

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

**IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA c-FOS NA MEDULA
ESPINAL LOMBOSSACRAL E NO GÂNGLIO DA RAIZ
DORSAL DE RÃS *Rana catesbeiana* 3 DIAS APÓS A
SECÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DANIELE ROSSATO

Porto Alegre, 2006

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

**IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA c-FOS NA MEDULA
ESPINAL LOMBOSSACRAL E NO GÂNGLIO DA RAIZ
DORSAL DE RÃS *Rana catesbeiana* 3 DIAS APÓS A
SECÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

DANIELE ROSSATO

Orientadora
Profª Drª Wania Aparecida Partata

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

Porto Alegre, 2006

Dedico este trabalho à minha avó Jandira Maria Feltrin Sachett (*in memoriam*), por ter torcido tanto por mim e por ter me ensinado *que é pelo amor que vale a vida*.

***“...Um brinde ao que está sempre
nas nossas mãos:
a vida inédita pela frente
e a virgindade dos dias que virão!”***

(Elisa Lucinda)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Wania Aparecida Partata, pelo carinho, paciência e sobretudo por ser exemplo de dedicação e competência.

Aos meus queridos pais Rubens e Neda Rossato, por tanto amor, carinho e incentivo, mas sobretudo por me ensinarem a sonhar e lutar pelos meus sonhos. Meu eterno agradecimento.

Ao meu irmão Felipe, pela força.

À Prof^a. Dr^a. Maria Flávia, pela colaboração na realização da técnica de Western Blot.

À Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval pelo empréstimo dos materiais e equipamentos dos laboratórios de Histofisiologia Comparada e Análise de Imagens – Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde - UFRGS .

À Prof^a Dr^a Adriane Belló-Klein pelo empréstimo do anticorpo para c-Fos para a realização da técnica de Western Blot.

Ao Prof. Dr. Leder Xavier, pelo auxílio na realização da densitometria óptica.

A todos os professores deste programa de Pós Graduação pelos ensinamentos.

À Suzi Alves Camey e Gilberto Pereira Mesquita, pelo auxílio na análise estatística.

Ao Reni Volmir dos Santos, pelo ombro amigo sempre à disposição e por me incentivar a entrar neste programa de pós-graduação.

Aos queridos colegas de laboratório: Renata (pelo auxílio na realização da técnica de Western Blot e pelo empréstimo de materiais), Denise (pelo disponibilização do scanner e pelas “limpezas de chaminé”), Luciano, Gabriela e Malcon.

Às alunas bolsistas Camila e Lidiane.

À todos os colegas do Programa de pós graduação em Neurociências pela convivência e divisão de conhecimentos.

Às minhas amigas do peito: Fernanda Dal'Maso, Laura dos Santos e Fabrícia Hoff, que sempre me incentivaram e torceram por mim.

Ao amigo Maicol Marsílio, pela ajuda *on line* quando meu computador insistiu em não colaborar 48 horas antes da entrega do trabalho.

À todos os meus amigos que sempre me incentivaram.

À CAPES, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dor e Nocicepção	1
1.2 Estudos experimentais	3
1.3 Mecanismos de transmissão nociceptiva	6
1.4 Organização da medula espinal em anfíbios	9
1.5 Genes precocemente expressos	13
1.6 Hipótese de trabalho	25
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Animais: procedência e manutenção	28
3.2 Teste do ácido acético	29
3.3 Desnervação periférica	32
3.4 Obtenção do tecido nervoso	35
3.5 Procedimento imunohistoquímico	37
3.6 Densitometria óptica	39
3.7 Número de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos	41
3.8 Western Blot	42
3.9 Quantificação das proteínas	43
3.10 Análise estatística	43
4 RESULTADOS	45
4.1 Teste do ácido acético	45
4.2 Imunorreatividade à proteína c-Fos	49
4.3 Número de neurônios imunorreativos ao c-Fos	64
4.4 Densitometria óptica dos gânglios das raízes dorsais	65
4.5 Western Blot	68

5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÃO	84
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

RELAÇÃO DE FIGURAS

Fig 1 - O Conceito de Descartes sobre a dor.	2
Fig 2 - Representação esquemática de uma secção coronal de medula espinal de rã <i>Rana catesbeiana</i> .	10
Fig 3 - Representação esquemática de uma hemiseção da medula espinal de rã <i>Rana catesbeiana</i> .	12
Fig. 4 - Regulação da expressão gênica de c-Fos por estímulos exógenos.	15
Fig. 5 - Transdução nuclear de c-fos e c-jun.	17
Fig. 6 - Anfíbio da espécie <i>Rana catesbeiana</i> em condições ambientais prévias ao experimento.	29
Tabela 1 -Concentrações de ácido acético empregadas no teste químico do limiar nociceptivo de rãs.	30
Fig. 7 - Seqüência de eventos para a realização do teste químico do Ácido Acético.	32
Fig. 8 - Seqüência de eventos para a realização da secção do nervo ciático de rã <i>Rana catesbeiana</i>	34
Fig. 9 - Seqüência de eventos para a realização de perfusão intracardíaca em rã <i>Rana catesbeiana</i> .	36
Tabela 2 - Variabilidade das respostas das rãs controle, sham e desnervadas ao teste químico do ácido acético durante o período experimental considerado.	47
Fig. 10 - Resposta das rãs ao teste do ácido acético aplicado na pata ipsilateral à lesão nos períodos de 0, 1 e 3 dias após a secção do nervo ciático.	48

- Fig. 11** - Imunorreatividade à proteína c-Fos em citoplasma e núcleos de neurônios de gânglio da raiz dorsal ipsilateral à lesão de rãs *Rana catesbeiana* 3 dias após a secção do nervo ciático. **52**
- Fig. 12** - Imunorreatividade à proteína c-Fos em citoplasma de neurônios de gânglio da raiz dorsal contralateral à lesão de rãs *Rana catesbeiana* 3 dias após a secção do nervo ciático. **54**
- Fig. 13** - Fotomontagem da medula espinal lombossacral de rã *Rana catesbeiana*, controle, mostrando a presença de imunorreatividade à proteína c-Fos em núcleos (setas) celulares localizados nas regiões dos funículos dorsal (FD), lateral (FL) e ventral (FV), nos campos terminais dorsal (CTD) e ventral (CTV), na banda mediolateral (BML) e no corno ventral (CV). **56**
- Fig. 14** - Imunorreatividade à proteína c-Fos em núcleos de células localizadas na região do campo terminal dorsal de medula espinal de rãs *Rana Catesbeiana* controle (A), *sham* (B) e desnervada (C). **58**
- Fig. 15** - (A) Imunorreatividade à proteína c-Fos em núcleos de neurônios motores localizados lateralmente no corno ventral da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* controle. (B) Detalhe em maior aumento dos núcleos de neurônios motores do corno ventral espinal imunorreativos à proteína c-Fos. **60**
- Fig. 16** - Imunorreatividade à proteína c-Fos em núcleos de células localizadas nos funículos: (A) lateral (FL) e (B) Ventromedial (FVM) da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* controle. **62**
- Fig. 17** - Número de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos em gânglios das raízes dorsais, localizados ipsilateral (IPSI) e contralateral (CONTRA) à injúria periférica, de rãs *Rana catesbeiana* controle (CT) e submetidas a manipulação do nervo ciático e a secção deste nervo. **64**
- Fig. 18** - Densitometria óptica da imunorreatividade à proteína c-Fos localizada no citoplasma de células do GRD de rãs *Rana catesbeiana* controle (CT) e submetidas a manipulação do nervo ciático (S) e a secção deste nervo (D). **66**
- Fig. 19** - Densitometria óptica da imunorreatividade à proteína c-Fos localizada no núcleo de células do GRD de rãs *Rana catesbeiana* controle (CT) e submetidas a manipulação do nervo ciático (S) e a secção deste nervo (D). **67**
- Fig. 20** - Expressão da proteína c-Fos em medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* em estado basal (CT) e após a manipulação do nervo ciático (S) e a secção do mesmo (D). **68**

LISTA DE ABREVIATURAS

A δ - fibras A delta

A.A. - Ácido acético

B - Intensidade gerada quando nenhuma luz passa através do material

BG _(x,y) - Intensidade de fundo em um determinado pixel

Ca⁺ - Ion Cálcio

CGRP - Peptídeo Relacionado com o Gene da Calcitonina

DAB - Diaminobenzidina

DNA - Ácido desoxiribonucleico

Fos-ir - Imunorreativo à c-Fos

GABA - Ácido Gama - Aminobutírico

GRD - Gânglio da raiz dorsal

GRDs - Gânglios das raízes dorsais

I - Intensidade máxima de luz incidental

IEG - Gene Precocemente Expresso

IT _(x,y) - intensidade em um determinado pixel da área analisada

NADPH-diaforase - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Diaforase

NMDA - N-Metyl-D-Aspartato

NOS - Óxido Nítrico Sintase

mRNA - Ácido Ribonucléico Mensageiro

OD - Densidade óptica

PAP- Peroxidase Antiperoxidase

PBS - Tampão Fosfato Salino

PBS-T - Triton X-100 diluído em PBS

SN - Sistema Nervoso

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP- Sistema Nervoso Periférico

TP - tampão fosfato 0.1M pH7,4

TBS - Tampão tris

TTBS - tampão tris acrescido de Tween

RESUMO

A dor constitui uma experiência complexa, mediada por distintos sistemas de transmissão sendo integrados por diversos mecanismos neurais. Um dos modelos mais empregados para o estudo da dor neuropática é a secção nervosa periférica, a qual resulta em alterações neuroquímicas e neuroanatômicas em neurônios sensoriais primários e em seus territórios de projeção. Após a secção do nervo ciático, os mamíferos apresentam um aumento na expressão de genes precocemente expressos, como o c-Fos e o c-Jun, no corno dorsal da medula espinal. Animais não mamíferos, como os anfíbios, também vem sendo utilizados como modelos para os estudos dos mecanismos acerca da nocicepção.

No presente estudo foi analisado o padrão de imunorreatividade à proteína c-Fos na medula espinal lombossacral e no gânglio da raiz dorsal (GRD) de rãs *Rana catesbeiana* em condições basais, bem como de rãs submetidas à manipulação e à secção do nervo ciático. Para isso foram utilizados animais adultos, de ambos os sexos, sendo que os mesmos foram sacrificados 3 dias após o procedimento cirúrgico. A técnica imunoistoquímica utilizada foi a do anticorpo não marcado de Sternberger (1979), sendo utilizado anticorpo primário do tipo

policlonal, na concentração de 1:700. As alterações no padrão de imunorreatividade a esta proteína no GRD dos três grupos experimentais foram quantificadas através das técnicas de densitometria óptica e contagem neuronal. Para a quantificação da proteína c-Fos na medula espinal lombossacral dos 3 grupos experimentais, utilizou-se a técnica de western blot.

Em GRD, a imunorreatividade foi mais pronunciada no citoplasma de neurônios de pequeno (10-20 μ m), médio (25-35 μ m), e grande 40-50 μ m) diâmetro dos 3 grupos experimentais. A manipulação e a secção do nervo ciático provocou aumento no número de núcleos imunorreativos de células de pequeno diâmetro. A densitometria óptica foi significativamente maior no citoplasma das células dos GRDs localizados ipsilateralmente quando comparada com aquela das células pertencentes aos GRDs localizados contralateralmente à lesão. Todavia, não houve diferenças estatisticamente significativa entre a imunorreatividade nuclear nos GRDs entre os 3 grupos experimentais. O número de células imunorreativas nestes gânglios não mostrou mudanças significativas nos 3 grupos experimentais.

Na medula espinal, a imunorreatividade à proteína c-Fos ocorreu predominantemente em núcleos localizados nos campos terminais dorsal e ventral, na banda mediolateral, na região ventral medial do corno ventral e nos funículos lateral e ventral medial. Os neurônios motores sempre foram imunorreativos. A manipulação e a secção do nervo ciático resultaram em um acréscimo no número de núcleos imunorreativos localizados nos campos terminais

dorsal e ventral, e banda mediolateral, sendo este aumento maior na região do campo terminal dorsal. As demais regiões não mostraram modificações significantes no padrão de imunorreatividade da proteína c-Fos. A expressão desta proteína não modificou significativamente nos 3 grupos experimentais.

Estes resultados mostram que, em rãs, similar ao que ocorre em mamíferos, a ativação de fibras aferentes primárias ativam a proteína c-Fos. No entanto, diferente de mamíferos, esta proteína ocorre no citoplasma de células sensoriais. Assim, apesar das rãs constituírem excelentes modelos para o estudo do papel do c-Fos nos mecanismos da transmissão nociceptiva, os estudos futuros abordando esta questão deverão considerar esta particularidade das rãs.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Dor e Nocicepção

A dor tem sido um tema de grande interesse para a humanidade desde o início dos tempos, sendo alvo de esforços onipresentes para entendê-la e controlá-la. Nas sociedades antigas, a dor, sem outra causa aparente, como o traumatismo, era atribuída à invasão do corpo por maus espíritos ou como punição dos deuses (LOESER & BONICA, 2001). Desde 1980, mas principalmente após 1990, ocorreram enormes avanços em relação ao entendimento das interações celulares, neuroplasticidade e mecanismos moleculares do sistema nervoso em geral. Muitos dos mecanismos que estão presentes em aspectos como nocicepção aguda, inflamação crônica e dor neuropática foram melhores entendidos (BYERS & BONICA, 2001). Historicamente, uma clássica pintura de Descartes sobre a dor auxiliou os primeiros anatomistas e neurofisiologistas na descoberta de como a dor é traduzida e transmitida à medula espinal e ao córtex (Fig. 1).



Fig. 1 - O Conceito de Descartes sobre a dor. Com grande perspicácia, ele escreveu: “Se, por exemplo, o fogo (A) estiver próximo ao pé (B), diminutas partículas deste fogo, as quais você sabe que se locomovem em grande velocidade, tem o poder de colocar em movimento o local da pele do pé onde elas tocam e por esta via estimular a delicada trilha à qual está ligada a este local da pele. Neste mesmo instante, elas abrem o poro que bloqueia o delicado término da trilha, como o puxar da ponta de uma corda permite, no mesmo instante, atingir um sino que está pendurado no término da mesma.” (retirado de LOESER et al., 2001).

Ao se iniciar um estudo sobre a dor, é de extrema importância diferenciar a terminologia empregada. Dor é a percepção das sensações tão diversas quanto a irritação, inflamação, ardência ou latejar, geralmente sensações oriundas de alguma parte do corpo, tratando-se assim de uma experiência desagradável (BEAR et al., 2002). A dor também trata-se de uma sensação de caráter subjetivo, sendo assim, relacionada somente a humanos, os quais possuem capacidade de verbalizá-la (MILLAN,1999; LOESER et al.,2001). A dor foi conceituada, em 1986, pela International Association for the Study of Pain (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável que é associada a lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões”.

Entretanto, nocicepção é o processo sensorial que provê sinais que desencadeiam a experiência da dor. Refere-se aos mecanismos pelos quais a dor é transmitida ao sistema nervoso central (SNC) (LOESER et al., 2001). A ativação seletiva dos nociceptores desencadeia a experiência consciente de dor.

A dor, tanto em mamíferos quanto em não mamíferos, compreende um conjunto de efeitos gerados por mecanismos bioquímicos, fisiológicos e psicológicos simultâneos, os quais desencadeiam atividades em vários centros do sistema nervoso, onde ocorrem os processamentos sensoriais, motivacionais e cognitivos (LOESER et al., 2001; JULIUS & BASBAUM, 2001).

1.2. Estudos Experimentais

O desenvolvimento de modelos animais, associados à estudos clínicos e moleculares, tem sido de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos patológicos de uma vasta gama de doenças. Estudos acerca da dor e analgesia em animais tornam-se necessários para o entendimento das interações entre SNC e SNP (sistema nervoso periférico) e seus efeitos sobre o comportamento *in vivo* (LOESER et al., 2001). A dor crônica (incluindo dor neuropática) tem sido um tema de considerável interesse para a pesquisa, pois engloba inúmeros fatores, tanto fisiológicos quanto psicológicos e sociais. Em

humanos, além dos achados clássicos como hiperalgesia e alodinia, outros fatores não menos importantes são encontrados, como distúrbios nas relações sociais e familiares, distúrbios do sono, redução do apetite, disfunções metabólicas, endócrinas e sexuais, redução na habilidade de concentração, perda do interesse por estímulos externos, podendo ocasionar também depressão moderada ou severa (KEAY et al., 2004), o que torna o estudo da dor um tema de grande interesse em neurociências. Para a compreensão destes mecanismos nociceptivos são amplamente utilizados os modelos animais. Inúmeros estudos acerca da dor tem sido realizados em mamíferos visando a compreensão dos mecanismos envolvidos na codificação e transmissão da dor em humanos (SNELDON, 2004). Embora não possuam comunicação verbal, estes animais exibem respostas motoras similares ao comportamento motor humano quando em contato com estímulos nociceptivos, os quais permitem inferir a existência de dor (DUBNER, 1983; KAVALIERS, 1988; LOESER et al., 2001). De acordo com Sneldon (2004), outros modelos de animais vertebrados não mamíferos podem e vem sendo utilizados como modelo para o estudo acerca da nocicepção, dentre eles anfíbios e aves.

Síndromes de dor neuropática envolvem lesões do sistema nervoso, podendo esta ser originária de compressão ou secção nervosa. Após secção nervosa periférica, ocorre a formação de neuritos locais, atrofia, alteração na atividade das células de Schwann, e alterações na sinalização celular (LOESER et al., 2001). Estímulos nociceptivos resultam na liberação local de vários mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório, tais como bradicininas,

prostaglandinas, leucotrienos, serotonina, histamina, substância P, tromboxanos, fatores ativadores de plaquetas, cátions e radicais livres. Alguns destes fatores estão envolvidos de maneira direta no processo nociceptivo, enquanto outros geram a sensibilização do SNC (MEYER et al., 1994).

Após a lesão nervosa periférica, além da interrupção do transporte axonal, uma grande cascata de eventos é iniciada, tanto na região proximal quanto na região distal do nervo. Na região distal do nervo ocorre um processo denominado degeneração walleriana, evidenciada pelo processo de fagocitose. No coto proximal à lesão ocorre a formação de cones de crescimento induzidos pelos fatores de crescimento produzidos pelas células nervosas e de Schwann, que, juntamente com as células de Schwann, tem a função de orientar a regeneração do axônio lesionado. Ao mesmo tempo, os neurônios lesionados iniciam uma série de alterações citoplasmáticas denominadas cromatólise, sendo esta a primeira etapa morfológica em uma cascata de eventos que serão responsáveis pela regeneração neuronal ou pela morte deste neurônio lesionado (SCHRÖDER, 1975; OLIVEIRA, 2001)

A perda de continuidade do nervo ciático é um dos modelos de secção axonal, sendo assim um modelo de dor (BENNETT & XIE, 1988). Os animais submetidos a este procedimento desenvolvem comportamentos de dor, alodinia e hiperalgesia (CATHELIN et al., 1999). Alodinia refere-se à situação onde um estímulo que é normalmente inócuo desencadeia uma resposta dolorosa,

enquanto hiperalgesia refere-se à sensação de dor com amplitude anormal intensa após estímulos nocivos (BENNET, 1994). Cumpre ressaltar que a lesão nervosa periférica resulta em mudanças a longo prazo na atividade das fibras nervosas lesionadas, como degeneração axonal seguida de uma regeneração parcial com perda de mielina e formação de um neuroma (CATHELINE et al., 1999; NISHIMORI et al., 2002) . Após a lesão nervosa periférica, uma seqüência complexa de eventos inicia-se para remover o tecido lesado e começar o processo de reparação do tecido. Deve-se ressaltar que, em mamíferos, a resposta à lesão nervosa não é somente local, envolve também corpos celulares localizados na medula espinal e no gânglio da raiz dorsal do nervo lesionado (CHI et al., 1993; BRUNETT& ZAGER, 2004). Em vertebrados não mamíferos, como por exemplo a rã, está demonstrado que a secção de um nervo sensorial periférico também induz uma variedade de mudanças bioquímicas e funcionais no gânglio da raiz dorsal e terminais aferentes primários na medula espinal (PARTATA et al., 2002; GUEDES et al., 2004a; b; AULER, 2004). Deste modo, a utilização de modelos animais em abordagens experimentais de dor neuropática vem sendo uma via para a elucidação dos mecanismos envolvidos na codificação e transmissão da nocicepção, bem como dos processos associados à injúria nervosa periférica (CHI et al., 1993; CATHELINE, et al., 1999).

1.3 Mecanismos da Transmissão Nociceptiva

A dor é uma experiência multidimensional e complexa, que se origina no sítio da lesão, é transmitida para o SNC, sendo, ao longo deste percurso, processada em vários níveis e finalmente percebida pelo córtex cerebral. Há quase um século atrás, foi proposta a existência de nociceptores: neurônios sensoriais primários que dão origem às terminações nervosas livres, e que são ativados por estímulos capazes de causar lesão tecidual (SNEDDON, 2004). Estas lesões, sejam elas induzidas por doenças, inflamação, acidentes, ou provocadas por cirurgias ou outros procedimentos terapêuticos constituem estímulos nocivos e causam modificações celulares com liberação de substâncias químicas. Estes receptores nociceptivos específicos podem ser sensíveis ao calor, frio, estímulos mecânicos ou mediadores químicos (LOESER et al., 2001; MILLAN, 1999; MEYER, CAMPBELL & RAJA, 1994). Axônios aferentes transmitem as informações da terminação sensorial periférica do tecido innervado (pele, músculo, etc) até suas terminações sinápticas no SNC. Normalmente cada neurônio constitui um canal independente de comunicação sensorial, cujo trabalho é comunicar ao SNC os estímulos que ocorrem na periferia (DEVOR, 1994). As fibras que innervam a região da cabeça e do corpo surgem de corpos celulares localizados nos gânglios trigeminal e da raiz dorsal, respectivamente. As fibras responsáveis pela transmissão nociceptiva podem ser divididas basicamente em 2 grupos: fibras dos tipos A delta (A δ) e C. Em mamíferos, as fibras A δ são pouco mielinizadas, possuindo uma bainha de mielina com espessura de 2-14 μ m. Sua

velocidade de condução é de 5–30 m/s, sendo responsável pela transmissão da dor aguda. As fibras do tipo C, amielínicas, possuem um diâmetro de 0,2–3,0 μm e uma velocidade de condução de aproximadamente 0,3–1,2 m/s, sendo responsáveis pela transmissão da dor secundária (LOESER et al., 2001; MILLAN, 1999). Os nervos periféricos consistem de axônios motores somáticos, vegetativos e sensoriais aferentes viscerais e somáticos que estão conectados ao SNC através das raízes ventrais e dorsais. Secções coronais de nervos periféricos mostram vários diâmetros de axônios mielinizados (diâmetros entre 1,5 a 20 μm) e grupos de axônios não mielinizados (diâmetros entre 0,2 a 2,0 μm) (LOESER et al., 2001; MILLAN, 1999).

Em gatos, Rexed (1964) subdividiu a substância cinzenta da medula espinal em um arranjo laminar contendo 10 estruturas. As lâminas I-VI fazem parte do corno dorsal da medula, enquanto as lâminas VII-IX fazem parte do corno ventral. A lâmina X é composta por uma coluna de células agrupadas em torno do canal central. Este arranjo foi determinado levando-se em conta o tamanho, a forma e a densidade dos corpos neuronais. A lâmina I é também chamada de lâmina marginal e possui um grande número de células que enviam seus axônios ao tálamo, deste modo tendo uma importante contribuição para a formação do trato espinotalâmico, o qual é uma das vias de transmissão nociceptiva entre a medula espinal e o encéfalo. Células da lâmina V também contribuem para a formação do trato espinotalâmico. A lâmina II é também chamada de substância gelatinosa, e seus neurônios raramente projetam para o tálamo. Terminais proprioceptivos e

projeções supra-espinhais projetam sobre a lâmina V e VI. A lâmina VII recebe inúmeras convergências de vias descendentes, enquanto a lâmina VIII é formada principalmente por interneurônios. A lâmina IX contém os neurônios motores e a lâmina X é composta por neurônios comissurais (LOESER et al., 2001).

1.4 Organização da medula espinal em anfíbios

Os animais não mamíferos apresentam características anátomo-fisiológicas básicas de percepção dos estímulos nociceptivos similares às dos mamíferos (STOSKOPF, 1994). Dentre a diversidade de espécies de não mamíferos utilizadas nos estudos sobre nocicepção, pode-se destacar especialmente a rã. A rã *Rana catesbeiana*, pertencente à família Ranidae, é um anfíbio aquático resistente às baixas temperaturas, o qual vem sendo há algum tempo empregado como modelo experimental nos estudos acerca da nocicepção desenvolvidos no Laboratório de Neurobiologia Comparada do Departamento de Fisiologia, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estes estudos determinaram os efeitos da injúria axonal periférica sobre o padrão de imunorreatividade da substância P (PARTATA et al., 2002), neuropeptídeo Y, GABA, somatostatina (GUEDES et al., 2004a, b), tirosina hidroxilase e serotonina (AULER, 2004) em medula espinal e gânglio da raiz dorsal desta espécie de rã. A ampla utilização deste modelo experimental deve-se ao fato de este ser um animal de fácil obtenção no comércio local. Além disso, estes animais possuem uma grande tolerância às diversas condições

ambientais (ROCHA & BRANCO, 1988). Em estudos acerca da nocicepção, as rãs têm se mostrado um modelo bastante adequado, já que apresentam grande tolerância aos procedimentos empregados, além de exibirem recuperação satisfatória devido principalmente à sua grande resistência às infecções (PARTATA et al., 2002; GUEDES et al., 2004a, b; AULER et al., 2004).

Embora não apresente um arranjo laminar como a dos mamíferos, a medula espinal dos anfíbios apresenta várias características anátomo-funcionais similares àquelas dos amniotas. Ebesson (1976) apud Schotland & Tresch (1997), dividiu a medula espinal da rã em 6 regiões distintas (Fig. 2): uma região dorsal correspondente às lâminas I-IV dos mamíferos; uma região lateral análoga às lâminas V e VI; uma região ventrolateral representativa da lâmina VII; uma zona ventromedial correspondente à lâmina VIII; uma área motora relacionada com a lâmina IX; e uma zona central correspondente à lâmina X de Rexed. A semelhança entre a distribuição dos neurônios motores, dos terminais aferentes primários, do trato de Lissauer e também dos circuitos reflexos musculares entre estas duas classes de vertebrados torna possível a comparação dos resultados obtidos dos estudos experimentais realizados em rãs com aqueles de mamíferos (MUÑOZ et al., 2000).

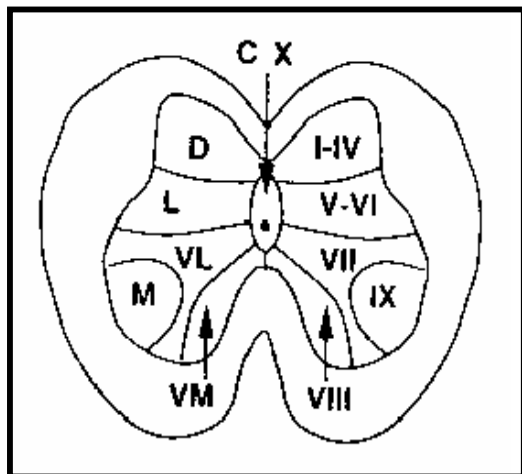


Fig. 2 - Representação esquemática de uma secção coronal de medula espinal. À esquerda, são mostradas as divisões da substância cinzenta espinal de rã, descritas por Ebesson (1976) apud Schotland & Tresch (1997). À direita, estão representadas as lâminas caracterizadas por Rexed (1964), em gatos. As regiões são correspondentes nas duas classes de vertebrados. D, região dorsal; L, região lateral; VL, região ventrolateral; M, região motora;

Conforme revisado por Stevens (2004), em anfíbios tem sido encontrados três grupos de terminações nervosas livres. Estes incluem um tipo de terminação nervosa primária situada ao nível superficial da derme e dois grupos de terminações nervosas livres: um na epiderme e outro nas lâminas profundas da derme.

Os anfíbios possuem, como os mamíferos, fibras aferentes mielinizadas e não mielinizadas encontradas nos nervos mistos periféricos. Estas fibras aferentes tem sido divididas em três classes gerais, baseado na morfologia, velocidade de condução, latência de resposta e características do potencial de ação: Fibras do tipo A, as quais são de grande diâmetro e altamente mielinizadas, fibras com pequeno diâmetro e pouco mielinizadas denominadas fibras do tipo B e fibras do tipo C, que possuem diâmetro pequeno e não são mielinizadas. Estas

características estão correlacionadas com os tipos de fibras encontradas em mamíferos: A β , A δ e C, respectivamente (STEVENS, 2004).

Nos anfíbios, de forma similar ao descrito em mamíferos, o corno dorsal espinal recebe informações aferentes primárias. Tal região é dividida em neuropilos dorsal e ventral, também chamados de campo terminal dorsal e campo terminal ventral, respectivamente (Fig. 3). Entre as duas zonas de neuropilo localiza-se a banda mediolateral, a qual se une lateralmente com o trato de Lissauer (ADLI et al., 1988). De acordo com a classificação de Ebesson (1976) apud Schotland & Tresch (1997), a zona correspondente ao corno dorsal localiza-se nas regiões terminais dorsal e ventral. As fibras com bainha de mielina espessa, as quais suprem os fusos musculares, terminam no campo terminal ventral, onde podem fazer conexões monossinápticas diretas com os prolongamentos dos neurônios motores espinais, sendo que os corpos celulares destes últimos localizam-se no corno ventral (MEARS & FRANK, 1994). Entretanto, os aferentes sensoriais primários projetam-se para o campo terminal dorsal, o que ressalta a correspondência desta região às lâminas I-IV dos amniotas (ADLI et al., 1988). É importante salientar que as duas regiões de neuropilo do corno dorsal não apresentam áreas de sobreposição, o que facilita a análise da especificidade topográfica dos terminais aferentes após lesões de axônios sensoriais periféricos (MEARS & FRANK, 1994).

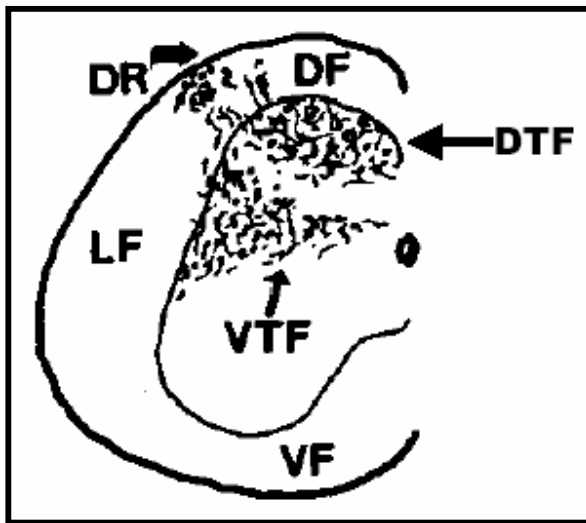


Fig. 3 - Representação esquemática de uma hemiseção da medula espinal de rã, mostrando as principais regiões do corno dorsal. DR, raiz dorsal; DF, funículo dorsal; LF, funículo lateral; VF, funículo ventral; DTF, campo terminal dorsal; VTF, campo terminal ventral (modificado de ADLI et al., 1988).

Em mamíferos expostos à nocicepção, as fibras nervosas aferentes primárias liberam neurotransmissores como substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), Ácido Gama - Aminobutírico (GABA) e glutamato, os quais também são identificados em abundância no corno dorsal da medula espinal de anfíbios em condições basais (INAGAKI et al., 1981; LOREZ & KEMALI, 1981; PETKÓ & SANTA, 1992; VESSELKIN et al., 2003). Em anfíbios, também são encontrados neurotransmissores como met-enkefalina e peptídeos opióides endógenos, os quais agem pré-sinápticamente para inibir a liberação de substância P e pós-sinápticamente para diminuir a estimulação de neurônios de segunda ordem em casos de nocicepção (STEVENS, 2004).

Embora a maioria dos estudos acerca dos mecanismos nociceptivos sejam realizados em mamíferos, parece haver uma correlação entre os mecanismos

básicos de nocicepção entre estes animais e os anfíbios no que diz respeito à liberação de neurotransmissores e peptídeos opióides endógenos.

1.5 Genes Precocemente Expressos

Os mecanismos de transmissão e modulação da dor no SNC são extremamente complexos. Neurotransmissores, atividade elétrica da membrana celular e fatores de crescimento podem modular estes mecanismos. Lesões teciduais ou inflamação geralmente induzem à situação de dor, a qual é resultado tanto da sensibilização periférica (aumento da sensibilidade dos nociceptores aferentes primários) como da sensibilização central (aumento na excitabilidade dos neurônios espinais) (MA et al., 1996). Em mamíferos, sabe-se que estímulos nocivos podem produzir variações de longa duração nos processos celulares do SNC após a ativação de genes precocemente expressos (IEG's - Immediate Early Genes). Dentre os numerosos tipos de fatores de transcrição existentes no SNC, os genes da família Fos e Jun merecem atenção considerável (NESTLER et al., 1998). O c-fos faz parte desta grande família de IEG's, o qual é comumente empregado nos estudos sobre nocicepção, uma vez que codifica fatores de transcrição que controlam a atividade de outros genes (HUNTER et al., 1995). O termo fos provém da união das primeiras letras das palavras *Finkel Osteogenic's Sarcoma*, e foi primeiramente utilizado para descrever o gene codificado pelo retrovírus do sarcoma osteogênico *Finkel-Biskis-Junkis* em roedores (HERDEGEN & LEAH, 1998; MITSIKOSTAS & Del RIO, 2001). Este gene codifica a proteína c-Fos ou Fos, a qual é composta por 380 aminoácidos e apresenta peso molecular

de 55-62 kDa (MORGAN & CURRAN, 1989). Após sua síntese, esta proteína sofre heterodimerização com membros da família Jun (c-Jun, JunB e junD) e passa a atuar como fator de transcrição, ativando genes alvo secundários (Fig. 4). De acordo com NESTLER e colaboradores (1998), novas formas de proteínas da família Fos foram reconhecidas. Estas proteínas, originalmente chamadas de FRAs (*Fos-related antigens*) parecem ser induzidas em regiões específicas do encéfalo após vários tipos de estimulações crônicas. Até agora, quatro membros da família c-Fos foram identificados: c-Fos, FosB, Fra-1 e Fra-2, os quais codificam as proteínas Fos, Fos B, Fra-1 e Fra-2, respectivamente.

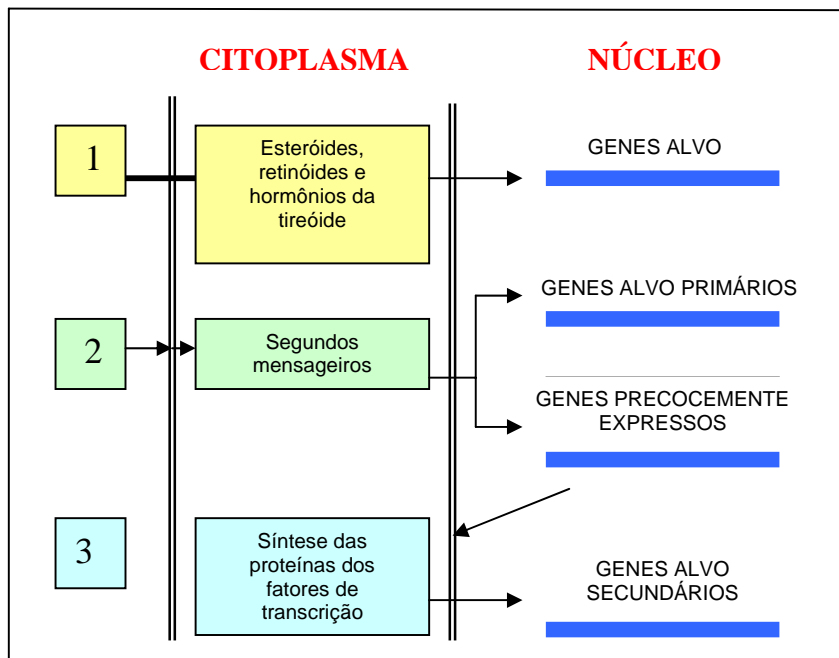


Fig. 4 - Regulação da expressão gênica por estímulos exógenos. Estímulos extracelulares podem modular a expressão gênica por três diferentes vias. (1) Moléculas como esteróides, retinóides e hormônios da tireóide ligam-se a receptores nucleares específicos e diretamente induzem alterações na transcrição de genes alvo. (2) estímulos que não podem ter acesso ao interior da célula alteram a expressão gênica por induzir a formação de segundos mensageiros. Estes, por sua vez, podem diretamente modular expressão de genes alvo ou indiretamente podem induzir genes precocemente expressos, os quais codificam fatores de transcrição que irão regular a expressão de genes alvo (3). (Adaptado de MORGAN e CURRAN, 1989).

Em mamíferos, a transcrição do gene *c-fos* é induzida rapidamente e transitoriamente após estimulação, juntamente com o gene *c-jun*. (MORGAN & CURRAN, 1989; KOVÁCS, 1998). Quando há despolarização da membrana, e entrada de Ca^{++} na célula, a expressão de *c-fos* é rapidamente induzida (HOFFMAN et al., 2000). Os mRNAs (ácidos ribonucleicos mensageiros) destes genes acumulam-se transitoriamente por 1–2 horas no citoplasma e suas

respectivas proteínas são traduzidas. As proteínas c-Fos e c-Jun são translocadas para o núcleo celular onde formam um complexo protéico heterodimérico, o qual liga-se ao elemento regulatório do DNA (ácido desoxirribonucleico) conhecido como sítio de ligação AP-1, ativando assim outros genes que causam mudanças a longo prazo no fenótipo celular (Fig. 5). O complexo heterodimérico AP-1 interage com a sequência TGACTCA em regiões regulatórias de genes alvo e, dependendo da composição do complexo AP-1, estimula ou inibe a transcrição (MORGAN & CURRAN, 1989; KOVÁCS, 1998). O complexo c-Fos/c-Jun tem sido descrito como tendo efeitos estimulatórios na expressão de genes alvo, enquanto complexos c-Fos/JunB são comumente inibitórios (KOVÁČZ, 1998). Em relação às proteínas FRAs, estas tem demonstrado serem relativamente estáveis, e persistem no encéfalo semanas ou meses após sua estimulação. Estes achados levam à hipótese de que estas podem ser responsáveis pelas mudanças a longo prazo da expressão gênica no encéfalo (NESTLER et al., 1998).

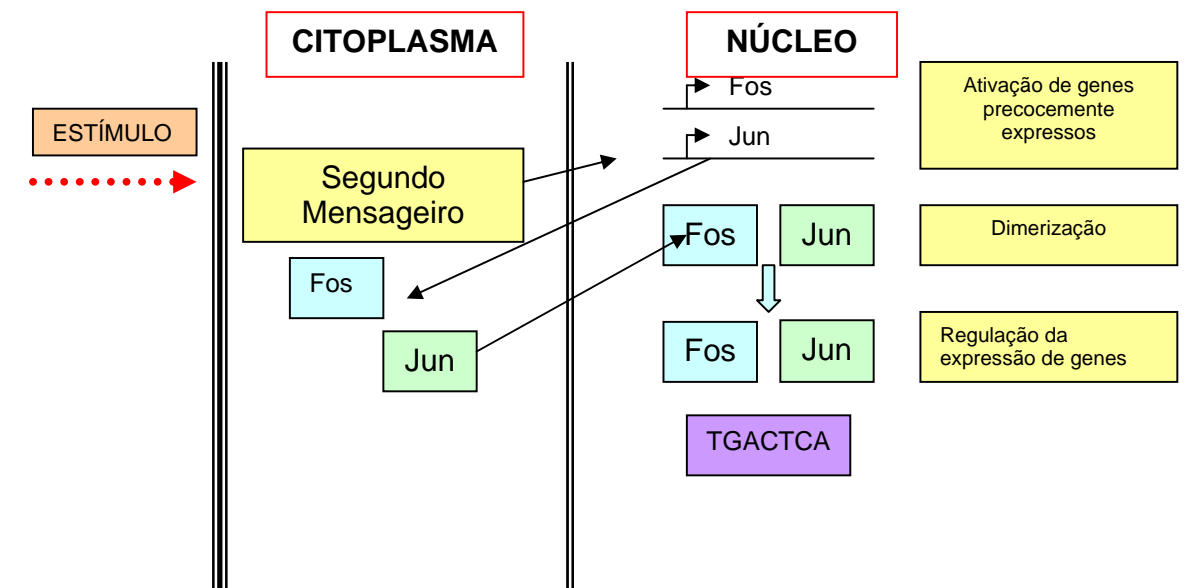


Fig. 5 - Transdução nuclear de c-fos e c-jun. Estímulos extracelulares ocasionam mudanças em segundos mensageiros, as quais induzem a expressão de c-fos e c-jun. Após translação no citoplasma, c-Fos e c-Jun (proteínas codificadas pelos genes c-fos e c-jun respectivamente) são rapidamente translocadas ao núcleo celular onde formam um complexo heterodimérico, o qual possui alta afinidade com o sítio AP-1 do DNA, regulando assim a transcrição de genes alvo (Adaptado de MORGAN & CURRAN, 1989).

Morgan & Curran (1989) descreveram que diversos resultados experimentais sugerem que o c-fos e outros genes precocemente expressos são induzidos no SNC em distintas circunstâncias. NARANJO e colaboradores (1991b), bem como KOVÁKS (1998), relatam que existem vários fatores que podem induzir a expressão de c-Fos, como neurotransmissores, fatores neurotróficos, despolarização, aumento do influxo de Ca^{+} e elevação do Ca^{+} intracelular ou intranuclear. Outras situações, como estimulação elétrica, lesões cirúrgicas, secções nervosas, lesões isquêmicas do encéfalo, estimulações nocivas e periféricas, convulsões e estimulação luminosa também estão

envolvidas na indução de c-fos no SN (Sistema Nervoso) de mamíferos (MORGAN & CURRAN, 1989).

De acordo com Buritova & Besson (2002), a expressão da proteína c-Fos, especialmente em medula espinal, é freqüentemente utilizada em mamíferos como um marcador indireto de neurônios envolvidos na transmissão nociceptiva. Hunt e colaboradores (1987) apud BELLAVANCE & BEITZ (1996) foram os primeiros pesquisadores a demonstrar que estímulos nocivos poderiam induzir a expressão de c-Fos no corno dorsal da medula espinal, constituindo esta, desde então, uma das principais ferramentas empregadas para mapear células e circuitarias ativadas em resposta a vários tipos de estímulos nocivos. É utilizada também para demonstrar o padrão de aferências em segmentos medulares e para avaliar a eficácia de agentes antinociceptivos em estímulos agudos (BON et al., 2002, DELANDER et al., 1997, AIDA, 2005). Gronenberg e colaboradores (2001) descreveram ainda que inúmeros neurotransmissores e outros estímulos fisiológicos ou patofisiológicos podem induzir a expressão das proteínas c-Fos e c-Jun também no gânglio da raiz dorsal. Deste modo, em mamíferos, estímulos nocivos (térmicos, químicos, mecânicos) ocasionam aumento no mRNA de c-fos em neurônios medulares envolvidos na nocicepção, predominantemente naqueles localizados nas lâminas superficiais (I e II), mas também na lâmina V (HUNTER et al., 1995 ; MUNGLANI & HUNT, 1995; BELLAVACE & BEINTZ, 1996). Cabe destacar que as lâminas superficiais I e II são conhecidas por receberem terminações de fibras C e A-delta ($A\delta$), as quais respondem à estímulos nocivos

(LOESER et al., 2001; MILLAN, 1999). Neste momento, podem ser citados também estudos demonstrando que, em resposta a estímulos nociceptivos, o gene c-fos foi rapidamente expresso tanto na medula espinal como em neurônios supraespinais (BULLITT, 1990; AIDA, 2005).

Todos estes estudos confirmam a relação entre nocicepção e c-Fos, validando este proto-oncogene como um marcador para esta situação (HARRIS, 1998). Em mamíferos, mediante o emprego de técnica de imunistoquímica, foi demonstrado que estímulos nocivos periféricos aumentam o número de neurônios imunorreativos ao c-Fos de poucas horas a poucos dias após a estimulação (para uma completa revisão, ver COGGESHALL, 2005).

Com relação à lesão nervosa periférica propriamente dita, sabe-se que esta condição ocasiona acréscimo tanto na expressão como no número de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos (Fos-ir) (ACHAVAL, 1991). Estudos demonstraram um aumento na expressão de c-Fos tanto no lado ipsilateral quanto no lado contralateral à lesão nervosa periférica, sugerindo assim um mecanismo polissináptico (MUNGLANI & HUNT, 1995). Porém, segundo alguns autores, este acréscimo localiza-se apenas no lado ipsilateral à lesão (para uma revisão, veja COGGESHALL, 2005). NISHIMORI e colaboradores (2002) descrevem que, após lesão nervosa periférica, a expressão da proteína c-Fos pode ser dividida em 2 estágios: um estágio precoce e um tardio. No estágio precoce, 2 a 3 horas após a lesão, os neurônios que expressam a proteína c-Fos estão localizados nas lâminas superficiais ipsilaterais e na lâmina V da medula espinal. No estágio mais

tardio, neurônios imunorreativos à esta proteína encontram-se distribuídos no núcleo próprio e através da extensão mediolateral do corno dorsal da medula espinal destes animais.

Todavia, se deve ressaltar que o papel funcional das mudanças que ocorrem após lesão nervosa periférica não está completamente compreendido. Por exemplo, tem sido demonstrado que o fator de transcrição c-Jun é expresso no gânglio da raiz dorsal e em neurônios da medula espinal após lesão axonal, e foi proposto que a expressão deste gene é um pré-requisito para o sucesso da regeneração axonal. Contudo, existem evidências que o c-Jun pode também estar envolvido com a morte de neurônios encefálicos em hipóxia-isquemia ou lesões axonais (WU, 1996). Harris (1998) afirma ser difícil determinar se as alterações na distribuição laminar de c-Fos estão associadas às diferenças na qualidade do estímulo nocivo (químico, térmico ou mecânico), ou associada a intensidade relativa da estimulação. Os IEG's poderiam estar envolvidos em alterações da síntese proteica em neurônios medulares após lesões periféricas BULLITT, 1991; ACHAVAL, 1991; HERDEGEN et al., 1994). Expressões basais de c-Fos são comumente encontradas de forma mínima e restrita no SNC de mamíferos. Nestes animais esta proteína é expressa de forma considerável no córtex visual de ratos, gatos, macacos e humanos, e mais fracamente em outras áreas corticais. Existe uma maior expressão de c-Fos no núcleo olfatório anterior, e uma moderada expressão nos córtex entorrinal e piriforme, núcleo endopiriforme dorsal, septo lateral e *subiculum*. Uma discreta expressão é observada nos córtices frontal, agranular, orbital e cingulado, nas áreas CA1 e CA2 do hipocampo, na amígdala e

no tegmento (HERDEGEN & LEAH, 1998). Análises de Northern Blot tem demonstrado que as concentrações de mRNA de c-Fos oscilam de uma maneira circadiana, estando mais proeminente durante a fase escura, onde os animais estão mais ativos (KACZMAREK & CHAUDHURI, 1996; HERDEGEN & LEAH, 1998). Estímulos denominados “usuais”, os quais transmitem informações aferentes de intensidade “usual”, não resultam na indução de c-Fos. A estimulação do córtex visual ocorreu somente após a privação do estímulo visual, ou quando os animais foram expostos a novos estímulos (KOVÁCS, 1998). Gronenberg e colaboradores (2001) demonstraram que as proteínas c-Fos e c-Jun foram expressas em menos de 1% das células de gânglios sensoriais de roedores em condições basais. Entretanto, o mesmo estudo realizado em porcos mostrou uma notória expressão da proteína Jun em gânglios sensoriais, sugerindo que o mesmo está envolvido no metabolismo neuronal normal destes animais como fator de transcrição. Sendo assim, diferente do que ocorre em ratos, a expressão de c-Jun nestes animais deve ser utilizada com cautela para a identificação da ativação de genes precocemente expressos. Para Harris (1998), a relação entre nocicepção e expressão de c-Fos na medula espinal deve ser verificada com cautela pelo fato de que a manipulação dos animais em estudo pode estimular reflexos nociceptivos e comportamentos de dor, induzindo assim a expressão de c-Fos.

No entanto, é intrigante o fato de que parece ocorrer uma relação entre analgesia e expressão de c-fos. A utilização do analgésico Nefopan em ratos submetidos à dor aguda (calor) e dor crônica (injeção intraplantar de formalina)

mostrou uma redução na expressão de células Fos-ir, principalmente nos animais submetidos à dor aguda (BURITOVA & BESSON, 2002). O pré-tratamento com Morfina em ratos submetidos à estímulos nociceptivos reduziu o número de células Fos-ir (HARRIS, 1998).

Estes resultados evidenciam a necessidade de realização de mais estudos para um maior entendimento do papel funcional do gene c-fos na nocicepção. Como pode ser observado, os estudos até agora descritos foram realizados em mamíferos. Porém, como foi salientado no início desta introdução, vertebrados não mamíferos, tais como as rãs, podem e vem sendo empregados como modelos para o estudo de dor neuropática (PARTATA et al., 2002; AULER, 2004; GUEDES et al., 2004a, b). Nestes animais foi demonstrada a presença da proteína c-Fos em neurônios e em células testiculares (COBELLIS et al., 1997; COBELLIS et al., 1999a, b; COBELLIS et al., 2002a; b). No hipotálamo de rãs, Cobellis e colaboradores (1999a) demonstraram a existência de uma relação entre a expressão basal de c-Fos e o ciclo sexual anual de *Rana esculenta*. Neste estudo, as células imunorreativas ao c-Fos foram encontradas no encéfalo dos animais coletados em março, maio a julho, e de setembro a novembro, sendo a densidade das mesmas maior nos animais coletados em julho. Já os animais coletados em janeiro, fevereiro, Abril e dezembro não apresentaram nenhuma célula imunorreativa a esta proteína. Nas rãs coletadas em março, a expressão de c-fos foi tanto nuclear quanto citoplasmática, enquanto nos animais coletados em maio, junho, setembro, outubro e novembro a atividade foi somente

citoplasmática. Nos animais coletados em Julho, por sua vez, a atividade foi predominantemente nuclear.

Cobellis e colaboradores (1997) observaram que o mRNA do gene *c-fos* aumentou em testículos de rãs *Rana esculenta* durante o período de atividade espermatogênica. A concentração deste proto-oncogene foi maior durante o período de pico do estradiol, havendo um declínio deste na fase onde ocorreu acréscimo na concentração de androgênios. Todavia, esta proteína foi encontrada nas espermatogônias durante todo o ano. Por este fato foi sugerido que as flutuações da expressão de *c-Fos* poderia estar correlacionada com as variações sazonais anuais das concentrações de hormônios esteróides. Em um outro estudo realizado por Cobellis e colaboradores (1999b), estes autores sugeriram que a expressão de *c-Fos* e suas alterações não estão restritas somente a curtos períodos como ocorre em mamíferos. Estes autores observaram que as mudanças sazonais, e aquelas induzidas por estradiol na atividade de *c-Fos*, correlacionava com os períodos reprodutivos destes animais. De fato, foi observado que nos períodos de outono e inverno, quando a espermatogênese encontra-se em uma fase quiescente, ocorre predomínio da expressão de *c-Fos* no citoplasma das espermatogônias. Porém, o aumento de atividade destas células induz uma maior atividade nuclear. Por este fato foi sugerido que o *c-Fos* citoplasmático poderia ser translocado para o núcleo, onde induziria a atividade mitótica característica dos períodos ativos (primavera e verão). Esta mesma hipótese foi sugerida em um estudo realizado com lagartos da espécie *Podarcis s. sicula*, onde houve o aparecimento de células imunorreativas ao *c-Fos* no

compartimento perinuclear da espermatogônia durante os períodos de outono e inverno (CHIEFFI et al., 1997).

Recentemente COBELLIS e colaboradores (2002a; b) demonstraram, utilizando testículos de rã *Rana esculenta*, que a proteína c-Fos citosólica apresenta peso molecular de 52 kDa, enquanto o núcleo contém 2 isoformas: uma de 43 kDa e outra de 68 kDa, sendo que a expressão desta última aumentou paralelamente com a proliferação das espermatogônias. O emprego de fosfatases alcalinas e de seus inibidores mostrou que esta forma de 68 kDa parecia ser uma forma fosforilada, a qual poderia ser o resultado de uma modificação da proteína de 52 kDa encontrada no citoplasma.

Foi sugerido que o aparecimento da proteína c-Fos no núcleo de neurônios hipotalâmicos de rã poderia estar correlacionado com a atividade de biossíntese dirigida pela mudança em neurotransmissores/neuromoduladores após a quiescência testicular do inverno (COBELLIS et al., 1999a). Sabe-se que a secção nervosa periférica, nestes animais, ocasionou mudanças temporais no padrão de imunorreatividade de alguns neurotransmissores clássicos e neuropeptídeos, as quais já foram observadas aos três (03) dias após a injúria nervosa (PARTATA et al., 2002; AULER, 2004; GUEDES et al., 2004a, b). Baseado nestas informações, e sabendo que em mamíferos a proteína c-Fos é ativada minutos após a aplicação de estímulo nocivo, uma das hipóteses levantadas é se esta proteína poderia ser um dos agentes a participar no controle das alterações resultantes da secção

nervosa periférica em rãs. Deste modo, o presente estudo propôs demonstrar, além da presença e localização da proteína c-Fos em medula espinal lombossacral e gânglio da raiz dorsal de rãs *Rana catesbeiana* na ausência de qualquer estimulação intencional (estado basal), os efeitos da secção do nervo ciático sobre a expressão e o padrão de imunorreatividade desta proteína nestes tecidos. Como as mudanças neuroquímicas até agora determinadas em medula espinal de rãs já estavam presentes aos 3 dias após a injúria nervosa periférica, e em ratos o padrão de imunorreatividade da proteína c-Fos já está aumentado aos 3 dias após a lesão no nervo ciático (KAJANDER et al., 1996), este intervalo de tempo foi aqui considerado. Por ser este o primeiro estudo com este enfoque em anfíbios, seus resultados contribuem não apenas para o entendimento do papel do c-Fos em medula espinal de rãs submetidas a uma lesão nervosa periférica, condição que induz a um quadro de dor neuropática, mas também permite inferir que o envolvimento do gene c-fos na nocicepção apareceu precocemente durante o processo evolutivo dos vertebrados, uma vez que os anfíbios foram os primeiros vertebrados terrestres.

1.6- Hipótese de Trabalho

Como está demonstrada a presença da proteína c-Fos no hipotálamo de rãs, e sendo ainda desconhecida sua existência na medula espinal destes animais, nossa hipótese de trabalho foi apresentar um mapa da distribuição da imunorreatividade da proteína c-Fos em medula espinal de rãs *Rana catesbeiana*,

adultas, em situação basal, e 3 dias após estes animais serem submetidos à manipulação e à secção do nervo ciático.

2 - OBJETIVOS

O presente estudo avaliou os efeitos da secção do nervo ciático sobre o padrão de imunorreatividade da proteína c-Fos em gânglio da raiz dorsal e medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana*, adultas, de ambos os sexos, considerando para este estudo o período de três dias após a desnervação. Propôs ainda determinar os efeitos desta injúria nervosa periférica sobre a expressão da proteína c-Fos em medula espinal lombossacral desta espécie de rã.

Para isso pretendeu-se:

- Determinar o padrão de imunorreatividade da proteína c-Fos em cortes coronais de medula espinal lombossacral e gânglio da raiz dorsal de rãs *Rana catesbeiana*, adultas, sem qualquer estimulação intencional (condições basais);
- Localizar, mediante técnica de imunistoquímica, as modificações no padrão de distribuição da imunorreatividade à proteína c-Fos na medula

espinal e no gânglio da raiz dorsal de rãs *Rana catesbeiana*, adultas, 3 dias após a secção do nervo ciático.

- Quantificar, mediante técnica de Densitometria Óptica e contagem neuronal, as possíveis alterações no padrão de imunorreatividade à proteína c-Fos em gânglio da raiz dorsal de rãs *Rana catesbeiana* em condições basais e 3 dias após a secção do nervo ciático.
- Quantificar, mediante emprego da técnica de Western Blot, os efeitos da secção do nervo ciático sobre a expressão da proteína c-Fos em medula espinal lombossacral de rãs em estado basal e 3 dias após secção do nervo ciático.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS: PROCEDÊNCIA E MANUTENÇÃO

Para este estudo foram utilizadas rãs *Rana catesbeiana* (Fig. 6), adultas, de ambos os sexos, com peso médio de 100-200g. Estes animais foram obtidos no ranário Ranasul (Imbé - RS) e mantidos no Laboratório de Neurobiologia Comparada do Departamento de Fisiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da UFRGS, onde permaneceram em aquários contendo 2,0 cm de água destilada até sua utilização experimental. Durante este período, foram alimentados *ad. libitum* com ração apropriada. A limpeza dos aquários foi efetuada todos os dias após a alimentação dos animais. A temperatura da sala onde os mesmos permaneceram e os ciclos de luz oscilaram de acordo com o ambiente.



Fig. 6 - Anfíbio da espécie *Rana catesbeiana* em condições ambientais prévias ao experimento.

3.2 - TESTE QUÍMICO DO ÁCIDO ACÉTICO

Para a realização deste teste, utilizou-se a técnica empregada por Pezalla (1983), a qual avalia o limiar nociceptivo de rãs mediante o emprego de diferentes concentrações de ácido acético, as quais variaram de 0,18 a 15 M. A preparação do ácido acético consistiu em 11 diluições do mesmo, sendo estas preparadas em água destilada. Estas diferentes concentrações foram codificadas em números de 1 a 12, onde o menor número correspondeu a menor concentração de ácido, conforme a tabela mostrada a seguir:

Concentração de ácido acético (em Molar)	Código de numeração dos frascos
0,18 M	1
0,26 M	2
0,39 M	3
0,58 M	4
0,88 M	5
1,31 M	6
1,97 M	7
2,96 M	8
4,44 M	9
6,66 M	10
10,00 M	11
15,00 M	12

Tabela 1- Concentrações de ácido acético empregadas no teste químico do limiar nociceptivo de rãs.

Antes do teste, os animais foram identificados através da colocação de fitas de cores diferentes nas patas dianteiras e separados aleatoriamente em animais pertencentes aos grupos controle (rãs sem qualquer manipulação prévia), *sham* (rãs que tiveram o nervo ciático isolado, mas não seccionado) e desnervadas (rãs que tiveram o nervo ciático isolado e seccionado). Cada grupo foi composto por 5 animais. Após estes procedimentos, as rãs foram colocadas em aquários individuais para início do teste. Iniciou-se este teste com a menor concentração de ácido, sendo este gotejado com uma pipeta Pasteur na pata posterior do animal (Fig. 7). Observou-se, então, a reação do mesmo, que deveria ser a de limpar a pata estimulada. Esta ação deveria ocorrer num intervalo de 4 segundos. Se o

animal não apresentava a reação de limpar a pata testada durante este intervalo de tempo, procedia-se com o gotejamento da concentração de ácido acético imediatamente superior. O limiar nociceptivo foi determinado quando a resposta de retirada ocorreu em até 4 segundos. Para evitar a lesão tissular provocada por este ácido, a pata do animal foi lavada com água destilada a cada mudança da concentração de ácido. O limiar nociceptivo foi determinado nos grupos controle, *sham* e desnervado antes da desnervação periférica, 1 e 3 dias após o procedimento cirúrgico. Este teste foi realizado nas duas patas posteriores dos animais dos três grupos experimentais para a determinação do limiar nociceptivo tanto na pata que não sofreu nenhum tipo de estimulação como naquela onde foi realizada a manipulação ou a secção do nervo ciático, a fim de visualizar se o estímulo periférico poderia ocasionar mudanças na pata contralateral àquela estimulada.

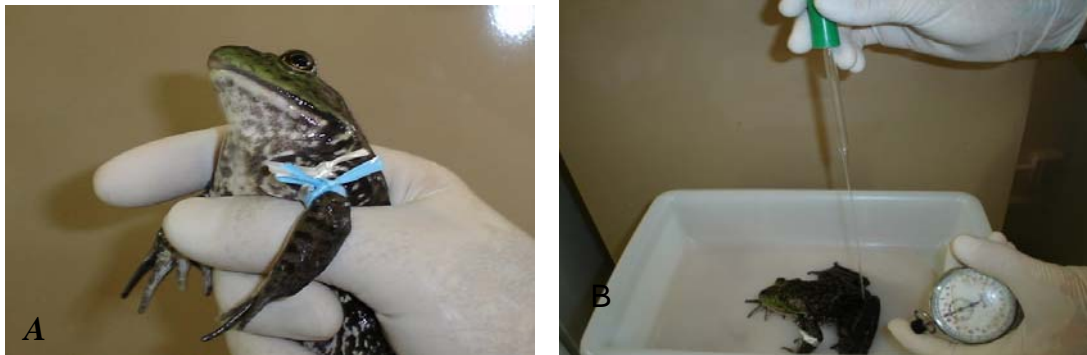


Fig. 7- Seqüência de eventos para a realização do teste químico do Ácido Acético. (A) Rã identificada por fitas coloridas amarradas em uma das patas dianteiras. (B) Rã sendo submetida ao teste químico do ácido acético, o qual é gotejado em uma das patas posteriores da mesma com uma pipeta Pasteur. Ainda pode ser visualizado o cronômetro na outra mão do pesquisador.

3.3 - DESNERVAÇÃO PERIFÉRICA

Inicialmente as rãs foram anestesiadas localmente com xilocaína 2% (ASTRA). Este anestésico foi administrado na musculatura da pata posterior direita de cada rã, na dose de 0,1 ml/100 g de peso corporal do animal (Fig. 8). Em seguida, este membro foi firmemente fixado por um pedaço de esparadrapo para permitir a incisão dos tecidos moles e a visualização do nervo ciático do animal. Visualizado este nervo, o mesmo foi afastado dos tecidos à sua volta com o intuito de deixá-lo completamente isolado. Em seqüência, dois fios de sutura (de algodão) foram colocados debaixo do nervo de tal forma que uma distância de dois milímetros permaneceu entre eles. Neste estágio foram dados nós nos fios de sutura e, em seguida, foi seccionado o segmento do nervo localizado entre os fios de sutura. Feito isso, a incisão foi suturada com fio de algodão. O tipo de sutura

utilizada foi a sutura de WOLFF, por ser mais indicada nos casos de maior tensão (LAZZERI, 1977) e por se acreditar que esta pode vedar melhor a incisão. Ao final, o animal foi colocado em um recipiente com 2,0 cm de água destilada, e mantido no laboratório nas condições inicialmente descritas por um período de 3 dias. Os animais *sham* foram submetidos ao mesmo procedimento, porém só houve o isolamento do nervo ciático sem a sua secção.

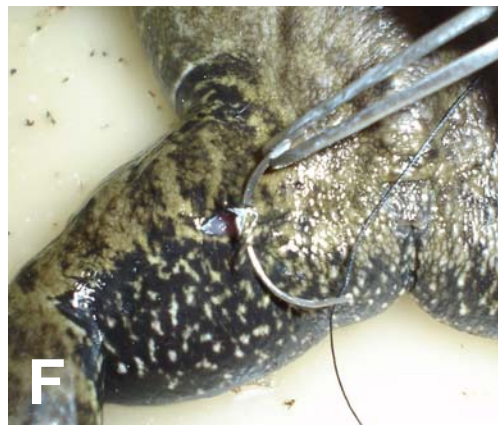
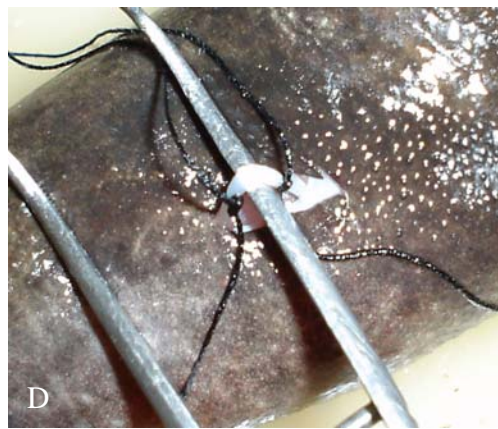
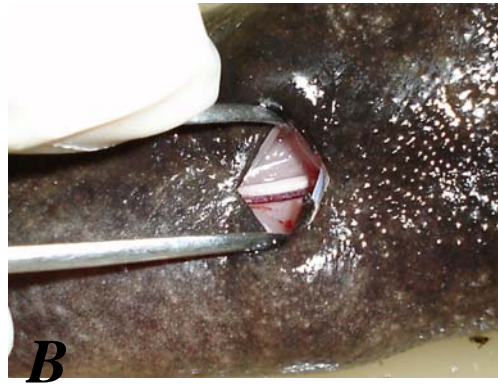


Fig. 8 - Seqüência de eventos para a realização da secção do nervo ciático de rã *Rana catesbeiana*: (A) administração do anestésico xilocaína 2% na pata posterior direita do animal; (B) visualização do nervo ciático após a incisão do integumento e dos tecidos à sua volta; (C) visualização mais detalhada do nervo ciático isolado, estando este suspenso por uma pinça; (D) nervo ciático isolado tendo ao longo de seu comprimento duas regiões de constrição devido a presença de dois nós com fios de sutura de algodão; (E) nervo ciático seccionado com os cotos amarrados por um fio de sutura; (F) sutura do local lesionado

3.4 - OBTENÇÃO DO TECIDO NERVOSO

As rãs controle, *sham* e desnervadas foram anestesiadas, no terceiro dia, com solução de sal de ácido metanosulfônico etil 3- aminobenzoato (MMS22), diluída em água destilada, na concentração de 0,5g de MMS22/10ml de água destilada. Esta solução foi injetada no saco linfático ventral de cada animal (Fig. 9). Estando anestesiadas, as rãs foram submetidas a uma perfusão intracardíaca. Para isto, o integumento da região torácica foi seccionado e afastado, permitindo o isolamento do coração e do cone arterial. Estando visualizados, 1000UI/Kg de heparina (Liquemine, Roche) foram injetadas no ventrículo cardíaco para evitar a formação de coágulos. Após, foi realizada uma incisão no ventrículo por onde passou a cânula da bomba peristáltica (Control Company). Uma vez visualizada a ponta da cânula no cone arterial, a mesma foi fixada por meio de uma pinça fazendo-se passar 100 ml de solução salina para a lavagem da árvore vascular. Imediatamente após a fixação da pinça e do início da passagem da solução salina na aorta, foi feita uma incisão no átrio direito para que todo o sistema sangüíneo tivesse uma saída. Ao término desta lavagem foi deixado passar pelo sistema perfusor 100 ml de solução de paraformaldeído 4% (Reagen), diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (TP), para a fixação dos tecidos. Terminada a perfusão, a medula espinal lombossacral e os gânglios das raízes dorsais do nervo ciático, tanto os ipsilaterais como os contralaterais, foram retirados e colocados em solução de paraformaldeído 4%, diluído em TP, por 4 horas à temperatura ambiente. Esgotado este período de tempo, o tecido nervoso foi crioprotegido em

solução de sacarose 15 e 30%, dissolvida em TP, e deixado à 4°C até afundar, em agitação contínua. Cortes coronais de 50 µm foram obtidos em criostato (Leitz 1720), os quais foram coletados “free floating” em frasco de vidro contendo tampão fosfato salino (PBS) à 4°C, sendo, em seguida, submetidos à técnica de imunohistoquímica para detectar a proteína c-Fos.

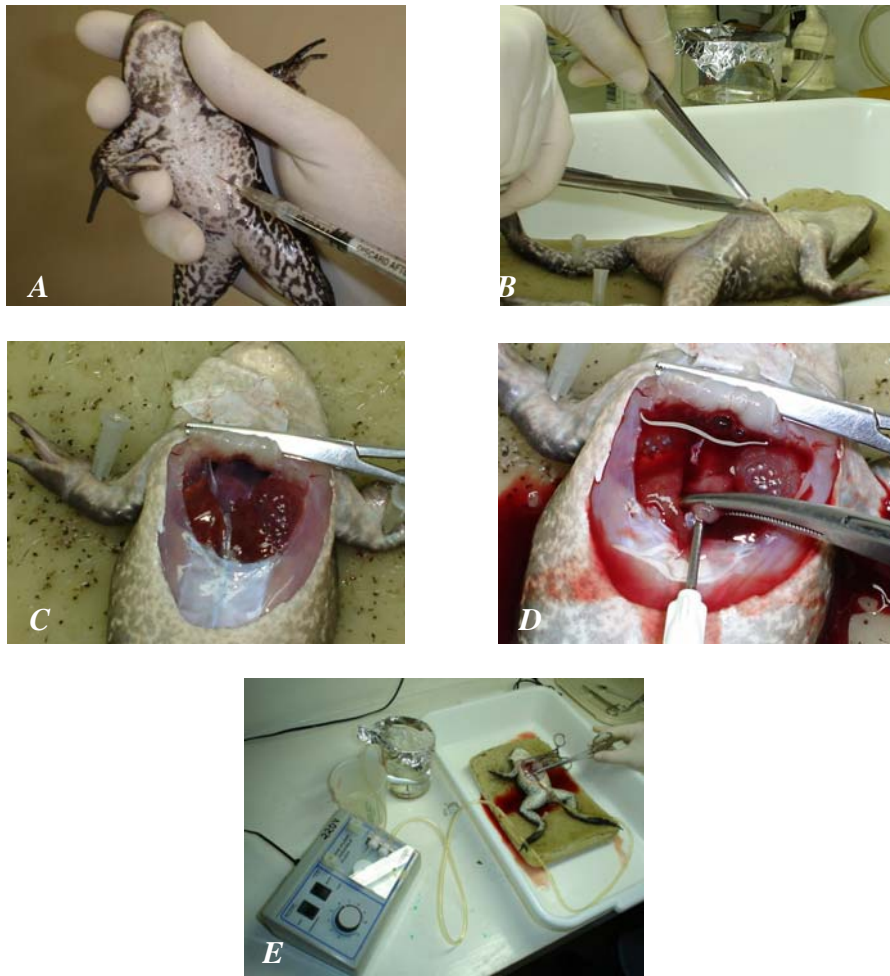


Fig. 9 - Seqüência de eventos para a realização de perfusão intracardíaca em rã *Rana catesbeiana*. (A) administração do anestésico MMS22 ; (B) incisão do integumento na região ventral torácica do animal; (C) abertura do tórax da rã expondo o coração; (D) cânula da bomba peristáltica introduzida no ventrículo cardíaco e fixada com o auxílio de uma pinça hemostática; (E) visão geral da bomba peristáltica, da solução fixadora em um Becker e de uma rã com o coração contendo em seu interior a ponta da cânula da bomba peristáltica.

3.5 - PROCEDIMENTO IMUNOISTOQUÍMICO

Para a demonstração da imunorreatividade à proteína c-Fos em medula espinal lombossacral e gânglios das raízes dorsais de rãs controle, sham e desnervada foi utilizada a técnica de anticorpo não marcado de Sternberger (1979). Para isto os cortes, que foram processados ao mesmo tempo, receberam inicialmente uma série de pré-tratamentos para bloquear a atividade da peroxidase endógena e de alguns sítios inespecíficos de união de anticorpos antes da incubação com o anticorpo primário.

O bloqueio da atividade peroxidásica foi realizado mediante o tratamento dos cortes com uma solução de metanol 10% diluída em solução de peróxido de hidrogênio 3% preparada em PBS. Esta pré-incubação teve duração de 30 minutos e foi realizada à temperatura ambiente e sob agitação constante (AGITADOR ORBITAL, MOD. 225-b, FANEM). Após, os cortes foram lavados em PBS contendo Triton X-100, na concentração de 0,2% (PBS-T), durante 30 minutos à temperatura ambiente e em agitação. Esta lavagem foi realizada em 2 banhos de 15 minutos de duração cada um.

Para bloquear as ligações inespecíficas, foi realizada uma pré-incubação dos cortes com soro não imune do animal doador do segundo anticorpo, neste caso, a cabra. Esta pré-incubação teve duração de 30 minutos e foi feita à temperatura ambiente e em agitação. A concentração desta solução foi de 3% preparada em PBS -T. Ao término deste período, este meio foi descartado e os

cortes foram incubados com o anticorpo primário para a proteína c-Fos (CALBIOCHEM). Este foi do tipo policlonal, desenvolvido em coelho, correspondendo aos aminoácidos 4- 17 de c-Fos p62 de origem humana, na concentração de 1:700, sendo esta diluição realizada em PBS-T. Esta incubação teve duração de 48 horas e foi realizada à temperatura de 4°C e em agitação contínua. Ao término dessa incubação, os cortes foram lavados em PBS durante 30 min, à temperatura ambiente e em agitação constante, sendo esta lavagem realizada em 2 banhos de 15 minutos de duração cada um. Em seqüência, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário (SIGMA) na concentração de 1:100 diluído em PBS. Esta incubação teve a duração de 90 min e ocorreu à temperatura ambiente e sob agitação constante.

Após isto, os cortes foram lavados em PBS conforme já descrito, e incubados em uma solução de PAP (peroxidase antiperoxidase de "rabbit") (SIGMA), na concentração de 1:500, diluído em PBS, durante 2 horas, à temperatura ambiente e em agitação contínua. Após a lavagem dos cortes em PBS conforme a descrição anterior, os cortes foram incubados em solução 0,006% de 3',3 diaminobenzidina (DAB; SIGMA), diluída em PBS, por 10 min, à temperatura ambiente e em agitação. Em seguida, foi acrescentado a este meio de incubação solução de peróxido de hidrogênio na concentração de 10% e na proporção de 1:1 (1,0 µl de solução de peróxido de hidrogênio para cada 1,0 ml de solução de DAB). Os cortes permaneceram neste meio por 10 minutos, durante o qual ocorreu o aparecimento do precipitado marrom. Depois desta revelação, os

cortes foram lavados várias vezes em PBS e colocados em lâminas tratadas com gelatina cromo-alúmen. Após a adesão dos cortes à lâmina, estes foram desidratados com soluções crescentes de álcool, diafanizados em xilol e montados com Bálsamo do Canadá e lamínulas.

Para a determinação da especificidade da reação, a técnica foi realizada conforme a descrição acima, porém o anticorpo primário foi substituído por soro normal ou PBS em diferentes experimentos. Os resultados obtidos foram negativos e indicaram que a imunorreatividade observada foi o resultado da interação antígeno-anticorpo, e não associada aos anticorpos secundários e terciários.

A imunorreatividade presente na medula espinal e gânglio da raiz dorsal das rãs submetidas às distintas condições experimentais foram examinadas e fotografadas através do fotomicroscópio NIKON OPTIPHOT-2 equipado com câmera fotográfica NIKON FX-35DX.

3.6 - DENSITOMETRIA ÓPTICA

Para medir a intensidade do produto de reação da imunoistoquímica (análise semi-quantitativa), utilizou-se o microscópio Nikon Eclipse E-600 (400 X) acoplado à uma câmara ProSeries High Performance CCD e a um microcomputador contendo o programa Image Pro Plus Software 4.1 (Media

Cybernetics, USA) em sua memória, conforme a técnica descrita por Xavier e colaboradores (2005). Para isto fez-se inicialmente a análise dos cortes, selecionou-se o campo visual de cada corte de gânglio da raiz dorsal, tanto aqueles contralaterais como os ipsilaterais à lesão, e estas imagens foram convertidas em imagens digitais preto e branco na tela do computador. Este aparelho, então, mediu o nível de cinza presente em cada amostra, obedecendo a uma escala de 0-255 níveis de cinza que existe no programa, onde o nível de cinza de cada pixel varia de 0 (preto)-255 (branco).

Em cada imagem, o soma neuronal foi usado para estabelecer a intensidade da imunorreatividade à proteína c-Fos. Para isto um quadrado de área de interesse definida ($93\mu\text{m}^2$) foi inserido no citoplasma e, quando possível no núcleo, de cada neurônio imunorreativo. Este procedimento resultou em um número de pixels. A coloração de fundo foi determinada e utilizada para a correção das leituras de densitometria óptica. A densitometria óptica foi calculada através da seguinte fórmula:

$$OD = -\log\left\{\frac{(I-B) - [(BG-B) - (IT-B)]}{(I-B)}\right\}$$

Onde:

OD: densidade óptica;

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

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

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

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

Todas as condições de luz foram mantidas constantes durante as leituras. O número de pixels obtidos nas leituras foi submetido à análise estatística para a determinação de possíveis alterações nos grupos experimentais.

3.7 - NÚMERO DE NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS À PROTEÍNA c-FOS

O número de neurônios imunorreativos, por μm^2 , nos gânglios das raízes dorsais de animais controle, *sham* e desnervado foi estimado utilizando-se o mesmo software empregado para a mensuração da densitometria óptica (Image Pro Plus Software 4.1 (Media Cybernetics, USA), conforme a técnica descrita por Xavier e colaboradores (2005). Para esta contagem neuronal, 5 (cinco) diferentes cortes de cada gânglio dos animais experimentais foram utilizados, sendo que cada grupo experimental (controle, *sham* e desnervado) foi composto por 5 animais. Um quadrado de área conhecida ($10.350 \mu\text{m}^2$) foi colocado em 3 diferentes regiões de cada corte de gânglio (contralateral e ipsilateral) de cada grupo. Os corpos celulares dos neurônios positivos para c-Fos localizados dentro deste quadrado ou que tocavam a linha superior e/ ou esquerda do quadrado foram contados. Os corpos celulares que tocavam a linha inferior e/ ou direita do quadrado não foram contados.

3.8 - WESTERN BLOT

Os animais utilizados para a medida da expressão da proteína c-Fos (Western Blot) (LAEMMLI et al, 1970) foram sacrificados por decapitação, e a região espinal lombossacral foi imediatamente retirada. Em seguida, este material foi homogenizado com tampão de lise acrescido de inibidores de proteases e detergentes. Após quantificação das proteínas, foi utilizado o sistema mini-protein (Bio-Rad) para separação das proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE (poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio). O homogenizado foi colocado em cada canaleta com tampão de carga (ANEXO 1) e, correram no mesmo gel, padrões de peso molecular. As amostras foram aquecidas a 100°C por 3 min antes de carregar o gel. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose usando um sistema de transferência (mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell), a 110 V por 1h. As membranas foram incubadas com leite em pó desnatado 8% em TTBS, por 90 min, com o objetivo de bloquear ligações inespecíficas. Após 3 lavagens com TTBS, as membranas foram incubadas por 24 horas, a 4°C, com o anticorpo primário para c-Fos (SANTA CRUZ). Este foi do tipo policlonal, (desenvolvido em coelho e correspondendo á porção N-terminal de c-fos p62 de origem humana), na concentração de 1:1000, e diluído em TTBS. A incubação com o anticorpo secundário iniciou após 3 lavagens com TTBS e teve duração de 2 horas, em temperatura ambiente. Todas as incubações foram realizadas sob agitação constante. Após 3 lavagens com TBS, realizou-se a revelação através do sistema de quimiluminescência. Esta ocorreu mediante o uso de sistema de detecção baseado em substratos luminescentes,

com exposição das membranas ao filme radiográfico Hiperfilm (AMERSHAM) por aproximadamente 1 minuto. A autorradiografia gerada foi analisada por meio do analisador de imagens e quantificador (IMAGE MASTER VDS). Para evitar as variações interensaio, as amostras de todos os grupos experimentais foram processadas em paralelo.

3.9 - QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), empregando como padrão solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/ml. As leituras foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de 595 nm.

3.10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação dos resultados obtidos nos testes de ácido acético nos diferentes grupos experimentais empregou-se o teste de análise de variância (ANOVA) para amostras repetidas. Este mesmo teste foi utilizado para a comparação dos resultados da contagem neuronal e da densitometria óptica dos GRDs de rãs controle, *sham* e desnervada. Na análise estatística dos resultados da densitometria óptica, antes da aplicação deste teste os dados foram transformados pelo método de mínimos quadrados ponderados. Na transformação a variância dos tratamentos entrou na composição do peso para a ponderação dos dados. Os resultados obtidos pelo emprego da técnica de western Blot foram

analisados mediante a utilização de ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Kleus. O nível de significância foi de $p < 0,05$ para todos os testes.

4 - RESULTADOS

4.1 - TESTE DO ÁCIDO ACÉTICO

As respostas das rãs controle, sham e desnervadas ao teste do ácido acético mostraram-se similares quando este foi realizado antes dos procedimentos cirúrgicos, ou seja, os animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais apresentaram respostas de limpar as patas estimuladas quando concentrações similares de ácido foram colocadas nas mesmas (Fig. 10). Esta resposta permaneceu sem modificações significativas nos animais controle e sham ao longo de todo o intervalo de observação, tanto na pata ipsilateral como naquela contralateral à lesão. Entretanto, a secção do nervo ciático ocasionou incapacidade do animal executar a limpeza da pata estimulada, uma vez que este não respondeu a nenhuma concentração de ácido acético empregada neste estudo quando a mesma foi colocada na pata ipsilateral à lesão um dia após o procedimento cirúrgico. Todavia, ao terceiro dia os animais apresentaram a resposta de limpar a pata estimulada, manifestando esta ação quando uma concentração mais elevada de ácido foi gotejada na mesma (Fig. 10). A tabela 2

mostra que esta resposta ocorreu quando a concentração correspondente ao número de código 7 foi colocada na pata ipsilateral à lesão. A pata contralateral à lesão destes animais desnervados continuou respondendo com a mesma concentração de ácido que a estimulou no início do experimento, tanto no primeiro como no terceiro dia após a secção do nervo ciático.

Tabela 2 - Variabilidade das respostas das rãs controle, sham e desnervadas ao teste químico do ácido acético durante o período experimental considerado.

	Rã Controle		Rã Sham		Rã desnervada	
	IPSI	CONTRA	IPSI	CONTRA	IPSI	CONTRA
Variação das respostas às concentrações de A. A. (representado pelo nº do código)	2 - 5	2 - 6	3 - 6	3 - 6	3 - 7	3 - 6
Concentração de A. A. prevalente nas respostas (representado pelo nº do código)	4	4	4	4	-	4

Os números da primeira linha indicam os maiores e os menores números dos códigos das soluções de ácido acético (A.A) às quais os diferentes grupos de animais responderam durante a realização do teste químico. Os números da segunda linha mostram os códigos das soluções de A.A. onde um maior número de animais responderam com a reação de limpeza da pata estimulada. Na coluna correspondente aos valores obtidos no animal desnervado, não foram incluídos os resultados do primeiro dia após a desnervação, uma vez que estes animais não responderam a nenhuma concentração empregada. IPSI: ipsilateral à lesão; CONTRA: contralateral à lesão.

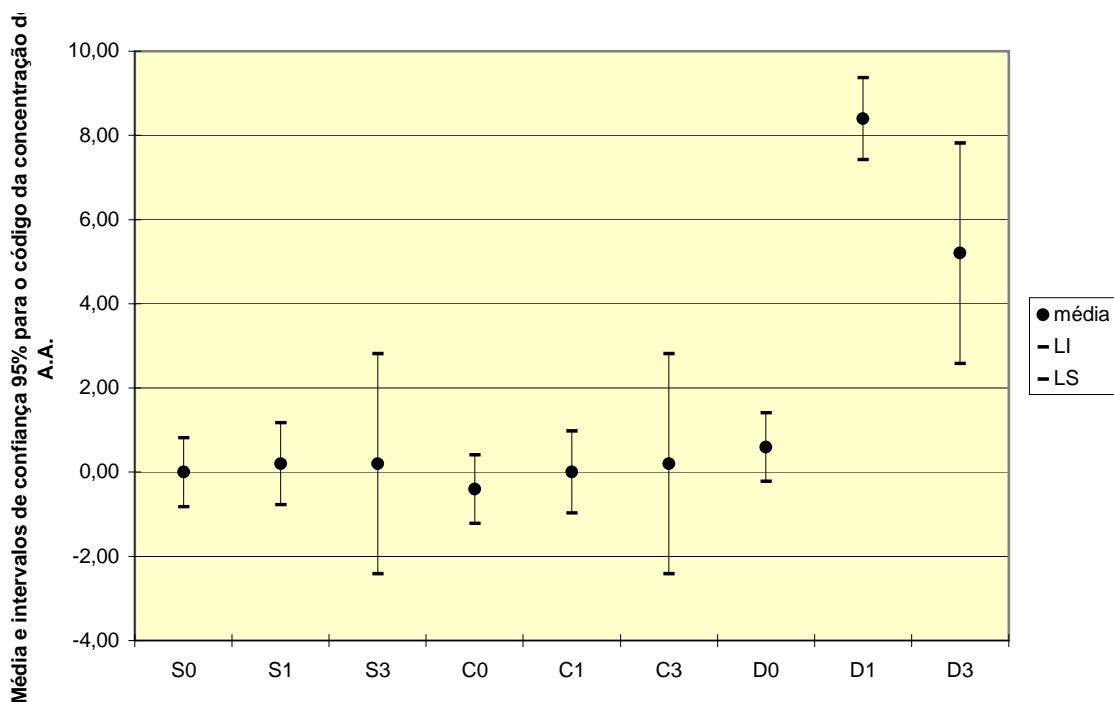


Fig. 10 – Resposta das rãs ao teste do ácido acético aplicado na pata ipsilateral à lesão nos períodos de 0, 1 e 3 dias após a secção do nervo ciático. S0 corresponde ao grupo sham antes da manipulação do nervo ciático; S1 corresponde ao grupo sham no dia 1^o dia após a manipulação do nervo; S3 corresponde ao grupo sham no dia 3^o dia após a manipulação do nervo, C0 corresponde ao grupo controle no dia 0, C1 corresponde ao grupo controle no 1^o dia; C3 corresponde ao grupo controle no 3^o dia; D0 corresponde ao grupo de animais com secção do nervo ciático no dia anterior a este procedimento; D1 corresponde ao grupo de animais com secção do nervo ciático no 1^o dia após o procedimento cirúrgico; e D3 corresponde ao grupo de animais com secção do nervo ciático no 3^o dia após o procedimento cirúrgico. Os valores estão representados em média e intervalos de confiança. LI: limite inferior do intervalo de confiança; LS: limite superior do intervalo de confiança. Análise de variância para amostras repetidas, $p < 0,05$.

4.2 - IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA c-FOS

Neste estudo, a imunorreatividade à proteína c-Fos foi observada tanto no citoplasma como no núcleo das células dos gânglios das raízes dorsais e da medula espinal lombossacral dos animais pertencentes aos 3 grupos experimentais (Figs. 11, 12, 13). Os núcleos celulares imunorreativos à proteína c-Fos apresentaram uma coloração marrom homogênea (Figs. 11, 13, 14, 15, 16), enquanto no citoplasma esta imunorreatividade apareceu como grânulos intensamente corados, visualizados como precipitados de cor marrom (Figs. 11, 12). Outra característica comum que ocorreu no citoplasma de células do gânglio da raiz dorsal das rãs pertencentes aos diferentes grupos experimentais foi o acúmulo de grânulos intensamente corados na região perinuclear. Os padrões de imunorreatividade observados em núcleos de células da medula espinal não foram homogêneos, apresentando variância na intensidade da reação (fraca, intermediária e forte). A omissão do anticorpo primário resultou na perda desta coloração, tanto naquela localizada no núcleo como no citoplasma.

Outras características também foram comuns nas rãs controle, *sham* e desnervadas. O padrão de imunorreatividade à proteína c-Fos nos neurônios dos gânglios das raízes dorsais apareceu predominantemente no citoplasma celular (Figs. 11, 12). Considerando o diâmetro médio destas células, as mesmas foram classificadas em grandes (40-50 μm), médias (25-35 μm) e pequenas (10-20 μm).

Esta imunorreatividade estava presente em células de GRD ipsilateral (Fig. 13) e contralateral à lesão (Fig.12).

Embora não tenha sido realizada análise quantitativa, a simples manipulação do nervo nos animais do grupo *sham*, bem como a secção deste no grupo desnervado ocasionou um maior aparecimento de imunorreatividade à proteína c-Fos no núcleo de pequenas células dos gânglios localizados ipsilateralmente à injúria periférica. Nos animais controle, por sua vez, não pareceu ocorrer mudanças na quantidade de núcleos imunorreativos. No entanto, nos três grupos experimentais a imunorreatividade à proteína c-Fos ainda foi prevalente no citoplasma das células do GRD imunorreativas no intervalo de tempo considerado, ou seja, três dias.

Na medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* dos grupos controle, sham e desnervado, a imunorreatividade à proteína c-Fos foi observada predominantemente em núcleos celulares localizados tanto na substância branca quanto na substância cinzenta (Fig. 13). Todavia, o número de núcleos imunorreativos foi maior na substância cinzenta. Nesta região, a imunorreatividade nuclear apareceu com intensidade fraca, intermediária e forte nos 3 grupos em estudo. Um grande número de núcleos intensamente corados foram observados nas regiões do campo terminal ventral, na banda mediolateral e na região ventral medial do corno ventral (Fig. 13). Todas estas regiões também apresentaram núcleos com coloração de intensidade fraca e intermediária. No campo terminal dorsal também foram encontrados núcleos intensamente corados, porém seu

número foi menor do que nas regiões acima citadas (Figs. 13, 14). No corno ventral, os núcleos dos neurônios motores localizados lateralmente sempre mostraram intensa imunorreatividade à proteína c-Fos (Fig. 13, 15). Núcleos imunorreativos foram ainda observados na região ventral medial do corno ventral (Fig.13). Na substância branca, núcleos fortemente corados foram observados nos funículos lateral e ventral medial (Figs.13, 16).

Uma análise qualitativa dos cortes de medula espinal lombossacral de rãs *sham* e desnervadas revelou que 3 dias após a injúria periférica houve um maior aparecimento de núcleos intensamente corados na região do campo terminal dorsal (Fig.14). Este acréscimo também apareceu nas regiões do campo terminal ventral e da banda mediolateral, porém não foi tão acentuado como na região do campo terminal dorsal. As demais regiões Fos-ir apresentaram o mesmo padrão de imunorreatividade. Nos animais do grupo controle não foram detectadas mudanças na distribuição das células Fos-ir.

Fig. 11 - Imunorreatividade à proteína c-Fos no citoplasma (seta larga) e nos núcleos (seta curva) de neurônios de gânglio da raiz dorsal ipsilateral à lesão de rãs *Rana catesbeiana* 3 dias após a secção do nervo ciático. (A e B) Animais controle; (C e D) animais *sham*; (E e F) animais desnervados. As setas largas indicam neurônios de diâmetro médio e as setas finas indicam neurônios de pequeno diâmetro. Barra de calibração: A, C, E = 50 μ m; B, D, F = 20 μ m

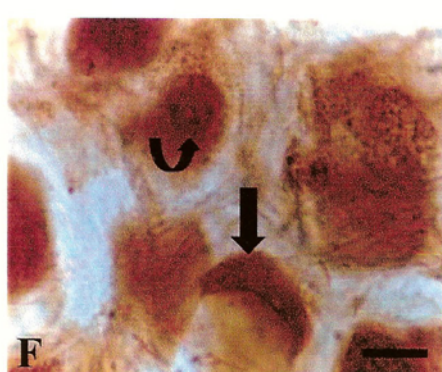
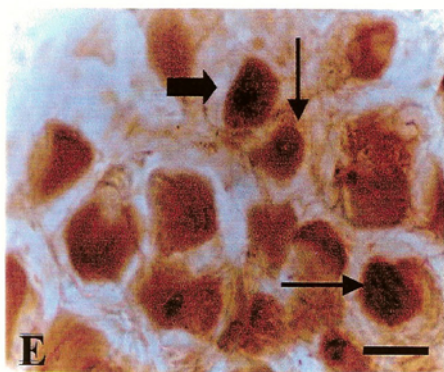
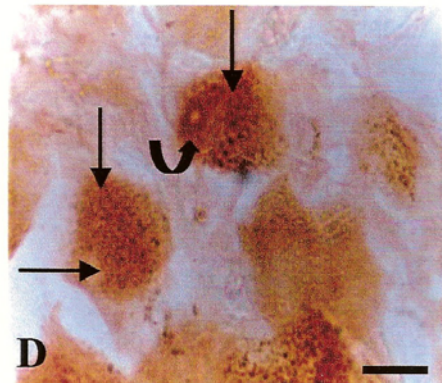
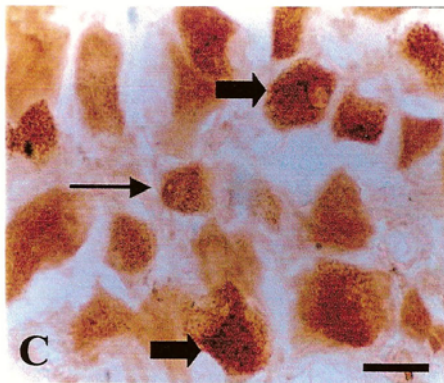
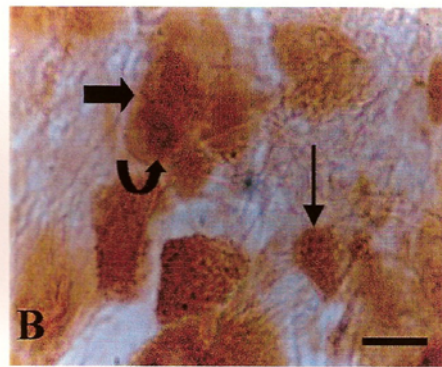
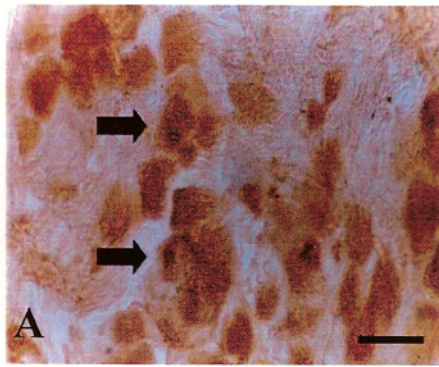


Fig. 12 - Imunorreatividade à proteína c-Fos em citoplasma (seta larga) de neurônios de gânglio da raiz dorsal contralateral à lesão de rãs *Rana catesbeiana* 3 dias após a secção do nervo ciático. (A e B) Animais controle; (C e D) animais *sham*; (E e F) animais desnervados. As setas grossas indicam neurônios de diâmetro médio e as setas finas indicam neurônios de pequeno diâmetro. Barra de calibração: A, C, E = 50 μ m; B, D, F = 20 μ m

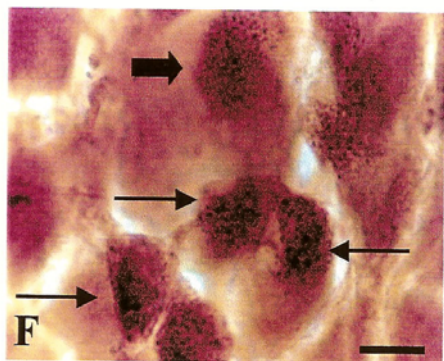
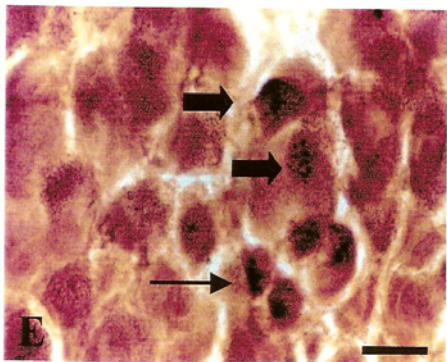
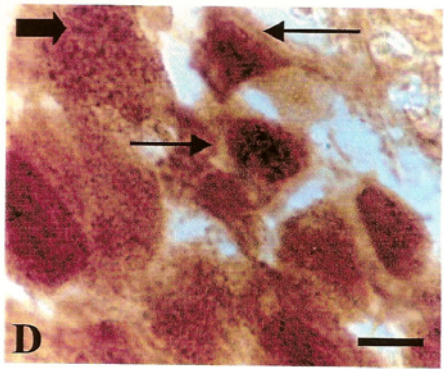
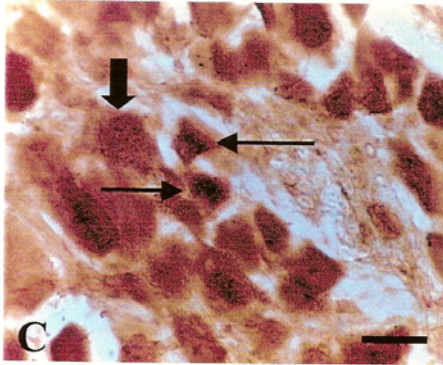
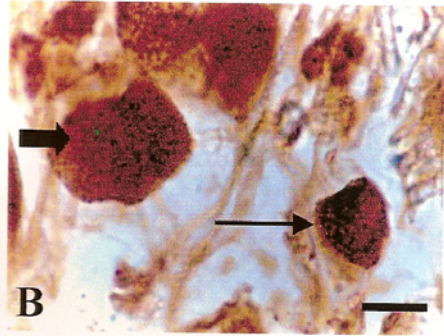
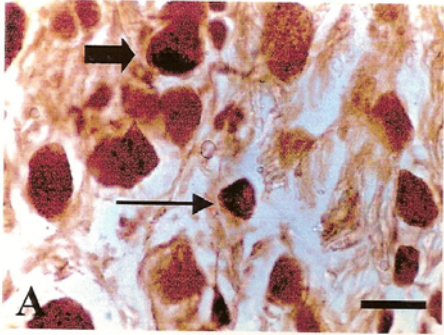


Fig. 13 - Fotomontagem da medula espinal lombossacral de rã *Rana catesbeiana*, controle, mostrando a presença de imunorreatividade à proteína c-Fos em núcleos (setas) celulares localizados nas regiões dos funículos dorsal (FD), lateral (FL) e ventral (FV), nos campos terminais dorsal (CTD) e ventral (CTV), na banda mediolateral (BML) e no corno ventral (CV). As setas grossas pequenas indicam núcleos imunorreativos no CTD, na BML, no CTV e no CV, enquanto as setas finas indicam núcleos de neurônios motores do CV imunorreativos a esta proteína. As cabeças de setas indicam, por sua vez, núcleos imunorreativos no FL e no FV, enquanto as setas vazadas apontam para núcleos com intensidade intermediária. FD: funículo dorsal; CC:canal central. Barra de calibração = 190µm.

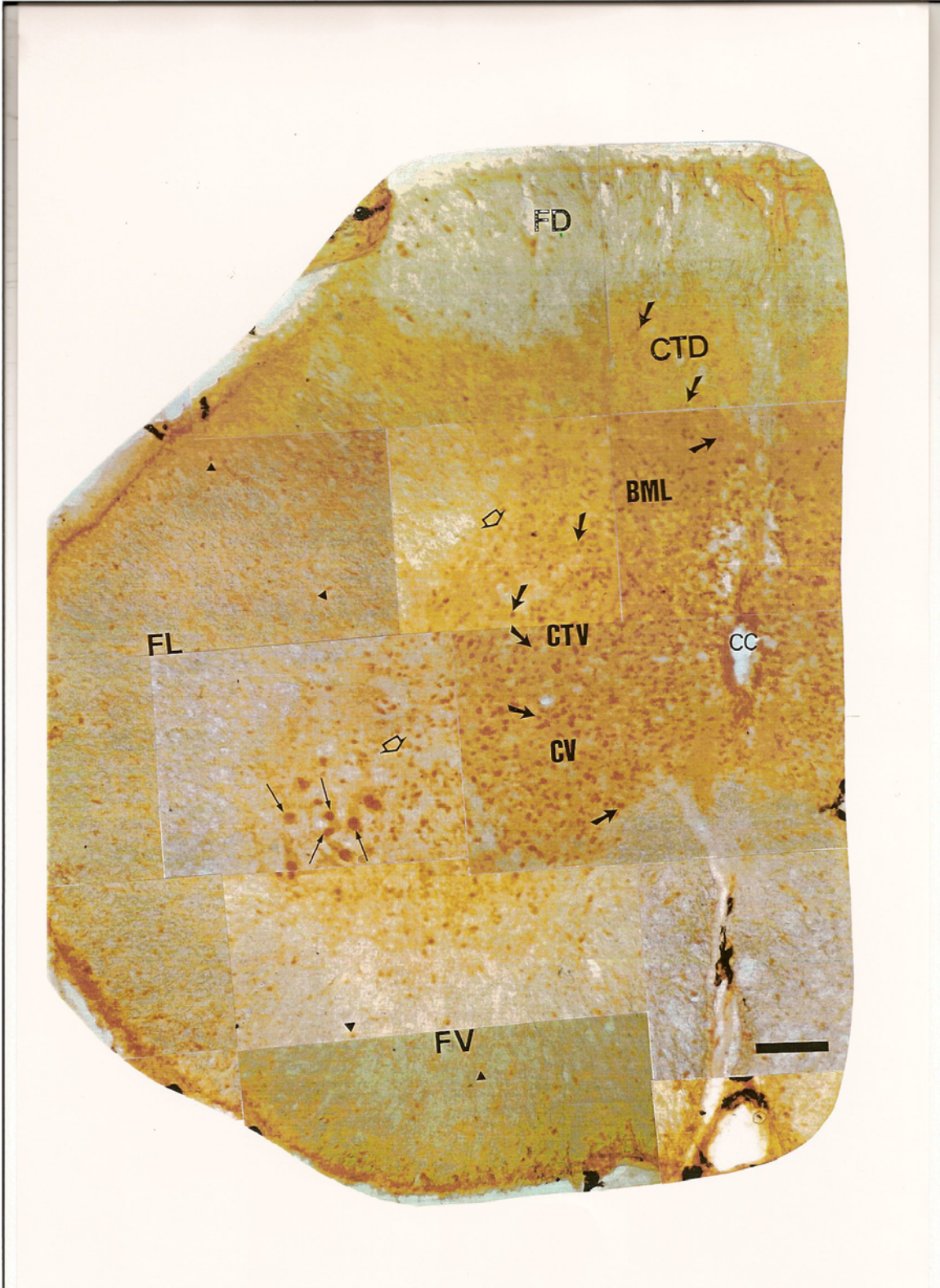


Fig. 14 - Imunorreatividade à proteína c-Fos em núcleos (setas) de células localizadas na região do campo terminal dorsal de medula espinal de rãs *Rana Catesbeiana* controle (A), *sham* (B) e desnervada (C). Note a maior quantidade de neurônios imunorreativos na região do campo terminal dorsal de rãs desnervadas (C). (FD) funículo dorsal. Barra de calibração = 50 μ m

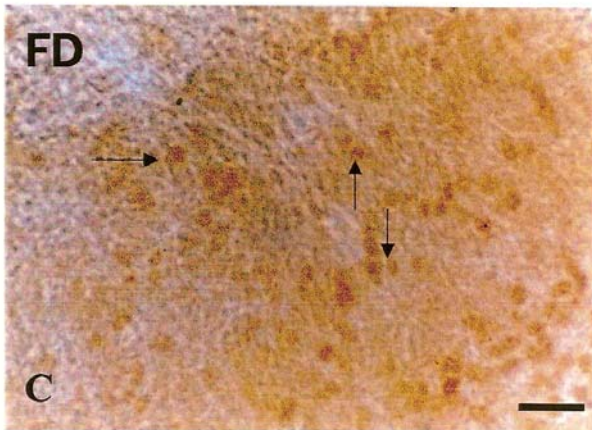
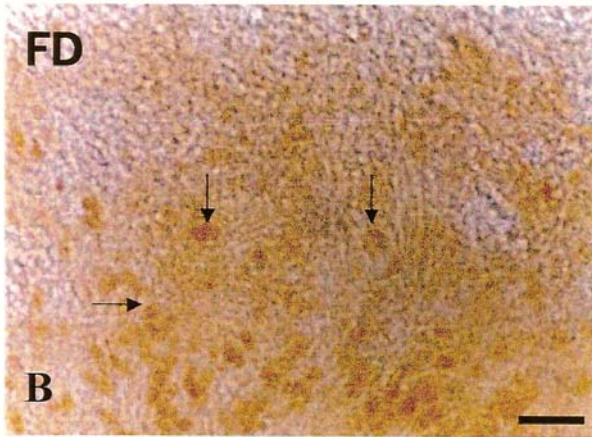
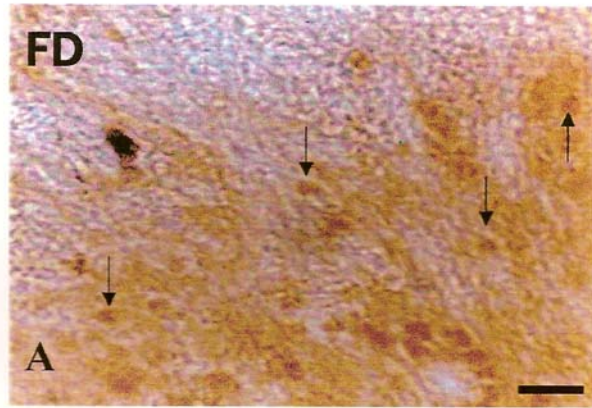


Fig. 15 - (A) Imunorreatividade à proteína c-Fos em núcleos (setas) de neurônios motores localizados lateralmente no corno ventral da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* controle. (B) Detalhe em maior aumento dos núcleos (setas) de neurônios motores do corno ventral espinal imunorreativos à proteína c-Fos. Barra de calibração: (A) = 50 μ m; (B) = 20 μ m

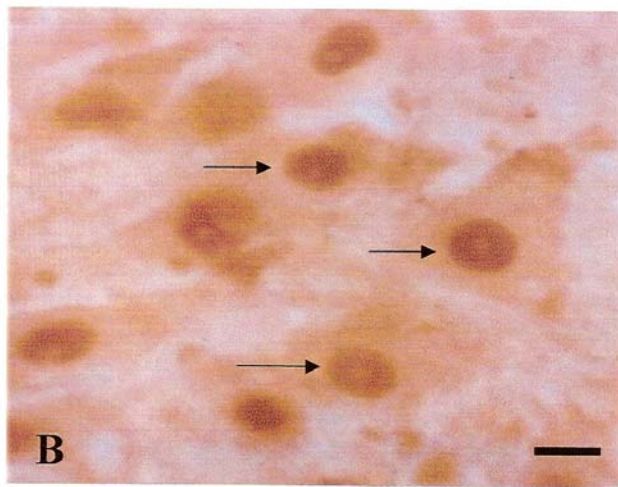
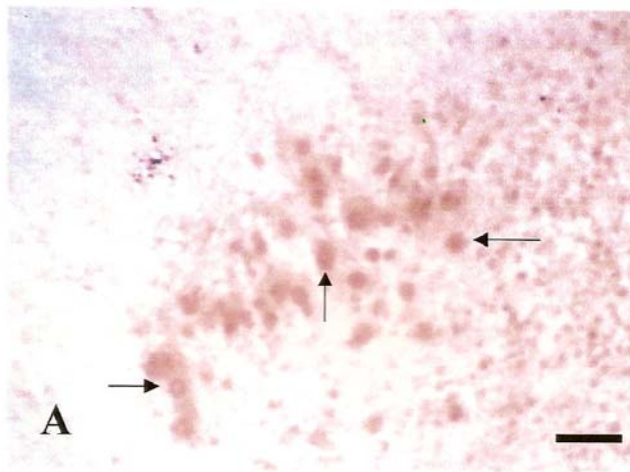
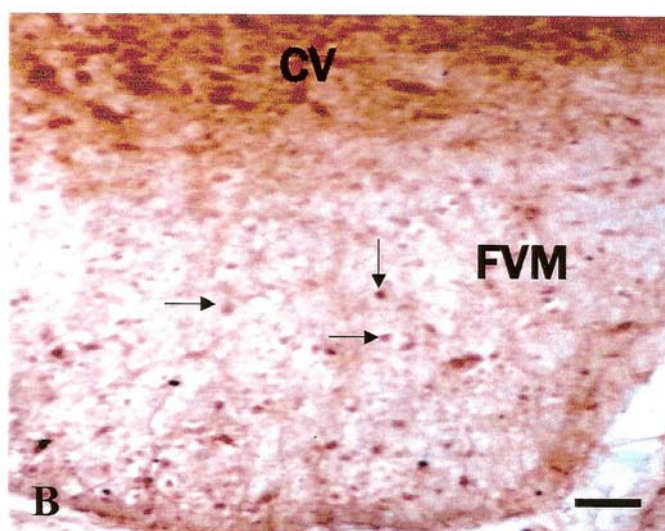
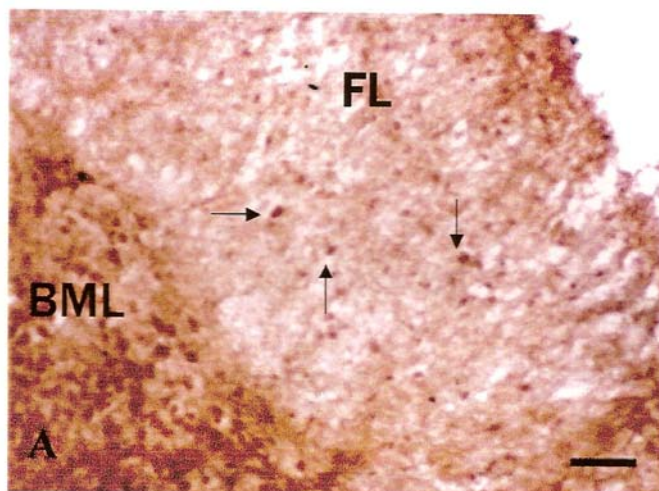


Fig. 16 - Imunorreatividade à proteína c-Fos em núcleos de células (setas) localizadas nos funículos (A) lateral (FL) e (B) Ventromedial (FVM) da medula espinal de rãs *Rana catesbeiana* controle. (BML) Banda Médiolateral; (CV) Corno ventral. Barra de calibração = 50 μ m



4.3 - NÚMEROS DE NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS À PROTEÍNA c-FOS

O número de células Fos-ir dos gânglios das raízes dorsais de animais controle, sham e desnervado, não modificou significativamente, ou seja, este número mostrou-se similar nestes diferentes grupos experimentais. Esta similaridade ocorreu tanto nos gânglios ipsilaterais como contralaterais à injúria periférica (Fig.17). Cabe ressaltar que, para a realização desta contagem neuronal foram utilizados todos os neurônios localizados dentro da área de análise, independente do tamanho dos mesmos, pois, neste momento, foi impossível separá-los de acordo com os seus diâmetros médios.

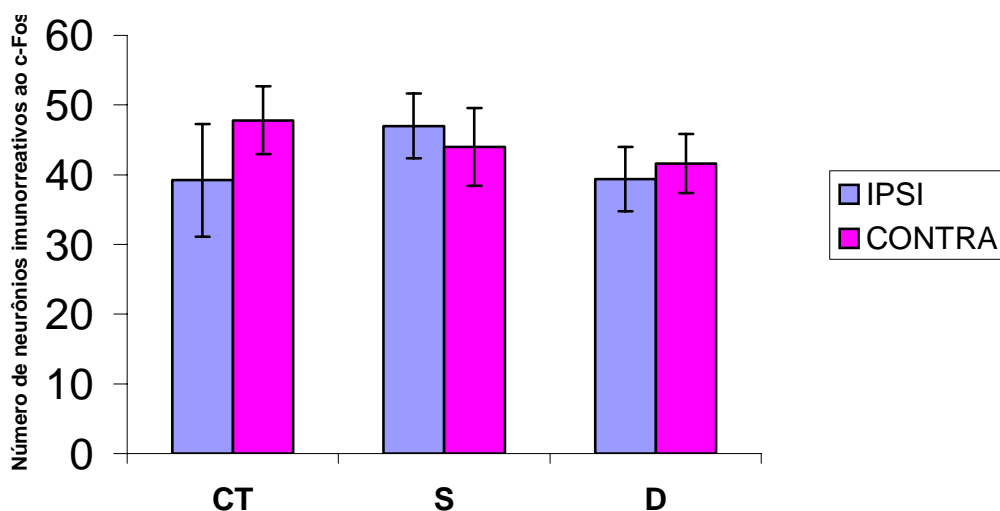


Fig. 17 - Número de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos em gânglios das raízes dorsais, localizados ipsilateral (IPSI) e contralateral (CONTRA) à injúria periférica, de rãs *Rana catesbeiana* controle (CT) e submetidas a manipulação do nervo ciático (S) e a secção deste nervo (D). Estes resultados foram obtidos 3 dias após a realização da injúria periférica. Os resultados estão representados por médias \pm erro padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Análise de variância para amostras repetidas, $p < 0,05$).

4.4 DENSITOMETRIA ÓPTICA DOS NEURÔNIOS DOS GÂNGLIOS DAS RAÍZES DORSAIS

A densitometria óptica da imunorreatividade à proteína c-Fos no citoplasma de células dos GRDs das rãs pertencentes aos grupos controle, sham e desnervado mostrou uma maior imunorreatividade no citoplasma das células dos GRDs pertencentes aos animais do grupo *sham*. Este acréscimo foi significativo quando comparado aos valores obtidos nos grupos controle e desnervado (Fig. 18). O grupo desnervado, por sua vez, apresentou os menores valores de densitometria citoplasmática, sendo esta diminuição estatisticamente significativa quando comparada à dos grupos *sham* e controle. Já a densitometria óptica nuclear não diferiu significativamente entre os 3 grupos experimentais (Fig. 19).

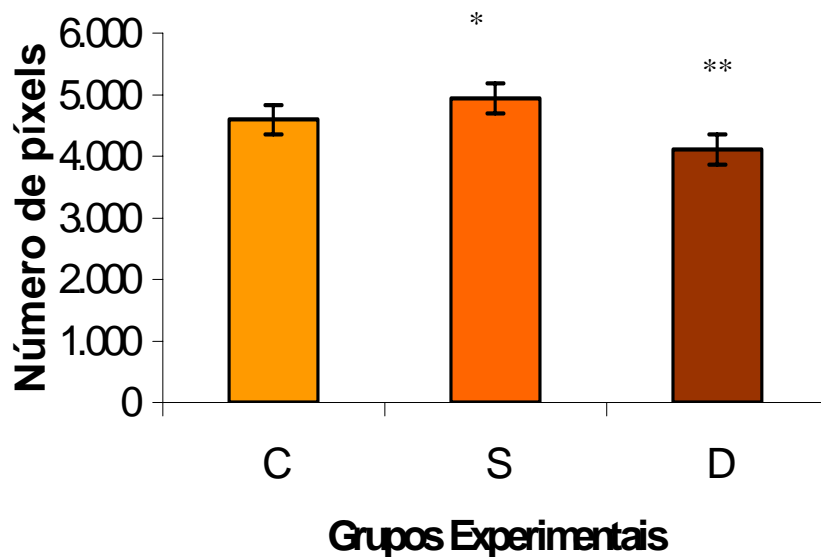


Fig. 18 - Densitometria óptica da imunorreatividade à proteína c-Fos localizada no citoplasma de células do GRD de rãs *Rana catesbeiana* controle (CT) e submetidas à manipulação do nervo ciático (S) e à secção deste nervo (D). Estes resultados foram obtidos 3 dias após a realização da injúria periférica. Os resultados estão representados por médias obtidas pela transformação dos resultados pelo método dos mínimos quadrados ponderados. * Diferença significativa em relação aos grupos controle e desnervado. ** Diferença significativa em relação aos grupos sham e controle. (Análise de variância para amostras repetidas, $p < 0,05$).

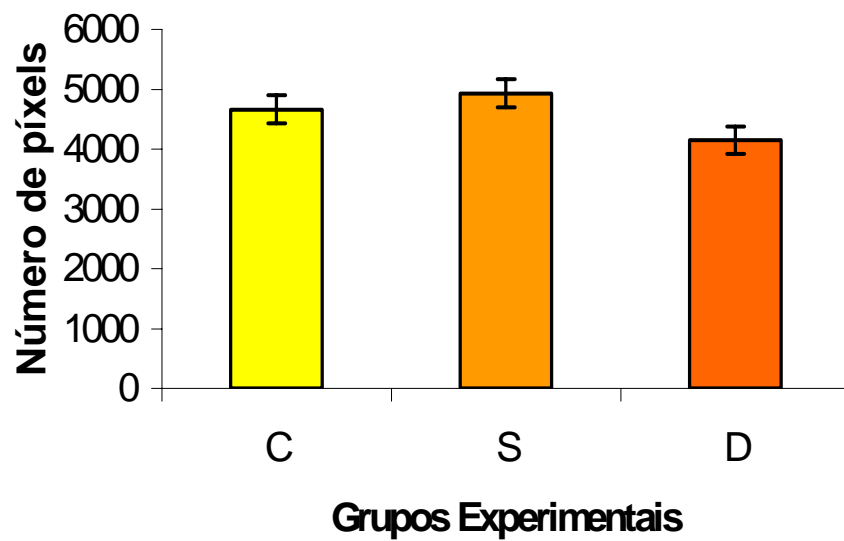


Fig. 19 - Densitometria óptica da imunorreatividade à proteína c-Fos localizada no núcleo de células do GRD de rãs *Rana catesbeiana* controle (CT) e submetidas a manipulação do nervo ciático (S) e a secção deste nervo (D). Estes resultados foram obtidos 3 dias após a realização da injúria periférica. Os resultados estão representados por médias obtidas pela transformação dos resultados pelo método dos mínimos quadrados ponderados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (Análise de variância para amostras repetidas, $p < 0,05$).

4.5 WESTERN BLOT

Os resultados obtidos pela técnica de Western Blot revelaram uma banda clara de 62 kDa, a qual ocorreu em todos os grupos experimentais. Esta banda apresentou intensidade de coloração similar nos grupos controle, *sham* e desnervado (Topo da Fig 20). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão desta proteína em medula espinal lombossacral de rãs controle, *sham* e desnervadas (Fig. 20).

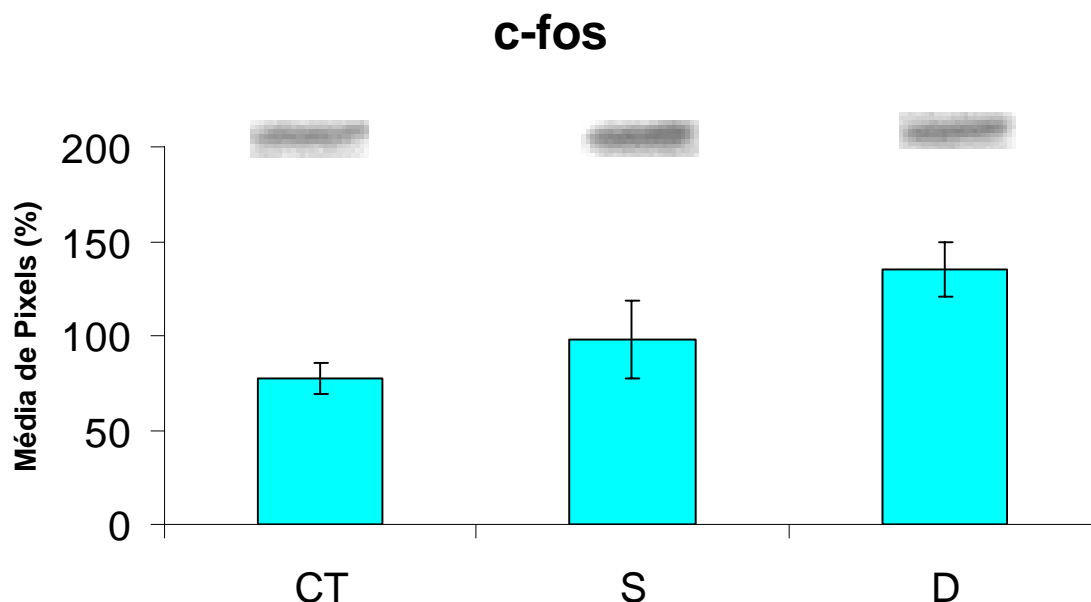


Fig. 20 - Expressão da proteína c-Fos em medula espinal lombossacral de rãs *Rana catesbeiana* em estado basal (CT) e após a manipulação do nervo ciático (S) e a secção do mesmo (D). Estes resultados foram obtidos 3 dias após a injúria periférica. Os resultados estão representados em percentuais em relação aos valores obtidos de animais controles. Acima de cada barra é apresentada a banda correspondente a este grupo experimental. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls, $p < 0,05$).

5 - DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou o padrão de imunorreatividade à proteína c-Fos na medula espinal lombossacral e no gânglio da raiz dorsal de rãs *Rana catesbeiana* em situação basal e três dias após a manipulação e a secção do nervo ciático. É evidente que não se pode descartar a possibilidade de que a imunorreatividade aqui observada possa ser decorrente da reação dos anticorpos com proteínas FRAs. Todavia, está demonstrado que as proteínas FosB, Fra1 e Fra2 possuem pesos moleculares de 40, 38 e 35 kDa, respectivamente (HERDEGEN & LEAH, 1998), sendo que neste trabalho a proteína c-Fos da medula espinal lombossacral mostrou uma banda clara e única de 62 kDa. Isto demonstra que a imunorreatividade observada trata-se, em sua maioria, da reação do anticorpo com a proteína c-Fos. Em hipotálamo de rãs, o emprego da técnica de northern blot revelou a presença de uma única banda, tendo esta 1,9 Kb (COBELLIS et al., 1999a).

Um resultado interessante neste estudo foi a presença desta imunorreatividade principalmente no citoplasma de células dos GRDs de rãs pertencentes aos três grupos experimentais. A presença de c-Fos no citoplasma

celular parece ser uma característica destes animais, já que foi relatada a ocorrência da mesma no citoplasma de neurônios hipotalâmicos e espermatogônias de rãs (COBELLIS et al., 1999 a; b; COBELLIS et al., 2002a; b).

A presença de IEGs no citoplasma celular parece ser uma característica que apareceu precocemente durante a evolução. Rigon (2005) observou a predominância de imunorreatividade à proteína c-Fos no citoplasma de células localizadas nos gânglios cerebrais, pedais, parietal direito e visceral do molusco gastrópode *Megalobulimus abbreviatus* após estimulação nociceptiva. O mesmo foi observado no molusco gastrópode *Cepaea nemoralis*, onde a atividade imunorreativa à proteína c-Jun não restringiu-se apenas ao núcleo celular, mas também ocorreu no soma e nos prolongamentos celulares (DYAKONOVA et al., 1999). Esta proteína também foi localizada no citoplasma de células de peixes teleósteos, abelhas, gafanhotos, besouros e grilos (WEGERHOFF et al., 1998; FONTA et al., 1995 apud DYAKONOVA et al., 1999). Em mamíferos, c-Fos ocorreu no citoplasma de células de Purkinje do cerebelo de ratos em estado basal (TIAN & BISHOP, 2002). Foi encontrada ainda no citoplasma de células gliais localizadas próximas de áreas lesionadas do SNC (PHILLIPS & BELARDO, 1994) e em axônios do eixo hipotálamo-hipófise (SKUTELLA et al., 1995) de ratos. Assim, pode-se sugerir que esta característica se manteve ao longo da evolução.

Uma complicação para a aceitação desta hipótese é que a ocorrência de c-Fos no citoplasma apareceu em diferentes regiões encefálicas, sendo difícil correlacionar a atividade citoplasmática e a função do neurônio. Quando se

considera apenas neurônios do GRD, os dados até agora obtidos, os quais foram provenientes de estudos em mamíferos, mostraram que os IEGs predominam na região nuclear destes neurônios (ACHAVAL, 1991; BUSCHMANN et al., 1998; COGESHALL, 2005). Além disso, a presença destes genes em animais em condições basais parece depender da espécie considerada. Em gânglios sensoriais trigeminais de cobaias foi encontrada uma grande quantidade de células imunorreativas à proteína c-Jun, enquanto foi baixo o número de células Fos-ir (GRONEMBERG et al., 2001). Já em camundongos e ratos, sob condições basais, as proteínas c-Fos e c-Jun foram expressas em menos de 1% dos neurônios sensoriais, o que levou os autores a sugerirem que as mesmas não ocorrem nestas células. Assim, seria interessante a demonstração da presença ou não destas proteínas em células sensoriais de outras espécies de mamíferos, bem como de peixes e aves, o que poderá esclarecer se a ocorrência de IEGs nestes neurônios é uma característica de vertebrados ou constitui uma peculiaridade das rãs.

De acordo com Gronemberg e colaboradores (2001), o c-Jun existente em células sem nenhuma estimulação aparente poderia estar indicando o envolvimento deste no metabolismo celular. É provável que a presença da proteína c-Fos no citoplasma neuronal de GRD de rãs, em condições basais, esteja indicando que esta proteína tenha algum papel no metabolismo basal destas células, assim como foi sugerido para o c-Jun em células sensoriais de cobaias (GRONEMBERG et al., 2001). Todavia, somente estudos mais detalhados poderão elucidar esta hipótese. Porém, cumpre ressaltar que a presença da

proteína c-Fos no citoplasma de neurônios hipotalâmicos e espermatogônias de rãs, em estado basal, foi considerada uma provável reserva da mesma, a qual poderia ser translocada para o núcleo mediante estímulos apropriados (COBELLIS et al., 1999 a; b; COBELLIS et al., 2002a; b).

De acordo com Cobellis e colaboradores (1999a), o aparecimento do fator de transcrição fos no núcleo neuronal correlaciona-se com o aumento da atividade de síntese direcionada pela liberação de neurotransmissores/neuromoduladores após a quiescência do inverno. Em testículo de rãs, a presença de c-Fos no citoplasma de espermatogônias prevaleceu durante os períodos de quiescência testicular, ocorrendo o predomínio da atividade nuclear quando houve um aumento na espermatogênese (COBELLIS et al., 2002). No presente estudo observou-se que a manipulação e a secção do nervo ciático de rãs ocasionou um aumento no número de núcleos imunorreativos à proteína c-Fos no GRD ipsilateral à lesão. É possível que este maior número de núcleos imunorreativos seja consequência da translocação da proteína c-Fos citoplasmática para o núcleo em virtude da ativação dos nociceptores periféricos. Em cerebelo de rato, a ativação das fibras trepadeiras resultou no aparecimento de c-Fos no núcleo de células de Purkinje, cuja atividade ocorreu no citoplasma celular antes da aplicação do estímulo elétrico (TIAN & BISHOP, 2002). Neste mesmo animal, a estimulação de axônios do eixo hipotálamo-hipófise fez o mRNA de c-fos movimentar retrogradamente para o respectivo núcleo hipotalâmico (SKUTELLA et al., 1995). Assim, também em mamíferos parece ocorrer a translocação da proteína c-Fos citoplasmática para o núcleo. Em nosso trabalho, provavelmente

esta translocação da proteína c-Fos seja a explicação para o menor valor da densitometria óptica citoplasmática das células ganglionares de rãs desnervadas e o aumento no número de células pequenas imunorreativas. Nos animais *sham*, pela presença de somente lesão tecidual, é possível que tenha ocorrido uma menor translocação da proteína citoplasmática para o núcleo, porém um acréscimo na síntese da mesma. Já nos animais desnervados deve ter ocorrido também um aumento na síntese da proteína c-Fos no citoplasma celular, havendo, entretanto, uma maior translocação desta para o núcleo.

Pode-se sugerir aumentos na síntese desta proteína pelo fato de que, em mamíferos, Cogeshall (2005) descreve que a expressão de c-Fos aparece precocemente, o que pode ser resultado do procedimento de lesão nervosa a que estes animais estão submetidos, sendo o tempo de permanência da expressão de c-Fos variado, podendo ou não estar correlacionado com o comportamento de hiperalgesia destes animais. Outros autores também salientaram acréscimo nesta proteína após a aplicação de estímulos nocivos periféricos em mamíferos (RASHID & UEDA, 2005; BON et al., 2002; BURITOVA & BESSON, 2002, YASPAL et al.,1998; DELLANDER, 1997; KAJANDER, 1996; HUNTER et al.,1995, CHI et al.,1993; ACHAVAL, 1991). Em rãs, similar aos mamíferos, a nocicepção também parece induzir aumentos na proteína c-Fos. Entretanto, diferente dos mamíferos, este estímulo sensorial é capaz de induzir a translocação da proteína citoplasmática para o núcleo. Cobellis e colaboradores (1999) descrevem que anfíbios podem apresentar uma expressão crônica de c-fos, e as mudanças na sua atividade podem não estar somente restrita a curtos períodos como em

mamíferos. Nestes, a proteína c-Fos foi rápida e transitoriamente expressa mediante a presença de estímulos apropriados. Em ratos, a injeção intraplantar de formalina produziu acréscimo significativo de neurônios Fos-ir na medula espinal, o qual atingiu um pico em 60-120 minutos após o estímulo nociceptivo (BON et al., 2002). De acordo com Hunter e colaboradores (1995), o aumento de c-Fos inicia-se 15 minutos após a injúria e estende-se por até 4 horas. Em mamíferos, o gene c-fos foi rapidamente e transitoriamente expresso em neurônios em resposta a estímulos externos, sendo que a ativação transcricional ocorreu poucos minutos após sua estimulação. Seu RNAm acumula-se transitoriamente por 1-2 horas no citoplasma, sendo que seu pico de acúmulo ocorreu em aproximadamente 30 – 40 minutos, e a meia-vida da proteína c-Fos foi de 2 horas após sua transcrição gênica (NARANJO et al., 1991a; HARRIS, 1998; MORGAN & CURRAN, 1989).

CHI e colaboradores (1993) relataram que a transecção do nervo ciático, em ratos, induziu, na medula espinal, a expressão de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos. Diferentemente dos outros trabalhos, estes autores afirmam que a proteína c-Fos pode ser expressa até um mês após a injúria axonal. Isto também pode estar ocorrendo em rãs, mas para o esclarecimento desta hipótese torna-se necessário o acompanhamento das mudanças na imunoreatividade e na expressão de c-Fos medular por um intervalo de tempo maior. É provável que a inexistência de mudanças estatisticamente significativas nos valores da densitometria óptica nos núcleos celulares dos três grupos experimentais seja decorrente da igualdade dos mecanismos de degradação desta proteína nestes animais, o que também necessita de estudos adicionais para sua confirmação.

Pode-se inferir ainda neste trabalho que a ausência de mudanças estatisticamente significativas no número de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos nos GRDs dos animais controle, *sham* e desnervado deva-se provavelmente ao fato de que foi considerado o número total de neurônios imunorreativos, não tendo sido realizada a separação por diâmetros. É provável que uma contagem onde se faça a separação por diâmetros mostre a existência de modificações significativas nos grupos *sham* e desnervado.

A análise qualitativa realizada no presente estudo mostrou a presença de um maior número de células com pequeno diâmetro imunorreativas à proteína c-Fos nos grupos *sham* e desnervado. Como estas células estão envolvidas na nocicepção em anfíbios (STEEVENS, 2004), parece viável a sugestão de que a ativação de fibras aferentes primárias nestes animais induza a um aumento na imunorreatividade à proteína c-Fos nestas células. Se esta hipótese for verdadeira, este resultado é similar àquele obtido em mamíferos, onde a ativação de nociceptores periféricos também induziu acréscimos na imunorreatividade desta proteína em GRDs (COGESHALL, 2005, RASHID & UEDA, 2005; BON et al., 2002; BURITOVA & BESSON, 2002, YASPAL et al., 1998; DELLANDER, 1997; KAJANDER, 1996; HUNTER et al., 1995, CHI et al., 1993). Entretanto, torna-se intrigante o fato de que as rãs do grupo *sham* e desnervado não apresentaram hiperalgesia. Em mamíferos, a manipulação e a secção do nervo ciático provocam hiperalgesia (KEAY et al., 2004). Em rãs, a lesão tecidual não alterou significativamente o limiar nociceptivo. A secção do nervo ciático, por sua vez,

resultou em um acréscimo deste limiar quando a mesma manifestou a resposta de limpeza da pata estimulada. Possivelmente esta diferença seja devido à presença de peptídeos similares aos opióides na pele das rãs (AMICHE et al., 1998; BADIO et al., 1994; GRAHAM et al., 2005). Porém, deve ser também considerada a possibilidade de que este aumento do limiar nociceptivo seja o resultado da lesão nervosa periférica, estando estes ainda com déficits sensoriais e motores na pata lesionada. Contudo, somente estudos mais detalhados abordando esta questão poderão elucidar esta hipótese.

Outro achado que permite relacionar c-Fos e nocicepção é o aumento dos núcleos imunorreativos na região do campo terminal dorsal de rãs dos grupos *sham* e desnervado. Está demonstrado que esta região corresponde às lâminas I-IV dos amniotas, recebendo informações de aferentes sensoriais primários (ADLI et al., 1988). Deste modo, em rãs, similar ao que ocorre em mamíferos, a lesão periférica induz aumento na proteína c-Fos nas regiões superficiais da substância cinzenta do corno dorsal da medula espinal. Esta hipótese encontra apoio nos resultados experimentais que demonstraram que, em mamíferos, a ativação de nociceptores periféricos, seja por indução de inflamação tecidual, secção ou constrição do nervo periférico, produz aumento na imunoreatividade à proteína c-Fos nas lâminas superficiais e, posteriormente, profundas da substância cinzenta do corno dorsal da medula espinal, sendo estas as lâminas I – II, V- VI e X (BON et al., 2002; COGESHALL, 2005; ACHAVAL, 1991).

A técnica de western blot não revelou um acréscimo significativo na expressão da proteína c-fos em medula espinal de rãs dos grupos *sham* e desnervado. É possível que este resultado tenha ocorrido pelo fato de ter sido utilizado todo o segmento lombossacral da medula espinal destes animais. É provável ainda que a ausência de diferenças significativas na expressão desta proteína na medula espinal lombossacral de rãs seja decorrente de ter sido considerado apenas o intervalo de 3 dias. Possivelmente seja necessário um período de tempo maior para a verificação de alterações estatisticamente significativas na expressão de c-Fos. Em ratos, a secção e a constrição do nervo ciático ocasionou um aumento na imunorreatividade à proteína c-Fos nas lâminas superficiais da medula espinal, a qual já estava presente no primeiro dia após a injúria periférica, sendo o seu pico de imunorreatividade observado ao quinto dia (KAJANDER et al., 1996). Como em rãs o processo de ativação da transcrição do gene c-fos por estímulos externos parece ser mais lento do que em mamíferos (COBELLIS et al., 1999a; b), esta hipótese corroboraria com os dados do presente estudo.

Até este momento não é possível determinar se as mudanças na expressão da proteína c-Fos na medula espinal de rãs foram ipsilaterais ou bilaterais. Em mamíferos, as modificações da proteína c-Fos induzidas por estímulos nocivos periféricos foram restritas ao lado ipsilateral da medula espinal em uma vasta quantidade de estudos (COGGESHAL, 2005; SHIMORAMA et al., 2005; NISHIMORI et al., 2002; RAHAM et al., 2005; CATHELIN et al., 1998; KAJANDER, et al., 1996; HERDEGEN et al., 1993). Porém, de acordo com alguns

autores, estas alterações estendem-se ao lado contralateral da medula espinal (COGGESHAL, 2005; RO et al., 2004; YAMAZAKI et al., 2001; ACHAVAL, 1991; MENETREY et al., 1989; HUNT et al., 1987). Desta forma, torna-se necessário a realização de estudos abordando esta questão em anfíbios.

Um resultado intrigante revelado pela técnica de imunistoquímica foi a grande quantidade de núcleos imunorreativos à proteína c-Fos na medula espinal de rãs em condições basais. Cobellis e colaboradores (1999a) demonstraram a predominância desta proteína em núcleos neuronais localizados no hipotálamo de rãs quando estes animais foram coletados no verão, o que não ocorreu nas demais estações do ano. Os animais empregados no presente estudo também foram coletados e sacrificados no verão. Possivelmente a predominância de imunorreatividade nuclear na medula espinal seja decorrente deste fato. Assim, nestes animais torna-se interessante determinar as alterações no padrão de imunorreatividade da proteína c-Fos nas diferentes estações do ano.

No hipotálamo e em testículos de rãs, a estação do ano é um fator importante na determinação da expressão de c-Fos no citoplasma e no núcleo celular, ocorrendo predomínio da atividade nuclear nos períodos de reprodução e acasalamento (COBELLIS et al., 1999 a; b; COBELLIS et al., 2002a; b). Se esta for uma característica do tecido neural de rãs, torna-se necessário considerar a variação sazonal nos estudos acerca de c-Fos em SN de rãs.

É provável que a presença de c-fos em núcleos de neurônios motores do corno ventral da medula espinal de rãs, em condições basais, seja também decorrente do efeito da estação do ano. Entretanto, apesar desta proteína ter sido observada no núcleo de neurônios motores tanto de rãs controle quanto *sham* e desnervadas, não se pode descartar a hipótese de que a expressão de c-Fos esteja aumentada nos animais dos grupos *sham* e desnervado. Possivelmente a realização de densitometria óptica no núcleo destas células possa demonstrar esta possível alteração, o que não foi realizado no presente estudo. Em ratos, a aplicação de estímulo elétrico nocivo em pata anterior e posterior provocou o aparecimento de c-Fos em células localizadas no corno ventral da medula espinal destes animais (LAWRENCE et al., 2004). Outros autores também descreveram a presença de imunorreatividade ao c-Fos no núcleo de células localizadas no corno ventral de ratos submetidos à estimulação nociva periférica, estando esta localizada principalmente na lâmina VII (KING & APPS, 2002). De acordo com Lawrence e colaboradores (2004), a presença de c-Fos em núcleos localizados no corno ventral da medula espinal provavelmente esteja relacionada com respostas reflexas. É possível que isto também ocorra em rãs. Nestes animais houve um acréscimo no número de núcleos imunorreativos na região do campo terminal ventral. Esta região recebe aferências dos fusos musculares, e nela estas aferências podem ainda fazer conexões monossinápticas diretas com os prolongamentos de neurônios motores espinais (MEARS & FRANK, 1994), havendo, assim, um substrato morfológico para o desencadeamento de respostas reflexas. Outro apoio para esta hipótese é o fato de que também ocorreu acréscimo no número de núcleos imunorreativos na região da banda mediolateral

da medula espinal de rãs. Está demonstrado que nesta região, bem como no campo terminal ventral, neurônios apresentam prolongamentos que se dirigem para o campo terminal dorsal e funículo lateral. Muitos desses neurônios também possuem prolongamentos que se estendem para o lado contralateral da medula espinal ou que se dirigem para segmentos adjacentes da medula (MUÑOZ et al., a; b).

Nas rãs, a proteína c-Fos foi encontrada em núcleos localizados nos funículos lateral e ventral medial. Apesar de ter sido impossível estabelecer o tipo celular onde esta imunorreatividade estava localizada, pode-se sugerir que estas células sejam células gliais. Em mamíferos, um estudo recente salientou a ocorrência de ativação de células gliais em situação de dor patológica (WIESLER-FRANK et al., 2004). Segundo estes autores, sinais neuronais, como a liberação de glutamato e de substância P, ativariam astrócitos e células microgliais, os quais, por sua vez, liberariam mediadores que poderiam agir em outras células gliais e neurônios. Garrison e colaboradores (1991) descreveram um acentuado aumento na expressão de GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida) na substância cinzenta da medula espinal lombar de ratos submetidos à constrição do nervo ciático. Cabe ressaltar que este acréscimo ocorreu do lado ipsilateral à lesão, sendo atribuído primeiramente à hipertrofia dos astrócitos. Os autores ressaltam ainda que a magnitude do aumento de GFAP correlacionou-se com o grau de hiperalgesia destes animais. Um estudo recente mostrou que as regiões da medula espinal de ratos onde ocorreram aumentos na imunorreatividade à proteína c-Fos após a indução de dor inflamatória, também mostraram acréscimo

da imunorreatividade à GFAP (SUN et al., 2005). Correlação positiva entre c-Fos e GFAP também foi descrita em outros estudos (SORKIN et al., 2003; TIAN & BISHOP, 2002; MATSUNAGA et al., 2001). Imunorreatividade à proteína c-Fos foi ainda observada em células satélites de GDR de camundongos submetidos à lesão axonal (SOARES et al, 2001). Portanto, em rãs, os núcleos imunorreativos da substância branca poderiam ser núcleos de células gliais. Para a demonstração da veracidade desta hipótese, é necessário demonstrar se a secção nervosa periférica e a lesão tecidual podem alterar a expressão de c-Fos nestas células. Pela análise qualitativa feita no presente estudo, não parece ter ocorrido mudanças significativas no número de núcleos imunorreativos da substância branca da medula espinal. Porém, é possível que o intervalo de tempo aqui considerado tenha sido insuficiente para demonstrar estas mudanças. O emprego de um intervalo de tempo maior será necessário para esclarecer esta hipótese, já que, em mamíferos, a ativação das células gliais foi um evento posterior à ativação neuronal (WIESELER-FRANK et al., 2004).

Segundo Herdegen & Leah (1998), neurotransmissores e hormônios podem ativar a expressão de c-Fos. Está demonstrado que a nocicepção provoca modificações na expressão e na atividade de neurotransmissores clássicos e diversos peptídeos (LOESER et al., 2001). De acordo com Herdegen e colaboradores (1994), a aplicação de estímulo nocivo periférico, em ratos, desencadeia uma série de eventos que inicia com a liberação de óxido nítrico, substância P e CGRP de aferentes primários que chegam à medula espinal, havendo, então, a indução da expressão de fatores de transcrição, codificados

pelos genes precocemente expressos, em neurônios de segunda e terceira ordem. A expressão aumentada destes fatores ativaria a expressão do gene da enzima óxido nítrico sintase (NOS) nas lâminas superficiais do corno dorsal, resultando em acréscimo na produção de óxido nítrico. Em medula espinal de rãs *Rana catesbeiana*, a secção do nervo ciático ocasionou, aos três dias, uma queda da imunorreatividade à substância P (PARTATA et al, 2002) e ao GABA (GUEDES et al., 2004a), havendo, entretanto, um aumento na imunorreatividade ao neuropeptídeo Y (GUEDES et al., 2004b) e à enzima NADPH-diaforase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase) (dados não publicados), a qual é uma óxido nítrico sintase (HOPE et al., 1991). Baseado na hipótese acima apresentada, pode-se sugerir que a modificação na imunorreatividade à substância P seja um fator importante na ativação do gene c-fos em rãs, o qual poderia estar ativando a enzima óxido nítrico sintase. O aumento da intensidade de coloração da NADPH-diaforase provavelmente seja decorrente do aumento na síntese de óxido nítrico. Apesar desta hipótese ser plausível neste momento, torna-se necessário a realização de estudos de co-localização e microscopia eletrônica para o conhecimento das relações temporais e espaciais na expressão e na atividade destas substâncias químicas em rãs submetidas à secção nervosa periférica. Se isto realmente ocorrer na medula espinal deste animal, pode-se sugerir que a translocação da proteína c-Fos para o núcleo ocorreu em neurônios de segunda e terceira ordem deste tecido, sendo esta ativação de c-Fos um dos eventos responsáveis pelo aumento da síntese de óxido nítrico. Isto poderia explicar a manutenção do aumento da reação histoquímica à NADPH-diaforase sete dias após a secção do nervo ciático (dados não publicados).

Cumprе salientar ainda que uma grande quantidade de neurônios GABAérgicos foram encontrados na região da banda mediolateral da medula espinal de rãs (GUEDES et al., 2004a). Como em mamíferos um grande número de células GABAérgicas apresentaram imunorreatividade também à proteína c-Fos (COGESHALL, 2005), é possível que isto ocorra em rãs, uma vez que a região da banda mediolateral apresentou também núcleos imunorreativos à proteína c-Fos. Estudos de co-localização seriam necessários para o esclarecimento desta hipótese.

Frente ao que foi exposto aqui, muitas questões ainda permanecem abertas em relação às rãs. Deste modo, o emprego deste modelo experimental oferece perspectivas para o futuro, não apenas para um maior entendimento de seu processo nociceptivo, mas também pelo fato de que o conhecimento de processos fisiológicos destes animais contribuirão para responder questões especulativas dos mamíferos, ao mesmo tempo que permitem inferências evolutivas sobre os mesmos.

6 - CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que, em rãs, diferente do que acontece em mamíferos, a imunorreatividade à proteína c-Fos ocorre predominantemente no citoplasma de células do GRD, enquanto na medula espinal lombossacral esta imunorreatividade prevalece em núcleos neuronais localizados no corno dorsal e ventral. A secção do nervo ciático e a lesão tecidual foram capazes de induzir um acréscimo no número de núcleos imunorreativos em células de pequeno diâmetro do GRD localizado ipsilateralmente à lesão e no corno dorsal da medula espinal, os quais, por suas conexões sinápticas, podem estar envolvidos com o processamento de informações nociceptivas. Este acréscimo é similar àquele descrito em mamíferos. Assim, as rãs mostram-se como excelentes modelos para o estudo do papel de c-Fos na nocicepção. Porém, estudos futuros com este enfoque deverão considerar a particularidade destes animais em relação à expressão da proteína c-Fos.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHAVAL, M. (1991). Expressão da proteína c-Fos no sistema nervoso central do rato após a estimulação nervosa nociceptiva periférica. Curso de pós graduação em ciências Biológicas – Fisiologia UFRGS. Tese de doutorado. Porto Alegre.

ADLI, D. S. H.; ROSENTHAL, B. M. ; YUEN, G. L.; HO, R. H. ; CRUCE, W. L. R. (1988) Immunohistochemical localization of substance P, somatostatin, enkephalin, and serotonin in the spinal cord of the northern leopard frog *Rana pipiens*. **J. Comp. Neurol.**, 275:106-116.

AIDA, S. (2005). The challenge of preemptive analgesia. **Pain Clinical Updates**, XIII (2): 1- 4.

AMICHE, M.; DELFOUR, A. ;NICHOLAS, P.(1998) Opioids peptides from frog skin. **EXS**, 85 :57-71.

AULER, V. B. (2004) . Efeitos da secção nervosa periférica sobre o padrão de imunorreatividade da tirosina hidroxilase da serotonina em medula espinal e variação sazonal de rãs *Rana catesbeiana*. Dissertação de Mestrado, PPG Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BADIO, B. ; DALY, J. W. (1994) Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist. **Mol. Pharmacol**, 45:563-569.

BASBAUM, A. L. ; JESSEL T. M. (2000). The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds). **Principles of Neural Science**, McGraw-Hill, 472-491.

BEAR, M.F.; CONNORS,B.W.; PARADISOM.A. (2002) **Neuriciências: desvendando o sistema nervoso**. Porto Alegre: Artmed, 421- 434.

BELLAVANCE, L. L.; BEINTZ, A. J. (1996) Altered c-fos Expression in the Parabrachial Nucleus in a Rodent Model of CFA- Induced Peripheral Inflammation. **J. Comp. Neurol.** 366: 431-447.

BENNET, G. J. (1994) Neurophatic Pain. In: Wall,M.;Melzack, R.(eds) **.Textbook of Pain**. Churchill Livingstone, 201- 224.

BESTER, H.; MATSUMOTO,N. ;BESSON,J.M. ;BERNARD, J. F. (1997) Further Evidence for the Involvement of the Spinoparabrachial Pathway in Nociceptive Process: A c – Fos Study in the Rat. **J. Comp. Neurol.:** 383-458.

BON,K.; WILSON,S.G.; MOGIL,J.S. ROBERTS,W.J. (2002) genetic evidence for the correlation of deep dorsal horn Fos protein immunoreactivity with tonic formalin pain behavior. **J. Pain** 3: 181-189.

BRADFORD, M. M.(1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. **Anal.Biochem.**;72: 248-254.

BRUNETT, M. G.; ZAGER, E. L.(2004) Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurg. Focus** 16 (5): 1-7

BURITOVA,J.;BESSON, J.M. (2002) Effects of nefopam on the spinal nociceptive process: a c-Fos protein study in the rat. **Eur J Pharmacol.** 441:67-74.

BURITOVA, J.; LARRUE, S.; ALIAGA, M.; BESSON, J. M.; COLPAERT, F. (2005) Effects of the high-efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist, F 13640 in the formalin pain model: A c-Fos study. **Europ. J. Pharm.** 514: 121 – 130.

BUSHMANN, T.; MARTIN-VILALBA, A. ;KOCSIS, J. D.; WAXMAN, S. G. ;ZIMMERMANN, M.; HERDEGEN,T. (1998) Expression of Jun, Fos, and ATF-2 proteins in axotomized explanted and cultured adult rat dorsal root ganglia. **Neuroscience.** 84:163-76.

BULLITT, E. (1990) expression of c-Fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. **J. Comp. Neurol.** 296:517-530.

BYERS, M. R.; BONICA, J. J. (2001). Peripheral Pain Mechanisms and Nociceptor Plasticity. In: Loeser, J.D.; Butler, S.H.; Chapman, R.; Turck, D.C. (eds). **Bonica's management of pain**, Lippincott Williams & Williams, 26-72.

CATHELINE, G.; LE GUEN, S.; HONORÉ, P.; BESSON, J. M. (1999) Are there long-term changes in the basal or evoked Fos expression in the dorsal horn of the spinal cord of the mononeuropathic rat? **Pain.** 80:347-357.

CHI, S. I.; LEVINE, J. D.; BASBAUM, A. I. (1993) Peripheral and central contributions to the persistent expression of spinal cord fos-like immunoreactivity produced by sciatic nerve transection in the rat. **Brain Res.** 617:225-237.

CHIEFFI, P.; ANGELINI, F.; PIERANTONI, R. (1997) Proto-oncogene Activity in the testis of the lizard, *Podarcis s. sicula*, during the Annual Reproductive Cycle., **Gen. Comp. Endocrinol.** 108: 173-181.

COBELLIS, G.; PIERANTONI, R.; FASANO, S. (1996) c-fos and c-jun-like mRNA Expression in Frog (*Rana esculenta*) Testis during the Annual Reproductive Cycle., **Gen. Comp. Endocrinol.** 106:26-29.

COBELLIS, G.; VALLARINO, M.; MECCARIELO, R.; PIERANTONI, R.; MASINI, M. A.; MATHIEU, M.; PERNAS-ALONSO, R.; CHIEFFI, P.; FASANO, S. (1999a) Fos Localization in Cytosolic and Nuclear Compartments in Neurons of the Frog, *Rana esculenta*, brain: an Analysis Carried Out in Parallel with GnRH Molecular Forms. **J. Neuroendocrinol.** 11, 725-735.

COBELLIS, G.; PIERANTONI, R.; MINUCCI, S.; PERNAS - ALONSO, R.; MECCARIELLO, R.; FASANO, S. (1999b) c-fos Activity in *Rana esculenta* testis: Seasonal and Estradiol-Induced Changes. **Endocrinology.** 7:3238-3244.

COBELLIS, G.; MECCARIELLO, R.; FIENGA, G.; PIERANTONI, R.; FASANO, S. (2002a) Cytoplasmic and Nuclear Fos Protein Forms regulate Resumption of Spermato-genesis in the frog, *Rana esculenta*. **Endocrinology.** 1:163-170.

COBELIS, G.; MECCARIELLO, R.; MINUCCI, S.; PALMIERO, C.; PIERANTONI, R.; FASANO, S. (2002b) Cytoplasmic Versus Nuclear Localization of Fos related Proteins in the frog, *Rana esculenta*, Testis: In Vivo and direct In Vitro Effect of a Gonadotrophin-releasing Hormone Agonist. **Biology of reproduction**, 68:954-960.

COGGESHALL, R. E. (2005) Fos, nociception and the dorsal horn. **Progress in Neurobiol.** 77 : 299–352

DELLANDER, G. E.; SHÖTT, E.; BRODIN; FREDHOLM, E. (1997) Spinal Expression of mRNA for Immediate Early Genes in a Model of Chronic Pain. **Acta Physiol Scand.** 161:517-525.

DEVOR, M. (1994) The pathophysiology of damaged peripheral nerves. In: Wall, M.; Melzack, R. (eds) . **Textbook of Pain**. Churchill Livingstone, 79- 100.

DUBNER, R. (1983) **Pain research in animals**. Ann. N. Y. Acad. Sci. **75:128-132**.

DYAKONOVA, V.; ELOFSSON, R.; CALBERG, M.; SAKHAROV, D. A. (1999). Effects of naloxone on c-Jun/AP-1 in met-enkephalin and FMRFamide – immunoreactive neurons of gastropod snail . **Acta Biologica Hungarica** 50: 43 –54.

EBESSON, S. O. E. (1976) Morphology of the spinal cord. In: LINÁS, R.; PRECHT, W. (eds). Frog neurobiology. Springer-Verlag, 679-706. Apud: SCHOTLAND L.L.; TRESCH, M.C. (1997). Segmental and propriospinal projection systems of frog lumbar interneurons. **Exp. Brain Res.** 116: 286-298.

FONTA, C.; GRASCUEL, J.; MASSON, C. (1995) Brain FOS-like expression in developing and adult honey-bees. NeuroReport apud DYAKONOVA, V.; ELOFSSON, R.; CALBERG, M.; SAKHAROV, D. A. (1999). Effects of naloxone on c-Jun/AP-1 in met-enkephalin and FMRFamide – immunoreactive neurons of gastropod snail . **Acta Biologica Hungarica** 50: 43 –54.

FUNAHASHI, M.; HE, Y.; SUGIMOTO, T.; MATSUO, R. (1999) Noxious tooth pulp stimulation suppresses c-fos expression in the rat hippocampal formation. **Brain Res.** 827: 215-220.

GARRISON, C. J.; DOUGHERTY, P. M.; KAJANDER, K. C.; CERLOTON, S. M. (1991) staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. **Brain Res.** 565:1-7.

GRAHAM, C.; IRVINE, A. E.; McCLEAN, S.; RITCHER, S. C.; FLAT, P. R.; SHAW, C. (2005) Peptide tyrosine arginine, a potent immunomodulatory peptide isolated and structurally characterized from the skin secretions of the dusky gopher frog, *Rana sevosia*. **Peptides**, 26:737-743.

GRONEBERG, D. A.; WIEGAND, S.; DINH, Q. T.; PEISER, C.; SPRINGER, J.; FISCHER, A. (2001) Expression of immediate early genes in sensory ganglia. **Neuroch Res.** 26: 1113-1117.

GUEDES, R. P.; MARCHI, M. I.; VIOLA, G. G.; XAVIER, L. L.; ACHAVAL, M.; PARTATA, W. A. (2004a) Complete sciatic nerve transection induces increases of neuropeptide Y – like immunoreactivity in primary sensory neurons and spinal cord on the frogs. **Comp. Biochem. Physiol.**, Part A 139, 461– 467

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

HANSEL, D. E.; EIPPER, B. A.; RONNET, G. V. (2001) Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. **Nature**, 410: 940 – 944.

HARRIS, J. A. (1998) Using c-fos as a Neural Marker of Pain. **Brain Res. Bull.**, 45, 1-8.

HAMAMOTO, D. T.; FORKEYM. W.; DAVIS,W. L.; KAJANDER,K. C., SIMONE, D.A. (2000). The role of pH and osmolarity in evoking the acetic acid-induced wiping response in a model of nociception in frogs. **Brain Res.** 862: 217-229.

HAMAMOTO,D.T.; SIMONE,D.A. (2003) characterization of cutaneous primary afferent fibers excites by acetic acid in a model of nociception frog. **J. Neurophysiol.** 90: 566-577

HERDEGEN, T.; LEAH, J.D. (1998) Inducible and constitutive transcription factors in mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ ATF proteins. **Brain Res. Rev.** 28: 370-490.

HERDEGEN,T.; RÜDIGER,S.;MAYER,B.;BRAVO,R.; ZIMMERMANN,M.(1994) Expression of Nitric Oxide Sintase and Colocalization With Jun,Fos and Krox Transcription Factors in Spinal Cord Neurons Following Noxious Stimulation of the Rat Hipaw. **Mol. Brain Res.**22:245-258.

HOFFMAN, E. E.; MURPHY, A. Z. (2000) Anatomical markers of activity in hypothalamic systems. In: CONN, P. M.; FREEMAN, M. E.(eds). **Neuroendocrinology in Physiology and medicine.** Human Press, 541-552.

HERDEGEN,T.;SKENE,P.; BÄHR,M. (1997) The c-jun Transcription Factor-Bipotent Mediator of Neurological Death, Survival and Regeneration. **TINS** 20:227-231.

HOPE, B. T.; MICHAEL,G. J. ; KNIGGE, K. M.; VINCENT, S. R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proc. Nat. Acad.Sci.**, v.88, p. 2811-2814.

HUNTER, J. C.; WOODBURN,V.L.; DIREUX,E.K.; PETTERSON,K.E.; POAT,J.A. HUGHES,J. (1995). C-Fos Antisense Oligodeoxynucleotide Increases Formalin-Induced Nociception and Regulates Preprodynorphyn Expression. **Neuroscience** 65: 485-492.

INAGAKI,S.;SENBA,E.; SHIOSAKA,S., et al. (1981) Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in the frog brain and spinal cord: immunohistochemical analysis. **J. Comp. Neurol.** 201: 243-254.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. (2001) Molecular Mechanisms of Nociception. **Nature**;413,203-210.

KAJANDER, K. C.; MADSEN, A. M.; IADAROLA, M. J.; DRAISCI, G.; WAKISAKA, S. (1996) Fos-Like immunoreactivity increases in the lumbar spinal cord following a chronic constriction injury to the sciatic nerve of rat. **Neurosci. Lett.** 206:9-12.

KACZMAREK, L.; CHAUDHURI, A. (1996) Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. **Brain Res. Rev.**23: 237-256.

KAVALIERS,M. (1988) Evolutionary and Comparative aspects of nociception. **Brain Res. Bull.**;21: 923-931.

KEAY,K.A.; MONASSI, C.R.; LEVISON,D.B.; BANDLER,R. (2004) Peripheral nerve injury evokes disabilities and sensory dysfunction in a subpopulation of rats: a closer model to human chronic neuropathic pain? **Neurosci. Lett.**, 361: 188-191.

KOVÁCS. K. (1998) C-Fos as a transcriptional factor: a stressful (re)view from a functional map. **Neurochem. Int.** 33: 287-297.

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685.

LOESER,J.D.; BONICA, J. (2001) .History of pain Concepts and Therapies. In: Loeser,J.D.;Butler,S.H.; Chapmam,R.;Turck,D.C. (eds). **Bonica's management of pain**, Lippincott Williams& Williams, 3-25.

LOREZ, H.P.; KEMALI,M. (1981) substance P-, Met- Enkephalin- and somatostatin- like immunoreactivity distribution in the frog spinal cord. **Neurosci. Lett.**; 26: 119-124.

LOWRENCE, J.; STORMAN, P. W.; BASCARAMURTY, S.; JORDAN, L. M. MALISZA, K. L. (2004) Correlation of functional activation in the rat spinal cord with neuronal activation detected by immunohistochemistry. **Neuroimage**. 22: 1802-1807.

MA, Q.P; WOOLF, C.J. (1996) Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat. **Pain**, 67:307-316.

MATSUANGA, W.; OSAWA, S.; MIYATA, S.; KIOHARA, T. (2001) Astrocytic Fos expression in the rat posterior pituitary following LPS administration. **Brain Res**. 898:215-223

MEARS S.C., FRANK, E. (1994). Specific regeneration of cutaneous sensory afferent fibers in the amphibian spinal cord. **Exp. Neurol.**; 130:115-119.

MENÉTREY, D., GANNON, A., LEVINE, J.D., BASBAUM, A.I., 1989. Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular and visceral stimulation. **J. Comp. Neurol**. 285: 177–194.

MEYER, R.A.; CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N. (1994) Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall, M.; Melzack, R. (eds) **.Textbook of Pain**. Churchill Livingstone, 13- 44.

MILLAN, M. J. (1999) The Induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**; 57:1-164

MITSIKOSTAS, D. D.; del RIO, M.S. (2000) Receptor systems mediating c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis in animal models of migraine. **Brain Res. Rev.**, 35: 20-35.

MORGAN, J.I.; CURRAN, T. (1989) Stimulus- Transcription coupling in neurons: role of cellular immediate – early genes. **TINS**. Vol 12. 11:459-462.

MUNGLANI, R; HUNT, S., P. (1995) Molecular biology of pain. **Br. J. Anaesth**, 75(2):186-192.

MUÑOZ, M., MUÑOZ, A.; GONZÁLEZ, A.; ten DONKELAAR, H. J. (1996) Evidence for an anuran homologue of the mammalian spinocervicothalamic system: An in vitro tract-tracing study in *Xenopus laevis*. **Eur. J. Neurosci.** 8 :1390-1400

MUÑOZ, M., MUÑOZ, A.; GONZÁLEZ, A.; ten DONKELAAR, H. J. (1997) spinal ascending pathways in amphibians: cells of origin and main targets. **J. Comp. Neurol.**, 378 :205-228.

MUÑOZ, M., MARIN, O, GONZÁLES, A. (2000). Localization of NADPH diaphorase/nitric oxide synthase and choline acetyltransferase in the spinal cord of the frog, *Rana perezi*. **J Comp Neurol**; 419:451-470.

NARANJO, J.R.; MELLSTROM, B.; ACHAVAL, M.; SASSONE-CORSI, P. (1991a) molecular pathways of pain: Fos/Jun-mediated activation of the opiodinergic gene through a non-canonical AP-1 site. **Neuron.** 6 :223 :227.

NARANJO, J.R.; MELLSTROM, B.; ACHAVAL, M.; LUCAS, J.J.; DEL RIO, J. SASSONE-CORSI, P. (1991b) Co-induction of Jun B and c-fos in a subset of neurons in the spinal cord. **Oncogene**, 6 : 223-227.

NARANJO, J.R.; MELLSTRÖM, B.; CARRIÓN, A.M.; LUCAS, J.J.; FOULKES, N.S.; SASSONE-CORSI, P. (1997) Peripheral Noxious Stimulation Induces CREM Expression in a Dorsal Horn: Involvement of Glutamate. **Eur. J. Neurosc.** 9: 2778-2783.

NESTLER, E. J.; KELZ, M. B.; CHEN, J. (1998) Δ FosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. **Brain Res.** 835:10-17.

NISHMORI, T.; IKEDA, T.; TERAYAMA, R.; ISHIDA, Y. MAKAMURA, T., OAHARA, N. (2002) Effect of ionotropic glutamate receptor antagonist on Fos-like immunoreactivity in the dorsal horn following transection of the rat sciatic nerve. **Brain Res.** 934: 81 – 86.

OLIVEIRA, A.L.R. (2001) Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice **Biol. Res. Braz. J Med.** 34: 375-380.

PARTATA, W.; CERVEIRA, J.F.; XAVIER, L.L.; VIOLA, G.G.; ACHAVAL, M. (2002)

Sciatic nerve transection decrease substance P immunoreactivity in the lumbosacral spinal cord of the frog (*Rana Catesbeiana*). **Comp. Biochem. Physiol.** .part B; 131:807-814.

PETKÓ,M.; SANTA, A. (1992) Distribution of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the central nervous system of the frog, *Rana esculenta*. **Cell Tissue Res.** 269(3):525-34.

PHILLIPS, L.L.; BELARDO, E.T. (1994) Increase of c-fos and ras oncoproteins in the denervated neuropil of the rat dentate gyrus. **Neuroscience** 58: 503-514.

RASHID H.; UEDA,H.(2005) Pre-injury administration of morphine prevents development of neuropathic hyperalgesia through activation of descending monoaminergic mechanisms in the spinal cord in mice. **Molecular pain** . 1:19

REDBURN, J.L.; LEAH,J.D. (1999) The induction and potentiation of c-Jun and c-Fos expression in Spinal Neurons Mediated by NK1 and NK2 receptors. **Neuropeptides.** 33:115-119.

RIGON, P. (2005) Imunorreatividade à proteína c-Fos após a estimulação periférica nociva e tratamento com morfina no sistema nervoso central do caracol *megalobulimus abbreviatus*. Dissertação de mestrado. PPG Neurociências. Universidade federal do Rio Grande do Sul.

RO, L.S., LI, H.Y., HUANG, K.F., CHEN, S.T.,(2004). Territorial and extra – territorial distribution of Fos protein in the lumbar spinal dorsal horn neurons in rats with chronic constriction nerve injuries. **Brain Res.** 1004: 177–187.

ROCHA P.L.; BRANCO,L.G.S. (1998) Seasonal changes in the cardiovascular, respiratory and metabolic responses to temperature and hypoxia in the bullfrog *Rana catesbeiana*. **J. Exp. Biol.**; 761 – 768.

SCHOTLAND,J.L., TRESCH MC. (1997). Segmental and propriospinal projection systems of frog lumbar interneurons. **Exp Brain Res**; 116:283:298.

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

SHIMOYAMA,M.; TAKOSUDA.H.; OHTORI,S.; TANAKA,K.; SHIMOYAMAN.
(2005) change of dorsal horn neurochemistry in a mouse model of neuropathic
cancer pain. **Pain**. 114: 221 – 230.

SKUTELLA, T.; PROBST, J.C.; JIRIKOWSKI, G.F. (1995) c-fos mRNA is present
in axons of the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. **Cell Mol. Biol.**
41: 793-798.

SNEDDON,L.U. (2004) Evolution of nociception in vertebrates: comparative
analysis of lower vertebrates. **Brain Res. Rev.**, 46:123-130.

SOARES,H.D.; CHEN,S.C.; MORGAN,H.I.(2001) Differential and prolonged
Expression of Fos-lacZ and Jun-lacZ in neurons, glia and muscle following sciatic
nerve damage. **Experim. Neurol**. 167: 1 – 14.

SORKIN,L.S.; MAMYAMA,K.; BOTLED.L.; YANG,L.; MARSALAM.;
FIRESTEING.S. (2003) SPINAL ADENOSINE AGONIST REDUCES C-Fos and
astrocyte activation in dorsal horn of rats with adjuvant – induced arthritis.
Neurosci. Lett. 340: 119 –122.

STERNBERGER, L. A. (1979). **Immunocytochemistry**. Chichester, Wiley &
Sons. 338p.

STEVENS C.W. (2004) Opioid research in amphibians: an alternative pain model
yielding insights on the evolution of opioid receptors. . **Brain Res. Rev.** 46: 204-
215.

STOSKOPF,M.K. (1994) Pain and analgesia in birds, reptiles , amphibians,and
fish. **Invest Ophthalmol. Vis.Sci**. 35:775-780

SUN,Y.N.; LUO.J.I.; RAO,Z.R.;LANL.;DUAN,L.(2005) gfap AND Fos
immunoreactivity in lumbo-sacral spinal cord and medulla oblongata after chronic
colonic inflammation in rats. **World J. Gastroenterol**. 11:4827-4832.

TIAN,J.B.; BISOPH.G.A. (2002) stimulus – dependent activation of c-fos in
neurons and glia in the rat cerebellum. **J. Chem.Neuroanat**. 23:157 – 170.

THERMAN G.W.; BONICA,J.J. Spinal Mechanisms and their modulation. In: Loeser,J.D.;Butler,S.H.; Chapmam,R.;Turck,D.C. (eds). **Bonica's management of pain**, Lippincott Williams& Williams,73-152.

TURK,D.C.; OKIFUJI,A. 2001. Pain Terms and Taxonomies of Pain. In: Loeser,J.D.;Butler,S.H.; Chapmam,R.;Turck,D.C. (eds). **Bonica's management of pain**, Lippincott Williams& Williams,17-23.

VESSELKLIN,N.P., ADANINA,V.O.; RIO, J. P.; REPERANT, J. (2003) Ultrastructural study of glutamate- and GABA-immunoreactive terminals contacting the primary afferent fibers in frog spinal cord. A double postembedding immunocytochemical study. *Brain Res* ; 960(1-2):267-72.

WIESELER-FRANK, J. MAILER,S.F.;WATKINS,L.R. (2003) Glial activation and pathological pain. **Neurochem. Inter.** 45:389-395.

WEGERHOFF, R.; GAETHJE, H.; VOSSFELDT, R.; ROEDER, T. (1998) Iminohistoquematic staining with two polyclonal antibodies against c-Jun/AP-1 in locust and beetle. In: ELSNER,N.;WEHNER,R (eds)Proceedings of the 26th Goettingen Neurobiology Conference. Vol.2, p.566 apud DYAKONOVA,V.; ELOFSSON,R.;CALBERG,M.;SAKHAROV,D.A.(1999). Effects of naloxone on c-Jun/AP-1 in met-enkephalin and FMRFamide – immunoreactive neurons of gaspod snail . **Acta Biologica Hungarica** 50: 43 –54.

WU,W. (1996) Potential Roles Of Gene Expression Change in Adult Rat spinal Motoneurons Following Axonal Injury: A Comparison Among c-jun, Low-Affinity Grow Factor Receptor(LNGFR), and Nitric Oxide Sintase (NOS). **Exp. Neurol.**, 141:190-196.

XAVIER,L.L.; VIOLA, G. G.; FERRAZA. C.; DA CUNHA, C.; BEONÍZIO, J. M. D.;NETTO, C. A. ACHAVAL, M. (2005) A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hidroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. **Brain Res. Protocols** 16:58-64.

YAMAZAKI, Y., MAEDA, T., SOMEYA, G.,WAKISAKA, S., (2001).Temporal and spatial distribution of Fos protein in the lumbar spinal dorsal horn neurons in the rat with chronic constriction injury to the sciatic nerve. **Brain Res.** 914, 106–114.

YASPAL,K.;MASON,P.;McMENNA,J.E.;SHARMA,S.K.;HENRY,J.L.;CODERRE,T.
J.(1998) Comparison of the Effects of Treatment with Intrathecal Lidocaine Given
before and after Formalin on Both Nociception and Fos Expression in the spinal
cord Horn. **Anesthesiology**, 88(1): 157-164.

ANEXO 1

Reagentes utilizados na técnica de Western Blot:

1. Tampão de Lise (NaCl 150mM; Tris20mM; EDTA 5mM)
2. Inibidores de protease (PMSF)
3. Tampão de Carga (Tris 65mM; SDS 10%;Glicerol 50%; Azul de Bromofenol 0,1%)
4. Gel de Policrilamida (12%)
5. Tampão de corrida de eletroforese (Glicina 192mM; Tris 25mM; SDS 0,1%; pH=8,3)
6. Tampão de transferência (Glicina 192mM; Tris25mM; Metanol 10%; pH=8,3)
7. Tampão TBS (Tris 20mM; NaCl 140mM)
8. Tampão TTBS (TBS + 0.5mL Tween 20)
9. Solução para bloqueio de membrana (8% de leite em pó em TTBS)

