervo ciático sobre a atividade e expressão da enzima AChE em tecido nervoso e muscular de rã e rato. Isto não apenas para o entendimento de suas peculiaridades, mas também para a compreensão de muitas questões ainda especulativas nos mamíferos, as quais analisadas numa perspectiva evolutiva poderão ser esclarecidas. É indiscutível a posição estratégica dos anfíbios na filogenia dos vertebrados, já que estes animais foram os primeiros vertebrados a ocuparem a terra. Na literatura há inúmeros exemplos mostrando que a identificação de similaridades e diferenças na estrutura e função entre as espécies permite constatar que algumas delas, de acordo com certas peculiaridades, possam servir como modelo ideal para o estudo de processos fisiológicos básicos.

PERSPECTIVAS

Diante do que foi apresentado, surge a importância de analisar o efeito da secção de nervo periférico sobre o padrão de imunorreatividade à AChE em medula espinal de rãs e ratos, pois assim poderemos verificar se a mudança é bilateral ou ipsilateral neste tecido. Além disso, é necessário determinar se esta condição experimental modifica diferencialmente os subtipos da AChE nestas espécies, pois as diferenças entre rãs e ratos podem ter decorrido de modificações no padrão de atividade e/ou expressão destes diferentes subtipos nestes vertebrados. Outra questão a ser analisada é os efeitos da secção nervosa periférica sobre a atividade e/ou expressão de fatores neurotróficos em rãs, cujos efeitos ainda permanecem desconhecidos e possíveis diferenças nestes fatores poderão estar contribuindo para os resultados demonstrados em nosso estudo. Estes conhecimentos trarão subsídios para o entendimento evolutivo dos diversos papéis da AChE.

REFERÊNCIAS BIBILOGRÁFICAS

ADLI DS, ROSENTHAL BM, YUEN GL, HO RH, CRUCE WL.J. 1988. Immunohistochemical localization of substance P, somatostatin, enkephalin, and serotonin in the spinal cord of the northern leopard frog, *Rana pipiens*. **Comp Neurol.** 1;275(1):106-16.

AKASSOGLU K, STRICKLAND S. 2002. Nervous system pathology: the fibrin perspective. **Biol Chem.** 383(1):37-45

ANDERSON RB, KEY B. 1999. Role of acetylcholinesterase in the development of axon tracts within the embryonic vertebrate brain. **Int J Dev Neurosci.** 17(8):787-93

AMIR R.; DEVOR M. 1996. Aconal cross-excitation in nerve-end neuromas: comparison of A-and C-fibers. **J. Neurophysiol.** 68:1160-1166.

ARIANO M A, ARMSTRONG R B, EDGERTON V R. 1973. Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. **Histochem Cytochem.** 21:51-5.

BETZ H. 1980. Effects of drug-induced paralysis and depolarisation on acetylcholine receptor and cyclic nucleotide levels of chick muscle cultures. **FEBS Lett.** 118(2):289-92.

BRIMIJOIN S. 1983. Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. **Prog Neurobiol.** 21(4):291-322.

BUTLER, I. J., D. B. DRACHMAN, and A. M. GOLDBERG 1978. The effect of disuse on cholinergic enzymes. **J. Physiol.** 274: 593-600.

CANGIANO, A., T. LØMO, L. LUTZEMBERGER, AND O. SVEEN .1980. Effects of chronic nerve conduction block on formation of neuromuscular junctions and junctional AChE in the rat. **Acta Physiol.** 709: 283-296.

- CARSON, S., S. BON, M. VIGNY, J. MASSOULIE, and M. FARDEAU. 1979. Distribution of acetylcholinesterase molecular forms in neural and non-neural sections of human muscle. **FEBS Lett.** 97: 348-352.
- COLLINS, P., and YOUNKIN S. G. 1982. Effect of denervation on the molecular forms of acetylcholinesterase in rat diaphragm. **J. Biol. Chem.** 257: 13638-13644.
- COYLE JT, PRICE DL, DELONG MR. 1983. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. **Science.** 11; 219 (4589):1184-90
- CRNE-FINDERLE N, PREGELJ P, SKETELJ J. 2005. Junctional and extrajunctional ace.tylcholinesterase in skeletal muscle fibers. **Chem Biol Interact.** 15;157-158:23-7.
- CUMMINS TR, RUSH AM. 2007. Voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. **Expert Rev Neurother.** 7(11):1597-612.
- DANGER J.M.; GUY I. ;BENYAMINA M.; JEGOU. S. LEBOULENGER F.; COTE J.; TONON M.C; PELLETIER G.; VAUNDRY H. 1985. Localization and identification of neuropeptide y (NPY) like imunoreactivity in frog main. **Peptides;** 6:1225-1236.
- DE LA PORTE S, VALLETTE FM, GRASSI J, VIGNY M, KOENIG J. 1986. Presynaptic or postsynaptic origin of acetylcholinesterase at neuromuscular junctions? An immunological study in heterologous nerve-muscle cultures. **Dev Biol.** 116(1):69-77
- DRACHMAN, D. B. 1972. Neurotrophic regulation of muscle cholinesterase: Effects of botulinum toxin and denervation. **J. Physiol. (Lond.)** 226: 619-627.
- DUBNER R. 1983. Pain research in animals. **Acad Sci.** 406:128-32.

DUSSOR GO, HELESIC G, HARGREAVES KM, FLORES M 2004. Cholinergic modulation of nociceptive responses in vivo and neuropeptide release in vitro at the level of the primary sensory neuron. **Pain**. 107(1-2):22-32.

ELLMAN G L, COURTNEY U D, ANDRES V, FEATHERSTONE R M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** 7:88-95.

FÜRST Z. 2008. Central and peripheral mechanisms in antinociception: current and future perspectives. **Neuropsychopharmacol Hung.**;10(3):127-30.

GARRY EM, JONES E, FLEETWOOD-WALKER SM. 2004. Nociception in vertebrates: key receptors participating in spinal mechanisms of chronic pain in animals.. **Brain Res Rev.** 46(2):216-24

GUEDES, R.P.2002. Efeitos da denervação periférica sobre o padrão de imunoreatividade da GABA, neuropeptídeo y, somatostatina e GGPR em medula espinal de rãs (*Rana Catesbeiana*). Porto Alegre: UFRGS, 2002 Dissertação (Mestrado Em Ciencia Biológicas, Concentração Neurociências). Universidade do Rio Grande Do Sul.

GUEDES, R.P., MARCHI, M.I., VIOLA, G.G., XAVIER, L.L., ACHAVAL, M., PARTATA,W., 2004. Somatostatin-, calcitonin gene-related peptide, and g-aminobutyric acid-like immunoreactivity in the frog lumbosacral spinal cord: distribution and effects of sciatic nerve transection. **Comp. Biochem. Physiol.**, 138, 19–28.

GRISARU D, DEUTSCH V, SHAPIRA M, PICK M, STERNFELDM, MELAMED-BOOK N, KAUFER D, GALYAM N, GAIT MJ,OWEN D *et al.* 2001. ARP, a peptide derived from the stress-associated acetylcholinesterase variant, has hematopoietic growth promoting activities. **Mol Med** 7, 93–105

GRISARU D, STERNFELD M, ELDOR A, GLICK D, SOREQ H. 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology..**Eur J Biochem.** 264(3):672-86.

HALL Z.W. 1973 Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in endplate and non-endplate regions of rat diaphragm muscle. **J. Neurobiol.** 4 343–361.

HAMAMOTO DT, SIMONE DA. 2003. Characterization of cutaneous primary afferent fibers excited by acetic acid in a model of nociception in frogs. **J Neurophysiol.** 90(2):566-77.

HENNIG R., LØMO T., 1985. Firing patterns of motor units in normal rats. **Nature.** 314: 164–166.

INESTROSA NC, ROBERTS WL, MARSHALL TL, ROSENBERRY TL. 1987 Acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus is attached to membranes by a novel subunit distinct from those of acetylcholinesterases in other tissues..**J Biol Chem.** 5;262(10):4441-4.

JIANG H, ZHANG J, ZHU H, LI H, ZHANG X. 2007. Nerve growth factor prevents the apoptosis-associated increase in acetylcholinesterase activity after hydrogen peroxide treatment by activating Akt.. **Acta Biochim Biophys.** 39 (1):46-56

KAVALIERS M. 1988. Evolutionary and comparative aspects of nociception. **Brain Res Bull.** 21(6):923-31.

KOENIG, J.; RIEGER F. 1981. Biochemical stability of the AChE molecular forms after cytochemical staining: Post-natal focalization of the high molecular weight forms of rat AChE. **Dev. Neurosci.** 4: 249-257.

KOENIG, J. VIGNY M 1978. Neural induction of the 16s acetylcholinesterase in muscle cell cultures. **Nature** 277: 75-77.

KREJCI E, DUVAL N, CHATONNET A, VINCENS P, MASSOULIÉ J. 1991. Cholinesterase-like domains in enzymes and structural proteins: functional and evolutionary relationships and identification of a catalytically essential aspartic acid. **Proc Natl Acad Sci** 1: 88 (15):6647-51.

LAZZERI L. 1977. Fases fundamentais da técnica cirúrgica. **JM Varela livros**, 1-190.

LAI J, JEDRZEJCZYK J, PIZZEY JA, GREEN D, BARNARD EA. 1986. Neural control of the forms of acetylcholinesterase in slow mammalian muscles. **Nature**.1-7;321(6065):72-4

LAYER, P.G. 1991 Cholinesterases during development of the avian nervous system, **Cell. Mol. Neurobiol.**, 11: 7–33

LAYER PG. 1990. Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. **Bioessays**. 1990 Sep;12(9):415-20.

LIMA-RODRIGUES M, VALLE-FERNANDES A, NUNES R, ALMEIDA A . 2006 Distribution of neuromuscular junctions in laryngeal and syringeal muscles in vertebrates. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**; 288 (5):543-51

LEV-LEHMAN E, EL-TAMER A, YARON A, GRIFMAN M, GINZBERG D, HANIN I, SOREQ H. 1994. Cholinotoxic effects on acetylcholinesterase gene expression are associated with brain-region specific alterations in G,C-rich transcripts. **Brain Res**. 24; 661(1-2):75-82.

LOEESER, J.D; BONICA. 2001. History of pain concepts and therapies. In Loeser J.D; Butler S.H; Chapman R; Turk D.C. Bonica's management of pain. **Lippincott, Willians e Wiekins**, 3-25.

LØMO T, MASSOULIÉ J, VIGNY M.1985 Stimulation of Denervated Rat Soleus Muscle with Fast and Slow Activity Patterns Induces Different Expression of Acetylcholinesterase Molecular Forms. **The Journal of Neuroscience** Vol. 5, No. 5, pp. 1180-1187.

LØMO, T., and SLATER C. R. 1980. Control of junctional acetylcholinesterase by neural and muscular influences in the rat. **J. Physiol.** 303: 191-202.

MA W, BISBY MA. 1998. Increase of preprotachykinin mRNA and substance P immunoreactivity in spared dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injury. **Eur J Neurosci.** 10(7):2388-99.

MASSOULIÉ J, SUSSMAN J, BON S, SILMAN I. 1993. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Prog Brain Res.** 98:139-46.

MASSOULIE, J., BON S. 1982. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Annu. Rev. Neurosci.** 5: 57-106

MASSOULIE, J., ANSELMET, A., BON, S., KREJCI, E., LEGAY, C., MOREL, N. and SIMON, S. 1983. Acetylcholinesterase: C Figure terminal domains, molecular forms and functional localization. **J. Physiol.** 92, 183–190.

MILLIAN M.J. 1999. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.** 57:1-164.

MISULIS K E, DETTBARN W D. 1985. Is fast innervation responsible for increased acetylcholinesterase activity in reinnervation soleus muscles? **Exp Neuro.** 89: 204-12

- MUÑOZ M.; MARIN O. GONZÁLEZ A. 2000. Localization of NADPH diaphorase, nitric oxid synthase and choline acetyltransferase in the spinal cord of the frog *Rana perizi*. **J. Comp. Neurol**; 419:451-470.
- NIETO M.; VERDÚ E.; 1998. Lesiones del sistema nervioso: respuesta neuronal y reparación. In: Delgado IM, Ferrús A, Mora F, Rubia FJ (eds). Manual de Neurociência, **Editorial Síntesis**, 933-963.
- O'BRIEN, R.A.D. 1978. Axonal transport of acetylcholine, choline acetyltransferase in regenerating peripheral nerve. *J Physiol*. 282, 91-103.
- PARK, S. E., KIM, N. D. and YOO, Y. H. (2004) Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. **Cancer Res**. 64, 2652–2655.
- PARTATA WA, CERVEIRA JF, XAVIER LL, VIOLA GG, ACHAVAL M. 2002. Sciatic nerve transection decrease substance P immunoreactivity in the lumbosacral spinal cord of the frog (*Rana catesbeiana*). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**. 131(4):807-14.
- RADZIUKEVICH TL. 1995. Reinnervation of a mixed muscle in the frog *Rana temporaria* with a regenerating homogeneous nerve. **Zh Evol Biokhim Fiziol**.;31(4):467-74.
- REISS M. 1966. New perspectives in research into the etiology of mental retardation. **Int J Neuropsychiatry**. 2(4):310-29.
- ROCHA PL, BRANCO LG. 1998. Seasonal changes in the cardiovascular, respiratory and metabolic responses to temperature and hypoxia in the bullfrog *Rana catesbeiana*. **J Exp Biol**. 201(Pt 5):761-8.
- RYDH-RINDER M, HOLMBERG K, ELFVIN LG, WIESENFELD-HALLIN Z, HOKFELT T. 1996. Effects of peripheral axotomy on neuropeptides and nitric

oxide synthase in dorsal root ganglia and spinal cord of the guinea pig: an immunohistochemical study.. **Brain Res** 29;707(2):180-8.

ROTUNDO RL, CARBONETTO ST. 1987. Neurons segregate clusters of membrane-bound acetylcholinesterase along their neurites. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 84(7):2063-7.

ROTUNDO RL. 1990. Nucleus-specific translation and assembly of acetylcholinesterase in multinucleated muscle cells.. **J Cell Biol**. 110 (3):715-9.

RUBIN, L. L.. S. M. SCHUETZE. C. L. WEILL, and G. D. FISCHBACH. 1980 Regulation of acetylcholinesterase appearance at neuromuscular junctions in vitro. **Nature** 283: 264-267.

SCHRÖDER JM.1975.Degeneration and regeneration of myelinated nerve fibers in experimental neuropathies. In: Thomas PK, Lambert EH (eds). Peripheral neuropathy, WB Saunders Company. 337-362.

SCHECHTMANN G, SONG Z, ULTENIUS C, MEYERSON BA, LINDEROTH B.2008. Cholinergic mechanisms involved in the pain relieving effect of spinal cord stimulation in a model of neuropathy. **Pain**. 30;139(1):136-45.

SKETELJ J, BRZIN M.J. 1985. Asymmetric molecular forms of acetylcholinesterase in mammalian skeletal muscles. **Neurosci Res**. 1985;14(1):95-103

SKETELJ, J., BRZIN M 1980. 16s acetylcholinesterase in endplate-free regions of developing rat diaphragm. **Neurochem. Res**. 5: 655-660.

SKETELJ, J., CRNE-FINDERLE, N., BRZIN, M. 1992. Influence of denervation on the molecular forms of junctional and extrajunctional acetylcholinesterase in fast and slow muscles of the rat, **Neurochem. Inter**. 21: 415–421.

SOREQ, H. and SEIDMAN, S. (2001) Acetylcholinesterase – New roles for an old actor. **Nat. Rev. Neurosci.** 2, 294–302.

STARER T.I; USENGER R.L, STEBBINS R.C; NYBAKKEN J.N. 1984. Zoologia Geral. Companhia Editorial Nacional, 618-641.

STERNFELD M, MING G, SONG H, SELA K, TIMBERG R, POO M, SOREQ H. 1998. Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contributions of its hydrolytic capacity, core protein, and variable C termini. **J Neurosci.** 15;18(4):1240-9

STEVENS, C.W. 2004. Opioid research in amphibians; an alternative pain model yielding insights on the evolution of opioid receptors. **Brain Research Reviews.** 46: 204-215.

STOLL G, MÜLLER HW. 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. **Brain Pathol.** 9(2):313-25.

STREICHERT LC, SARGENT PB. 1990. Differential effects of denervation on acetylcholinesterase activity in parasympathetic and sympathetic ganglia of the frog, *Rana pipiens*. **J Neurobiol.** 21(6):938-49

SWEENEY L J, BRODFUEHRER P D, PDRAUGHLEY B L. 2004. An introductory biology lab that uses enzyme histochemistry to teach students about skeletal muscle fiber types. **Adv Physiol Educ.** 28:23-8

TAYLOR, P. and RADIC, Z. 1994. The cholinesterases: From genes to proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 34, 281–320.

TAYLOR P. 1998. Development of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease. **Neurology** 51, S30–S35; discussion S65–S67.

TRINKAUS M, PREGELJ P, SKETELJ J. 2008. Reciprocal neural regulation of extrajunctional acetylcholinesterase and collagen Q in rat muscles—The role of calcineurin signaling **Chemico-Biological Interactions**. 175: 45-49

TSIM KW, GREENBERG I, RIMER M, RANDALL WR, SALPETER MM 1992. Transcripts for the acetylcholine receptor and acetylcholine esterase show distribution differences in cultured chick muscle cells. **J Cell Biol.**;118 (5):1201-12.

TSIM KW, CHOI RC, XIE HQ, ZHU JT, LEUNG KW, LAU FT, CHU GK, CHEN VP, MOK MK, CHEUNG AW, BI CW. 2008. Transcriptional control of different subunits of AChE in muscles: signals triggered by the motor nerve-derived factors. **Chem Biol Interact**. 25;175(1-3):58-63.

VALLETTE, F.M. and MASSOULIE', J. 1991 Regulation of the expression of acetylcholinesterase by muscular activity in avian primary cultures, **J. Neurochem**. 56:518–1525.

VIGNY, M., J. KOENIG, AND F. RIEGER. 1976. The motor end-plate specific form of acetylcholinesterase: Appearance during embryogenesis and re-innervation of rat muscle. **J. Neurochem**. 27: 1347-1 353.

VRBOVÁ G, GREENSMITH L, SIERADZAN K. 1992. Motor neuron disease model. **Nature**. 19;360(6401):216.

VUKOVA T, ATANASSOV A, IVANOV R, RADICHEVA N. 2005. Intensity-dependent effects of microwave electromagnetic fields on acetylcholinesterase activity and protein conformation in frog skeletal muscles. **Med Sci Monit**. 11(2):BR50-6.

UNDERHILL, R., SIERRA, C. 1978. Laboratory anatomy of the frog. Third Edition.

WAN D. C.C., YU P. NG,, CHOI R C.Y, CHEUNG P. W.T., DONG T.T.X., TSIM K W.K 1997. Denervation decreases the ipsilateral expression of AChE in chick lumbaric motor neurons. **Neuroscience Letters** 232 : 83–86

WIESELER-FRANK J, MAIER SF, WATKINS LR. 2004. Glial activation and pathological pain. **Neurochem Int.**45(2-3): 389-95.

WRIGHT, C. I., GEULA, C. & MESULAM, M. M. 1993. Neurological cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. **Ann. Neurol.** 34, 373–384.

YANG, L., HE, H. Y. AND ZHANG, X. J. 2002. Increased expression of intranuclear AChE involved in apoptosis of SK-N-SH cells. **Neurosci. Res.** 42, 261–268.

YOUNKIN SG, ROSENSTEIN C, COLLINS PL, ROSENBERRY TL. 1982. Cellular localization of the molecular forms of acetylcholinesterase in rat diaphragm. **J Biol Chem.** 25;257(22):13630-7

ZHANG J.-Y., JIANG H., GAO W., WU, J., PENG, K., SHI Y.-F. AND ZHANG X.-J. 2008. The JNK/AP1/ATF2 pathway is involved in H₂O₂-induced acetylcholinesterase expression during apoptosis. **Cell. Mol. Life Sci.** 65: 1435-1445

ZIMERMANN M. 2001. Pathobiology of neurophathic pain. **Eur J Pharmacol.** 429:23-37.