

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITO DA DESNERVAÇÃO PERIFÉRICA SOBRE O PADRÃO DE
IMUNORREATIVIDADE AO GABA, NEUROPEPTÍDEO Y,
SOMATOSTATINA E CGRP NA MEDULA ESPINAL DE RÃS *RANA*
*CATESBEIANA***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RENATA PADILHA GUEDES

PORTO ALEGRE
2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITO DA DESNERVAÇÃO PERIFÉRICA SOBRE O PADRÃO DE
IMUNORREATIVIDADE AO GABA, NEUROPEPTÍDEO Y,
SOMATOSTATINA E CGRP NA MEDULA ESPINAL DE RÃS *Rana
catesbeiana***

RENATA PADILHA GUEDES

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. **WANIA APARECIDA PARTATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

PORTO ALEGRE
2002

*A minha mãe, Carolina,
pela cumplicidade e imenso
afeto, dedico-lhe esta conquista
como gratidão.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Wania Partata pela grande solicitude, orientação competente e, sobretudo, pelo exemplo de profissionalismo, o qual, certamente, foi um dos mais importantes aprendizados ao longo desse período.

À Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval pela disponibilização de materiais e equipamentos. Agradeço também pelas críticas e sugestões sempre relevantes.

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia Comparada. À Melina pela indispensável colaboração durante a fase experimental. À Maria e à Taís pela receptividade e apoio na “ambientação” ao laboratório. A todos pelo alegre convívio.

Ao Luciano pelo apoio “prático” durante todas as fases do mestrado: disciplinas, prova de qualificação, experimentos... Agradeço também, e principalmente, pela paciência, compreensão e carinhosa presença, aspectos estes que certamente me encorajaram, e encorajam, a prosseguir.

Aos colegas do Laboratório de Histofisiologia Comparada. Ao Giordano pela constante colaboração. À Érica pelo grande “suporte técnico” durante a utilização do *scanner* e pelo empréstimo de materiais. Agradeço a todos pela amizade.

Aos amigos Lúcia e Charles pelas sugestões inteligentes e, especialmente, pela grande amizade. À Letícia por compartilhar angústias e aspirações na fase inicial desse período.

Aos professores do PPG Neurociências pelos ensinamentos e pelo incentivo ao desenvolvimento de um pensamento crítico. À Maria, secretária do curso, pela grande disposição em ajudar.

À CAPES pela bolsa concedida.

Com a certeza de que as dívidas pessoais são impagáveis, deixo a todos meu sincero
MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RELAÇÃO DAS FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
INTRODUÇÃO	01
1. Dor e Nocicepção.....	02
2. Abordagens Experimentais.....	03
3. Fisiologia da Transmissão Nociceptiva.....	05
4. Organização da Medula Espinal em Anfíbios.....	10
5. Neuropeptídeos.....	14
5.1. Neuropeptídeo Y.....	17
5.2. Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP).....	19
5.3. Somatostatina.....	21
6. Ácido γ -aminobutírico (GABA).....	22
7. Considerações Finais.....	25
OBJETIVOS	27
MATERIAL E MÉTODOS	29
1. Animais: Procedência e Manutenção.....	30
2. Grupos Experimentais.....	30
3. Desnervação Periférica.....	32
4. Obtenção do Tecido Nervoso.....	32
5. Procedimento Imunoistoquímico.....	33
6. Densitometria Óptica.....	36
7. Análise Estatística.....	38
RESULTADOS	40
1. Neuropeptídeo Y.....	42
2. Somatostatina.....	49
3. GABA.....	54
4. CGRP.....	59
DISCUSSÃO	63
1. Padrão de Distribuição do NPY, Somatostatina, GABA e CGRP em Rãs <i>Rana catesbeiana</i> em Condições Basais.....	64

1.1. Neuropeptídeo Y.....	64
1.2. Somatostatina.....	66
1.3. GABA.....	69
1.4. CGRP.....	71
2. Padrão de Distribuição do NPY, Somatostatina, GABA e CGRP em Rãs <i>Rana catesbeiana</i> Após a Desnervação Periférica.....	73
2.1. Neuropeptídeo Y.....	73
2.2. Somatostatina.....	76
2.3. GABA.....	79
2.4. CGRP.....	83
CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

RELAÇÃO DAS FIGURAS

- FIGURA 1:** Representação esquemática de uma secção coronal de medula espinal.....12
- FIGURA 2:** Representação esquemática de uma hemiseção da medula espinal de rã, demonstrando as principais regiões do corno dorsal.....13
- FIGURA 3:** Representação esquemática de secção coronal de medula espinal lombossacral de *Rana catesbeiana*.....37
- FIGURA 4:** Fotomontagem de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da NPY-IR em animal controle.....45
- FIGURA 5:** Fotomicrografias de secções coronais da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da NPY-IR em animais controle.....46
- FIGURA 6:** Fotomicrografia de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da NPY-IR 15 dias após a secção do nervo ciático (A). Valores da densidade óptica relativos à imunorreatividade ao NPY na medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* em diferentes tempos após a secção do nervo ciático (B,C,D).....47
- FIGURA 7:** Fotomontagem de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da SOM-IR em animal controle.....51
- FIGURA 8:** Fotomicrografias de secções coronais da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da SOM-IR em animais controle.....52
- FIGURA 9:** Fotomicrografia de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da SOM-IR após 15 dias de desnervação periférica. O asterisco indica o lado ipsilateral à lesão (A). Valores da densidade óptica relativos à imunorreatividade à SOM-IR na medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* em diferentes períodos de tempo após a secção do nervo ciático (B)53
- FIGURA 10:** Fotomontagem de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da GABA-IR em animal controle.....56
- FIGURA 11:** Fotomicrografias de secções coronais da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da GABA-IR em animais controle.....57

- FIGURA 12:** Fotomicrografia de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da GABA-IR após 15 dias de desnervação periférica (A). Valores da densidade óptica relativos à imunorreatividade ao GABA-IR na medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* em diferentes tempos após a secção do nervo ciático (B).....58
- FIGURA 13:** Fotomontagem de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da CGRP-IR em animal controle (A). Destaque da parte dorsal do funículo lateral (B). Destaque de uma varicosidade (seta) proveniente da parte dorsal do funículo lateral (C).....61
- FIGURA 14:** Fotomicrografia de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da CGRP-IR após 15 dias de desnervação periférica (A). Valores da densidade óptica relativos à imunorreatividade à CGRP-IR na medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* em diferentes tempos após a secção do nervo ciático (B).....62

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxanol propionato
B: intensidade gerada quando nenhuma luz passa pelo material
BG: intensidade de fundo
BML: banda mediolateral
Ca⁺⁺: íon cálcio
CC: canal central
CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CGRP-IR: imunorreatividade ao peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cl⁻: íon cloreto
CONTRA: lado contralateral à lesão
CTD: campo terminal dorsal
CTV: campo terminal ventral
DAB: 3,3'-tetrahidrocloreto de diaminobenzidina
FD: funículo dorsal
FL: funículo lateral
FLd: parte dorsal do funículo lateral
FV: funículo ventral
GABA: ácido gama-aminobutírico
GABA_A: receptor gabaérgico do tipo A
GABA_B: receptor gabaérgico do tipo B
GABA-IR: imunorreatividade ao GABA
GAD: ácido glutâmico descarboxilase
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HRP: peroxidase de rabanete
I: intensidade máxima da luz incidental
IPSI: lado ipsilateral à lesão
IT: intensidade
K⁺: íon potássio
NK1: neuroquinina 1
NK2: neuroquinina 2
NMDA: N-metil-D-aspartato
NPY: neuropeptídeo Y
NPY-IR: imunorreatividade ao neuropeptídeo Y
OD: densidade óptica
PAP: peroxidase anti-peroxidase
PBS: tampão fosfato salino
PBS-T: triton X-100 diluído em PBS
SNC: sistema nervoso central
SOM-IR: imunorreatividade à somatostatina
SP-IR: imunorreatividade à substância P
SST₁₋₅: receptores somatostatinérgicos dos tipos 1 ao 5
SST₂: receptor somatostatinérgico do tipo 2
SST_{2a}: receptor somatostatinérgico do tipo 2, subtipo a
SST_{2b}: receptor somatostatinérgico do tipo 2, subtipo b
TP: tampão fosfato 0,1 M pH 7,4

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 neuropática, um dos modelos mais empregados é a lesão nervosa periférica, sendo que a maioria desses estudos é realizada em mamíferos. 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 desses animais pode fornecer subsídios adicionais para compreensão dos mecanismos da transmissão nociceptiva, além de esclarecer os aspectos evolutivos envolvidos na mesma.

No presente trabalho foi analisado o padrão de imunorreatividade ao neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), somatostatina (SOM) e ácido γ -aminobutírico (GABA) em medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* em condições basais e após a secção do nervo ciático. Para isso, foram utilizados animais adultos, de ambos os sexos, os quais foram divididos em grupos controle (animais em condições basais) e experimental (animais submetidos à secção do nervo ciático). Para o estudo da imunorreatividade ao NPY, os animais desnervados foram sacrificados 3, 7 e 15 dias após a secção do nervo ciático. Para CGRP, SOM e GABA os intervalos de tempo considerados foram de 3, 5, 8 e 15 dias após a axotomia. A técnica imunoistoquímica utilizada foi a de Sternberger (1979), sendo utilizados anticorpos primários do tipo policlonal nas concentrações de 1:1000 (GABA e neuropeptídeo Y), 1:500 (somatostatina) e 1:100 (CGRP). A imunorreacção foi semi-quantificada através de densitometria óptica. A intensidade dos produtos de reacção foi comparada entre os lados ipsilateral e contralateral à lesão e com o grupo controle.

Os resultados obtidos nos animais controle foram semelhantes aos descritos anteriormente para os anfíbios. A maior intensidade de imunorreacção ocorreu na parte dorsal do funículo lateral para todas as substâncias neuroquímicas consideradas. Imunorreatividade ao GABA, NPY e SOM ainda foram observadas ao longo do funículo lateral e no funículo ventral. Na substância cinzenta, o corno dorsal apresentou maior imunorreatividade

quando comparado ao ventral, sendo esta uma característica comum entre as substâncias neuroquímicas consideradas no presente estudo. Neurônios *bitufted* imunorreativos para GABA, NPY e SOM foram detectados na banda mediolateral. No corno ventral, neurônios motores apresentaram imunorreação à SOM, ao CGRP e ao GABA, sendo neste último de fraca intensidade. Após a desnervação periférica não houve variação no padrão de distribuição da imunorreatividade à SOM e ao CGRP. Entretanto, a axotomia causou uma redução significativa na imunorreatividade ao GABA na parte dorsal do funículo lateral no lado ipsilateral à lesão. Essa diminuição foi evidenciada 3 dias após a desnervação, persistindo aos 5, 8 e 15 dias após a secção do nervo ciático. A imunorreatividade ao NPY apresentou inicialmente (3 e 7 dias após a axotomia) um aumento bilateral na intensidade de reação. Porém, 15 dias após a desnervação periférica, houve uma queda na imunorreatividade ao NPY, a qual também foi evidenciada bilateralmente.

Esses resultados sugerem o envolvimento das substâncias neuroquímicas abordadas neste estudo no processamento das informações sensoriais de rãs *Rana catesbeiana*. Todavia, ainda é especulativa a participação das mesmas nos mecanismos de transmissão e codificação da nocicepção nesses animais. Estudos complementares são necessários para o esclarecimento dessas questões. Todavia, pode-se afirmar que o corno dorsal desses animais apresenta uma circuitaria complexa, onde diferentes sistemas de neurotransmissores e/ou neuromoduladores interagem para a modulação dos sinais nociceptivos, semelhante ao que é descrito para os mamíferos.

INTRODUÇÃO

1. Dor e Nociceção

A dor é um importante tema de estudo desde épocas bastante remotas ao início da neurociência. As civilizações primitivas já experimentavam meios para o alívio dos estados dolorosos. Algumas dessas terapias milenares foram sendo empregadas ao longo dos séculos, mas sua curiosa eficácia só pôde ser explicada tempos mais tarde após o seu surgimento (BONICA & LOESER, 2001).

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, quanto aos mecanismos fisiológicos e/ou patofisiológicos de sua transmissão (BONICA & LOESER, 2001).

Na conceitualização da dor, deve-se 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 nervosos 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, como foi abordado acima, trata-se de uma experiência sensorial desagradável, tem caráter subjetivo e, portanto, pode ser relacionada somente aos humanos que possuem a capacidade de verbalizá-la. Nociceção, 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 empregados. Embora não possuam capacidade de comunicação verbal, quando em contato com estímulos nociceptivos, esses animais exibem respostas motoras similares as dos humanos. Tais respostas permitem inferir sobre a existência de dor (DUBNER, 1983; KAVALIERS, 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. Abordagens Experimentais

Entre as diversas abordagens para o estudo da dor, podem ser citadas a secção de um nervo periférico e a indução de lesão tecidual ou processos inflamatórios locais. A lesão de um nervo periférico pode causar dor neuropática severa. Várias espécies de animais submetidos a situações que comprovadamente resultam em dor neuropática são utilizadas como modelos para o estudo da dor, de seus mecanismos e de sua fisiopatologia (SOMMER & MYERS, 1995; ZIMMERMANN, 2001).

Está demonstrado que a secção do nervo ciático 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).

Nos modelos animais utilizados para o estudo da dor neuropática, uma lesão mecânica é induzida sobre um nervo periférico. Na região axonal distal à lesão ocorre interrupção da condução elétrica nervosa, seguida de degeneração walleriana. Nos axônios proximais à lesão, ocorre a formação de cones de crescimento, os quais são formados pela indução dos fatores de crescimento produzidos pelas células de Schwann. A função dessas regiões especializadas, juntamente com as células de Schwann, é de orientar o sentido da regeneração da fibra. Os mecanismos de regulação desse processo ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, sabe-se que envolvem várias etapas e estão modulados pelo microambiente local, onde as células de Schwann exercem um papel importante. Convém ressaltar que os eventos relacionados com a degeneração/regeneração da fibra nervosa não ocorrem exclusivamente no local da lesão. Pouco tempo após a secção é observada cromatólise do núcleo nos corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal (SCHRÖDER, 1975; NIETO & VERDÚ, 1998; ZIMMERMANN, 2001).

Outra característica das lesões de nervos periféricos são as respostas comportamentais desencadeadas. Após a injúria, observam-se hiperalgesia (sensibilidade aumentada aos estímulos nocivos), alodinia (resposta dolorosa a estímulos normalmente inócuos), parestesia (diminuição da sensibilidade) e

disestesia (perda de sensibilidade) e, ainda, dor espontânea. Essas disfunções podem ser geradas por uma grande variedade de mecanismos, entre eles, mudanças na expressão de canais iônicos localizados no gânglio da raiz dorsal e/ou no neuroma, e também pelo fenômeno de comunicação não-sináptica entre neurônios, onde uma célula nervosa modifica a atividade das células adjacentes. Como exemplos de comunicação não-sináptica podem ser citadas as junções comunicantes que podem ocorrer entre os neurônios periféricos na região do neuroma e, ainda, a descarga cruzada, onde ocorre a despolarização de neurônios pelo disparo repetitivo das células vizinhas. Em situações normais, as conseqüências de pequenas despolarizações são insignificantes, mas após a lesão nervosa, a atividade ectópica pode ser acentuada (AMIR & DEVOR, 1992; LEKAN et al., 1996; MILLAN, 1999).

Portanto, as lesões nervosas periféricas desencadeiam cascatas de eventos na região afetada. A partir disso, ocorre a propagação dos impulsos, relacionados à condição patofisiológica, para todas as partes do neurônio danificado e também em direção ao SNC (ZIMMERMANN, 2001).

3. Fisiologia da Transmissão Nociceptiva

O dano aos tecidos constitui um estímulo nocivo, o qual gera alterações celulares com liberação de inúmeras substâncias neuroquímicas. 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 sensorial, motivacional e cognitivo (BYERS & BONICA, 2001).

De uma forma geral, os eventos modulatórios da transmissão nociceptiva ocorrem primariamente no corno dorsal da medula espinal e em núcleos do tronco encefálico e, secundariamente, em centros talâmicos e estruturas corticolímbicas. Entretanto, sob certas condições patológicas como lesão nervosa periférica ou dano ao SNC, a dor pode ser produzida por centros mais superiores, independentemente das terminações nervosas sensoriais periféricas. Nesse contexto enquadra-se o conceito de dor neuropática, a qual foi abordada anteriormente, que é a dor ocasionada em virtude de dano ou de disfunção de um nervo periférico ou de um agrupamento neuronal central (MILLAN, 1999).

Os mecanismos patofisiológicos da dor neuropática 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 neuropática (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 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).

As fibras sensoriais são altamente especializadas na transmissão das informações sobre o ambiente ou sobre o estado do organismo. Os principais tipos de fibras nervosas envolvidas na transmissão da dor são as fibras dos tipos C e A δ . A sensação aguda de dor é transmitida principalmente por fibras nervosas do tipo A δ , as quais possuem bainha de mielina pouco espessa e velocidade de condução em torno de 5-30 m/s. Já a transmissão nociceptiva sustentada, relacionada à dor crônica, é conduzida pelas fibras C, amielínicas, as quais apresentam velocidade de condução mais lenta, geralmente menor que 1 m/s (MEYER et al., 1994; BASBAUM & JESSEL, 2000).

Além da diferença na velocidade de condução, as fibras C e A δ também estão relacionadas com a transmissão de modalidades diferentes de informação nociceptiva. As primeiras são especializadas na condução de estímulos mecânicos, térmicos (frio e calor) e químicos. As fibras A δ podem ser classificadas em duas classes. As do tipo I são ativadas por estímulos mecânicos nocivos de alta intensidade, portanto são fibras de alto limiar, sendo consideradas primariamente mecanorreceptores de condução rápida, fracamente responsivos a estímulos térmicos e químicos. As fibras A δ do tipo II

apresentam uma condução mais lenta em relação ao primeiro tipo, possuindo limiares menores aos estímulos térmicos nocivos (MILLAN, 1999).

O fato dessas fibras conduzirem diversas modalidades sensoriais as caracteriza como receptores polimodais. A proporção de fibras A e C consideradas receptores polimodais varia de acordo com a espécie e o tecido estudado. Entretanto, geralmente as fibras C representam a maior parcela desses receptores (BYERS & BONICA, 2001).

Assim, 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, onde chegam os aferentes primários cutâneos ou seus colaterais. As lâminas V e VI recebem

terminais proprioceptivos 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.

O corno dorsal é formado pelas lâminas I-VI. A lâmina I corresponde à zona marginal, região que contém células de grande tamanho chamadas células marginais. Essa região é importante para a nocicepção, pois é o local de terminação dos aferentes nociceptivos, além de conter células responsivas unicamente a esses estímulos. Grande parte das células da lâmina I são neurônios de projeção, os quais contribuem para a formação do trato espinotalâmico lateral, o principal trato envolvido na transmissão da dor para o encéfalo (BYERS & BONICA, 2001).

A lâmina II, também chamada de substância gelatinosa devido a grande concentração de células gliais, contém muitos neurônios de pequeno tamanho. Algumas células dessa lâmina são interneurônios que recebem informações dos aferentes primários, estabelecendo conexões com os dendritos dos neurônios de projeção da lâmina I, os quais se localizam na substância gelatinosa (BYERS & BONICA, 2001).

Extensas arborizações dendríticas, provenientes de células de regiões mais profundas, são encontradas na lâmina III. A função específica dessa área ainda não foi estabelecida, sendo considerada uma zona de transição entre as lâminas II e IV. Essa última contém células grandes que enviam os seus dendritos para as camadas mais superficiais do corno dorsal. Na lâmina V convergem muitas aferências nociceptivas e os axônios dos neurônios

localizados nessa região também contribuem para a formação do trato espinotalâmico. As lâminas III-V correspondem ao *nucleus proprius*, já a lâmina VI forma a base do corno dorsal (BYERS & BONICA, 2001).

Em vertebrados não-mamíferos diversos estudos demonstraram que os componentes básicos anatômicos, fisiológicos e biológicos da percepção da dor são similares àqueles descritos em mamíferos. Nesses animais, as fibras C e A δ também são as responsáveis pela condução da informação dolorosa, as quais, da mesma forma, finalizam no corno dorsal da medula espinal e em núcleos do tronco encefálico (EBESSON, 1976 apud SCHOTLAND & TRESCH, 1997). Porém, a medula espinal de muitos desses vertebrados não-mamíferos não apresenta o arranjo laminar descrito anteriormente (EBESSON, 1976 apud SCHOTLAND & TRESCH, 1997; ADLI et al., 1988). Contudo, as conexões e distribuições neuronais são funcionalmente relacionadas com aquelas dos mamíferos.

4. 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 exibem 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 demonstra 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 mamíferos e outros vertebrados não-mamíferos, para, com isso, elucidar em que extensão a

organização da medula espinal foi conservada durante a evolução (MUÑOZ et al., 2000).

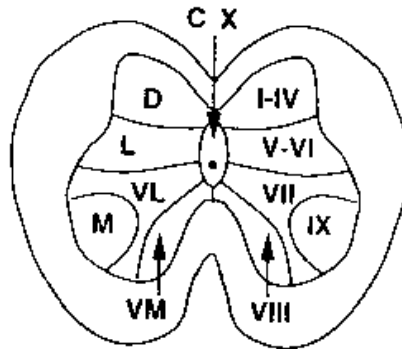


Figura 1. Representação esquemática de uma secção coronal de medula espinal. À esquerda, são mostradas as divisões da substância cinzenta espinal de rã, descritas por Ebesson (1976) apud Schotland & Tresch (1997). À direita, estão representadas as lâminas caracterizadas por Rexed (1964), em gatos. As 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).

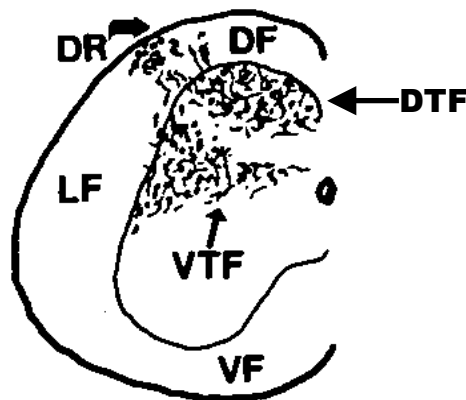


Figura 2. Representação esquemática de uma hemiseção da medula espinal de rã, mostrando as principais regiões do corno dorsal. DR, raiz dorsal; DF, funículo dorsal; LF, funículo lateral; VF, funículo ventral; DTF, campo terminal dorsal; VTF, campo terminal ventral (modificado de ADLI et al., 1988).

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).

Recentemente foi demonstrado que a transecção do nervo ciático em rãs ocasiona uma diminuição da imunorreatividade à substância P no corno dorsal da medula espinal lombossacral no lado ipsilateral à lesão. Essa alteração foi detectada na parte dorsal do funículo lateral, sendo que, após a lesão nervosa, as demais regiões imunorreativas à substância P permaneceram com o mesmo padrão de distribuição dos animais controle. Três dias após a desnervação periférica essas alterações já foram evidenciadas, sendo mantidas ao longo de 5, 8 e 15 dias após o referido procedimento experimental. No entanto, aos 20 dias o padrão da imunorreatividade à substância P voltou a ser semelhante ao grupo controle (PARTATA et al., 2002). Em mamíferos, tal peptídeo apresenta um papel central no processamento nociceptivo (HÖKFELT et al., 1976). A partir disso, pode-se inferir que as rãs utilizam os mesmos peptídeos e neurotransmissores que estão envolvidos na transmissão nociceptiva de mamíferos. Porém, é evidente a necessidade de estudos complementares utilizando outras substâncias neuroquímicas nessa situação para posteriores comparações. Todavia, a rã pode ser considerada um modelo útil para o estudo da nocicepção.

5. Neuropeptídeos

O corno dorsal recebe diferentes formas de informação sensorial, que são conduzidas por tipos distintos de fibras aferentes primárias. Essas informações entram na medula espinal de forma organizada (fibras

mielinizadas de maior calibre, pela porção mais medial; fibras não mielinizadas e mielinizadas de menor calibre, pelas porções mais laterais) fazendo conexões sinápticas em regiões específicas. Outra forma de categorizar essas fibras está baseada na natureza das moléculas que elas contêm e liberam. As substâncias neuroquímicas que modulam a nocicepção no corno dorsal são agentes excitatórios e inibitórios. Essas substâncias são liberadas por terminais de aferentes primários, por interneurônios do corno dorsal e, ainda, por projeções descendentes que terminam nesta região. Entre as diversas substâncias produzidas pelos aferentes primários destacam-se os peptídeos, os quais possuem um importante papel nos mecanismos relacionados à dor (SLUKA et al., 1992; MILLAN, 1999; TERMAN & BONICA, 2001).

Os peptídeos estão presentes em organismos de todo o reino animal e, ainda, em muitas espécies de plantas. A hidra, um membro dos celenterados, que possui um sistema nervoso bastante rudimentar, já apresenta numerosos neuropeptídeos (HÖKFELT et al., 2000). Os peptídeos demonstram grande homologia estrutural na filogênese, o que possibilita a correlação dos achados demonstrados acerca de sua distribuição em diferentes espécies, ou mesmo classes de animais.

Os peptídeos podem ser considerados neurotransmissores pois satisfazem os critérios necessários para essa classificação: 1 - são sintetizados na célula pré-sináptica, porém de forma diferente dos transmissores clássicos, pois um precursor inativo deve ser sintetizado no retículo endoplasmático rugoso localizado no soma neuronal para posterior clivagem no aparelho de Golgi, formando assim o peptídeo ativo, o qual será transportado dentro de grânulos secretores até o terminal axonal; 2 - são liberados mediante

estimulação da célula pré-sináptica, esta liberação também requer um aumento na concentração de cálcio citosólico, assim como ocorre com os transmissores clássicos; 3 - produzem respostas pós-sinápticas por ligação aos receptores, sendo que a ativação dos mesmos ocorre com baixas concentrações do peptídeo; 4 - suas ações também são bloqueadas por antagonistas; 5 - sofrem inativação na fenda sináptica como os demais neurotransmissores, no caso dos peptídeos a degradação enzimática é a principal forma de inativação, e as enzimas responsáveis por esta ação são as peptidases (MAINS & EIPPER, 1999; SCHWARTZ, 2000).

Essas diferenças entre neuropeptídeos e transmissores clássicos acarretam importantes diferenças funcionais. Os neurotransmissores clássicos desencadeiam, em geral, efeitos rápidos sobre a célula pós-sináptica. Entretanto, a ação dos peptídeos inicia-se lentamente e apresenta uma duração mais prolongada. Devido a isso, essas moléculas são freqüentemente chamadas de neuromoduladores. Portanto, muitas vezes os peptídeos atuam de forma complementar às ações dos transmissores clássicos (TERMAN & BONICA, 2001).

A expressão dos neuropeptídeos apresenta grande plasticidade dependendo da circunstância. Alguns peptídeos estão presentes em altas concentrações em condições basais, estando funcionalmente disponíveis a qualquer momento. Outros são normalmente expressos em concentrações baixas ou indetectáveis, os quais podem sofrer *up-regulation* em virtude de um estímulo específico como, por exemplo, a lesão nervosa. Existe, ainda, mais um grupo de peptídeos que são expressos apenas no período pré-natal e sofrem *down-regulation* após o nascimento (HÖKFELT et al., 2000).

Nas fibras aferentes primárias, numerosas substâncias estão contidas em seus terminais. Assim como em muitas regiões do SNC, existe co-localização de transmissores clássicos e peptídeos nas fibras que chegam ao corno dorsal espinal. Portanto, muitas moléculas podem agir como neurotransmissores e/ou neuromoduladores nociceptivos. As vantagens adaptativas da sensação de dor para a sobrevivência sugerem que, assim como em todos os mecanismos processados pelo sistema nervoso, ocorre um controle extremamente fino da liberação e ação de substâncias neuroativas (TERMAN & BONICA, 2001).

5.1. Neuropeptídeo Y

O neuropeptídeo Y (NPY) é um peptídeo com 36 aminoácidos, que foi isolado originalmente no trato gastrintestinal e pertence à família dos polipeptídeos pancreáticos. Considera-se que seja o peptídeo mais abundante no córtex cerebral, porém ele também se concentra no corno dorsal espinal e no hipotálamo (NESTLER et al., 2001). Nessas regiões, sugere-se que o NPY possa estar envolvido em distúrbios de ansiedade, controle da dor e comportamento alimentar (STANLEY et al., 1986; DUGGAN et al., 1991; WAHLESTEDT et al., 1993; KRYSIAK et al., 2000).

Muitas similaridades são encontradas na distribuição do NPY ao longo do SNC em diferentes classes de vertebrados (De QUIDT & EMSON 1986; REINER & OLIVER, 1987; VALLARINO et al., 1988; LÁZAR et al., 1993). Na medula espinal de anfíbios, assim como nos demais modelos empregados no estudo do NPY, a preponderância de localização desse peptídeo também

ocorre no corno dorsal (DANGER et al., 1985; LÁZAR et al., 1993; GUEDES et al., 2001).

Além dos trabalhos acerca da distribuição de peptídeos no SNC que utilizam técnicas de marcação celular, outros métodos de estudo são utilizados para determinar a presença dessas substâncias em regiões específicas do neuroeixo. Roddy et al. (1990), determinaram a concentração de NPY na medula espinal, gânglio da raiz dorsal e nervos periféricos de diversas espécies de mamíferos, inclusive em humanos, mediante utilização de radioimunoensaio. Esse estudo revelou uma concentração baixa ou até mesmo indetectável do peptídeo no corno ventral e nos gânglios da raiz dorsal e trigeminal. O corno dorsal, ao contrário, apresentou altas concentrações de NPY, especialmente nos segmentos lombossacrais. Portanto, esses resultados são semelhantes aos apresentados nos estudos histológicos (DANGER et al., 1985; LÁZAR et al., 1993; GUEDES et al., 2001), confirmando a localização preponderante do NPY no corno dorsal espinal.

Essa dominância dorsal sugere uma possível ação como neurotransmissor e/ou neuromodulador nas funções sensoriais desta região. Pelo fato de sua escassa distribuição e concentração nas células do gânglio da raiz dorsal em condições basais, pode-se sugerir sua pequena participação como um dos principais componentes dos aferentes sensoriais. Entretanto, após manipulações experimentais, como secção e compressão nervosa periférica, ocorre um aumento da expressão do NPY nessas células ganglionares (WAKISAKA et al., 1991, BENOLIEL et al., 2001). Isso suporta seu papel como um participante na transmissão de informações aferentes primárias, o que corrobora com a idéia previamente discutida da ação dos

peptídeos como neurotransmissores e/ou neuromoduladores (TERMAN & BONICA, 2001).

Ainda na medula espinal, o NPY também foi detectado na substância cinzenta intermediária e no funículo dorsolateral da substância branca. Essas duas regiões contêm interneurônios pré-sinápticos às células simpáticas pré-ganglionares, cujos corpos celulares situam-se na coluna intermediolateral da medula espinal. Os axônios dessas células pré-ganglionares projetam-se para a periferia e regulam a atividade dos órgãos efetores relacionados ao sistema nervoso vegetativo. Assim, o NPY pode também ser considerado como um dos participantes dos circuitos vegetativos (MINSON et al., 2001).

5.2. Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP)

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) é formado por uma seqüência de 37 aminoácidos. É predominantemente sintetizado e armazenado em neurônios sensoriais. Sua distribuição abrange vários tecidos, mas é concentrado principalmente no sistema nervoso periférico (fibras C e A δ) e central (corno dorsal da medula espinal), sendo também detectado em neurônios motores e vegetativos (ROSENFELD et al., 1983; BRAIN & CAMBRIDGE, 1996; ONUOHA & ALPAR, 1999).

Quanto as suas funções, o CGRP é um importante mediador do processamento sensorial. Além disso, na periferia, é considerado como um potente vasodilatador. Em condições fisiológicas, a concentração plasmática de CGRP é baixa, tornando-se aumentada devido a patologias. Muitas fibras nervosas que contêm CGRP apresentam uma distribuição perivascular e,

portanto, é provável que o CGRP, liberado retrogradamente das fibras aferentes primárias, exerça importantes efeitos locais sem produzir um aumento detectável na concentração sistêmica. Devido a essas propriedades, o CGRP é considerado um dos principais mediadores da inflamação neurogênica. A substância P, que apresenta co-localização com o CGRP em muitas regiões do sistema nervoso, também atua nesse sentido e, em conjunto com o CGRP, desencadeia extravasamento de proteínas plasmáticas a partir dos capilares, contribuindo para a formação de edema associado com a inflamação (BRAIN & CAMBRIDGE, 1996; HOLZER, 1998).

No corno dorsal o CGRP, juntamente com substância P e aminoácidos excitatórios, é importante na sinalização nociceptiva. Essas substâncias agem sinergisticamente gerando potenciais excitatórios pós-sinápticos, porém, suas ações dependem da natureza e duração do estímulo nocivo. Os disparos iniciais provavelmente ocorrem pela ativação dos receptores AMPA, os quais medeiam a transmissão excitatória rápida no SNC. Subseqüentemente ocorre a ativação de receptores NMDA e metabotrópicos glutamatérgicos, NK1 e NK2 (receptores para substância P) e para o CGRP. Estímulos nocivos repetidos causam somação temporal e amplificação das respostas do corno dorsal (RANDIC & MILETIC, 1977; MORTON & HUTCHISON, 1989; MILLAN, 1999).

Especificamente, o CGRP causa lenta despolarização da membrana paralelamente ao aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular. Essas ações potencializam os efeitos da ativação dos receptores NK1 e NMDA. Ainda, o CGRP facilita a nocicepção por retardar o metabolismo da substância P, acentuando a transmissão por volume, que ocorre quando um neurotransmissor atua em regiões distantes do seu local de liberação. Além

disso, o CGRP também aumenta a liberação de substância P e aminoácidos excitatórios no corno dorsal (OKU et al., 1988; KANGRGA & RANDIC, 1990).

Em ratos, a rizotomia dorsal provoca uma redução na quantidade de fibras imunorreativas à substância P e ao CGRP no corno dorsal, além da diminuição na concentração desses peptídeos na mesma região. Já no gânglio da raiz dorsal, o conteúdo dos peptídeos aumentou após 14 dias de sobrevivência (VILLAR et al., 1991). Esses resultados demonstram a integração das respostas da substância P e CGRP após lesões nervosas experimentais.

5.3. Somatostatina

A somatostatina foi originalmente detectada no hipotálamo, onde exerce ações importantes sobre a função endócrina da pituitária por controlar a liberação hormonal (BRADFORD, 1986). O termo somatostatina foi primeiramente aplicado a um peptídeo cíclico contendo 14 aminoácidos (somatostatina-14). Posteriormente, uma segunda forma, com uma estrutura de 28 aminoácidos, foi identificada (somatostatina-28). Essas duas formas são derivadas do mesmo precursor, o qual sofre clivagens independentes por enzimas específicas. A distribuição dos dois tipos de somatostatina é diferente. A somatostatina-14 é a forma predominante no sistema nervoso, enquanto a somatostatina-28 é encontrada principalmente no trato gastrointestinal (REICHLIN, 2001).

Na medula espinal, sua distribuição concentra-se nas lâminas superficiais do corno dorsal e na região do canal central (RUDA et al., 1985).

Diferente do CGRP, a somatostatina e a substância P estão presentes em duas populações de aferentes primários distintas, e podem ser liberadas após diferentes tipos de estimulação periférica nociva. Ambos os peptídeos estão presentes em interneurônios do corno dorsal e em projeções supraespinais descendentes (TODD et al., 1998).

A somatostatina apresenta efeitos inibitórios sobre os nociceptores, o que foi demonstrado por estudos eletrofisiológicos (SANDKUHNER et al., 1990) e farmacológicos (CARLTON et al., 2001). Ainda, Carlton et al. (2001) verificaram que a administração de um agonista da somatostatina, o *octreotide*, inibe respostas comportamentais nociceptivas, bem como o limiar de excitação das fibras C após indução de inflamação e de diferentes tipos de estimulação nociva.

A distribuição dos receptores sst_{2a} , um dos subtipos de receptores para somatostatina, ocorre em corpos celulares e processos neuronais dentro da substância gelatinosa espinal e na substância cinzenta periaquedutal, uma região mesencefálica importante para a supressão da sensação nociceptiva. Portanto, a localização desses receptores em áreas envolvidas com a anti-nocicepção sustenta o caráter analgésico desempenhado pela somatostatina (SCHINDLER et al., 1998).

6. Ácido δ -aminobutírico (GABA)

O ácido δ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório dentro do SNC de mamíferos, sendo responsável por aproximadamente 40% do processamento inibitório. A ativação de seus receptores faz com que o

potencial de membrana de uma célula não atinja o limiar para o potencial de ação. Sua extensiva distribuição em interneurônios inibitórios e neurônios de projeção sugere que o sistema nervoso opera em considerável restrição, pois o GABA atua como um controlador tônico da excitação (MALCANGIO & BOWERY, 1996; DICKENSON et al., 1997; NESTLER et al., 2001). Entretanto, durante o desenvolvimento o GABA pode agir como um transmissor excitatório, causando despolarização neuronal (NESTLER et al., 2001).

O GABA atua nas células nervosas através de dois tipos de receptores, o ionotrópico GABA_A e o metabotrópico GABA_B. O GABA_A é um canal de Cl⁻ aberto por ligando, o qual é alvo de importantes fármacos como, por exemplo, os benzodiazepínicos, que acentuam a ação do GABA. Devido a essa ação, os benzodiazepínicos já foram testados como analgésicos, mas os resultados dos estudos desenvolvidos são controversos (NESTLER et al., 2001). O GABA_B pertence à família dos receptores ligados à proteína G e está ligado a canais de Ca²⁺ e K⁺, seu efeito é mimetizado por baclofen (MALCANGIO & BOWERY, 1996).

Na medula espinal de mamíferos, o GABA localiza-se predominantemente na substância cinzenta, especialmente nas lâminas superficiais do corno dorsal (MALCANGIO & BOWERY, 1996). Ambos os tipos de receptores GABAérgicos são encontrados em regiões pré-sinápticas às fibras aferentes primárias do corno dorsal (TODD & MCKENZIE, 1989; MALCANGIO & BOWERY, 1996). Além disso, os receptores GABA_A também se localizam na coluna dorsal (trato ascendente localizado na substância branca), onde parecem modular a condução axonal (SAKATANI et al., 1991).

Portanto, a regulação das aferências sensoriais realizada pelo GABA tem um papel importante no funcionamento da medula espinal. Os efeitos pré-sinápticos produzidos pelo GABA podem ser de dois tipos. No primeiro, terminais GABAérgicos e fibras aferentes primárias fazem sinapses onde o GABA liberado atua sobre os receptores GABA_A abrindo os canais de cloreto, os quais geram uma redução na amplitude do potencial de ação, e conseqüente queda na liberação de neurotransmissor a partir do aferente primário. A outra forma de inibição pré-sináptica ocorre sobre os receptores GABA_B, que quando ativados provocam redução do influxo de Ca²⁺, dessa forma ocasionando queda na liberação de neurotransmissores no neurônio pré-sináptico (MALCANGIO & BOWERY, 1996; DICKENSON et al., 1997; VESSELKIN et al., 2001). Apesar da ação GABAérgica ocorrer através de dois tipos de receptores, a inibição é dada da mesma forma em ambos, ou seja, por meio da queda na liberação de neurotransmissores.

O processamento da informação nociceptiva na medula espinal é alvo importante da modulação GABAérgica. Estudos experimentais que induzem situações de dor neuropática freqüentemente são seguidos de testes comportamentais que apontam a presença de alodinia e/ou hiperalgesia nos animais testados (CUI et al., 1997; IBUKI et al., 1997; FUKUOKA et al., 1998; EATON et al., 1999; MALAN et al., 2002). Foi demonstrado que a liberação de GABA no corno dorsal apresenta-se reduzida sob essas condições de sensibilidade alterada. Entretanto, quando a mesma é restabelecida observa-se o desaparecimento das alterações comportamentais (CUI et al., 1997; IBUKI et al., 1997). Além disso, antagonistas dos receptores GABA_A e GABA_B produzem hiperalgesia e agonistas desses receptores revertem a hiperalgesia produzida

por lesão nervosa periférica (MALAN et al., 2002). Esses resultados indicam o potente efeito analgésico conferido pelo GABA após lesões nervosas.

7. Considerações Finais

Portanto, o corno dorsal da medula espinal é uma região onde diversos neurotransmissores e/ou neuromoduladores interagem para a transmissão das informações sensoriais. As situações experimentais de lesão nervosa periférica geram modificações na transmissão sináptica dessa região. A maioria dos estudos realizados nesse sentido foi conduzida em mamíferos (WAKISAKA, et al., 1991; CASTRO-LOPES et al., 1993; RYDH-RINDER et al., 1996; IBUKI et al., 1997; FUKUOKA et al., 1998; SCHINDLER et al., 1998; TODD et al., 1998; MA & BISBY, 1999). Entretanto, as informações aqui apresentadas demonstram que a rã é um modelo útil para o estudo dos mecanismos envolvidos na codificação e transmissão nociceptivas. Além disso, o estudo da nocicepção nesses animais pode fornecer subsídios adicionais para a compreensão dos mecanismos neuroquímicos deste processo sob um ponto de vista evolutivo e contribuir para o esclarecimento de muitas questões ainda especulativas, referentes a este tema, em mamíferos. Essa hipótese pode ser sustentada pelo fato de que a secção do nervo ciático resultou em modificações importantes na distribuição da imunorreatividade à substância P na medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* (PARTATA et al., 2002), sendo esta resposta similar à obtida em mamíferos (TESSLER et al., 1985). No entanto, não é conhecido o que a lesão nervosa periférica ocasiona sobre outras substâncias neuroquímicas presentes na medula espinal de anfíbios.

Com o intuito de fornecer subsídios a essa questão, o presente estudo apresenta os efeitos da secção do nervo ciático sobre o padrão de imunorreatividade dos peptídeos CGRP, somatostatina e neuropeptídeo Y, bem como do GABA, que é um importante aminoácido inibitório. Esses resultados irão trazer subsídios para a compreensão da participação dessas substâncias na transmissão nociceptiva de anfíbios, e, também, um conhecimento preliminar sobre a circuitaria química envolvida neste processo sensorial.

OBJETIVOS

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

- Determinar, através da técnica de imunistoquímica, o padrão de distribuição do neuropeptídeo Y, da somatostatina, do CGRP e do GABA, em secções coronais de medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* adultas, em condições basais.

- Localizar, mediante técnica de imunistoquímica, as modificações no padrão de imunorreatividade ao neuropeptídeo Y, à somatostatina, ao CGRP e ao GABA em secções coronais de medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* adultas, submetidas à secção do nervo ciático, nos intervalos de 3, 5, 8 e 15 dias após a lesão axonal.

- Quantificar, por técnica de densitometria óptica, as alterações no padrão da imunorreatividade ao neuropeptídeo Y, à somatostatina, ao CGRP e ao GABA em medula espinal de rãs em condições basais e após serem submetidas à desnervação periférica e comparar os resultados obtidos entre animais controle e desnervados.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais: Procedência e Manutenção

Foram utilizadas 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, os animais foram divididos em grupos e submetidos à secção do nervo ciático. Após este procedimento experimental, as rãs foram novamente colocadas nos aquários e mantidas sob as mesmas condições descritas acima, permanecendo dessa forma até o período de seu sacrifício.

2. Grupos Experimentais

Os animais utilizados neste estudo foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Animais controle: aqueles que não sofreram qualquer manipulação experimental.

- Animais experimentais: aqueles submetidos à secção do nervo ciático. Esse grupo foi dividido em subgrupos de acordo com os intervalos de tempo em que foram sacrificados após a desnervação periférica.

Para o estudo da imunorreatividade ao CGRP, somatostatina e GABA foram utilizados 3 animais controle e 12 animais experimentais para cada um destes neurotransmissores. Os animais experimentais foram divididos em quatro subgrupos: 3, 5, 8 e 15 dias após o procedimento de desnervação periférica, sendo que cada um dos grupos foi composto por 3 animais.

Para o estudo da imunorreatividade ao neuropeptídeo Y foram utilizados 3 animais controle e 9 animais experimentais. Os animais experimentais foram divididos em três subgrupos: 3, 7 e 15 dias após a secção do nervo ciático, e cada um desses grupos também foi formado por 3 animais.

No caso do CGRP, da somatostatina e do GABA, os animais controle foram sacrificados no dia zero. Os animais dos grupos experimentais foram sacrificados de acordo com o subgrupo a que pertenciam.

Para o neuropeptídeo Y, além do grupo sacrificado no dia zero, 3 animais controle foram sacrificados juntamente com um grupo experimental para, com isso, possibilitar a comparação dos resultados entre os animais controle e os experimentais, em cada um dos intervalos de tempo.

3. Desnervação Periférica

Para o procedimento de desnervação periférica, as rãs foram previamente anestesiadas com xilocaína 2% (ASTRA). Com o objetivo de visualizar o nervo ciático do animal, o membro posterior direito foi fixado em uma superfície rígida através de um pedaço de esparadrapo, dessa forma possibilitando a incisão 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. Em seguida, dois fios de sutura de algodão foram colocados abaixo do nervo a uma distância de dois milímetros entre os mesmos. Foi dado um nó em cada um dos fios de sutura, e o segmento do nervo localizado entre os dois fios foi seccionado, e a incisão foi 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, o animal foi colocado em um aquário com água e mantido no laboratório nas condições acima descritas, durante o período experimental.

4. Obtenção do Tecido Nervoso

Para a obtenção do tecido nervoso, os animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais foram descerebrados e submetidos a uma perfusão intra-cardíaca. Para tal, o coração e o cone arterial foram isolados. A formação de coágulos na árvore vascular foi prevenida pela administração intra-ventricular de 1000 UI/kg de heparina (Liquemine[®], Roche). Após, foi realizada uma incisão no ventrículo para a colocação da cânula do aparelho perfusor (Control Company). Após a implantação 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 sanguíneo 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 passado pelo sistema para a fixação dos tecidos. Terminada a perfusão, a

medula espinal lombossacral foi retirada e colocada em solução de paraformaldeído 4% diluído em TP por 4 horas à temperatura ambiente para a pós-fixação do tecido. Após esse procedimento, o tecido nervoso foi crioprottegido em soluções de sacarose 15 e 30%, diluídas em TP, e mantidas a 4°C, *overnight*. No dia seguinte, foram realizadas secções coronais de 50 µm 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 de imunistoquímica.

5. Procedimento Imunoistoquímico

Para a demonstração da imunorreatividade ao neuropeptídeo Y, à somatostatina, ao GABA e ao CGRP nos animais controle e experimentais, foi utilizada a técnica do anticorpo não marcado de Sternberger (1979). Inicialmente, os cortes receberam uma série de pré-tratamentos para bloquear a atividade da peroxidase endógena e alguns sítios inespecíficos de união dos anticorpos antes da incubação com o anticorpo primário.

O bloqueio da atividade peroxidásica foi realizado mediante o tratamento dos cortes com uma solução de metanol 10% diluída em solução de peróxido de hidrogênio 3% preparada em PBS. Essa pré-incubação teve duração de 30 minutos e foi realizada à temperatura ambiente sob agitação constante (AGITADOR ORBITAL, MOD. 255-B, FANEM). Após, os cortes foram lavados

em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente e em agitação. Essa lavagem foi realizada em 2 banhos de 15 minutos de duração cada um.

Para bloquear as ligações inespecíficas, decorrentes da existência de múltiplos locais onde os anticorpos podem realizar ligações inespecíficas, devido a atrações hidrofóbicas, reações eletrostáticas, pontes salinas, etc., foi realizada uma pré-incubação dos cortes com soro não imune do animal doador do segundo anticorpo, a cabra (STERNBERGER, 1979). Esta pré-incubação teve duração de 30 minutos e foi feita à temperatura ambiente e em agitação contínua. A concentração desta solução foi de 3%, sendo preparada em Triton X-100 0,4% (SIGMA) diluído em PBS (PBS-T). O Triton é um detergente que favorece a penetração dos anticorpos no tecido

Em seguida, iniciava-se a incubação com os anticorpos primários. Estes foram do tipo policlonal, desenvolvidos em coelho e diluídos em PBS-T nas seguintes proporções: CGRP (ICN) - 1:100, somatostatina (Peninsula Laboratories) - 1:500, GABA (Sigma) - 1:1000 e neuropeptídeo Y (ICN) - 1:1000. A incubação teve duração de 72 horas para o CGRP, somatostatina e GABA e *overnigth* para o neuropeptídeo Y, sendo realizada a 4°C em agitação contínua (AGITADOR ORBITAL PA 141, PACHANE). Em seqüência, os cortes foram lavados em PBS-T nas condições descritas inicialmente, sendo, logo após, incubados com o anticorpo secundário (SIGMA). Esse anticorpo foi retirado de coelho e desenvolvido em cabra e a diluição empregada foi de 1:100 em PBS-T. A incubação foi realizada à temperatura ambiente durante 60 minutos e em agitação contínua (AGITADOR ORBITAL, MOD 255-B, FANEM).

Após, os cortes foram lavados em PBS-T, conforme já descrito, e incubados em uma solução de PAP (peroxidase antiperoxidase) (SIGMA) com

diluição de 1:500 em PBS-T, durante 90 minutos, à temperatura ambiente e em agitação. O complexo PAP reage imunologicamente com o anticorpo secundário, o qual, por sua vez, reconhece o anticorpo primário. Por esse motivo o anticorpo secundário é também chamado de “ponte”. O complexo PAP é solúvel e consta de três moléculas de peroxidase de rabanete (HRP), um marcador, por cada duas moléculas de antiperoxidase.

A HRP foi revelada pelo método histoquímico de Graham & Karnovsky (1966) por combinar-se com o substrato, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultando em um complexo $HRP.H_2O_2$, que pode oxidar diferentes cromógenos. A oxidação desses cromógenos resulta em um precipitado, o qual adquire cor. Existem vários cromógenos, porém o mais comumente utilizado é o tetracloreto de 3-3'diaminobenzidina (DAB). Por isso, foi utilizada uma solução de DAB (SIGMA) 0,06% em PBS e uma solução de H_2O_2 10% em água deionizada para a revelação da reação imunoistoquímica. Para isso, os cortes foram incubados por 10 minutos na solução de DAB, sendo acrescentado, logo em seguida, 0,005% de solução de H_2O_2 . Os cortes permaneceram neste meio até o aparecimento de um precipitado de cor parda, o qual ocorreu em torno de 10 minutos.

Depois da revelação, os cortes foram lavados várias vezes em PBS e colocados em lâminas tratadas com gelatina cromo-alúmen. Após adesão dos cortes à lâmina, esses foram desidratados com soluções crescentes de álcool, diafanizados em xilol, cobertos com bálsamo do Canadá e com lamínulas.

Para a determinação da especificidade da imunotinação, verificou-se a especificidade do anticorpo utilizado para reconhecer o antígeno em estudo. Com esse objetivo, foi realizada a substituição do anticorpo primário por PBS.

Esse controle foi realizado em diferentes experimentos e os resultados obtidos, que foram negativos, indicaram que a imunorreatividade observada foi o resultado da interação antígeno-anticorpo primário.

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.

6. Densitometria Óptica

A intensidade do produto de reação da técnica de imunoistoquímica foi determinada através de densitometria óptica, sendo este procedimento realizado no Laboratório de Análises de Imagens, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Através da densitometria óptica pode-se estabelecer uma análise semi-quantitativa.

Neste trabalho, as lâminas contendo os cortes foram analisadas em um microscópio Nikon Eclipse E-600 (400X), o qual estava acoplado a uma câmera ProSeries High Performance CCD e a um microcomputador com o programa Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, USA) em sua memória. Após essa análise, as imagens selecionadas foram capturadas e convertidas para imagens digitais dentro de uma escala de 256 tons de cinza onde o nível de cinza de cada pixel variava de 0 (preto)-255 (branco).

A região escolhida para o cálculo da densidade óptica foi a parte dorsal do funículo lateral, pois, além de ser uma importante área de entrada dos

aferentes primários, foi a região que apresentou alterações em seu padrão de imunorreatividade após a desnervação periférica (Fig. 3).

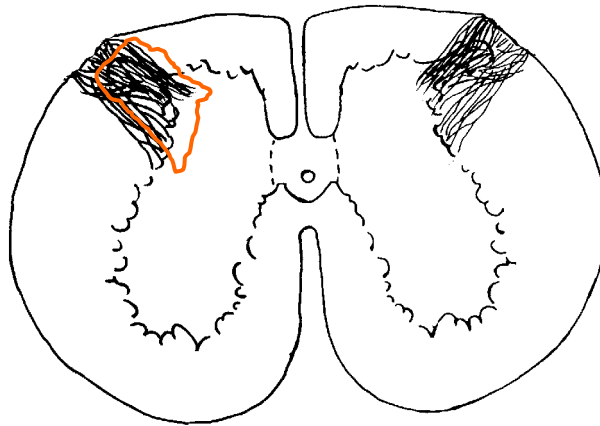


Fig. 3 – Representação esquemática de secção coronal de medula espinal lombossacral de *Rana catesbeiana*. A área delimitada em vermelho corresponde à parte dorsal do funículo lateral, região utilizada para a obtenção das imagens e posterior cálculo da densidade óptica.

A partir da delimitação da área de interesse, o programa forneceu um histograma contendo a densidade óptica calculada, sendo este valor expresso em uma escala logarítmica. Foram realizadas cinco leituras para cada animal, totalizando 15 leituras para cada grupo experimental, as quais foram trabalhadas estatisticamente (PARTATA et al., 2002). Todas as condições de luz foram mantidas constantes durante as medições.

A coloração de fundo (“background”) foi determinada e utilizada para a correção das leituras de densidade óptica. A densidade óptica foi calculada através da seguinte fórmula:

$$OD = -\log\left\{\frac{I-B}{(BG-B)-(IT-B)}\right\}, \text{ onde:}$$

OD: densidade óptica;

I (“incident”): intensidade máxima da luz incidental, neste trabalho 255;

B (“black”): intensidade gerada quando nenhuma luz passa através do material, neste trabalho 0;

$BG_{(x,y)}$ (“background”): é a intensidade de fundo em um determinado pixel;

$IT_{(x,y)}$ (“intensity”): é a intensidade em um determinado pixel da área analisada.

Para a obtenção de resultados fidedignos a partir do processamento da densitometria óptica, a técnica de imunistoquímica sempre deve ser realizada no mesmo dia e empregar as mesmas soluções para os cortes que serão comparados entre si. Dessa forma, são prevenidas possíveis diferenças na reação do cromógeno ou alterações na reação de fundo (RASIA-FILHO et al., 2002). Por isso, no presente estudo, o produto de reação do GABA, do CGRP e da somatostatina foram comparados nos lados ipsilateral e contralateral das mesmas secções, já que a imunistoquímica não foi processada nos mesmos dias para os diferentes grupos experimentais. Entretanto, para o neuropeptídeo Y a comparação entre animais experimentais e controle foi possível, pois os mesmos foram processados ao mesmo tempo, usando soluções idênticas.

7. Análise Estatística

Os resultados obtidos na densitometria óptica foram analisados estatisticamente através de teste “t” de Student para amostras pareadas. O nível de significância (α) adotado foi de 0,05. O programa utilizado foi o “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS), versão 9.0.

Para a análise estatística das médias da densidade óptica, obtidas a partir dos produtos de reação ao CGRP, à somatostatina e ao GABA, foram comparados os lados ipsilateral e contralateral à lesão. Para essas substâncias neuroquímicas não foi possível a comparação com as médias encontradas nos animais controle, já que o processamento da imunistoquímica dos grupos experimentais não foi realizado no mesmo dia.

Entretanto, as médias da densidade óptica dos cortes submetidos à imunistoquímica para o neuropeptídeo Y puderam ser comparadas com as médias dos animais controle. Nesse caso, a imunistoquímica de cada grupo experimental foi processada juntamente com aquela do animal controle. Portanto, a análise estatística envolveu, além da comparação entre os lados ipsilateral e contralateral à lesão dos animais experimentais, uma comparação de cada um desses lados com os valores obtidos a partir dos animais controle.

RESULTADOS

Neste estudo, todos os anticorpos utilizados apresentaram um padrão diferente de imunorreatividade, visualizado como um precipitado de cor parda, que não aparecia após a omissão do anticorpo primário. Para todos as substâncias neuroquímicas considerados neste estudo, observaram-se algumas características comuns no padrão de distribuição da imunorreatividade nos animais em estado basal. Todos eles apresentaram imunorreação nas substâncias branca e cinzenta da medula espinal das rãs *Rana catesbeiana*. Porém, na substância cinzenta o padrão de imunorreatividade foi sempre mais intenso. Dentro dessa região, o corno dorsal mostrou maior imunorreatividade quando comparado com o corno ventral, sendo que a parte dorsal do funículo lateral sempre apresentou a maior intensidade de imunorreação.

Outra característica comum foi observada em relação à forma das estruturas marcadas. Os prolongamentos neuronais evidenciados apresentavam-se, muitas vezes, como varicosidades, onde a imunorreação aparecia como pontos de reação mais intensa interligados entre si, assemelhando-se às contas de um rosário. A maioria dos somas neuronais marcados possuía aspecto fusiforme. A partir desses corpos celulares, muitas vezes, foi observada a emergência de dois prolongamentos, os quais se estendiam por alguns milímetros. Essas células foram consideradas neurônios *bitufted*.

Cabe também ressaltar que, entre os animais controle, houve uma distribuição simétrica das estruturas imunorreativas entre os dois lados da medula espinal.

1.1. Neuropeptídeo Y

Nos animais controle, a região de maior imunorreatividade ao neuropeptídeo Y (NPY-IR) foi a parte dorsal do funículo lateral. Nessa região concentraram-se agrupamentos de prolongamentos neuronais apresentados, na sua maior parte, como varicosidades (Fig. 4). A densidade dessa imunorreação decrescia quando se afastava da porção dorsal em direção à porção ventral do funículo lateral. Medialmente, no corno dorsal, essas varicosidades NPY-IR pareciam penetrar na região da banda mediolateral e prosseguir em direção ao lado contralateral. Na banda mediolateral foram encontrados neurônios do tipo *bitufted* intensamente imunorreativos (Fig. 5A), sendo que em muitos deles os prolongamentos podiam ser acompanhados por alguns milímetros. Essas células foram observadas ao longo de toda a banda mediolateral e apresentavam diâmetro médio de 10 μm . A maior parte dos somas neuronais intensamente NPY-IR foram encontrados nas porções mais mediais da banda mediolateral (Fig. 5B). Entretanto, alguns deles foram verificados na zona próxima ao campo terminal dorsal (Fig. 5A). Ainda no corno dorsal, muitas varicosidades foram observadas na região do campo terminal dorsal, sendo esta imunorreação sempre intensa (Fig. 5A). O campo terminal ventral (localizado ventralmente à banda mediolateral) também apresentou varicosidades NPY-IR, as quais se estendiam por distâncias variadas, porém menores do que àquelas dos neurônios *bitufted* da banda mediolateral (Fig. 5C). Entretanto, cabe ser ressaltado que as varicosidades do campo terminal ventral mostravam-se mais numerosas do que aquelas localizadas no campo

terminal dorsal. A região do funículo dorsal foi sempre negativa a este tratamento imunistoquímico (Figs. 4, 5A).

No corno ventral, os neurônios motores mostraram-se sempre negativos ao tratamento imunistoquímico. Ao contrário desses, muitas varicosidades fortemente NPY-IR foram encontradas dispersas pelo corno ventral (Fig. 5E). Além disso, na porção mais dorsal do corno ventral visualizaram-se também alguns neurônios do tipo *bitufted* intensamente NPY-IR, sendo que os prolongamentos destas células podiam ser acompanhados por alguns milímetros (Figs. 4, 5D). O tamanho dos somas dessas células foi similar aos observados na banda mediolateral. No funículo ventral foram encontradas varicosidades NPY-IR (Fig. 5F).

Na análise qualitativa do padrão de distribuição da NPY-IR nos segmentos lombossacrais da medula espinal das rãs submetidas à secção do nervo ciático, foram observadas alterações na atividade deste peptídeo. As modificações foram restritas à parte dorsal do funículo lateral, onde ocorreu um acréscimo na NPY-IR, enquanto as demais regiões não apresentaram variações quanto ao padrão de distribuição do NPY (Fig. 6A). A comparação da intensidade dos produtos da reação imunistoquímica foi feita da seguinte forma: entre os lados ipsilateral e contralateral dentro dos grupos experimentais; entre os lados ipsilateral e contralateral dos animais experimentais com o grupo controle. Quando comparados os lados ipsilateral e contralateral à lesão dentro de um mesmo grupo experimental (Fig. 6B) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Por outro lado, a comparação entre os animais desnervados e os do grupo controle apresentou diferenças marcantes. Aos 3 dias após a desnervação periférica, o

lado ipsilateral à lesão apresentou um aumento na NPY-IR ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle. Aos 7 dias, esse aumento permaneceu e foi ainda mais significativo estatisticamente ($p < 0,001$). Porém, aos 15 dias de desnervação periférica, o lado ipsilateral expressou uma diminuição na NPY-IR ($p < 0,01$). Essas alterações na intensidade da reação são demonstradas na Figura 6C. O lado contralateral à lesão também apresentou modificações na NPY-IR, porém essas variações foram estatisticamente significativas apenas a partir dos 7 dias de desnervação (Fig. 6D). Nesse período, o lado contralateral apresentou um aumento na NPY-IR ($p < 0,05$). Entretanto, após 15 dias de desnervação periférica houve uma diminuição na NPY-IR ($p < 0,01$).

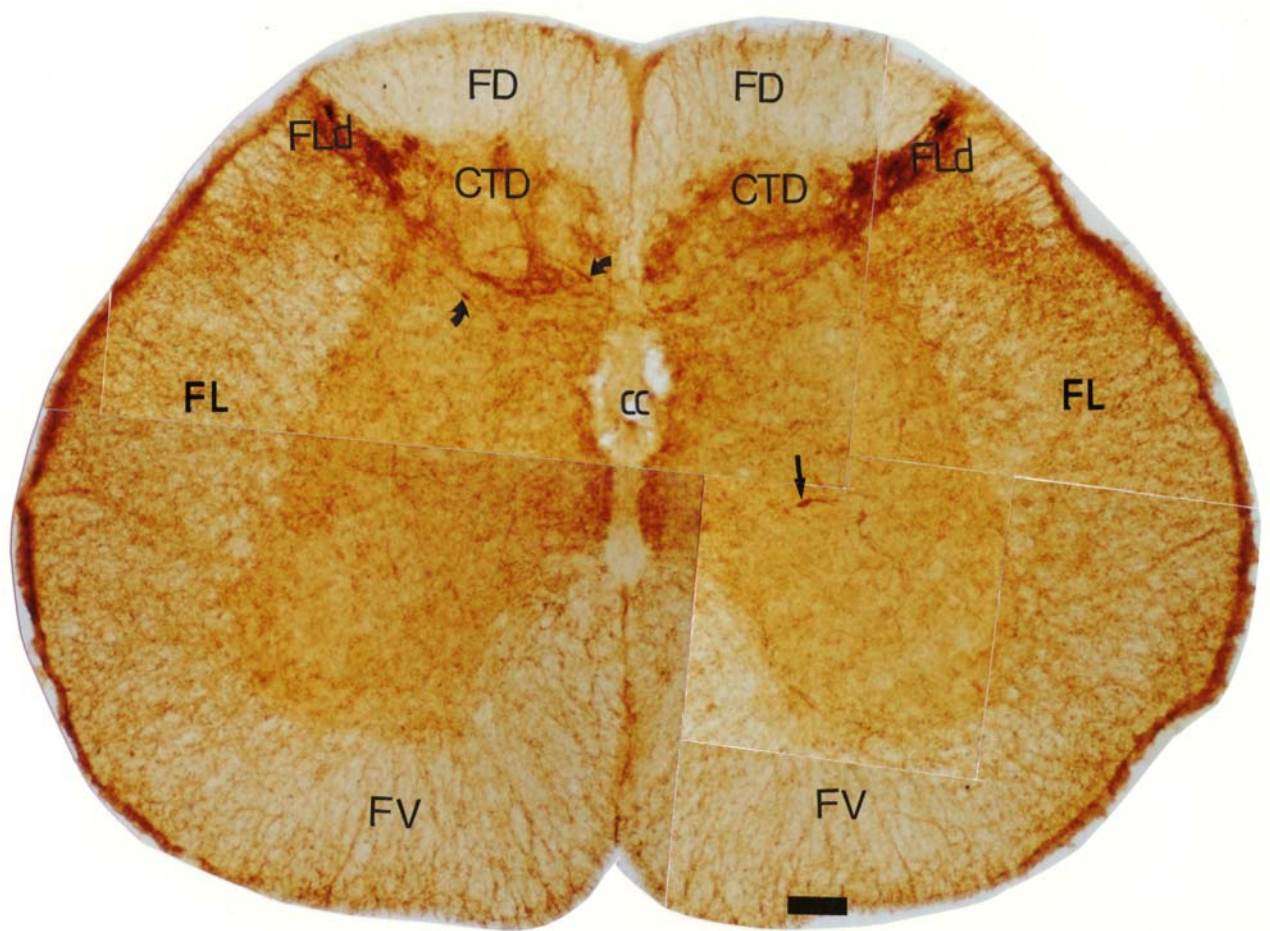


Fig. 4 - Fotomontagem de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da NPY-IR em animal controle. Notar a forte imunoreatividade na parte dorsal do funículo lateral (FLd). NPY-IR ainda pode ser observada no campo terminal dorsal (CTD), na banda mediolateral e no campo terminal ventral. As setas curvas indicam neurônios NPY-IR localizados na banda mediolateral. A seta reta aponta neurônio NPY-IR na porção mais dorsal do corno ventral. O funículo dorsal (FD) mostrou-se negativo ao tratamento imunistoquímico, enquanto que no funículo lateral (FL) a reação intensa da porção dorsal decresceu no sentido dorsal para ventral. Varicosidades imunorreativas também são observadas no funículo ventral (FV). CC, canal central. Barra = 100 µm.

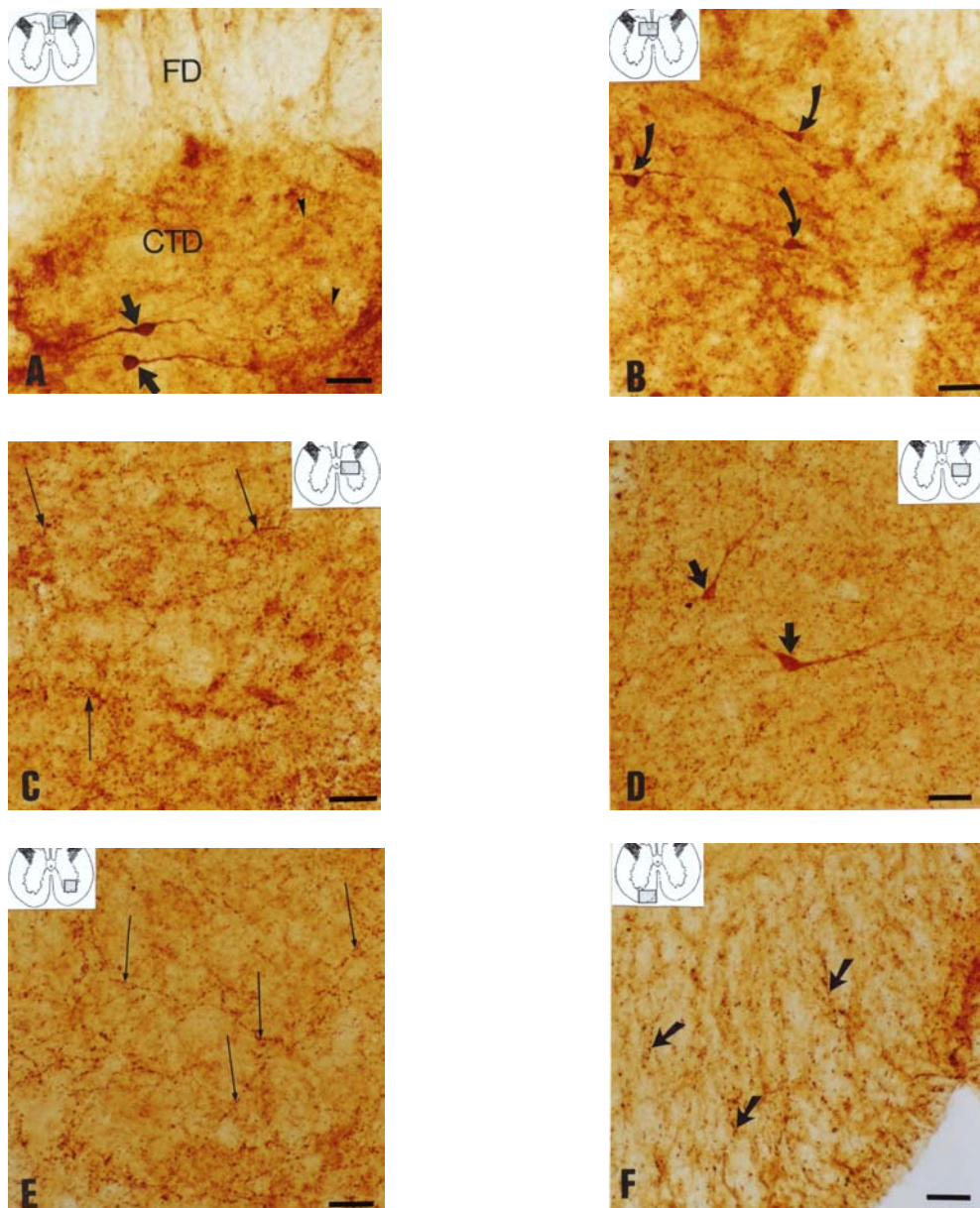
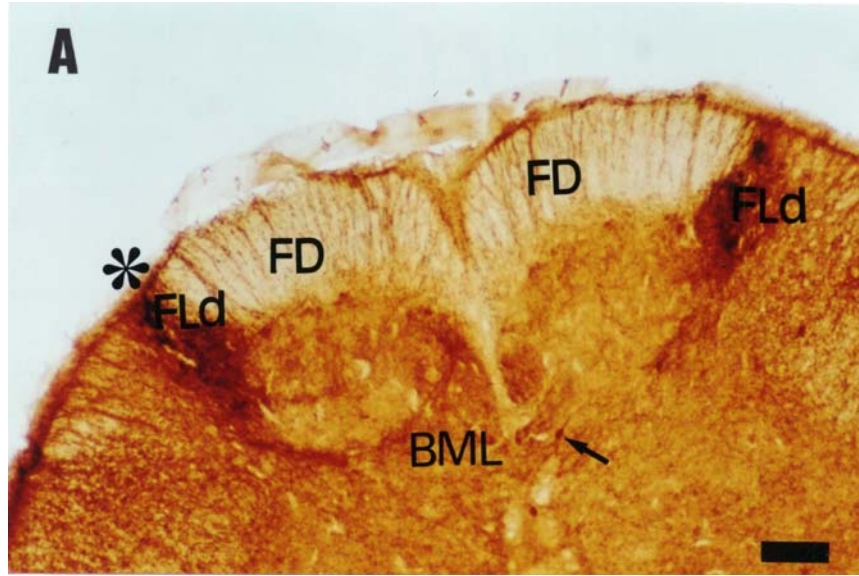
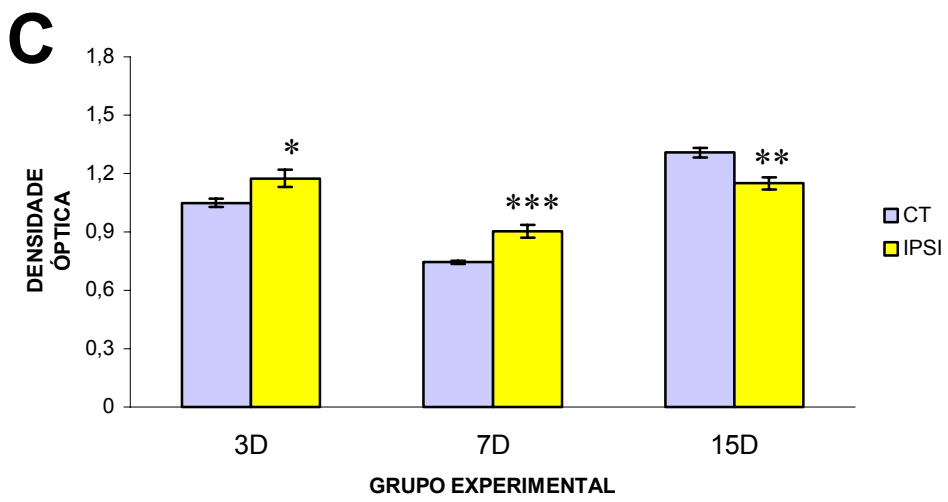
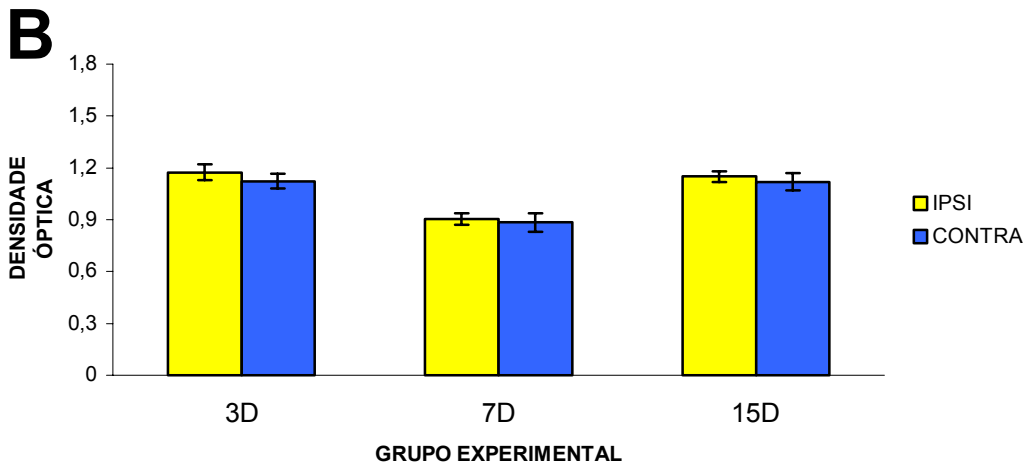


Fig. 5 - Fotomicrografias de secções coronais da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da NPY-IR em animais controle. (A) As setas indicam neurônios *bitufted* da banda mediolateral, os quais podem ser observados abaixo do campo terminal dorsal (CTD). A partir do soma desses neurônios é possível a visualização da emergência de dois prolongamentos imunorreativos. As cabeças de seta apontam varicosidades no CTD. O funículo dorsal (FD) apresentou-se negativo ao tratamento imunoistoquímico. (B) As setas curvas indicam corpos celulares fusiformes NPY-IR de neurônios *bitufted* da banda mediolateral localizados próximos à linha média da medula espinal. Destes neurônios também pode-se observar a emergência de prolongamentos imunorreativos. (C) Região do campo terminal ventral. As setas apontam varicosidades NPY-IR. (D) Na porção mais dorsal do corno ventral também são observados neurônios *bitufted* (setas), mostrando os prolongamentos imunorreativos que emergem de seus somas. (E) Varicosidades NPY-IR no corno ventral (setas). (F) Região do funículo ventral. As setas indicam as varicosidades. A área cinza colocada sobre os esquemas no topo de cada figura representa as regiões mostradas em cada fotomicrografia. Barra = 40 μ m



NPY



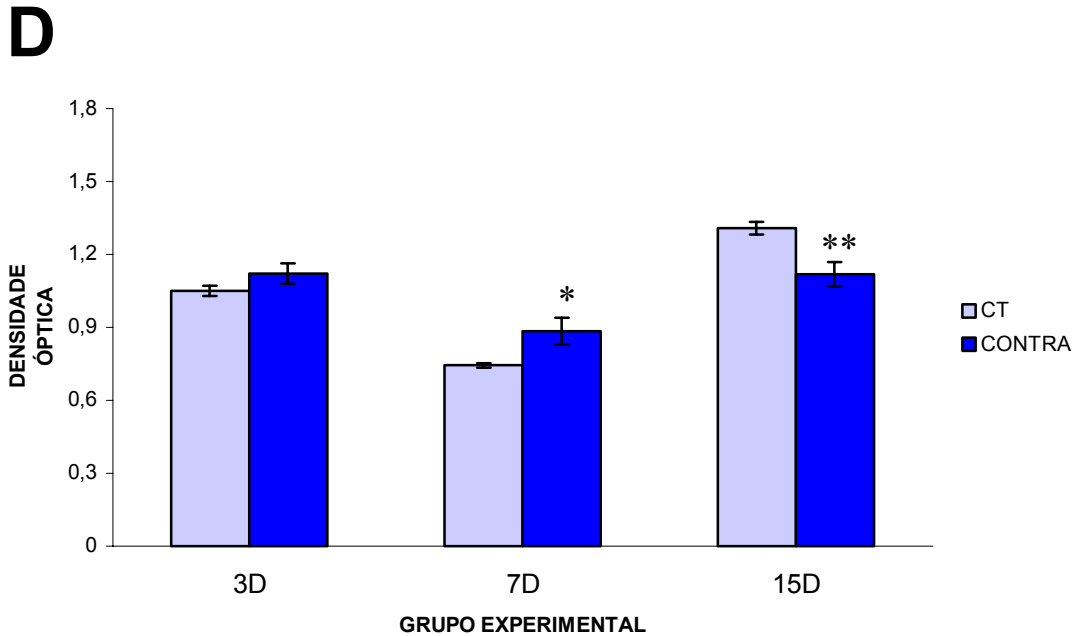


Fig. 6 - (A) Fotomicrografia de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da NPY-IR 15 dias após a secção do nervo ciático. O asterisco indica o lado ipsilateral à lesão. Observar que o padrão de distribuição da NPY-IR foi o mesmo observado nos animais controle, sendo que a parte dorsal do funículo lateral (FLd) permaneceu como a zona de maior concentração de imunorreacção. A seta indica neurônio *bitufted* localizado na banda mediolateral (BML). FD, funículo dorsal. Barra = 100 μ m. (B, C e D). Valores da densidade óptica relativos à imunorreatividade ao NPY na medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* em diferentes períodos de tempo após a secção do nervo ciático. (B) Comparação entre os lados ipsilateral e contralateral à lesão dentro de um mesmo grupo experimental. (C) Comparação entre o lado ipsilateral à lesão e animal controle. (D) Comparação entre o lado contralateral à lesão e animal controle. 3D, 7D, 15D, correspondem respectivamente a 3, 7 e 15 dias após a desnervação; CT, grupo controle; IPSI, lado ipsilateral à lesão; CONTRA, lado contralateral à lesão. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas (um asterisco $p < 0,05$; dois asteriscos $p < 0,01$; três asteriscos $p < 0,001$; teste “t” de Student para amostras pareadas).

1.2. Somatostatina

Na medula espinal dos animais do grupo controle houve um denso padrão de distribuição da imunorreatividade à somatostatina (SOM-IR). A parte dorsal do funículo lateral foi o local de maior intensidade da SOM-IR, sendo que esta, semelhante ao que ocorreu com o NPY, decresceu de intensidade da direção dorsal para a ventral e também localizou-se predominantemente em processos varicosos (Fig. 7). No entanto, a densidade da SOM-IR na parte dorsal do funículo lateral foi superior à NPY-IR na mesma área.

Nas regiões mais superficiais do campo terminal dorsal também foi encontrada uma maior SOM-IR, a qual diminuiu de intensidade nas porções mais profundas desta área. Esse padrão de SOM-IR foi observado em varicosidades esparsamente distribuídas ao longo dessa região (Fig. 8A).

Outras varicosidades imunorreativas foram encontradas na banda mediolateral. Ainda nessa área, foram observados alguns corpos celulares intensamente SOM-IR, os quais apresentavam formato fusiforme e diâmetro médio de 10,5 μm (Figs. 7 e 8B). Em alguns desses neurônios foi possível observar a emergência de prolongamentos, caracterizando-os como neurônios do tipo *bitufted*. Uma região preponderante de localização desses neurônios foi a zona próxima à linha média (Fig. 8B).

Neurônios com forte SOM-IR também foram observados na região em torno da cavidade do canal central. Essas células também apresentavam características de neurônios *bitufted*, e também possuíam diâmetro médio de 10,5 μm (Fig. 8D). Os prolongamentos dessas células, localizadas ao redor da

cavidade do canal central, mostraram a seguinte disposição: um dirigia-se para a região da cavidade e o outro para o lado oposto da medula espinal (Fig. 8D).

No campo terminal ventral e na região mais dorsal do corno ventral, a SOM-IR apresentou um padrão difuso. Entretanto, nessas regiões foi identificada forte imunorreação em somas neuronais com formato *bitufted* e em pequenas varicosidades (Figs. 7 e 8C).

O corno ventral apresentou inúmeros neurônios motores com forte SOM-IR (Figs. 7 e 8E). O diâmetro médio dos somas dessas células foi de 38 μm . No funículo ventral foram observadas varicosidades esparsas com imunorreatividade variando de moderada a forte (Fig. 8F).

A desnervação periférica não provocou alterações na intensidade da SOM-IR (Fig. 9A). Além disso, não foram detectadas modificações significativas na intensidade de reação quando comparados os lados ipsilateral e contralateral à lesão dentro de um mesmo grupo experimental (Fig. 9B). O mesmo padrão de imunorreatividade obtido nos animais controle manteve-se aos 3, 5, 8 e 15 dias após a secção nervosa periférica.

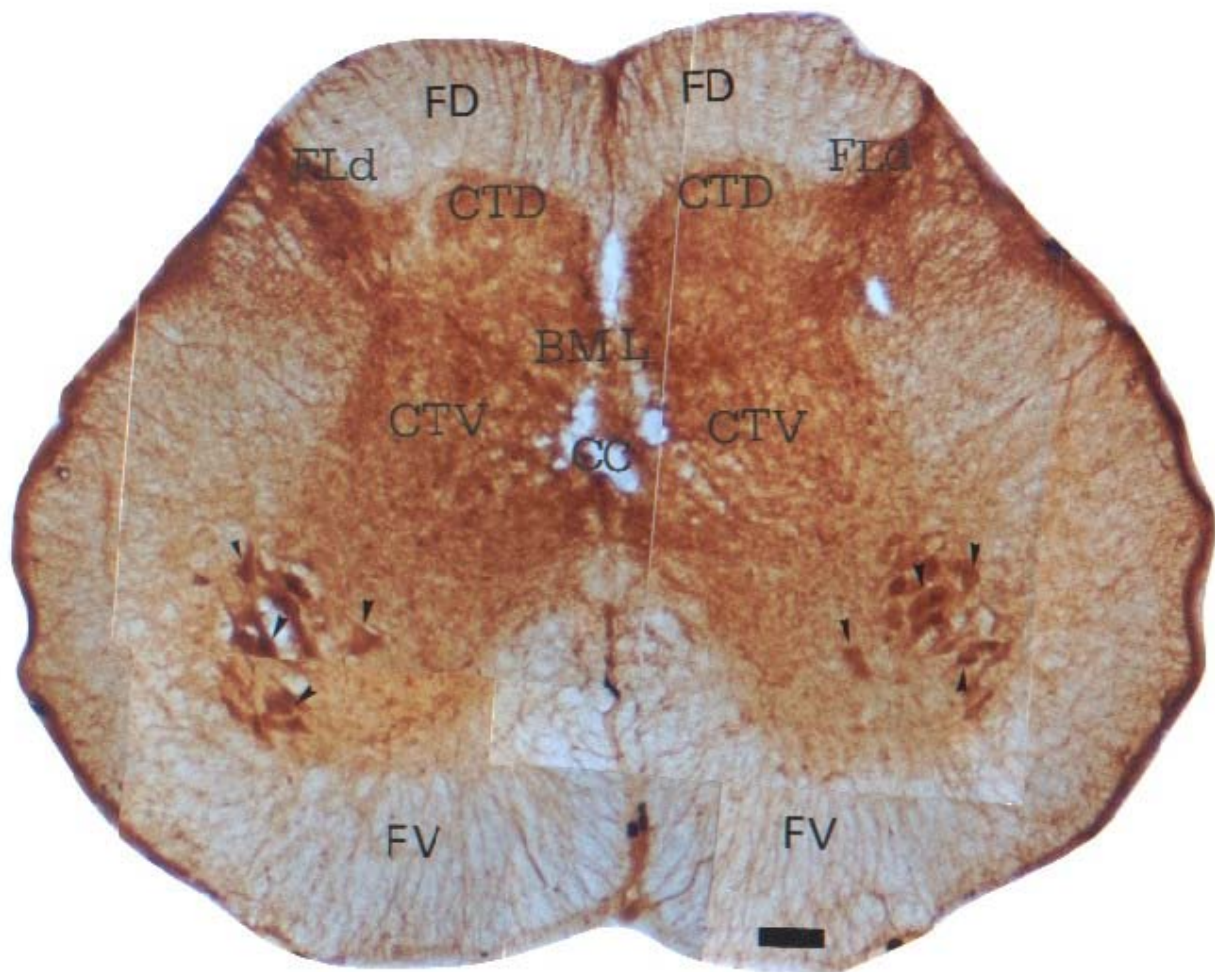


Fig. 7 - Fotomontagem de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da SOM-IR em animal controle. Notar a intensa imunorreatividade na parte dorsal do funículo lateral (FLd), e a redução desta imunorreação da porção dorsal para a ventral do funículo lateral. Todo o corno dorsal apresenta zonas de reação intensa, incluindo as regiões do campo terminal dorsal (CTD), banda mediolateral (BML) e campo terminal ventral (CTV). O funículo dorsal (FD) apresentou-se sempre negativo ao tratamento imunoistoquímico. O funículo ventral (FV) também demonstrou varicosidades imunorreativas. As cabeças de seta apontam neurônios motores fortemente SOM-IR localizados no corno ventral. Barra = 100 µm.

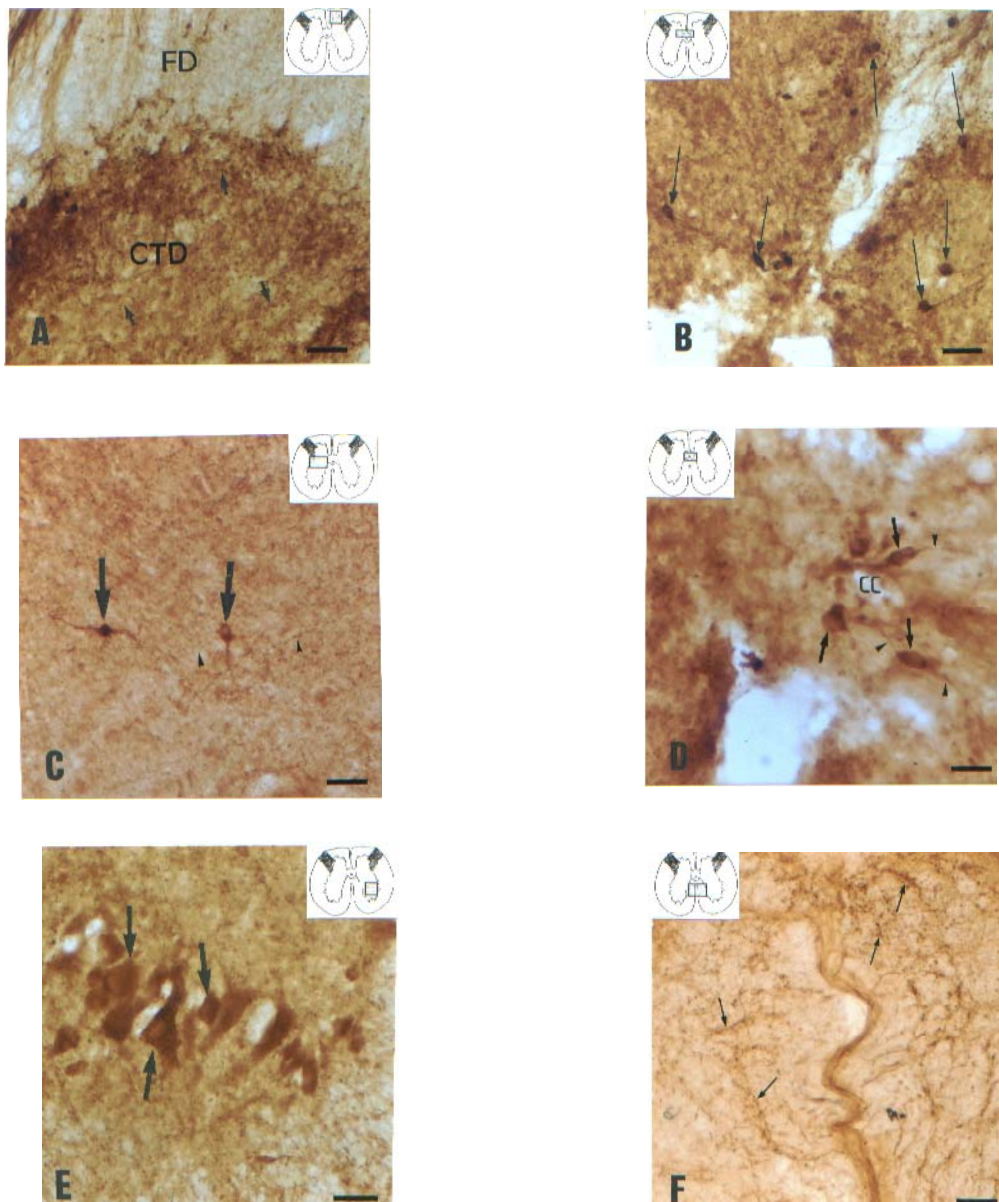


Fig. 8 - Fotomicrografias de secções coronais da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da SOM-IR em animais controle. (A) As setas apontam varicosidades SOM-IR no campo terminal dorsal (CTD). (B) Neurônios (setas) intensamente imunorreativos na banda mediolateral, localizados próximos à linha média da medula espinal. Notar seu aspecto fusiforme e a emergência de prolongamentos de seus corpos celulares. (C) Neurônios *bitufted* localizados na porção dorsal do corno ventral, a partir destes, emergem prolongamentos SOM-IR (setas). As cabeças de seta indicam as varicosidades dessa zona. (D) Neurônios *bitufted* (setas) localizados na região ao redor da cavidade do canal central (CC), onde se nota a intensa imunorreação e a emergência de prolongamentos. As cabeças de seta apontam prolongamentos em direção à cavidade do canal central e outro na direção oposta. (E) Região lateral do corno ventral. As setas indicam neurônios motores com intensa SOM-IR. (F) Funículo ventral. As varicosidades SOM-IR dessa região são apontadas pelas setas. A área cinza colocada sobre os esquemas no topo de cada figura representa as regiões mostradas em cada fotomicrografia. Barra = 40 μm (A, B, C, E, F); 20 μm (D).

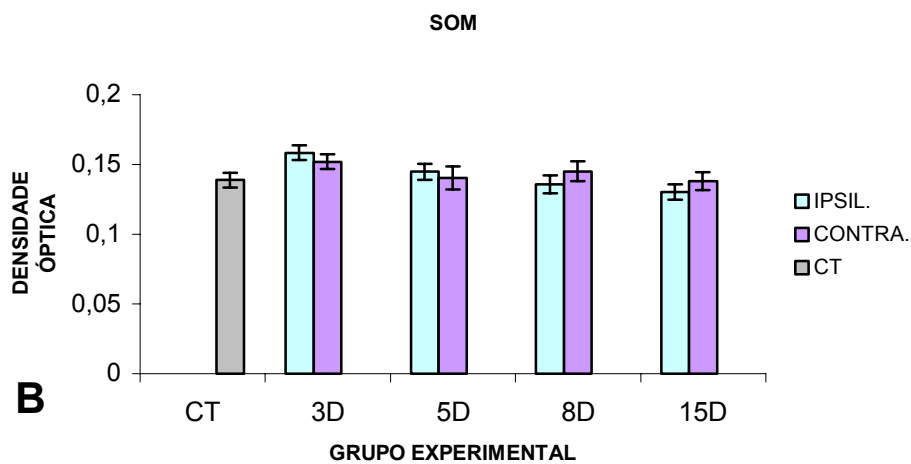
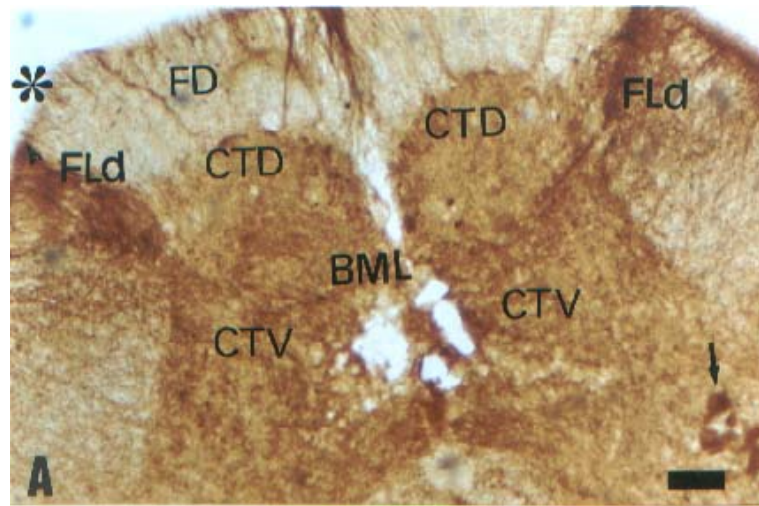


Fig. 9 - (A) Fotomicrografia de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da SOM-IR após 15 dias de desnervação periférica. O asterisco indica o lado ipsilateral à lesão. Notar a intensa imunorreação na porção dorsal do funículo lateral (FLd), a qual decresceu da porção dorsal para a ventral. A intensidade de reação permaneceu a mesma nos lados ipsilateral e contralateral à lesão. SOM-IR ainda é observada no campo terminal dorsal (CTD), na banda mediolateral (BML) e no campo terminal ventral (CTV). A seta indica neurônios motores com intensa SOM-IR no corno ventral. Barra = 100 μ m. (B) Valores da densidade óptica relativos à SOM-IR na medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* em diferentes períodos de tempo após a secção do nervo ciático. A comparação foi realizada entre os lados ipsilateral e contralateral à lesão dentro de um mesmo grupo experimental. 3D, 5D, 8D, 15D, correspondem respectivamente a 3, 5, 8 e 15 dias após a desnervação; CT, grupo controle; IPSI, lado ipsilateral à lesão; CONTRA, lado contralateral à lesão. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os lados ipsilateral e contralateral à lesão ($p > 0,05$, teste "t" de Student para amostras pareadas).

1.3. GABA

O padrão de distribuição da imunorreatividade ao GABA (GABA-IR) nos animais do grupo controle também foi preponderante na parte dorsal do funículo lateral (Fig. 10). Porém, a densidade da imunorreação foi menor do que aquela observada para a somatostatina e superior à obtida para o NPY. Os processos neuronais também podiam ser visualizados, na maior parte das vezes, como varicosidades. Similar ao observado para a somatostatina e para o NPY, a imunorreação observada nas varicosidades diminuía de intensidade da porção dorsal para a ventral do funículo lateral.

Além dessa região, o campo terminal dorsal também expressou varicosidades fortemente GABA-IR, as quais estavam esparsamente distribuídas, porém predominavam nas porções mais superiores desta região (Figs. 10 e 11A).

Na banda mediolateral não foram observadas varicosidades imunorreativas. Todavia, essa região apresentou um grande número de corpos celulares fusiformes GABA-IR. Esses neurônios apresentavam diâmetro médio de 8,5 μm e foram caracterizados como *bitufted*, sendo possível a visualização da emergência de prolongamentos a partir dos somas, os quais seguiam direções opostas (Fig. 10,11B,11C). A visualização dessas células foi possível ao longo de toda a extensão da banda mediolateral. Algumas localizavam-se na mesma área onde foram detectados os neurônios SOM-IR e NPY-IR.

Similar ao observado para somatostatina, neurônios GABA-IR também foram encontrados próximos à cavidade do canal central (Fig. 11D). Assim como aqueles visualizados na banda mediolateral, as células próximas ao

canal central também foram do tipo *bitufted* e apresentavam diâmetro médio de 8,5 μm . Seus prolongamentos imunorreativos seguiam o mesmo percurso dos neurônios SOM-IR, ou seja, um dirigia-se para a região da cavidade e o outro para o lado oposto da medula espinal.

Contudo, diferente da distribuição da SOM-IR ou da NPY-IR, o campo terminal ventral não apresentou varicosidades GABA-IR. O funículo dorsal, por sua vez, também foi negativo a este tratamento imunohistoquímico (Fig. 10).

No corno ventral também houve GABA-IR em neurônios motores, porém, a intensidade da reação nestas células foi fraca (Fig. 11E). A média do diâmetro dessas células foi de 37 μm .

A secção do nervo ciático ocasionou uma redução na GABA-IR na parte dorsal do funículo lateral (Fig. 12A). Nas demais regiões, o padrão de distribuição da GABA-IR na medula espinal lombossacral das rãs manteve-se o mesmo, sendo esta análise feita de forma qualitativa. A comparação estatística, realizada com dados obtidos pela densitometria óptica, foi feita entre os lados ipsilateral e contralateral à lesão dentro de um mesmo grupo experimental. No lado ipsilateral à lesão, 3 dias após a desnervação periférica, o decréscimo da GABA-IR na parte dorsal do funículo lateral foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$). Aos 5, 8 e 15 dias após a transecção nervosa foi mantido o mesmo padrão de imunorreatividade, sendo que a redução da GABA-IR permaneceu com o mesmo nível de significância estatística (Fig. 12B).

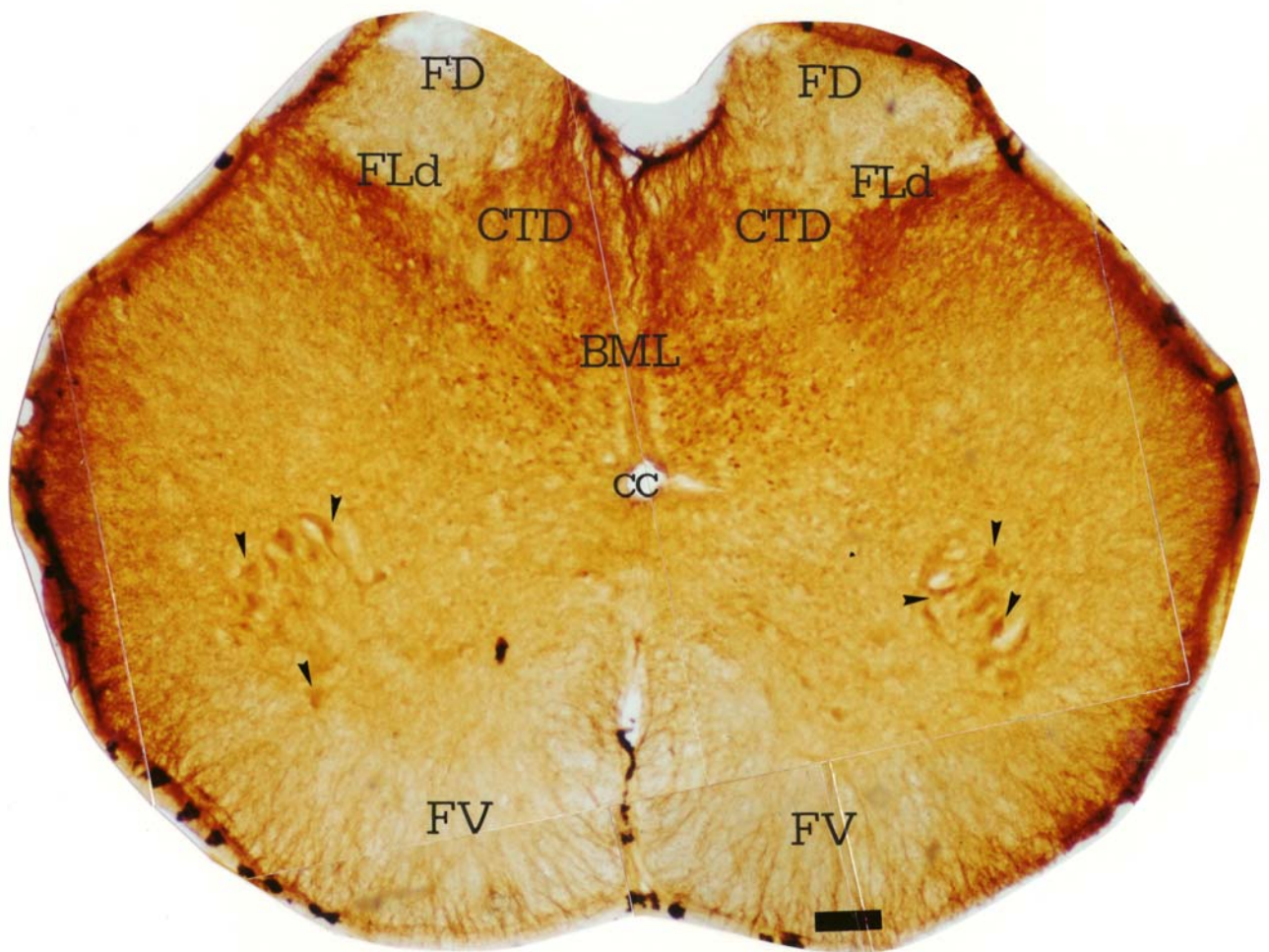


Fig. 10 - Fotomontagem de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da GABA-IR em animal controle. Notar a intensa imunorreação na parte dorsal do funículo lateral (FLd), a qual decresce da porção dorsal para a ventral. No corno dorsal destaca-se ainda a grande quantidade de neurônios GABA-IR na região da banda mediolateral (BML). O campo terminal dorsal também apresentou imunorreação. Os neurônios motores do corno ventral (cabeças de seta) mostram uma fraca GABA-IR. FV, funículo ventral; FD, funículo dorsal; CC, canal central. Barra =100 μ m.

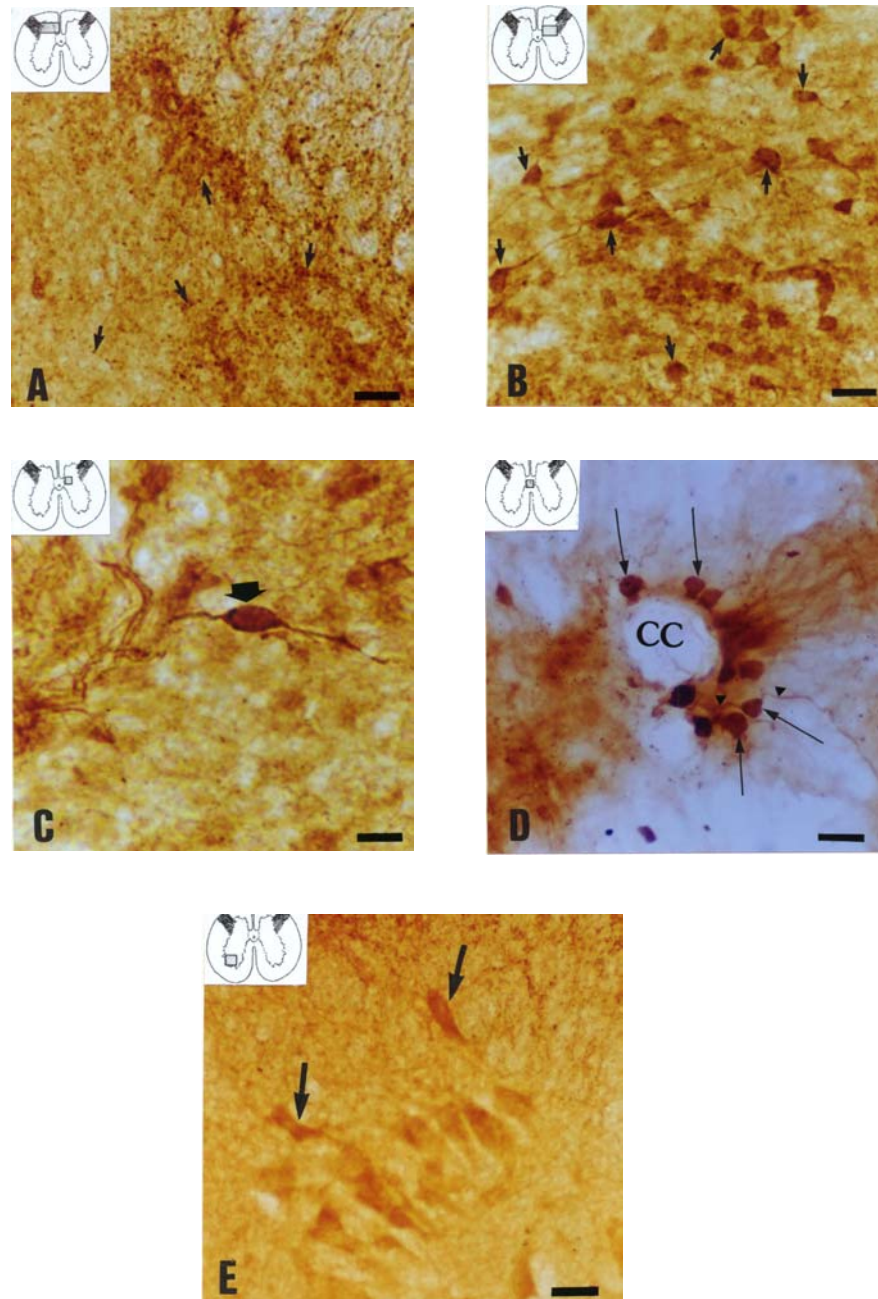


Fig. 11 - Fotomicrografias de secções coronais da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da GABA-IR em animais controle. (A) As setas indicam varicosidades imunorreativas no campo terminal dorsal. (B) Numerosos somas neuronais fortemente imunorreativos (setas) podem ser observados na banda mediolateral. Notar a emergência de prolongamentos imunorreativos a partir dessas células. (C) Detalhe em maior aumento de um neurônio *bitufted* (seta) da banda mediolateral. (D) Neurônios *bitufted* fortemente GABA-IR (setas) localizados em torno do canal central (CC), as cabeças de seta indicam seus prolongamentos. (E) As setas apontam neurônios motores do corno ventral apresentando uma fraca GABA-IR. A área cinza colocada sobre os esquemas no topo de cada figura representa as regiões mostradas em cada fotomicrografia. Barra = 40 μ m (A, B, E); 20 μ m (C,D).

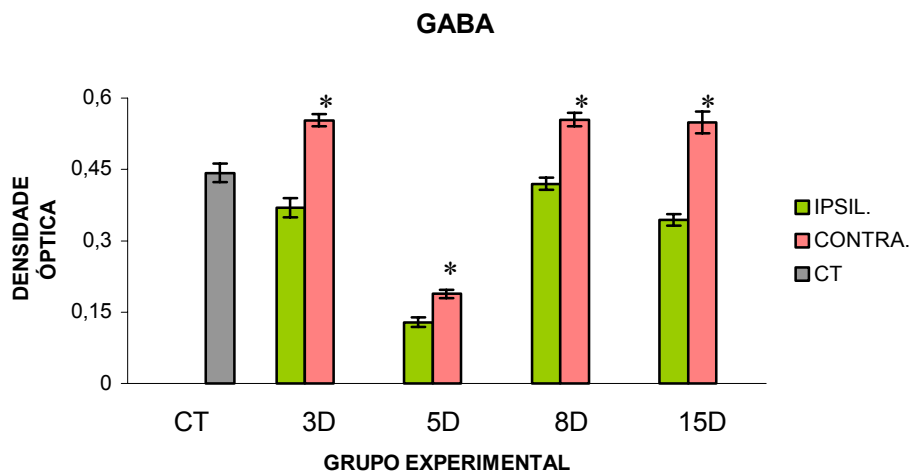
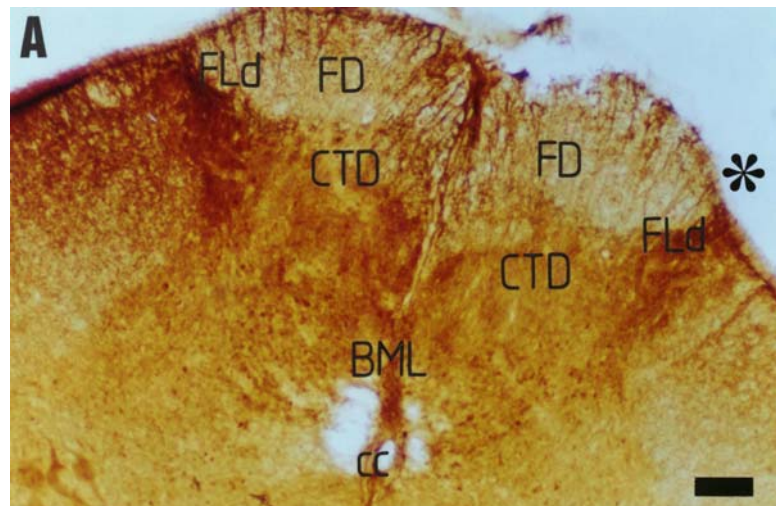


Fig. 12 - (A) Fotomicrografia de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da GABA-IR após 15 dias de desnervação periférica. Notar que a parte dorsal do funículo lateral (FLd) apresenta densa GABA-IR, sendo esta de menor intensidade no lado ipsilateral à lesão, o qual está indicado pelo asterisco. O campo terminal dorsal (CTD) e neurônios da banda mediolateral também exibem GABA-IR. O funículo dorsal (FD) mostra-se negativo ao tratamento imunistoquímico. CC, canal central. Barra = 100 μ m. (B) Valores da densidade óptica relativos à GABA-IR na medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* em diferentes períodos de tempo após a secção do nervo ciático. A comparação foi realizada entre os lados ipsilateral e contralateral à lesão dentro de um mesmo grupo experimental. 3D, 5D, 8D, 15D, correspondem respectivamente a 3, 5, 8 e 15 dias após a desnervação; CT, grupo controle; IPSI, lado ipsilateral à lesão; CONTRA, lado contralateral à lesão. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$; teste "t" de Student para amostras pareadas).

1.4. CGRP

Nos animais controle, o padrão de distribuição da imunorreatividade ao CGRP (CGRP-IR) foi restrito a poucas regiões. Semelhante ao observado para as demais substâncias neuroquímicas estudadas, a reação também se concentrou na parte dorsal do funículo lateral (Fig. 13A, B). Nessa região, foram visualizados agrupamentos de processos neuronais e varicosidades com intensa CGRP-IR (Fig. 13B). No entanto, diferente do que foi encontrado para o NPY, a somatostatina e o GABA, a CGRP-IR não apresentou diminuição do sentido dorsal para o ventral no funículo lateral.

Os processos imunorreativos na parte dorsal do funículo lateral pareciam penetrar no corno dorsal, na região lateral do mesmo. Algumas vezes, essas varicosidades podiam ser seguidas em seu trajeto pelo corno dorsal, onde percorriam pela banda mediolateral e pareciam cruzar para o lado oposto da medula espinal (Fig. 13C).

No corno ventral, alguns neurônios motores apresentaram CGRP-IR. Porém, essa imunorreação foi moderada e restrita a um pequeno número de células (Fig. 13A).

Após a desnervação periférica não foram detectadas modificações no padrão de distribuição das estruturas CGRP-IR na medula espinal das rãs *Rana catesbeiana* (Fig. 14A). Foram comparadas estatisticamente as médias da intensidade de reação da parte dorsal do funículo lateral. Essa comparação estatística foi realizada com dados obtidos pela densitometria óptica e foi feita entre os lados ipsilateral e contralateral à lesão dentro de um mesmo grupo

experimental. Nos intervalos de tempo analisados (3, 5, 8 e 15 dias após a lesão) não existiram diferenças estatisticamente significativas (Fig. 14B).

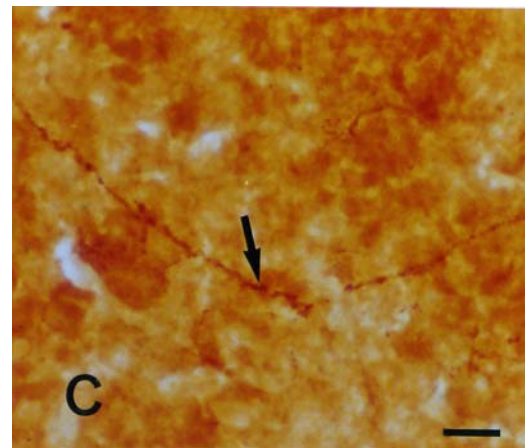
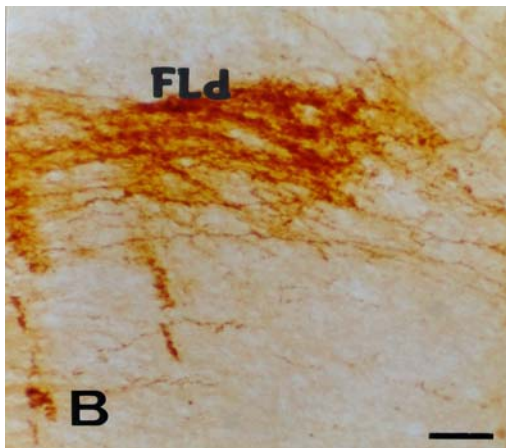
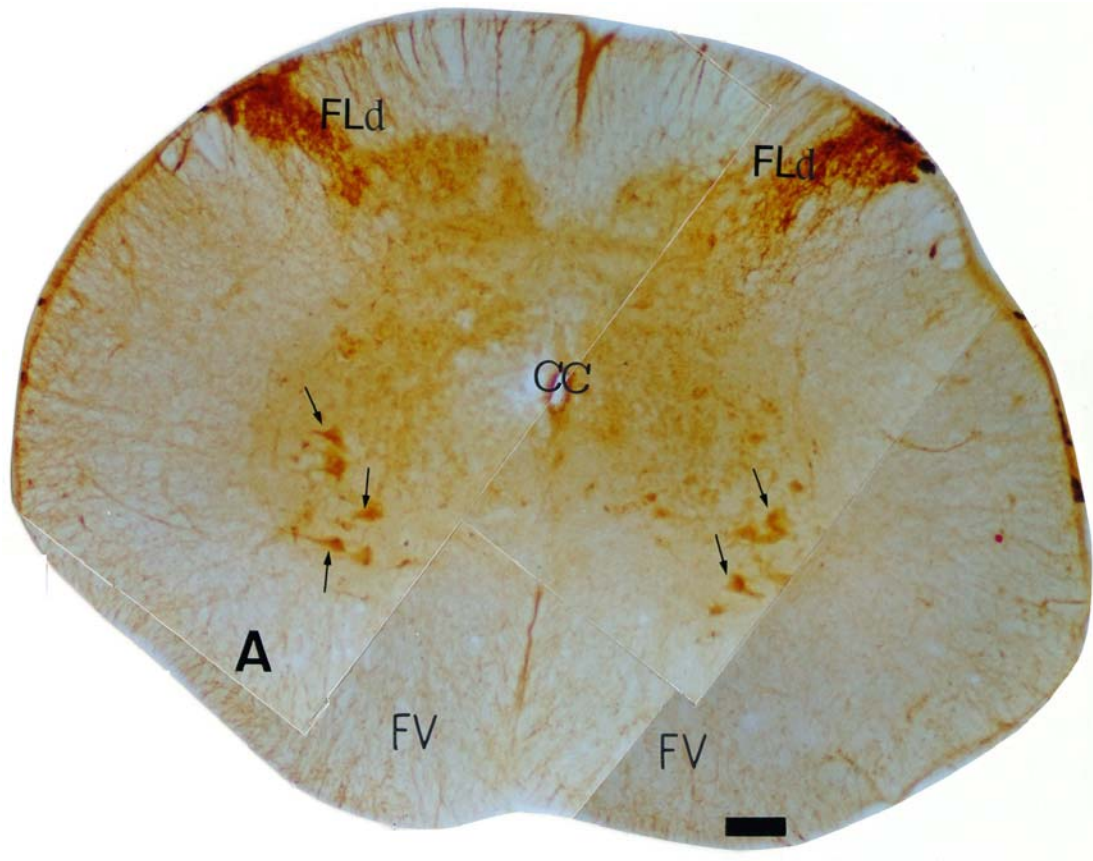


Fig. 13 - (A) Fotomontagem de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da CGRP-IR em animal controle. A maior zona de concentração de CGRP-IR é a parte dorsal do funículo lateral (FLd). Na substância cinzenta observam-se pontos de imunorreação e são destacados os neurônios motores no corno ventral (setas). FV, funículo ventral; CC, canal central. (B) Destaque da parte dorsal do funículo lateral (FLd), onde se observa claramente o agrupamento dos prolongamentos neuronais dessa região. (C) Varicosidade (seta) proveniente da parte dorsal do funículo lateral, a qual penetra na região da banda mediolateral e parece cruzar para o lado oposto da medula espinal. Barra = 100 μm (A); 40 μm (B, C).

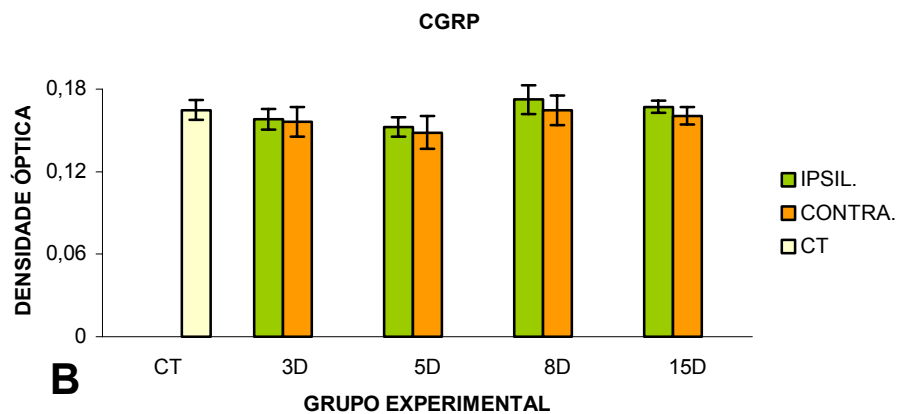
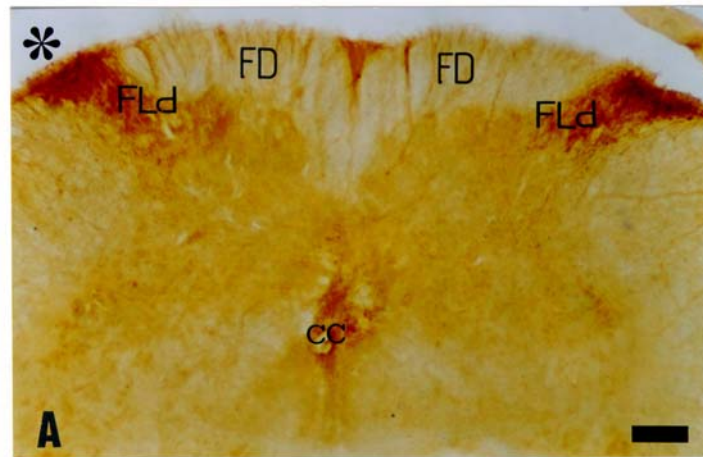


Fig. 14 - (A) Fotomicrografia de secção coronal da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* mostrando a distribuição da CGRP-IR após 15 dias de desnervação periférica. O asterisco indica o lado ipsilateral à lesão. Observar que a distribuição da CGRP-IR foi semelhante aos animais controle, sendo que a parte dorsal do funículo lateral (FLd) permaneceu como a zona de maior concentração de imunorreação. FD, funículo dorsal. Barra = 100 μ m. (B) Valores da densidade óptica relativos à CGRP-IR na medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* em diferentes períodos de tempo após a secção do nervo ciático. A comparação foi realizada entre os lados ipsilateral e contralateral à lesão dentro de um mesmo grupo experimental. 3D, 5D, 8D, 15D, correspondem respectivamente a 3, 5, 8 e 15 dias após a desnervação; CT, grupo controle; IPSI, lado ipsilateral à lesão; CONTRA, lado contralateral à lesão. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os lados ipsilateral e contralateral à lesão ($p > 0,05$, teste "t" de Student para amostras pareadas).

DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou o padrão de distribuição da imunorreatividade ao NPY, somatostatina, GABA e CGRP na medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* em situação basal e após a secção do nervo ciático. Entre as substâncias neuroquímicas estudadas, as características do padrão de distribuição nos animais em estado basal foram semelhantes ao demonstrado por outros estudos em anfíbios (LOREZ & KEMALI, 1981; ADLI et al., 1988; PETKÓ & SANTA, 1992; LÁZÁR et al., 1993; PETKO & OROSZ, 1996; PIERIBONE, et al., 1994). Dentre as principais similaridades encontradas destacam-se a maior intensidade de imunorreacção na substância cinzenta em relação à substância branca, e do corno dorsal em relação ao ventral, além da acentuada reacção observada na parte dorsal do funículo lateral.

1. Padrão de Distribuição do NPY, Somatostatina, GABA e CGRP em Rãs *Rana catesbeiana* em Condições Basais

1.1. Neuropeptídeo Y

Em *Rana esculenta* e *Xenopus laevis* foram descritas varicosidades NPY-IR ao longo da substância cinzenta, especialmente no corno dorsal. Somas neuronais foram detectados na zona intermediária da substância cinzenta e na base do corno dorsal (região que corresponde ao campo terminal ventral). Na substância branca, a metade dorsal do funículo lateral apresentou um acúmulo de fibras NPY-IR (LÁZÁR et al., 1993). Essa descrição é bastante similar à apresentada no presente trabalho para *Rana catesbeiana*. Portanto,

esse parece ser um padrão comum de distribuição do NPY na medula espinal de anfíbios. Essa distribuição sugere que o NPY é um participante nos mecanismos de codificação e transmissão da informação sensorial em anfíbios, o que também é sugerido para mamíferos (RODDY et al., 1990; LÁZÁR et al., 1993). No presente estudo, a banda mediolateral apresentou um predomínio de somas neuronais NPY-IR. Os prolongamentos desses somas apresentaram-se orientados em direção ao lado oposto da medula espinal, sugerindo um possível cruzamento de informações entre os dois lados da medula espinal na região da banda mediolateral. Em virtude das similaridades na NPY-IR entre diferentes classes de anfíbios, é possível que o cruzamento dos prolongamentos dos neurônios da banda mediolateral ocorra em outras espécies além de *Rana catesbeiana*. Porém, não se pode afirmar que essa seja uma característica comum em anfíbios, pois os estudos acima citados não referem o trajeto dos prolongamentos dos neurônios NPY-IR dessa região.

Roddy et al. (1990), descreveram a distribuição da NPY-IR em diversas espécies de mamíferos, inclusive em humanos. Nesses animais, a característica mais marcante foi a intensa imunorreação nas lâminas superficiais do corno dorsal. Além disso, esses autores também verificaram a presença de NPY na medula espinal através de radioimunoensaio, confirmando a maior concentração do peptídeo na substância cinzenta, principalmente no corno dorsal. A partir desses resultados foi sugerido o envolvimento do NPY no processamento da informação sensitiva. Portanto, devido à preservação do seu padrão de distribuição na medula espinal dos vertebrados, é possível inferir que essa função é mantida ao longo da filogênese.

1.2. Somatostatina

Lorez & Kemali (1981) observaram varicosidades positivas para a somatostatina na substância cinzenta espinal de *Rana esculenta*, especialmente no corno dorsal e na região intermediária da substância cinzenta. As regiões de maior SOM-IR em varicosidades no corno dorsal de *Rana esculenta* são as porções mais superficiais desta zona (PETKO & OROSZ, 1996). Ainda nesses animais, uma alta densidade de processos neuronais marcados para somatostatina foi encontrada na região de entrada da raiz dorsal (LOREZ & KEMALI, 1981), o que também foi demonstrado em *Rana pipiens* (ADLI et al., 1988). Esses resultados são semelhantes aos apresentados no presente estudo, onde a maior intensidade de reação ocorreu na parte dorsal do funículo lateral, sugerindo que em anfíbios a somatostatina possa atuar como mais um entre os transmissores aferentes primários.

Na substância branca espinal de *Rana esculenta* e *Rana pipiens*, o funículo lateral é uma região que contém fibras esparsas positivas para somatostatina (LOREZ & KEMALI, 1981; ADLI et al., 1988). No presente estudo, o funículo lateral de *Rana catesbeiana* apresentou uma intensa SOM-IR, a qual diminuía de intensidade da direção dorsal para a ventral. Isso evidencia a existência de diferenças no padrão de SOM-IR entre distintas espécies de anfíbios. Entretanto, até o momento essas diferenças não podem ser explicadas.

Em relação aos corpos celulares SOM-IR na medula espinal de anfíbios, a literatura ressalta a ampla distribuição dos mesmos no corno dorsal e na

região intermediária da substância cinzenta (LOREZ & KEMALI, 1981; ADLI et al., 1988).

Em torno do canal central também podem ser encontrados somas neuronais, os quais possivelmente comunicam-se com o líquido cerebrospinal, pois um de seus prolongamentos dirige-se para a cavidade do canal central (ADLI et al., 1988; PETKO & OROSZ, 1996). No presente estudo, a região em torno do canal central também apresentou corpos celulares SOM-IR. Possivelmente essas células desempenhem as mesmas funções em *Rana catesbeiana*.

Portanto, muitas semelhanças são demonstradas entre diferentes espécies de anfíbios. Em *Rana catesbeiana*, outra área onde foram identificados somas com forte imunorreação foi o corno ventral, região esta não descrita nos demais trabalhos de mapeamento da distribuição da somatostatina na medula espinal de anfíbios (LOREZ & KEMALI, 1981; ADLI et al., 1988; PETKO & OROSZ, 1996). Porém, a somatostatina também foi localizada no corno ventral de mamíferos, onde apresenta imunorreação em neurônios motores (STINE et al., 1982; KRUKOFF et al., 1986). Ainda em mamíferos, também foi evidenciada a presença de somatostatina em fibras localizadas no corno dorsal (HÖKFELT et al., 1975 apud PROUDLOCK et al., 1993). Em ratos, as lâminas superficiais são as regiões de maior SOM-IR na substância cinzenta dorsal (PROUDLOCK et al., 1993). A preponderância da localização da somatostatina no corno dorsal também foi observada através de radioimunoensaio, onde a concentração do peptídeo nesta região é quinze vezes maior em relação ao corno ventral (STINE et al., 1982). Portanto, a distribuição da somatostatina mostra-se semelhante entre anfíbios e

mamíferos, sugerindo funções similares para este peptídeo na medula espinal de diferentes classes de vertebrados.

Quanto à ação da somatostatina, ela ocorre pela ligação a receptores específicos, os quais estão divididos em 5 subtipos: sst_{1-5} , sendo que o sst_2 é subdividido em sst_{2a} e sst_{2b} (PATEL et al, 1995). Em relação à distribuição desses receptores, as lâminas superficiais (lâminas I e II e porção superior da lâmina III) foram as regiões que apresentaram maior intensidade de reação em ratos. Além das regiões acima mencionadas, outras zonas da medula espinal também apresentaram imunorreatividade aos receptores somatostatinérgicos, dentre elas, a lâmina X (região em torno do canal central) e neurônios motores no corno ventral (TODD et al., 1998; BANCHET et al., 1999). Devido as similaridades acima apresentadas, pode-se sugerir que na medula espinal de anfíbios os receptores para somatostatina apresentem uma distribuição semelhante aos mamíferos. Porém, essa hipótese é especulativa e mais estudos são necessários para confirmá-la.

No presente estudo, a banda mediolateral apresentou neurônios *bitufted* SOM-IR. Nos demais trabalhos acerca da distribuição da SOM-IR na medula espinal de anfíbios, essa região também evidenciou imunorreação intensa, porém concentrada em processos neuronais. Cabe ressaltar que a banda mediolateral é uma zona desprovida de aferentes primários (ADLI et al., 1988). Dessa forma, pode-se inferir que a somatostatina está presente em interneurônios espinais, os quais, devido a sua localização no corno dorsal, podem participar do processamento da informação sensorial, porém não especificamente para nocicepção.

Portanto, as prováveis funções da somatostatina na medula espinal de rãs são similares ao que é sugerido para mamíferos. Nesses últimos, a distribuição da SOM-IR, bem como de seus receptores, indicam possíveis efeitos do peptídeo sobre funções motoras e sensoriais (STINE et al., 1982; KRUKOFF et al., 1986; PROUDLOCK et al., 1993; TODD et al., 1998; BANCHET et al., 1999). Além disso, a diversidade de subtipos de receptores para a somatostatina pode estar relacionada com a variedade dos efeitos desencadeados por este neuropeptídeo, os quais podem ser excitatórios ou inibitórios (BANCHET et al., 1999). Dessa forma, é possível que exista uma circuitaria complexa dentro da medula espinal onde a somatostatina interage, sendo esta mantida em diferentes classes de vertebrados.

1.3. GABA

A distribuição da GABA-IR apresentada neste estudo é similar à descrita anteriormente para anfíbios, onde são observadas varicosidades ao longo das substâncias branca e cinzenta da medula espinal e corpos celulares nos cornos dorsal e ventral, além de neurônios marcados na região da cavidade do canal central (SHUPLIAKOV et al., 1992).

O GABA é amplamente distribuído na medula espinal de diferentes espécies de vertebrados, o que indica a importância desse neurotransmissor nos mecanismos fisiológicos do sistema nervoso de anamniotas e amniotas (BARBER et al., 1982; SHUPLIAKOV et al., 1992; UEMATSU et al., 1993; ANADÓN et al., 1998). Estudos imunistoquímicos para ácido glutâmico descarboxilase (GAD), a enzima biossintética do GABA, demonstraram a

presença de neurônios positivos em todas as lâminas da substância cinzenta (exceto na lâmina IX), na camada endimária e no funículo dorsolateral da medula espinal de ratos (BARBER et al., 1982). Entretanto, nesses animais, a maior concentração de GABA foi observada no corno dorsal, onde o aminoácido é identificado em interneurônios e terminais axônicos predominantemente nas lâminas II e III (MALCANGIO & BOWERY, 1996).

No corno dorsal de *Rana catesbeiana*, o campo terminal dorsal apresentou a maior GABA-IR. Como referido previamente, essa região corresponde, tanto morfológica quanto funcionalmente, às lâminas superficiais dos vertebrados superiores. Outra região GABA-IR observada no presente estudo foi a banda mediolateral, onde foram observados neurônios *bitufted*. Essa parece ser uma zona modulatória importante da medula espinal desses animais, pois essas células, possivelmente interneurônios, também demonstraram imunorreação para o NPY e a somatostatina. Isso sugere que o corno dorsal de anfíbios, assim como o de mamíferos (DUGGAN et al., 1991), é uma região onde se localizam muitos compostos neuroativos, os quais interagem entre si.

No presente estudo, neurônios GABA-IR também foram encontrados próximos à cavidade do canal central, similar ao observado para a somatostatina. Nessas células GABAérgicas, os prolongamentos seguiam o mesmo percurso dos neurônios SOM-IR, ou seja, um dirigia-se para a região da cavidade e o outro para o lado oposto da medula espinal. Esse mesmo padrão de distribuição de GABA-IR também é observado em outras espécies de anamniotas, como o anfioxo (ANADÓN et al., 1998), a *carpa Cyprinus carpio* (UEMATSU et al., 1993), a lampréia (DALE et al., 1987) e *Xenopus*

(BRODIN et al., 1990). Essas células, que provavelmente contactam com o líquido cerebrospinal, apresentam microvilosidades e cílios na superfície apical. Nesses animais, a função especulada para as mesmas é a de atuarem como receptores para estímulos mecânicos e químicos (DALE et al., 1987). É possível que as células localizadas em torno do canal central em *Rana catesbeiana* também tenham essa função.

Os neurônios motores GABA-IR visualizados no presente estudo apresentaram uma reação fraca. Entretanto, independente da intensidade de imunorreação, a presença de GABA no corno ventral de anfíbios pode estar relacionada à participação deste aminoácido em circuitos motores desses animais, assim como é descrito em mamíferos (BARBER et al., 1982). Porém, estudos complementares são necessários para esclarecer essa hipótese.

1.4. CGRP

Semelhante ao que foi observado em *Rana catesbeiana* no presente estudo, a região de entrada da raiz dorsal de *Rana esculenta* e *Xenopus laevis* foi a área de maior concentração da CGRP-IR (PETKÓ & SANTA, 1992; PIERIBONE, et al., 1994). No presente estudo, como em *Rana esculenta*, foi evidenciada imunorreação em neurônios motores (PETKÓ & SANTA, 1992). Dessa forma, a distribuição da CGRP-IR é semelhante entre diferentes espécies de anfíbios. Já a localização do CGRP na medula espinal de mamíferos predomina em regiões onde se localizam os aferentes primários, o que torna possível considerar este peptídeo como um modulador nociceptivo (SOMMER & MYERS, 1995; MILLAN, 1999; TERMAN & BONICA, 2001). Essa

hipótese pode ser aplicada às rãs, pois a região de entrada da raiz dorsal foi imunorreativa ao CGRP. Contudo, o campo terminal dorsal, região onde se localizam as terminações nervosas aferentes primárias, não apresentou CGRP-IR em *Rana catesbeiana*. Esse resultado sugere a existência de uma dissociação entre CGRP e nocicepção em anfíbios. Até o momento não é possível explicar esse resultado, tornando-se evidente a necessidade de outros estudos que esclareçam essa aparente diferença.

Apesar da imunorreação observada na parte dorsal do funículo lateral, o padrão de distribuição da CGRP-IR foi distinto ao apresentado pelas demais substâncias neuroquímicas abordadas neste estudo, pois, a reação foi mais concentrada e restrita a poucas regiões. Alguns dos prolongamentos CGRP-IR visualizados na parte dorsal do funículo lateral, observados sob a forma de varicosidades, podiam ser acompanhados em seu trajeto pelo corno dorsal, onde percorriam pela banda mediolateral e, semelhante às células NPY-IR detectadas nesta região, os prolongamentos CGRP-IR pareciam cruzar para o lado oposto da medula espinal. Porém, os prolongamentos CGRP-IR que apresentavam esse trajeto estavam presentes em menor proporção comparados aos NPY-IR. Contudo, parece válido sugerir que o CGRP também pode estar envolvido na transferência de informações sensoriais entre os dois lados da medula espinal.

A CGRP-IR em neurônios motores do corno ventral é outra característica marcante da distribuição deste peptídeo na medula espinal de mamíferos (GIBSON, 1984). No presente trabalho, alguns neurônios motores apresentaram CGRP-IR. Porém, essa imunorreação foi moderada e restrita a um pequeno número de células. Petkó & Santa (1992) descreveram variações

na intensidade de reação do CGRP em núcleos motores da medula espinal de *Rana esculenta*. Essa resposta heterogênea em relação ao conteúdo do CGRP em neurônios motores de anfíbios foi atribuída à condição funcional deste peptídeo. Ou seja, a produção de CGRP nessas células pode ser dinamicamente influenciada por uma relação entre as conexões sinápticas provenientes dos aferentes primários e de centros supraespinais, além da própria atividade muscular do animal. Isso poderia explicar o pequeno número de neurônios motores CGRP-IR na medula espinal de *Rana catesbeiana*, já que no presente estudo os animais eram mantidos em aquários no laboratório, e, talvez, por isso sua movimentação poderia estar diminuída.

2. Padrão de Distribuição do NPY, Somatostatina, GABA e CGRP em Rãs *Rana catesbeiana* Após a Desnervação Periférica

2.1. Neuropeptídeo Y

A secção do nervo ciático ocasionou alterações complexas no padrão de distribuição da NPY-IR na medula espinal de rãs *Rana catesbeiana*. Foi evidenciado um aumento bilateral na NPY-IR 3 dias após a lesão, entretanto, neste período foi observado um aumento estatisticamente significativo apenas no lado ipsilateral ($p < 0,05$). Após 7 dias, ambos os lados apresentaram elevação na NPY-IR ($p < 0,001$ no lado ipsilateral e $p < 0,05$ no lado contralateral). Essa intensa imunorreação observada aos 7 dias foi seguida de uma queda na NPY-IR após 15 dias de desnervação periférica, sendo este

fenômeno, da mesma forma que o precedente, bilateral ($p < 0,01$ para ambos os lados).

Em mamíferos, o NPY é frequentemente citado como um importante peptídeo participante dos mecanismos nociceptivos espinais (DUGGAN et al., 1991; ZHANG et al., 1995; MA & BISBY, 1998; COLVIN & DUGGAN, 2001; BAO et al., 2002) e supra-espinais (MA & BISBY, 1999; ZHANG et al., 2000). Porém, a modulação da informação sensorial pelo NPY não está restrita aos vertebrados superiores. Os efeitos fisiológicos desse peptídeo foram analisados na lampréia, sendo encontrada redução da excitabilidade pré e pós-sináptica, bem como redução na liberação de neurotransmissores após aplicação de NPY na solução que banhava as fatias de medula espinal durante os registros eletrofisiológicos (PARKER et al., 1998).

Em gatos, está demonstrado que microinjeções de NPY inibem a liberação de substância P nas camadas superficiais do corno dorsal. Isso sustenta o papel do NPY no controle das informações aferentes, especialmente a nociceptiva, reforçando a hipótese da inibição pré-sináptica de neurotransmissores (RODDY et al., 1990; DUGGAN et al., 1991). Além disso, o NPY apresenta co-localização com diversas substâncias neuroquímicas em regiões envolvidas com a nocicepção, sendo este padrão observado em diferentes classes de animais (ZHANG et al., 1995; PARKER et al., 1998). No modelo animal utilizado neste estudo, o corno dorsal apresentou intensa NPY-IR, especialmente no campo terminal ventral. Enquanto o padrão de distribuição observado para substância P em *Rana catesbeiana* ficou concentrado na banda mediolateral (PARTATA et al., 2002). Essa região também apresentou células NPY-IR. Assim, pode-se sugerir que o NPY

poderia modular a expressão de substância P na região da banda mediolateral e na porção dorsal do funículo lateral, regiões imunorreativas para ambos os peptídeos. Outro aspecto que deve ser destacado é a presença de prolongamentos neuronais NPY-IR no campo terminal ventral, enquanto que os prolongamentos imunorreativos à substância P (SP-IR) localizaram-se na banda mediolateral, uma região adjacente ao campo terminal ventral. Devido à proximidade dessas áreas é possível sugerir que o NPY poderia controlar o fluxo de informações sensoriais conduzidas pelos processos neuronais SP-IR. Porém, estudos adicionais são imprescindíveis para esclarecer essa hipótese. Os efeitos da secção do nervo ciático sobre a imunorreatividade ao NPY e à substância P em *Rana catesbeiana* trazem subsídios para essas questões. Essa situação experimental ocasiona uma queda na SP-IR e uma elevação na NPY-IR até um período de 7 dias após a lesão. O padrão de redução na SP-IR foi mantido até 15 dias e nesse período a NPY-IR também diminuiu. Neste estudo não foi considerado o intervalo de tempo de 20 dias após a axotomia, porém, Partata et al. (2002) verificaram que, neste período, a SP-IR retornou aos valores observados nos animais controle. Portanto, é possível que o NPY possa estar modulando as ações da substância P após lesão nervosa periférica em anfíbios, assim como é proposto para outras classes de vertebrados. Entretanto, as mudanças na NPY-IR foram bilaterais, enquanto a diminuição observada na SP-IR ocorreu somente no lado ipsilateral à lesão. Pode ser sugerido que as variações bilaterais sejam resultado do possível cruzamento de informações na região da banda mediolateral, pois os processos neuronais das células localizadas nessa zona apresentaram-se orientados em direção ao lado oposto da medula espinal. Cabe ser ressaltado que o padrão de alteração

da NPY-IR em medula espinal de rãs é semelhante ao descrito para os mamíferos. Nesses animais, a secção nervosa periférica também causa elevações significativas na NPY-IR no corno dorsal espinal e em células do gânglio da raiz dorsal (WAKISAKA, et al., 1991; RYDH-RINDER et al., 1996; FUKUOKA et al., 1998). Alguns autores descrevem um aumento ipsilateral (WAKISAKA, et al., 1991; FUKUOKA et al., 1998), enquanto outros relatam variações bilaterais, sendo menos acentuadas no lado contralateral (RYDH-RINDER et al., 1996). Assim, sendo essas respostas similares, o estudo do papel do NPY em rãs submetidas às condições de dor neuropática pode trazer contribuições relevantes às questões que ainda permanecem especulativas em mamíferos.

2.2. Somatostatina

A distribuição de estruturas SOM-IR, bem como de seus receptores, ao longo do SNC do rato inferem o papel deste peptídeo no processamento, modulação e/ou transmissão da informação nociceptiva (TODD et al., 1989; SCHINDLER et al., 1998; CARLTON et al., 2001). Entretanto, no presente estudo, a secção do nervo ciático não ocasionou qualquer alteração na SOM-IR na medula espinal de *Rana catesbeiana*, mas a hipótese da ação desse neuropeptídeo sobre a nocicepção em anfíbios não deve ser descartada.

Na medula espinal de mamíferos, a substância P atua sobre os receptores NK1, os quais se localizam em regiões do corno dorsal distintas às descritas para os receptores do subtipo sst_{2a} da somatostatina (TODD et al., 1989). Portanto, parece existir uma separação funcional entre a substância P e

a somatostatina, pois esses peptídeos agem sobre neurônios diferentes dentro das lâminas superficiais do corno dorsal. Entretanto, ambos são liberados após estimulação periférica nociva. A liberação de substância P está associada com estimulação mecânica nociva, enquanto que a liberação de somatostatina ocorre após estimulação térmica nociva. Portanto ambos os peptídeos estão envolvidos na transmissão nociceptiva, porém após diferentes modalidades nociceptivas (KURAIISHI et al., 1985), as quais devem ser estudadas em vertebrados não mamíferos, inclusive em anfíbios.

Outra situação que suporta a atuação da somatostatina na nocicepção é demonstrada através de estados inflamatórios, como aqueles induzidos experimentalmente por injeção de formalina na pata do animal. Nesses casos, a administração intratecal de somatostatina inibe o aumento da imunorreatividade à substância P na medula espinal. Então, é possível que o efeito analgésico ocasionado pela somatostatina seja resultante da inibição da resposta nociva induzida pela substância P (RUAN et al., 1997). Esta situação experimental precisa ser estudada em rãs, pois os resultados do presente estudo consideraram apenas os efeitos da secção nervosa periférica.

Entretanto, após a rizotomia dorsal e lesão das fibras descendentes do funículo dorsolateral, não foi evidenciada modificação no padrão de distribuição dos receptores do subtipo sst_{2a} na medula espinal de ratos. Esse achado indica a ausência de localização desses receptores em neurônios aferentes primários. A partir disso, é improvável que a inibição pré-sináptica da liberação de transmissores seja o mecanismo de analgesia conferido pela somatostatina (SCHINDLER et al., 1998).

Além disso, estudos eletrofisiológicos e comportamentais atestam a ação pró-nociceptiva de antagonistas aos receptores somatostatinérgicos, pois estes ocasionam comportamento nociceptivo e aumento da atividade de nociceptores em ratos normais e após injeção de formalina, enquanto que agonistas dos mesmos revertem essas ações. Dessa forma, os receptores para somatostatina podem exercer um controle inibitório tônico sobre os nociceptores periféricos (CARLTON et al., 2001).

As ações anti-nociceptivas relacionadas à somatostatina ocorrem em situações inflamatórias (KARALIS et al., 1994; SZOLCSÁNYI et al., 1998a; 1998b). Portanto, mais do que um peptídeo anti-nociceptivo, a somatostatina deve ser considerada como um peptídeo anti-inflamatório. Durante estados inflamatórios, especialmente inflamação neurogênica, são bem documentadas as ações integradas da substância P e do CGRP, que são peptídeos excitatórios, pró-inflamatórios (BRAIN & CAMBRIDGE, 1996; HOLZER, 1998). Assim, provavelmente deve existir uma interação entre somatostatina, substância P e CGRP durante situações inflamatórias em mamíferos. É possível que isso também aconteça em rãs, porém para verificar esta hipótese são necessários estudos sobre os efeitos da inflamação nesses animais. Cabe ressaltar que em *Rana catesbeiana* a SOM-IR apresentou áreas de sobreposição com a SP-IR (PARTATA et al., 2002) e com a CGRP-IR e a NPY-IR, como, por exemplo, a parte dorsal do funículo lateral e a banda mediolateral. Isso pode indicar regiões onde esses peptídeos possam estar co-localizados e, dessa forma, participem da complexa circuitaria existente na medula espinal das rãs, assim como é descrito para os mamíferos.

2.3. GABA

A desnervação periférica ocasionou uma redução bastante significativa ($p < 0,001$) na imunorreatividade GABAérgica no lado ipsilateral à lesão em rãs *Rana catesbeiana*. Esses resultados são semelhantes aos encontrados nos estudos realizados em mamíferos (CASTRO-LOPES et al., 1993; IBUKI et al., 1997; FUKUOKA et al., 1998). No entanto, a redução da GABA-IR observada por Ibuki et al. (1997) foi bilateral, principalmente no período de uma a três semanas após a lesão nervosa periférica. Nesse estudo, foi evidenciada perda total da GABA-IR nas lâminas superficiais do corno dorsal de ratos, sendo os resultados significativos após 3 dias de lesão no lado ipsilateral. O lado contralateral também apresentou perda total da GABA-IR, porém esse quadro foi evidenciado em um intervalo de tempo mais curto (uma a três semanas após a lesão) do que o lado ipsilateral, sendo a GABA-IR completamente restabelecida 7 semanas após a lesão. Nesse período, o lado ipsilateral também apresentou restauração da GABA-IR, porém de forma incompleta. De forma semelhante ao verificado no presente estudo, as modificações da GABA-IR apresentadas por Ibuki et al. (1997) foram mais marcantes no lado ipsilateral. Porém, em *Rana catesbeiana*, o lado contralateral não expressou nenhuma tendência à redução da GABA-IR. A manutenção da imunorreatividade GABAérgica no lado contralateral à lesão poderia proporcionar uma atenuação dos efeitos relacionados com a redução dos mecanismos inibitórios deste aminoácido. Em mamíferos os comportamentos de alodinia e hiperalgesia ocorrem paralelamente à redução da atividade GABAérgica no corno dorsal (CUI et al., 1997; IBUKI et al., 1997; MALAN et al.,

2002; SOMERS & CLEMENTE, 2002). A realização de estudos comportamentais em rãs submetidas à lesão nervosa periférica será importante para verificar se esses animais também apresentam comportamentos sensoriais alterados após a axotomia. Esses estudos também podem ser úteis para possíveis correlações entre essas anormalidades comportamentais e a atividade GABAérgica na medula espinal. Além disso, deve ser destacado que a presença de neurônios GABA-IR na banda mediolateral sugere a possibilidade de cruzamento de informações entre os dois lados da medula espinal. Portanto, em *Rana catesbeiana*, o lado contralateral à lesão poderia atuar de forma compensatória, uma vez que poderia estar recebendo informações ipsilaterais e contralaterais.

A redução do GABA no corno dorsal parece ser um padrão de resposta comum observado após lesão nervosa periférica, onde o GABA apresenta uma queda temporária nas regiões de entrada de aferentes primários no corno dorsal e no gânglio da raiz dorsal (CASTRO-LOPES et al., 1993; IBUKI et al., 1997; FUKUOKA et al., 1998). A resposta GABAérgica demonstra ser conservada entre os vertebrados, já que anfíbios e mamíferos apresentam resultados similares após situações indutoras de dor neuropática. Isso sustenta o papel desse aminoácido inibitório como um importante modulador das informações nociceptivas na medula espinal de diferentes classes de animais submetidas às condições de dor neuropática.

No presente trabalho, as variações da GABA-IR foram acompanhadas até um período de 15 dias após a axotomia. Nesse intervalo de tempo não houve recuperação da GABA-IR. Porém, é provável que após um período maior exista recuperação da GABA-IR, assim como foi observado para a

substância P em *Rana catesbeiana* (PARTATA et al., 2002) e em mamíferos submetidos a lesões periféricas (TESSLER et al., 1985). Em mamíferos, a redução temporária da GABA-IR foi atribuída a uma *down-regulation* da síntese desse aminoácido no corno dorsal (CASTRO-LOPES et al., 1993; IBUKI et al., 1997; FUKUOKA et al., 1998). Estudos eletrofisiológicos também suportam essa hipótese. Após secção do nervo ciático a atividade elétrica gerada pelo GABA sobre as raízes dorsais foi significativamente reduzida. Esse fenômeno está associado à gênese dos estados anormais de sensibilidade, como alodinia e hiperalgesia (KINGERY et al., 1988; LAIRD & BENNETT, 1992). Entretanto, as respostas comportamentais normais (observadas antes da lesão nervosa) são recuperadas após um período variável de tempo (CUI et al., 1997; IBUKI et al., 1997; FUKUOKA et al., 1998), e isso ocorre concomitante ao restabelecimento do conteúdo GABAérgico no corno dorsal (CUI et al., 1997; SOMERS & CLEMENTE, 2002). Além disso, não foram detectados sinais de morte em neurônios GABAérgicos após lesão nervosa periférica em mamíferos (IBUKI et al., 1997; FUKUOKA et al., 1998). No presente estudo também não foram observados sinais de morte neuronal após a secção do nervo ciático. Embora não tenha sido realizada a contagem do número de células, aparentemente não ocorreram alterações na quantidade de neurônios GABA-IR da banda mediolateral após a axotomia. Assim, a redução da GABA-IR na medula espinal de *Rana catesbeiana* também pode ser resultado de *down-regulation* da síntese desse aminoácido.

A substância P e o GABA estão co-localizados nas lâminas superficiais da medula espinal de gatos (MA & RIBEIRO-DA-SILVA, 1995). Isso indica que neurotransmissores excitatórios e inibitórios podem interagir durante o

processamento da informação sensorial gerando efeitos complexos. Em *Rana catesbeiana*, a banda mediolateral e a parte dorsal do funículo lateral apresentaram imunorreação tanto para o GABA (demonstrado no presente estudo) como para substância P (PARTATA et al., 2002). Não é possível afirmar se o GABA e a substância P apresentam co-localização na medula espinal das rãs. No entanto, a proximidade entre as estruturas imunorreativas aos mesmos sugere uma possibilidade de interação de seus efeitos no corno dorsal. Ainda, é possível que as fibras SP-IR da banda mediolateral possam modular a atividade dos neurônios GABA-IR desta região. Em mamíferos, foi demonstrado que neurônios GABAérgicos da medula espinal possuem receptores para substância P e para CGRP (HIURA et al., 1998). Se isso também ocorre na medula espinal de rãs, pode-se sugerir que a alteração da substância P esteja controlando a *down-regulation* de GABA no corno dorsal de *Rana catesbeiana*, hipótese esta que necessita ser verificada. Sommer e Myers (1995) observaram redução da SP-IR no corno dorsal após lesão nervosa periférica em mamíferos, e relacionaram esse resultado a um aumento na sensibilidade de interneurônios espinais aos sinais aferentes. Talvez os anfíbios também apresentem essas respostas, já que os interneurônios da banda mediolateral permanecem imunorreativos, não apenas ao GABA, mas também à SOM e ao NPY, após desnervação periférica.

2.4. CGRP

Estudos em mamíferos demonstram que lesões nervosas ocasionam modificações na concentração e na imunorreatividade ao CGRP na medula

espinal e no gânglio da raiz dorsal (VILLAR et al., 1991; SOMMER & MYERS, 1995; RYDH-RINDER et al., 1996; FUKUOKA et al., 1998; MIKI et al., 1998). A redução da CGRP-IR observada nas lâminas superficiais do corno dorsal freqüentemente está associada a uma diminuição paralela de substância P (VILLAR et al., 1991; SOMMER & MYERS, 1995; RYDH-RINDER et al., 1996).

Em mamíferos, ações sinérgicas do CGRP e da substância P são descritas quanto à regulação da transmissão sináptica de aferentes primários. Esses peptídeos acentuam a liberação de aminoácidos excitatórios, incluindo glutamato e aspartato, na medula espinal e no gânglio da raiz dorsal de ratos, em condições basais e após estimulação elétrica repetida das raízes dorsais lombares (KANGRGA & RANDIC, 1990). Esses resultados fornecem evidência adicional ao envolvimento do CGRP na transmissão e modulação da nocicepção em mamíferos. Em rãs pode-se sugerir, em princípio, que o CGRP não participa do processamento da nocicepção, pois, no presente estudo não foram encontradas variações na CGRP-IR após a secção do nervo ciático. Dessa forma, o CGRP provavelmente esteja envolvido em outros aspectos da informação sensorial em *Rana catesbeiana*, entretanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer o papel deste peptídeo na medula espinal de anfíbios. Até o momento não existem outros trabalhos acerca do efeito de lesões nervosas periféricas sobre a expressão do CGRP em anfíbios. Porém, a CGRP-IR foi investigada após transecção espinal em *Xenopus laevis*, não sendo detectadas modificações do padrão de distribuição deste peptídeo após o procedimento experimental citado (PIERIBONE et al., 1994).

‘Entretanto, em rãs *Rana catesbeiana* a substância P apresentou queda em seu padrão de distribuição após axotomia periférica (PARTATA et al.,

2002). Nesse estudo a região da medula espinal onde foram evidenciadas as variações foi a parte dorsal do funículo lateral. Portanto, a substância P provavelmente esteja envolvida na transmissão sensorial desses animais, semelhante ao que ocorre em mamíferos. Porém, a dissociação dos resultados do CGRP e da substância P em rãs sugere que o processamento da informação nociceptiva, em nível espinal, ocorre através de sistemas peptidérgicos diferentes dos observados em amniotas. Contudo, isso parece ser válido apenas para a relação entre CGRP e substância P, pois o NPY, a somatostatina e o GABA apresentaram respostas similares àquelas observadas em mamíferos, o que pode indicar a utilização de alguns sistemas de interação química entre diferentes classes de vertebrados. Assim, a medula espinal de rãs apresenta circuitos complexos para a transmissão da informação sensorial nociceptiva, sendo alguns destes semelhantes aos de mamíferos. Porém, a medula espinal da rã apresenta suas peculiaridades, as quais precisam ser consideradas nos estudos fisiológicos e farmacológicos deste tecido, sendo, todavia, um bom modelo para os estudos referentes à nocicepção.

CONCLUSÕES

O padrão de distribuição das substâncias neuroquímicas estudadas neste trabalho indica o envolvimento dos mesmos no processamento das informações sensoriais de rãs *Rana catesbeiana*. Um dos principais aspectos que suportam essa hipótese é a forte imunorreação evidenciada na parte dorsal do funículo lateral, uma região de entrada de fibras aferentes primárias onde GABA, CGRP, NPY e somatostatina apresentaram uma forte imunorreação. Além dessa área do corno dorsal, neurônios do tipo *bitufted*, localizados na banda mediolateral, mostraram intensa imunorreatividade ao NPY, GABA e somatostatina. Porém, neurônios CGRP-IR não foram detectados nessa área. GABA, somatostatina e CGRP parecem participar de circuitos motores, uma vez que os neurônios motores do corno ventral foram imunorreativos a essas substâncias neuroquímicas. A presença de GABA, somatostatina e NPY nos funículos lateral e ventral sugere a participação dos mesmos em vias descendentes que chegam a essas regiões. Porém, a falta de imunorreação no funículo dorsal provavelmente esteja indicando a não participação dessas substâncias neuroquímicas em vias ascendentes dessa região que seguem em direção a porções mais superiores do neuroeixo. Porém, devido a possível presença de imunorreatividade no trato de Lissauer, essas substâncias poderiam estar participando de vias ascendentes intrínsecas da medula espinal. Estudos mais detalhados poderão verificar essas hipóteses.

A secção do nervo ciático ocasionou efeitos complexos sobre a distribuição das substâncias neuroquímicas estudadas na medula espinal de rãs. A ausência de alterações na CGRP-IR sugere pouca participação desse peptídeo nos mecanismos espinais, especialmente àqueles relacionados com a dor neuropática. Talvez o CGRP atue de forma mais significativa em outras

situações que provocam dor, como por exemplo, injeção de agentes inflamatórios. A somatostatina também não apresentou variações após a axotomia. Porém, seu papel em relação à transmissão nociceptiva não deve ser descartado, pois a SOM-IR foi intensa nas regiões do corno dorsal, especialmente no campo terminal dorsal. Estudos acerca dos efeitos da somatostatina em estados inflamatórios devem ser realizados em anfíbios, já que em mamíferos essa situação determina modificações na expressão desse peptídeo.

Diferentemente do CGRP e da somatostatina, GABA e NPY apresentaram modificações significativas após a axotomia. A redução da GABA-IR observada no lado ipsilateral à lesão pode ser atribuída a uma *down-regulation* desse neurotransmissor após secção nervosa periférica, uma vez que não ocorreram sinais de perda neuronal, pois os neurônios *bitufted* da banda mediolateral permaneceram imunorreativos e aparentemente não variaram em quantidade. Em relação ao NPY, a secção do nervo ciático ocasionou inicialmente um aumento bilateral de sua imunorreatividade na parte dorsal do funículo lateral, a qual diminuiu 15 dias após este procedimento experimental. É possível que essas variações tenham resultado inicialmente de uma elevação na expressão do NPY nas células do gânglio da raiz dorsal, hipótese que está sendo verificada em nosso laboratório atualmente. Porém, não deve ser descartada a possibilidade de que o aumento seja resultante de uma maior liberação de NPY por vias descendentes que chegam à parte dorsal do funículo lateral. A posterior queda na imunorreatividade desse peptídeo pode estar associada com a redução dos sinais nociceptivos. Ainda, outros neurotransmissores podem estar modulando as modificações oriundas da lesão nervosa periférica, já que a medula espinal das rãs parece possuir

circuitos complexos em sua estrutura. Dessa forma, é necessário conhecer essa rede intrincada de conexões, a qual deve envolver também outros peptídeos e neurotransmissores, de modo similar ao que ocorre em mamíferos.

Portanto, os resultados do presente estudo evidenciam a necessidade da realização de estudos complementares para o conhecimento da circuitaria espinal relacionada com a nocicepção em *Rana catesbeiana*. Isso certamente contribuirá para o esclarecimento de muitas questões ainda especulativas em mamíferos, além disso, fornecerá subsídios para o conhecimento dos aspectos evolutivos da nocicepção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adli DSH, Rosenthal BM, Yuen GL, Ho RH, Cruce WLR. 1988. 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.

Amir R, Devor M. 1996. Axonal cross-excitation in nerve-end neuromas: comparison of A- and C-fibers. *J Neurophysiol*; 68:1160-1166.

Anadón R, Adrio F, Rodríguez-Moldes I. 1998. Distribution of GABA immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum* Pallas). *J Comp Neurol*; 401:293-307.

Banchet GS, Schindler M, Hervieu G, Beckmann B, Emson PC, Heppelmann B. 1999. Distribution of somatostatin receptor subtypes in rat lumbar spinal cord examined with gold-labelled somatostatin and anti-receptor antibodies. *Brain Res*; 816:254-257.

Bao L, Wang HF, Cai HJ, Tong YG, Jin SX, Lu YJ, Grant G, Hökfelt T, Zhang X. 2002. Peripheral axotomy induces only very limited sprouting of coarse myelinated afferents into inner lamina II of rat spinal cord. *Eur J Neurosci*; 16:175-185.

Barber RP, Vaughn JE, Roberts E. 1982. The cytoarchitecture of gabaergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res*; 238:305-328.

Basbaum AI, Jessell TM. 2000. The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds). *Principles of neural science*, McGraw-Hill, 472-491.

Benoliel R, Eliav E, Iadarola MJ. 2001. Neuropeptide Y in trigeminal ganglion following chronic constriction injury of the rat infraorbital nerve: is there correlation to somatosensory parameters? *Pain*; 91:111-121.

Bradford HF. 1986. Neuropeptides: The rising generation of neuroactive substances. In: Bradford HF (ed). Chemical Neurobiology, WH Freeman and Company, 265-310.

Brain SD, Cambridge H. 1996. Calcitonin gene-related peptide: Vasoactive effects and potential therapeutic role. *Gen Pharmacol*; 27:607-611.

Byers MR, Bonica JJ. 2001. Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman R, Turk DC (eds). Bonica's management of pain, Lippincott Williams & Wilkins, 26-72.

Carlton SM, Du J, Davidson E, Zhou S, Coggeshall RE. 2001. Somatostatin receptors on peripheral primary afferent terminals: inhibition of sensitized nociceptors. *Pain*; 90:233-244.

Castro-Lopes JM, Tavares I, Coimbra A. 1993. GABA decreases in the spinal cord dorsal horn after peripheral neurectomy. *Brain Res*; 620:287-291.

Colvin LA, Duggan AW. 2001. The effect of conduction block on the spinal release of immunoreactive-neuropeptide Y (ir-NPY) in the neuropathic rat. *Pain*; 91:235-240.

Cui JG, O'Connor WT, Ungerstedt U, Linderoth B, Meyerson BA. 1997. Spinal cord stimulation attenuates augmented dorsal horn release of excitatory amino acids in mononeuropathy via a GABAergic mechanism. *Pain*; 73:87-95.

Danger JM, Guy I, Benyamina M, Jegou S, Leboulenger F, Cote J, Tonon MC, Pelletier G, Vaundry H. 1985. Localization and identification of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in the frog brain. *Peptides*; 6:1225-1236.

De Quidt ME, Emson PC. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system – II. Immunohistochemical analysis. 1986. *Neuroscience*; 18:527-543.

Dickenson AH, Chapman V, Green GM. 1997. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *Gen Pharmacol*; 28:633-638.

Dubner, R. 1983. Pain research in animals. *Ann NY Acad Sci*; 75:128-132.

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. *Neuroscience*; 44:733-740.

Eaton MJ, Martinez MA, Karmally S. 1999. A single intrathecal injection of GABA permanently reverses neuropathic pain after nerve injury. *Brain Res*; 835:334-339.

Ebbesson SOE. 1976. Morphology of the spinal cord. In: Llinás R, Precht W (eds). *Frog neurobiology*. Springer-Verlag, 679-706. Apud: Schotland JL, Tresch MC. 1997. Segmental and propriospinal projection systems of frog lumbar interneurons. *Exp Brain Res*; 116:283-298.

Fukuoka t, Tokunaga A, Kondo E, Miki K, Tachibana T, Noguchi K. 1998. Change in mRNA for neuropeptides and the GABA_A receptor in dorsal root ganglion in a rat experimental neuropathic pain model. *Pain*; 78:13-26.

Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, Sabata IM, Mulderry PM, Ghatei MA, Morrison JFB, Kelly JS, Rosenfeld MG. 1984. Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight species. *J Neurosci*; 4:3101-3111.

Graham RC, Karnovsky MJ. 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney in ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem*; 14:291-302.

Guedes RP, Marchi MI, Achaval M, Partata WA. 2001. Distribution of neuropeptide Y in the spinal cord of the frog *Rana catesbeiana*. *Acta Microscopica (suppl.) C*, 3:215-216.

Hackman JC, Holohean AM, Davidoff RA. 1997. Role of metabotropic glutamate receptors in the depression of GABA-mediated depolarization of frog primary afferent terminals. *Neuroscience*; 81:1079-1090.

Hiura A, Nasu F, Ishizuka H. 1998. Relationship of substance P- and CGRP-immunoreactive central endings of the primary afferent neurons to GABAergic interneurons in the guinea pig substantia gelatinosa. *Okajimas Folia Anat Jpn*; 74:231-235.

Hökfelt T, Elde R, Johansson O, Luft R, Arimura A. 1975. Immunohistochemical evidence for the presence of somatostatin, a powerful inhibitory peptide, in some primary sensory neurons. *Neurosci Lett*; 1:231-235. Apud: Proudlock F, Spike RC, Todd AJ. 1993. Immunocytochemical study of somatostatin, neurotensin, GABA, and glycine in rat spinal dorsal horn. *J Comp Neurol*; 327:289-297.

Hökfelt T, Elde R, Johansson O, Luft R, Nilsson G, Arimura A. 1976. Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience*; 1:131-136.

Hökfelt T, Broberger C, Xu ZQD, Sergeev V, Ubink R, Diez M. 2000. Neuropeptides - an overview. *Neuropharmacology*; 39:1337-1356.

Holzer, P. 1998. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol*; 30:5-11.

Ibuki T, Hama AT, Wang XT, Pappas GD, Sagen J. 1997. Loss of gaba-immunoreactivity in the dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. *Neuroscience*; 76:845-858.

Kangrga I, Randic M. 1990. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn slice. *J Neurosci*; 10:2026-2038.

Karalis K, Mastorakos G, Chrousos GP, Tolis G. 1994. Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J Clin Invest*; 93:2000-2006.

Kavaliers M. 1988. Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res Bull*; 21:923-931.

Kingery WS, Fields RD, Koesis JD. 1988. Diminished dorsal root GABA sensitivity following chronic peripheral nerve injury. *Exp Neurol*; 100:478-490.

Krukoff TL, Ciriello J, Calaresu FR. 1986. Somatostatin-like immunoreactivity in neurons, nerve terminals, and fibers of the cat spinal cord. *J Comp Neurol*; 243:13-22.

Krysiak R, Obuchowicz E, Herman ZS. 2000. Conditioned fear-induced changes in neuropeptide Y-like immunoreactivity in rats: the effect of diazepam and buspirone. *Neuropeptides*; 34:148-157.

Kuraishi Y, Hirota N, Sato Y, Hino Y, Satoh M, Takagi H. 1985. Evidence that substance P and somatostatin transmit separate information related to pain in the spinal dorsal horn. *Brain Res*; 325:294-298.

Laird JMA, Bennett GJ. 1992. Dorsal root potentials and afferent input to the spinal cord in rats with an experimental peripheral neuropathy. *Brain Res*; 584:181-190.

Lázár G, Maderdrut JL, Trasti SL, Liposits Z, Tóth P, Kozicz T, Merchenthaler I. 1993. Distribution of proneuropeptide Y-derived peptides in the brain of *Rana esculenta* and *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol*; 327:551-571.

Lazzeri L. 1977. Fases fundamentais da técnica cirúrgica. JM Varela Livros, 1-190.

Loeser JD, Bonica JJ. 2001. History of pain concepts and therapies. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman R, Turk DC (eds). Bonica's management of pain, Lippincott Williams & Wilkins, 3-25.

Lorez HP, Kemali M. 1981. Substance P-, Met-Enkephalin- and somatostatin-like immunoreactivity distribution in the frog spinal cord. *Neurosci Lett*;26:119-124.

Lekan HA, Carlton SM, Coggeshall RE. 1996. Sprouting of B-HRP fixed fibers of the L5 spinal nerve following L5 and L6 spinal ligation in the rat. *Neurosci Lett*; 208:147-150.

Ma W, Bisby MA. 1998. Partial and complete sciatic nerve injuries induce similar increases of neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide immunoreactivities in primary sensory neurons and their central projections. *Neuroscience*; 86:1217-1234.

Ma W, Bisby MA. 1999. Ultrastructural localization of increased neuropeptide immunoreactivity in the axons and cells of the gracile nucleus following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neuroscience*; 93:335-348.

Mains RE, Eipper BA. 1999. Peptides. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (eds). *Basic neurochemistry*, Lippincott Raven, 363-382.

Malan TP, Mata HP, Porreca F. 2002. Spinal GABA_A and GABA_B receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology*; 96:1161-1167.

Malcangio M, Bowery NG. 1996. GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends Neurosci*; 17:457-462.

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

Meyer RA, Campbell JN, Raja SN. 1994. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall PD, Melzack R (eds). *Textbook of Pain*, Churchill Livingstone, 1-44.

Miki K, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K. 1998. Calcitonin gene-related peptide increase in the rat spinal dorsal horn and dorsal column nucleus following peripheral nerve injury: up-regulation in a subpopulation of primary afferent sensory neurons. *Neuroscience*; 82:1243-1252.

Millan MJ. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*; 57:1-164.

Minson JB, Llewellyn-Smith IJ, Arnold LF. 2001. Neuropeptide y mRNA expression in interneurons in rat spinal cord. *Auton Neurosci*; 93:14-20.

Morton CR, Hutchison WD. 1989. Release of sensory neuropeptides in the spinal cord: studies with calcitonin gene-related peptide and galanin. *Neuroscience*; 31:807-815.

Muñoz M, Marin O, González A. 2000. Localization of NADPH diaphorase/nitric oxide synthase and choline acetyltransferase in the spinal cord of the frog, *Rana perezi*. *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 Neurociencia*, Editorial Síntesis, 933-963.

Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. 2001. Excitatory and inhibitory amino acids. In: Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC (eds). *Molecular neuropharmacology: A foundation for clinical neuroscience*, McGraw-Hill, 141-166.

Oku R, Nanayama T, Satoh M. 1988. Calcitonin gene-related peptide modulates calcium mobilization in synaptosomes of rat spinal dorsal horn. *Brain Res*; 475:356-360.

Onuoha GN, Alpar AK. 1999. Calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides in the plasma of patients with soft tissue injury. *Life Sci*; 65:1351-1358.

Padjen AL, Hashiguchi T. 1983. Primary afferent depolarization in frog spinal cord is associated with an increase in membrane conductance. *Can J Physiol Pharmacol*; 61:626-631.

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.

Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Nizik H, Srikant CB. 1995. The somatostatin receptor family. *Life Sci*; 57:1249-1265.

Petko M, Orosz V. 1996. Distribution of somatostatin-immunoreactive structures in the central nervous system of the frog, *Rana esculenta*. *J Hirnforsch*; 37:109-120.

Pieribone VA, Brodin L, Hökfelt T. 1994. Immunohistochemical analysis of the relation between 5-hydroxytryptamine- and neuropeptide-immunoreactive elements in the spinal cord of an amphibian (*Xenopus laevis*). *J Comp Neurol*; 341:492-506.

Proudlock F, Spike RC, Todd AJ. 1993. Immunocytochemical study of somatostatin, neurotensin, GABA, and glycine in rat spinal dorsal horn. *J Comp Neurol*; 327:289-297.

Randic M, Miletic V. 1977. Effect of substance P in cat dorsal horn neurones activated by noxious stimuli. *Brain Res*; 128:164-169

Rasio-Filho AA, Xavier LL, Santos P, Gehlen G, Achaval M. 2002. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats. *Brain Res Bull*; 58:67-75.

Reichlin S. 2001. Neuroendocrinology. In: De Groot LJ, Jameson JL (eds). *Endocrinology*, Philadelphia Saunders, 165-248.

Reiner A, Oliver JR. 1987. Somatostatin and neuropeptide Y are almost exclusively found in the same neurons in the telencephalon of turtles. *Brain Res*; 426:149-156.

Rexed B. 1964. Some aspects of the cytoarchitectonics and synaptology of the spinal cord. In: Eccles JC, Schadé JP (eds). *Organization of the spinal cord*, Elsevier Publishing Company, 58-92.

Rocha PL, Branco LGS. 1998. Seasonal changes in the cardiovascular, respiratory and metabolic responses to temperature and hypoxia in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J Exp Biol*;201:761-768.

Roddy DR, Yaksh TL, Aimone LD, Go VLW. 1990. Distribution of neuropeptide Y in the spinal cords of cat, dog, rat, man and pig. *Regul Pept*; 29:81-92.

Rosenfeld MG, Marmod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM. 1983. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*; 304:129-135.

Rydh-Rinder M, Holmberg K, Elfvin LG, Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt 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*; 707:180-188.

Ruan HZ, Li XC, Cai WQ. 1997. Somatostatin inhibited pain modulation action of substance P in spinal cord [ABSTRACT]. *Sheng Li Xue Bao*; 49:13-17.

Ruda MA, Bennett GJ, Dubner R. 1986. Neurochemistry and neural circuitry in the dorsal horn. *Brain Res*; 66:219-268.

Sakatani K, Chesler M, Hassan AZ. 1991. GABA_A receptors modulate axonal conduction in dorsal columns of neonatal rat spinal cord. *Brain Res*; 542:273-279.

Sandkuhler J, Fu QG, Helmchen C. 1990. Spinal somatostatin superfusion in vivo affects activity of cat nociceptive dorsal horn neurons: comparison with spinal morphine. *Neuroscience*; 34:565-576.

Schindler M, Holloway S, Hathway G, Woolf CJ, Humphrey PPA, Emson PC. 1998. Identification of somatostatin sst_{2(a)} receptor expressing neurons in central regions involved in nociception. *Brain Res*; 798:25-35.

Schotland JL, Tresch MC. 1997. Segmental and propriospinal projection systems of frog lumbar interneurons. *Exp Brain Res*; 116:283:298.

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

Schwartz, JM. 2000. Neurotransmitters. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds). *Principles of neural science*, McGraw-Hill, 280-296.

Shupliakov OV, Veselkin NP, Reperant J, Pierre J. 1992. GABA-immunoreactive structures in the lumbar spinal cord of the frog [ABSTRACT]. *Fiziol ZH SSSR Im I M Sechenova*; 78:39-47.

Sluka KA, Dougherty PM, Okin LS, Willis WD, West-Lund KN. 1992. Neuronal changes in acute arthritis in monkeys III. Changes in substance P, CGRP and glutamate in the dorsal horn of the spinal cord. *Brain Res Rev*; 17:29-38.

Sommer C, Myers RR. 1995. Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush. *Acta Neuropathol*; 90:478-485.

Somers DL, Clemente FR. 2002. Dorsal horn synaptosomal content of aspartate, glutamate, glycine and GABA are differentially altered following chronic constriction injury to the rat sciatic nerve. *Neurosci Lett*; 323:171-174.

Stanley BG, Kirkouly SE, Lampert S. 1986. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*; 7:1189-1192.

Sternberger LA. 1979. *Immunocytochemistry*. Wiley & Sons, 1-338.

Stine SM, Yang HY, Costa E. 1982. Evidence for ascending and descending intraspinal as well as primary sensory somatostatin projections in the rat spinal cord. *J Neurochem*; 38:1144-1150.

Stoskopf MK. 1994. Pain and analgesia in birds, reptiles, amphibians, and fish. *Invest Ophthalmol*; 35:775-780.

Storer TI, Usinger RL, Stebbins RC, Nybakken JW. 1984. *Zoologia Geral*. Companhia Editorial Nacional, 618-641.

Szolcsányi J, Helyes Z, Oroszi G, Nemeth J, Pintér E. 1998a. Release of somatostatin and its role in the medication of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibers of rat sciatic nerve. *Br J Pharmacol*; 123:936-942.

Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z, Oroszi G, Nemeth J. 1998b. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br J Pharmacol*; 125:916-922.

Terman GW, Bonica JJ. Spinal mechanisms and their modulation. 2001. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman R, Turk DC (eds). *Bonica's management of pain*, Lippincott Williams & Wilkins, 73-152.

Tessler A, Himes BT, Krieger NR, Murray M, Golberger ME. 1985. Sciatic nerve transection produces death of dorsal root ganglion cells and reversible loss of substance P in spinal cord. *Brain Res*; 304:555-568.

Todd AJ, McKenzie J. 1989. GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*; 31:799-806.

Todd AJ, Spike RC, Polgár E. 1998. A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst2a receptors in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience*; 85:459-473.

Uematsu K, Shirasaki M, Storm-Mathisen J. 1993. GABA- and Glycine-immunoreactive neurons in the spinal cord of the carp *Cyprinus carpio*. *J Comp Neurol*; 332:59-68.

Vallarino M, Danger JM, Fasolo A, Pelletier G, Saint-Pierre S, Vaudry H. 1988. Distribution and characterization of neuropeptide Y in the brain of an elasmobranch fish. *Brain Res*; 448:67-76.

Vesselkin NP, Adanina VO, Rio JP, Repérant J. 2001. Axo-axonic GABA-immunopositive synapses on the primary afferent fibers in frogs. *J Chem Neuroanat*; 22:209-217.

Villar MJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu X, Theodorsson E, Emson PC, Hökfelt T. 1991. Further studies on galanin-, substance P-, and CGRP-like immunoreactivities in primary sensory neurons and spinal cord: effects of dorsal rhizotomies and sciatic nerve lesions. *Exp Neurol*; 112:29-39.

Wahlestedt C, Pinch EM, Koob GF, Yee F, Heilig M. 1993. Modulation of anxiety and neuropeptide Y – Y1 receptors by antisense oligodeoxynucleotides. *Science*; 259:528-531.

Wakisaka S, Kajander KC, Bennett GJ. 1991. Increased neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy. *Neurosci Lett*; 124:200-203.

Zimmermann M. 2001. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*; 429:23-37.

Zhang X, Xu ZQ, Bao L, Dagerlind A, Hökfelt T. 1995. Complementary distribution of receptors for neurotensin and NPY in small neurons in rat lumbar DRGs and regulation of the receptors and peptides after peripheral axotomy. *J Neurosci*; 15:2733-2747.

Zhang YX, Lundeberg T, Yu LC. 2000. Involvement of neuropeptide Y and Y1 receptor in antinociception in nucleus raphe magnus of rats. *Regul Pept*; 95:109-113.