

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia

**ESTUDO COMPARATIVO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS EM REGIÕES ENCEFÁLICAS DE RATOS
E RÃS EM ESTADO BASAL E APÓS A SECÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO**

Dissertação de Mestrado

Taína Scheid

Porto Alegre, abril de 2010.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia

**ESTUDO COMPARATIVO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS EM REGIÕES ENCEFÁLICAS DE RATOS
E RÃS EM ESTADO BASAL E APÓS A SECÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre

Taína Scheid

Orientadora: Wania Aparecida Partata

Porto Alegre, abril de 2010.

“De início, a arte do puzzle parece uma arte menor, mínima [...], o objeto visado não é uma soma de elementos que teríamos inicialmente de isolar e analisar, mas um conjunto, ou seja, uma forma, uma estrutura; o elemento não preexiste ao conjunto, não é nem mais imediato nem mais antigo; não são os elementos que determinam o conjunto, mas o conjunto que determina os elementos; o conhecimento do todo e de suas leis, do conjunto e de sua estrutura, não é passível de deduzir do conhecimento separado das partes que o compõem; isto quer dizer que se pode observar uma peça de puzzle durante três dias e achar que sabe tudo sobre sua configuração e cor, sem que com isso tenha se avançado um passo sequer; a única coisa que conta é a possibilidade de relacionar essa peça a outras peças...”

Georges Perec, em *A vida, modo de usar*

AGRADECIMENTOS

Ao Santo Expedito, pelas graças concedidas. Por trazer fé a uma mente outrora cética.

À Professora Wania A. Partata, pela oportunidade de cursar o mestrado sob sua orientação, em um projeto que se revelou encantador e despertou-me um grande interesse pelo estudo da fisiologia comparada. Pela confiança, e incentivo em estudar sempre mais. Ainda, pelo exemplo de pesquisadora, constantemente envolvida, com paciência, obsequiosidade, rigor... Obrigada!

À Lidiane Dal Bosco, pela amizade ímpar, pelo companheirismo, pelos ensinamentos, pelo profissionalismo e talento, e por partilhar comigo sua mente vanguardista.

À Professora Adriane Belló Klein pelo empréstimo de material e equipamentos junto ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, bem como aos colegas Rafael Fernandes, Bruno, Rafael Colombo, Cristina Carraro e Paulo Schenkel, sempre simpáticos e solícitos.

À Professora Maria Amália Pavanatto pelo treinamento em distintos ensaios bioquímicos junto ao Laboratório de Espécies Ativas de Oxigênio da Universidade Federal de Santa Maria, bem como pela adorável companhia e acolhimento durante o período em que estive nesta Universidade. Ainda, à Isabela Finamor, Diogo Gabriel, Ana Paula Konzen Riffel e Eti pelo auxílio nestes ensaios, e amizade.

Ao Professor Luís C. R. Kucharski e Roselis S. M. da Silva pelo empréstimo de material e equipamentos junto ao Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia de Invertebrados e Vertebrados. Ainda, Ao Professor Luís pela solicitude e engenhosidade em realizar os mais diversos consertos de emergência.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Comparada, pelo auxílio em tarefas cotidianas, em especial à Carolina Kolberg e Andréia Horst que me auxiliaram nos meus primeiros experimentos.

Ao Professor e colega farmacêutico Alex Sander da Rosa Araújo pelo auxílio em desenvolver e desvendar desde ensaios bioquímicos a questões matemáticas.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Fisiologia da UFRGS, pelos ensinamentos. Aos queridos colegas de mestrado, Lidiane, Rafael, Helena, Gustavo, Vanessa, Everson, Régis, Nádia, Felipe, Fernanda, Liciane, Ruben, Luciana, Fábio e Diego, pela amizade e companheirismo!

À Maria Inês, pela disponibilidade e gentileza quanto aos trabalhos realizados no Laboratório de Aulas Práticas, pelo qual é responsável.

Ao Laboratório de Histologia Comparada pelo empréstimo de gelo, em períodos de escassez.

À querida Mabel Luz Zeballos pela companhia tranquila e pela gentileza das várias refeições saudáveis, nos dias mais afoitos.

À minha família, por seu constante apoio e orgulho dos meus feitos, mesmo que tão singelos. À minha mãe, por seu permanente e notável otimismo e por caminhar comigo os meus novos “primeiros passos”.

Ao Willian Ricardo, pelas irreversíveis mudanças que trouxe a minha forma de ver o mundo. Por pacientemente atravessar comigo os momentos de tormenta e inquietude. Pela companhia insubstituível.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro indispensável à realização deste curso de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA FIGURAS	8
LISTA TABELAS	9
LISTA ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	10
RESUMO	11
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Dor e nociceção.....	13
1.2 Dor neuropática.....	16
1.3 Modelos experimentais e distintas espécies animais no estudo da dor neuropática decorrente de lesão nervosa periférica.....	19
1.4 Espécies reativas de oxigênio e a nociceção.....	21
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Animais: procedência e manutenção.....	29
3.2 Grupos experimentais.....	30
3.3 Procedimento cirúrgico.....	31
3.4 Obtenção do tecido nervoso e preparo das amostras.....	32
3.5 Ensaio bioquímico.....	33
3.5.1 Atividade da enzima catalase.....	33
3.5.2 Atividade da enzima superóxido dismutase.....	33
3.5.3 Atividade da enzima glutatona transferase.....	34
3.5.4 Ácido ascórbico.....	35
3.5.5 Peroxidação lipídica.....	35
3.5.6 Quantificação de proteínas.....	36
3.6 Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS	38
4.1 Defesas antioxidantes em encéfalo de ratos e rãs em estado basal.....	38
4.2 Marcadores de estresse oxidativo no encéfalo de ratos e rãs submetidos à secção do nervo isquiático.....	39
4.2.1 Atividade da enzima superóxido dismutase.....	40
4.2.2 Atividade da enzima catalase.....	41
4.2.3 Atividade da enzima glutatona transferase.....	42
4.2.4 Valores de ácido ascórbico.....	43
4.2.5 Lipoperoxidação.....	44

4.3 Perfis de defesas antioxidantes e dano oxidativo nas regiões encefálicas estudadas, em ratos e rãs após a secção do nervo ciático.....	45
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÃO.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

RELAÇÃO DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Ilustração de um corte transversal de medula espinal de anuros.....20
- FIGURA 2** – Estrutura molecular do ácido ascórbico, como ânion monovalente, ascorbato, e sua forma oxidada, o dehidroascorbato, formado a partir da perda de dois elétrons e um próton.....26
- FIGURA 3** – Atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) em (A) Córtex cerebral de ratos, (B) tronco encefálico de ratos, (C) prosencéfalo de rãs e (D) tronco encefálico de rãs.....40
- FIGURA 4** – Atividade da enzima catalase em (A) Córtex cerebral de ratos, (B) tronco encefálico de ratos, (C) prosencéfalo de rãs e (D) tronco encefálico de rãs.....41
- FIGURA 5** – Atividade da enzima Glutathione transferase em (A) Córtex cerebral de ratos, (B) tronco encefálico de ratos, (C) prosencéfalo de rãs e (D) tronco encefálico de rãs.....42
- FIGURA 6** – Concentração de ácido ascórbico em (A) Córtex cerebral de ratos, (B) tronco encefálico de ratos, (C) prosencéfalo de rãs e (D) tronco encefálico de rãs.....43
- FIGURA 7** – Medida de lipoperoxidação por quimioluminescência em (A) Córtex cerebral de ratos, (B) tronco encefálico de ratos, (C) prosencéfalo de rãs e (D) tronco encefálico de rãs.....45
- FIGURA 8** - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione transferase (GST); concentração de ascorbato (ASC) e grau de lipoperoxidação (LP) em prosencéfalo de *Rana catesbeiana*, expressas em unidades relativas ao respectivo controle, definido aqui como (0,0).....46
- FIGURA 9** - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione transferase (GST); concentração de ascorbato (ASC) e grau de lipoperoxidação (LP) em tronco encefálico de *Rana catesbeiana*, expressas em unidades relativas ao respectivo controle, definido aqui como (0,0).....47
- FIGURA 10** - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione transferase (GST); concentração de ascorbato (ASC) e grau de lipoperoxidação (LP) em córtex cerebral de ratos, expressas em unidades relativas ao respectivo controle, definido aqui como (0,0).....48
- FIGURA 11** - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione transferase (GST); concentração de ascorbato (ASC) e grau de lipoperoxidação (LP) em tronco encefálico de ratos, expressas em unidades relativas ao respectivo controle, definido aqui como (0,0).....49

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1 – Organização dos grupos experimentais..... 30

TABELA 2 – Parâmetros oxidativos em encéfalo de ratos e rãs em estado basal..... 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

β:	Beta
CAT:	Catalase
cm:	Centímetro
cps:	Contagens por segundo
δ:	Delta
EROs:	Espécies reativas de oxigênio
g:	Gramma
GPx:	Glutathione peroxidase
GSH:	Glutathione reduzida
GST:	Glutathione transferase
IASP:	<i>International Association for the Study of Pain</i>
m:	Metro
μM:	Micromolar
mg:	Miligrama
mL:	Mililitro
mM:	Milimolar
NE	Neurônios Nociceptivos Específicos
NK-1:	Receptor de neurocinina
nm:	Nanômetro
NMDA:	Receptor N-metil-D-aspartato
rpm:	Rotações Por Minuto
s:	Segundo
SOD:	Superóxido dismutase
WDR:	Neurônios de larga faixa dinâmica

RESUMO

Diferentes modelos experimentais podem ser empregados no estudo da injúria às fibras nervosas periféricas, sendo este um modelo de dor neuropática. Inúmeros estudos vêm relatando a participação de espécies reativas de oxigênio (EROs) no processamento da informação nociceptiva e na perpetuação de anormalidades decorrentes da secção nervosa periférica (Kim et al, 2004; Gao et al, 2007). A informação nociceptiva percorre desde centros de processamento espinais até as regiões mais superiores do neuroeixo, incluindo o córtex cerebral. Neste sentido, alguns pesquisadores observaram que a axotomia periférica promove alterações em regiões supraespinais (Pankova, 2009; Taschibana *et al*, 2008). Porém são escassos ou mesmo inexistentes os trabalhos que avaliam o envolvimento das espécies reativas e das defesas antioxidantes neste modelo experimental, nas regiões encefálicas e, especialmente, em distintas espécies animais, o que proporcionaria uma abordagem comparativa.

Assim, este trabalho avaliou parâmetros de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em regiões encefálicas de duas espécies distintas de vertebrados, rãs e ratos, em condições basais e após a secção do nervo isquiático. Para tanto se empregaram ratos Wistar e rãs *Rana catesbeiana*, machos, adultos, os quais foram separados nos seguintes grupos experimentais: controle (animais sem qualquer manipulação cirúrgica) e desnervados (animais com secção do nervo isquiático). As diferentes espécies foram mortas por decapitação aos três e sete dias após os procedimentos cirúrgicos. Nos ratos ainda separou-se um grupo *sham* (animais onde o nervo foi exposto, porém não seccionado), sendo estes mortos nos mesmos intervalos de tempo. As estruturas nervosas centrais escolhidas para estudo foram o neocórtex e tronco encefálico, nos ratos, e prosencéfalo e tronco encefálico nas rãs. Para avaliação dos parâmetros oxidativos realizaram-se as medidas das atividades antioxidantes das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona transferase (GST), além da quantificação do teor de ácido ascórbico e grau de lipoperoxidação nas regiões encefálicas das diferentes espécies.

No encéfalo de ratos e rãs em estado basal, a SOD e o ácido ascórbico apresentaram valores semelhantes entre as espécies, com concentração de ácido ascórbico ligeiramente maior em tronco encefálico de rãs. As atividades da GST e CAT foram peculiares entre as espécies de animais, sendo o valor da atividade da CAT aproximadamente o dobro daquele observado em rato nas duas regiões encefálicas, e o da GST maior apenas no prosencéfalo de rãs. Aos três dias após a secção do nervo isquiático, observou-se aumento significativo da lipoperoxidação nas duas regiões encefálicas de ratos, porém nas rãs este acréscimo foi observado aos 3 e 7 dias no prosencéfalo e apenas aos 3 dias no tronco encefálico. Nos ratos a atividade da CAT aumentou apenas no córtex, não mostrando qualquer modificação significativa nos tecidos de rãs. A enzima SOD mostrou aumento em sua atividade nas duas

regiões encefálicas de ratos nos períodos experimentais em estudo, mas teve esta atividade reduzida nas regiões encefálicas de rãs aos 3 dias após a axotomia periférica. Os ratos do grupo *sham* também mostraram aumentos em seus valores de lipoperoxidação nas regiões estudadas, mas apenas aos 3 dias após a lesão. Os valores de ácido ascórbico não variaram significativamente nas regiões do encéfalo de ratos, mas tiveram aumento significativo nas regiões de rãs aos 7 dias. Diferentemente dos ratos, as regiões encefálicas de rãs diminuíram a atividade da GST aos 3 dias após a secção nervosa periférica.

Estes resultados mostram que a secção nervosa periférica, bem como as diferentes intensidades de estimulação nociceptiva (grupos *sham* e desnervado), é capaz de alterar o estado redox das células em estruturas encefálicas de distintas espécies de vertebrados. Além disso, a injúria nervosa periférica parece ativar diferentes mecanismos de defesa antioxidante no encéfalo de rãs e ratos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor e nocicepção

A dor é uma experiência consciente, fruto da interpretação e percepção de um estímulo nocivo, e que sofre a influência de fatores emocionais, cognitivos, mnemônicos e patológicos (Tracey, 2005). Outra definição, concebida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) ilustra a composição multifatorial de tal sensação: “Experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”.

A dor é, portanto, uma experiência única e individual, modificada pelo conhecimento prévio de um dano que pode ser existente ou presumido. Oliveira e Silva (2009) propõem a observação da dor sob dois diferentes aspectos - um sensorial-discriminativo, relacionado à detecção do estímulo nocivo quanto à intensidade, localização, duração e qualidade, e outro afetivo-motivacional, responsável pela integração da informação nociceptiva com a experiência afetiva, e que conduz às distintas respostas comportamentais apresentadas pelos seres humanos frente a um mesmo estímulo. Assim, uma injeção no braço pode ser abominada pela dor que provoca em alguns, e quase indolor para outros, ilustrando as diferentes reações e o componente afetivo-motivacional. No entanto, estes mesmos indivíduos são capazes de relatar consensualmente a localização, qualidade e duração da picada, o que caracteriza o outro componente proposto, sensorial-discriminativo.

Sendo assim, a investigação da dor, como experiência sensorial complexa, necessita de indivíduos capazes de relatar tais percepções. Como a grande parte de estudos científicos emprega animais não humanos que não possuem a capacidade de verbalização, uma abordagem possível para o estudo da dor é por meio da avaliação do componente discriminativo-sensorial, e não emocional. Nestes animais, portanto, embora sejam observadas respostas similares às humanas (reações motoras protetoras, vegetativas, mudanças comportamentais, aprendizado de aversão ao estímulo), o que permite inferir a experiência de dor e, portanto, empregá-los para seu estudo, este termo não é adequado, e fica restrito às abordagens em seres humanos (Kavaliers, 1988).

Neste contexto surge o termo *nocicepção*¹, que se refere aos mecanismos pelos quais a informação nociva é detectada, transmitida e processada pelo sistema nervoso central (SNC) (Bonica e Loeser, 2001). Uma breve descrição destes mecanismos se faz necessária.

Um estímulo nocivo vindo da periferia ou de órgãos internos é detectado pelas terminações nervosas livres de neurônios sensoriais primários especializados, denominados nociceptores. Estas células sofrem despolarização frente a estímulos térmicos, mecânicos e químicos de alta intensidade, desencadeando respostas neuroquímicas, autonômicas e motoras reflexas (defensivas) à medida que a informação é processada e transmitida, ao longo do SNC, culminado com a percepção consciente da injúria por regiões corticais (Costigan, 2006).

Charles Sherrington, em 1903, foi um dos pioneiros em propor a existência de receptores específicos aos estímulos danosos, dando-lhes a denominação de *nocipientes*. Estudos posteriores, examinando-se fibras aferentes primárias em gatos confirmaram a distinção destas em classes, algumas das quais responsáveis exclusivamente pela injúria tecidual (Smith e Lewin, 2009).

Atualmente as fibras dos neurônios aferentes primários cutâneos em mamíferos são classificadas de acordo com o calibre axonal e o grau de mielinização, com conseqüente reflexo na velocidade de condução: fibras A de grande diâmetro e mielinizadas, conduzindo a 1,2-40 m/s e fibras C não mielinizadas e de pequeno calibre, com velocidade de condução de 0,3-1,2 m/s (Smith e Lewin, 2009). Os nociceptores transmitem a informação dolorosa via fibras A δ (tipo de fibra A de médio calibre e pouco mielinizada) e C, enquanto as fibras A β , mais calibrosas, respondem por estímulos mecânicos inócuos (Costigan, *et al* 2006).

As fibras A δ representam cerca de 10% do total de nociceptores da epiderme, e desencadeiam a sensação de dor rápida e aguda. Respondem principalmente a estímulos mecânicos nocivos, e em algum grau a estímulos térmicos. As fibras C, em maior número, são polimodais quanto ao tipo de estímulo ambiental lesivo que transduzem – mecânico, térmico e químico. Sua ativação desencadeia percepção de dor persistente e mais lenta (Millan, 1999).

Os neurônios aferentes nociceptivos primários projetam-se da periferia em direção ao corno posterior da medula espinal, ou à região trigeminal bulbar (aferências oriundas dos segmentos cefálicos) onde se comunicam com neurônios de segunda ordem e neurônios de

¹ Nocicepção deriva do latim *nocere*, que significa machucar, causar dano.

projeção. Os corpos dos aferentes primários do tronco e membros localizam-se no gânglio da raiz dorsal da medula espinal e gânglio trigeminal, quando da cabeça. Nos mamíferos a medula possui uma organização laminar conforme as características citoarquitetônicas das células presentes em cada segmento (Carvalho e Lemônica, 1998; Basbaum e Jessel, 2000).

As fibras A δ e C vindas da periferia comunicam-se de forma distinta com as diferentes lâminas, ativando neurônios específicos em receber estímulos nócicos, os Nociceptivos Específicos (NE), e outros que recebem estímulos de baixa intensidade, os chamados neurônios de Larga Faixa Dinâmica (WDR) (Carvalho e Lemonica, 1998). Estes últimos também são ativados por estímulos inócuos oriundos de fibras A β , o que significa que a transmissão do estímulo nocivo pode ser modulada pela ativação de receptores não nociceptivos (Oliveira e Silva, 2009). Os Nociceptivos Específicos encontram-se principalmente na lâmina I e II e os neurônios da Larga Faixa Dinâmica na lâmina V. Além destes existem ainda importantes interneurônios inibitórios e excitatórios, concentrados na lâmina II (Basbaum e Jessel, 2000; Oliveira e Silva, 2009).

O corno posterior ainda recebe projeções descendentes de regiões supraespinais, como a substância cinzenta periaquedutal, a qual recebe informações vindas do córtex frontal, ínsula, hipotálamo, amígdala, e as projeta indiretamente via bulbo ventromedial rostral para o corno posterior (Costigan, et al. 2006). Estas projeções contribuem para a modulação da entrada sensorial nociceptiva, caracterizando a medula como importante centro integrador desta informação periférica (Oliveira e Silva, 2009; Brooks e Tracey, 2005).

A partir da medula espinal a informação nociceptiva ascende para o encéfalo por meio de diferentes vias: tratos espinotalâmico lateral e medial, espinoreticular, espinomesencefálico, cervicotalâmico e espinohipotálâmico (Basbaum e Jessel, 2000). O trato espinotalâmico lateral (neoespinotalâmico) é característico em animais mamíferos, proeminentemente em primatas, com projeções para regiões talâmicas – núcleos ventral póstero-lateral, ventral póstero-medial e ventral posterior, e núcleos posteriores – envolvidas no componente sensorial-discriminativo, bem como no afetivo-motivacional da dor (Millan 1999).

Os tratos que se projetam para o tronco encefálico – espinoreticular, espinomesencefálico – fazem conexões com distintos núcleos: formação reticular mesencefálica, colículo superior, núcleo cuneiforme e parabraquial, substância cinzenta periaquedutal. O tronco, portanto desempenha uma série de funções no processamento da

informação nociceptiva, como a modulação descendente, a geração de respostas autonômicas e o envolvimento no componente afetivo-motivacional desta sensação (Millan, 1999).

Como complexa e multifatorial experiência, a dor envolve diversas regiões corticais e subcorticais durante a recepção e integração da informação sensorial nociceptiva: córtex cingulado anterior, ínsula, córtices frontal e pré-frontal, além dos somatossensoriais primário e secundário, e também os córtices parietais e temporais. Como regiões subcorticais importantes podem ser citadas ainda o tálamo, importante centro retransmissor e integrador, os núcleos da base, a amígdala, o hipocampo e o cerebelo (Tracey, 2005).

A nocicepção pode se apresentar, quanto à duração, sob a forma transitória, aguda ou crônica. A forma transitória envolve a ativação dos nociceptores, em alerta ao risco de lesão iminente. A forma aguda envolve, além da ativação dos receptores sensoriais, o dano tecidual e um processo inflamatório, mas possui duração limitada. A nocicepção crônica, por sua vez, consiste em processo patológico que supera a capacidade de cura do organismo, podendo se estender por meses ou anos (Ashburn e Staats, 1999).

1.2 Dor neuropática

A partir do conhecimento dos mecanismos gerais de transmissão e processamento da informação nociceptiva, é possível observar com mais enfoque uma condição patológica crônica, debilitante denominada *dor neuropática*.

Esta disfunção manifesta-se como uma constante dor em queimação, com exacerbação espontânea de tempos em tempos, e com o desenvolvimento de anormalidades sensoriais como disestesia¹, hiperalgesia² e alodinia³, acarretando considerável impacto na qualidade de vida do indivíduo (Teixeira, 2003). Conforme Pasero (2004), a dor neuropática acomete 1,5% da população nos Estados Unidos e 1% no Reino Unido, porém esta prevalência pode estar sendo subestimada em razão de frequentemente esta manifestação neuropática não ser reconhecida como tal em meio a outras condições patológicas adjacentes.

¹ Disestesia: sensação anormal desagradável, espontânea ou provocada.

² Hiperalgesia: resposta exacerbada frente a um estímulo doloroso.

³ Alodinia: dor frente a um estímulo usualmente inócuo. Terminologia conforme IASP (Merskey e Bogduk, 1994).

Dieleman et al. (2008), relatam a predominância em mulheres e pessoas com mais de 50 anos de idade, embora seja impreciso extrapolar tal dado para toda a população, visto que as neuropatias decorrem de uma diversidade de enfermidades e condições, intimamente relacionadas com a geografia, condições socioeconômicas, hábitos, etc.

A IASP define dor neuropática como “dor iniciada ou causada por lesão primária, disfunção, ou perturbação transitória do sistema nervoso central ou periférico”.

A maioria das doenças associadas à dor neuropática envolve alterações no sistema nervoso periférico. Entretanto àquela decorrente de lesão em regiões encefálicas e medula espinal também ocorre, com menor frequência, e decorre de tumores, epilepsia, doenças neurodegenerativas, e tem a denominação de *dor neuropática central* (Costigan, et al. 2006).

Quanto às injúrias aos nervos periféricos, estas ocorrem como resultado de diferentes causas, que vão desde um trauma mecânico a uma disfunção decorrente do uso de medicamentos, como a vincristina, isoniazida, cisplatina e o paclitaxel (Zimmermann, 2001).

Comumente resultam de traumas por acidentes automobilísticos, e com menor frequência de lesões penetrantes por quedas e acidentes industriais (Robinson, 2000). Lacerações por materiais cortantes, por armas de fogo, e fraturas de ossos longos compõem significativa porcentagem das causas de dano traumático aos nervos. O trauma pode levar ao esmagamento, compressão, estensão e ruptura total da fibra nervosa (Campbell, 2009). Os nervos geralmente acometidos são o radial, seguido pelo ulnar e mediano, nos membros superiores, e nervo isquiático¹, nos membros inferiores (Robinson, 2000). Muito do que se conhece a respeito de lesão nervosa periférica deve-se às experiências oriundas das mutilações sofridas pelos soldados e civis durante as grandes guerras ao longo dos últimos séculos – Guerra Civil Americana, Primeira e Segunda Guerras Mundiais e subsequentes (Robinson, 2000), sendo que os conflitos bélicos atuais também constituem etiologia para a lesão nervosa periférica devido a trauma.

Algumas disfunções orgânicas e doenças também podem danificar o tecido nervoso periférico, tais como a neuropatia diabética, a esclerose múltipla, a síndrome do Túnel do Carpo, infecções virais (herpes zoster, vírus da Imunodeficiência Humana – HIV), a deficiência

¹Isquiático é a nova denominação em substituição ao termo “ciático”, conforme última edição da Terminologia Anatómica elaborada pelo *Federative Committee on Anatomical Terminology* (FCAT).

de vitamina B em indivíduos mal nutridos e alcoolistas, e a neurotoxicidade decorrente da terapia com fármacos antineoplásicos e antituberculosos (Zimmermann, 2001).

A injúria aos nervos sensoriais desencadeia uma série de alterações em neurônios da periferia e centrais que diferem do ocorrido com uma lesão tecidual não nervosa. Isto inclui modificações na liberação de neurotransmissores, expressão de genes, rearranjos anatômicos em neurônios do gânglio da raiz dorsal e da medula espinal, e de regiões superiores (Garry et al. 2004). Os nociceptores modificam-se lentamente, gerando dor em decorrência das alterações anatômicas e funcionais (Teixeira, 2003). Um dos primeiros efeitos do trauma é um acréscimo nos disparos de potenciais de ação pelas fibras lesadas, o que pode contribuir para a iniciação dos eventos subsequentes. A geração de potenciais ectópicos e disparos anormais podem permanecer por longos períodos (Saadé e Jabbur, 2008). Esta atividade ectópica que passa a ocorrer nos neuromas formados e fibras nervosas em crescimento ocorre principalmente pela modificação na permeabilidade da membrana axonal e alteração no número, distribuição e cinética dos canais de sódio e potássio das células lesadas. Tais mudanças no fenótipo dos aferentes primários axotomizados são atribuídas à perda de um suporte trófico normalmente provido pelos tecidos periféricos (Devor, 2001).

Um mecanismo de grande importância na fisiopatologia da nocicepção, e em especial da nocicepção crônica, é o desenvolvimento de transmissão facilitada nas células do corno dorsal da medula e regiões ascendentes, como consequência. A repetida estimulação pelas fibras C soma-se temporalmente e leva à sensibilização central dos neurônios do corno dorsal, que se manifesta por uma redução no limiar de estimulação. Como resultado tem-se a elevação da frequência de descargas espontâneas destes e recrutamento de outros circuitos sinápticos, gerando um aumento de seu campo receptivo e exagerada resposta aos estímulos térmicos e mecânicos, observados clinicamente como a hiperalgesia e alodinia (Carvalho e Lemonica, 1998).

A participação de neurotransmissores no desenvolvimento destes fenômenos relativos à nocicepção crônica já é bem estabelecida. A ativação de receptores NMDA (N-metil-D-Aspartato) e NK-1 (receptor de neurocinina) pelo glutamato e substância P, liberados dos aferentes primários no corno dorsal, produz uma lenta e prolongada despolarização e eleva o influxo de cálcio. Este aumento de cálcio intracelular desencadeia uma cascata de eventos que em última instância produzem alterações persistentes na membrana celular, induz a expressão de genes como c-fos e c-jun - que influenciam a transcrição de uma série de genes

codificadores de inúmeros neuropeptídeos – modulando, portanto, a memória nociceptiva e as futuras respostas a um estímulo doloroso (Carvalho e Lemonica, 1998; Zimmermann, 2001).

1.3 Modelos experimentais e distintas espécies animais no estudo da dor neuropática decorrente de lesão nervosa periférica

Diferentes modelos experimentais podem ser empregados no estudo da injúria às fibras nervosas periféricas, mimetizando as distintas condições de lesão anteriormente descritas e responsáveis pelo desenvolvimento de dor neuropática (Zimmermann, 2001). Dentre aqueles extensamente estudados estão os que produzem um trauma mecânico. Isto pode ser feito por meio da secção total, esmagamento, constrição, crioneurólise, entres outros, em um determinado nervo periférico. A secção total, proposta inicialmente pelo pesquisador canadense Patrick D. Wall em 1979, é um modelo adequado para mimetizar os efeitos da amputação de membros, ou de acidentes que lesam transversalmente os nervos periféricos, além dos sintomas clínicos do “membro fantasma” (Klusaková e Dubovy, 2009; Dowdall et al., 2004).

Roedores estão entre os animais comumente utilizados nestes modelos, por reproduzirem com maior precisão os aspectos fisiopatológicos dos seres humanos (Klusaková e Dubovy, 2009). Entretanto, é interessante lembrar que os primeiros estudos eletrofisiológicos sobre nocicepção, ainda na década de 1920, foram realizados em medula espinal isolada de sapos, antes que surgissem técnicas mais refinadas que permitissem investigações similares em mamíferos (Stevens, 1992). Possivelmente a facilidade de obtenção destes animais tenha permitido muitas destas pesquisas; porém, observando-se a anatomia e fisiologia dos anfíbios, muitas similaridades ficam evidentes, bem como a contribuição que o trabalho com estes animais pode proporcionar ao estudo da nocicepção.

A espécie *Rana catesbeiana* vêm sendo utilizada há alguns anos no Laboratório de Neurobiologia Comparada como modelo experimental. A rã-touro, como é conhecida popularmente, integra a ordem Anura, com aproximadamente 3.500 espécies. Estes animais ocorrem em praticamente todos os continentes – florestas tropicais e temperadas, áreas desérticas e litorâneas – exceto a Antártida (Pough, 1989).

O SNC dos anfíbios compreende a medula espinal, o tronco encefálico (composto pela medula oblonga (ou bulbo) e o mesencéfalo), o cerebelo, diencéfalo e telencéfalo. A medula espinal é dividida, nos anuros, nas regiões dorsal, lateral, central, medial, ventromedial e

ventrolateral. Quanto às características funcionais das células, esta divisão é análoga à laminação descrita por Rexed na medula de mamíferos (FIGURA 1) (Dicke e Roth, 2007).

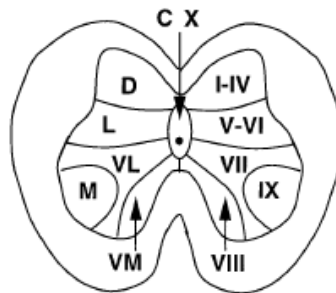


FIGURA 1 – Ilustração de um corte transversal de medula espinal de anuros. O lado esquerdo representa a divisão nas regiões dorsal (D), lateral (L), ventrolateral (VL), medial (M), ventromedial (VM) e central (C), proposta por Ebesson, em 1976. O lado direito esquematiza as regiões correspondentes nos mamíferos, cuja medula espinal é dividida em lâminas de Rexed (Schotland e Tresch, 1997).

As fibras de seus neurônios aferentes primários são classificadas em três tipos: fibras A, calibrosas e bem mielinizadas; fibras B pequenas e com delgada cobertura mielínica; e fibras C não mielinizadas. Tais fibras são correlatas às A β , A δ e C encontradas em mamíferos (Stevens, 2004; Machin, 1999).

Nos anfíbios, assim como em outros vertebrados, a medula oblonga possui estações de retransmissão de informações sensoriais somáticas e viscerais, núcleos de controle das funções vitais (cardiorrespiratórios), de atenção e vigília, e divisão da formação reticular em zonas homólogas aos distintos núcleos reticulares descritos em mamíferos (Dicke e Roth, 2007).

O telencéfalo é ainda rudimentar, apresentando primórdios de organização laminar e diferenciação celular (Northcutt, 1981). Não há uma significativa conexão entre o tálamo e o córtex visto que este aparece posteriormente, a partir da área olfatória, nos répteis, e mesmo nestes ainda não se observa a complexa estrutura laminar dos mamíferos. (Stevens, 2004). A expressão *pallium* (dorsal, ventral, lateral, no telencéfalo dos anfíbios) remete a um córtex, porém é importante destacar que ainda não se observa uma laminação neocortical e mesmo arquicortical (Dicke e Roth, 2007). A este respeito, Stevens (2004) defende que os anfíbios representam um modelo “puro” para o estudo da nocicepção, pois a ausência de um córtex e

mesmo de um sistema límbico definido impossibilita-os de uma verdadeira apreciação da dor, em seu âmbito afetivo-motivacional.

Uma variedade de neuropeptídeos envolvidos na transmissão somatossensorial e estímulos nociceptivos (opióides, taquicinas), bem como fibras serotoninérgicas, histaminérgicas e catecolaminérgicas têm sido demonstrados nos aferentes primários ou medula espinal destes animais (Dicke e Roth, 2007). Em mamíferos foi observada a participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio nos mecanismos de codificação e transmissão da informação nociceptiva neuropática (Guedes et al., 2007; Kim et al., 2004). Nestes animais, esses estudos se limitaram principalmente ao local da lesão e à medula espinal. Antes de dar prosseguimento a este tema, cabe uma breve descrição das EROs seguida de seu papel na nocicepção, com ênfase na dor neuropática.

1.4 Espécies reativas de oxigênio e a nocicepção

Inúmeros estudos vêm relatando a participação de espécies reativas de oxigênio (EROs) no desenvolvimento das mais diversas patologias - cardiovasculares, metabólicas e neurodegenerativas – por suas ações oxidantes e deletérias sobre proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Estudos recentes também relatam o envolvimento destas espécies como mensageiros intracelulares, capazes de atuar como sinalizadores frente a condições de excitotoxicidade e processos inflamatórios (Sorg, 2004).

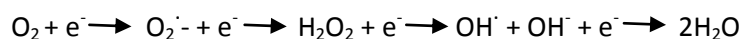
No processamento da informação nociceptiva e na perpetuação de anormalidades decorrentes de lesão nervosa periférica também existem trabalhos que apontam para o envolvimento de EROs (Kim et al., 2004; Gao et al., 2007). Primeiramente, entretanto, é importante reconhecer seu papel nos sistemas fisiológicos normais.

O oxigênio, desde seu aparecimento substancial na atmosfera terrestre há cerca de dois bilhões de anos, trouxe o incremento ao rendimento energético dos nutrientes, permitindo o desenvolvimento de milhares de organismos multicelulares mais complexos e de ávida demanda metabólica. Suas características como elemento químico e sua configuração eletrônica lhe permitem atuar nesta importante função de acceptor final de elétrons, na cadeia respiratória, bem como na geração de outras espécies nem tão inofensivas aos sistemas biológicos, os radicais livres e derivados.

Uma definição frequentemente empregada quando se fala em radicais livres é um tanto abrangente: “espécies com um ou mais elétrons desemparelhados, capazes de existência independente” (Halliwell, 1992; Zwart et al., 1999). Esta definição engloba moléculas como o oxigênio molecular e o átomo de hidrogênio, os quais embora possuam elétrons não pareados, não possuem alta reatividade. Da mesma forma existe o peróxido de hidrogênio e o peroxinitrito, espécies bastante reativas, capazes de danificar biomoléculas, porém não radicalares. Em meio a esta dificuldade em encontrar uma definição tão genérica quanto precisa, surge a terminologia “Espécies Reativas de Oxigênio” (EROs), que inclui os radicais livres e outras espécies que não possuem elétrons desemparelhados, mas são igualmente reativas (Sorg, 2004; Ribeiro et al., 2005; Halliwell e Gutteridge, 2007).

As principais EROs formadas *in vivo* são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); o peróxido de hidrogênio, não radicalar (H_2O_2); o radical hidroxila ($\cdot OH$); radicais peroxila (RO_2^{\cdot}) e alcóxila (RO^{\cdot}) e o oxigênio *singlet*, forma excitada do O_2 (1O_2). Existem ainda espécies reativas derivadas do nitrogênio, como o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Uma importante fonte de geração de EROs é durante a redução tetravalente do oxigênio à água, ilustrada pela reação:



A transferência de elétrons é realizada por um complexo multiproteico enzimático da mitocôndria, a citocromo oxidase, em distintas etapas. Sua estrutura, contendo grupamentos heme férricos e íons cobre visam garantir a ligação resistente a estes intermediários reduzidos, muito reativos. Ainda assim, pequenas quantidades destes são perdidas ao longo da cadeia transportadora de elétrons, estando livres para reagir com moléculas da vizinhança (Ribeiro et al., 2005; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Existe nas células uma variedade de enzimas que utilizam o oxigênio na oxidação de substratos, como D-aminoácido oxidases e a xantina oxidase. Outros requerem o oxigênio para a adição de grupamentos hidroxil, como a prolina e lisina hidroxilases (síntese do colágeno) e a tirosina hidroxilase, na síntese de catecolaminas. Outro importante grupo de enzimas que emprega o oxigênio na oxidação de diversos produtos do metabolismo e xenobióticos é o citocromo P450, distribuído no retículo endoplasmático e organelas de plantas e animais. Assim como na cadeia de elétrons, ocasionalmente pode haver escapes de EROs ao longo de qualquer uma destas reações enzimáticas descritas. Menos frequentemente nos sistemas

biológicos ocorre a geração de EROs pela quebra de ligações covalentes entre as moléculas, pelo efeito das radiações ultravioleta e ionizante, ou de altas temperaturas (Zangar et al., 2004; Lewén et al., 2000).

A presença de metais de transição, como o ferro e o cobre, favorece a formação do mais reativo dos radicais, o hidroxil, a partir da reação do metal com o peróxido de hidrogênio conhecida como reação de Fenton¹ mostrada a seguir:



A própria natureza química de uma estrutura abundante em todas as células, a membrana lipídica, favorece a formação de radicais peroxila e alcoila, decorrente da decomposição dos peróxidos orgânicos (ROOH) presentes, pela ação do calor, da exposição à radiação ultravioleta ou interação com metais. Entretanto, a ação das EROs é sem dúvida a maior responsável pela oxidação das membranas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Locais ricos em ácidos graxos poliinsaturados, como o SNC, são particularmente suscetíveis à lipoperoxidação. Alterações na conformação das membranas e perda da integridade funcional, bem como a injúria decorrente da ação de subprodutos da oxidação lipídica resultam deste fenômeno (Lewén et al., 2000).

Frente à ação fortemente oxidante do oxigênio, e às diversas situações onde a geração de EROs escapa ao controle, são previstas consequências deletérias aos componentes celulares, caso aqueles não sejam eliminados, ou neutralizados por um eficiente sistema antioxidante. A partir deste contexto surge o conceito de estresse oxidativo, uma situação onde as oxidações indesejadas induzidas pelo oxigênio não são eficientemente neutralizadas, levando a um metabolismo anormal, perda de funções fisiológicas, doenças e morte (Sorg, 2004).

Assim, qualquer organismo que viva em presença de oxigênio possui um sistema frequentemente complexo de defesa capaz de capturar intermediários reativos antes que eles

¹ Sobre esta reação é interessante destacar a natureza da diferença entre os grupamentos hidroxil formados, o segundo ilustrado é radicalar e o primeiro não – em razão do número de elétrons que ficou com cada um deles. O H₂O₂ possui 18 elétrons pareados, porém ao capturar 1 elétron do ferro dá origem a um íon hidroxil com 10 elétrons em pares e outro com 9, sendo 1 não pareado e, portanto, um radical extremamente reativo.

oxidem biomoléculas, ou em algum ponto onde o processo já tenha iniciado. Tendo em vista as diferentes EROs formadas, as distintas biomoléculas alvo, e todos os compartimentos celulares em que a ação destas espécies deletérias pode ocorrer, existem também variados antioxidantes característicos para cada condição (Sorg, 2004).

As defesas antioxidantes exercem seu papel de diferentes formas e em diferentes momentos, seja evitando a formação dos radicais, ou minimizando algum processo oxidativo já desencadeado. A importância relativa de cada uma delas, portanto, depende destas peculiaridades. Os mais eficientes são enzimas que removem cataliticamente as EROs após sua formação: enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e outras peroxidases e glutatona transferase (GST) (Zwart et al., 1999; Sorg, 2004).

A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido – formado principalmente na mitocôndria - em peróxido de hidrogênio, o qual atravessa facilmente as membranas celulares e das organelas, e pode posteriormente ser neutralizado pela ação das peroxidases CAT e GPx, resultando na formação de água e oxigênio. Embora o radical superóxido sozinho não represente maior periculosidade à célula, sua combinação com o óxido nítrico circulante resulta em um forte oxidante, o peroxinitrito, cujos produtos de decomposição são igualmente reativos (radical hidroxil e óxido nítrico). A SOD é uma metaloproteína que existe virtualmente em todas as células, possuindo uma isoforma citosólica ligada ao cobre e ao zinco, uma isoforma mitocondrial ligada ao manganês (Fridovich, 1975; Mruk et al., 2002).

A catalase é uma hemeoproteína amplamente distribuída nos peroxissomas e membranas mitocondriais do organismo, especialmente no fígado, rins e eritrócitos (Mruk et al., 2002; Nishikawa *et al*, 2009). Como já mencionado, ela catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio, cujo maior perigo está em sua interação com metais formando o radical hidroxil. O peróxido é formado via ações das enzimas SOD, glicose oxidase, monoamina oxidase, entre outras. Tanto a CAT quanto a GPx, outra importante detoxificadora de peróxidos, são encontradas em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Baud et al., 2004). A GPx, por sua vez, catalisa a conversão tanto do peróxido de hidrogênio, quanto de hidroperóxidos orgânicos em produtos menos reativos, empregando para isso a glutatona em sua forma reduzida (GSH) como doador de elétrons. A forma oxidada do tripeptídeo glutatona (GSSG) é novamente reduzida pela ação da enzima glutatona redutase (GR) e do NADPH como doador de elétrons. Existem ao menos quatro tipos distintos de GPx. A forma mais ubíqua é a GPx1, citosólica. As outras formas, GPx2, 3 e 4 são encontradas principalmente no plasma, intestino e gônadas, respectivamente (Baud et al., 2004). Finalmente, outra família de enzimas

que emprega a glutathione em seus processos catalíticos é a GST. Este grupo de enzimas citosólicas tem como principal papel a eliminação de substâncias exógenas, como fármacos, poluentes e aditivos alimentares. Algumas delas atuam eliminando hidroperóxidos orgânicos, assim como a GPx (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Existem também proteínas que previnem a formação de EROs, pois ligam-se aos agentes pró-oxidantes (íons metálicos, heme) e impedem que interajam. Alguns exemplos são as transferrinas, haptoglobinas e albumina (Ribeiro et al., 2005; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Outro grupo de moléculas, bastante diversas entre si, possuem um papel comum de neutralizar diretamente as EROs formadas, reduzindo-as prontamente. Sua grande vantagem é a capacidade de regeneração por ciclos enzimáticos que as recompõem novamente em moléculas reduzidas. São membros deste grupo de antioxidantes a glutathione (GSH), o urato, o ascorbato, a bilirrubina e o alfa-tocoferol (Lewén et al., 2000). O ascorbato e a glutathione são os antioxidantes de baixo peso molecular mais abundantes no SNC, estando o primeiro em maior concentração em neurônios e o segundo em glia. (Rice e Russo-Menna, 1998).

A glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine) é um peptídeo de baixo peso molecular amplamente distribuído em animais e plantas que atua em muitos processos bioquímicos celulares como um “tampão redox” de grupamentos tióis, transferindo seus elétrons, podendo ser reduzida e oxidada diversas vezes. Como já mencionado, participa na neutralização de radicais juntamente com vários sistemas enzimáticos, além de atuar sozinha como um agente redutor de EROs (Sies, 1999).

Outro importante antioxidante que atua nos compartimentos hidrofílicos é o ácido ascórbico, que nos fluidos biológicos encontra-se sob a forma do ânion ascorbato. Os locais de mais elevadas concentrações são as adrenais e o SNC e, dentro deste, maior abundância na região cortical, em detrimento às regiões mais posteriores, como o tronco encefálico. A maioria dos animais é capaz de sintetizá-lo (no fígado e rins), porém os primatas, incluindo os seres humanos, não possuem a enzima responsável pela última etapa da síntese e, portanto, devem obter o ácido ascórbico da dieta. Por suas características polares tem dificuldade de atravessar livremente as membranas celulares e mesmo a barreira hematoencefálica, de modo que seu transporte para o interior do SNC é realizado por transporte ativo sódio-dependente (transportador SVCT2) no plexo coriário e, já no meio extracelular, adentra as células nervosas principalmente pelo mesmo SVCT2, onde permanece em maior concentração (Rice, 2000; Harrison e May, 2009). Sua forma oxidada, o dehidroascorbato, adentra as células via transportador de glicose GLUT1 (Harrison e May, 2009). Suas propriedades antioxidantes estão

relacionadas a sua capacidade como doador de elétrons às espécies radicais, formando o semidehidroascorbato (na perda de um elétron) e dehidroascorbato (na perda de dois elétrons) (FIGURA 2). As formas oxidadas são recicladas pela glutatona (GSH), que por sua vez é reciclada pela GSH redutase (Rice, 2000; Patra, 2001)

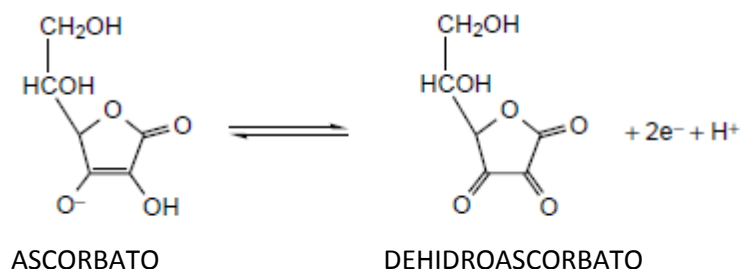


FIGURA 2 – Estrutura molecular do ácido ascórbico, como ânion monovalente, ascorbato, e sua forma oxidada, o dehidroascorbato, formado a partir da perda de dois elétrons e um próton (Rice, 2000).

A partir deste panorama é oportuno trazer alguns trabalhos que demonstram o envolvimento dos EROs, ou das defesas antioxidantes relacionadas no processo de nocicepção, especialmente na neuropática.

Um estudo em um modelo de dor inflamatória induzida por capsaicina, de Gao et al. (2007) demonstrou que a administração de um sequestrador de EROs, também chamado *scavenger*, foi acompanhado de diminuição na hiperalgesia característica do processo inflamatório.

Quanto aos modelos de dor crônica, empregando o mesmo *scavenger*, Kim et al. (2004) observaram a reversão da alodinia decorrente de constrição crônica de nervo, em modelo de dor neuropática. Guedes et al. (2006) relataram redução na atividade da enzima SOD, em medula espinal, sete dias após a secção do nervo isquiático. Em seu estudo mais recente, Guedes et al. (2009) mostraram que a injúria causada por este modelo de dor neuropática induziu aumento na atividade da enzima GPx e na concentração de GSH, requerido para sua atividade. Ao mesmo tempo houve acréscimo na concentração dos metabólitos do óxido nítrico, molécula sabidamente envolvida nos processos nociceptivos.

Este quadro de evidências permite observar que houve um aumento de EROs decorrente de um modelo de nocicepção, seja como forma de sinalização ou dano,

acompanhado de um aumento das defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas, possivelmente como forma de evitar a geração de um quadro de estresse oxidativo.

Estes últimos trabalhos avaliaram, através de modelos de dor neuropática, parâmetros de estresse oxidativo na medula espinal e em outros tecidos não nervosos. Como já descrito, a informação nociceptiva percorre desde centros de processamento espinais (daí a importância em se estudar tal região) até as regiões mais superiores do neuroeixo, incluindo o córtex cerebral. Com especial interesse nestas áreas do SNC, alguns pesquisadores investigaram os efeitos da lesão nervosa periférica em regiões supraespinais sob diferentes aspectos. Em um de seus estudos mais recentes Pankova (2009) observou mudanças na atividade elétrica cerebral de ratos após a injúria nervosa. Neste trabalho foram relatadas alterações na amplitude das ondas alfa e delta em regiões corticais frontais e límbicas, e núcleos da base, 21 dias após a secção do nervo isquiático de ratos. Este rearranjo na atividade elétrica coincidiu com o pico das manifestações da “síndrome da dor neurogênica”, demonstrada pela maior hiperalgesia térmica e intensa autotomia no membro desnervado.

Em outro estudo sobre injúria nervosa periférica, descrito por Tachibana et al. (2008), observou-se a diminuição na transmissão sináptica entre os núcleos talâmicos anteriores e o córtex cingulado anterior (CCA), cinco dias após a ligação parcial do nervo isquiático. A avaliação da eficácia sináptica foi realizada pela detecção eletrofisiológica dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS) no CCA, região a qual se atribui papel no aspecto afetivo da dor, incluindo sentimentos desagradáveis e subjetivos e respostas antecipatórias à dor.

Narita e colaboradores (2003) também dedicaram sua pesquisa à investigação das alterações em regiões supraespinais decorrentes da lesão de nervo. Observaram então que a injúria nervosa periférica resultou em aumento na expressão de c-Fos em córtex frontal, tálamo e substância cinzenta periaquedutal de ratos, o que lhes permitiu sugerir o envolvimento de tal gene, dito “precocemente expresso” como precursor das modificações funcionais que se estabelecem a longo prazo nos neurônios dessas regiões.

Porém são escassos ou mesmo inexistentes os trabalhos que avaliam o envolvimento das espécies reativas e as defesas antioxidantes neste modelo experimental, nas regiões encefálicas e especialmente, empregando distintas espécies animais, o que proporcionaria uma abordagem comparativa. Desta forma, este trabalho avalia parâmetros de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em regiões encefálicas de duas espécies distintas de vertebrados, rãs e ratos, em condições basais e após a secção do nervo isquiático.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo comparativo de marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em regiões encefálicas de ratos e rãs, em estado basal e aos 3 e 7 dias após a secção do nervo isquiático.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar, como medida de dano lipídico, os valores da quimioluminescência espontânea em tronco encefálico e neocórtex de ratos, e tronco encefálico e prosencéfalo de rãs, em estado basal e aos 3 e 7 dias após a secção unilateral do nervo isquiático;

Determinar as atividades das enzimas antioxidantes catalase, superóxido-dismutase, e glutathione transferase em tronco encefálico e neocórtex de ratos, e tronco encefálico e prosencéfalo de rãs, em estado basal e aos 3 e 7 dias após a secção unilateral do nervo isquiático;

Determinar o conteúdo do antioxidante ácido ascórbico em tronco encefálico e neocórtex de ratos, e tronco encefálico e prosencéfalo de rãs, em estado basal e aos 3 e 7 dias após a secção unilateral do nervo isquiático.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais: Procedência e Manutenção

Neste estudo foram empregadas duas espécies de animais – ratos (*Rattus norvegicus* da linhagem Wistar) machos, adultos jovens, com aproximadamente 300 g de peso e rãs (*Rana catesbeiana*) machos, adultas, com cerca de 150-250 g de peso.

As rãs foram obtidas do ranário Ranasul, localizado em Imbé – RS, em março de 2009, e mantidas no Biotério Central da UFRGS, com alimentação à base de ração apropriada ofertada em cocho vibratório, *ad libitum*, por cerca de uma semana para aclimação. Após este período inicial os animais foram transferidos para o Laboratório de Neurobiologia Comparada e mantidos em aquários de vidro¹ contendo água, até o dia da cirurgia e/ou morte. A limpeza dos recipientes e troca de água eram realizadas diariamente. Durante todo o período experimental as rãs foram mantidas em temperatura e fotoperíodo que oscilaram de acordo com a temperatura ambiente.

Os ratos foram obtidos do Biotério Central da UFRGS, com 60 dias de vida, e transferidos para o Laboratório de Neurobiologia Comparada apenas no dia da cirurgia e/ou morte. Após a cirurgia permaneceram no Biotério do Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Os animais foram acomodados em caixas forradas com maravalha, e com livre acesso à água e alimentação. Eles permaneceram sob condições de luz e temperatura controladas, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 07h00min às 19h00min) e temperatura ambiental de $22 \pm 2^{\circ}$ C. Foram dispostos cinco ratos em cada caixa. A limpeza das caixas era realizada, no máximo, a cada dois dias.

¹ Os aquários possuíam as seguintes dimensões: 25 cm de largura, 40 cm de comprimento e 30 cm de altura. O preenchimento com água era feito até aproximadamente 2,0 cm de altura, totalizando cerca de 2,0 litros. Foram dispostos cinco animais em cada aquário.

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

a) **Grupo Controle:** animais que não sofreram qualquer tipo de intervenção cirúrgica;

b) **Grupo Sham:** animais que sofreram a incisão dos tecidos até visualização do nervo isquiático, porém sem a secção do mesmo. Este grupo foi subdividido em dois diferentes períodos, conforme o tempo entre a cirurgia e a morte do animal, resultando nos subgrupos Sham 3 dias e Sham 7 dias;

c) **Grupo Desnervado:** animais que sofreram a secção total do nervo isquiático. Este grupo foi subdividido em dois diferentes períodos, conforme o tempo entre a desnervação e a morte do animal, resultando nos subgrupos SNT (do inglês *Sciatic nerve transection*) 3 dias e SNT 7 dias;

As estruturas nervosas centrais escolhidas para estudo foram o neocórtex e tronco encefálico, nos ratos e prosencéfalo e tronco encefálico nas rãs. Considerando o reduzido tamanho destas regiões em *Rana catesbeiana* foi necessário empregar maior número de animais para compor uma única amostra, totalizando 15 animais pra compor um “n” de 5, por cada grupo experimental.

Para uma melhor compreensão, o número de animais de cada grupo e a organização dos grupos como mencionado estão ilustradas na tabela abaixo:

TABELA 1 – Organização dos grupos experimentais

	Grupo experimental	Número de animais	Estrutura SNC
Mamíferos Ratos Wistar	Controle	n = 6	Néocortex e tronco encefálico
	Sham 3 dias	n = 6	
	Sham 7 dias	n = 6	
	SNT 3 dias	n = 6	
	SNT 7 dias	n = 6	
Anfíbios <i>Rana catesbeiana</i>	Controle	15 (agrupados a cada 3), n=5	Prosencéfalo e tronco encefálico
	SNT 3 dias	15 (agrupados a cada 3) n=5	
	SNT 7 dias	15 (agrupados a cada 3) n=5	

3.3 Procedimento cirúrgico

O procedimento de desnervação periférica consistiu na secção total de um segmento do nervo isquiático dos animais, em sua pata direita. Inicialmente os animais foram anestesiados, empregando-se distintos fármacos para cada uma das espécies. As rãs receberam injeção intramuscular na porção ventral da coxa direita, de prilocaína 2% (Astra[®]) na dose de 20 mg.kg⁻¹ de massa corporal. Embora este seja um anestésico de ação local, a rica vascularização do tegumento deste animal permite uma pronunciada absorção sistêmica, de modo que se observa ligeira sedação e diminuição dos movimentos. A pressão por pinça nas articulações foi realizada, de tempos em tempos, até que não se observassem mais respostas de retirada da pata. Este procedimento, além dos efeitos obtidos com a anestesia buscou assegurar que o animal não sentiria dor durante a cirurgia.

Os ratos receberam injeção intraperitoneal de uma solução anestésica preparada a partir de cloridrato de cetamina (Ketamin[®] – Cristália) 100 mg.mL⁻¹ e cloridrato de xilazina (Anasedan[®] - Vetbrands) 20 mg.mL⁻¹, na proporção 9:1. Esta solução foi administrada na dose de 90 mg.kg⁻¹ (cetamina) e 2 mg.kg⁻¹ (xilazina) de massa corporal. Esta combinação proporciona anestesia geral.

Anestesiados, os animais foram colocados sobre uma superfície plástica plana e sua pata posterior direita foi fixada com auxílio de fita esparadrapo. No rato foi necessário o corte dos pêlos onde seria realizada a incisão, com uma tesoura. Realizou-se então um pequeno corte na pele, com cerca de dois centímetros de comprimento, foram sendo afastadas cuidadosamente as fâscias de tecido conjuntivo, e depois os músculos, até a visualização do nervo isquiático, como um filamento espesso, branco e brilhante. Na rã existe um calibroso vaso sanguíneo percorrendo junto com o nervo o segmento a ser seccionado, de modo que neste animal o isolamento do nervo foi ainda mais cauteloso para preservar o vaso e evitar um acidente hemorrágico. Nos animais a serem desnervados, seguiu-se com a colocação de um fio de algodão como forma de demarcação do segmento a ser cortado (cerca de três milímetros), e fez-se um pequeno nó. As partes de nervo logo adjacentes ao pequeno nó foram então seccionadas e a incisão suturada. Nos animais sham o nervo foi visualizado e pinçado, porém não seccionado. Após a sutura aplicou-se no local da lesão uma solução antisséptica de rifamicina (Rifocina[®] - Sanofi Aventis). Durante todo experimento, período pré e pós-cirúrgico, e mesmo com aqueles animais que não sofreram qualquer tipo de intervenção (controles), buscou-se evitar submetê-los a extremos de temperatura, especialmente por ser inverno. Ainda mais zelo foi necessário após a recuperação anestésica, principalmente nos ratos que

são homeotermos, e para isso foram mantidos em sala condicionada a 25°C até recomposição de sua temperatura corporal.

3.4 Obtenção do tecido nervoso e preparo das amostras

Imediatamente após a morte dos animais, por decapitação, o encéfalo foi completa e cuidadosamente removido da caixa craniana. Após foi transferido para uma placa de Petri resfriada em banho de gelo, contendo solução salina 0,9% (solução preparada a partir de cloreto de sódio (Nuclear®) em água destilada). Este aparato foi utilizado para separar as distintas regiões encefálicas e preservar sua integridade metabólica e anatômica o tanto quanto possível. Dos ratos obteve-se o tronco encefálico e o neocórtex, e das rãs o tronco encefálico e o prosencéfalo, considerando que estes animais não possuem um neocórtex definido. Separadas, as partes foram rapidamente pesadas, armazenadas em *ependorfs* e estes imersos em nitrogênio líquido, o que conferiu um congelamento instantâneo aos tecidos removidos. Em seguida foram acondicionados em freezer a -60°, até o momento da homogeneização, realizada no dia seguinte.

A homogeneização visa preservar o tecido da ação de proteases, manter um ambiente iônico favorável à manutenção das estruturas celulares e, após a centrifugação do mesmo, reservar no sobrenadante somente as porções do tecido interessantes ao estudo. Assim, aos tecidos brutos foi adicionada solução aquosa de cloreto de potássio (Reagen®) 1,15%, em um volume de cinco vezes a massa de cada tecido, e solução isopropanólica de fenilmetilsulfonil fluoreto (Sigma®) 100 mM, em um volume de um vigésimo da massa de cada tecido. Após homogeneização em aparelho mixer manual, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm em centrífuga refrigerada. Os sobrenadantes foram então armazenados em novos *ependorfs*, os quais foram identificados e guardados em freezer a -60° até o momento das determinações bioquímicas. O termo “amostras”, na descrição dos experimentos seguintes, refere-se a sua forma homogeneizada, como descrito neste parágrafo.

3.5 Ensaios bioquímicos

3.5.1 Atividade da enzima catalase

A catalase foi quantificada conforme Aebi (1984), a partir da observação em espectrofotômetro do decaimento na concentração de peróxido de hidrogênio do meio de reação experimental. Inicialmente realizou-se a leitura da solução de peróxido de hidrogênio em cubeta de quartzo contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, a fim de verificar a qualidade da solução e do reagente. A leitura das amostras foi realizada empregando-se 50 µL (tecido de rato) ou 30 µL (tecido de rã) destas em cubeta de quartzo contendo 1,93 mL ou 1,95 mL, respectivamente, de tampão fosfato 0,1 M. Após zerar o espectrofotômetro (BIOESPECTRO SP-220), adicionou-se 50 µL de peróxido de hidrogênio, e observou-se o gradativo decaimento nas absorvâncias medidas, nos tempos 0, 15 s, 30 s, 45 s e 60 s, representando a ação enzimática proporcional da catalase das amostras sobre o peróxido em solução. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 240 nanômetros. A solução de peróxido de hidrogênio possuía concentração de 0,88 M diluída em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Os resultados foram expressos em picomoles por miligrama de proteína.

3.5.2 Atividade da enzima superóxido dismutase

Fridovich e Misra propuseram, em 1972, um ensaio para quantificar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) por meio da inibição que esta demonstrou exercer frente à auto-oxidação da adrenalina. Esta catecolamina sofre auto-oxidação quando em meio básico, sendo mais intenso e veloz o processo em pH entre 10 e 11. A reação envolve a geração de radicais livres, especialmente o ânion superóxido, que contribui com a perpetuação da oxidação. Para tanto o método avalia, indiretamente, a ação enzimática da SOD, que ao neutralizar os radicais superóxido evita a oxidação da adrenalina em adrenocromo, um subproduto colorido que pode ser medido a 480 nanômetros.

Inicialmente realizou-se uma leitura, em espectrofotômetro de feixe duplo Cary (Varian) da auto-oxidação natural da adrenalina, em meio contendo tampão glicina pH 11,3, por cerca de 90 s. A leitura resulta em uma curva, cuja porção ascendente indica a formação de adrenocromo, até o ápice da curva, a partir de onde observa-se um decaimento que indica a oxidação deste em outros compostos com absorção máxima não mais em 480 nm, e por isso

não detectáveis. As absorvâncias interessantes são aquelas do início e fim do segmento da curva mais acentuado, representando o período mais intenso da reação.

Após realizou-se a leitura das amostras, cada qual nos volumes de 15 e 30 μL . Colocou-se o primeiro volume de amostra na cubeta, em meio contendo tampão glicina pH 11,3, e zerou-se o equipamento. A seguir, adicionou-se 50 μL de adrenalina e observou-se a formação de curva semelhante à primeira, porém de menor amplitude, proporcionalmente ao teor de SOD presente na amostra.

O tampão foi preparado na concentração de 50 mM de glicina (Vetec[®]), em água ultrapura, e seu pH foi ajustado à 11,3 com hidróxido de sódio (F. Maia[®]) em pérolas. A solução de adrenalina (Sigma[®]) foi preparada na concentração de 60 mM, em água ultrapura. O pH desta solução deve ficar em 2,0, podendo ser ajustado com ácido clorídrico, se necessário.

O ensaio proporciona uma medida indireta da atividade enzimática, e por isso os resultados são expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína, que representa a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a velocidade de auto-oxidação da adrenalina.

3.5.3 Atividade da enzima glutathione transferase

O princípio desta técnica baseia-se na conjugação da glutathione reduzida (GSH) ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), pela glutathione transferase (GST) presente na mostra em estudo. O composto resultante, dinitrofenilglutathione, pode então ser detectado espectrofotometricamente, a 340 nanômetros, conforme descrito em Habig *et al* (1974).

Utilizando uma cubeta de quartzo, adicionaram-se os seguintes reagentes ao meio de reação, em equipamento BIOSPECTRO SP-220: 970 μL tampão fosfato 0,1 M pH 6,5; 30 μL de amostra e 200 μL de GSH. Zerou-se o espectrofotômetro e rapidamente adicionou-se 100 μL de CDNB. A reação foi observada por um minuto, e as absorvâncias nos tempos 0 e 60 s foram anotadas, para posterior cálculo da atividade enzimática, expressa em picomoles por minuto, por miligrama de proteína.

A solução de CDNB foi preparada em etanol 99% (Nuclear[®]), na concentração de 20 mM, e mantida em isopor com gelo e em frasco âmbar durante o experimento. A solução de GSH (Sigma[®]) teve como veículo o tampão fosfato 0,1 M e também permaneceu no gelo enquanto durou o ensaio.

3.5.4 Ácido ascórbico

O ensaio de quantificação do ácido ascórbico foi realizado conforme descrito por Roe e Kuether (1942), com adaptações elaboradas e padronizadas em nosso laboratório (Lab. Neurobiologia Comparada). Inicialmente as amostras foram centrifugadas, sob refrigeração, por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante foi separado para o ensaio. Preconizou-se uma curva padrão de ácido ascórbico (AA) (Synth[®]) com as seguintes quantidades: 0,0015 mg; 0,00375 mg; 0,0075 e 0,0150 mg. Preparou-se então uma solução de AA de 10 mg/mL e a partir desta uma outra de 0,100 mg/mL, a qual foi distribuída, em duplicata, em tubos *ependorfs* nos volumes 20, 50, 100 e 200 microlitros e completados até 400 microlitros com ácido tricloroacético 4% (Vetec[®]). O conteúdo destes foi então agitado com carvão ativado (Synth[®]), de granulometria 1-2 mm, tratado previamente com ácido clorídrico 10 %, para conversão do AA em sua forma oxidada. Após, separou-se 300 microlitros desta solução, adicionou-se 10 microlitros de solução de tiouréia 10% (Vetec[®]), 75 microlitros de 2,3-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 2% (Sigma[®]) e os *ependorfs* contendo essa mistura de soluções foram colocados em banho-maria a 37 °C por 3 horas. Terminado este período de tempo adicionou-se 375 microlitros de ácido sulfúrico 85% (Nuclear[®]), gota a gota, com os *ependorfs* em banho de gelo, e aguardou-se 30 minutos para leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 540 nanômetros. Na presença de AA desenvolve-se uma coloração alaranjada, proporcional à concentração. As amostras tiveram o mesmo tratamento, porém com a adição de ácido tricloroacético ocorre desproteíntização, sendo necessário centrifugar novamente os *ependorfs* por breve período de tempo, e seguir o ensaio utilizando o sobrenadante obtido. A partir da curva padrão de AA e regressão linear obteve-se a concentração em $\mu\text{M AA.mg proteína}^{-1}$.

3.5.5 Peroxidação lipídica

A quantificação do grau de lipoperoxidação foi realizada pelo método quimioluminescente proposto por Gonzalez-Flecha *et al* (1991), com modificações, em equipamento contador de cintilação líquida beta (modelo 1215, LKB-Produker AB, Suécia). Este ensaio quantifica a emissão de luz por espécies, como o oxigênio *singlet*, derivadas do processo de oxidação dos lipídeos da amostra, que após um estado de excitação eletrônica, têm seus elétrons retornando aos subníveis de menor energia. O início da reação de detecção pode ser realizado adicionando-se um hidroperóxido, como o terc-butil (t-BOOH) ou espontaneamente, quando as características do tecido permitem uma emissão espontânea,

que ocorre preferencialmente em temperaturas acima dos 25 °C. Como os tecidos encefálicos emitem espontaneamente a luminescência resultante da oxidação de seus lipídios, não foi necessário adicionar um peróxido iniciador. O procedimento todo foi realizado em ambiente desprovido de luz. Os frascos de vidro (*vials*) utilizados para o experimento foram deixados em recipiente escuro por tempo suficiente para resultar em uma contagem de luminescência tão baixa quanto possível, entre 4.000 e 8.000 cps. Então, inicialmente realizou-se a leitura dos frascos vazios, para determinar tal contagem, e se viáveis, foram adicionados aos frascos 1,75 mL de solução tampão fosfato 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4. Esta leitura é denominada “base”. Por fim adicionou-se 0,25 mL de amostra para obtenção da leitura “máxima”, a qual foi obtida após sucessivos ciclos de leituras pelo contador. Os resultados são expressos em contagens por segundo, por miligrama de proteína (cps.mg proteína⁻¹).

3.5.6 Quantificação de Proteínas

A quantificação do conteúdo proteico dos tecidos foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Lowry *et al* (1951). Este ensaio emprega o reagente de Folin-Ciocalteu, cuja redução pelas proteínas pré-tratadas com cobre resulta em coloração azul intensa que pode ser medida espectrofotometricamente a 625 nanômetros. Em duplicata, 20 µL de amostra foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 780 µL de água ultrapura. Após, foram adicionados 2,0 mL de Reativo C. Dez minutos depois, adicionou-se 0,2 mL do Reagente de Folin-Ciocalteu, com repouso de 30 minutos até a leitura das absorbâncias, em espectrofotômetro Analyser 850M. O conteúdo de proteínas da amostra é calculado com base nas absorbâncias desta e de um fator de calibração obtido de uma curva-padrão de albumina. A solução de albumina foi preparada no dia do experimento, na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹ em água ultrapura. Os três pontos da curva em duplicata foram compostos pelas concentrações de proteína de 0,05 mg.mL⁻¹; 0,10 mg.mL⁻¹ e 0,150 mg.mL⁻¹. Os resultados foram expressos em miligramas de proteína.

O Reagente de Folin-Ciocalteu (Proton Quimica[®]) utilizado foi diluído na proporção de 1:4 (v/v) em água ultrapura, e armazenado em geladeira. Esta mistura é viável sob refrigeração por cerca de duas semanas.

O Reativo C foi preparado a partir de outras três soluções previamente preparadas - A, B1 e B2 – nas proporções 10: 0,1: 0,1 (v/v/v), para uso exclusivo no dia do experimento. A solução A é composta por bicarbonato de sódio (Nuclear[®]) 2% em hidróxido de sódio (F.

Maia®) 0,1 M. A solução B1 consiste em sulfato de cobre (Nuclear®) 1%, e a solução B2 em tartarato de sódio e potássio (Vetec®) 2%, ambos em água ultrapura.

3.6 Análise estatística

Os resultados apresentados neste trabalho representam a média obtida de cada grupo experimental, \pm o erro padrão da média. O número de animais (n) necessário para os ensaios foi estabelecido com base no “n” empregado em experimentos similares realizados por outros alunos e pesquisadores no Laboratório de Neurobiologia Comparada – número este considerado o mínimo para formar um subconjunto representativo da população em estudo.

Para análise dos dados obtidos empregou-se o programa Sigmastat versão 3.5. O nível de significância (α) adotado foi de 0,05. O teste estatístico aplicado foi ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Holm-Sidak, quando houve diferença significativa.

Os gráficos das figuras 8 a 11 foram construídos a partir da transformação dos valores dos ensaios em percentuais positivos ou negativos em relação ao controle, estipulado arbitrariamente como 0,00.

4. RESULTADOS

Inicialmente são apresentados os resultados relativos aos parâmetros estudados nos animais do grupo controle, ou seja, aqueles sem qualquer manipulação cirúrgica, visando salientar as diferenças entre rãs e ratos nesta condição basal.

Em sequência estão os resultados agrupados por ensaio, para que seja possível a observação das diferenças entre todos os grupos experimentais quanto àquele parâmetro.

Por fim são apresentadas figuras que agregam todos os parâmetros e grupos, buscando evidenciar a diferença entre as duas regiões encefálicas estudadas, em cada espécie.

4.1 Parâmetros oxidativos em encéfalo de ratos e rãs em estado basal

Os dados deste subitem estão mostrados na TABELA 2 e expressos como média±erro padrão da média.

Os valores de atividade da primeira enzima antioxidante estudada, superóxido dismutase (SOD), são bastante semelhantes entre as espécies e mesmo entre as regiões análogas. No córtex cerebral de ratos e prosencéfalo de rãs obteve-se $17,57 \pm 1,26$ e $17,45 \pm 0,68$ USod. mg proteína⁻¹, respectivamente; no tronco encefálico de ratos e rãs $12,36 \pm 0,80$ e $15,21 \pm 0,80$ USod. mg proteína⁻¹, respectivamente.

A atividade da enzima catalase, entretanto, diferiu. Na rã a atividade basal da enzima foi próxima ao dobro da encontrada no rato, em ambas as regiões do encéfalo. Assim, teve-se $0,206 \pm 0,022$ pmoles.mg proteína⁻¹ no córtex de rato e $0,504 \pm 0,063$ pmoles.mg proteína⁻¹ no prosencéfalo da rã. No tronco encefálico de rato o valor encontrado foi $0,248 \pm 0,025$ pmoles.mg proteína⁻¹, sendo na rã de $0,468 \pm 0,049$ pmoles.mg proteína⁻¹.

A glutathion transferase apresentou perfil de atividade semelhante nas diferentes regiões encefálicas de rato (córtex: $58,36 \pm 4,17$ pmoles.min.mg proteína⁻¹, tronco: $60,92 \pm 4,85$

pmoles.min.mg proteína⁻¹). Na rã obteve-se maior atividade no prosencéfalo (83,74±2,70 pmoles.min.mg proteína⁻¹) do que no tronco (53,98±1,88 pmoles.min.mg proteína⁻¹).

A concentração de ascorbato foi semelhante em rato e rã nas regiões análogas - córtex (1,804±0,125 µM. mg proteína⁻¹) e prosencéfalo (1,764±0,153 µM. mg proteína⁻¹). O tronco encefálico da rã apresentou a maior concentração de ascorbato (1,975±0,117 µM. mg proteína⁻¹), e a mesma região no rato teve a menor concentração (0,663±0,053 µM. mg proteína⁻¹).

Os valores de peroxidação de lipídeos no córtex (516,02 ± 57,74) e tronco encefálico (83,28 ± 7,93) de ratos foram maiores do que aqueles encontrados no prosencéfalo (182,06 ± 15,42) e tronco encefálico (31,27 ± 3,048) de rãs. Os valores das estruturas encefálicas do rato foram praticamente o dobro daqueles obtidos nas estruturas similares de rãs.

TABELA 2 – Parâmetros oxidativos em encéfalo de ratos e rãs em estado basal

	Rato		Rã	
	Córtex	Tronco encefálico	Prosencéfalo	Tronco Encefálico
Superóxido dismutase (USod. mg proteína ⁻¹)	17,57 ± 1,26	12,36 ± 0,80	17,45 ± 0,68	15,21 ± 0,80
Catalase (pmoles.mg proteína ⁻¹)	0,206 ± 0,022	0,248 ± 0,025	0,504 ± 0,063	0,468 ± 0,049
Glutathiona transferase (pmoles.min.mg proteína ⁻¹)	58,36 ± 4,17*	60,92 ± 4,85*	83,74 ± 2,70	53,98 ± 1,88
Ascorbato (µM. mg proteína ⁻¹)	1,804 ± 0,125	0,663 ± 0,053	1,764 ± 0,153	1,975 ± 0,117
Lipoperoxidação (cps.mg proteína ⁻¹)	516,02 ± 57,74*	83,28 ± 7,93*	182,06 ± 15,42	31,27 ± 3,048

Dados representam a média ± erro padrão, n=6 (ratos) e n=5 (rãs), exceto em (*), onde n = 5.

4.2 Marcadores de estresse oxidativo no encéfalo de ratos e rãs submetidos à secção do nervo isquiático

Os resultados apresentados a seguir, em parênteses, representam a média ± erro padrão da média. As unidades dos valores nos parágrafos seguintes foram suprimidas visando conferir melhor fluência à leitura do texto, e podem ser conferidas no item 5 e nas legendas das figuras dos respectivos ensaios.

4.2.1 Atividade da enzima Superóxido dismutase

A atividade da SOD no córtex ($27,99 \pm 1,10$) e tronco encefálico ($18,30 \pm 1,54$) dos ratos aumentou significativamente em relação aos respectivos controles ($17,57 \pm 1,26$ e $12,36 \pm 0,80$) transcorridos três dias da secção do nervo isquiático, permanecendo elevada ainda aos sete dias (FIGURA 3A e B). Os grupos SHAM 3D e 7D, em ambas as regiões, não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Na FIGURA 3 (C e D), a atividade da SOD em prosencéfalo e tronco encefálico de *Rana catesbeiana* reduziu significativamente aos três dias após a desnervação ($10,74 \pm 1,18$ e $7,63 \pm 0,65$, respectivamente) quando estes valores foram comparados aos seus controles ($17,45 \pm 0,68$ e $15,21 \pm 0,79$). Aos sete dias, esta atividade mostrou valores similares aos obtidos no grupo controle – $17,01 \pm 1,02$ e $15,77 \pm 0,76$.

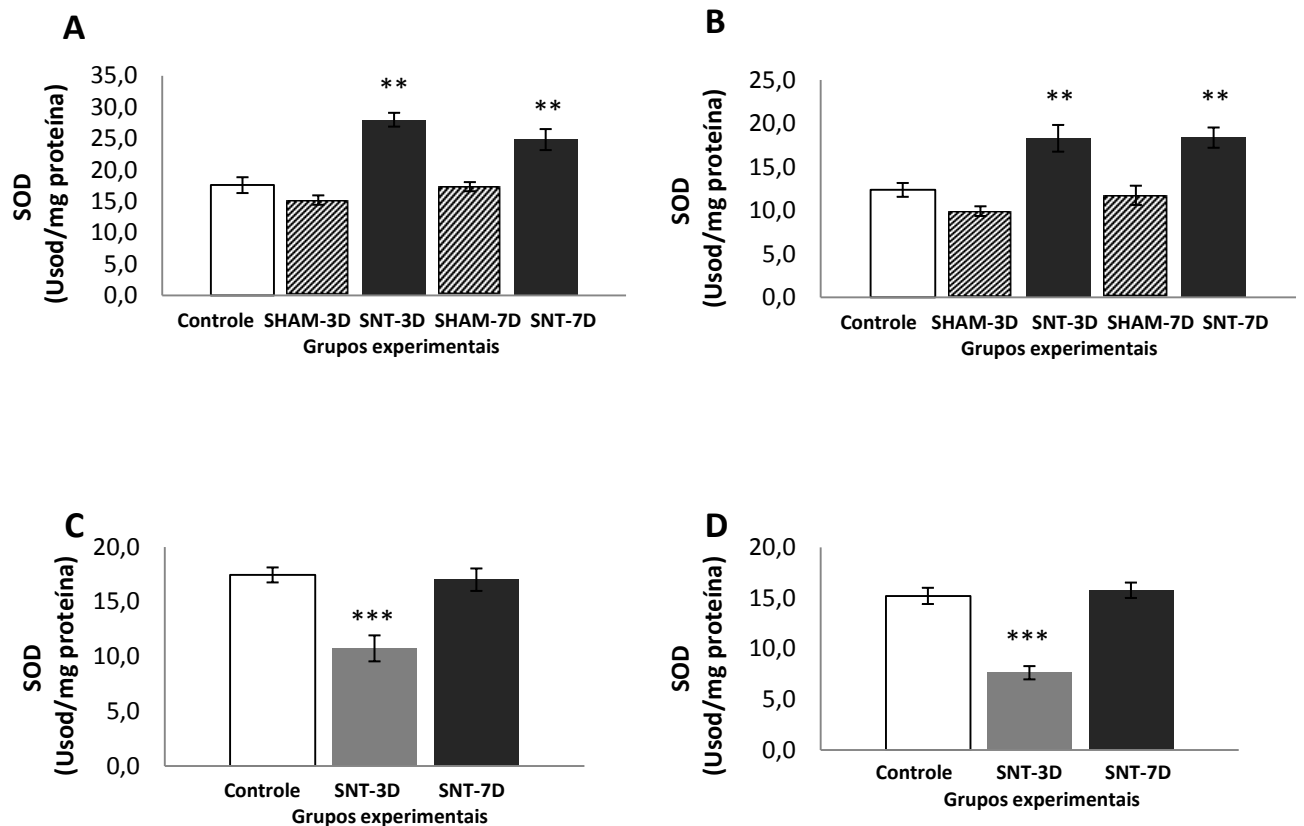


FIGURA 3 – Atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) em (A) Córtex cerebral de ratos, (B) tronco encefálico de ratos, (C) prosencéfalo de rãs e (D) tronco encefálico de rãs. Dados representam a média \pm erro padrão, $n=6$ (ratos) e $n=5$ (rãs). **Indica diferença significativa quando comparado ao controle e ao SHAM do mesmo grupo desnervado (3D e 7D). ***Indica diferença significativa quando comparado ao controle e SNT 7D, ($P<0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste Holm-Sidak). Atividade da enzima em $USod.mg\ prote\acute{a}na^{-1}$. SNT, do inglês *sciatic nerve transection*, animais desnervados; 3D e 7D indicam 3 e 7 dias após cirurgia.

4.2.2 Atividade da enzima catalase

Aos três dias após a secção do nervo isquiático, a atividade da catalase (CAT) no córtex cerebral de ratos ($0,282 \pm 0,026$) aumentou significativamente quando comparada ao grupo controle ($0,206 \pm 0,021$). Já no tronco encefálico destes animais, a CAT não mostrou variação significativa nos diferentes grupos experimentais (FIGURA 4 A e B).

Nas rãs, a enzima não apresentou variação estatisticamente significativa em sua atividade nos distintos grupos experimentais e regiões encefálicas em estudo (FIGURA 4 C e D).

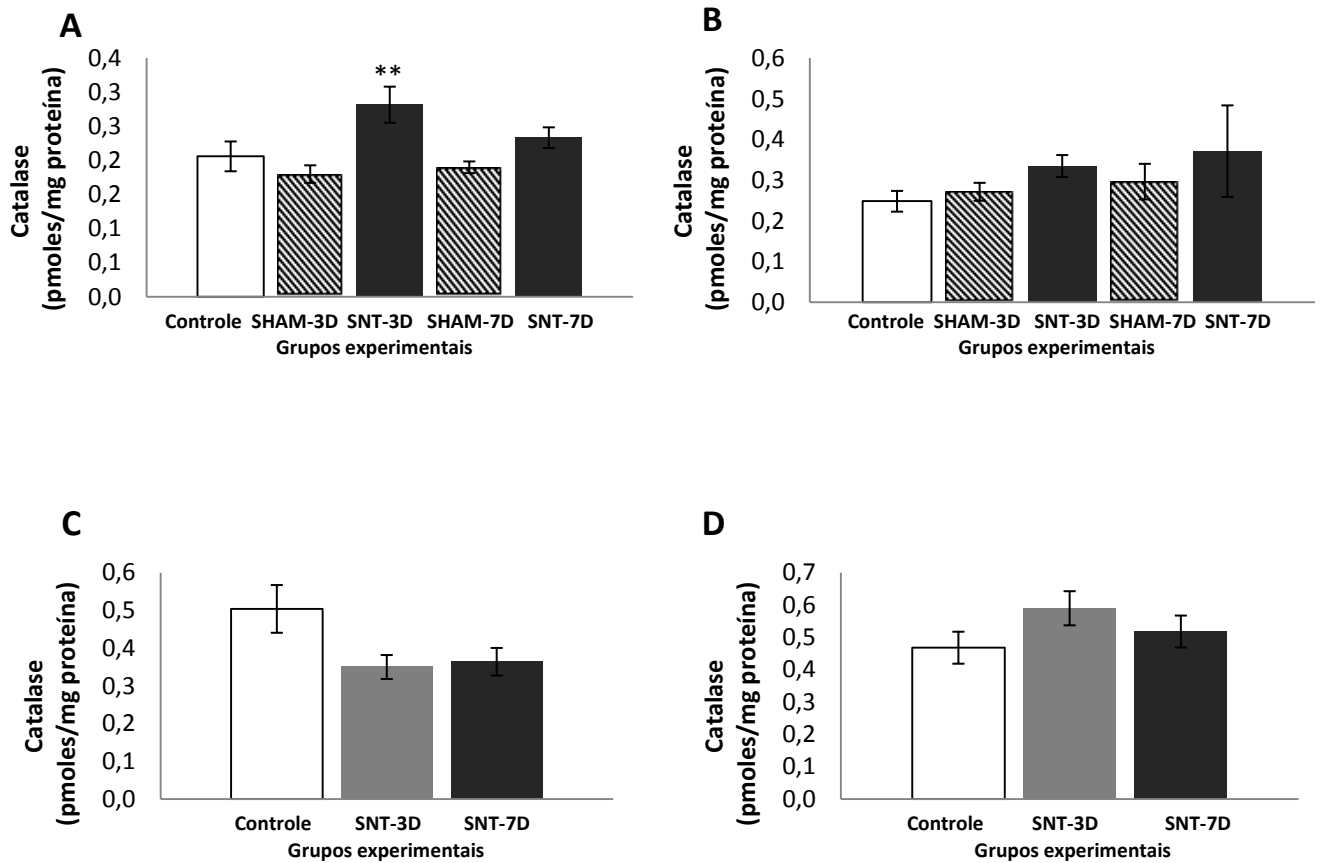


FIGURA 4 – Atividade da enzima catalase em (A) Córtex cerebral de ratos, (B) tronco encefálico de ratos, (C) prosencéfalo de rãs e (D) tronco encefálico de rãs. Dados representam a média \pm erro padrão, $n=6$ (ratos) e $n=5$ (rãs).** Indica diferença significativa quando comparado ao controle e SHAM 3D. ($P<0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste Holm-Sidak). Atividade da enzima em $\text{pmoles} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$. SNT, do inglês *sciatic nerve transection*, animais desnervados; 3D e 7D indicam 3 e 7 dias após cirurgia.

4.2.3 Atividade da enzima Glutathione transferase

A FIGURA 5 (A e B) mostra a atividade da GST em córtex cerebral e tronco encefálico de ratos, não sendo observadas diferenças significativas nos diferentes grupos experimentais.

No prosencéfalo da rã, por sua vez, a GST apresentou diminuição em sua atividade aos sete dias após a secção do isquiático ($72,78 \pm 2,11$), quando comparado aos grupos controle ($83,74 \pm 2,70$) e desnervado 3 dias (SNT 3D, $84,67 \pm 2,89$). No tronco encefálico a atividade permaneceu semelhante nos distintos grupos experimentais (FIGURA 5 C e D).

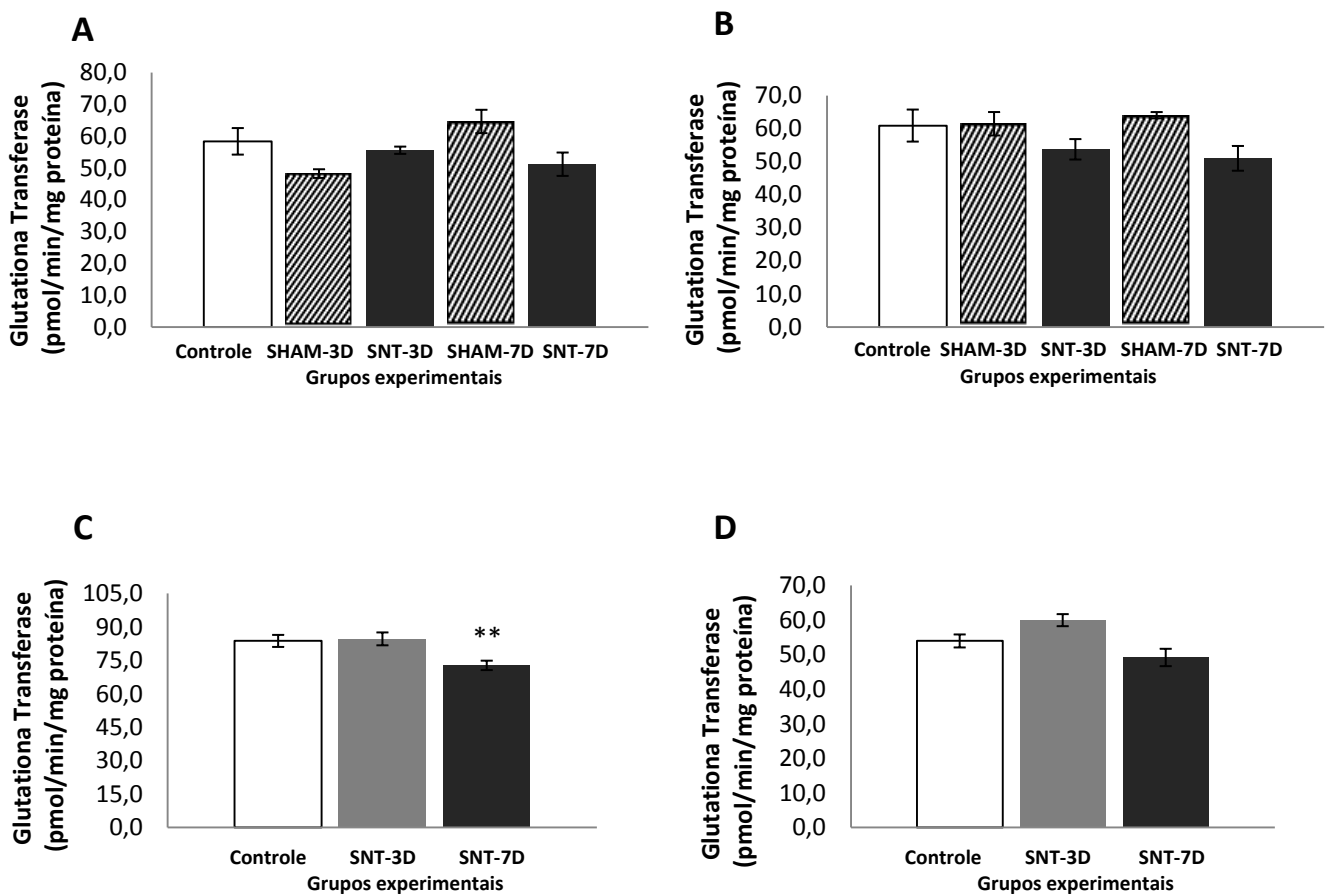


FIGURA 5 – Atividade da enzima Glutathione transferase em (A) Córtex cerebral de ratos, (B) tronco encefálico de ratos, (C) prosencéfalo de rãs e (D) tronco encefálico de rãs. Dados representam a média \pm erro padrão, $n=6$ (ratos córtex), $n=5$ (ratos tronco) e $n=5$ (rãs). ** Indica diferença significativa quando comparado ao controle e SNT 3D ($P<0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste Holm-Sidak). Atividade da enzima em $\text{pmoles} \cdot \text{min} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$. SNT, do inglês *sciatic nerve transection*, animais desnervados; 3D e 7D indicam 3 e 7 dias após cirurgia.

4.2.4 Valores de ácido ascórbico

Os valores de ácido ascórbico não variaram significativamente no córtex cerebral e tronco encefálico de ratos aos três e sete dias após a secção nervosa periférica (FIGURA 6 A e B).

Nas rãs, como mostrado na FIGURA 6C e D, houve aumento significativo na concentração de ácido ascórbico no grupo SNT 7D, tanto no prosencéfalo ($2,943 \pm 0,115$) como no tronco encefálico ($3,02 \pm 0,100$), quando comparados aos seus respectivos grupos controle ($1,764 \pm 0,153$ e $1,975 \pm 0,117$) e SNT3D ($2,187 \pm 0,036$ e $1,736 \pm 0,153$).

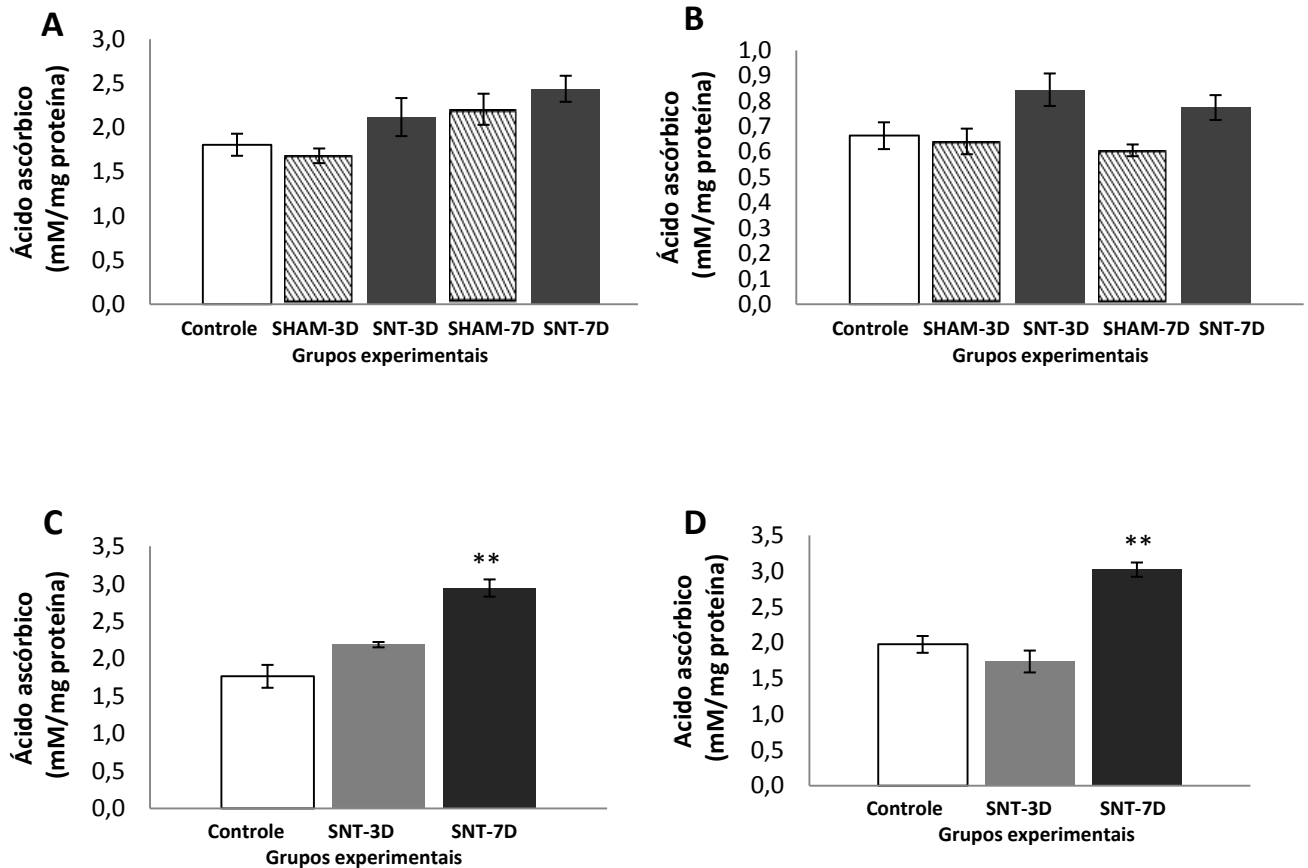


FIGURA 6 – Concentração de ácido ascórbico em (A) Córtex cerebral de ratos, (B) tronco encefálico de ratos, (C) prosencéfalo de rãs e (D) tronco encefálico de rãs. Dados representam a média \pm erro padrão, n=6 (ratos) e n=5 (rãs). ** Indica diferença significativa quando comparado ao controle e SNT 3D ($P<0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste Holm-Sidak). Concentração de ácido ascórbico em $\mu\text{M} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$. SNT, do inglês *sciatic nerve transection*; 3D e 7D indicam 3 e 7 dias após cirurgia.

4.2.5 Lipoperoxidação

No córtex cerebral de ratos, a oxidação de lipídeos apresentou-se elevada nos grupos SHAM 3D ($1.149,71 \pm 52,93$) e SNT 3D ($1.018,79 \pm 48,96$) em relação aos grupos controle ($516,02 \pm 57,74$) e SNT 7D ($278,22 \pm 11,12$), não ocorrendo, entretanto, diferenças significativas entre SHAM 3D e SNT 3D (FIGURA 7 A). Aos sete dias após a secção nervosa periférica, os valores de lipoperoxidação no grupo SHAM 7D foi similar aos valores basais, não sendo observada diferença significativa entre este e o seu grupo controle. Porém, o grupo SNT 7D mostrou uma redução significativa em seus valores de quimiluminescência espontânea, quando estes foram comparados aos dos grupos controle e SNT 3D (FIGURA 7A).

No tronco encefálico do rato (FIGURA 7 B) houve aumento da oxidação lipídica no grupo SHAM 3D ($366,81 \pm 18,26$) em relação ao controle ($83,28 \pm 7,93$) e SNT 3D ($155,37 \pm 8,06$). Este último, por sua vez, também mostrou maiores valores de lipoperoxidação quando comparado ao grupo controle, mas significativamente menores do que aqueles do grupo SHAM 3D. Não foram observadas mudanças estatisticamente significativas na peroxidação lipídica no tronco encefálico de ratos aos sete dias após a secção do nervo isquiático (FIGURA 7B).

No prosencéfalo das rãs observou-se maior dano aos lipídeos aos três dias após desnervação (SNT 3D, $1.320,73 \pm 133,37$), quando comparado ao grupo controle ($182,06 \pm 15,42$) e ao SNT 7D ($874,75 \pm 92,47$). Aos sete dias (SNT 7D) este parâmetro ainda mostrou-se elevado em relação ao controle, porém com valores menores do que aqueles obtidos aos três dias após a secção nervosa periférica (FIGURA 7 C).

No tronco encefálico deste animal (FIGURA 7 D), o grupo SNT 3D ($72,86 \pm 3,05$) mostrou maior oxidação lipídica do que os grupos controle ($31,27 \pm 3,048$) e SNT 7D ($16,39 \pm 2,043$). Aos sete dias após a desnervação ocorreu redução nos valores de lipoperoxidação, sendo esta diminuição mais acentuada do que aquela observada no prosencéfalo e estatisticamente diferente do controle e do SNT 3D.

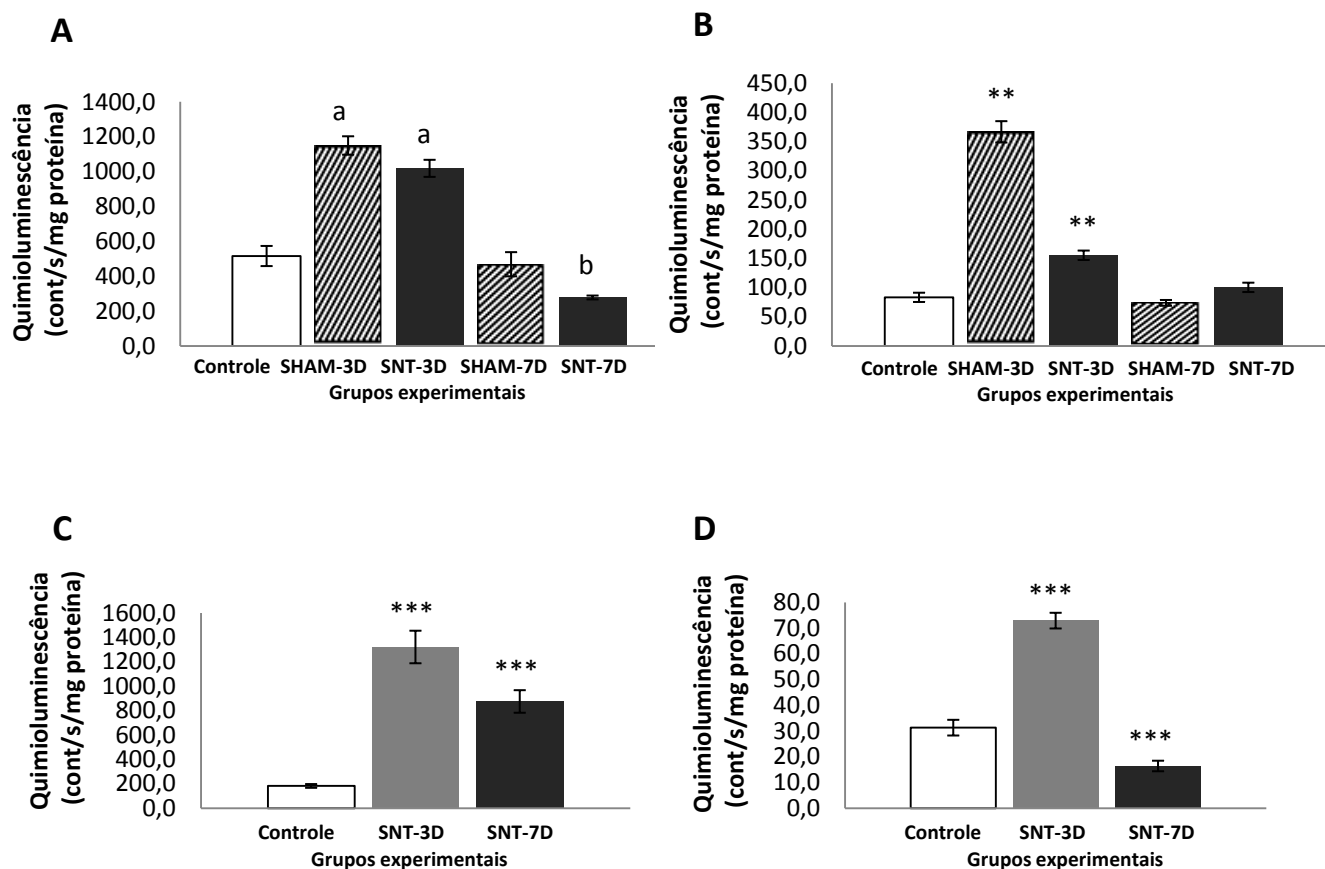


FIGURA 7 – Medida de lipoperoxidação por quimioluminescência em (A) Córtex cerebral de ratos, (B) tronco encefálico de ratos, (C) prosencéfalo de rãs e (D) tronco encefálico de rãs. Dados representam a média \pm erro padrão, n=5 (ratos e rãs). (a) Indica diferença significativa comparado-se SNT 3D ao controle e SNT 7D; comparando-se SHAM 3D ao controle e SHAM 7D. (b) Indica diferença significativa quando comparado ao controle e SNT 3D. ** Indica diferença significativa comparando-se SNT 3D ao controle e SHAM 3D; comparando-se SHAM 3D ao controle e SNT 3D. ***Indica diferença significativa comparando-se SNT 3D ao controle e SNT 7D; comparando-se SNT 7D ao controle e SNT 3D ($P < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste Holm-Sidak). Medida de quimioluminescência em cps.mg proteína⁻¹. SNT, do inglês *sciatic nerve transection*; 3D e 7D indicam 3 e 7 dias após cirurgia.

4.3 Perfis de defesas antioxidantes e dano oxidativo nas regiões encefálicas estudadas, em ratos e rãs após a secção do nervo isquiático.

Nas FIGURAS 8 a 11 os resultados obtidos encontram-se agrupados por região encefálica (prosencéfalo e tronco encefálico de rãs e córtex cerebral e tronco encefálico de ratos), dos grupos controle e desnervado apenas. Estes dados já foram apresentados nos itens anteriores deste capítulo, porém aqui foram reorganizados para demonstrar com maior

clareza a existência de diferentes perfis de atuação das defesas antioxidantes e agentes pró-oxidantes em cada uma das regiões do encéfalo.

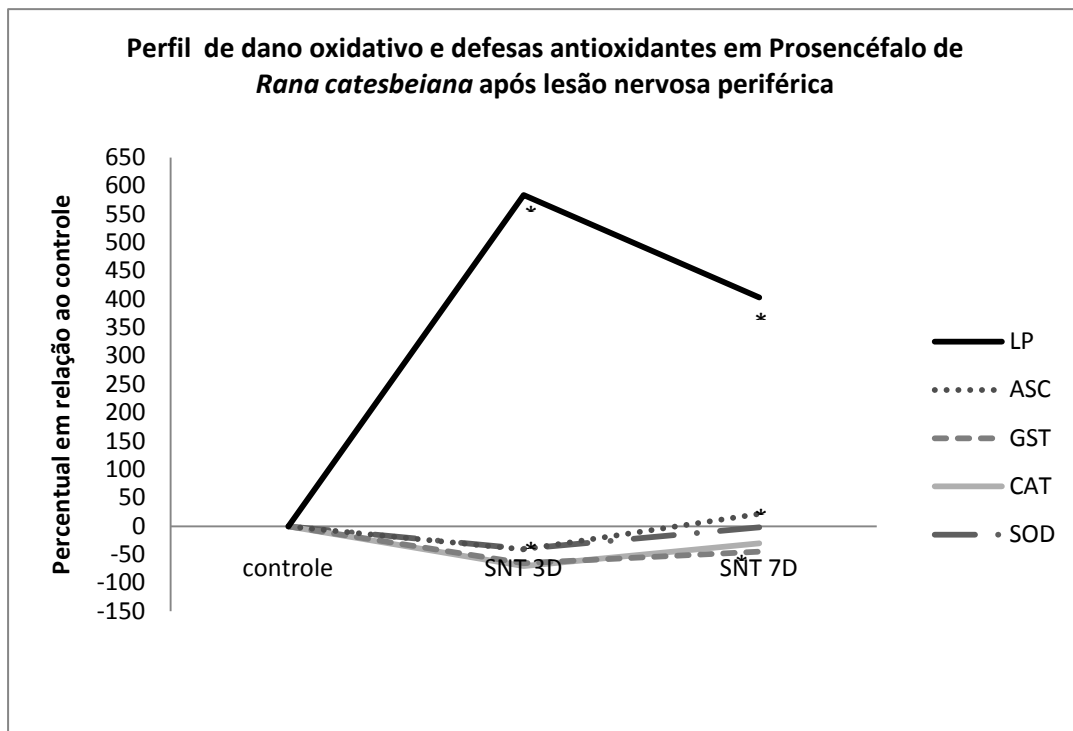


FIGURA 8 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona transferase (GST); concentração de ascorbato (ASC) e grau de lipoperoxidação (LP) em prosencéfalo de *Rana catesbeiana*, expressas em percentual relativo ao respectivo controle, definido aqui como (0,0). *Indica diferença significativa quando comparado ao controle. ($P < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste Holm-Sidak). SNT, do inglês *sciatic nerve transection*, animais desnervados; 3D e 7D indicam 3 e 7 dias após a cirurgia.

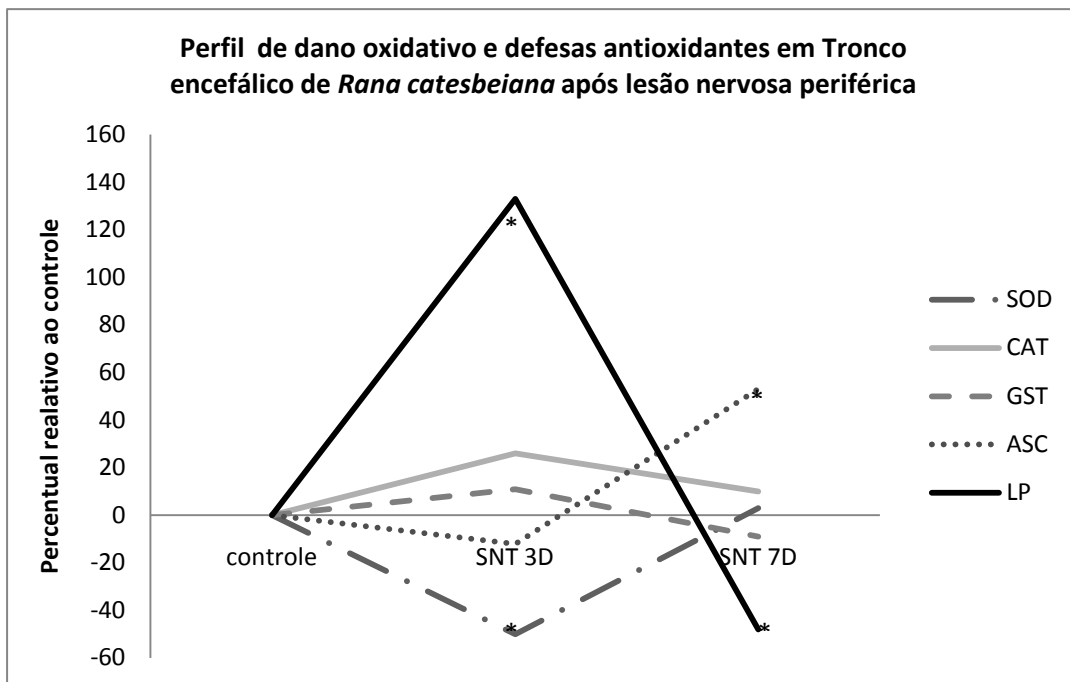


FIGURA 9 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona transferase (GST); concentração de ascorbato (ASC) e grau de lipoperoxidação (LP) em tronco encefálico de *Rana catesbeiana*, expressas em percentual relativo ao respectivo controle, definido aqui como (0,0). *Indica diferença significativa quando comparado ao controle. ($P < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste Holm-Sidak). SNT, do inglês *sciatic nerve transection*, animais desnervados; 3D e 7D indicam 3 e 7 dias após a cirurgia.

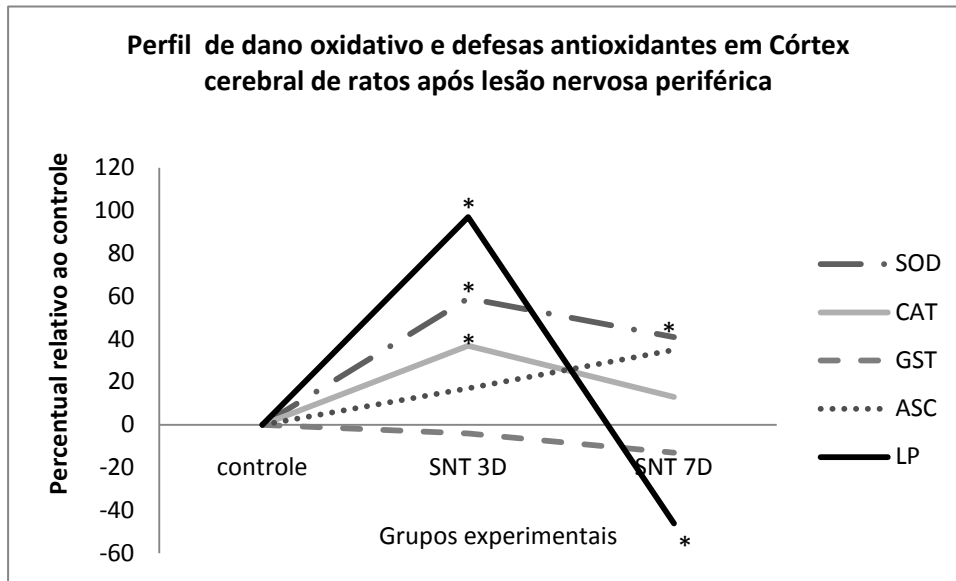


FIGURA 10 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona transferase (GST); concentração de ascorbato (ASC) e grau de lipoperoxidação (LP) em córtex cerebral de ratos, expressas em percentual relativo ao respectivo controle, definido aqui como (0,0). *Indica diferença significativa quando comparado ao controle. ($P < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste Holm-Sidak). SNT, do inglês *sciatic nerve transection*, animais desnervados; 3D e 7D indicam 3 e 7 dias após a cirurgia.

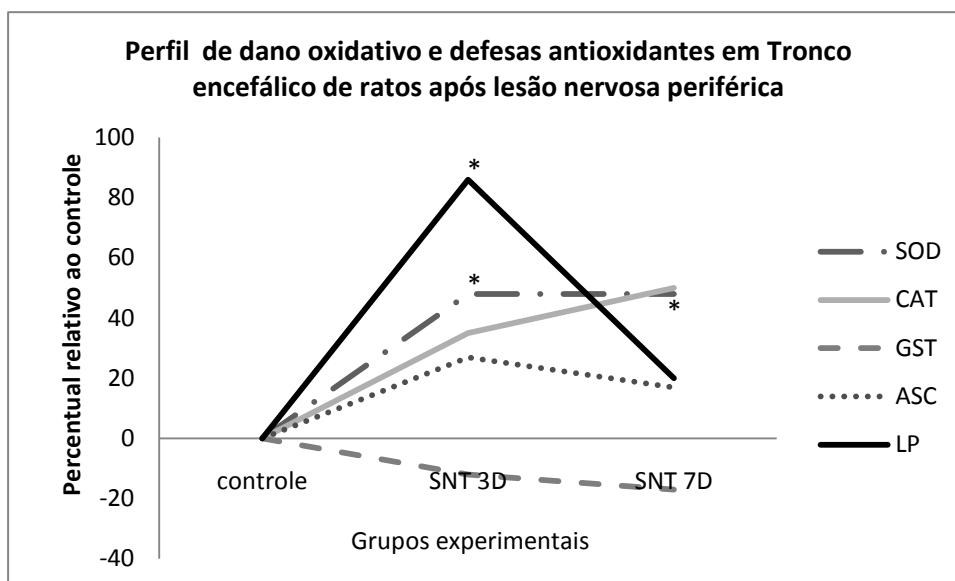


FIGURA 11 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona transferase (GST); concentração de ascorbato (ASC) e grau de lipoperoxidação (LP) em tronco encefálico de ratos, expressas em percentual relativo ao respectivo controle, definido aqui como (0,0). *Indica diferença significativa quando comparado ao controle. ($P < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste Holm-Sidak). SNT, do inglês *sciatic nerve transection*, animais desnervados; 3D e 7D indicam 3 e 7 dias após a cirurgia.

5. DISCUSSÃO

Sob uma ótica comparativa, o presente trabalho avaliou diferentes marcadores de estresse oxidativo no encéfalo de ratos e rãs em estado basal e após secção do nervo isquiático, permitindo a constatação de que a injúria nervosa periférica modifica um importante parâmetro de estresse, a oxidação lipídica, e desencadeia respostas nas defesas antioxidantes (frente à lipoperoxidação e possivelmente outras alterações não mensuradas neste trabalho) de formas diferentes entre as duas espécies de vertebrados.

Em princípio cabe comentar os resultados acerca das defesas antioxidantes no encéfalo dos animais em seu estado basal. A atividade da SOD foi bastante semelhante entre as espécies, e mesmo entre as estruturas do SNC estudadas. Esta semelhança é coerente com a ubiquidade desta enzima entre todos os seres aeróbios, desde os unicelulares até os mais complexos (Fridovich, 1975). A importância da SOD na proteção aos efeitos deletérios das EROs está evidenciada em diversos trabalhos, entre os quais os que demonstram sua indução pela exposição ao oxigênio e a resistência que a enzima confere às células submetidas a elevadas tensões de O₂ (Léwen *et al*, 2000). A atuação fundamental da SOD em condições de estresse oxidativo iminente é corroborada pelo estudo de Gregory e Fridovich (1973) empregando o microorganismo *Bacillus subtilis*. Quando em exposição ao oxigênio a bactéria apresentou aumento na atividade da enzima catalase, porém não da SOD, e quando submetida a ambiente hiperbárico não sobreviveu. Frequentemente em microorganismos a SOD se encontra no espaço periplásmico, o que demonstra sua atuação na linha de frente contra radicais oriundos do meio externo. Em geral, entre diversos animais e mesmo plantas, a estrutura da enzima é bastante similar (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Observando-se o desenvolvimento de larvas de *Xenopus laevis*, um anuro africano, constatou-se uma elevada atividade da SOD nos primeiros estágios de vida deste animal, com valores próximos a 30,0 USOD.mg proteína⁻¹ (Rizzo *et al*, 2006), quase duas vezes superior aos valores obtidos no encéfalo das rãs adultas empregadas no presente trabalho. Apesar de não estar claro o motivo desta elevada atividade da SOD nestes animais no início de seu desenvolvimento, é interessante a redução ao longo do desenvolvimento da espécie. Deste contexto é plausível inferir que a SOD tem papel imprescindível na neutralização de EROs em

espécies tão distintas quanto bactérias e seres humanos, e que conforme os resultados do presente trabalho esta função fica evidente pela atividade basal da enzima, similar e conservada entre ratos e rãs.

A catalase apresentou atividade basal próxima ao dobro, no encéfalo da rã, em relação ao rato. Possivelmente a catalase nestes animais seja a principal enzima detoxificadora do peróxido de hidrogênio, considerando que Torres-Lopez e colaboradores (1993) observaram, em diferentes tecidos de sapos uma maior atividade da CAT em relação à GPx (outra importante enzima neutralizadora de peróxidos), sugerindo sua importância e atuação predominante nesta espécie. No cérebro de ratos, entretanto, diversos trabalhos reúnem evidências que atribuem à GPx o papel primário de eliminação de peróxidos (Dringen *et al*, 2000; Ishibashi *et al*, 2002). Em mamíferos a enzima é encontrada tanto em citosol quanto matriz mitocondrial e é capaz de eliminar o peróxido de hidrogênio mais eficientemente do que a CAT (Ishibashi *et al*, 2002).

Quanto à GST, o prosencéfalo da rã apresentou atividade destacada da enzima em meio a um perfil relativamente homogêneo apresentado pelas estruturas encefálicas do rato e pelo próprio tronco encefálico da rã. Esta particularidade pode estar relacionada a uma maior vulnerabilidade desta região a substâncias exógenas tóxicas e mesmo a produtos do metabolismo interno, como peróxidos orgânicos e, como será comentado adiante, à atuação destacada desta enzima em situações de estresse oxidativo em anfíbios.

No rato, como descrito por Rice *et al* (2002), há uma maior concentração de ácido ascórbico no córtex cerebral, cerca de três vezes superior àquela encontrada no tronco encefálico, o que segundo os autores aponta para a importância desta molécula no metabolismo basal do neocórtex de mamíferos. Em répteis constatou-se algo similar (Rice *et al*, 2002). Um gradiente de concentração de ascorbato entre as regiões mais rostrais às caudais do SNC foi observado em duas espécies de tartarugas, *Trachemys scripta* e *Chrysemys picta*.

Na rã, contrariando os achados anteriores, a maior concentração de ácido ascórbico foi encontrada no tronco encefálico. Rice e Russo-Menna (1998) demonstraram, em uma série de vertebrados, que o teor de ascorbato é maior em neurônios do que em glia e que, portanto, regiões do SNC com maior densidade neuronal, como o córtex cerebral, apresentam elevada concentração desta molécula. Entretanto, sabe-se que os anfíbios não apresentam uma organização cortical bem definida, tal qual a laminação neocortical, o que provavelmente resulta em menor densidade de neurônios na região do prosencéfalo. O tronco encefálico, por sua vez, que nas rãs atua como um próprio centro retransmissor e integrador, local de

convergência de vias, reúne características estruturais e funcionais que demandam efetiva proteção antioxidante, à semelhança das regiões integradoras corticais dos mamíferos. Esta condição poderia explicar os maiores valores de ácido ascórbico encontrado no tronco encefálico destes animais.

Em um estudo prévio, realizado por Guedes et al. (2006) no Laboratório de Neurobiologia Comparada, foi demonstrado que entre o primeiro e o sétimo dias após a secção do nervo isquiático ocorrem alterações importantes nos sistemas antioxidantes, e mesmo dano oxidativo na medula espinal de ratos. Observando-se o desenvolvimento de hiperalgesia térmica nestes animais, constatou-se sua presença aos três e sete dias após a desnervação, mas não mais aos quinze dias. A hiperalgesia, medida por métodos como a placa quente (térmica) ou por filamentos de Von Frey (mecânica) é um dos mais importantes parâmetros para constatação da ocorrência de dor neuropática (Lambert et al., 2009; Menéndez et al., 2002). De acordo com os resultados obtidos nestas investigações, portanto, o presente trabalho estabeleceu os três e sete dias após a injúria nervosa para avaliar marcadores de estresse oxidativo, desta vez no encéfalo. E de fato, interessantes observações foram realizadas neste período, com marcantes diferenças entre rãs e ratos.

Em primeiro lugar, há de se observar a elevação da oxidação lipídica tanto em córtex cerebral, quanto em tronco encefálico de ratos. Esta lipoperoxidação marcante aos três dias após as cirurgias, nos grupos *sham* e desnervado, demonstra que a injúria aos tecidos, e não somente ao nervo, desencadeia a geração de EROs. Sobretudo em tronco encefálico, onde os valores de oxidação do grupo *sham* foram maiores do que o desnervado evidencia-se a sensibilidade do sistema redox a diferentes intensidades de estimulação aferente nociceptiva. Neste caso parece que a intensidade do estímulo nociceptivo desencadeou respostas protetoras proporcionalmente intensas, razão pela qual a injúria tecidual menos extensa sofrida pelos animais *sham* resultou em maior lipoperoxidação. Aos sete dias, entretanto, *sham* e desnervados apresentaram níveis basais de peroxidação lipídica, sendo que em córtex cerebral estes níveis eram ainda menores do que o grupo controle, possivelmente pela atuação mais efetiva do sistema de defesa antioxidante celular nesta região.

De fato, duas das enzimas antioxidantes estudadas tiveram um significativo acréscimo em sua atividade no córtex cerebral de ratos, em contrapartida ao aumento de apenas uma enzima no tronco encefálico. Em ambas as estruturas observou-se elevação da SOD, exclusivamente nos animais desnervados, tanto aos três como aos sete dias após a axotomia periférica. Consoante ao aumento da SOD em neocórtex foi a elevação da CAT aos três dias

após a desnervação. Sabe-se que uma intensa atividade da SOD resulta em incremento na concentração de peróxido de hidrogênio, o qual é substrato para ação da CAT, razão pela qual a atividade desta possa estar aumentada. Em medula espinal de ratos *sham* e desnervados, a lesão nervosa periférica desencadeou um quadro diferente (Guedes et al., 2006; 2008 e 2009). Estes autores relataram aumento na concentração de peróxido de hidrogênio já no primeiro dia após as intervenções nos grupos *sham* e desnervado, e redução gradativa ao longo do período experimental. Entretanto, as enzimas CAT (aos três e sete dias) e SOD (aos sete dias) tiveram suas atividades diminuídas, de modo que se sugeriu que a proteção antioxidante poderia ser conferida pela GPx, aumentada aos três dias, justamente quando os níveis de peróxido estavam em seu máximo. A partir destas comparações e dos resultados obtidos no presente trabalho observa-se que o encéfalo, e especialmente o córtex cerebral de ratos, possui diferente demanda de proteção antioxidante, daquela da medula espinal. Sua intensa taxa metabólica - cerca de 20% do oxigênio consumido pelo organismo - proporciona maior geração de EROs durante a cadeia fosforilativa e nas ações constantes de suas inúmeras enzimas, muitas delas oxidases (Halliwell e Gutteridge, 2007; Dringen, 2000). O alto conteúdo de lipídios poliinsaturados é um substrato vulnerável para o início de uma reação em cadeia promovida por EROs, que rapidamente oxidam membranas e geram mais EROs (Léwen *et al*, 2000). A lipoperoxidação tem sido relatada como o mais importante fenômeno causador de dano celular em consequência do estresse oxidativo. A membrana microssomal intracelular, quando rompida libera o cálcio armazenado, promovendo a ativação de enzimas cinases e fosfolipases cálcio-dependentes. A ruptura da membrana mitocondrial desestrutura a maquinaria para produção de energia aeróbia da célula inviabilizando o intenso metabolismo e sobrevivência da mesma (Hermes-Lima *et al*, 2001). O aumento da atividade de enzimas antioxidantes demonstrado no presente estudo provavelmente está indicando a mobilização deste sistema para evitar a ação dos agentes pró-oxidantes.

Esta outra demanda de proteção antioxidante do encéfalo, portanto, pode ser observada a partir do aumento nas atividades da SOD e CAT em ratos, após a desnervação. Além disso, o teor de ascorbato, embora não tenha apresentado diferenças significativas nos grupos e períodos experimentais estudados nesta espécie, demonstra uma tendência à elevação em sua concentração, o que poderia estar conferindo proteção adicional à lipoperoxidação observada em tronco encefálico e neocórtex, já que o ácido ascórbico atua como reciclador do radical tocoferoxila (forma da vitamina E após captura de elétrons de EROs durante a oxidação de lipídeos de membrana) (Fuzukawa, 2008). Entretanto, esperava-se observar a elevação nas concentrações de ascorbato no encéfalo dos ratos, como forma de

proteção à ação dos EROs gerados pela injúria nervosa e tecidual (animais *sham*), dado à demonstração da importância desta molécula no SNC (Harrison e May, 2009; Rice, 2000; Patra, 2001). Tais estudos mostram que ácido ascórbico tem vital importância em muitos organismos e, embora sua compartimentalização e locais de biossíntese sejam distintos entre as espécies, parece haver uma gradativa organização em sua produção, com o intuito de disponibilizar mais eficientemente esta molécula aos organismos que têm maiores demandas. A este respeito Arrigoni e Tullio (2002) sugerem que a transferência da maquinaria de síntese do ácido ascórbico, dos rins (em anfíbios e répteis), para um órgão de grande importância bioquímica como o fígado (em mamíferos) reflete uma maior necessidade destes últimos no emprego desta molécula em um ambiente atmosférico mais rico em oxigênio. Uma possível explicação para a constância nos valores de ascorbato no encéfalo de ratos, apesar da geração de EROs, é a existência de fortes mecanismos homeostáticos que mantêm as concentrações de ácido ascórbico no encéfalo e, especialmente, em neurônios em limites bastante estreitos (Harrison e May, 2009). Assim, tão difícil quanto a depleção desta molécula no SNC é a sua elevação, a não ser por curtos períodos de tempo até que o ajuste por mecanismos de recaptção e reciclagem recomponha as concentrações em seus valores basais. E de acordo com Rice (2000) e Harrison e May (2009) a magnitude dos valores basais de ácido ascórbico em neurônios (cerca de 10 mM) em relação ao interstício neuronal (200-400 μ M) e o plasma (30-60 μ M) parece garantir, se estritamente regulada, uma efetiva proteção às células do SNC.

A atividade da GST permaneceu constante nas diferentes estruturas estudadas no rato, tanto nos grupos *sham* quanto desnervado. Possivelmente nestes animais a atuação primordial desta enzima é na eliminação de compostos tóxicos, especialmente exógenos, razão pela qual a estimulação nociceptiva e decorrente geração de EROs, endogenamente, não provocou modificações em sua atividade.

Nas rãs, ocorreu acentuada lipoperoxidação em prosencéfalo (cerca de seis vezes maior que o controle) e tronco encefálico (cerca de uma e meia vez maior que os controles) após três dias da desnervação, com diminuição significativa aos sete dias, especialmente no tronco encefálico, o qual apresentou valores de peroxidação lipídica ainda menores do que o grupo controle. Diferentemente do que foi observado no rato, neste caso a maior lipoperoxidação não foi acompanhada pelo aumento na atividade da SOD, a qual diminuiu, nos animais controle e desnervados, em contrapartida. O processo de oxidação observado por quimioluminescência nos evidencia que houve aumento na geração de EROs. Ora, se a SOD diminuiu sua atividade frente a este quadro, pode-se inferir que maior concentração de radicais superóxido esteve circulante no meio intracelular, contribuindo para a formação de

novas EROs, o que explica a magnitude da oxidação ao lipídeos observada especialmente em prosencéfalo. Além disso, sabe-se que SOD e CAT atuam sinergisticamente, de modo que a ausência ou menor atividade de uma resulta em menor efetividade na atividade da outra (Kono e Fridovich, 1982). O ânion superóxido, quando não neutralizado pela SOD, tem ação inibitória sobre a atividade da CAT, formando rapidamente um complexo reversível com o grupamento heme, junto ao Fe^{+3} . Como a primeira reação da CAT é justamente reduzir uma molécula de peróxido utilizando o elétron do ferro, para formar Fe^{+4} , a reação não ocorre (Putnam *et al*, 2000; Kono e Fridovich, 1982). Tal processo pode explicar a constância na atividade da CAT, mesmo frente a maiores concentrações do ânion superóxido, e mesmo a tendência em diminuir sua atividade, que embora não verificada estatisticamente, pode ser observada nos dados referentes ao prosencéfalo.

Curiosamente, a atividade da GST em prosencéfalo de rãs diminuiu aos sete dias após a secção do nervo isquiático, fato que não foi observado em tronco encefálico e em nenhuma das estruturas estudadas no rato. Usualmente confere-se à enzima principalmente o papel de eliminação de xenobióticos, por meio da conjugação à glutatona. Entretanto, sabe-se que ela pode atuar também como peroxidase, eliminando peróxidos orgânicos. Alguns estudos mostram que a enzima é modulada, em diversos tecidos de anfíbios, em resposta a condições onde há geração de EROs, como a desidratação e o ciclo anoxia e reoxigenação (Malik e Storey, 2009; Hermes-Lima e Zenteno-Savin, 2002). Entretanto permanece a incerteza acerca de seu papel nestes quadros. Na maioria destes trabalhos observou-se elevação na atividade da GST em fígado, músculo esquelético, epiderme e encéfalo, porém decréscimo em rins e coração. A dificuldade em se estabelecer um vetor final de ação desta enzima em situações de estresse oxidativo pode estar relacionada à existência de subtipos de GST com ações particularmente distintas entre os diversos tecidos (Malik e Storey, 2009). Especificamente no presente trabalho, sugere-se que a redução na atividade da GST esteja relacionada à possível redução na disponibilidade de um de seus substratos, a GSH. A glutatona em sua forma reduzida é adicionada enzimaticamente pela GST a compostos diversos, conferindo-lhes maior solubilidade e usualmente menor toxicidade à célula, com a finalidade de eliminar tal substância do organismo (Sies, 1999). Embora não tenha sido medida a concentração de glutatona, a observação de dois outros parâmetros permite a inferência de sua diminuição, com consequente reflexo na atividade da GST. Em primeiro lugar houve um aumento significativo na concentração de ácido ascórbico aos sete dias após a desnervação. O ácido ascórbico, em sua atuação antioxidante, doa hidrogênios às moléculas radicais convertendo-se em dehidroascorbato, sua forma oxidada, a qual é novamente regenerada à ascorbato (forma

reduzida) pela GSH. Ademais, é importante observar que esta elevação no teor de ácido ascórbico ocorre em mesmo período onde há diminuição da GST, aos sete dias após a desnervação. Em segundo lugar, embora alguns estudos apontem para a participação majoritária da catalase na eliminação de peróxidos nos anfíbios, estes animais também contam com a atuação da GPx nesta tarefa. E esta é uma enzima que também emprega a GSH na redução de EROs, tornando-os moléculas menos reativas. Assim, é possível que a demanda pela GSH em outras vias antioxidantes resulte em menor disponibilidade à ação da GST, com evidente diminuição em sua atividade.

Uma molécula de baixo peso molecular demonstrou ter importante papel na defesa antioxidante em anfíbios: o ácido ascórbico. Sua concentração esteve aumentada aos sete dias após a desnervação, em prosencéfalo e tronco encefálico. Neste mesmo período houve redução significativa na elevada lipoperoxidação observada aos três dias, em prosencéfalo. Em tronco encefálico, onde também se observou o processo de oxidação lipídica após a secção nervosa, a redução nos valores de quimioluminescência foi ainda maior do que os do controle, aos sete dias. Aqui é interessante lembrar que os valores basais de ascorbato encontrados no tronco encefálico da rã foram superiores ao do prosencéfalo, o que possivelmente conferiu maior proteção à ação dos EROs sobre os lipídeos celulares.

Diferentemente do que se observou em ratos, cujas principais modificações frente à lesão nervosa periférica foram nas defesas antioxidantes enzimáticas, nas rãs esse papel coube ao ácido ascórbico. Como discutido a pouco, a manutenção dos valores basais de ascorbato no encéfalo de ratos não significa que tal molécula tenha menor importância na proteção antioxidante nestes animais, mas que possivelmente sua concentração já seja suficientemente elevada em neurônios e que intensa regulação não permita significativas flutuações nesta concentração. Contudo, o conhecimento de tais mecanismos homeostáticos de regulação do ácido ascórbico é baseado em trabalhos que empregam especialmente primatas e roedores. Em anfíbios, esta regulação ainda permanece desconhecida. O mecanismo de defesa antioxidante de anfíbios e répteis tem despertado grande interesse em razão de que certas condições climáticas e metabólicas que muitos destes animais normalmente enfrentam em seus habitats, como anoxia, congelamento e aclimação ao calor, resultam na formação de (Bagnyukova *et al*, 2003). No encéfalo de *Trachemys scripta elegans*, uma tartaruga tolerante a anoxia, encontrou-se teores de ácido ascórbico mais elevados do que em cérebro de roedores, especialmente em animais coletados no verão; mesmo naqueles animais obtidos no inverno, onde a taxa de biossíntese de ascorbato está diminuída, a concentração desta molécula ainda foi mais elevada (Pérez-Pinzon e Rice, 1995). Investigando o processo de biossíntese do ácido

ascórbico em hepatócitos de roedores, Bánhegyi et al. (1997) observaram que o principal precursor para a síntese *de novo* do ascorbato é o glicogênio. A estreita relação entre o metabolismo do glicogênio e a síntese do ácido ascórbico também fica evidente na constatação de que a enzima gulonolactona oxidase (etapa final da biossíntese de ascorbato) é expressa nos órgãos que armazenam glicogênio em abundância. Sabe-se que o encéfalo de anfíbios possui altos níveis de glicogênio, cerca de seis a nove vezes maiores do que as concentrações encontradas em ratos, e que em sapos estes valores variam ao longo das estações do ano (McDougal *et al*, 1967). Neste sentido, Farrar e Dupre (1983) observaram a duplicação do estoque de glicogênio em diversos tecidos de *Rana catesbeiana* pouco antes do período de dormência, que ocorre durante o inverno. Considerando tais evidências, pode-se relacionar o aumento peculiar nos valores de ácido ascórbico nas rãs, frente à injúria nervosa periférica, decorrente do considerável estoque de glicogênio característico desta classe de animais, o qual é precursor primário para a biossíntese de ácido ascórbico. Cabe lembrar, ademais, que as rãs foram obtidas durante o outono, justamente no período de pré-dormência.

Esta suposta facilidade na obtenção de substrato para biossíntese de ácido ascórbico possivelmente não é a única razão para seu aumento no encéfalo das rãs desnervadas. Considerando que a elevação foi observada somente após sete dias da secção do isquiático, talvez tenha ocorrido maior inserção de transportadores SVCT (principal transportador de ácido ascórbico em animais) nas membranas celulares, fator limitante para o influxo desta molécula em neurônios, visto que tais transportadores operam usualmente saturados (Harrinson e May, 2009). Embora no presente trabalho tenham se estudado as regiões encefálicas dos animais, provavelmente a desnervação periférica e a geração de EROs resultante tenha tido efeitos sobre outros sistemas orgânicos, como fígado e rins, que nos anfíbios são os responsáveis pela formação do ácido ascórbico. Neste sentido, outra razão para o seu aumento seria o fato de que a maior geração de EROs e conseqüente consumo de estoques de GSH em hepatócitos (órgão de síntese de ácido ascórbico) estimularia a atividade da enzima gulonolactona oxidase, responsável pela última etapa da biossíntese da vitamina C (Bánhegyi et al, 1997). Estes pesquisadores observaram ainda que grandes quantidades de glutatona em sua forma oxidada formaram complexos com a enzima glicogênio sintetase, inibindo-a, e a decorrente quebra do glicogênio (em detrimento à síntese) também promoveu incremento na síntese de ácido ascórbico em células que contém a gulonolactona oxidase (fígado e rins). Assim, torna-se necessária a determinação dos teores de ácido ascórbico em fígado e rim de rãs submetidas à secção nervosa periférica para melhor compreensão dos

mecanismos envolvidos no acréscimo desta molécula em regiões encefálicas destes animais nessa condição experimental.

Assim, os resultados do presente trabalho demonstram, portanto, primeiramente que a injúria nervosa periférica modifica as defesas antioxidantes no encéfalo de rãs e ratos, bem como desencadeia a geração de EROs e decorrente lipoperoxidação, fato que não foi exclusivo da lesão nervosa, mas também da injúria tecidual sofrida pelos animais *sham*. Neste contexto, cabe reinterar sobre alguns mecanismos pelos quais as EROs contribuem para o desenvolvimentos de anormalidades na transmissão nociceptiva e conseqüente quadro de dor neuropática. A injúria dos tecidos conjuntivo e nervoso durante a secção de nervo periférico resulta em resposta inflamatória local, com recrutamento de células do sistema imune e ação de enzimas inflamatórias, todos os quais geram EROs (Ma e Quirion, 2008; Khalil *et al*, 1999). A injúria nervosa ainda resulta em ativação de receptores NMDA, em neurônios desde a medula espinal até regiões superiores do neuroeixo, com conseqüente aumento de cálcio intracelular, ativação da proteína cinase C e produção de óxido nítrico. A combinação deste com EROs locais resulta na formação de peroxinitrito, ao qual se atribui a responsabilidade por um aumento persistente na sensação dolorosa (Gao *et al*, 2007). Ainda, estudos relatam um aumento na taxa metabólica nas células injuriadas e adjacentes, o que significa maior atividade mitocondrial e, portanto, maior geração de EROs. Muitas das enzimas do metabolismo celular normal são oxidases, o que também contribui para o montante de radicais livres (Vetter *et al*, 2001).

Em segundo lugar, observou-se que em geral tronco encefálico e córtex cerebral apresentam um perfil de respostas ao estresse oxidativo e defesas antioxidantes semelhantes, porém com algumas diferenças, sobretudo quanto ao grau de lipoperoxidação. Por fim, foi possível observar marcantes diferenças entre ratos e rãs quanto ao recrutamento de defesas no combate aos EROs gerados. Desta forma, tanto ratos como rãs são excelentes modelos experimentais para o estudo da nocicepção periférica e central, porém no emprego de cada uma delas devem ser consideradas as características dos parâmetros oxidativos e antioxidantes característicos do tecido nervoso de cada uma delas.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados do presente trabalho pode-se concluir que a injúria nervosa periférica, como modelo de dor neuropática, desencadeia alterações em parâmetros de estresse oxidativo no encéfalo de rãs e ratos, entre os três e sete dias após a cirurgia.

Em ratos, a principal resposta observada foi o aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, tanto em córtex cerebral como em tronco encefálico exclusivamente nos animais submetidos à secção do nervo isquiático. O processo de oxidação lipídica, entretanto, pode ser observado também nos animais *sham*, razão pela qual se conclui que o sistema redox, no que tange à lipoperoxidação, é sensível a diferentes intensidades de estimulação nociceptiva.

Em rãs, a injúria nervosa periférica desencadeou respostas bastante distintas daquelas encontradas em ratos. A diminuição nas atividades de defesas antioxidantes enzimáticas, SOD e GST, pode ter sido uma das prováveis causas da maior lipoperoxidação inicial observada no encéfalo destes animais. Entretanto, esta maior vulnerabilidade inicial à oxidação lipídica foi revertida aos sete dias, justamente quando se observou um significativo acréscimo na concentração de ácido ascórbico no encéfalo das rãs.

Portanto, este trabalho vem a corroborar sobre o envolvimento das EROs no processamento da informação nociceptiva e que as defesas antioxidantes ao longo do neuroeixo são distintas frente a injúria nervosa periférica. Além disso, foi possível verificar que em ratos e rãs, animais oriundos de pontos diversos da escala evolutiva, as respostas protetoras antioxidantes de cada um também o são, fato que instiga à continuidade do estudo comparativo buscando conhecer as modificações nas defesas antioxidantes ao longo da evolução das espécies.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **125**:121-126
- Arrigoni, O.; Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: much more than an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1569 (1-3), 1-9.
- Ashburn, M. A.; Staats, P. S. (1999). Management of chronic pain. *The Lancet*, **353**, 1865-69.
- Bagnyukova, T. V.; Storey, K. B.; Lushchak, V. I. (2003). Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. *J. of Thermal Biology*, 28 (1), 21-28.
- Bánhegyi, G.; Braun, L.; Csala, M.; Puskás, F.; Mandl, J. (1997). Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radical Medicine & Biology*, 23 (5), 793-803.
- Basbaum, A. I.; Jessel, T. M. (2000). The perception of pain. In: Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessel, T. M. (eds). *Principles of neural science*, McGraw-Hill, 4ª ed.
- Baud, O.; Greene, A. E.; Li, J.; Wang, H.; Volpe, J. J.; Rosenberg, P. A. (2004). Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *The J. of Neurosc.*, 24 (7), 1531-1540.
- Bonica, JJ.; Loeser, JD. (2001). History's of pain concepts and therapies. In: Loeser, J. D.; Butler, S. H.; Chapman, R.; Turk, D. C. (eds). *Bonica's management of pain*. Lippincott Williams & Wilkins, 3-25.
- Brooks, J.; Tracey, I. (2005). From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *J. Anat.*, **207**, 19-33.
- Campbell, W. W. (2009). Evaluation of peripheral nerve injury. *Eur. J. Pain Sup.*, **3**, 37-40.
- Carvalho, W. A.; Lemonica, L. (1998). Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor. Atualização terapêutica. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 48 (3), 221-241.
- Costigan, M.; Scholz, J.; Samad, T.; Woolf, C. J. (2006). Pain. In: Siegel, G. J.; Albers, R. W.; Brady, S. T.; Price, D. L (eds). *Basic Neurochemistry*, Academic Press, 7ª ed., 928-937.
- Dicke, U.; Roth, G. (2007). Evolution of the amphibian nervous system. In: Kaas, J. H. (ed). *Evolution of nervous systems*. Academic Press, vol. 2, 61-124.
- Dieleman, J. P.; Kerklaan, J.; Huygen, F. J. P. M.; Bouma, P. A. D.; Sturkenboom, M. C. J. M. (2008). Incidence rate and treatment of neuropathic pain conditions in the general population. *Pain*, 137 (3), 681-68.

- Dowdall, T.; Robinson I.; Meert, T. (2004). Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharm., Biochem. Behav*, **80**, 93-108.
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress Neurobiol.*, **62** (6), 649-671.
- Dringen, R.; Gutterer, J.; Hirrlinger, J. (2000). Glutathione metabolism in brain. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4912-4916.
- Farrar, E; Dupre, K. (1983). The role of diet on glycogen storage by juvenile bullfrog prior to overwintering. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, **75** (2), 255-260.
- Fridovich, I. (1975). Superoxido dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 147-159.
- Fridovich, I.; Misra. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The J. of Biol. Chem.*, **247** (10): 3170-3175.
- Fuzukawa, K. (2008). Dynamics of lipid peroxidation and antioxidant a alfa-tocoferol in membranes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **54**, 273-285.
- Gao, X.; Kim, H. K.; Chung, J. M.; Chung, K. (2007). Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animals models of pain. *Pain*, **131** (3), 262-271.
- Garry, E. M.; Jones, E.; Fleetwood-Walker, S. M. (2004). Nociception in vertebrates: key receptors participating in spinal mechanisms of chronic pain in animals. *Brain Res. Rev.*, **46**, 216-224.
- Gonzalez-Flecha, B.; Llesuy, S.; Boveris, A. (1991). Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Rad Biol Med*; **10**: 41-47.
- Gregory, E. M.; Fridovich, I. (1973). Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. *J. Bacteriol.*, **114** (3), 1193-1197.
- Guedes, R. P.; Araujo, A. S. R.; Janner, D.; Belló-Klein, A.; Ribeiro, M. F. M.; Partata, W. A. (2008). Increase in Reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **28**, 1049-1056.
- Guedes, R. P.; Dal Bosco, L., Araujo, A. S. R.; Belló-Klein, A.; Ribeiro, M. F. M; Partata, W.A. (2009). Sciatic nerve transection increases glutathione antioxidant system activity and neuronal nitric oxide synthase expression on spinal cord. *Brain Res. Bull.*, **80** (6), 422-427.
- Guedes, R. P.; Dal Bosco, L., Teixeira, C. M.; Araujo, A. S. R.; Llesuy, S.; Belló-Klein, A.; Ribeiro, M. F. M; Partata, W.A. (2006). Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. *Neurochem. Res.*, **31**, 603-609.
- Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W.B. (1974). Glutathione s-transferases. The first enzymatic in mercapturic acid formation. *The J. of Biol. Chem.*, **249** (22): 7130-7139.

- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen espécies and the central nervous system. *J. of Neurochem.*, 59 (5), 1609-1623.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (2007). Free radicals in biology and medicine. 4^a ed., Oxford University Press, 851 p.
- Harrison, F.; May, J. (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 719-730.
- Hermes-Lima, M.; Storey, J. M.; Storey, K. B. (2001). Antioxidants defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. *Cell and Molecular Response to Stress*, 2, 263-827.
- Hermes-Lima, M.; Zenteno-Savin, T. (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 133 (4), 537-556.
- Ishibashi, N.; Prokopenko, O.; Weisbrodt-Lefkowitz, M.; Reuhl, K.; Mirochnitchenko, O. (2002). Glutathione peroxidase inhibits cell death and glial activation following experimental stroke. *Mol. Brain Res.*, 109 (1-2), 34-44.
- Khalil, Z.; Liu, T.; Helme, T. (1999). Free radicals contribute to the reduction in the peripheral vascular responses and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury. *Pain*, 79, 31-37.
- Kavaliers, M. (1988). Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res. Bull.*, 21, 923-931.
- Kim, H. K.; Park, S. K.; Zhou, J. L.; Taghialatela, G.; Chung, K.; Coggeshall, R. E.; Chung, J. M. (2004). Reactive oxygen species play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 111 (1-2), 116-124.
- Klusáková, I; Dubový, P. (2009). Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries – An anatomical perspective. *Ann. Anat*, 191, 248-259.
- Kono, Y.; Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 257 (10), 5751-5754.
- Lewén, A.; Matz, P.; Chan, P. H. (2000). Free radical pathways in CNS injury. *J. of Neurosci.*, 17 (10), 871-890.
- Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Rojas, C., Cedenas, S. and Barja de Quiroga, G. (1993). Simultaneous induction of SOD, glutathione reductase, GSH and ascorbate in the liver and kidney with survival during aging. *Free Radic. Biol. Med.* 15, pp. 133–142.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Ma, W.; Quirion, R. (2008). Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain? *Neuroscience Letters*, 437 (3), 165-169.

- Machin, K. L.; D. V. M; M. Sc. (1999). Amphibian pain and analgesia. *J. of Zoo and Wildlife Medicine*, 30 (1), 2-10.
- Malik, A. D.; Storey, K. B. (2009). Activation of antioxidant defense during dehydration stress in the African clawed frog. *Gene*, 442 (1-2), 99-107.
- McDougal, D. B.; Holowach, J.; Howe, M.C.; Jones, E. M.; Thomas, C. A. (1968). The effects of anoxia upon energy sources and selected metabolic intermediates in the brains of fish, frog and turtle. *J. of Neurochem.*, 15, 577-588.
- Merskey, H.; Bogduk, N. (eds) (1994). Pain Terms, a current list with definitions and notes on usage. In: *Classification of chronic pain*, 2^a ed., IASP Task Force on Taxonomy, IASP Press, 209-214.
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progr. Neurobiol.*, 57, 1-164.
- Mruk, D. D.; Silvestrini, B.; Mo, M.; Cheng, C. Y. (2002). Antioxidant superoxide dismutase – a review: its function, regulation in the testis and role in the male fertility. *Contraception*, 65, 305-311.
- Narita, M.; Osaki, S.; Yse, I.; Yajima, I.; Suzuki, T. (2003). Change in the expression of c-Fos in the rat brain following sciatic nerve ligation. *Neurosc. Letters*, 352 (3), 231-233.
- Newman, L. C.; Wallace, D. R.; Stevens, C.W. (2000). Selective opioid agonist and antagonist competition for [³H]-naloxone binding in amphibian spinal cord. *Brain Res.*, 884, 184-191.
- Nishikawa, M.; Haschida, M.; Takakura, Y. (2009). Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61 (4), 319-326.
- Northcutt, R. G. (1981). Evolution of the telencephalon in nonmammals. *Annu. Rev. Neurosci.*, 4, 301-350.
- Oliveira, L. M.; Silva, L. F. S. (2009). Mecanismos neurais e modulação da dor. In: Neto, O. A. et al (org). *Dor, princípios e prática*, Artmed, 235-246.
- Pankova, N. B. (2009). Changes in spectral measures of brain electrical activity in rats after transection of the sciatic nerve. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 39 (2), 133-139.
- Pasero, C. (2004). Pathophysiology of neuropathic pain. *Pain Management Nursing*, 5 (1), 3-8.
- Patra, R.C.; Swarup, D.; Dwivedi, S. K. (2001). Antioxidant effects of alfa-tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain rats. *Toxicol.*, 162, 81-88.
- Pérez-Pinzón, M.; Rice, M. (1995). Seasonal- and temperature-dependent variation in CNS ascorbate and glutathione levels in anoxia tolerant turtles. *Brain Res.*, 705, 45-52.
- Pough, F. H. (1989). Amphibians, a rich source of biological diversity. In: Woodhead, A. D. (ed). *Nonmammalian animal models for biomedical research*. CR Press, 245-278.

- Putnam, C.; Arvai, A.; Bourne, Y.; Tainer, J. (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.*, **296**, 295-309.
- Ribeiro, S. M. R.; Queiroz, J. H.; Pelúzo, M. C. G.; Costa, N. M. B.; Matta, S. L. P.; Queiroz, M. E. L. R. (2005). A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci. J.*, **21** (3), 133-149.
- Rice, M. E. (2000). Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.*, **23**, 209-216.
- Rice, M. E.; Russo-Menna, I. (1998). Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neurosci.*, **82** (4), 1213-1223.
- Rizzo, A. M.; Adorni, L.; Montorfano, G.; Rossi, F.; Berra, B. (2006). Antioxidant metabolism of xenopus laevis embryos during the first days of development. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, **146**, 94,100.
- Robinson, L. R. (2000). Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*, **23** (6), 863-873.
- Roe, J. H.; Kuether, C.A. (1942). The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *The J. of Biol. Chem.*, 399-407.
- Saadé, N. E.; Jabbur, S. J. (2008). Nociceptive behavior on animal models for peripheral neuropathy: spinal and supraspinal mechanisms. *Prog. in Neurobiol.*, **86**, 22-47.
- Sauberlich, H. E. (1994). Pharmacology of vitamin C. *Annu. Rev. Nutr.*, **14**, 371-391.
- Schotland, J. L.; Tresch, M. C. (1997). Segmental and propriospinal projections systems of frog lumbar interneurons. *Exp. Brain Res.*, **116**, 283-298.
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biol. Med.*, **27** (9-10), 916-921.
- Smith, E. S. J.; Lewin, G. R. (2009). Nociceptors: a phylogenetic view. *J. Comp. Physiol. A*, **195**, 1089-1106.
- Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical modelo or a biological reality? *C. R. Biologies*, **327**, 649-662.
- Stevens, C. W. (2004). Opioid research in amphibians: na alternative pain model yielding insights on the evolution of opioid receptors. *Brain Res. Rev.*, **46**, 204-215.
- _____ (1992). Alternatives to the use of mammals for pain research. *Life Sciences*, **50**, 901-912.
- Tachibana, K.; Kato, R.; Tsuruga, K.; Takita, K.; Hashimoto, T.; Morimoto, Y. (2008). Altered synaptic transmission in rat anterior cingulated cortex following peripheral nerve injury. *Brain Res.*, **1238**, 53-58.

Teixeira, M. J. (2003). Fisiopatologia da dor neuropática. In: Teixeira, M. J. (ed). Dor – contexto interdisciplinário, Editora Maio, 155-169.

Tracey, I. (2005). Nociceptive processing in the human brain. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **15**, 478-487.

Vetter, G.; Geisslinger, G.; Tegeder, I. (2001). Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E2 and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation. *Pain*, 92 (1-2), 213-218.

Zangar, R. C.; Davydov, D. R.; Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied pharmacology*, **199**, 316-331.

Zimmermann, M. (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, **429**, 23-37.

Zwart, L. L.; Meerman, J. H. N.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in human. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (1/2), 202-226.