

1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

Distribuição da reação NADPH-diaforase em medula espinal
lombossacral e gânglio da raiz dorsal de rãs
Rana catesbeiana

ROSANE TIMMERS SCHILLING
autor

Wania Aparecida Partata
Profa.orientadora

Trabalho apresentado como Conclusão de curso para a obtenção de título de
Bacharel na área de Molecular, Celular e Funcional do Curso de Ciências
Biológicas.

Porto Alegre, janeiro de 2004.

2004
FÍSICA
2004
FÍSICA
2004

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram nesta jornada, dando-me incentivo e apoio constante. Agradeço ao Laboratório de Neurobiologia Comparada, desta Universidade por ter me acolhido e pelo carinho de todos os colegas.

Agradeço em especial a meu noivo Daniel, pelo carinho, ajuda, apoio e compreensão, sem os quais dificilmente teria chegado com sucesso ao fim da minha graduação. Também aos meus pais e minha querida irmã e a família Seelig por todos nossos momentos juntos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
INTRODUÇÃO	6
1. Dor e Nocicepção	6
2. Fisiologia da Transmissão Nociceptiva.....	7
3. Organização da Medula Espinal em Anfíbios.....	10
4. NADPH-diaforase	14
OBJETIVOS.....	19
MATERIAL E MÉTODOS:	20
1. Animais: Procedência e Manutenção	20
2. Obtenção do Tecido Nervoso	20
.....	21
3. Procedimento Histoquímico	21
RESULTADOS.....	23
DISCUSSÃO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	44

RESUMO

A sensação de dor é mediada por diferentes sistemas de transmissão, os quais estão continuamente sendo integrados e modulados por diversos mecanismos neurais, agindo em diferentes períodos de tempo. Para o estudo da dor os mamíferos são preferencialmente os modelos mais utilizados. No entanto, apesar da ausência de um arranjo laminar, a medula espinal de anfíbios apresenta muitas similaridades anatômicas e funcionais com a dos mamíferos. Por isso, o estudo destes animais pode fornecer subsídios adicionais para a compreensão dos mecanismos da transmissão nociceptiva, além de esclarecer os aspectos evolutivos envolvidos na mesma.

Um dos fatores que parece envolvido nos mecanismos de codificação e transmissão nociceptiva é o óxido nítrico (NO). Estudos recentes demonstraram que a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPH-diaforase) é uma óxido nítrico sintase, enzima responsável pela síntese de NO. Sabe-se que esta enzima está presente no tecido nervoso de rãs, mas é ainda desconhecida sua distribuição na medula espinal lombossacral e gânglio da raiz dorsal da espécie *Rana catesbeiana*, cuja medula espinal é amplamente utilizada em estudos morfofuncionais e farmacológicos, inclusive naqueles desenvolvidos no laboratório de Neurobiologia Comparada da UFRGS. Desta forma, este trabalho avaliou, mediante técnica histoquímica, a expressão da atividade NADPH-diaforase em medula espinal lombossacral e gânglio da raiz dorsal (GRD) de rãs *Rana catesbeiana*, adultas e de ambos os sexos em condições basais. Para isto os animais foram submetidos a uma perfusão intracardíaca para a obtenção dos

tecidos os quais, em seguida, foram seccionados (50 μm) e tratados segundo a técnica histoquímica para NADPH-diaforase. Nesses animais, a reação a NADPH-diaforase do GRD localizou-se predominantemente em somas neuronais de grande (35-50 μm) e médio (20-35 μm) diâmetro, sendo esta de forte intensidade nos neurônios de médio diâmetro e de intensidade moderada na maioria dos neurônios grandes. Esta atividade ainda foi observada em somas neuronais de pequeno (10-20 μm) diâmetro, porém esses neurônios foram em pequeno número, mas a atividade quando presente ocorreu com forte intensidade. Já na medula espinal lombossacral a reação a NADPH-diaforase localizou-se predominantemente em fibras do campo terminal dorsal e na porção dorsal do funículo lateral, sendo esta de forte intensidade. Neurônios intensamente corados foram observados nas regiões da banda mediolateral, do campo terminal ventral e das porções dorsal e ventromedial do corno ventral. Esses neurônios foram do tipo "bitufted" e apresentaram diâmetro médio de 10 μm . A NADPH-diaforase também ocorreu em fibras localizadas nos funículos laterais e ventrais, as quais tinham intensidade forte. A presença da intensa reação a NADPH-diaforase no GRD e na medula espinal de rãs em estado basal, sugere a participação do NO no processamento de informações somatossensoriais nessa espécie de rã. Como algumas destas regiões reativas a NADPH-diaforase recebem terminações provenientes de receptores nociceptivos, como está demonstrado para o campo terminal dorsal e porção dorsal do funículo lateral, é possível que o NO esteja envolvido nos mecanismos de transmissão nociceptiva em rãs *Rana catesbeiana*, similar ao que é proposto para os mamíferos.. No entanto, estudos adicionais serão necessários para o esclarecimento dessa hipótese.

INTRODUÇÃO

1. Dor e Nocicepção

A dor é um importante tema de estudo desde épocas bastante remotas ao início da neurociência. Com o advento da tecnologia e a descoberta de inúmeros métodos de estudo, grandes avanços ocorreram na pesquisa sobre a dor. Entretanto, muitas lacunas ainda permanecem, relativas tanto à escolha da modalidade terapêutica mais adequada, como aos mecanismos fisiológicos e/ou patofisiológicos de sua transmissão (BONICA & LOESER, 2001).

Na conceitualização da dor, deve focar o aspecto sensorial, pois se trata de uma experiência desagradável onde o estímulo nocivo é codificado como uma mensagem nociceptiva, sendo progressivamente transmitido e processado em centros superiores. Entretanto, além do componente sensorial, deve ser salientado o aspecto emocional, além de respostas vegetativas e reações psicológicas e comportamentais provocadas pela lesão tecidual (MILLAN, 1999; BYERS & BONICA, 2001).

Quando se estuda a dor, é importante compreender a terminologia empregada. Dor propriamente dita trata-se de uma experiência sensorial desagradável, tem um caráter subjetivo e, portanto, pode ser relacionada somente aos humanos que possuem a capacidade de verbaliza-la.

Nocicepção, contudo, refere-se aos mecanismos pelos quais a dor é transmitida ao 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 (MILLAN, 1999; BONICA & LOESER, 2001).

Para a compreensão desses mecanismos, os mamíferos ainda são os modelos mais utilizados. Embora não possuam capacidade de comunicação verbal quando em contato com estímulos nociceptivos, esses animais exibem respostas motoras similares às dos humanos. Tais respostas permitem inferir sobre a existência de dor (DUBNER, 1983; KAVALIRES, 1988). Os não mamíferos, por sua vez, também apresentam respostas comportamentais e fisiológicas aos estímulos nociceptivos (KAVALIERS, 1988). Dessa forma, esses modelos também podem colaborar a elucidar os mecanismos envolvidos na codificação e transmissão nociceptivas no sistema nervoso. Esse conhecimento em vertebrados não-mamíferos poderá ainda esclarecer os aspectos evolutivos envolvidos na nocicepção.

2. Fisiologia da Transmissão Nociceptiva

O dano aos tecidos constitui um estímulo nocivo, o qual gera alterações celulares com liberação de inúmeras substâncias químicas. Portanto, a dor, tanto em mamíferos como em vertebrados não-mamíferos, compreende um conjunto de efeitos ocasionados por mecanismos bioquímicos, fisiológicos e psicológicos simultâneos, desencadeando atividade em vários centros do sistema nervoso onde ocorrem os processamentos sensoriais, motivacional e cognitivo (BYERS & BONICA, 2001).

De uma forma geral, os eventos modulatórios da transmissão nociceptiva ocorrem primeiramente no corno dorsal da medula espinal e em núcleos do tronco encefálico e, secundariamente, em centros talâmicos e estruturas corticolímbicas.

Os mecanismos patofisiológicos da dor podem ocorrer em locais distantes do foco da lesão. Primeiramente, a transmissão da informação nociceptiva é gerada pela alteração na excitabilidade dos terminais sensoriais. Porém, ao longo do tempo, outras regiões do neurônio sensorial primário, e mesmo células pós-sinápticas do corno dorsal, ou de ordem superior, podem contribuir para a patofisiologia da dor (ZIMMERMANN, 2001).

Além disso, entre as modalidades sensoriais somáticas, a sensação de dor, por sua inerente natureza aversiva, é a mais distinta e a que mais contribui na função vital de proteção desempenhada pelo sistema nervoso, já que alerta o organismo sobre a ocorrência ou ameaça de lesões (MEYER et al., 1994; BASBAUM & JESSEL, 2000). Sherrington foi um dos primeiros pesquisadores a considerar essa função protetora desempenhada pela sensação de dor, postulando a existência de alerta de nociceptores, neurônios sensoriais não responsivos a estímulos inócuos. A função de alerta da dor aguda reflete a ativação fásica dos nociceptores pelos estímulos nocivos ou potencialmente nocivos, os quais excedem os limites fisiológicos. A dor aguda, portanto, evoca reações de fuga e/ou retirada, formando assim as respostas protetoras que impedem a continuidade da exposição ao estímulo nocivo. A dor crônica, entretanto, não pode ser considerada adaptativa, pois envolve a ativação tônica dos nociceptores, dessa forma não desempenhando uma função fisiológica (MILLAN, 1999).

Os neurônios somatossensoriais detectam alterações nas condições térmicas, mecânicas e químicas dos tecidos corporais para conversão dessas informações em estímulos nervosos, os quais irão convergir sobre o corno

dorsal da medula espinal e em núcleos do tronco encefálico (BYERS & BONICA, 2001).

Em relação à medula espinal, observa-se que, em mamíferos, no início do desenvolvimento, os neurônios sensoriais apresentam uma forma bipolar, porém o corpo celular vai tornando-se gradativamente unipolar, com um pequeno tronco de conexão entre o corpo celular e o axônio. Essas células sensoriais estão localizadas no gânglio da raiz dorsal. O suporte trófico e estrutural é conferido por células de origem glial: células satélites localizam-se em torno do soma celular, enquanto que células de Schwann envolvem o tronco axonal (BYERS & BONICA, 2001).

Em mamíferos, Rexed (1964) estabeleceu um arranjo laminar para a organização morfológica da substância cinzenta espinal, o qual foi determinado a partir do tamanho, forma e densidade dos corpos neuronais. De acordo com essa organização, as lâminas I-IV são regiões de entrada, aonde chegam os aferentes primários cutâneos ou seus colaterais. As lâminas V e VI recebem terminais proprioceptivas e projeções supra-espinais. Muitas vias descendentes convergem sobre a lâmina VII. A lâmina VIII é formada principalmente por interneurônios. Os neurônios motores estão contidos na lâmina IX. E por fim, a lâmina X localiza-se ao redor do canal central, contendo muitos neurônios comissurais.

Em vertebrados não-mamíferos diversos estudos demonstraram que os componentes básicos anatômicos, fisiológicos e biológicos da percepção da dor são similares aos dos mamíferos. Porém, a medula espinal de muitos desses vertebrados não-mamíferos não apresenta o arranjo laminar; contudo

as conexões e distribuições neuronais são funcionalmente relacionadas com aquelas dos mamíferos.

3. Organização da Medula Espinal em Anfíbios

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 (ADLI et al., 1988; PARTATA et al., 2002).

A rã, *Rana catesbeiana*, pertencente à família Ranidae, é um anfíbio aquático resistente às baixas temperaturas. É uma espécie típica da região norte dos Estados Unidos, sendo popularmente conhecida como rã-touro (STORER et al., 1984). No Brasil, foi introduzida com o objetivo de comercialização de sua carne, que apresenta boa qualidade nutricional. Devido a isso, esses animais são facilmente obtidos através das inúmeras criações em cativeiro.

Nos estudos acerca da nocicepção, as rãs mostram-se um modelo bastante adequado, já que apresentam grande tolerância aos procedimentos empregados e exibe uma recuperação satisfatória devido principalmente a sua grande resistência às infecções (PARTATA et al., 2002)

Apesar da ausência de um arranjo laminar, a medula espinal dos anfíbios apresenta muitas similaridades anatômicas e funcionais com os amniotas (Fig. 1). Ebesson (1976) apud Schotland & Tresch (1997), dividiu a

medula espinal da rã em 6 regiões distintas: uma região dorsal correspondente às lâminas I-IV dos mamíferos; uma região lateral análoga às lâminas V e VI; uma região ventrolateral representativa da lâmina VII; uma zona ventromedial correspondente à lâmina VIII; uma área motora relacionada com a lâmina IX; e uma zona central na medula da rã correspondente à lâmina X de Rexed. Então, a distribuição dos neurônios motores, dos terminais aferentes primários, do trato de Lissauer e, também, dos circuitos reflexos musculares, são semelhantes entre essas classes de vertebrados. Dessa forma, é possível comparar os resultados obtidos dos estudos experimentais em rãs e outros vertebrados não-mamíferos e mamíferos, para, com isso, elucidar em que extensão a organização da medula espinal foi conservada durante a evolução (MUÑOZ et al., 2000).

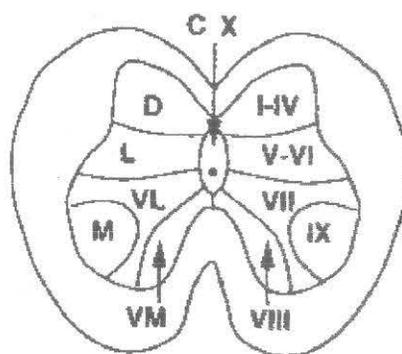


Figura 1. Representação esquemática de uma seção coronal de medula espinal. À esquerda, são mostradas as divisões da substância cinzenta espinal de rã, descritas por Ebesson (1976) apud Schotland & Tresch (1997). À direita, estão representadas as lâminas caracterizadas por Rexed (1964), em gatos. As regiões são correspondentes nas duas classes de vertebrados. D, região dorsal; L, região lateral; VL, região ventrolateral; M, região motora; VM, região ventromotora; C, região central; as lâminas de Rexed (1964) são indicadas pelos números romanos (SCHOTLAND & TRESCH, 1997).

Nos anfíbios, de forma similar ao descrito em mamíferos, o corno dorsal espinal recebe as informações aferentes primárias. Tal região é dividida em neuropilos, dorsal e ventral, também chamados de campo terminal dorsal e campo terminal ventral, respectivamente (Fig. 2). Entre as duas zonas de neuropilo localiza-se a banda mediolateral, a qual se une lateralmente com o trato de Lissauer (ADLI et al., 1988). De acordo com a classificação de Ebesson (1976) apud Schotland & Tresch (1997), a zona correspondente ao corno dorsal localiza-se nas regiões dorsal e lateral (Fig. 1).

As fibras com bainha de mielina espessa, as quais suprem os fusos musculares, terminam no campo terminal ventral, onde podem fazer conexões monossinápticas diretas com os prolongamentos dos neurônios motores espinais, sendo que os corpos celulares destes últimos localizam-se no corno ventral (MEARS & FRANK, 1994). Entretanto, os aferentes sensoriais projetam-se para o campo terminal dorsal, o que ressalta a correspondência desta região às lâminas I-IV dos amniotas (ADLI et al., 1988). É importante salientar que as duas regiões de neuropilo do corno dorsal não apresentam áreas de sobreposição, o que facilita a análise da especificidade topográfica dos terminais aferentes após lesões de axônios sensoriais periféricos (MEARS & FRANK, 1994).

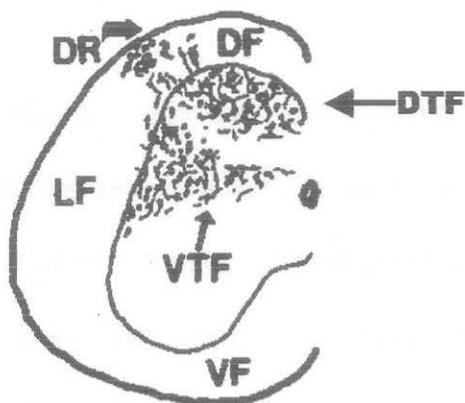


Figura 2. Representação esquemática de uma hemiseção da medula espinal de rã, mostrando as principais regiões do corno dorsal. DR, raiz dorsal; DF, funículo dorsal; LF, funículo lateral; VF, funículo ventral; DTF, campo terminal dorsal; VTF, campo terminal ventral (modificado de ADLI et al., 1988).

Nos anfíbios, de forma similar ao observado em mamíferos, o corno dorsal da medula espinal apresenta uma grande diversidade de neurotransmissores e peptídeos, os quais provavelmente também estão envolvidos nos mecanismos de codificação e transmissão nociceptivas. Porém, muito pouco é conhecido acerca do papel funcional dessas substâncias (LOREZ & KEMALI, 1981; ADLI, 1988; PETKÓ & SANTA, 1992; PARTATA, 2002).

Pode-se inferir que as rãs utilizam os mesmos neurotransmissores que estão envolvidos na transmissão nociceptiva de mamíferos. Porém, é evidente a necessidade de estudos complementares utilizando outras substâncias químicas. Todavia, a rã pode ser considerada um modelo útil para o estudo da nocicepção.

4. NADPH-diaforase

Os métodos de estudo regionais do sistema nervoso permitem o estabelecimento das relações estrutura função, as quais são importantes para o entendimento do funcionamento deste tecido e permitem maiores inferências evolutivas por relacionar áreas homólogas e análogas. Entre a diversidade de substâncias químicas empregadas nesses estudos, pode-se citar a NADPH-diaforase (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfatase diaforase).

O método para a demonstração da atividade da NADPH-diaforase na medula utiliza β -NADPH como substrato e azul de nitrotetrazólio como aceptor de elétrons. A redução do azul de nitrotetrazólio resulta na formação de um produto chamado formazan, o qual produz uma coloração azul escura e insolúvel nas regiões que possuem a enzima NADPH-diaforase. A técnica inicial foi desenvolvida por Thomas & Pearse, em 1961, os quais demonstraram a presença desta enzima em neurônios corticais e em células dos gânglios basais. Posteriormente, outros estudos evidenciaram sua atividade em diversas regiões do tecido nervoso (ABE et al., 1963; DUCKETT & PEARSE, 1964; THOMAS & PEARSE, 1964; SHIMIZU & ABE, 1966; SIMS et al., 1974).

Atualmente cresceu o interesse por esta enzima. Isto se deve ao conhecimento de que sua atividade é preservada após a fixação dos tecidos em paraformaldeído (MATSUMOTO et al., 1993a) e pela demonstração de que ela é um óxido nítrico sintase (NOS), a enzima responsável pela síntese do óxido nítrico (HOPE et al., 1991). Deste modo, a simples técnica para a detecção da NADPH-diaforase permite a localização de células capazes de sintetizar o óxido nítrico (NO), muito embora a distribuição de ambas as enzimas não seja totalmente coincidente. O óxido nítrico é um gás formado por

um átomo de nitrogênio e um átomo de oxigênio, os dois elementos mais comuns na natureza, que cumpre diferentes funções no organismo (LOPÉZ-JARAMILHO, 2001).

A demonstração da produção de NO é ainda difícil, sendo sempre realizada de maneira indireta; aliás, todas as pesquisas pioneiras não demonstraram o NO propriamente dito, devido a sua evanescência, considerando-se a concentração de nitrito e nitrato como prova de sua produção.(FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). Muitas células são capazes de sintetizar o NO através de hemeoproteínas da família do citocromo P450, chamadas de NOS. As NOS são dependentes de O₂, flavinas, bipterinas e NADPH para exercer sua atividade. O óxido nítrico é um radical livre resultante da oxidação do grupo guanidina da L-arginina, que é regulada pelo complexo cálcio-calmodulina. Esta enzima utiliza como substratos o oxigênio e o NADPH, onde o oxigênio é incorporado ao óxido nítrico e ao grupo ureído da L-citrulina, o outro produto desta reação, enquanto o NADPH parece estar envolvido na formação da N-hidroxi-L-arginina (GROZDANOVIC et al., 1994). Alguns tipos celulares necessitam de cálcio como um co-fator. A reação global de síntese do óxido nítrico está representada na figura 3.

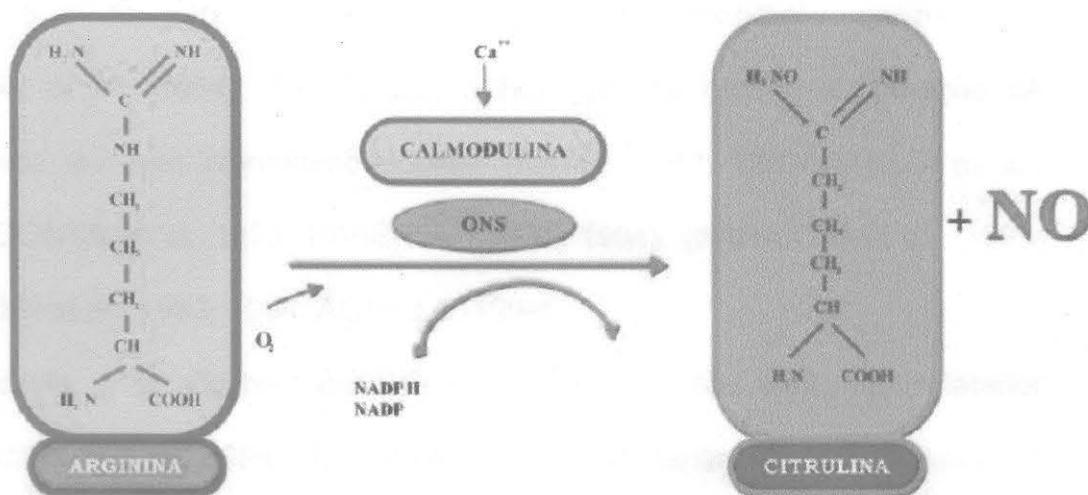


Fig. 3. Via Óxido Nítrico: L-arginina (Patrício Lopez-Jaramilho, 2001)

As funções do NO até hoje descobertas são complexas e antagônicas. Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica, conforme a concentração ou depuração tecidual. Ele é um importante mensageiro intercelular nos mamíferos superiores. GARTHWAITE et al., 1988 demonstraram que o NO foi liberado de terminais axionais após a propagação de potenciais de ação, e agiu sobre moléculas receptoras localizadas em células pós-sinápticas. Seu mecanismo de sinalização intercelular é, em geral, exercido diretamente em nível intracelular devido a sua alta difusibilidade, sem receptores transmembrana. (LOPEZ-JARAMILHO, 2001).

O grande interesse atual pelo óxido nítrico decorreu da demonstração de que esta molécula atua como um neurotransmissor e/ou neuromodulador no sistema nervoso central. Diversos estudos sugeriram que o NO pode afetar a captação de neurotransmissores, visto que substâncias doadoras dessa molécula inibiram o transporte de dopamina, serotonina e glutamato marcados,

mas não o de adrenalina, em preparações de sinaptossomas estriatais (POGUN et al., 1994). Além disso, o NO parece regular a liberação de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise (KATO, 1992; CECCATELLI et al., 1993; COSTA et al., 1993; RIVIER & SHEN, 1994). (KARANTH et al., 1993; RETTORI et al., 1993; 1994; AGUILLA, 1994).

Todavia, a função bem definida para o NO é o seu efeito vasodilatador (FARACI & BRIAN, 1994). Em encéfalo, o óxido nítrico parece influenciar o fluxo sanguíneo cerebral local, acoplado às necessidades neuronais (GARTHWAITE & BOULTON, 1995).

É proposto que o organismo utiliza o NO em funções fisiológicas em que é necessária resposta rápida, como a dor. (FILHO-ZILBERSTEIN, 2000). Em relação a este tema está demonstrado que o NO possui ações pró-nociceptivas e anti-nociceptivas. Sua ação pró-nociceptiva parece ser decorrente de sua capacidade de induzir hiperalgesia, enquanto seu efeito analgésico parece ser exercido pela inibição tônica que ele exerce sobre a atividade de repouso em neurônios do corno dorsal (FÜRST, 1999). Tem sido sugerido que a dor espontânea após lesões medulares resulta da redução no número de neurônios produtores de NO na medula espinal (TRUDRUNG et al., 2000). Entretanto, para outros autores o efeito benéfico do NO estaria restrito às células capazes de sintetizá-lo, ou seja, aquelas que possuem enzima NOS, sendo sua ação deletéria nos neurônios que não apresentam esta enzima e exibem ainda receptores glutamatérgicos do tipo NMDA em sua membrana (XU, et al., 2000).

É sabido que a enzima NADPH-diaforase e NOS no sistema nervoso central de anfíbios (MUÑOZ et al., 1996; MUÑOZ et al., 2000; BRÜNING &

MEYER, 2001). Muitas das áreas encefálicas reativas estão sabidamente envolvidas com os mecanismos da nocicepção nesses animais. Como ainda existem muitas questões não respondidas a cerca do papel do NO no tecido nervoso e na nocicepção, este estudo pretendeu trazer subsídios aos mecanismos da transmissão nociceptiva realizando o mapeamento da enzima NADPH-diaforase na medula espinal de rãs *Rana catesbeiana*, cuja distribuição ainda era desconhecida, visando à comparação destes com aqueles da literatura que sabidamente estão envolvidos com a nocicepção. Estes resultados fornecerão subsídios adicionais para a compreensão dos mecanismos químicos envolvidos no processo de nocicepção, tanto sob um ponto de vista evolutivo quanto para o esclarecimento de muitas questões ainda especulativas em mamíferos.

OBJETIVOS

Com o intuito de ampliar o conhecimento vigente acerca das alterações anátomo-temporais ocorridas na medula espinal de rãs *Rana catesbeiana*, adultas, em relação à atividade de substâncias químicas participantes do processamento nociceptivo, este trabalho tem como objetivo:

- Determinar, mediante o emprego de técnica histoquímica, o padrão de distribuição da enzima NADPH-diaforase em secções coronais de GRD e medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* adultas, de ambos os sexos, em condições basais.

MATERIAL E MÉTODOS:

1. Animais: Procedência e Manutenção

Foram utilizados rãs *Rana catesbeiana*, adultas, de ambos os sexos, com peso médio entre 100-200 g. Os animais foram obtidos do ranário Ranasul (Imbé, RS) e mantidos no laboratório de Neurobiologia Comparada, do Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. No laboratório, as rãs foram colocadas em aquários contendo 2 cm de água destilada. Para a alimentação foi oferecida ração apropriada *ad libitum*. A limpeza dos aquários foi efetuada diariamente após a alimentação dos animais. A temperatura da sala foi mantida em aproximadamente 25°C. Após um período de adaptação às condições do laboratório (uma semana), os animais foram utilizados para o estudo de mapeamento da atividade NADPH-diaforase em GRD e medula espinal lombossacral.

2. Obtenção do Tecido Nervoso

Para a obtenção do tecido nervoso, os animais foram descerebrados e submetidos a uma perfusão intracardíaca. Para isso, o coração e o cone arterial foram isolados. A formação de coágulos na árvore vascular foi prevenida pela administração intraventricular de 1000 UI/kg de heparina (Liquenine®, Roche). Após, foi realizada uma incisão no ventrículo para a colocação da cânula no cone arterial, a mesma foi fixada por uma pinça

hemostática, e deixou-se passar pelo sistema 100 ml de solução salina para a lavagem da árvore vascular. Imediatamente após a fixação da pinça e o início da passagem de solução salina na aorta, foi feita uma incisão no átrio direito funcionando como uma saída para todo o sistema sangüíneo e de perfusão. Ao término da lavagem, 100 ml de solução de paraformaldeído 4% (Reagen), diluído em tampão fosfato 0,1 M. pH 7,4 (TP), foi passada pelo sistema para a fixação dos tecidos. Terminada a perfusão, o GRD e a medula espinal lombossacral foram retirados e colocados em solução de paraformaldeído 4% diluído em TP por 4 horas, à temperatura ambiente, para pós-fixação dos tecidos. Após esse procedimento, os tecidos nervosos foram crioprotetidos em soluções de sacarose 15 e 30 %, diluídas em TP, e mantidos a 4°C "overnight". No dia seguinte, foram realizadas secções coronais de 50µm em criostato (Leitz 1720) no Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Os cortes foram coletados em frascos de vidro contendo tampão fosfato salino (PBS) a 4°C, sendo, em seguida, submetidos à técnica histoquímica da NADPH-diaforase

3. Procedimento Histoquímico

A atividade da enzima NADPH-diaforase foi demonstrada pela técnica descrita por Valtschanoff et al. (1992). Os cortes "free-floating" dos animais foram colocados em solução 0,02% de Triton X-100 diluída em TP 0,1 M, pH 7,4, por 8 minutos, sob agitação contínua (agitador orbital Fanen). Ao término deste período, esta solução foi substituída pelo meio de incubação, o qual continha 0,5mg/ml de β -NADPH (Sigma), 0,2mg/ml de azul de nitrotetrazólio (Sigma) e tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4 contendo 12 µl de triton

X-100. Neste meio os cortes foram pré-incubados, em agitação constante, por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo em seguida, colocados à 37°C, onde permaneceram por 4 horas. Após isto os cortes foram lavados 3 vezes em TP, coletados em lâminas gelatinizadas, desidratados em álcoois de concentrações crescentes, clareados em xilol e cobertos com Bálsamo do Canadá e lamínulas.

Os cortes foram examinados e fotografados através do fotomicroscópio NIKON OPTIPHOT-2 equipado com câmera fotográfica NIKON FX-35DX. Essa etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Análises de Imagens, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

RESULTADOS

O estudo dos cortes do GRD e da medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* com a técnica da NADPH-diaforase mostrou reação positiva em somas e prolongamentos neuronais, a qual aparecia como uma coloração azul violácea. A área nuclear sempre foi negativa a este tratamento histoquímico. A densidade de fibras e neurônios positivos foram similares em ambos os lados da medula espinal e do GRD. Esta reatividade também estava presente no neuropilo e nas células endoteliais das regiões estudadas (Fig. 8B). Os cortes controle sempre se mostraram negativos.

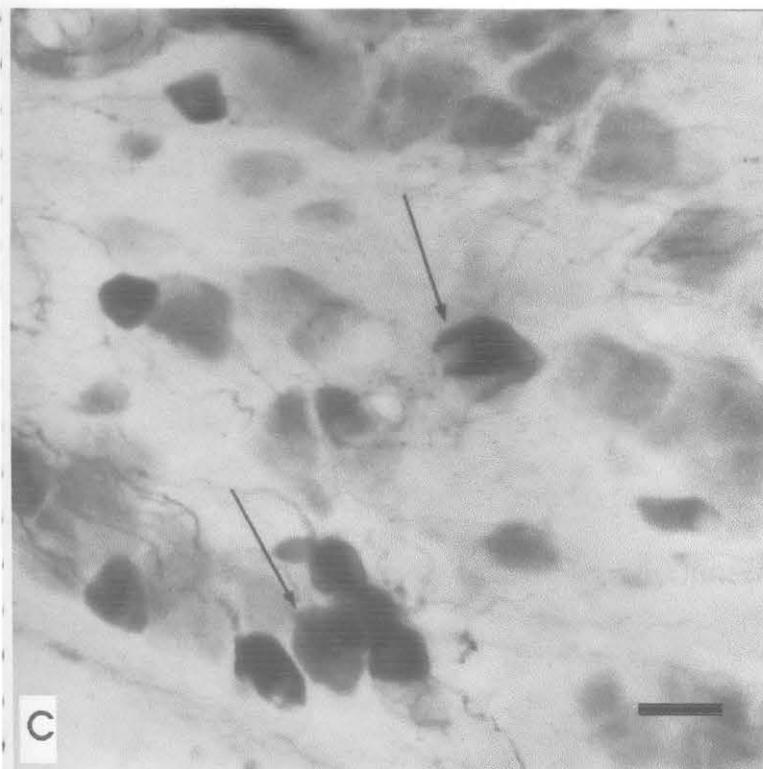
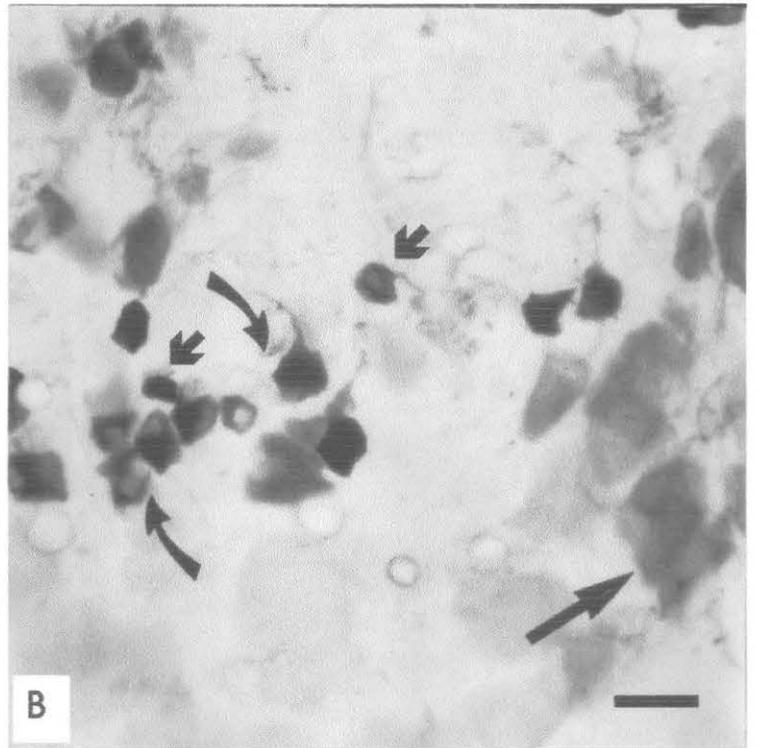
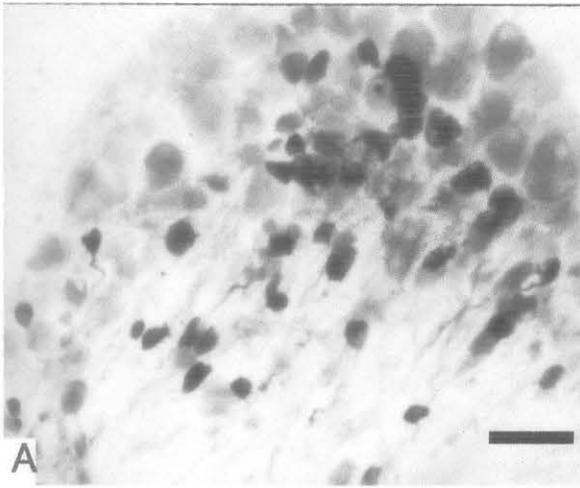
No gânglio da raiz dorsal (Fig. 4), a reação a NADPH-diaforase predominou em somas neuronais de grande (35-50 μm) e de médio (20-35 μm) diâmetro. Estes neurônios apareciam em grande quantidade e aqueles de diâmetro grande, em sua maioria, exibiam reação de intensidade fraca a moderada, enquanto aqueles de diâmetro médio possuíam quase sempre reação de forte intensidade. A NADPH-diaforase também foi observada em somas neuronais de pequenos diâmetros (10-20 μm), porém esses neurônios ocorreram em pouca quantidade, mas exibiram sempre reação de forte intensidade.

Na medula espinal (Fig. 5), a enzima NADPH-diaforase ocorreu nos cornos dorsal e ventral, sendo a reação exibida pelo corno dorsal maior do que aquela do corno ventral. No corno dorsal, uma forte reação a NADPH-diaforase ocorreu em fibras localizadas no campo terminal dorsal (Fig. 6). Neurônios com forte positividade à técnica da NADPH-diaforase foram observados na região da banda mediolateral e do campo terminal ventral (Figs. 5 e 7). Na região da banda mediolateral esses neurônios estavam localizados principalmente na

região mediana da medula e na junção entre banda mediolateral e campo terminal dorsal (Fig. 7B). Aqueles do campo terminal ventral distribuíam-se por toda esta região. Esses neurônios foram sempre do tipo "bitufted". De seu soma podia-se observar a emergência de dois prolongamentos opostos, os quais podiam ser acompanhados por algumas distâncias em alguns casos (Fig. 7A e C). Esses prolongamentos neuronais permaneciam, algumas vezes, somente no lado ipsilateral da medula espinal e podiam seguir-se em direção ao campo terminal dorsal, ao campo terminal ventral e ao funículo lateral. Já outros desses neurônios "bitufted" tinham prolongamentos que pareciam dirigir-se ao lado contralateral da medula espinal. Estes neurônios possuíam diâmetro médio de 10 μm .

No corno ventral, a reação a NADPH-diaforase ocorreu em neurônios localizados nas porções dorsal e ventromediais do corno ventral, os quais foram do tipo "bitufted" e piramidal, exibindo diâmetro médio de 10 μm (Fig. 5). Seus prolongamentos positivos dirigiam-se ao campo terminal ventral, à região onde estavam localizados os neurônios motores e ao corno ventral contralateral. A intensidade dessa reação foi sempre intensa. Cabe destacar que os neurônios motores mostraram-se negativos a este tratamento histoquímico.

A reação a NADPH-diaforase ainda ocorreu no funículo lateral, principalmente em sua porção dorsal, onde se mostrou com forte intensidade, a qual ia diminuindo à medida que se afastava dessa região do funículo lateral (Fig. 5 e 8B). Outras fibras reativas foram encontradas no funículo ventral, sendo o seu número menor do que aquele do funículo lateral (Fig. 8A). O funículo dorsal mostrou-se negativo a este tratamento histoquímico (Fig. 5).



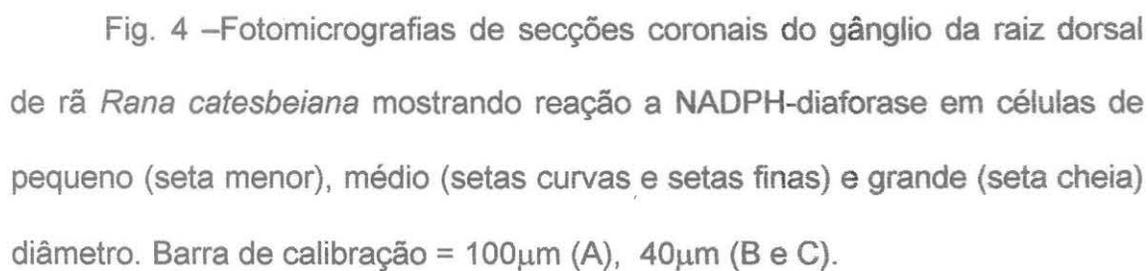


Fig. 4 –Fotomicrografias de secções coronais do gânglio da raiz dorsal de rã *Rana catesbeiana* mostrando reação a NADPH-diaforase em células de pequeno (seta menor), médio (setas curvas e setas finas) e grande (seta cheia) diâmetro. Barra de calibração = 100 μ m (A), 40 μ m (B e C).

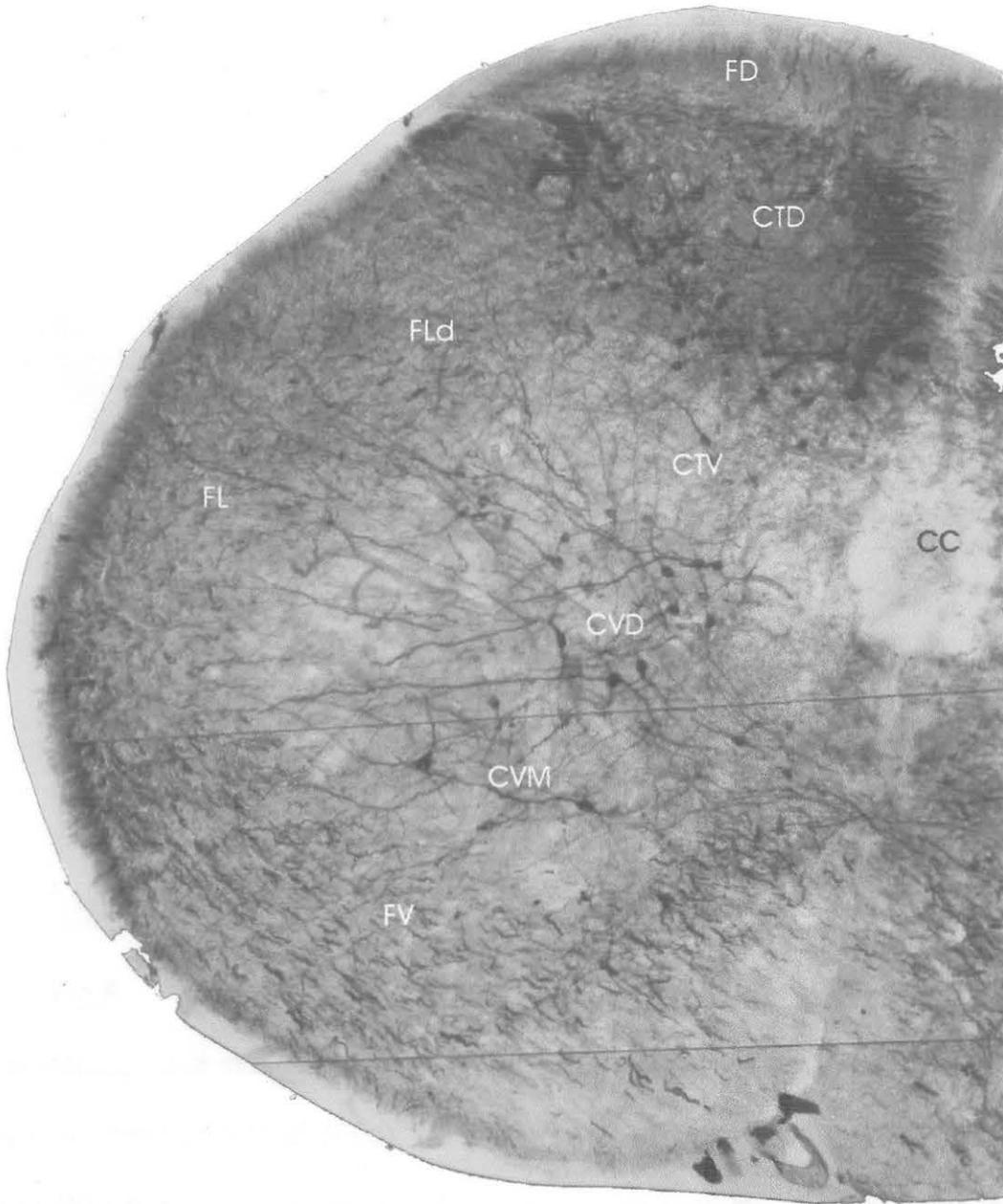


Fig.5 – Fotomontagem de uma hemiseção de medula espinal de rã *Rana catesbeiana* mostrando reação a NADPH-diaforase em fibras da porção dorsal do funículo lateral (FLd), do campo terminal dorsal (CTD), do funículo lateral (FL) e do funículo ventral (FV). Neurônios reativos são observados na região da banda mediolateral (BML), no campo terminal ventral (CTV) e corno ventral (CV). CC= canal central; FD = funículo dorsal.

Barra de calibração = 40 μm

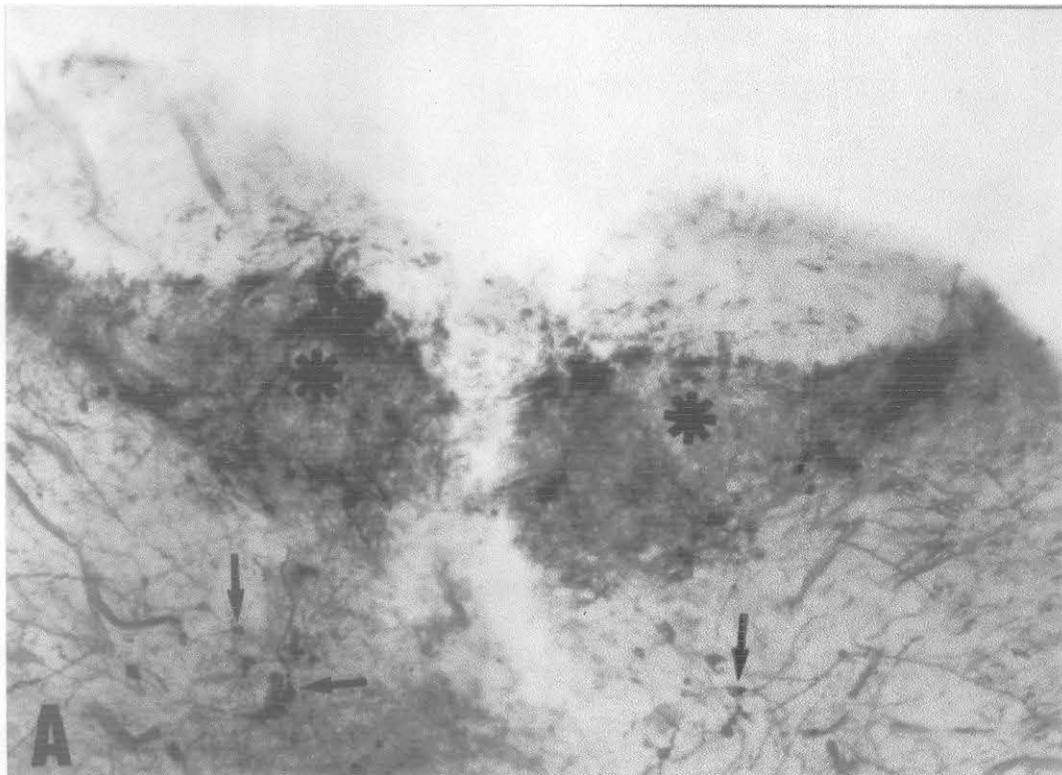
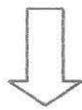
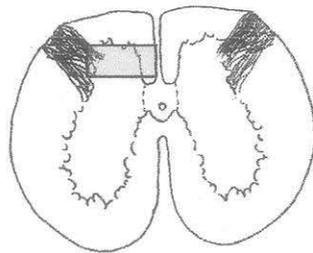




Fig.6 – Fotomicrografia de secção coronal da medula espinal de rã *Rana catesbeiana* mostrando reação a NADPH-diaforase nos campos terminais dorsais (asteriscos). As setas indicam neurônios reativos da banda mediolateral.

Barra de calibração= 40 μm .

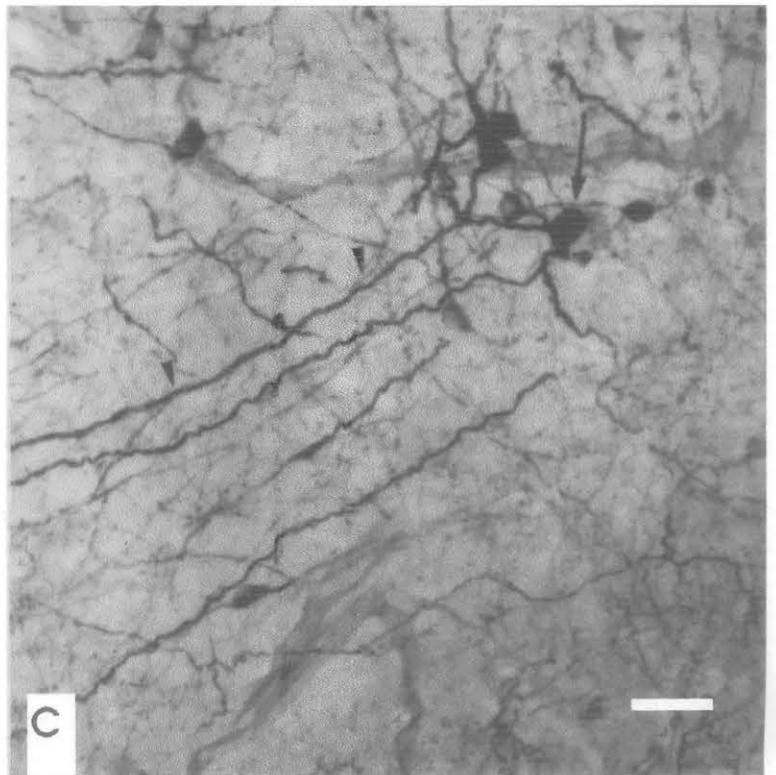
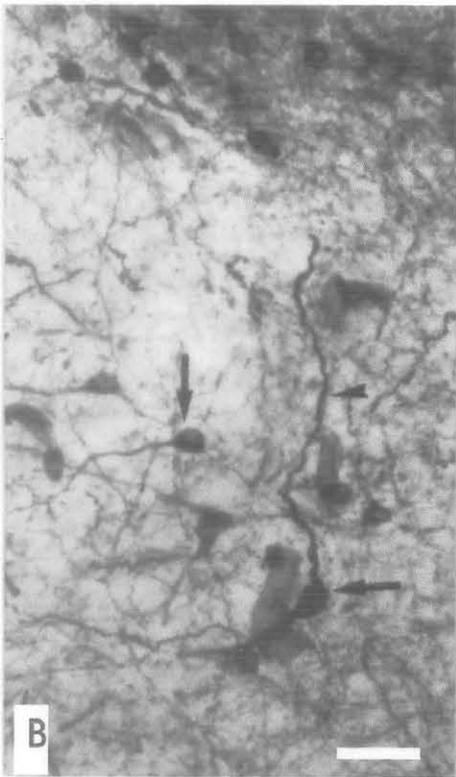
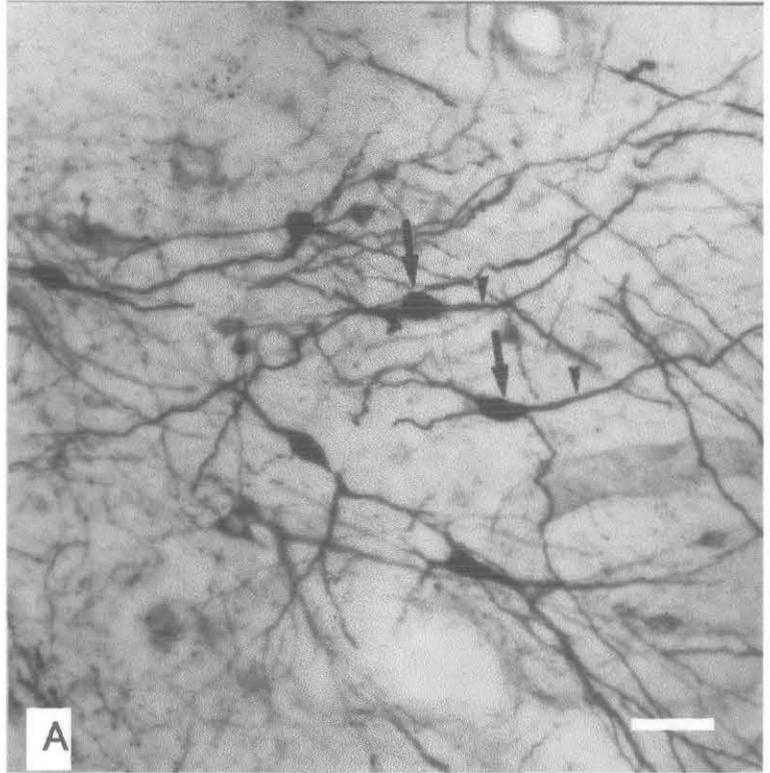
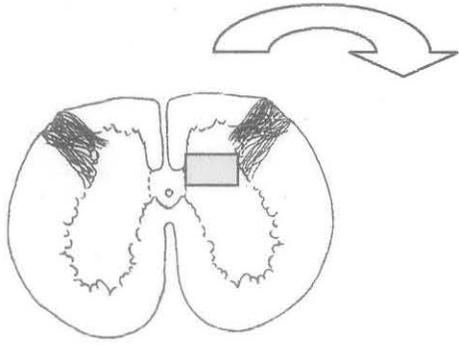


Fig.7 – Fotomicrografia de secções coronais da medula espinal de rã *Rana catesbeiana* mostrando reação a NADPH-diaforase em neurônios (setas) do campo terminal ventral (A e C) e da banda mediolateral (B).

Barra de calibração= 40 μm

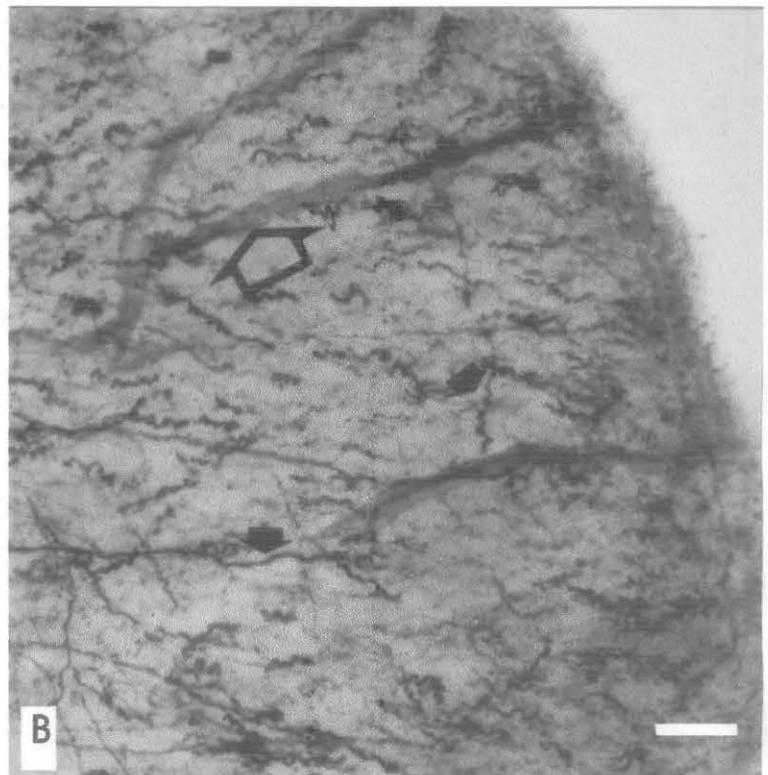
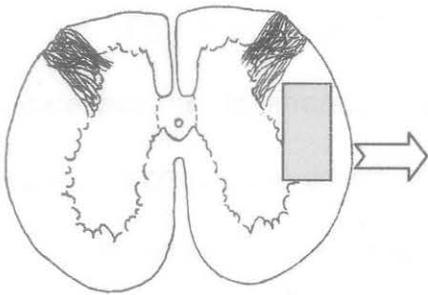
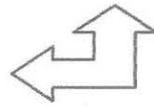
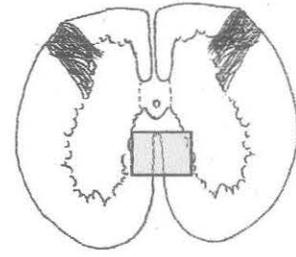
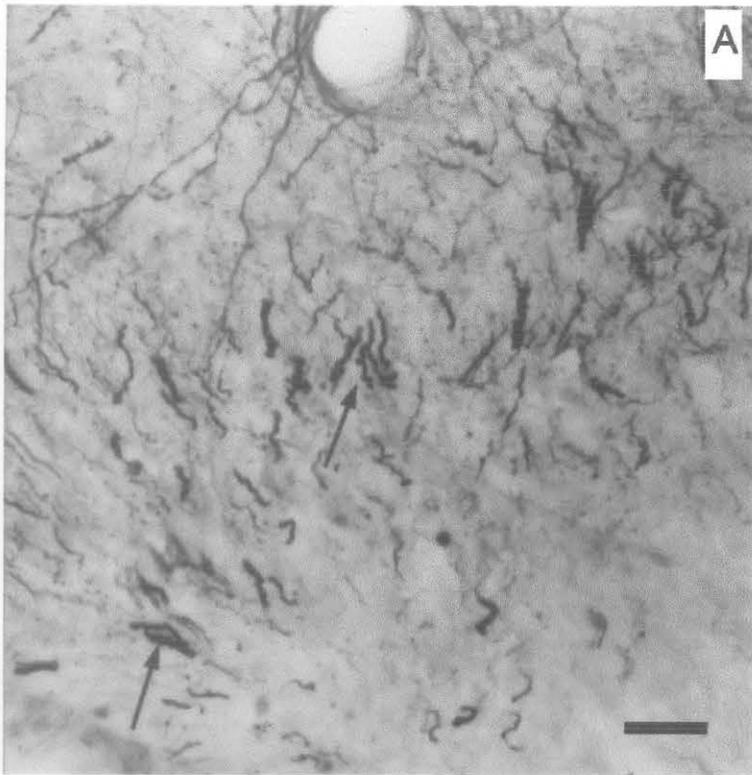


Fig.8 –Fotomicrografia de secções coronais da medula espinal de rã *Rana catesbeiana* mostrando reação a NADPH-diaforase em fibras (setas finas e grossas pequenas) do funículo ventral (A) e do funículo lateral (B). A seta maior vazada indica um vaso reativo a esta enzima.

Barra de calibração = 40 μm

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a ampla distribuição da enzima NADPH-diaforase no GRD e na medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana*, adultas, em condições basais. Como já foi demonstrado que esta enzima é uma NOS (HOPE et al., 1991), pode-se inferir que este mapa representa a distribuição de neurônios nitrérgicos no GRD e na medula espinal desta espécie de rã. Esta afirmação é decorrente também do fato de que, em *Rana perezi*, a distribuição da enzima NADPH-diaforase, em animais em condições basais, foi igual àquela da NOS, o que sugere colocalização destes dois marcadores no tecido nervoso deste animal (MUÑOZ et al., 2000). Esta parece também ser a situação em mamíferos em estado fisiológico normal, havendo, entretanto, nesses animais, divergências na distribuição destas duas enzimas quando os animais foram submetidos a diferentes condições experimentais (CALLSEN-CENCIC et al., 1999). Contudo, como no presente estudo os animais estavam em situação basal, os neurônios positivos à técnica histoquímica da NADPH-diaforase serão considerados como capazes de sintetizar NO, ou seja, neurônios nitrérgicos.

Cabe ser ressaltado neste momento que o padrão de distribuição da NADPH-diaforase, tanto no GRD como na medula espinal, mostrou-se similar àquele descrito em outras espécies de rãs (MUÑOZ et al., 1996; MUÑOZ et al., 2000), mamíferos (ANDERSON, 1992; VALTSCHANOFF et al., 1992; ZHANG et al., 1993), tartarugas (PARTATA, 1996) e peixes (BRÜNING et al., 1995; ARÉVALO et al., 1995). Essa similaridade de distribuição de neurônios nitrérgicos nestes tecidos nervosos de diferentes classes de vertebrados

permite sugerir que o aparecimento da capacidade de síntese do NO ocorreu muito cedo na evolução dos vertebrados, e se manteve durante todo o processo evolutivo. Como o NO parece envolvido nos mecanismos da nocicepção, hiperalgesia e sensibilização central (FÜRST, 1999; TRUDRUNG et al., 2000; MAISKY et al., 2002), dentre outras funções, pode-se inferir que estas suas ações também tenham aparecido precocemente durante a evolução dos vertebrados.

A presença de numerosos neurônios nitrérgicos, principalmente de médio diâmetro, no GRD de rãs parece ser uma característica comum destes animais, pois outras espécies de rãs também apresentaram essa reatividade neste local (CROWE et al., 1995; GONZÁLEZ et al., 1996). Esta também é a situação em mamíferos (ZHANG et al, 1993).

A presença de fibras e neurônios nitrérgicas nas regiões do campo terminal dorsal, região análoga às lâminas I-IV dos amniotas (MEARS & FRANK, 1994), no campo terminal ventral, que corresponde às lâminas V-VI dos amniotas, e na porção dorsal do funículo lateral, que, de acordo com a literatura específica, inclui o trato de Lissauer nos anfíbios (ADLI et al., 1988), sugere um papel para o NO no processamento de informações somatossensoriais na medula espinal de rãs, tal qual como foi sugerido para os mamíferos (ZHANG et al, 1993). Um outro fator que sustenta esta hipótese é a grande quantidade de somas neuronais nitrérgicas no GRD de rãs, muito embora deve também ser considerada a possibilidade de que a molécula de NO destes neurônios pode estar agindo como um mensageiro entre estes e suas células satélites. Em mamíferos, o NO parece desempenhar esta função (MORRIS et al., 1992).

Nas rãs, como em outros vertebrados (ANDERSON, 1992; VALTSCHANOFF et al., 1992; ZHANG et al, 1993; BRÜNING et al., 1995; ARÉVALO et al., 1995; MUÑOZ et al., 1996; PARTATA, 1996; MUÑOZ et al., 2000), neurônios nitrérgicos foram observados nas regiões profundas do corno dorsal, muitos destes estando localizados acima do canal central, ou seja, na região da comissura cinzenta dorsal. Muitos exibiam prolongamentos neurais que se estendiam bilateralmente na medula espinal ou dirigiam-se para as camadas superficiais e laterais desta região. Estas características permitem inferir a possibilidade de participação do NO em funções intrínsecas da medula espinal de rãs. No entanto, estudos de marcação de vias seriam necessários para elucidar esta hipótese. Porém, como em mamíferos o NO é uma das moléculas de sinalização de vias propioespinais (ANDERSON, 1992; VALTSCHANOFF et al., 1992; ZHANG et al, 1993; BRÜNING et al., 1995; ARÉVALO et al., 1995), e dada às semelhanças entre as respostas fisiológicas destes e as rãs, esta hipótese parece plausível. É possível também que alguns destes neurônios reativos possam originar vias propioespinais. De acordo com MUÑOZ et al. (1996; 1997), os neurônios profundos do corno dorsal poderiam originar tratos espinais e serem os responsáveis por algumas conexões intersegmentais na medula espinal de rãs.

É preciso considerar ainda a possibilidade de que neurônios nitrérgicos localizados na porção ventral do campo terminal dorsal podem ser neurônios da substância cinzenta intermediolateral, o que, se for o caso, fazem parte do sistema nervoso neurovegetativo. A presença dessas células simpáticas e parassimpáticas, nesta região da medula espinal, já foi demonstrada em anuros (PERUZZI & FOREHAND, 1993; CAMPBELL et al., 1994). No entanto,

a comparação dos resultados do presente estudo com estes da literatura não possibilitou a emissão de uma afirmativa. A localização das células nitrérgicas não foi totalmente coincidente com a localização proposta para os neurônios pré-ganglionares simpáticos e parassimpáticos. Assim, permanece esta incerteza. No entanto, se for levado em consideração os resultados dos estudos de distribuição da atividade nitrérgica na substância cinzenta intermediária da medula espinal de mamíferos, esta hipótese merece consideração. Nesses animais, resultados farmacológicos sugerem o envolvimento do NO na transmissão sináptica de gânglios simpáticos, bem como sua presença em neurônios de núcleos espinais neurovegetativos (AIMI et al., 1991; BRIGGS, 1992). Assim, estudos adicionais são necessários para o esclarecimento desta questão.

É curiosa também a presença de neurônios nitrérgicos no corno ventral de rãs. Se for considerada sua localização, tamanho e morfologia, estes podem ser classificados como interneurônios. Como muitas destas células emitiam extensos prolongamentos em direção aos neurônios motores e ao lado contralateral do corno ventral, é provável que o NO liberado por estes terminais possa modular a motricidade nesses animais. Neurônios nitrérgicos com estas mesmas características morfológicas e localização foram descritos no corno ventral de mamíferos (VALTSCHANOFF et al., 1992; MARSALA et al., 1999), e não mamíferos (RADMILOVICH et al., 1997; SMEETS et al., 1997; BRÜNING, 1994; BRÜNING et al., 1995; ARÉVALO, 1995), inclusive em outras espécies de rãs (GONZÁLEZ et al., 1996; MUÑOZ et al., 1996; MUÑOZ et al., 2000), o que torna esta provável função do NO uma possível característica funcional de vertebrados. Cabe salientar neste momento que todos os autores acima

citados também não observaram a presença de reatividade a NADPH-diaforase em neurônios motores do corno ventral, o que sugere também ser esta uma outra característica de vertebrados. Todavia, há uma complicação em relação a esta hipótese. CROWE et al. (1995) descreveram a presença de atividade NADPH-diaforase em somas neuronais motores da medula espinal de *Xenopus laevis*. No entanto, um estudo recente, no qual foi empregada esta mesma espécie de anfíbio, os autores não observaram esta reatividade em somas de neurônios motores (BRÜNING & MEYER, 2001). É difícil explicar esta divergência de resultados, porém, deve ser destacado que nos dois estudos os animais foram perfundidos com paraformaldeído e o meio de incubação divergiu em relação às quantidades dos substratos. Assim, se for considerado os resultados do primeiro estudo, os mesmos indicam uma diferença no padrão de atividade nitrérgica de neurônios motores da medula espinal de anfíbios. Já os resultados do segundo estudo favorecem a hipótese inicialmente apresentada. Contudo, parece ser necessário o estudo da distribuição da atividade nitrérgica em medula espinal de uma maior diversidade de espécies de vertebrados para a aceitação ou rejeição desta hipótese.

É interessante que muitas destas regiões reativas a NADPH-diaforase na rã *Rana catesbeiana* foram imunorreativas à substância P, somatostatina, peptídeo semelhante ao gene da calcitonina (CGRP), neuropeptídeo Y e GABA, os quais sabidamente participam dos mecanismos de codificação e transmissão nociceptivas (PARTATA et al., 2002; GUEDES, 2002). As áreas que sempre mostraram positividade a estes dois tipos de tratamentos foram à porção dorsal do funículo lateral, o campo terminal dorsal e a banda mediolateral, todas regiões com características sensoriais e, ao que parece

envolvida com a nocicepção em anuros. Este fato salienta a possível participação do NO nos mecanismos nociceptivos desses animais, uma vez que este padrão de distribuição nitrérgica foi comum entre as diferentes espécies de rãs estudadas até o presente momento. Também evidencia a possível existência de colocalização do NO com estes neuropeptídeos e GABA. Colocalização de GABA e NO já foi demonstrada em medula espinal de mamíferos (SPIKE et al., 1993), porém, estudo similar ainda não foi realizado nos anfíbios. No entanto, é interessante o fato de que o diâmetro médio dos neurônios reativos a NADPH-diaforase da banda mediolateral foi similar àqueles imunorreativos ao GABA nesta mesma região (GUEDES, 2002). Assim, a possibilidade de colocalização de GABA e NO nessas células de rãs parece uma hipótese razoável. Considerando ainda o tamanho, muito destes neurônios nitrérgicos poderiam conter também somatostatina e neuropeptídeo Y, hipótese que poderia ser avaliada mediante a utilização da técnica imunistoquímica para dupla marcação, o que é um objetivo para trabalhos futuros do laboratório de Neurobiologia Comparada. Porém, em virtude das semelhanças morfofuncionais entre rãs e mamíferos, pode-se considerar muito viável esta hipótese, pois em mamíferos muitos neurônios nitrérgicos do córtex cerebral e do estriado apresentaram também imunorreatividade a somatostatina e ao neuropeptídeo Y. Em rãs, colocalização de GABA e neuropeptídeo Y ocorreu em neurônios da região do teto encefálico (KOZICZ & LÁZÁR, 2001). Assim, torna-se necessário à realização de estudos adicionais acerca deste tema.

Cabe neste momento salientar que a associação espacial entre fibras contendo substância P e CGRP com neurônios reativos a NADPH-diaforase foi

demonstrada no corno dorsal da medula espinal de mamíferos (HERDEGEN et al. 1994). Esta associação também poderia estar acontecendo no corno dorsal da medula espinal de rã, uma vez que a região da banda mediolateral é uma área com intensa quantidade de fibras contendo substância P (PARTATA et al., 2002) e onde ocorreu inúmeros neurônios nitrérgicos. O campo terminal dorsal, principal local de finalização de aferentes primários (MEARS & FRANK, 1994), bem como a porção dorsal do funículo lateral, que inclui o trato de Lissauer (ADLI et al., 1998) também apresentaram fibras nitrérgicas e imunorreatividade a substância P e ao CGRP. Em mamíferos, HERDEGEN et al. (1994) propuseram que, em situações de dor, ocorreria inicialmente a liberação de NO, substância P e CGRP de aferentes primários, os quais levariam a ativação de genes precoces imediatos em neurônios de segunda e terceira ordem do corno dorsal da medula espinal. A ativação destes genes precoces, por sua vez, aumentaria a expressão do gene da NOS, levando a uma maior produção de NO na medula espinal, o que poderia levar a hiperalgesia e dor mais tardia. Dado ao padrão de distribuição da reatividade a NADPH-diaforase no corno dorsal da medula espinal de rãs, esta seqüência de eventos também poderia estar acontecendo neste animal. No entanto, é interessante que estas mesmas regiões também foram imunorreativas ao GABA e ao neuropeptídeo Y. É proposto, em mamíferos, que a colocalização de NO com GABA e glicina leva a uma ação dupla para esta molécula gasosa, uma vez que GABA e glicina estão envolvidos em analgesia e prevenção de hiperalgesia, enquanto o NO parece envolvido tanto em hiperalgesia como em analgesia (FÜRST, 1999), todavia, o controle iniciaria no próprio neurônio (SPIKE et al., 1993).

Em mamíferos, a maioria dos neurônios contendo GABA e neuropeptídeo Y apresentaram receptores do tipo neurocinina 1, no qual a substância P se liga (POLGÁR et al., 1999). Esta associação levou os autores a sugerirem que o efeito analgésico do neuropeptídeo Y poderia decorrer da ativação desses receptores, uma vez que a ação analgésica deste peptídeo se dá pela inibição pré-sináptica de aferentes nociceptivos, particularmente aqueles que contém substância P (DUGGAN et al., 1991; HUA et al., 1991). Em rãs, a banda mediolateral, local onde ocorreram neurônios imunorreativos ao GABA, neuropeptídeo Y e NADPH-diaforase, possui intensa quantidade de fibras imunorreativas a substância P (PARTATA et al., 2002). Além disso, fibras imunorreativas ao neuropeptídeo Y foram abundantes no campo terminal ventral (GUEDES, 2002), região localizada abaixo da banda mediolateral. Esta organização favorece a hipótese de que as mesmas interações estejam ocorrendo no corno dorsal da medula espinal de rãs.

Assim, fica explícito a necessidade da realização de estudos detalhando as conexões sináptica, bem como as interações químicas no corno dorsal de rãs, não apenas para o conhecimento da organização morfofuncional da medula espinal destes animais, mas também para o esclarecimento de muitas questões químicas ainda desconhecidas ou especulativas nos mamíferos. Como a região medular é o principal local de finalização das fibras nociceptivas periféricas, o conhecimento de sua organização morfofisiológica e de suas interações químicas contribuirá também para o desenvolvimento de fármacos com ação analgésica mais efetiva, o que efetivamente proporcionará melhor qualidade de vida a população.

O presente estudo mostra também que o padrão de distribuição da enzima NADPH-diaforase é similar entre as diferentes espécies de anfíbios estudadas e entre estes e as diferentes classes de vertebrados cuja distribuição já é conhecida, salientando, assim, que as funções do NO se desenvolveram precocemente durante o processo evolutivo dos vertebrados. Além disso, a distribuição desta molécula na medula espinal de rãs sugere a participação da mesma no processamento de informação somatossensorial destes animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Adli DSH, Rosenthal BM, Yuen GL, Ho RH, Cruce WLR, 1998. Immunohistochemical localization of substance P, somatostatin, enkephalin, and serotonin in the spinal cord of the northern leopard frog *Rana pipiens*. *J. Comp Neurol*; 275: 106-116.
- Aimi, Y., Fujimura, M., Vincent, SR., Kimura, H. 1991- Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J. Comp. Neurol.* 306: 382-392.
- Anderson, C.A 1992 – NADPH-diaphorase – positive neurons in the rat spinal cord include a subpopulation of autonomic preganglionic neurons. *Neurosci. Lett.* 139: 280-284.
- Arévalo, R; Alonzo, J R; Garcia-Ojeda, E; Brinón, J G; Crespo, C; Aijón, J. 1995- NADPH-diaphorase in the central nervous system of the tench (*Tinca tinca* L. 1758). *J. Comp. Neurol.* 352: 398-420.
- Briggs, CA. 1992- Potentiation of nicotinic transmission in the rat superior cervical sympathetic ganglion effects of cyclic GMP and nitric oxide generators. *Brain Res.* 573: 139-146.
- Brüning, G., KatzBach, R., Mauer, B. 1995- Histochemical and immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the central nervous system of the goldfish *Carassius auratus*. *J. Comp. Neurol.* 358(2): 353-382.
- Brüning, G; Mayer, B. 2001- Nitric oxide synthase in the spinal cord of the frog, *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* 305: 457-462.
- Callsen-Cencic, P; Hoheisel, V; Kaske, A; Mense, S; Tenschert S. 1999- The controversy about spinal neuronal nitric oxide synthase; under which conditions is it up or down- regulated? *Cell Tissue Res.* 295: 183-194.

Campbell, HJ., Beattie, MS., Bresnahan, JC. 1994- Distribution and morphology of sacral spinal cord neurons innervating pelvic structures in *Xenopus laevis*. J.Comp. Neurol. 347: 619-627.

Crowe, M J; Brown, T J; Bressahan, J C; Beattie, M S. 1995- Distribution of NADPH-diaphorase reactivity in the spinal cord of meta morphosing and adult *Xenopus laevis*. Brain Res Dev. Brain Res. 86:155-166.

Duggan, AW., Hope, PJ, Lang, CW. 1991- Microinjection of neuropeptide Y into the Superficial dorsal horn reduces stimulus-evoked release of immunoreactive substance P in the anaesthetized cat. Neurosci. 44: 733-740.

Fajardo, L; Linares, M; Olaya, H.2001- Inflamacion y dolor: cambios en el sistema nervioso periferico y central. Medunab, vol.4, número 10, pag. 1-14.

Furst, S. 1999- Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. Res. Bull 48(2): 129-141. (Review)

Gonzalez, A; Muñoz, A; Muñoz, M; Marin, O; Arévalo, R; Porteros, A; Alonzo, J R. 1996- Nitric Oxide synthase in the brain of a urodele amphibian (*Pleurodeles waltl*) and reation to catecholaminergic neuronal structures. Brain Res. 727: 49-64.

Herdegen, T; Rüdiger, S; Mayer,B; Bravo,R; Zimmermann, M. 1994- Expression of nitric oxide synthase and colocalizationwith Jun, Fos and Krose transcription factors in spinal cord neurons following noxions stimulation of the rat hindpaw. Mol. Brain Res.22: 245-258.

Hope, B.T., G.J.Michael, Knigge, and S.R.Vicent. 1991- Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. Proc. Natl. acad. Sci. U.S.A 88: 2811-2814.

Hua, XY., Boubli, JH., Spicer, MA., Rivier, JE., Brown, MR., Yaksh, TL. 1991- The antinociceptive effects of spinally administered neuropeptide Y in the rat: systematic studies on structures-activity relationship. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 243-248.

Kalueff, A V; Maysky, V A; Pilyavskii, A I; Markarchuk, N E. 2001 - Persistent c- fos expression and NADPH-d reactivity in the medulla and lumbar spinal cord in rat with short-term peripheral anosmia. *Neurosc. Lett.* 301: 131-134.

Kozicz, T.; Lázár, G. 2001- Colocalization of GABA, enkephalin and neuropeptide Y in the tectum of the green frog *Rana esculenta*. *Peptides* 22:1071-1077.

Lopéz-Jaramilho, P. 2001- Oxido nítrico y dolor (artigo de revisão) *Medunab* vol. 4 número 10, pág 1-7.

Marsala, J., Marsala, M., Vanicky, I., Taira, Y. 1999- Localization of NADPHd-exhibiting neurons in the spinal cord of the rabbit. *J. Comp. Neurol.* 406: 263-284.

Maysky, V A; Pilyavskii, A I; Kalezic, I; Ljubisavljevic, M; Kostyukov, A I; Windhorst, U; Johansson, H. 2002- NADPH-diaphorase activity and c-fos expression in medulary neurons after fatiguing stimulation of hindlimb muscles in the rat. *Aut. Neurosc.: Basic chin.* 101: 1-12.

Mears, S.C., Frank, E. 1994-Specific regeneration of cutaneous sensory afferent fibers in the amphibian spinal cord. *Exp. Neurol.* 130: 115-119.

Mizukawa, K; Vincent, S.R; Mcgeer, P.L; Mcgeer, E.G..1989- Distribution of reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate diaphorase-positive cells and fibers in the cat central nervous system. *J.Comp: Neurol.* 279: 281-311.

Morris, R., Southman, E., Braid, DJ. 1994- Nitric oxide may acts as a messenger between dorsal root ganglion neurones and their satellite cells. *Neurosc. Lett.* 137: 29-32

Muñoz, M., Muñoz, A., Marín, O., Alonzo, JR., Arévalo, R. 1996- Topographical distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the frog, *Rana perezii*. *J. Comp. Neurol.* 367: 54-69.

Muñoz, M. Muñoz, A. Gonzalez, A., ten Donkelaar, HJ. 1997- Spinal ascending pathways in amphibians: cells of origin and main targets. *J. Comp. Neurol.* 378: 205-228.

Muñoz M,; Marin O; González A. 2000. Localization of NADPH diaphorase/nitric oxide synthase and coline acetyltransferase in the spinal cord of the frog, *Rana perezii*. *J Comp Neurol*; 419: 451-470.

Partata W; 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 Part B*;131:807-814.

Peruzzi, D., Forehand, C. 1993- Segmental restriction and target specificity of bull frog preganglionic neurons that exhibit galanin-like immunoreactivity. *J.Auton. Nerv. Syst.* 45(3): 201-213.

Pólgar, E; Shehab, S.A.S; Watt, C.; Todd, A.J.1999-GABAergic neurons that contain neuropeptide Y selectively target cells with the neurokinin 1 receptor in the laminal III and IV of the rat spinal cord. *J.Neurosc.* 19: 2637-2646.

Radmilovich, M., Fernandez, A., Trujillo-Cenoz, O. 1997- Localization of NADPH- diaphorase cointaining neurons in spinal cord dorsal horn and spinal sensory ganglia of the turtle *Chrysemys dorbigny*. *Exp. Brain. Res.* 113: 455-464.

Smeets, WJAJ, Alonzo, JR., Gonzales, A. 1997- Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in relation to catecholaminergic neuronal structures in the brain of lizard *Gekko gecko*. J.Comp. Neurol. 377; 121-141.

Spike, R.C.; Todd, A.J; Johnston, H.M.1993- Coexistence of NADPH diaphorase with GABA, glycine and acetylcholine in the rat spinal cord. J.Comp..Neurol. 335: 320-333.

Trudrung, P; Wirth, U; Mense, S. 2000- Changes in the number of nitric oxide-synthesizing neurones on the both sides of a chronic transecctionof the rat spinal cord. Neurosc. Lett. 287: 125-128.

Valtschanoff, J. G., R.J. Weinberg, and A. Rustiono 1992- NADPH-diaphorase in the spinal cord of rats. J. comp. Neurol. 321: 209-222.

Xu, M; Ng, Y-K; Leong, S-K. 2000- Neuroprotective and neurodestructive functions of nitric oxide after spinal cord hemisction. Exp. Neurol. 161: 472-480.

Zhang, X. , Verge. V., Wiensenfeld-Hallin, Z., Ju, G., Brett, B., Snyder, S.H., Hökfelt, T. 1993- Nitric oxide synthase-like Immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. J. Comp. Neurol. 335: 563-575.

Dissertação de Mestrado de Renata Guedes, Dep. Fisiologia, UFRGS. 2002.

Tese de doutorado de Wania Partata, Dep. Fisiologia, UFRGS. 1996.