

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

**MARCADORES FUNCIONAIS NO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL DE TARTARUGAS E SUAS VARIAÇÕES EM  
DISTINTAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**

**WANIA APARECIDA PARTATA**

**Orientadores: Profa. Dra. Maria Marques  
Profa. Dra. Matilde Achaval**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, concentração em Fisiologia, Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**PORTO ALEGRE**

**1996**

*“Sonho que os homens um dia se levantarão e compreenderão enfim, que foram feitos para viver juntos como irmãos... Sonho que um dia a guerra acabará... Sonho que seremos capazes de afastar para longe as tentações do desespero e de lançar uma nova luz sobre as trevas do pessimismo. Sim, graças a esta fé, seremos capazes de apressar o dia em que a paz reinará sobre a terra”.*

*Martin Luther King*

Para RICARDO e AMBROSINA  
WANICE  
WANDER, CIBELY e JORDHANNA  
ANDERSON, SIMONE e ANDRESSA

com carinho

*Às minhas orientadoras:*

*Profa. Dra. Maria Marques e  
Profa. Dra. Matilde Achaval*

*Meu eterno agradecimento pelo inestimável trabalho de orientação, pela dedicação sempre dispensada, pelo constante estímulo e benevolência, e, principalmente por acreditarem em minha capacidade de realizar este trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Neste momento, gostaria de destacar meu reconhecimento aqueles mestres que contribuíram para a minha formação acadêmica, desde a alfabetização até o pós-graduação. Dentre todos, meu carinho especial às professoras de 1º grau Leda Borges e Catarina Barcelos Albuquerque, as quais despertaram em mim o interesse pela Ciência, e a professora Vera Lúcia de Campos Brites (Professora Adjunta do Departamento de Biociências - Universidade Federal de Uberlândia) a qual muito incentivou meu interesse pela pesquisa. Merecem também reconhecimento aquelas pessoas que diretamente auxiliaram em diversas etapas deste trabalho. São elas:

- A bolsista Ana Maria R. Krepsky, pelo inestimável auxílio em todas as etapas deste trabalho.
- Christiane de Queiroz Lopes, pela solícita ajuda na confecção do material iconográfico.
- Eudira da Luz Amaral Silva, pela prestativa contribuição na execução dos experimentos.
- Os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, concentração em Fisiologia, pela amizade e constantes colaborações.
- Os colegas do Laboratório de Histofisiologia Comparada, pelo convívio amigável e pelas colaborações e gentilezas sempre demonstradas.
- As amigas do Pensionato Maria Imaculada, pela convivência amigável e o companheirismo em todos os momentos.

Agradeço ainda ao Laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas, por permitir a realização da parte experimental deste trabalho, e à CAPES e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo auxílio financeiro assegurado.

## **OBSERVAÇÃO**

As figuras citadas nesta tese encontram-se no anexo, onde estão numeradas em ordem crescente, de acordo com sua citação no texto.

# SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>X</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1- Características gerais das tartarugas.....	<b>15</b>
1.2- Papel da histoquímica no estudo do sistema nervoso.....	<b>20</b>
1.3- Breve revisão histórica da histoquímica e dos estudos do sistema nervoso.....	<b>21</b>
1.4- Glicogênio no encéfalo da tartaruga <i>Chrysemys dorbigni</i> .....	<b>25</b>
1.5- Marcadores funcionais.....	<b>26</b>
1.5.1 Glicogênio fosforilase.....	<b>27</b>
1.5.2- Citocromo oxidase.....	<b>31</b>
1.5.3- NADPH-diaforase.....	<b>34</b>
1.6- Modificações pós-natais do sistema nervoso.....	<b>43</b>
1.7- Alterações no sistema nervoso central após secção de nervo periférico.....	<b>49</b>
1.8- Considerações finais.....	<b>56</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
1- Animais: Procedência e manutenção.....	<b>63</b>

2- Preparação dos tecidos para as técnicas histoquímicas.....	64
2.1- Glicogênio fosforilase.....	64
2.2- Citocromo oxidase.....	65
2.3- NADPH-diaforase.....	66
3- Tratamento dos animais.....	67
3.1- Desnervação periférica.....	67
3.2- Tartarugas submetidas ao jejum.....	68
4- Procedimentos histoquímicos.....	69
4.1- Glicogênio fosforilase.....	69
4.2- Citocromo oxidase.....	70
4.3- NADPH-diaforase.....	70
5- Procedimentos utilizados para os animais com desnervação periférica.....	71
6- Procedimento imunohistoquímico para a SP.....	72
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
1- Distribuição das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase no sistema nervoso central das tartarugas <i>Trachemys dorbigni</i> , adultas, em condições basais.....	78
1.1- Glicogênio fosforilase.....	78
1.2- Citocromo oxidase.....	81
1.3- NADPH-diaforase.....	85
2- Distribuição das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase no sistema nervoso central de tartarugas <i>Pseudemys scripta elegans</i> , juvenis, em condições basais.....	90
2.1- Glicogênio fosforilase.....	90

2.2- Citocromo oxidase.....	93
2.3- NADPH-diaforase.....	97
3- Efeitos das distintas condições experimentais sobre as atividades da glicogênio fosforilase, citocromo oxidase, NADPH-diaforase e SP no sistema nervoso central da tartaruga <i>Trachemys dorbigni</i> .....	101
3.1- Desnervação periférica.....	101
3.1.1- Atividade da citocromo oxidase.....	102
3.1.2- Atividade da NADPH-diaforase.....	102
3.1.3- Substância P.....	106
3.2- Jejum.....	108
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>109</b>
Distribuição da atividade glicogênio fosforilase e citocromo oxidase no sistema nervoso central de <i>Trachemys dorbigni</i> , adultas, em condições basais.....	110
Distribuição da NADPH-diaforase no sistema nervoso central de tartarugas <i>Trachemys dorbigni</i> , adultas, em condições basais.....	129
Distribuição da glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase no sistema nervoso central de <i>Pseudemys scripta elegans</i> , jovens em condições basais.....	146
Efeitos das distintas condições experimentais sobre as atividades glicogênio fosforilase, citocromo oxidase, NADPH-diaforase e SP no sistema nervoso central da tartaruga <i>Trachemys dorbigni</i> .....	163
1- Secção do nervo ciático.....	163
2- Jejum de 90 dias.....	181
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>185</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>189</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>236</b>

**RESUMO**

No presente trabalho demonstrou-se, mediante a utilização de técnicas histoquímicas, a distribuição das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase no sistema nervoso central de tartarugas *Trachemys dorbigni*, adultas, e *Pseudemys scripta elegans*, jovens. Verificou-se, também, a distribuição destas duas últimas enzimas no encéfalo e na medula espinal cervical alta e lombar de tartarugas *Trachemys dorbigni*, adultas, após secção do nervo ciático, incluindo ainda, o estudo do padrão de imunorreatividade da substância P (SP) na medula espinal. Também foi avaliado o efeito do jejum de 90 dias sobre a distribuição das três enzimas no sistema nervoso central de tartarugas *Trachemys dorbigni* adultas.

As enzimas em estudo mostraram uma distribuição similar no sistema nervoso central de *Trachemys dorbigni*, adulta, sendo esta distribuição igual na **medulla oblonga**, onde se detectaram nos núcleos reticulares, da rafe, no locus coeruleus, no vestibular, no coclear e nos V, VI, VII, X e XII pares cranianos. No **telencéfalo**, a glicogênio fosforilase ocorreu nas camadas granular e de fibras aferentes do bulbo olfatório, nas três camadas corticais, na eminência dorsal ventricular do telencéfalo (DVR), no estriado, no primórdio de hipocampo, na amígdala e nos núcleos do tubérculo olfatório e da banda diagonal de Broca. A citocromo oxidase também foi identificada nessas mesmas áreas, com exceção da banda diagonal de Broca. A NADPH-diaforase ocorreu nos glomérulos e na camada granular interna do bulbo olfatório, no DVR, no estriado, em algumas células piramidais dos córtices, no córtex piriforme, nos núcleos accumbens e da comissura anterior, na região septal, no globus pallidus e no tubérculo olfatório. No **diencéfalo**, a glicogênio fosforilase foi identificada nos núcleos rotundus, reuniens e geniculado, no hipotálamo periventricular e ventral, e na eminência média, e a citocromo oxidase nos núcleos rotundus, geniculado, habenular e entopeduncular, e no hipotálamo lateral e periventricular. A NADPH-diaforase também foi encontrada nestas mesmas áreas hipotalâmicas, e ainda na área pré-óptica e nos núcleos paraventricular, supra-mamilar, suprapeduncular e entopeduncular. No **mesencéfalo**, a glicogênio fosforilase foi evidenciada no tecto óptico, no núcleo mesencefálico do V par craniano, nos núcleos dos III e IV pares cranianos, no torus semicircularis (TSC), nos núcleos rubro

e do istmo, na substância nigra (SN) e nos núcleos interpeduncular e da comissura posterior. A citocromo oxidase foi detectada nestas regiões, com exceção do núcleo interpeduncular, ocorrendo ainda nos núcleos do fascículo longitudinal medial e da raiz óptica basal. A NADPH-diaforase foi revelada no tecto óptico, no TSC, na área tegmental ventral, nos núcleos profundos do mesencéfalo, na SN e no núcleo rubro. **No cerebelo**, a glicogênio fosforilase, a NADPH-diaforase e a citocromo oxidase foram identificadas nas camadas granular e molecular, enquanto esta última também foi observada nas células de Purkinje. Os núcleos profundos mostraram reatividade às três enzimas consideradas. **Na medula espinal cervical alta**, as atividades glicogênio fosforilase e citocromo oxidase ocorreram nos motoneurônios e nos neurônios comissurais dorsais. Esta última enzima ainda foi detectada na coluna lateral do corno dorsal, no núcleo marginal e em neurônios dispersos pelo funículo lateral. A atividade NADPH-diaforase foi encontrada nas áreas Ia, Ib, II e III, na coluna lateral e na comissura do corno dorsal. As células gliais mostraram reação positiva com os procedimentos histoquímicos utilizados.

As tartarugas *Pseudemys scripta elegans*, jovens, apresentaram esse perfil enzimático acima descrito para *Trachemys dorbigni* adulta. Observaram-se, porém, algumas diferenças: as camadas molecular e plexiforme corticais não mostraram atividade glicogênio fosforilase, mas uma intensa reação citocromo oxidase, e a distribuição da NADPH-diaforase foi mais ampla, ocorrendo em maior número de neurônios piramidais, na camada molecular, em corpos celulares no fascículo longitudinal medial e na substância branca da medula espinal, bem como em neurônios motores do corno ventral da medula espinal.

A secção do nervo ciático em tartaruga adulta não alterou o padrão de distribuição da citocromo oxidase, porém aumentou a reação NADPH-diaforase em células pequenas e grandes do gânglio raquidiano, e no corno dorsal da medula espinal lombar. Este acréscimo apresentou-se reduzido a partir dos 30 dias da axotomia nas células pequenas do gânglio raquidiano, enquanto no corno dorsal a atividade manteve-se elevada ainda aos 90 dias. Além disso, houve expressão

NADPH-diaforase em neurônios motores do corno ventral da medula espinal lombar, no lado ipsilateral à secção; acréscimo desta atividade em células gliais e endoteliais do neuroeixo; aparecimento da atividade enzimática nos núcleos dorsomedial do tálamo, mesencefálico do V par craniano e ístmo; presença de reação granular NADPH-diaforase em alguns neurônios dos núcleos reticulares medial e inferior, e naqueles da rafe superior e inferior. Em tartarugas adultas intactas a SP foi localizada em fibras da área Ia, as quais podiam chegar até a área III, cruzando, algumas delas, a linha média. Outras fibras chegavam ao corno ventral, onde rodeavam o soma de motoneurônios negativos. Ainda foi detectada SP nos funículos lateral e anterior, e no soma de neurônios da coluna lateral do corno dorsal. A secção do nervo ciático provocou diminuição do número de fibras imunorreativas à SP já aos 7 dias, e somente aos 90 dias constatou-se recuperação da imunorreatividade nessas mesmas fibras.

O jejum de 90 dias não ocasionou alterações no padrão de distribuição das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase do tecido nervoso de tartarugas *Trachemys dorbigni* adultas.

Concluindo, as enzimas em estudo possuem uma distribuição similar no sistema nervoso central de tartarugas *Trachemys dorbigni* adultas e *Pseudemys scripta elegans* jovens, havendo, porém, maior expressão NADPH-diaforase no encéfalo de *Pseudemys*. A secção de nervo periférico alterou o perfil neuroquímico da medula espinal lombar da tartaruga *Trachemys* e o jejum de 90 dias, ao contrário, não provocou modificação na atividade das enzimas consideradas. Estes resultados evidenciam a necessidade de uma abordagem funcional mais detalhada do tecido nervoso de tartarugas, não apenas para seu entendimento, mas também para o esclarecimento de muitas questões especulativas nos mamíferos, pois é indiscutível a posição estratégica dos quelônios na filogenia dos vertebrados.

## **INTRODUÇÃO**

### 1.1- Características gerais das tartarugas

Os répteis, descendentes dos antigos anfíbios, foram os primeiros vertebrados completamente terrestres. Esta libertação definitiva do ambiente aquático só foi possível mediante modificações drásticas em sua forma e função, as quais permitiram rápida radiação evolutiva dos vertebrados. Por sua vez, os répteis deram origem a duas classes altamente bem sucedidas, a das aves e a dos mamíferos. Assim sendo, este grupo possui uma posição chave na história do domínio dos continentes e na evolução dos mamíferos (ROMER & PARSONS, 1985).

Atualmente, os répteis vivos estão representados pelos lagartos, cobras ou serpentes, tartarugas, anfisbenas, crocodilos e tuataras. Dentre estes, as tartarugas mostram-se mais enigmáticas, apresentando caracteres primitivos e exclusivos. Como característica considerada primitiva pode-se citar o modo desajeitado de caminhar (ROMER & PARSONS, 1985). O desenvolvimento da carapaça óssea com cobertura córnea protegendo as regiões dorsal e ventral é um caracter apenas encontrado nestes animais, constituindo uma derivação exclusiva (POUGH et al., 1989). Essa mistura de características torna difícil a determinação de suas relações filogenéticas. Porém, deve ser considerado o fato de que a aquisição desta armadura limitou a evolução das tartarugas, deixando-as praticamente sem modificações desde seu aparecimento. O único aperfeiçoamento posterior, de alguma importância, foi a capacidade, a princípio inexistente, de retrain a cabeça para o interior da carapaça (ROMER & PARSONS, 1985). Como consequência, é comum as tartarugas serem referidas como “fósseis vivos”, muito embora alguns autores não aceitem esta denominação (GAFFNEY et al., 1987). Contudo, a posição sistemática dos quelônios, como representantes mais

antigos do grupo dos vertebrados amniotas, os coloca efetivamente entre os seres vivos atuais como testemunhas mais próximas da separação da linhagem, levando aos lagartos, serpentes, crocodilos e aves, e da linhagem mamífera. Ainda que sua posição, mais acima ou abaixo desta separação, seja disputada, eles constituem de qualquer maneira um modelo privilegiado da condição pré-mamífera (RISS et al., 1969). Além disso, evidências anatômicas e fisiológicas sugerem que as tartarugas retiveram características que provavelmente estavam presentes no encéfalo dos ancestrais reptilianos que deram origem ao tronco dos mamíferos (HALL & EBNER, 1970). Assim sendo, o conhecimento do metabolismo encefálico das tartarugas poderá ajudar no esclarecimento das características anátomo-funcionais dos ancestrais reptilianos e, conseqüentemente, dos mamíferos.

Na classificação dos répteis, as tartarugas pertencem à ordem Chelonia, a qual compreende duas subordens: A) Cryptodira, com dez famílias e B) Pleurodira, com duas famílias. Estas subordens totalizam sessenta e seis gêneros e aproximadamente duzentas e vinte espécies conhecidas. Considerando as subespécies, encontram-se na atualidade aproximadamente trezentos e quarenta representantes dessa ordem (GRZIMEK, 1975). Tartarugas de todas as famílias, exceto as Testudinidae, são basicamente aquáticas ou semi-aquáticas e alimentam-se de uma variedade de animais e plantas, vivos ou mortos, os quais são obtidos da terra ou d'água. Há uma diversidade de tartarugas de água doce e as sete espécies de tartarugas marinhas ocupam vários nichos marinhos (SEYMOUR, 1982).

Uma particularidade ímpar destes animais é a extraordinária tolerância à hipóxia e à anoxia. Tartarugas hibernando podem passar três a quatro meses mergulhadas em água fria (3°C) sem respirar (ULTSCH & JACKSON, 1982; JACKSON & HEISLER, 1983; ULTSCH, 1985). Berkson (1966) demonstrou que a tartaruga verde *Chelonia mydas* pode sustentar mergulhos voluntários de seis horas de duração, sendo que nas últimas cinco horas não se conseguiu medir oxigênio na traquéia ou na artéria carótida. Robin et al. (1964) observaram que *Pseudemys scripta* pode tolerar quarenta e oito horas em um ambiente com 100% de nitrogênio e também mergulhos anaeróbicos por mais de duas semanas em temperaturas entre 16 e 18°C. Tartarugas respirando nitrogênio puro são capazes de sobreviver por 27 horas a 20°C (BELKIN, 1962). A tartaruga *Chrysemys dorbigni* é capaz de tolerar mergulhos forçados por aproximadamente 13 horas (SANTOS et al., 1990).

A grande maioria dos vertebrados, ao contrário das tartarugas, exibe pouca tolerância à anoxia. Nesta situação, o encéfalo, dentre todos os tecidos corporais, mostra-se mais susceptível aos seus efeitos deletérios. Em mamíferos, a privação do suprimento de oxigênio por poucos minutos ocasiona danos irreversíveis ou morte das células nervosas. Todavia, em tartarugas, este tecido mantém sua integridade funcional durante várias horas ou meses em mergulho anóxico. Esta sobrevivência é atribuída ao baixo metabolismo energético e à habilidade de produção glicolítica de adenosina trifosfato (ATP) (LUTZ et al., 1985). Belkin (1962) observou que tartarugas *Sternothaerus*, tratadas com iodoacetato, um inibidor da via glicolítica, e submetidas a uma atmosfera sem oxigênio, apresentaram um período médio de sobrevivência menor do que os animais controles. Em *Pseudemys scripta elegans*, a

anoxia provocou uma diminuição na produção de ATP e fosfocreatina, havendo, ao mesmo tempo, um aumento da concentração do lactato encefálico (LUTZ et al., 1984). Kelly & Storey (1988) demonstraram que o tratamento anóxico de tartarugas *Pseudemys scripta*, durante uma hora, foi suficiente para provocar uma redução de 15 a 32% na concentração de ATP nos tecidos encefálico, hepático e muscular. De acordo com McDougal et al. (1968), a anoxia, produzida por decapitação, induz mudanças nos substratos energéticos do encéfalo de tartarugas que são similares àquelas observadas em mamíferos, porém muito mais lentas. Este resultado demonstra que o uso das tartarugas como modelos experimentais permite acompanhar mais detalhadamente certos processos bioquímicos que acontecem muito rapidamente nos ratos. Deste modo, a utilização destes animais na investigação científica não apenas contribui para esclarecer aspectos evolutivos de fenômenos biológicos, mas também possibilita acompanhar, passo a passo, detalhes de determinadas reações químicas que, em ratos, seria praticamente impossível, dada a velocidade com que ocorrem. Outra vantagem desse modelo experimental é que seu tecido nervoso mantém a integridade funcional após várias horas de separado do corpo, bastando apenas que se tome o cuidado de mantê-lo em uma solução de Ringer resfriada (4° C). Nestas condições, Velluti et al. (1991) registraram atividade elétrica no hemisfério cerebral intacto e aberto, sendo as características do eletroencefalograma similares às descritas *in vivo*. Além disso, observou-se que o encéfalo isolado de tartaruga *Chrysemys dorsalis* é um modelo epileptogênico natural, apresentando em seu córtex medial pontas complexas no eletroencefalograma e atividade intracelular caracterizada por descargas em salva com forma de onda semelhante à onda despolarizante paroxística (da COSTA, 1992a; b; 1993).

Outra característica das tartarugas é o elevado teor glicogênico dos tecidos. No fígado, esta reserva chega a totalizar 10% do peso total do órgão, enquanto no músculo sua percentagem é de 0,5% (COULSON & HERNANDEZ, 1974). No tecido muscular cardíaco, este polissacarídeo representa quase 7% do peso total deste órgão (BEALL & PRIVITERA, 1973). Altos valores também são encontrados no encéfalo. Comparações dos teores de glicogênio no tecido nervoso das tartarugas indicam elevações em torno de uma ordem de magnitude em relação aos vertebrados não mergulhadores (HOCHACHKA & SOMERO, 1984). Na tartaruga *Pseudemys scripta elegans*, o conteúdo glicogênico do encéfalo apresenta-se seis a nove vezes mais alto do que aquele de camundongos e duas a três vezes maior do que os valores detectados no cão e no gato (McDOUGAL et al., 1968). Em *Chrysemys dorbigni*, a concentração do glicogênio no encéfalo é o dobro daquela observada em ratos. Além disso, estas reservas modificam-se de acordo com as estações do ano, sendo que as menores médias foram obtidas na primavera. No verão ocorreu um pequeno acréscimo, que foi ainda maior no outono, e se intensificou no inverno (PARTATA & MARQUES, 1994).

Esta alta reserva glicogênica presente no tecido nervoso de tartarugas parece ter importância não apenas durante a anoxia, mas também nas situações de falta ou redução no fornecimento de glicose. PARTATA (1992) demonstrou que a administração de insulina na dose de 1,0 mg/kg de peso corporal, após o intervalo de 72 horas, reduziu significativamente o teor do glicogênio encefálico da tartaruga *Chrysemys dorbigni*. Neste estudo também foi evidenciado que ao final do jejum de 30 dias houve uma tendência de queda nesta reserva. Outro apoio a esta hipótese é

sugerido pelo trabalho de Plisetskaya (1968), onde a autora salienta que a reserva glicogênica do encéfalo constitui uma das fontes de glicose durante períodos hipoglicêmicos longos e severos. Além disso, observa-se que a reserva glicogênica encefálica é alta nos animais que normalmente passam por situações isquêmicas e de restrição no fornecimento de glicose ao longo de suas vidas (McDOUGAL et al., 1968).

Por outro lado, há estudos histoquímicos e eletrofisiológicos demonstrando a sobrevivência de neurônios de tartarugas submetidas à anoxia mesmo quando a via glicolítica está inibida (XIA et al., 1992). Segundo este trabalho, a sobrevivência do tecido nervoso nesta condição poderia resultar de diferentes mecanismos tais como, a utilização de múltiplos substratos como fonte de energia, a redução do consumo energético e a habilidade de poder alterar as propriedades da membrana a fim de limitar a utilização e a necessidade de ATP.

### **1.2- Papel da histoquímica no estudo do sistema nervoso**

Atualmente, para a determinação do padrão de atividade regional do tecido nervoso é comum o uso de métodos de mapeamento metabólico. Estes estudos baseiam-se na medida de parâmetros tais como, a taxa de utilização da glicose, o fluxo sanguíneo e a atividade de enzimas oxidativas, como marcadores da atividade funcional dos neurônios. Isto deve-se ao conceito fundamental do método, o qual estabelece que a utilização energética do encéfalo encontra-se acoplada à atividade funcional dos neurônios (revisado por DiROCCO et al., 1989; ERECINSKA & SILVER, 1989). Deste modo, estas técnicas metabólicas constituem uma maneira de

avaliar a atividade funcional de cada região do neuroeixo, tanto nos estados basais como após manipulações experimentais.

Para a identificação das regiões do encéfalo envolvidas em determinada atividade utilizam-se procedimentos histológicos. No entanto, para se conhecer o padrão metabólico de cada uma destas áreas, tornou-se necessário a união entre a histologia e a bioquímica, resultando na histoquímica.

A abordagem histoquímica tem sido e é muito útil para o mapeamento da distribuição de enzimas metabólicas em áreas particulares do tecido nervoso e para o entendimento da filogenia e da ontogenia do encéfalo dos vertebrados. Seus métodos permitem a determinação da expressão de uma dada enzima ou qualquer outra substância neuroativa, como por exemplo, um neurotransmissor e/ou neuromodulador, durante o desenvolvimento de uma espécie qualquer, ou nos diferentes representantes atuais dos vertebrados. Essas técnicas, além de fornecer a distribuição destas substâncias consideradas, possibilitam determinar sua possível localização nas diferentes áreas encefálicas. Também permitem o estabelecimento da relação estrutura-função para uma determinada região do encéfalo ao fornecer dados de sua atividade funcional, tanto no estado basal como nas diferentes situações experimentais (ADAMS, 1965).

### **1.3- Breve revisão histórica da histoquímica e dos estudos do sistema nervoso**

A histoquímica é uma ciência muito antiga. De acordo com Pearse (1968), ela é tão antiga quanto a histologia. Os primeiros relatos de sua utilização na investigação

científica datam de 1800. No entanto, foi apenas a partir de 1830 que a histoquímica tornou-se uma ciência. Seus primeiros modelos experimentais foram as plantas. Com isto, pode-se dizer que a origem da histoquímica foi no estudo dos vegetais. A utilização de animais como modelos neste campo da investigação teve início em 1856. A partir desta data ocorreu uma grande publicação de trabalhos científicos e livros sobre este assunto. A relação seqüencial destes artigos e livros estão bem apresentados na revisão histórica de Pearse (1968). Resumidamente, pode-se dizer que no decorrer desse período, desenvolveram-se diversas técnicas, as quais empregavam vários tipos de corantes. Como alguns exemplos, podem ser citados o emprego histoquímico da reação do iodo, o uso da reação xantoprotéica para a demonstração de proteínas, a utilização do ácido hidrocloreídrico para carboidratos, o emprego de diversos corantes como indicadores de pH e o método do azul de Prússia para a demonstração de ferro.

O uso das enzimas nas técnicas histoquímicas teve início em 1861. Porém, inicialmente, estas foram usadas apenas na digestão de tecidos. Somente a partir de 1866 é que apareceram estudos demonstrando sua localização em tecidos. As primeiras enzimas a serem demonstradas foram as peroxidases, seguidas pela citocromo oxidase. De lá para cá, houve uma explosão de estudos, os quais envolveram distintos tipos enzimáticos. Ainda hoje, essas técnicas são extremamente utilizadas, basta ver o grande número de publicações. Uma pequena parte destas podem ser encontradas nas referências bibliográficas do presente trabalho (PEARSE, 1968).

Por outro lado, o estudo do sistema nervoso é muito jovem. Pode-se dizer que há 100 anos aproximadamente o conhecimento deste tecido restringia-se às células e seus circuitos. A partir de 1897, demonstrou-se a existência de sinapses e ocorreram os primeiros registros diretos de atividade elétrica do neurônio. Somente há uns 15 anos atrás é que foi possível analisar diretamente os mecanismos moleculares que controlam a diferenciação das células nervosas e a expressão de suas propriedades funcionais (SHEPHERD, 1994).

Este atraso nos estudos desse tecido resultou da “mistificação” criada em torno desse órgão. Apesar da neuroanatomia ser uma ciência muito antiga, a qual surgiu no início da civilização, seus estudos basearam-se em elocubrações e dissecações grosseiras até o século 19. Isto deve-se às muitas proibições religiosas e tabus criados em torno deste sistema. Na era aristoteliana, o encéfalo era visto como algo totalmente metafísico. Acreditava-se na existência de uma hierarquia natural, onde o homem ocupava o cume dessa pirâmide hierárquica e os animais constituíam degradações da essência humana. Porém, a partir do final do século 18, esta concepção começou a ser substituída pelas idéias da anatomia transcendental. Segundo esta filosofia, havia um plano geral abstrato a partir do qual a complexidade do tecido nervoso aumentava até alcançar um máximo no encéfalo humano. Desta forma, os animais passaram a ser analisados como progressões até o cume da evolução. Apesar desta mudança, este período foi ainda essencialmente metafísico. Não havia o conceito de continuidade entre as espécies e as transformações eram consideradas apenas como analogias. Todavia, as relações inter-específicas apresentadas por Darwin (1858) trouxeram modificações nesta visão do sistema

nervoso. A partir destas idéias, este órgão começou a ser analisado como uma estrutura que possuía relação temporal. Muito embora ainda prevalecesse os conceitos do plano primitivo, apareceram as hipóteses das variações adaptativas nas diferentes espécies, refletindo a seleção natural preconizada por Darwin. No período posterior a este, ou seja, na época Pós-Darwiniana, ocorreu a introdução das técnicas histológicas, as quais transformaram a neuroanatomia em uma ciência microscópica, onde um de seus objetivos consistia em traçar a filogenia do encéfalo. Assim, pode-se dizer que a neuroanatomia iniciou-se no século 19. Deste século até o presente momento, três períodos caracterizam esta ciência. O primeiro, compreendido pelo intervalo de 1890-1950, representa a fase da neurohistologia. Nele encontram-se os trabalhos clássicos de Golgi, Ramón y Cajal, Ariens-Kappers, Herrick & Crosby. É considerada a idade de ouro da neuroanatomia. Porém, devido ao pequeno número de técnicas histológicas, estes pesquisadores foram limitados em seu trabalho. O segundo período, representado pela década de 1950-1960, caracteriza-se pelo abandono da neurohistologia e pelo começo da utilização das técnicas eletrofisiológicas para as inferências morfológicas. O terceiro período, o qual se inicia a partir de 1960 e chega até o presente momento, refere-se à introdução de novos métodos anatômicos experimentais para o estudo do encéfalo. Dentre estes encontram-se as técnicas de traçamento de vias e de imunohistoquímica, bem como a neuroanatomia molecular (REPÉRANT et al., 1993).

Com base nesse pequeno histórico, fica clara a importância dos estudos do encéfalo dos animais não pertencentes à Classe Mammalia para a compreensão da evolução deste órgão. Quanto maior o número de informações sobre o tecido nervoso

dos vertebrados, maior o conhecimento do processo evolutivo deste tecido. Desta forma, os estudos histoquímicos do encéfalo de qualquer representante dos vertebrados adquirem significativa relevância, principalmente naqueles animais que ocupam posições estratégicas durante o processo evolutivo, como é o caso das tartarugas.

#### 1.4- Glicogênio no encéfalo da tartaruga *Chrysemys dorbigni*

O estudo histoquímico da reserva glicogênica do encéfalo da tartaruga *Chrysemys dorbigni* revelou que este polissacarídeo encontra-se amplamente distribuído pelo neuroeixo, localizando-se em somas e prolongamentos de células de diversas regiões desse tecido. No telencéfalo, a reação positiva ocorreu nos glomérulos olfativos, na camada de fibras olfativas aferentes, em alguns neurônios da eminência dorsal ventricular e em escassas células corticais. No diencéfalo, observou-se positividade nos núcleos rotundus e reuniens, e nos neurônios dos núcleos ventrais hipotalâmicos. No mesencéfalo, os neurônios positivos a este tratamento localizaram-se no núcleo do V par (porções medial e lateral), nos núcleos motores do III e do IV pares cranianos, no torus semicircularis, nos núcleos do ístmo e rubro, no núcleo interpeduncular e na substância nigra. Na medulla oblonga, a reatividade ocorreu nos núcleos reticulares superior, médio e inferior, nos núcleos superior e inferior da rafe, nos núcleos motores do V, VI, VII, X e XII pares cranianos, no núcleo vestibular (porções superior, lateral e descendente), no núcleo coclear e no núcleo do trato solitário. Na medula espinal, região cervical alta, a positividade restringiu-se aos motoneurônios. Os plexos coróides e as células endimárias dos diferentes

ventrículos também apresentaram-se positivas. Esta reação também ocorreu nos tanicitos do diencéfalo (PARTATA & ACHAVAL-ELENA, 1995).

PARTATA (1992) salientou que esta distribuição glicogênica teve alguma similaridade com aquela descrita em ratos, estando, porém, este polissacarídeo mais concentrado no encéfalo da tartaruga. Neste animal, esta reserva predominou nas áreas filogeneticamente mais antigas, enquanto no rato, ao contrário, o glicogênio localizou-se nas regiões mais recentes (GHOSH & GUHA, 1978). Este resultado é intrigante e estimula uma maior abordagem neuroquímica do encéfalo de tartarugas.

#### **1.5- Marcadores funcionais**

Como salientado anteriormente, os métodos de estudo regional do sistema nervoso permitem o estabelecimento das relações estrutura-função, as quais são importantes para o entendimento do funcionamento deste tecido e permitem maiores inferências evolutivas por relacionar áreas homólogas e análogas. Atualmente, os estudos para a análise da função regional do encéfalo utilizam diversas substâncias participantes dos processos bioquímicos deste tecido, as quais passam a ser referidas como marcadores funcionais. Há uma vasta quantidade destes marcadores, porém, neste trabalho serão abordadas as enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPH-diaforase). A escolha destas enzimas deve-se a suas vantagens como marcadores neuronais. Para seu estudo não há necessidade de administração intra-venosa de precursores, como é o caso da 2-desoxiglicose, e sua localização histoquímica é bem simples, não requerendo métodos auto-radiográficos. Além disso, a atividade dessas enzimas é rapidamente

detectada e modifica-se frente a diferentes situações experimentais (HARLEY & BIELAJEW, 1992; VINCENT & KIMURA, 1992).

### 1.5.1- Glicogênio fosforilase

A glicogênio fosforilase é a enzima envolvida na degradação do glicogênio. *In vivo*, ela atua promovendo o rompimento fosforolítico dos laços -1,4- do glicogênio, para dar glicose-1-fosfato (MURRAY et al., 1990). *In vitro*, ao contrário, sua ação resulta na síntese do glicogênio, por unir as pontes -1,4- (IBRAHIM, 1975). Esta enzima existe nas formas ativa e inativa (Fig. 1). A forma ativa, chamada fosforilase **a**, possui um de seus resíduos serina fosforilado em uma união éster com a hidroxila da serina. Por ação de uma fosfatase específica (fosfofosforilase-fosfatase), a enzima pode ser inativada (fosforilase **b**), numa reação que envolve a remoção hidrolítica do fosfato do resíduo serina. A reativação requer a refosforilação com ATP por uma enzima específica, a fosfofosforilase-quinase. A conversão da forma ativa em inativa, ou vice-versa, é dependente da concentração de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e de íons cálcio. O aumento da concentração do AMPc ativa a proteína quinase dependente de AMPc. Esta quinase catalisa a fosforilação da fosforilase quinase-b inativa, ativando-a em fosforilase quinase-a, que, por sua vez, através de uma outra fosforilação, ativa a fosforilase-b para fosforilase-a. Os íons cálcio também podem ativar a fosforilase quinase. Tanto a fosforilase **a** como a fosforilase-quinase-a são desfosforiladas e inativadas pela proteína-fosfatase-1, a qual é inibida por uma proteína chamada inibidor-1, ativada somente após a fosforilação da proteína-quinase dependente de AMPc (MURRAY et al., 1990).

A primeira determinação histoquímica da atividade da glicogênio fosforilase foi realizada por Yin & Sun (1947) em folhas de gerânio. A utilização do tecido nervoso nestes estudos iniciou-se com o trabalho de Takeuchi & Kuriaki, em 1955. Desde então, surgiram numerosos trabalhos sobre este tema. Entretanto, observa-se uma variação na constituição do meio de incubação, o que resulta em uma grande quantidade de técnicas histoquímicas para a determinação da atividade glicogênio fosforilase. Alguns meios utilizam glicogênio como ativador, enquanto outros substituem este polissacarídeo pelo dextran. Em alguns meios de incubação ocorre a adição de insulina. Já outros adicionam este hormônio junto com etanol. Em alguns meios a insulina é substituída por adrenalina ou glucagon. Outros possuem ainda AMP em sua composição, enquanto em alguns outros pode-se encontrar fluoreto de sódio junto com AMP. Porém, todos possuem algo em comum, a utilização da glicose-1-fosfato como substrato. Outro ponto de divergência é a preparação do tecido a ser submetido ao método histoquímico para detecção da atividade dessa enzima. Alguns autores fazem uso da fixação e da inclusão em parafina. Outros preferem congelar o tecido rapidamente em nitrogênio líquido e submetê-lo a cortes em criostato. IBRAHIM et al. (1973) demonstraram que este último procedimento de preparação do tecido deu resultados mais completos sobre a atividade da glicogênio fosforilase.

A técnica histoquímica para o estudo da glicogênio fosforilase em tecidos não fixados permite visualizar tanto a atividade da fosforilase a como a da fosforilase total (formas a e b), dependendo apenas da constituição do meio de incubação do tecido. Quando este meio contém glicose-1-fosfato, glicogênio ou dextran,

etilenodiaminotetraacetato (EDTA) e fluoreto de sódio (NaF), detecta-se apenas a atividade da fosforilase a. Isto decorre da ação do EDTA e do NaF sobre a conversão das formas a e b da enzima em questão. O NaF inibe a ação da fosfatase, prevenindo a transformação da forma a em b (GOLDBERG et al., 1952). Ele também inibe a fosfoglicomutase, assim impedindo a conversão da glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato. Há dúvidas quanto ao mecanismo de ação do EDTA sobre a atividade da glicogênio fosforilase. Este composto foi usado pela primeira vez no meio de incubação para a verificação da atividade dessa enzima em 1963, por Godlewski. Este autor sugeriu que seu mecanismo de ação consistiria na inibição da fosforilase b quinase, assim impedindo a conversão da forma b para a forma a. No entanto, HORI (1964; 1966a; b) descreveu que este composto teria um efeito estimulatório sobre a atividade da enzima em questão. Ele ativaria a adenilato ciclase, resultando na formação de AMPc, o qual estimularia as duas formas da glicogênio fosforilase. Coopersmith & Leon (1987) descreveram que a adição de EDTA ao meio de incubação serve para quelar íons cálcio, os quais podem ativar a enzima fosforilase b quinase. Apesar destas dúvidas quanto à ação do EDTA sobre a enzima glicogênio fosforilase, este composto ainda é muito utilizado na preparação dos meios. A adição de AMPc ao meio de incubação resulta na visualização da atividade da fosforilase total, pois este nucleotídeo ativa ambas as formas da fosforilase e inibe a ação de fosfatases (IBRAHIM, 1975).

Ambas as formas da glicogênio fosforilase encontram-se amplamente distribuídas no sistema nervoso (BRECKENRIDGE & NORMAN, 1962; 1965), sendo sua localização muito similar àquela descrita para o glicogênio (SHIMIZU &

OKADA, 1957). Recentemente, HARLEY & BIELAJEW (1992) descreveram a distribuição da glicogênio fosforilase no encéfalo de ratos adultos. A atividade enzimática esteve presente em diversas áreas do sistema nervoso central, tanto na substância cinzenta como na branca. Essa reação positiva localizou-se em neurônios sensoriais e motores, e na camada ependimária. Os plexos corioides foram negativos a este tratamento histoquímico. Além disso, a atividade da glicogênio fosforilase total e da glicogênio fosforilase a foi similar.

Estudos histoquímicos e bioquímicos sobre a glicogênio fosforilase apoiam a hipótese de que em alguns sistemas neurais a proporção dessa enzima relaciona-se diretamente com a atividade nervosa. No córtex cerebral de camundongos, demonstrou-se que a alta atividade glicogênio fosforilase está associada com as colunas de dominância ocular (WALLACE, 1983). Woolf et al. (1984; 1985) demonstraram que a desnervação e a aplicação de um estímulo nociceptivo periférico induziu a elevação da atividade da glicogênio fosforilase a no corno dorsal e nos motoneurônios da medula espinal de ratos. A estimulação elétrica de fibras do tipo C e dos gânglios simpáticos geraram um acréscimo na glicogenólise, sugerindo uma ativação da atividade da glicogênio fosforilase (De RIBAUPIERRE, 1968; LANDOWNE & RITCHIE, 1971). Em bulbo olfatório de ratos jovens, a atividade da glicogênio fosforilase total variou após exposição dos animais a um estímulo olfativo (COOPERSMITH & LEON, 1987). Diversos estudos bioquímicos demonstraram que a hipóxia, a hiperglicemia, a aplicação de convulsivantes e a estimulação elétrica aumentam a atividade desta enzima (LOWRY et al., 1964; BRECKENRIDGE & NORMAN, 1965; KING et al., 1967; DRUMMOND & BELLWARD, 1970;

FOLBERGRAVÁ, 1975). Outras situações que ocasionam aumento da atividade da glicogênio fosforilase são a ação de alguns neurotransmissores (EDWARDS et al., 1974; WOOLF, 1987) e a administração de amfetaminas (NAHORSKI & ROGERS, 1974). Já o tratamento com barbitúricos leva a uma diminuição da atividade da glicogênio fosforilase (WATANABE & PASSONNEAU, 1973).

#### 1.5.2- Citocromo oxidase

A citocromo oxidase, também chamada citocromo  $aa_3$ , é um marcador intensivamente estudado devido ao seu papel crítico no metabolismo energético. Ela é uma hemoproteína amplamente distribuída em muitas plantas e tecidos animais. É um componente terminal da cadeia de transportadores respiratórios encontrados nas mitocôndrias (Fig. 2) e, portanto, responsável pela reação em que os elétrons, resultantes da oxidação das moléculas do substrato pelas desidrogenases, são transferidos para seu aceptor final, o oxigênio (MURRAY et al., 1990). Esta enzima é essencial para o funcionamento do sistema nervoso, pois a produção energética deste tecido depende praticamente do metabolismo aeróbico da glicose (SOKOLOFF, 1992). Ela constitui-se no sítio onde a energia é conservada para a síntese de ATP (WIKSTRÖM et al., 1981).

O maior consumidor de ATP em neurônios é a bomba sódio/potássio, a qual mantém o equilíbrio iônico necessário para o potencial de repouso, despolarizado durante a atividade elétrica do neurônio (HEVNER et al., 1992). O aumento da atividade elétrica ocasiona acréscimo da respiração aeróbica celular e,

conseqüentemente, da atividade citocromo oxidase a fim de gerar mais moléculas de ATP (Fig. 3). As mitocôndrias são importantes também na homeostase da concentração intracelular de cálcio. Deste modo, possuem um papel significativo na comunicação celular, desde que a atividade sináptica ocasiona elevações transitórias na concentração celular deste íon (MILLER, 1991). Esta união entre atividade citocromo oxidase e a atividade elétrica na demanda energética celular levou Wong-Riley (1979; 1989) a postular que a intensidade de atividade da citocromo oxidase neuronal relaciona-se diretamente com o estado funcional deste tipo celular. Assim, quanto mais neurônios ativos em uma dada região encefálica, maior a atividade citocromo oxidase em suas mitocôndrias (HEVNER & WONG-RILEY, 1989).

A primeira demonstração da atividade citocromo oxidase em tecidos ocorreu em 1885, por Ehrlich (PEARSE, 1968). Porém, o aprimoramento na histoquímica dessa enzima realizou-se em 1968 quando Seligman et al. introduziram a utilização do reagente osmiofilico 3,3-diaminobenzidina (DAB), no meio de incubação, o qual funciona como um doador de elétrons para o citocromo c. Nesta reação o DAB é polimerizado a indamina, um polímero osmiofilico, que é detectado ao microscópio óptico e eletrônico. Muito embora esta reação localiza citocromo c na superfície externa da membrana mitocondrial interna e também no espaço entre as cristas mitocondriais, ela requer uma reoxidação contínua do citocromo c pela citocromo oxidase para uma acumulação adequada do produto de reação. Assim, ela representa essencialmente a atividade citocromo oxidase (Fig. 4). O emprego deste método histoquímico para o estudo da citocromo oxidase no tecido nervoso foi realizado por Wong-Riley, em 1979. De lá para cá, diversos estudos apresentam a localização desta

enzima no tecido nervoso de diversas espécies. Em ratos, esta enzima foi encontrada em diversos núcleos neuronais, inclusive nas áreas corticais, estando presente em diferentes tipos de neurônios. Nesses estudos, esta enzima apresentou um padrão característico de distribuição, sendo mais intensa na substância cinzenta do que na branca (KRUKOFF et al., 1983; DIFIGLIA et al., 1987; HARLEY & BIELAJEW, 1992; HEVNER et al., 1995). A atividade citocromo oxidase também ocorreu na via auditiva central de *Meriones unguiculatus* (GONZÁLEZ-LIMA & JONES, 1994) e na área cortical 3a de gatos (AVENDAÑO & VERDU, 1992). Em macacos, sua localização foi detectada no córtex cerebelar (LECLERC et al., 1990) e no córtex visual, onde formam os conhecidos “puffs” ou “blobs”, que são zonas metabolicamente ativas envolvidas no processamento das cores (HORTON & HUBEL, 1981).

Nos répteis, a atividade da citocromo oxidase foi detectada em lagartos e em tartarugas. Na região cortical de lagartos, essa enzima localizou-se nas três camadas, porém não houve qualquer reação no córtex lateral (REGIDOR & POCH, 1988). Na tartaruga *Pseudemys scripta elegans*, a atividade encefálica da citocromo oxidase ocorreu no córtex cerebral, no hipocampo, na amígdala, no tálamo, no hipotálamo, no cerebelo, no tronco encefálico e na medula espinal (XIA et al., 1992). Os estudos bioquímicos desta enzima no encéfalo desta espécie de tartaruga revelaram que, na região cortical, a atividade citocromo oxidase foi apenas 25% daquele valor observado em rato adulto e jovem, enquanto no tronco encefálico, esta percentagem foi de 30% (XIA et al., 1992). Cabe ressaltar que, neste estudo, a atividade da

citocromo oxidase no tecido nervoso de rato jovem foi tão alta quanto aquela do mesmo tecido de rato adulto.

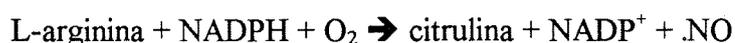
Do mesmo modo que a glicogênio fosforilase, a citocromo oxidase também modifica sua atividade frente a determinados estímulos. Wong-Riley (1979) observou uma redução em sua atividade após danos causados aos centros visuais. Em ratos Brattleboro, animais incapazes de sintetizar o hormônio anti-diurético, a atividade da citocromo oxidase mostrou-se elevada nos núcleos hipotalâmicos paraventricular, supra-óptico e circularis (KRUKOFF et al., 1983). A hipóxia é outra condição que resulta em supressão de sua atividade (NELSON & SILVERSTEIN, 1994). Outras situações que levam a modificações na citocromo oxidase são os distúrbios cerebrais que envolvem redução do metabolismo encefálico e irregularidades no fluxo sanguíneo, como por exemplo, nas doenças de Alzheimer, Huntington, Parkinson, entre outras (WONG-RILEY, 1989).

### 1.5.3- NADPH-diaforase

O método histoquímico para a demonstração da atividade da NADPH-diaforase no encéfalo utiliza  $\beta$ -NADPH como substrato e azul de nitrotetrazólio como aceptor de elétrons. A redução do azul de nitrotetrazólio resulta na formação de um produto chamado formazan, o qual produz uma coloração azul escura e insolúvel nas regiões que possuem a enzima NADPH-diaforase. A técnica inicial foi desenvolvida por Thomas & Pearse, em 1961, os quais demonstraram a presença desta enzima em neurônios corticais e em células dos gânglios basais. Posteriormente, outros estudos evidenciaram sua atividade em diversas regiões do tecido nervoso (ABE et al., 1963;

DUCKETT & PEARSE, 1964; THOMAS & PEARSE, 1964; SHIMIZU & ABE, 1966; SIMS et al., 1974). Porém, após este período, pouca atenção foi dispensada ao estudo da NADPH-diaforase. Entretanto, atualmente cresceu o interesse por esta enzima. Isto deve-se ao conhecimento de que sua atividade é preservada após fixação dos tecidos com paraformaldeído (MATSUMOTO et al., 1993a) e pela demonstração de que ela é uma óxido nítrico sintetase (NOS), a enzima responsável pela síntese do óxido nítrico (HOPE et al., 1991). Deste modo, a simples técnica para a detecção da NADPH-diaforase permite a localização de células capazes de sintetizar o óxido nítrico, muito embora a distribuição de ambas as enzimas não seja totalmente coincidente. Valtchanoff et al. (1993) descreveram a existência de divergências na distribuição da NADPH-diaforase e óxido nítrico sintetase em hipocampo de ratos, apesar de que o índice de similaridade foi quase 100%. No encéfalo da tartaruga *Pseudemys scripta elegans*, algumas regiões foram reativas à NADPH-diaforase e negativas ao tratamento imunohistoquímico da óxido nítrico sintetase (BRÜNING et al., 1994). Estas áreas são o nervo e os glomérulos olfativos, os núcleos hipotalâmicos supra-óptico e paraventricular, o órgão subcomissural e o núcleo mesencefálico do V par craniano. Esta mesma resposta foi observada por Brüning et al. (1995) em encéfalo de *Carassius auratus*, porém, neste animal, a positividade manteve-se apenas no núcleo mesencefálico do V par craniano e nas células granulares do cerebelo. Como se pode ver, as diferenças na distribuição destas duas enzimas foram sempre pequenas, o que torna a técnica histoquímica da NADPH-diaforase ainda indicada para a localização de células envolvidas na síntese do óxido nítrico, principalmente quando não se dispõem de anticorpos específicos ou “probes” gênicas para o estudo da óxido nítrico sintetase.

O óxido nítrico é um radical livre resultante da oxidação do grupo guanidino da L-arginina por ação da enzima óxido nítrico sintetase; é uma hemoproteína citosólica do tipo P450, que é regulada pelo complexo cálcio-calmodulina. Esta enzima utiliza como substratos o oxigênio e o NADPH, onde o oxigênio é incorporado ao óxido nítrico e ao grupo ureído da L-citrulina, o outro produto desta reação, enquanto o NADPH parece estar envolvido na formação da N-hidroxi-L-arginina (GROZDANOVIC et al., 1994). Alguns tipos celulares necessitam de cálcio como um cofator. A reação global de síntese do óxido nítrico pode ser representada da seguinte forma:



O grande interesse atual pelo óxido nítrico decorreu da demonstração de que esta molécula parece atuar como um neurotransmissor e/ou neuromodulador no sistema nervoso central. Garthwaite et al. (1988) demonstraram que ela foi liberada de terminais axonais após a propagação de potenciais de ação, e agiu sobre moléculas receptoras localizadas nas células pós-sinápticas. A administração de substâncias com efeito inibidor sobre a síntese de óxido nítrico resultou em uma inibição dessa resposta (GROZDANOVIC et al., 1994). Além disso, demonstrou-se a localização do óxido nítrico junto com neurotransmissores clássicos (UEMURA et al., 1990; VANHATALO & SOINILA, 1994), sendo, inclusive, capaz de influenciar a liberação de alguns deles (HIRSCH et al., 1993). No entanto, esta proposta de influência pré-sináptica do óxido nítrico é ainda muito debatida, pois de acordo com Garthwaite & Boulton (1995) há necessidade ainda de investigações experimentais mais relevantes.

Os dados mais convincentes até o presente momento provém de estudos utilizando o óxido nítrico endógeno, ou seja, aquele presente nos tecidos não estimulados (PRAST & PHILIPPU, 1992; BUGNON et al., 1994; GUEVARA-GUZMAN et al., 1994) e aqueles onde o óxido nítrico é gerado pela ativação dos receptores NMDA (DICKIE et al., 1992; HANBAUER et al., 1992; SORKIN, 1993; MONTAGUE et al., 1994). Contudo, em cultura de neurônios hipocampais, O'Dell et al. (1991) observaram que a exposição breve destas células a baixas concentrações de óxido nítrico (5-10 nM) resultou em aumento da frequência de pequenas correntes pós-sinápticas excitatórias, sugerindo uma ação pré-sináptica do óxido nítrico em terminais glutamatérgicos. Porém, a perfusão de fatias hipocampais com óxido nítrico na concentração de 100 nM não teve efeito sobre a linha basal da transmissão sináptica. Todavia, a associação desse tratamento com estimulação tetânica fraca (50 Hz por 0,5 s) potencializou por longo tempo a eficiência sináptica, possivelmente por um mecanismo pré-sináptico (ZHUO et al., 1993). Mas, por outro lado, há estudos demonstrando que a perfusão de células hipocampais com substâncias doadoras de óxido nítrico ou com aquelas inibidoras da conversão da guanidina monofosfato cíclica deprimiu reversivelmente a transmissão sináptica provavelmente por mecanismos pré-sinápticos (BOULTON et al., 1994). Além disso, um estudo recente sugeriu que o óxido nítrico pode também afetar a captação de neurotransmissores, visto que substâncias doadoras dessa molécula inibiram o transporte de dopamina, serotonina e glutamato marcados, mas não o de adrenalina, em preparações de sinaptossomas estriatais (POGUN et al., 1994).

O óxido nítrico também parece regular a liberação de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise, muito embora ocorram resultados divergentes. Em algumas situações, sua ação parece ser inibitória, ou seja, a liberação de alguns hormônios mostra-se potenciada pela inibição desta molécula (KATO, 1992; CECCATELLI et al., 1993; COSTA et al., 1993; RIVIER & SHEN, 1994). Porém, há evidências de uma ação estimulatória do óxido nítrico sobre a liberação de hormônios hipofisiários (KARANTH et al., 1993; RETTORI et al., 1993; 1994; AGUILLA, 1994).

Apesar desses resultados experimentais, permanece em debate o papel do óxido nítrico na neurotransmissão central. Esta problemática decorreu do fato desta molécula não preencher todos os requisitos necessários para a definição de um transmissor clássico. Ela não é encontrada armazenada em vesículas sinápticas, e sua síntese, ao contrário dos clássicos neurotransmissores, inicia-se quando ocorre uma estimulação celular (ZHANG & SNYDER, 1995).

As discussões também envolvem outras funções propostas para o óxido nítrico no tecido nervoso. Algumas destas estão bem definidas, como por exemplo, seu efeito vasodilatador (FARACI & BRIAN, 1994). Em encéfalo, o óxido nítrico parece influenciar o fluxo sanguíneo cerebral local, acoplando-o às necessidades neuronais (GARTHWAITE & BOULTON, 1995). Porém, outras ainda são especulativas. Acredita-se que o óxido nítrico esteja envolvido na potenciação a longo prazo (LTP), desempenhando alguma participação nos mecanismos de aprendizagem e de memória (BOHME et al., 1991; O'DELL et al., 1991; SCHUMAN & MADISON, 1991; HALEY et al., 1992). Esta hipótese decorre de sua fácil difusão através das células e

de sua geração por influxo de cálcio associado à ativação do receptor NMDA. Entretanto, até recentemente, não há evidências convincentes da presença da NOS em neurônios piramidais CA1 do hipocampo, muito embora estes mostrem reação positiva à NADPH-diaforase (SOUTHAM & GARTWAITE, 1991). Todavia, há resultados demonstrando positividade destes neurônios ao tratamento com anticorpo neuronal seletivo à NOS (DINERMAN et al., 1994; WENDLAND et al., 1994). Um outro suporte à hipótese de envolvimento do óxido nítrico na LTP provém de inúmeros dados demonstrando que a administração de inibidores da NOS resultou em bloqueio da LTP (BOHME et al., 1991; O'DELL et al., 1991; SCHUMAN & MADISON, 1991; BON et al., 1992; GRIBKOFF & LUM-RAGAN, 1992; HALEY et al., 1992). Porém, outros dados não demonstram esses efeitos (WILLIAMS et al., 1993). Os resultados divergentes levaram à sugestão de que o óxido nítrico deve induzir LTP apenas quando são utilizados estímulos muito fracos (GRIBKOFF & LUM-RAGAN, 1992; CHETKOVICH et al., 1993; HALEY et al., 1993).

O óxido nítrico também parece estar envolvido na depressão a longo prazo (LTD). Diversos resultados experimentais mostraram que a utilização de inibidores da NOS produzem bloqueio da LTD, tanto em hipocampo (IZUMI & ZORUMSKI, 1993) quanto em cerebelo de mamíferos (CREPEL & JAILLARD, 1990; ITO & KARACHOT, 1990; DANIEL et al., 1993).

Outro papel atribuído ao óxido nítrico é seu envolvimento na neurotoxicidade provocada pelo glutamato. Em cultura de neurônios corticais, o tratamento com antagonistas da NOS resultou em proteção à neurotoxicidade (DAWSON et al.,

1991; 1993). Em camundongos, ratos e gatos, a administração de pequenas doses de nitroarginina, um inibidor da NOS, ocasionou proteção contra os danos provocados pela oclusão da artéria cerebral média (NOWICKI et al., 1991; BUISSON et al., 1992; NAGAFUJI et al., 1992; TRIFILETTI, 1992; NISHIKAWA et al., 1993). Entretanto, há dados experimentais sugerindo um efeito benéfico do óxido nítrico durante a isquemia experimental. De acordo com Nishimura et al. (1991) e Moncada et al. (1992), essa molécula agiria mantendo o fluxo sanguíneo e inibindo a agregação e a adesão plaquetária durante o período isquêmico. Nesta situação, ele também foi capaz de bloquear os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (MANZONI et al., 1992). Atualmente acredita-se que, pelo menos na isquemia, a produção de óxido nítrico pode ser benéfica nos primeiros minutos ou horas da ocorrência de isquemia, porém, após este período inicial, tornar-se-ia neurotóxica (PELLIGRINO, 1993).

Apesar das interrogações quanto ao papel do óxido nítrico no tecido nervoso, a técnica histoquímica para NADPH-diaforase e o método imunohistoquímico para NOS revelaram neurônios positivos em diversas regiões deste tecido de vertebrados. Grande parte dos estudos referem-se à Ordem Mammalia. Em ratos, a NADPH-diaforase está amplamente distribuída pelo neuroeixo. Mas sua localização não se relaciona com aquela descrita para qualquer neurotransmissor, muito embora tenha ocorrido em muitos núcleos onde se sabe existir um ou outro neurotransmissor clássico. Além disso, a reação à NADPH-diaforase esteve presente em toda a via visual desse animal, desde a retina até o córtex cerebral, o que sugere seu envolvimento neste sistema (SANDELL, 1984; 1985, 1986; COBCROFT et al., 1989; SAGAR, 1990; AIMI et al., 1991; PASQUALOTTO et al., 1991; VINCENT &

KIMURA, 1992; VALTSCHANOFF et al., 1992). No neocórtex de gambá, a atividade NADPH-diaforase apresentou uma distribuição semelhante àquela observada na Ordem Rodentia, porém diferiu daquela encontrada nesta região de gatos e primatas (VOLCHAN & FRANCA, 1994). Em medula espinal de ratos, a positividade à NADPH-diaforase localizou-se nas camadas superficiais do corno dorsal e em torno do canal central em todos os segmentos medulares. Os neurônios da coluna celular intermédio-lateral também foram positivos. Alguns neurônios reativos ainda foram observados nas camadas profundas do corno dorsal, no corno ventral e na substância branca. (VALTSCHANOFF et al. , 1992). A reatividade da NADPH-diaforase também esteve presente nos gânglios das raízes dorsais de ratos, gatos e macacos. Em ratos, esta atividade localizou-se nos pequenos neurônios sensoriais (22-32  $\mu\text{m}$ ) e em alguns neurônios de tamanho médio (32-50  $\mu\text{m}$ ) dos gânglios dos segmentos L4 e L5 (ZHANG et al., 1993). Em macacos, esta positividade foi detectada em pequenos neurônios de 28-35  $\mu\text{m}$  de diâmetro e em neurônios médios de 35-50  $\mu\text{m}$ . Já em gatos, a maior intensidade de reação ocorreu nas menores células do gânglio dos segmentos L7-S2 (VIZZARD et al., 1994). Esta reatividade da NADPH-diaforase também foi descrita na amígdala de macacos (PITKÄNEN & AMARAL, 1991) e em algumas áreas do sistema nervoso central de humanos (FERRANTE et al., 1985; ELLISON et al., 1987; SOBREVIELA & MUFSON, 1995).

Nesses estudos, a reação positiva à NADPH-diaforase e à NOS ocorreu no soma e nos processos das células nervosas. Além disso, algumas vezes foi possível verificar que, em alguns núcleos positivos, a atividade apresentou-se localizada junto

com outras substâncias neuroativas, tais como, a somatostatina, o neuropeptídeo Y, a galanina, o GABA, o C-PON e a acetilcolina (VINCENT et al., 1983; VINCENT & JOHANSSON, 1983; VINCENT et al., 1986; SCOTT et al., 1987; KOWALL & BEAL, 1988; VANEY & YOUNG, 1988; SCHOBER et al., 1989; VILLALBA et al., 1989; PASQUALOTTO & VINCENT, 1991).

A distribuição da atividade NADPH-diaforase também já foi determinada no sistema nervoso de diversos vertebrados não mamíferos. Na lampréia, esta enzima ocorreu em neurônios e fibras de regiões como o bulbo olfatório, a glândula pineal, a habênula, a medulla oblonga e a medula espinal (SCHOBER et al., 1994). Ela também ocorreu em neurônios diencefálicos da truta arco-íris (SCHOBER et al., 1993), em células gliais do *Lepomis spp.* (MA, 1993) e no sistema nervoso central de *Carassius auratus* (FIORILLO et al., 1993; VILLANI et al., 1994; BRÜNING et al., 1995).

Nos anfíbios, a atividade desta enzima foi descrita nas células amácrinas da retina de rãs (SATO, 1990a) e no órgão pineal da *Rana esculenta* (SATO, 1990b). Recentemente, Muñoz et al. (1996) realizaram o mapeamento da NADPH-diaforase no neuroeixo de rã.

Nas aves, seu mapeamento foi realizado em duas espécies, na galinha e na codorna japonesa (BRÜNING, 1993; PANZICA et al., 1994). Nestes animais, sua atividade localizou-se em diversos núcleos do neuroeixo, apresentando grande similaridade com aquela observada em mamíferos. Esta enzima também foi demonstrada nas células amácrinas da retina de pombos (SATO, 1990a).

Nos répteis, a atividade NADPH-diaforase foi descrita em lagarto e em tartaruga. Em córtex de lagartos, a atividade NADPH-diaforase localizou-se em todas as regiões, inclusive no córtex lateral (REGIDOR & POCH, 1988). Todavia, na tartaruga *Pseudemys scripta elegans*, o córtices dorsal, médio e médio dorsal exibiram poucas células reativas. Porém, ao contrário destas áreas, o córtex piriforme ou lateral apresentou muitas células intensamente reativas à NADPH-diaforase. Já o neuropilo de toda a região cortical mostrou-se fortemente positivo (BRÜNING et al., 1994). Estes resultados demonstram diferenças na distribuição da NADPH-diaforase nos animais pertencentes à Classe Reptilia. Isto leva ao questionamento da possibilidade de existirem diferenças inter-específicas na atividade desta enzima, uma vez que não se conhece seu mapeamento em espécies pertencentes a uma mesma ordem dessa Classe.

#### **1.6- Modificações pós-natais do sistema nervoso**

De acordo com McIlwain (1955), o desenvolvimento do sistema nervoso abrange quatro períodos: o primeiro corresponde à fase de divisão celular, que em ratos e camundongos, representa a fase de formação da placa neural até o nascimento. No homem, porco-espinho e porco, este período abrange os primeiros três quartos da gestação. O segundo período corresponde à fase de crescimento e diferenciação de axônios e dendritos, onde ocorre um aumento rápido do tamanho e da complexidade das células nervosas, bem como um pequeno aumento em seu número. O rato apresenta ao nascimento 94-97% do número de células nervosas do adulto, mas estas continuam a crescer rapidamente até o décimo dia de vida pós-natal. No homem, este

período representa os 210-280 dias de gestação. A terceira fase representa o período de mielinização rápida, a qual, em ratos, ocorre entre o décimo e o vigésimo dia após o nascimento. No homem, essa fase é observada aos 120 dias. O quarto período representa a fase de mielinização lenta, sendo este o estágio final do desenvolvimento, o qual se caracteriza pelo crescimento lento do encéfalo até atingir as proporções do adulto e a finalização do processo de mielinização. No rato, o processo de mielinização completa-se aos 50 dias, sendo muito lento a partir do vigésimo sexto dia. No homem, este processo parece finalizar-se aos 4 anos de idade. Todavia, Spector (1965) destaca que estes períodos podem receber outras subdivisões. Por exemplo, um estágio crítico é descrito na segunda fase, pois durante esta os processos celulares crescem e se distanciam do corpo celular, a substância de Nissl aparece, a atividade elétrica se inicia e o consumo de oxigênio aumenta.

No entanto, Alberts et al. (1994) descrevem que o desenvolvimento do sistema nervoso abrange três fases: na primeira, os neurônios são gerados por divisão celular, processo semelhante ao de outros tecidos corporais. Na segunda fase, ocorre a formação de sinapses entre este tecido e outros alvos corporais, através do crescimento dos axônios e dendritos ao longo de rotas específicas. Na terceira fase, a qual continua durante a vida adulta, as conexões anteriormente formadas são remodeladas e refinadas de acordo com o padrão de atividade elétrica da rede neural.

Apesar desta variação no número de períodos que abrangem o desenvolvimento do tecido nervoso, é certo que a transição da vida fetal para a neonatal constitui um período crítico no desenvolvimento. Há um número apreciável

de investigações científicas demonstrando diversas modificações morfológicas do tecido nervoso durante os períodos pré e pós-natais (FLEXNER, 1955). Estas observações levaram ao conceito de que, em mamíferos, certos animais nascem com o tecido nervoso relativamente maduro. Estas espécies recebem o nome de animais precoces. Como exemplo pode-se citar o cavalo, a ovelha, o porco-espinho, etc. No entanto, há espécies que nascem com o sistema nervoso em um estágio bem atrasado do desenvolvimento, sendo referidas como animais não precoces. Nesta categoria encontram-se o camundongo, o coelho, o cão, o gato, etc., e, inclusive, o homem. Estas espécies não precoces apresentam um certo grau de resistência à hipóxia, o qual está diretamente relacionado com o estágio incompleto de maturação do tecido nervoso (BÔMONT et al., 1992).

Com relação ao desenvolvimento pós-natal do encéfalo de tartarugas, sabe-se que a organogênese fundamental das estruturas telencefálicas mostra-se praticamente finalizando ao nascimento, mas não seu crescimento. Assim, depois da eclosão, a organização da eminência dorsal ventricular anterior do telencéfalo (ADVR) continua, particularmente a organização radial da zona interna, e a convexidade característica desta região prossegue aumentando de tamanho. As estruturas corticais, neste estágio, já mostram seu aspecto maduro e começa a formação de colunas na área do espessamento palial e no ADVR. Os núcleos do septo e do estriado encontram-se bem individualizados, com o aspecto daqueles do animal adulto (MARQUES, 1994). Por estes dados, supõe-se que as tartarugas constituem exemplos de animais precoces, estando o encéfalo ao nascimento em um estágio bem avançado do desenvolvimento. Entretanto, nada foi encontrado na literatura a esse respeito.

Em mamíferos, sabe-se que o desenvolvimento neural pós-natal é acompanhado de modificações na atividade de diversas enzimas, as quais ocorrem tanto em animais precoces como não precoces. Booth et al. (1980) relataram a existência de alteração da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose e dos corpos cetônicos após o nascimento destes animais.

Shimizu & Okada (1957) demonstraram, em diversas espécies de representantes da ordem Rodentia, que a atividade da glicogênio fosforilase apresentou modificações ao longo do desenvolvimento pós-natal, as quais diferiram daquela observada para o glicogênio. Do nascimento até o quinto dia de vida, a reatividade à glicogênio fosforilase ocorreu nas mesmas áreas positivas ao glicogênio. Entretanto, no período de 10 a 21 dias, essa enzima teve um acréscimo em sua atividade, enquanto o glicogênio não aumentou proporcionalmente. No animal adulto, volta a semelhança entre a distribuição destes compostos. Esta similaridade ontogenética entre glicogênio fosforilase e glicogênio também foi observada no desenvolvimento do rombencéfalo de galinha (MARMO et al., 1976).

Com relação à citocromo oxidase, inúmeros autores estudaram o padrão de sua atividade em distintos períodos do desenvolvimento do tecido nervoso e salientaram que a atividade desta enzima apresenta variações durante o desenvolvimento do encéfalo. Entretanto, a maioria deles focalizou o sistema visual (WONG-RILEY & WELT, 1980; KAGEYAMA & WONG-RILEY, 1986; BARR et al., 1987; LACHICA et al., 1987; CASAGRANDE & CONDO, 1988; DEHAY & KENNEDY, 1988; MURAKAMI & FULLER, 1988; SHAW et al., 1988; WONG-RILEY et al.,

1989; LUI & WONG-RILEY, 1990). Já Hovda et al. (1992) descreveram que, em gatos, a capacidade oxidativa do tecido nervoso mostrou-se baixa ao nascimento, com exceção das regiões filogeneticamente mais antigas, as quais desenvolveram uma intensa reação citocromo oxidase. As outras áreas apresentaram um desenvolvimento progressivo, aumentando a atividade oxidativa a partir da 5ª semana de vida pós-natal. No entanto, atividade semelhante a do animal adulto foi observada após 60 dias de vida extra-uterina. Em medulla oblonga de ovelhas, a reatividade desta enzima diminui durante o desenvolvimento pós-natal. Mas, antes desta queda, houve uma tendência transitória de acréscimo, a qual ocorreu após oito horas do nascimento e regrediu imediatamente (TAI et al., 1995). Já em ratos de 5 dias de idade, a distribuição e a intensidade de reatividade desta enzima foi semelhante àquela observada no animal adulto (XIA et al., 1992). As pequenas diferenças observadas referem-se à atividade enzimática levemente superior em algumas regiões encefálicas do animal recém-nascido e à existência de uma maior heterogeneidade de reação no tecido do rato adulto. As áreas mais reativas foram: hipocampo, tálamo, tronco encefálico e medula espinal.

Outros estudos demonstraram ainda que a atividade citocromo oxidase tem relação com a densidade capilar e com o fluxo sanguíneo cerebral, tanto no animal adulto (GROSS et al., 1986; KLEIN et al., 1986; BOROWSKY & COLLINS, 1989) como durante o desenvolvimento pós-natal (TUOR et al., 1994). Nesta última situação, estes autores observaram que a elevação metabólica precede a angiogênese. Cabe ainda destacar que, em células de Purkinje do cerebelo de ratos em desenvolvimento, a atividade citocromo oxidase diferiu nas várias regiões de um

mesmo neurônio, dependendo do tipo de sinapse que estava recebendo. Se a aferência era excitatória, a região mostrava uma alta reatividade. Mas, ao contrário, se a aferência fosse inibitória, esta atividade apresentava-se baixa. Este estudo também revelou que há uma relação direta entre a atividade citocromo oxidase e o tamanho das mitocôndrias nos somas e nos dendritos das células de Purkinje. (MJAATVEDT & WONG-RILEY, 1988).

O óxido nítrico também parece possuir algum papel na ontogenia do sistema nervoso. Diversos resultados experimentais conferem-lhe importância no desenvolvimento e na diferenciação deste tecido. O tratamento de cultura de células PC12 com o fator de crescimento neuronal leva à ativação da NOS e, conseqüentemente, à formação de óxido nítrico. Esta molécula, por sua vez, parece desempenhar um importante papel no término da fase proliferativa e na indução dos mecanismos de diferenciação neuronal (PEUNOVA & ENIKOLOPOV, 1995). A ela também é conferida a função de induzir a morte celular programada, a qual é responsável por uma perda de praticamente 50% dos neurônios durante o estabelecimento das conexões neuronais (HESS et al., 1993). Sua participação também parece ser necessária na formação e no estabelecimento das relações sinápticas, bem como na formação e na segregação do neuropilo durante os últimos estágios de desenvolvimento (GALLY et al., 1990). Esta molécula também parece estar relacionada com o desenvolvimento de neurônios motores. Kalb & Agostini (1993) demonstraram que a produção local de óxido nítrico no corno ventral medular poderia contribuir para a aquisição das características moleculares maduras de neurônios motores, tais como a expressão do proteoglicano de superfície que reage

com o anticorpo monoclonal CAT301. Além disso, a detecção de NADPH-diaforase revelou um pequeno número de células positivas no neocórtex de rato recém-nascido. Porém, estas aumentaram sua expressão na primeira semana de vida pós-natal, sendo que o padrão laminar do adulto foi estabelecido ao final da segunda semana (YAN et al, 1994). Também cabe ressaltar que o óxido nítrico mostrou-se envolvido na organização das conexões do sistema retinotectal de pintos (WILLIAMS et al., 1994). Matsumoto et al. (1993b) observaram que a distribuição da atividade NOS alteraram-se durante a maturação do tecido nervoso. No cérebro, a reação da fração particulada aumentou durante a primeira semana de vida pós-natal, sofrendo, logo em seguida, uma diminuição, sendo que no adulto ocorreu apenas vestígio de sua atividade. No entanto, a fração citosólica apresentou um pequeno acréscimo durante esta fase. Este aumento também ocorreu na fração citosólica do cerebelo, mas a fração particulada desta região mostrou baixa atividade ao nascimento. Porém, esta aumentou durante o processo de maturação do tecido, de modo que no adulto os valores encontrados foram oito vezes maiores do que aqueles obtidos no animal recém-nascido.

#### **1.7- Alterações no sistema nervoso central após secção de nervo periférico**

A lesão de um axônio resulta em uma série de modificações metabólicas, estruturais e funcionais no soma neuronal, as quais são chamadas reações retrógradas ou axonais. Estas incluem o desaparecimento dos corpúsculos de Nissl, a dilatação e o arredondamento do corpo celular, o deslocamento do núcleo para o lado oposto ao cone de crescimento axonal e o aumento do tamanho do núcleo e do nucléolo. Além destas, ocorre também um deslocamento das cisternas do aparelho de Golgi para a

periferia do neurônio e o ancoramento da cromatina sexual na membrana nuclear (LIEBERMAN, 1971). Por estas alterações, o neurônio pode sofrer degeneração e morrer, ou recuperar-se completamente ou parcialmente. A recuperação completa requer a reinervação adequada, enquanto na parcial esta reinervação pode ser incompleta (LIEBERMAN, 1974). Esta recuperação reflete a capacidade de reorganização e crescimento de novas fibras no tecido nervoso de animais adultos. Em ratos adultos, a lesão de aferentes primários, ocasionadas por compressão, secção ou aplicação de neurotoxinas, regenerou-se devido a brotamentos de colaterais aferentes da raiz dorsal, resultantes principalmente da proliferação ou reestruturação dos limites normais ou moderadamente expandidos desses colaterais (MOLANDER et al., 1988; HIMES & TESSLER, 1989; LaMOTTE et al., 1989; McNEILL et al., 1990; POLISTINA et al., 1990).

Essas mudanças decorrentes da secção de nervo periférico foram observadas nas células do gânglio da raiz dorsal (LIEBERMAN, 1971; JESSELL et al., 1979; ZHANG et al., 1995a), as quais podem estender-se à medula espinal (KNYIHAR & CSILLIK, 1976; MORADIAN & RUSTIONI, 1977; TESSLER et al., 1980; HENTALL & FIELDS, 1983; McGREGOR et al., 1984; EL-BOHY & LAMOTTE, 1993; ZHANG et al., 1995b; ZHANG et al., 1995c) e a centros mais superiores do neuroeixo (PERSSON et al., 1991). Dentre essas mudanças destaca-se a queda significativa na expressão da substância P (SP).

As primeiras evidências da SP ocorreram em 1931, quando von Euler & Gaddum observaram, em extratos de tecidos nervosos e intestinais, a existência de

uma substância com efeito hipotensivo, o qual não era bloqueado pela atropina. No entanto, seu reconhecimento como peptídeo ocorreu em 1936, quando Von Euler observou sua inativação pela tripsina. Assim, a SP foi o primeiro peptídeo identificado que apresentava funções neuroativas. A letra **P** é uma abreviação de “powder”, visto que os primeiros testes farmacológicos utilizavam extratos em pó. A determinação da estrutura química da SP ocorreu 34 anos após os estudos iniciais, quando Chang & Leeman (1970) demonstraram que sua cadeia está composta por 11 aminoácidos.

Inúmeros estudos relatam a presença deste peptídeo no intestino, nas glândulas salivares, em músculos lisos, vasculares ou não, e em muitas áreas do sistema nervoso central de mamíferos, sendo que neste último as maiores concentrações ocorrem no hipotálamo, no estriado, na substância nigra, na substância cinzenta periaquedutal e na medula espinal (BRADFORD, 1986; De FELIPE et al., 1989). No corno dorsal da medula espinal, a SP está concentrada nas fibras do trato de Lissauer e nas lâminas I e II. Algumas fibras da lâmina I irradiam em direção às lâminas mais profundas do corno dorsal. A lâmina III contém escassas fibras positivas, as quais aparecem também nas lâminas V e X. As fibras da lâmina V formam um plexo que se estende dorsalmente invadindo o fascículo dorsolateral (HUNT, 1983). O corno ventral medular, por sua vez, expressa pequenas quantidades deste peptídeo (WILLIS, 1985). Entretanto, alta concentração de SP foi encontrada em células dos gânglios das raízes dorsais (CHAN-PALAY & PALAY, 1977). Em ratos, os neurônios contendo SP representam 15-20% da população total de células do gânglio raquidiano.

A SP do corno dorsal medular origina-se principalmente de fibras aferentes primárias (Fig. 5). Estes axônios periféricos, cujos corpos celulares são neurônios sensoriais localizados no gânglio raquidiano dorsal, finalizam como terminações nervosas livres na pele ou na proximidade aos vasos sanguíneos, enquanto sua porção central termina nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinal (HÖKFELT et al., 1975). Cerca de 80% da substância P provém de sua produção nas pequenas células do gânglio da raiz dorsal, sendo transportada pelas fibras aferentes até os terminais localizados no corno dorsal medular (HÖKFELT et al., 1975; TAKAHASHI & OTSUKA, 1975; CHAN-PALAY & PALAY, 1977; JESSELL et al., 1979; BARBUT et al., 1981; EL-BOHY & LAMOTTE, 1993). Entretanto, a SP também está presente em axônios de interneurônios medulares (HÖKFELT et al., 1975; LJUNGDAHL et al., 1978) e em fibras descendentes de neurônios do tronco encefálico que se projetam para a medula espinal (SCHOENEN et al., 1968; JESSELL et al., 1978).

A SP parece estar envolvida nos mecanismos da transmissão nociceptiva dos mamíferos, constituindo-se em um neuromediador das fibras aferentes finas, o qual é liberado no plexo perivascular provocando vasodilatação e edema (LaMOTTE et al., 1983). As evidências desta participação foram inferidas por resultados experimentais de imunohistoquímica, estudos iontoforéticos e por desnervação cirúrgica ou farmacológica, esta última com a utilização da capsaicina, um agente neurotóxico que destrói as fibras aferentes amielínicas provocando uma pronunciada depleção da SP no trato de Lissauer, nas lâminas I e II e nas fibras rostrocaudais da medula espinal (HÖKFELT et al., 1975; CUELLO, 1978). No entanto, a expressão deste peptídeo é

recuperada parcial ou totalmente após 3 meses-lano de secção do nervo periférico (TESSLER et al., 1985; HIMES & TESSLER, 1989; WANG et al., 1991), sendo esta recuperação principalmente devido a outros aferentes primários (HIMES & TESSLER, 1989) e a células locais (TESSLER et al., 1985). A recuperação também foi observada depois de rizotomia múltipla (TESSLER et al., 1984; WANG et al., 1991) e de gangliectomia (MICEVYCH et al., 1986), sendo, nestes casos, provavelmente, o resultado de síntese do peptídeo pelos neurônios intraespinais (MICEVYCH et al., 1986).

Em vertebrados não mamíferos, a distribuição da SP medular foi demonstrada em alguns representantes das aves (LAVALLEY & HO, 1983), dos répteis (LUTHMAN et al., 1991) e dos anfíbios (INAGAKI et al., 1981; LOREZ & KEMALI, 1981). Os resultados mostraram uma distribuição desse peptídeo, na medula, muito semelhante àquela observada em mamíferos.

Em medula espinal de tartarugas *Chrysemys dorsalis*, a detecção imunohistoquímica da SP revelou sua presença em fibras pertencentes ao campo sináptico Ia, sendo que alguns axônios invadiam o campo sináptico III. Algumas fibras positivas chegavam a cruzar a linha média (LUTHMAN et al., 1991). A comparação destes resultados com aqueles obtidos com o marcador peroxidase de rabanete (HRP) indicaram que os axônios imunorreativos à SP consistiam em colaterais de fibras sensoriais primárias provenientes do gânglio da raiz dorsal, as quais penetravam na medula pelo campo sináptico Ia (TRUJILLO-CENÓZ et al., 1990).

Com relação as enzimas consideradas no presente estudo, encontraram-se poucos dados sobre a atividade da glicogênio fosforilase e da citocromo oxidase após desnervação periférica. Quanto às alterações da NADPH-diaforase nessa situação experimental, existe maiores informações.

A expressão da glicogênio fosforilase na medula espinal de ratos elevou-se após desnervação (WOOLF et al., 1984). Já os resultados referentes à atividade da citocromo oxidase apresentam-se divergentes. De acordo com Rausell et al. (1992), a expressão desta enzima não se alterou no núcleo cuneato de macacos cronicamente rizotomizados. Porém, Goldberger et al. (1993) mostraram redução de sua atividade em neurônios do núcleo de Clarke após rizotomia dorsal de gatos. Esta mesma resposta ocorreu no núcleo cuneato de gatos submetidos à desnervação de uma das patas anteriores (AVENDAÑO & DYKES, 1996). Esta redução também foi descrita em animais jovens. Em ratos de seis dias de idade, a desnervação e a remoção da pata dianteira provocaram uma queda na atividade citocromo oxidase do núcleo cuneato (CROCKETT et al., 1993; FOSCHINI et al., 1994).

A lesão do sistema nervoso periférico ocasionou aumento da expressão da NADPH-diaforase em neurônios do gânglio raquidiano e do corno dorsal da medula espinal (FIALLOS-ESTRADA et al., 1993; WU, 1993; TRAUB et al., 1994; ANDO et al., 1996). Este acréscimo de atividade dos neurônios do gânglio raquidiano persistiu até 50 dias (FIALLOS-ESTRADA et al., 1993) Entretanto, o padrão de resposta parece depender da espécie em questão. Em macacos, ao contrário da resposta obtida em rato, a secção de um nervo periférico não ocasionou modificações

da atividade da enzima NOS no corno dorsal da medula espinal (ZHANG et al., 1993). Este aumento da atividade NADPH-diaforase também tem sido descrito em motoneurônios cranianos (JIA et al., 1994; RUAN et al., 1994; YU, 1994). No entanto, este aumento não parece ser simultâneo com a atividade da NOS. Recentemente, demonstrou-se que danos causados ao nervo facial resultaram em um aumento da atividade NADPH-diaforase nos motoneurônios do núcleo deste nervo no segundo dia após a desnervação. Porém, a expressão NOS apareceu somente a partir do quinto dia. Contudo, após este intervalo de tempo, ambas as atividades aumentaram (RUAN et al., 1995). Por outro lado, os motoneurônios da medula espinal parecem responder de acordo com a intensidade do dano periférico causado. Em rato adulto, estas células continuaram inexpressivas à NADPH-diaforase após desnervação periférica e secção da raiz ventral da medula espinal, porém, observou-se expressão dessa atividade após avulsão da raiz ventral (WU, 1993).

Este acréscimo da atividade NADPH-diaforase da medula espinal e do gânglio raquidiano parece ser bilateral (FIALLOS-ESTRADA et al., 1993; TRAUB et al., 1994), muito embora ocorram evidências experimentais sugerindo que este seja ipsilateral ao lado da lesão (VERGE et al., 1992; ZHANG et al., 1993).

Herdegen et al. (1993) observaram que as lesões do fascículo telencefálico medial e do tracto mamilo-talâmico induziram expressão da NOS nos somas neuronais destes feixes, a qual persistiu até cinco meses. No entanto, há dados na literatura demonstrando que a atividade NADPH-diaforase não se modificou nas regiões mais superiores do encéfalo após lesões periféricas ao tecido nervoso, ficando

as alterações restritas à medula espinal. De acordo com Traub et al. (1994), a atividade desta enzima nas células pertencentes à substância cinzenta periaqueductal e ao núcleo póstero-lateral do tálamo não se alterou após este tipo de tratamento. Porém, houve aumento na expressão da NADPH-diaforase na região da medula espinal.

### 1.8- Considerações finais

Com base nos dados apresentados, verifica-se que ainda é muito pequena a representação dos vertebrados não pertencentes à classe Mammalia nos estudos sobre a atividade regional do encéfalo através do uso de marcadores funcionais. Esta pouca significância dificulta a elaboração de hipóteses sobre o processo evolutivo desses marcadores e limita o conhecimento da filogenia da relação estrutura-função do tecido nervoso. É evidente que uma maior abordagem no reino animal fornecerá mais dados para a compreensão dos processos metabólicos do encéfalo e possibilitará maiores inferências sobre a evolução do neuroeixo. Desta forma, julgou-se ser importante o aprofundamento destes estudos em espécies que ocupam posições estratégicas dentro da escala evolutiva, como é o caso das tartarugas. Assim, no presente trabalho, procurou-se inicialmente realizar o mapeamento das enzimas glicogênio fosforilase e citocromo oxidase no encéfalo de tartarugas adultas, cuja distribuição do glicogênio encefálico, já fora previamente determinado (PARTATA & ACHAVAL-ELENA, 1995), permitindo estabelecer correlação entre este carboidrato e aquelas enzimas, assim trazendo mais subsídios ao conhecimento do metabolismo encefálico de tartarugas. Para um maior entendimento da funcionalidade deste tecido de tartarugas, realizou-se também o mapeamento da NADPH-diaforase,

o qual permite o conhecimento da distribuição de células capazes de sintetizar o óxido nítrico nesta espécie de tartaruga. Estas determinações histoquímicas poderão contribuir para maior esclarecimento sobre a grande tolerância à anoxia nestes animais, pois a glicogênio fosforilase e a NADPH-diaforase parecem ter algum papel nessa característica. Como apresentado inicialmente, um dos fatores necessários à sobrevivência de neurônios de tartarugas submetidas à anoxia é a utilização da via glicolítica (LUTZ et al., 1985). Em mamíferos, os neurônios positivos à NADPH-diaforase mostram-se mais resistentes à hipóxia (FERRIERO et al., 1988; UEMURA et al., 1990) e a danos citotóxicos (BEAL et al., 1986; KOH et al., 1986; MALCON et al., submetido).

É possível que o encéfalo de tartarugas apresente variações enzimáticas pós-natais, assim como foi descrito em mamíferos. Todavia, dados experimentais sobre este tema são ainda praticamente inexistentes. Com o objetivo de trazer contribuições a esta questão, será apresentado o estudo das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase no encéfalo de tartarugas jovens para comparação com os resultados obtidos nos animais adultos.

Visando maior entendimento do papel funcional das referidas enzimas no tecido nervoso de tartaruga, acrescentaram-se ao presente estudo os dados referentes aos efeitos do jejum e da secção de nervo periférico. Estas situações experimentais baseiam-se no conhecimento de que as tartarugas podem tolerar longos períodos de jejum, sem alterar apreciavelmente sua glicemia e suas reservas glicogênicas (MACHADO, 1977; SILVA, 1986; PARTATA, 1992), e pela inexistência de estudos

referentes aos efeitos de uma desnervação periférica em quelônios. Como está demonstrado em mamíferos que uma característica desta última situação experimental é a diminuição da expressão da SP, considerou-se válido determinar a presença desse peptídeo em populações neuronais da medula espinal e do gânglio raquidiano de tartarugas após a desnervação periférica.

## **OBJETIVOS**

O presente trabalho tem como objetivo determinar a distribuição das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase em subpopulações neuronais no sistema nervoso central de tartarugas adultas, em condições basais, e as possíveis modificações pós-natais da atividade dessas enzimas em função do desenvolvimento, e após distintas situações experimentais, como a secção de nervo ciático e o jejum.

Para isto, foram objetivos específicos:

-Localizar, mediante procedimentos histoquímicos, a distribuição das atividades das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase em subpopulações neuronais do sistema nervoso central de tartarugas *Trachemys dorbigni*, adultas, em condições basais.

-Demonstrar, por métodos histoquímicos, a distribuição das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase nas diferentes áreas encefálicas de tartarugas *Pseudemys scripta elegans*, jovens, em condições basais.

-Realizar um estudo anátomo-temporal das variações das atividades das enzimas citocromo oxidase e NADPH-diaforase no encéfalo e na medula espinal cervical alta e lombar, bem como em gânglio raquidiano de tartarugas *Trachemys dorbigni*, adultas, após a secção do nervo ciático.

- Efetuar, mediante técnica imunohistoquímica, um estudo anátomo-temporal das modificações na expressão da SP em subpopulações neuronais do gânglio raquidiano e da medula espinal cervical alta e lombar de tartarugas *Trachemys dorbigni*, adultas após a secção do nervo ciático.

-Avaliar o efeito do jejum de 90 dias sobre as atividades da glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase no encéfalo e na medula espinal cervical alta de tartarugas *Trachemys dorbigni*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### 1- Animais: Procedência e Manutenção

Para este estudo foram utilizadas tartarugas *Chrysemys dorbigni*, atualmente denominadas *Trachemys dorbigni* segundo critérios de Seidel & Smith (1986), e *Pseudemys scripta elegans*.

Os espécimes *Trachemys dorbigni* eram animais adultos, de ambos os sexos, com peso médio de 900 gramas, as quais procediam do município de Guaíba, adjacente à Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Os animais foram coletados com a devida autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Licenças números 138/91 e 031/95 - DEVIS.

As tartarugas *Trachemys dorbigni* eram coletadas à mão em seu ambiente natural e trazidas para o Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde permaneciam em tanques especiais localizados em ambiente aberto, contendo água constantemente renovada e uma porção central com terra. As tartarugas eram alimentadas *ad libitum* com carne bovina moída e fígado de galinha durante um período de adaptação de no mínimo uma semana antes de serem utilizadas nos trabalhos experimentais.

Dada a impossibilidade de obtenção de *Trachemys dorbigni* jovens, optou-se pela utilização de exemplares da tartaruga *Pseudemys scripta elegans* que eram facilmente adquiridas em lojas especializadas em venda de animais. Estas tartarugas de ambos os sexos, com peso médio de 8 gramas permaneciam no laboratório em caixas de plástico, contendo água e pedras em seu interior. Também foram

alimentadas *ad libitum* com carne bovina moída e fígado de galinha durante um período de adaptação de quinze dias.

Cabe ressaltar que em nenhum momento os animais foram submetidos a maus tratos ou sofrimento desnecessários, sendo que seu uso estava estritamente dentro da lei nº 6.638 de 8 de maio de 1979, a qual regulamenta o uso de animais para a prática didático-científica. O número de tartarugas utilizado para o estudo da atividade de cada uma das enzimas e da expressão da SP em condições basais ou experimentais foi de 2 a 3 animais.

## **2- Preparação dos tecidos para as técnicas histoquímicas**

**2.1- Glicogênio fosforilase:** Para o estudo da enzima glicogênio fosforilase no sistema nervoso central das espécies *Trachemys dorbigni* e *Pseudemys scripta elegans*, as tartarugas foram decapitadas e o encéfalo e a medula cervical alta rapidamente retirados, sendo, em seguida, congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido. Após isto, cortes coronais de 25 µm de espessura foram obtidos em criostato (LEITZ DIGITAL 1720) a uma temperatura de -15°C e montados em lâminas tratadas com gelatina cromo-alúmen. Esta solução de cromo-alúmen era preparada com 0,3 g de sulfato de potássio crômico, 3 g de gelatina e 500 ml de água destilada quente (40°C). As lâminas eram deixadas secar à temperatura ambiente por um período de 10 a 20 minutos e, em seguida, submetidas à técnica histoquímica para a glicogênio fosforilase ( WOOLF et al., 1985).

**2.2- Citocromo oxidase:** Para a demonstração da atividade da enzima citocromo oxidase nas espécies de tartarugas em estudo, estas foram submetidas a uma perfusão intra-cardíaca. As tartarugas *Trachemys dorbigni* foram, inicialmente, anestesiadas com pentobarbital sódico (Abbott), via intraperitoneal, a uma concentração de 25 mg/ml/kg de peso corporal. Após a retirada do plastrão com o auxílio de uma serra elétrica (Asclepios), localizava-se o coração e o cone arterial. Estando visualizado este órgão, procurava-se afastá-los dos tecidos à sua volta com o intuito de deixá-los completamente isolados. Em seguida, 1000 UI/kg de heparina (Liquemine, Roche) era injetada no ventrículo cardíaco para evitar a formação de coágulos. Após isto, realizava-se uma incisão no ventrículo e por esta fazia-se passar a cânula do aparelho perfusor. Uma vez visualizada a ponta da cânula na aorta ascendente, a mesma era fixada por meio de uma pinça fazendo-se passar 250 ml de solução salina para a lavagem da árvore vascular. Imediatamente após a fixação da pinça e início da passagem de solução salina na aorta, fazia-se uma incisão na aurícula direita para que todo o sistema sanguíneo e de perfusão tivesse saída. Ao término desta lavagem, deixava-se passar pelo sistema perfusor 250 ml de solução de paraformaldeído 4% (Reagen) diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (TP) contendo 0,2% de gluteraldeído (Sigma) para fixação dos tecidos. Terminada a perfusão, o encéfalo e a medula espinal cervical alta eram retirados com o auxílio de um saca-bocado e colocados em solução de paraformaldeído 4% diluído em TP por 2 horas à 4°C em agitação contínua. Esgotado este período de tempo, os tecidos eram crioprotetidos em solução de sacarose 15 e 30%, preparada em TP, e deixados a 4°C até afundar em agitação contínua. Cortes coronais de 50 µm de espessura eram obtidos em micrótomo de congelação (LEITZ), os quais eram coletados em frascos de vidro

contendo TP à 4°C, sendo, em seguida, submetidos à técnica histoquímica para a citocromo oxidase (WONG-RILEY, 1979).

As tartarugas *Pseudemys scripta elegans* foram anestesiadas conforme descrito para a outra espécie. A abertura do plastrão foi feita com uma tesoura dada a fragilidade dessa estrutura e a perfusão realizada com o auxílio de uma seringa de 1 ml. Para esta, utilizaram-se 3 ml de solução salina e 3 ml de solução de paraformaldeído 4% em TP contendo 0,2% de glutaraldeído. Os outros procedimentos foram iguais, porém os cortes dos tecidos foram realizados em criostato (LEITZ DIGITAL 1720) e coletados em lamínulas tratadas com gelatina cromo-alúmen devido ao seu pequeno tamanho. Estas lamínulas contendo os cortes permaneciam 15 minutos à temperatura ambiente para melhor adesão do tecido à lamínula e, em seguida, eram submetidas ao mesmo método histoquímico da citocromo oxidase utilizado para as tartarugas *Trachemys dorbigni*.

**2.3- NADPH-diaforase:** Para a detecção da atividade da enzima NADPH-diaforase, as tartarugas *Trachemys dorbigni* e *Pseudemys scripta elegans* foram decapitadas e, imediatamente, retirados o encéfalo e a medula espinal cervical alta, os quais foram rapidamente colocados em solução de paraformaldeído 4% diluído em TP contendo 0,2% de glutaraldeído (Sigma). Nesta solução, os tecidos permaneciam por 2 horas à 4°C. Em seguida, estes eram pós-fixados, por 2 horas à 4°C, em uma solução de paraformaldeído 4% diluído em TP. Ao término deste período, os tecidos eram crioprotetidos em solução de sacarose 15 e 30%, diluída em TP, e deixados a 4°C, em agitação contínua, até afundar. Em seguida, os tecidos foram seccionados coronalmente (100 µm) em micrótomo de congelação (LEITZ), coletados em frascos

de vidro contendo TP e submetidos à técnica histoquímica para NADPH-diaforase (VALTSCHANOFF et al., 1992).

Os cortes do encéfalo das tartarugas *Pseudemys scripta elegans* foram realizados em criostato (LEITZ DIGITAL 1720) e coletados em lamínulas tratadas com gelatina cromo-alúmen, as quais permaneciam 15 minutos à temperatura ambiente, sendo, logo após, tratadas de acordo com a técnica histoquímica da NADPH-diaforase utilizada para *Trachemys dorbigni*.

### 3- Tratamento dos animais

**3.1- Desnervação Periférica:** Inicialmente os animais eram anestesiados conforme a técnica descrita por Belló & Belló-Klein (1991), a qual está esquematizada na Figura 6. O animal era imobilizado em um aparelho próprio para quelônios, o qual consiste de dois semi-anéis articulados entre si que permite abri-los ou fechá-los conforme a necessidade. Quando fechados em torno do pescoço da tartaruga não permite que esta o retire. O anel inferior, por sua vez, se encontra fixado a uma placa de metal onde o animal permanece apoiado. Uma das extremidades de uma cânula plástica (PE 100) era introduzida na glote do animal e a outra conectada a um frasco de vidro. Este último continha chumaços de algodão embebidos em éter e uma cobertura plástica com algumas pequenas perfurações. Estando o animal bem relaxado, o membro posterior direito era firmemente seguro por um pedaço de esparadrapo e injetado 1,0 ml de xilocaína 2% (Astra) em vários pontos para permitir a incisão dos tecidos moles, através dos conhecidos procedimentos cirúrgicos, a fim de visualizar o nervo ciático do animal. Visualizado este nervo, procurava-se afastar os tecidos a sua

volta com o intuito de deixá-lo completamente isolado. Em seqüência, dois fios de sutura de algodão eram colocados debaixo do nervo de tal forma que uma distância de dois centímetros permanecesse entre eles. Neste estágio dava-se nós nos fios de sutura e, em seguida, cortava-se o segmento do nervo localizado entre os fios de sutura. Antes de suturar o corte, um oitavo de um comprimido floxinol (Millet Roux) era raspado e colocado em toda a área com o objetivo de evitar a formação de um processo infeccioso. Feito isto, a incisão era suturada com fio de algodão. O tipo de sutura escolhido foi a sutura de Wolff por ser a mais indicada nos casos de maior tensão (LAZZERI, 1977) e por acreditar que esta podia vedar melhor a cisão. Em seguida, a área suturada era recoberta com uma solução de celoidina 4% (Merck). Ao final, o animal era retirado da placa de contenção, colocado em um recipiente com água e mantido no laboratório. Estes animais foram utilizados após 7 e 15 dias, 1, 2 e 3 meses após o procedimento cirúrgico. Neste intervalo de tempo era oferecido alimento *ad libitum* aos animais. Os animais controles permaneciam nestas mesmas condições ambientais, porém não eram submetidos à secção do nervo ciático.

**3.2- Tartarugas submetidas ao jejum:** Para este estudo, utilizou-se tartarugas *Trachemys dorbigni*, adultas, as quais eram transferidas para recipientes com água, onde permaneciam sem qualquer alimento por 90 dias. Após o término deste período, estes animais foram sacrificados por decapitação para a retirada do encéfalo e da medula espinal cervical alta e preparados conforme as técnicas descritas anteriormente para a determinação da expressão das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase. Os animais controles consistiam naquelas tartarugas utilizadas nos estudos de distribuição destas enzimas no sistema nervoso central desta espécie de tartaruga.

#### 4- Procedimentos Histoquímicos

As atividades das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase foram detectadas nos cortes de encéfalo e de medula espinal cervical alta das tartarugas *Trachemys dorbigni* adultas e *Pseudemys scripta elegans* jovens, conforme as técnicas descritas logo a seguir. Deve-se ressaltar que estas determinações foram efetuadas tanto nos animais em condições basais como naquelas tartarugas *Trachemys dorbigni* submetidas ao jejum de 90 dias. Nos animais desnervados, realizaram-se apenas as determinações histoquímicas da citocromo oxidase e da NADPH-diaforase. Não foi realizada a técnica da glicogênio fosforilase pela impossibilidade de retirada rápida dos gânglios e da medula espinal lombar. Para comprovar se a reação desenvolvida pelas técnicas correspondiam à atividade das respectivas enzimas, realizava-se a incubação de alguns cortes em meio sem substrato.

**4.1- Glicogênio Fosforilase:** Para a demonstração da atividade glicogênio fosforilase utilizou-se a técnica descrita por Woolf et al. (1985). No entanto, modificou-se o tempo de incubação dos cortes devido à maior atividade glicogênio fosforilase encefálica na tartaruga. Os cortes montados em lâminas gelatinizadas foram incubados no meio para a glicogênio fosforilase por 15 minutos a 37°C. Este meio era composto por 200 mg de etilenodiaminotetraacetato dissódico, 160 mg de NaF, 4 g de dextran - 40.000 PM - (Sigma), 800 mg de  $\alpha$ -d- glicose-1-fosfato (Sigma) e 90 ml de tampão aceto-acetato 0,1 M, pH 5,6. Para completar o volume final de 100 ml deste meio, acrescentava-se água destilada. O pH final de 6,0 foi conseguido pela adição de algumas gotas de hidróxido de sódio 0,1 N e medido em pHmetro (Digimed). Assim, desta forma, este meio permitia visualizar a atividade da glicogênio fosforilase a. Para

a demonstração da enzima glicogênio fosforilase total, agregava-se a este meio adenosina monofosfato (Sigma) a uma concentração de 2,3 mM. Terminado o período de incubação, as lâminas eram escorridas, fixadas em álcool 40% por três minutos e submetidas a um banho de três minutos em solução de lugol com sacarose 11%. Este banho visava revelar a atividade enzimática. Após o banho, as lâminas eram lavadas rapidamente em solução salina, para remoção do excesso de solução de lugol, montadas em solução de lugol com glicerol (1:1) e cobertas com lamínulas. A reação positiva era evidenciada por uma coloração marrom ou azul violácea no citoplasma das células.

**4.2- Citocromo oxidase:** Para a observação da atividade desta enzima, os cortes “free-floating” dos animais adultos e as lamínulas contendo o tecido seccionado das tartarugas jovens foram incubados por 4 horas a 37°C no meio para citocromo oxidase descrito por Wong-Riley (1979). Este meio era constituído por 50 mg de diaminobenzidina (Sigma), 90 ml de TP, 23 mg de citocromo oxidase tipo III (Sigma) e 4 g de sacarose (Reagen). Ao final do período de incubação, os cortes eram lavados 3 vezes em TP, coletados em lâminas gelatinizadas e deixados secar à temperatura ambiente. Em seqüência, estas lâminas eram hidratadas em água destilada e submetidas a um banho de vapor de tetróxido de ósmio (Merck), por 3 minutos, para intensificar a coloração da reação. Após isto, as lâminas eram desidratadas em álcoois crescentes, clareadas em xilol e cobertas com bálsamo do Canadá e lamínulas. As células positiva apareciam com uma coloração marrom.

**4.3- NADPH-diaforase:** A atividade desta enzima foi demonstrada pela técnica descrita por Valtschanoff et al. (1992). Os cortes “free-floating” dos animais adultos e

as lâminulas contendo o tecido seccionado das tartarugas jovens eram colocados em solução de triton X-100 diluído em TP por 10 minutos sob agitação contínua (Agitador Orbital, Mod. 255-B, FANEM). Ao término deste período, esta solução foi substituída pelo meio de incubação, o qual continha 0,5 mg/ml de  $\beta$ -NADPH (Sigma), 0,2 mg/ml de azul de nitrotetrazólio (Sigma) e tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4 contendo 12  $\mu$ l de triton X-100. Neste meio, os cortes eram pré-incubados, em agitação constante, por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo, em seguida, colocados a 37°C, onde permaneciam por 4 horas. Após isto, os cortes eram lavados 3 vezes em TP, coletados em lâminas gelatinizadas, desidratados em álcoois crescentes, clareados em xilol e cobertos com bálsamo do Canadá e lamínulas. As células positivas apresentavam coloração azul violeta no corpo e nos prolongamentos.

#### **5- Procedimentos utilizados para os animais com desnervação periférica**

As tartarugas desnervadas foram inicialmente anestesiadas e submetidas a uma perfusão intra-cardíaca conforme descrito no item 3.2. Após este procedimento, o encéfalo e a medula espinal cervical alta foram rapidamente retirados e colocados em uma solução de paraformaldeído 4% em TP por 3 horas a temperatura ambiente. Durante este período, procedia-se a retirada da medula espinal lombar, a nível do segmento 20 (Fig. 7), e dos gânglios raquidianos. Para isto, visualizavam-se os nervos ciáticos, os quais eram dissecados retrogradamente em seus três ramos proximais até as emergências na coluna vertebral. Após uma laminectomia completa da região, dissecavam-se os gânglios raquidianos, seguindo o trajeto de seus três ramos até sua origem na medula espinal, quando então eram seccionados e retirados em ambos os lados. Durante esta retirada, tomava-se o cuidado de separar os gânglios raquidianos do lado desnervado e do lado não desnervado. Além disso, extraía-se a região

correspondente da medula espinal lombar. Estes tecidos eram imediatamente colocados também em solução de paraformaldeído 4% em TP, onde permaneciam por 3 horas em temperatura ambiente para pós-fixação. Ao final deste período, os tecidos passavam para uma solução de sacarose 15 e 30%, preparada em TP, para crioprotégê-los. Nesta permaneciam até afundar à temperatura de 4°C e em agitação contínua. Logo após, cortes coronais de 50 µm de espessura foram obtidos em criostato (LEITZ 1720) a -15°C e coletados em frascos contendo tampão a 4°C até o início das técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas.

Os cortes do encéfalo e da medula espinal cervical alta foram submetidos à técnica histoquímica da citocromo oxidase e da NADPH-diaforase. Entretanto, alguns cortes da medula espinal cervical, aqueles da medula lombar e dos gânglios raquidianos foram submetidos à técnica imunohistoquímica descrita por Sternberger (1979). Todavia, alguns dos cortes destas últimas regiões citadas também receberam tratamento para a demonstração da atividade da citocromo oxidase e da NADPH-diaforase.

#### **6- Procedimento imunohistoquímico para a SP**

Para a demonstração da expressão da SP em medula espinal cervical alta e lombar, e gânglio raquidiano de tartarugas *Trachemys dorbigni*, adultas e desnervadas, utilizou-se a técnica de anticorpo não marcado de Sternberger (1979). Para isto, os cortes receberam inicialmente uma série de pré-tratamentos para bloquear a atividade da peroxidase endógena e alguns sítios inespecíficos de união de anticorpos antes da incubação com o anticorpo primário.

O bloqueio da atividade peroxidásica era realizado mediante o tratamento dos cortes com uma solução de metanol 10% diluída em uma solução de peróxido de hidrogênio 3% preparada em PBS. Esta pré-incubação tinha duração de 30 minutos e realizava-se à temperatura ambiente e sob agitação constante (Agitador Orbital, Mod. 255-B, FANEM). Após isto, os cortes foram lavados em PBS 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, decorrentes da existência de múltiplos locais onde os anticorpos podem unir-se inespecificamente, devido a atrações hidrofóbicas, reações eletrostáticas, pontes salinas, etc., realizava-se uma pré-incubação dos cortes com soro não imune do animal doador do segundo anticorpo, a cabra (STERNBERGER, 1979). Esta pré-incubação tinha duração de 30 minutos e era feita à temperatura ambiente e em agitação contínua. A concentração desta solução era de 3% preparada em Triton X-100 0,4% diluído em PBS (PBS-T). O Triton é um detergente que favorece a penetração dos anticorpos no tecido. Ao término deste período, este meio era descartado e iniciava-se a incubação com o anticorpo primário da SP (doado pelo professor J. del Ríó do Instituto Cajal, Madrid, Espanha). Este era do tipo policlonal, desenvolvido em coelho e diluído em PBS-T na proporção de 1:800. A incubação tinha duração de 16-18 horas e realizava-se a 4°C e em agitação contínua (Agitador Orbital PA 141, PACHANE). Em seqüência, os cortes eram lavados em PBS-T nas condições descritas inicialmente, sendo, logo após, incubados com o anticorpo secundário (Sigma). Este era um anticorpo de coelho desenvolvido em cabra e tinha diluição de 1:50 em PBS-T. Esta incubação

realizou-se à temperatura ambiente durante 2 horas e em contínua agitação (Agitador Orbital, Mod 255-B, FANEM).

Após isto, os cortes eram lavados em PBS-T, conforme já descrito, e foram incubados em uma solução de peroxidase antiperoxidase (PAP, Sigma) diluído 1:500 em PBS-T, durante 2 horas, à temperatura ambiente e em agitação contínua. Este complexo PAP reage imunologicamente com o anticorpo secundário, o qual, por sua vez, reconhece o anticorpo primário. Por este motivo o anticorpo secundário é também chamado de “ponte”. O complexo PAP é solúvel e consta de três moléculas de peroxidase de rabanete (HRP), um marcador, por cada duas moléculas de antiperoxidase.

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

Depois desta revelação, os cortes foram lavados intensamente em PBS e colocados em lâminas tratadas com gelatina cromo-alúmen, cujo método de preparação já foi descrito anteriormente. Após adesão dos cortes à lâmina, estes foram desidratados com soluções crescentes de álcool, diafanizados em xilol e cobertos com Entellan (Merck) e lamínulas.

Para a determinação da especificidade do anticorpo utilizado para reconhecer o antígeno em estudo, utilizavam-se dois tipos de controles. Em um fazia-se a substituição do anticorpo primário por soro normal da espécie doadora deste anticorpo, e no outro realizava-se a substituição do anticorpo primário por PBS. Estes dois tipos de controle foram efetuados em diferentes experimentos e os resultados obtidos foram sempre negativos, indicando que a imunorreatividade observada era o resultado da interação antígeno-anticorpo primário, e não ocasionada pelos anticorpos secundários e terciários.

Para controle das mudanças na expressão da SP oriundas da secção do nervo periférico, compararam-se os resultados do lado ipsilateral e contralateral à desnervação, servindo este último como controle.

As atividades da glicogênio fosforilase, citocromo oxidase, NADPH-diaforase e da SP no sistema nervoso central das tartarugas *Trachemys dorbigni*, adultas, em condições basais ou após os dois tratamentos, e *Pseudemys scripta elegans*, jovens em condições basais, foram examinadas e fotografadas através do fotomicroscópio NIKON OPTIPHOT-2 equipado com câmera fotográfica NIKON FX-35DX, ou reproduzidas em desenhos esquemáticos conforme Reiner (1987), o qual se baseou no

atlas de Power & Reiner (1980). Porém, introduziram-se modificações nos desenhos propostos por esses autores, pois também foram considerados os esquemas apresentados por Anthony (1970). Os somas neuronais foram medidos com a ajuda de uma ocular micrométrica (LEITZ).

**RESULTADOS**

1- Distribuição das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase no sistema nervoso central das tartarugas *Trachemys dorbigni*, adultas, em condições basais

1.1- Glicogênio fosforilase

O estudo dos cortes encefálicos com a técnica da glicogênio fosforilase mostrou reação positiva em diversas regiões (Figs. 8, 9, 10), sendo a distribuição da glicogênio fosforilase total e da glicogênio fosforilase a exatamente a mesma. A reação positiva apareceu como inclusões granulares de tamanho variável, de cor marrom ou azul violáceo ou uma reação intensa homogênea. Esta atividade foi visualizada nos somas neuronais, havendo, entretanto, prolongamentos reativos em algumas regiões tais como nos núcleos reticulares. A área nuclear sempre foi negativa. Além das células nervosas, esta reação também ocorreu no neuropilo das áreas positivas, nas células endimárias e nos plexos corioides. No epêndima, a atividade glicogênio fosforilase apresentou-se com intensidade moderada, exceto na região da medula espinal, onde se observou intensa atividade. Uma forte positividade também ocorreu nas células do plexo coriíide. As células gliais também mostraram reação positiva, a qual se apresentou sempre com forte intensidade. Os cortes controles foram negativos.

No telencéfalo, a atividade glicogênio fosforilase foi encontrada em várias regiões. No bulbo olfatório, ela localizou-se na camada granular (Fig. 8A) e na camada de fibras olfativas aferentes. Na eminência dorsal ventricular, uma forte positividade foi observada em alguns neurônios (6  $\mu$ m de diâmetro) distribuídos por

toda sua extensão (Figs. 8C-D, 11B). Neurônios positivos (20  $\mu\text{m}$ ) também foram encontrados na região do estriado (Fig. 8C-D). A região cortical (Figs. 8 B-D, 9A-B), por sua vez, apresentou uma organização laminar, com positividade nas três camadas (Fig. 11A). Na camada molecular, a reação foi intensa e uniforme. Na camada de células piramidais, os neurônios (10  $\mu\text{m}$ ) mostraram atividade intensa ou moderada. Já a camada plexiforme apresentou grânulos com coloração azul violáceo, indicando uma reação intensa. Uma reatividade forte ocorreu em alguns neurônios (13  $\mu\text{m}$ ) do córtex piriforme (Figs. 8B-D, 9B). Outras regiões positivas foram o primórdio de hipocampo (Fig. 8C), onde os neurônios mediram 12  $\mu\text{m}$ , o tubérculo olfatório (Fig. 8B), em somas de 14  $\mu\text{m}$ , e o núcleo da banda diagonal de Broca (Fig. 8C), cujos neurônios tinham diâmetro médio de 12  $\mu\text{m}$ . Cabe ressaltar que estas regiões mostraram escassas células moderadamente reativas, exceto a banda diagonal de Broca, onde a reação apresentou-se intensa. A amígdala também mostrou neurônios positivos, os quais tinham diâmetro médio de 11  $\mu\text{m}$ .

No diencéfalo, a reação localizou-se nos núcleos rotundus (13  $\mu\text{m}$ ) e reuniens (12  $\mu\text{m}$ ) do tálamo (Fig. 9A). Esta positividade também foi observada no núcleo geniculado, porções dorsal e ventral, cujos somas mediram em média 16  $\mu\text{m}$  (Fig. 9A). No hipotálamo, a atividade ocorreu em toda a extensão do núcleo periventricular (Figs. 8D, 9A, 11C) e nos núcleos ventrais (Fig. 9A). Estes neurônios mediam aproximadamente 16 e 53  $\mu\text{m}$  respectivamente. A região da eminência média também mostrou intensa reatividade.

No mesencéfalo, merece destaque a forte reação observada no tecto óptico. Esta ocorreu em todas as suas camadas (Figs. 9C, 11E). Ainda na região dorsal, observou-se positividade nas células nervosas que compõe o núcleo mesencefálico do V par craniano, tanto na porção medial quanto na lateral, e estes neurônios mediram em média 66  $\mu\text{m}$  (Figs. 9C, 11F). Ventralmente, os neurônios reativos pertenciam aos núcleos motores do III (Fig. 12B) e IV (Figs. 9C, 12C) pares cranianos, os quais mediram 10 e 17  $\mu\text{m}$ , respectivamente, ao torus semicircularis (Fig. 9C), cujas somas tinham 11  $\mu\text{m}$ , e ao núcleo interpeduncular (Fig. 9C), onde as células tinham 23  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio. Ainda foram positivos os núcleos do ístmó (Figs. 9C, 10A, 12A) e rubro (Figs. 9B, 11D), tendo estes neurônios 21 e 9  $\mu\text{m}$ , respectivamente, e a substância nigra (Figs. 9C, 12D), cujas células mediram 25  $\mu\text{m}$ . O núcleo dorsal da comissura posterior também apresentou neurônios positivos a este procedimento histoquímico, os quais mediram 12  $\mu\text{m}$  (Fig. 9B).

Na medulla oblonga, intensa reação foi observada nos núcleos reticulares superior, médio e inferior, cujas células mediram aproximadamente 12  $\mu\text{m}$  (Figs. 10A-D, 13C). Uma forte atividade também ocorreu em neurônios (22  $\mu\text{m}$ ) localizados nos núcleos superior e inferior da rafe (Figs. 10A-E, 13C). Os núcleos motores do V (Figs. 10B, 13A), VI (Fig. 10C), VII (Figs. 10C, 12F) e XII (Figs. 10D-E, 13D) pares cranianos apresentaram-se intensamente positivos. Esta atividade localizou-se em neurônios de 70, 24, 22 e 19  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Outros grupos de células reativas ocorreram no locus coeruleus (Figs. 10A-B, 12E), nos subnúcleos superior, lateral e descendente do núcleo vestibular (Fig. 10C-D), e no núcleo coclear (Fig. 10C). Os

neurônios destas áreas mediram, em ordem de citação, 33, 16 e 18  $\mu\text{m}$ . A reação glicogênio fosforilase ainda foi visualizada em toda a extensão do núcleo do X par craniano (Figs. 10D-E, 13B), estando presente no núcleo do trato solitário (18  $\mu\text{m}$ ), no ambíguo (10  $\mu\text{m}$ ) e no motor dorsal (22  $\mu\text{m}$ ).

No cerebelo, a atividade glicogênio fosforilase localizou-se nas camadas granular e molecular (Fig. 10B-C). A reação na camada granular foi intensa, porém na camada molecular esta apresentou-se fraca. As células de Purkinje foram negativas, enquanto os núcleos próprios do cerebelo mostraram-se fortemente positivos, estando a reação localizada em somas de 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Fig. 10B).

Na medula espinal, em região cervical alta (única região estudada), uma forte atividade foi encontrada nos neurônios motores (18  $\mu\text{m}$ ) do corno ventral (Figs. 10F, 13E) e nas células comissurais dorsais (Figs. 10F, 13F), as quais mediram 10  $\mu\text{m}$ . Além destes neurônios, esta reação intensa ainda ocorreu nas células gliais da substância branca deste segmento medular. As células endimárias do canal central da medula espinal também desenvolveram positividade a este tratamento histoquímico, sendo esta de moderada intensidade.

### 1.2- Citocromo oxidase

A atividade positiva da citocromo oxidase apresentou-se em forma de inclusões granulares de tamanho variável, de cor marrom, ou como uma reação intensa difusa não particulada nos somas neuronais de diversas regiões do encéfalo da

tartaruga *Trachemys dorbigni* (Figs. 8, 9, 10). Às vezes, esta atividade enzimática era visualizada nos prolongamentos neuronais, como por exemplo, nos neurônios reticulares. A área nuclear sempre foi negativa. Além das células nervosas, a reatividade também foi encontrada nas células endoteliais. O neuropilo mostrou fraca atividade. As células gliais foram positivas a este procedimento histoquímico. Os cortes utilizados como controle mostraram-se negativos.

No telencéfalo, observou-se uma intensa atividade nos glomérulos olfativos (Figs. 8A, 14A). Esta positividade também ocorreu em neurônios (15  $\mu\text{m}$ ) do núcleo central da eminência dorsal ventricular (Figs. 8C-D, 14C); no estriado (Figs. 8C-D, 14D), em neurônios de 17  $\mu\text{m}$ ; no primórdio de hipocampo (Fig. 8C), cujas somas tinham diâmetro médio de 6  $\mu\text{m}$ ; e no tubérculo olfatório (Fig. 8B), onde as células mediram 12  $\mu\text{m}$ . No córtex, a atividade citocromo oxidase foi similar àquela encontrada para a glicogênio fosforilase, localizando-se nas três camadas e exibindo um padrão de organização laminar (Figs. 8B-D, 9A-B, 14B). Porém, a camada molecular mostrou-se dividida em duas zonas, onde a mais superficial desenvolveu uma forte reatividade, enquanto a outra mostrou-se fracamente positiva. Entretanto, nesta última zona encontraram-se escassos somas neuronais reativos (6  $\mu\text{m}$ ). As células piramidais desenvolveram uma atividade fraca ou moderada e mediram em média 10  $\mu\text{m}$ . Na camada plexiforme destacaram-se granulações moderadamente reativas (Fig. 14B). Esta atividade moderada também ocorreu em alguns neurônios (6  $\mu\text{m}$ ) do córtex piriforme (Figs. 8A-D, 9A-B).

No diencéfalo, a atividade da citocromo oxidase foi observada no tálamo, no hipotálamo e no epitálamo. No tálamo, neurônios fortemente reativos localizaram-se no núcleo rotundus (Figs. 9A, 14E) e nas porções ventral e dorsal do núcleo geniculado (Fig. 9A). As células do núcleo rotundus mediram aproximadamente 14  $\mu\text{m}$ , enquanto aquelas do núcleo geniculado tinham em média 13  $\mu\text{m}$ . No hipotálamo (Figs. 8D, 9A), destacaram-se agrupamentos de células nervosas, intensamente positivas, no hipotálamo lateral (23  $\mu\text{m}$ ) e no hipotálamo periventricular (13  $\mu\text{m}$ ). No epitálamo, a atividade enzimática ocorreu nos subnúcleos lateral e medial da habênula, tendo suas células tamanho médio de 11  $\mu\text{m}$  (Figs. 9A, 14F). Outra área diencefálica positiva foi o núcleo entopeduncular posterior (14  $\mu\text{m}$ ), localizado na junção do diencéfalo com o mesencéfalo. A eminência média mostrou-se negativa a este procedimento.

No mesencéfalo, a atividade citocromo oxidase ocorreu nas regiões dorsal e ventral. Na região dorsal, as camadas do tecto óptico mostraram-se moderadamente reativas, porém somas neuronais positivos (11  $\mu\text{m}$ ) ocorreram apenas na camada cinzenta central (Figs. 9C, 15B), os quais também foram de intensidade moderada. Entretanto, uma forte atividade foi observada nos neurônios (24  $\mu\text{m}$ ) das porções medial e lateral do núcleo mesencefálico do V par craniano (Figs. 9C, 16A). A região ventral apresentou neurônios positivos em vários núcleos. Medialmente, uma intensa reação ocorreu nos núcleos motores do III (Fig. 15E) e IV (Figs. 9C, 15F) pares cranianos, e no núcleo do fascículo longitudinal medial. Estes neurônios mediram 15, 20 e 21  $\mu\text{m}$ , respectivamente. A região do torus semicircularis (Figs. 9C, 16A)

mostrou atividade moderada, a qual estava localizada em somas de 11  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio. Lateralmente, os neurônios fortemente reativos pertenciam à substância nigra (Figs. 9C, 16B), aos núcleos rubro (Figs. 9B, 15C) e ístmico (Figs. 9C, 10A, 15D), ao núcleo da raiz óptica basal e ao núcleo dorsal da comissura posterior (Figs. 9B, 15A). Estes mediram aproximadamente 16, 17, 18 e 14  $\mu\text{m}$  respectivamente, sendo que no núcleo dorsal da comissura posterior foram encontrados neurônios de 12 e 16  $\mu\text{m}$ .

Na medulla oblonga, algumas áreas mostraram atividade citocromo oxidase. Na região medial, os núcleos superior e inferior da rafe foram moderadamente reativos (Figs. 10A-E, 16E). Nestas regiões, a reação localizou-se em neurônios de 15 e 28  $\mu\text{m}$ . Lateralmente, uma forte reatividade destacou-se no locus coeruleus (Fig. 10A-B), nos núcleos reticulares superior, medial e inferior (Figs. 10A-D, 16C), e nos núcleos motores do V (Fig. 10B) e XII (Figs. 10D-E, 16F) pares cranianos. Os somas neuronais destas áreas tinham diâmetro médio de 12, 28, 17 e 22  $\mu\text{m}$ , respectivamente. O núcleo do X par (Fig. 10E) apresentou neurônios positivos em toda sua extensão, ou seja, no núcleo do trato solitário (12  $\mu\text{m}$ ), no núcleo ambíguo (10  $\mu\text{m}$ ) e no núcleo motor dorsal (20  $\mu\text{m}$ ). Já os subnúcleos superior, descendente e lateral do núcleo vestibular (Figs. 10C-D, 16D) e os núcleos motores do VI (Fig. 10C) e VII (Fig. 10C) pares cranianos desenvolveram uma reatividade moderada a este procedimento histoenzimológico, estando esta localizada em neurônios de 14, 22 e 12  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Já o núcleo coclear apresentou intensa atividade em neurônios de 14  $\mu\text{m}$  (Fig. 10C).

No cerebelo, as camadas granular, molecular e de Purkinje foram positivas (Figs. 10B-C, 17A). Esta reação também ocorreu nos núcleos profundos do cerebelo (Figs. 10B, 17B) e nas células de Golgi da camada granular. Estas mediram aproximadamente 15 e 6  $\mu\text{m}$  respectivamente. É interessante destacar que a camada de células de Purkinje (23  $\mu\text{m}$ ) possuía duas camadas de células.

Na medula espinal, a região cervical alta apresentou uma forte reatividade nos neurônios motores (16  $\mu\text{m}$ ) do corno ventral (Figs. 10F, 17C-D). No corno dorsal, uma atividade fraca foi visualizada em somas neuronais da coluna lateral (20  $\mu\text{m}$ ) e da comissura dorsal (10  $\mu\text{m}$ ). As células nervosas (18  $\mu\text{m}$ ) pertencentes ao núcleo marginal (Figs. 10F, 17C e E) e alguns neurônios (15  $\mu\text{m}$ ) dispersos pelo funículo lateral (Figs. 10F, 17F) apresentaram intensa reação a este procedimento histoquímico.

### 1.3- NADPH-diaforase

O estudo dos cortes encefálicos com a técnica da NADPH-diaforase mostrou reação positiva no soma e nos prolongamentos neuronais de diversas regiões (Figs. 18, 19). Grande parte destas células apresentaram um perfil semelhante àquele encontrado em cortes impregnados pela técnica de Golgi. A área nuclear sempre foi negativa. Além dos neurônios, a positividade também ocorreu no neuropilo e nas células endoteliais e gliais. Os cortes controles mostraram-se sempre negativos.

No telencéfalo, os glomérulos olfativos desenvolveram intensa reação positiva (Figs. 18A, 20A), assim como algumas células (16  $\mu\text{m}$ ) da camada granular interna (Fig. 20A-B). Esta atividade também ocorreu na eminência dorsal ventricular (Figs. 18B-F, 21), onde se observou positividade no soma e nos prolongamentos neuronais (Fig. 20E). Estas células apresentaram um tamanho médio de 22  $\mu\text{m}$ . O percurso de seus prolongamentos podiam ser acompanhados por vários milímetros de distância. O córtex dorsal, médio e médio-dorsal mostraram esparsas células positivas (Figs. 18A-G, 22A), enquanto o córtex piriforme apresentou numerosos neurônios fusiformes com forte atividade, os quais mediam em torno de 14  $\mu\text{m}$  (Figs. 18B-G, 21). Outras áreas positivas foram o estriado (Figs. 18B-E, 20F, 21), com neurônios de 17  $\mu\text{m}$ ; o núcleo accumbens (Figs. 18B, 20C), onde as células mediram 13  $\mu\text{m}$ ; o globus pallidus, com somas de 13  $\mu\text{m}$ ; o tubérculo olfatório (Figs. 18B, 20D), com células de 15  $\mu\text{m}$ ; a amígdala, com neurônios de 12  $\mu\text{m}$ ; e o núcleo da comissura anterior (Fig. 18E), onde as células tinham 11  $\mu\text{m}$  de tamanho. A região septal apresentou alguns neurônios (12  $\mu\text{m}$ ) reativos (Fig. 18B-C). Os neurônios positivos destas áreas tinham forma fusiforme e, às vezes, era possível acompanhar seus prolongamentos por alguns milímetros de distância, exceto aqueles da região septal, onde a reação localizou-se apenas no soma.

No diencéfalo, os núcleos talâmicos rotundus e reuniens foram negativos a esta reação. No hipotálamo, os neurônios positivos localizaram-se na área pré-óptica (10  $\mu\text{m}$ ) e ao longo do núcleo periventricular (11  $\mu\text{m}$ ). Neste núcleo, estas células possuíam forma fusiforme e distribuíam-se perpendicularmente à camada endimária

(Figs. 18C-F, 23A). O núcleo paraventricular (Fig. 18D) e a área hipotalâmica lateral (Fig. 23B) também foram positivos. Os neurônios destas áreas mediram em torno de 8 e 13  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Na região supra-mamilar foram encontrados neurônios reativos, os quais mediam também 13  $\mu\text{m}$  (Figs. 18G, 23C). A eminência média revelou-se negativa com este tratamento. Outros proeminentes grupos de células positivas no diencéfalo localizaram-se nos núcleos suprapeduncular (Fig. 18F) e entopeduncular (Fig. 18G), tendo estas células 11 e 13  $\mu\text{m}$  de tamanho médio.

No mesencéfalo, os neurônios positivos foram detectados nas regiões dorsal e ventral. Na região dorsal, destacou-se a intensa reatividade nos neurônios (10  $\mu\text{m}$ ) do estrato cinzento periventricular (Figs. 18H-I, 23D). Estas células tinham forma fusiforme e apresentavam prolongamentos em uma de suas extremidades que se orientavam em direção ao estrato superficial. Alguns neurônios (14 e 20  $\mu\text{m}$ ) do estrato cinzento central mostraram reatividade moderada. Estas tinham forma fusiforme e seus processos orientavam-se transversalmente àqueles do estrato cinzento periventricular. O núcleo mesencefálico do V par craniano mostrou-se negativo. Na região ventral, os neurônios positivos localizaram-se no torus semicircularis (Fig. 18I), na área tegmental ventral (Fig. 18H-I) e nos núcleos profundos do mesencéfalo (Fig. 18I). Estes neurônios reativos mediram, em seqüência de citação, 14, 17 e 13  $\mu\text{m}$ , tinham forma fusiforme e a maioria apresentavam processos positivos que se orientavam aleatoriamente por todas as direções, não havendo um padrão predominante. A substância nigra (Figs. 18I, 23F) e o núcleo rubro (Figs. 18H, 23E) revelaram neurônios com intensa reatividade, os quais

mediram aproximadamente 24 e 22  $\mu\text{m}$  respectivamente. Estas células de forma piramidal geralmente apresentavam longos prolongamentos positivos que se orientavam também aleatoriamente por inúmeras direções.

Na medulla oblonga, a reação NADPH-diaforase foi observada nos núcleos reticulares superior, médio e inferior, tendo as células positivas o tamanho aproximado de 23  $\mu\text{m}$  (Figs. 19J-N, 24D). No núcleo vestibular (Fig. 19J-N), células nervosas positivas ocorreram nos subnúcleos superior, lateral e descendente, estando a reatividade localizada em neurônios de 18  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Nestas regiões, os neurônios apresentavam-se fusiformes ou estrelados e, geralmente, possuíam longos prolongamentos positivos. Outras células positivas foram observadas nos subnúcleos motor, principal e descendente do V (Fig. 19J), assim como nos núcleos do VI (Fig. 19L), VII (19L) e XII (Figs. 19N-O, 24C) pares cranianos. Estas regiões tinham neurônios com diâmetros médios de 22, 16, 15 e 18  $\mu\text{m}$ , respectivamente. O núcleo do vago (Fig. 19O) apresentou, em toda sua extensão, células positivas, as quais mediram aproximadamente 13  $\mu\text{m}$  no núcleo do trato solitário (Figs. 19M-O, 24E), 10  $\mu\text{m}$  no núcleo ambíguo e 14  $\mu\text{m}$  no núcleo motor dorsal. Esta atividade NADPH-diaforase ainda foi observada nos núcleos superior e inferior da rafe (12  $\mu\text{m}$ ), sendo esta de moderada intensidade, no locus coeruleus (20  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 24A)) e intensa no núcleo coclear (12  $\mu\text{m}$ ).

No cerebelo, a positividade NADPH-diaforase ocorreu nas camadas granular e molecular (Figs. 19J-L, 25B). Nesta última camada, esta reação também estava

presente no soma das células em cesto (6  $\mu\text{m}$ ). As células de Purkinje mostraram-se negativas. No entanto, nesta camada ocorreram fibras paralelas positivas, as quais emitiam colaterais em forma de cesto que rodeavam as células de Purkinje e se dirigiam à camada granular (Fig. 25B). Já os núcleos profundos do cerebelo apresentaram células moderadamente reativas (16  $\mu\text{m}$ ) (Figs. 19J, 24B).

Na medula espinal, na região cervical alta (única região estudada), a reação positiva localizou-se no corno dorsal. Para a descrição destas áreas reativas, será considerada a organização proposta por Fernández et al. (1993), a qual está representada esquematicamente na Figura 26. Nesta região da medula espinal, a atividade da NADPH-diaforase esteve presente em fibras das áreas Ia, Ib, II e III, havendo maior quantidade destas nas duas últimas áreas (Fig. 27). Os inúmeros neurônios reativos localizaram-se na coluna lateral e na comissura dorsal (Figs. 19P, 27). Os somas neuronais da coluna lateral pareciam corresponder aos neurônios gigantes ipsilateral e contralateral, uma vez que seus diâmetros tinham aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  e seus prolongamentos podiam permanecer ipsilateral (Fig. 24F) ou dirigir-se ao lado contralateral (Fig. 27). Na comissura dorsal, os somas neuronais possuíam aproximadamente 16-18  $\mu\text{m}$ , o que os classifica como neurônios de tamanho médio. Algumas destas células apresentavam uma forma fusiforme, onde se podia observar a emergência de prolongamentos em cada uma de suas extremidade. Além destes tipos neuronais, observaram-se neurônios radiais de tamanho médio (16  $\mu\text{m}$ ) na região mais látero-dorsal da coluna lateral (Fig. 27). As células endimárias deste segmento da medula espinal analisada apresentaram-se

fortemente positivas. Esta reatividade ainda foi visualizada nas células gliais da substância branca desta região da medula espinal.

## 2- Distribuição das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase no sistema nervoso central de tartarugas *Pseudemys scripta elegans*, juvenis, em condições basais

### 2.1- Glicogênio fosforilase

A atividade glicogênio fosforilase localizou-se no soma de diversos grupos neuronais do sistema nervoso central. Esta reação enzimática apresentou uma coloração marrom ou azul violácea, sendo que esta última ocorreu em alguns núcleos filogeneticamente mais antigos. Às vezes, esta reatividade pôde ser detectada nos prolongamentos de neurônios, como por exemplo, no núcleo reticular. A área nuclear sempre foi negativa. Além das células nervosas, a atividade glicogênio fosforilase ainda foi encontrada em células gliais, na camada endimária e nos plexos coriódos. O neuropilo apresentou-se intensamente reativo nas áreas filogeneticamente mais antigas, sendo de intensidade fraca nas regiões mais recentes. A expressão da enzima ativa (glicogênio fosforilase a) foi exatamente a mesma da glicogênio fosforilase total. Os cortes controles não desenvolveram nenhuma reatividade.

No telencéfalo, a atividade glicogênio fosforilase mostrou-se de fraca a moderada. No bulbo olfatório, uma reatividade intermédia localizou-se na camada de fibras aferentes. Entretanto, os glomérulos foram negativos. Já a camada granular exibiu uma fraca positividade. Na região cortical (Fig. 28A), a atividade desta enzima

esteve presente nas células piramidais (8  $\mu\text{m}$ ), sendo as camadas molecular e plexiforme negativas. Todavia, escassos neurônios foram detectados na camada molecular (8  $\mu\text{m}$ ). A intensidade da atividade cortical mostrou-se variada nas diferentes regiões. Uma reação moderada estava presente nos córtices dorsal, médio-dorsal e piriforme, mas foi fraca no córtex medial. Outras áreas positivas foram a eminência dorsal ventricular (Fig. 28B), o estriado (Fig. 28C), o tubérculo olfatório e a banda diagonal. Nestas regiões, a expressão da glicogênio fosforilase teve intensidade moderada e localizou em somas de 6, 12, 4 e 9  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Ainda foram reativos o núcleo septal (10  $\mu\text{m}$ ) e o primordium de hipocampo (9  $\mu\text{m}$ ), sendo esta atividade fraca e localizada em escassos neurônios. A região da amígdala também apresentou neurônios (4  $\mu\text{m}$ ) positivos, sendo esta reação de moderada intensidade.

No diencéfalo, a reação glicogênio fosforilase localizou-se no epitálamo, no tálamo e no hipotálamo. No epitálamo, a atividade moderada desta enzima foi encontrada na habênula lateral (5  $\mu\text{m}$ ), sendo a habênula medial negativa. No tálamo, a glicogênio fosforilase esteve presente nos núcleos rotundus (Fig. 28E) e reuniens, e nas porções dorsal e ventral do núcleo geniculado (Fig. 28D). Nestas regiões, a atividade ocorreu em somas de 12, 10 e 6  $\mu\text{m}$ , respectivamente e teve intensidade moderada. No hipotálamo, a atividade desta enzima foi detectada em neurônios (20  $\mu\text{m}$ ) da área periventricular (Fig. 28F) e em somas (10  $\mu\text{m}$ ) da região ventral. A região da eminência média também foi reativa a este procedimento histoquímico, sendo esta atividade de positividade intermediária.

No mesencéfalo, a atividade glicogênio fosforilase localizou-se em regiões dorsais e ventrais. Na região dorsal, as camadas do tecto óptico apresentaram-se fracamente reativas, com exceção da camada cinzenta central, onde a reação teve intensidade moderada e estava localizada em somas neuronais de 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Fig. 28A). Outra área positiva foi o núcleo mesencefálico do V par craniano (Fig. 28B). Neste núcleo, os neurônios (20  $\mu\text{m}$ ) reativos estavam localizados em suas porções medial e lateral. Na região ventral, a expressão da glicogênio fosforilase foi detectada nos núcleos do III (12  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 28C), e IV (12  $\mu\text{m}$ ) pares cranianos, no torus semicircularis (10  $\mu\text{m}$ ) e no núcleo interpeduncular (11  $\mu\text{m}$ ). Esta atividade da região ventral ainda ocorreu em núcleos localizados em suas porções laterais, tais como o núcleo do istmo (Fig. 28D), cujas células tinham diâmetro médio de 14  $\mu\text{m}$ , a substância nigra (Fig. 28E), onde os neurônios mediram 22  $\mu\text{m}$ , e o núcleo rubro (12  $\mu\text{m}$ ). Deve-se destacar que a reatividade destas áreas mesencefálicas mostrou-se com intensa coloração azul violácea. Outro núcleo com atividade glicogênio fosforilase foi o núcleo dorsal da comissura posterior, sendo sua atividade de moderada intensidade e localizada em somas de 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Na medulla oblonga, a reação glicogênio fosforilase apresentou-se intensa nos núcleos reticulares superior, médio e inferior (Fig. 30D), cujas somas mediram em torno de 20  $\mu\text{m}$ , e nos núcleos superior e inferior da rafe (Fig. 30E), estando esta localizada em neurônios de 12  $\mu\text{m}$ . Os núcleos do V (subnúcleos motor, principal e descendente) também foram positivos, estando a reação localizada em neurônios com diâmetro médio de 10  $\mu\text{m}$ . Os núcleos dos VI (10  $\mu\text{m}$ ), VII (11  $\mu\text{m}$ ), X (8  $\mu\text{m}$ ) (Fig.

30C) e XII (8  $\mu\text{m}$ ) pares cranianos desenvolveram forte reatividade. Já o núcleo coclear (Fig. 30B), cujas somas mediram 12  $\mu\text{m}$ , os núcleos do trato solitário (7  $\mu\text{m}$ ) e o ambíguo (8  $\mu\text{m}$ ) apresentaram atividade moderada. Porém, o núcleo vestibular (Fig. 30A) mostrou-se intensamente reativo em todos os seus subnúcleos (superior, lateral e descendente), estando a atividade localizada em somas de 8  $\mu\text{m}$ . O locus coeruleus (12  $\mu\text{m}$ ) foi outro núcleo fortemente reativo (Fig. 29F).

No cerebelo, a reação positiva foi detectada nas camadas granular e molecular. Nestas, a atividade enzimática teve moderada intensidade, sendo aquela da camada molecular a mais fraca. As células de Purkinje apresentaram-se negativas com este procedimento histoquímico. Já os núcleos profundos do cerebelo desenvolveram uma reatividade moderada nestas condições, a qual se localizou em somas de 11  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio.

Na medula espinal cervical alta, a atividade glicogênio fosforilase apareceu com moderada intensidade no soma (10  $\mu\text{m}$ ) de neurônios motores (Fig. 30F), e com fraca intensidade em algumas células comissurais dorsais (10  $\mu\text{m}$ ). As células gliais da substância branca e as células endimárias do canal central deste segmento da medula espinal apresentaram-se moderadamente positivas.

## 2.2- Citocromo oxidase

A atividade citocromo oxidase esteve presente em diversas regiões do neuroeixo da tartaruga *Pseudemys scripta elegans*. Esta reação positiva aparecia

como uma coloração marrom no citoplasma neuronal, sendo que, em algumas regiões, ela também foi visualizada nos prolongamentos. O neuropilo desenvolveu intensa reatividade. A área nuclear sempre foi negativa. Todavia, a expressão desta enzima não se restringiu apenas aos neurônios, havendo também forte atividade nas células endoteliais. As células gliais também foram positivas a este procedimento histoquímico. Os cortes controles sempre mostraram-se negativos.

No telencéfalo, uma moderada atividade citocromo oxidase apresentou-se nos glomérulos do bulbo olfatório, e nas células piramidais corticais (8  $\mu\text{m}$ ). As camadas molecular e plexiforme do córtex foram intensamente positivas (Fig. 31A). Na camada molecular observou-se, ainda, a presença de escassos neurônios fortemente reativos (8  $\mu\text{m}$ ). A reatividade da eminência dorsal ventricular apareceu também com intensidade fraca e localizada em neurônios (3  $\mu\text{m}$ ) dispersos por toda sua extensão, não predominando apenas em determinadas áreas (Fig. 31B). A atividade da citocromo oxidase ainda foi observada na região do estriado (Fig. 31C), em somas de 18  $\mu\text{m}$ , e no tubérculo olfatório (13  $\mu\text{m}$ ), sendo estas de forte intensidade. O núcleo septal e o primórdium de hipocampo apresentaram poucas células fracamente positivas, as quais mediram 9 e 11  $\mu\text{m}$  respectivamente.

No diencéfalo, a atividade citocromo oxidase localizou-se no epitálamo, no tálamo e no hipotálamo. No epitálamo, uma intensa reatividade pôde ser detectada nos núcleos habenuares lateral e medial (Fig. 31D), cujos neurônios mediram 4  $\mu\text{m}$ . No tálamo, sua atividade esteve presente no núcleo rotundus (Fig. 31E), em

neurônios de 3  $\mu\text{m}$ , e nas porções dorsal e ventral (Fig. 31F) do núcleo geniculado (12  $\mu\text{m}$ ). No hipotálamo, a positividade da citocromo oxidase foi detectada nas áreas periventricular (11  $\mu\text{m}$ ) e lateral (12  $\mu\text{m}$ ). Ela ainda foi encontrada na região da eminência média, sendo esta de moderada intensidade. Já as atividades das áreas talâmica e hipotalâmicas citadas mostraram-se intensas. Outras áreas positivas foram os núcleos suprapeduncular (12  $\mu\text{m}$ ) e entopeduncular (10  $\mu\text{m}$ ).

No mesencéfalo, os neurônios com reação citocromo oxidase ocorreram nas regiões dorsal e ventral. Dorsalmente, esta atividade localizou-se em algumas camadas do tecto óptico, não sendo encontrada nas camadas cinzenta e fibrosa periventriculares. Uma forte atividade foi detectada na camada óptica, sendo as outras camadas moderadamente reativas. Os somas celulares positivos das camadas fibrosa cinzenta e cinzenta central (Fig. 32B) mediram em torno de 8 e 3  $\mu\text{m}$  respectivamente, sendo esta atividade de intensidade intermédia. Outros neurônios com reatividade moderada ocorreram nas porções medial e lateral do núcleo mesencefálico do V par craniano (17  $\mu\text{m}$ ). Ventralmente, uma forte atividade citocromo oxidase esteve presente no núcleo do ístmo (Fig. 32D), cujos neurônios mediram 6  $\mu\text{m}$ , nos núcleos profundos do mesencéfalo (11  $\mu\text{m}$ ), nos núcleos do III (Fig. 32C), onde os somas tinham diâmetro médio de 10  $\mu\text{m}$ , e IV (10  $\mu\text{m}$ ) pares cranianos, no torus semicirculares (10  $\mu\text{m}$ ) e no núcleo do fascículo longitudinal medial (11  $\mu\text{m}$ ). Ainda foram intensamente reativos a substância nigra (14  $\mu\text{m}$ ) e os núcleos rubro (16  $\mu\text{m}$ ) e dorsal da comissura posterior (Fig. 32A), onde os neurônios mediram 5  $\mu\text{m}$ .

Na medulla oblonga, a atividade citocromo oxidase mostrou-se intensa e localizada em diversas regiões. Ela esteve presente no núcleo reticular (superior, médio e inferior), em somas neuronais de 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio (Fig. 33C). Também foi observada nos núcleos superior e inferior da rafe (11  $\mu\text{m}$ ), nos núcleos do VI (Fig. 33C), em neurônios de 5  $\mu\text{m}$ , VII (12  $\mu\text{m}$ ) e XII (10  $\mu\text{m}$ ) pares cranianos e no locus coeruleus (10  $\mu\text{m}$ ). A atividade do X par craniano localizou-se em toda sua extensão, ou seja, no núcleo do trato solitário (10  $\mu\text{m}$ ), no núcleo ambíguo (12  $\mu\text{m}$ ) e no núcleo motor dorsal (13  $\mu\text{m}$ ). O núcleo coclear (Fig. 33A) e o vestibular (Fig. 32E) também foram reativos, sendo que neste último a atividade foi detectada em todos os seus subnúcleos (superior, lateral e descendente). Os neurônios reativos destes núcleos mediram em torno de 5 e 14  $\mu\text{m}$ , respectivamente. O núcleo motor do V par (10  $\mu\text{m}$ ) foi outra região positiva a este método histoquímico, sendo esta atividade encontrada em todos seus subnúcleos (motor, principal e descendente).

No cerebelo, a atividade citocromo oxidase foi observada em todas as suas camadas, tendo esta uma forte intensidade (Fig. 32F). A camada das células de Purkinje aparecia composta por duas camadas, onde os somas tinham diâmetro médio de 12  $\mu\text{m}$ . Esta atividade também foi encontrada nos núcleos profundos do cerebelo, estando localizada em neurônios de 11  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Na medula espinal, região cervical alta, a atividade citocromo oxidase pôde ser detectada no soma (5  $\mu\text{m}$ ) de neurônios motores (Fig. 33D), no núcleo marginal (Fig. 33E), cujos somas mediram 2  $\mu\text{m}$ , e em células (3  $\mu\text{m}$ ) dispersas pelo funículo lateral.

### 2.3- NADPH-diaforase

A atividade NADPH-diaforase do sistema nervoso central da tartaruga *Pseudemys scripta elegans* localizou-se em somas neuronais de diversos núcleos deste tecido. Em algumas regiões, ela também ocorreu nos prolongamentos das células positivas. A área nuclear sempre foi negativa. Todavia, a atividade desta enzima não se restringiu apenas aos neurônios, mas também esteve presente no neuropilo, e em células gliais e endoteliais, onde mostrou forte intensidade. Os cortes controles foram negativos a este procedimento.

Uma característica da atividade NADPH-diaforase desta tartaruga juvenil foi a grande quantidade de neurônios e fibras intensamente positivos ao longo do neuroeixo. Algumas vezes, este número mostrava-se tão intenso que dificultava a delimitação dos núcleos reativos. Isto ocorreu principalmente na medulla oblonga.

No telencéfalo, a atividade NADPH-diaforase foi observada nos glomérulos do bulbo olfatório. Nas regiões dos córtices dorsal, médio e médio-dorsal, observou-se um número acentuado de neurônios piramidais reativos, cujas somas possuíam diâmetro médio de aproximadamente 12  $\mu\text{m}$ . Na camada molecular houve inúmeras fibras positivas, as quais apresentavam uma disposição que lembrava as contas de um rosário. Todavia, não foram encontrados somas neuronais com atividade NADPH-diaforase (Fig. 22B). A camada plexiforme mostrou-se negativa a este método histoquímico. O córtex piriforme, por sua vez, foi reativo, e suas células mediram em torno de 11  $\mu\text{m}$  (Fig. 34A). A eminência dorsal ventricular foi outra região positiva, cujos neurônios mediram 13  $\mu\text{m}$  (Figs. 34C, 35). Esta área teve uma distribuição

neuronal particular. Sua porção anterior apresentou poucas células com reação positiva a NADPH-diaforase, porém estas aumentaram em suas porções basais. Outros neurônios positivos localizaram-se nos núcleos accumbens (Figs. 34B, 35) e globus palidus (Fig. 36B), na região do estriado (Figs. 34D, 35, 36B), no tubérculo olfatório (Fig. 36A) e na amígdala (Fig. 34E). Os neurônios destas regiões tinham diâmetros médios de 8, 14, 13, 10 e 11  $\mu\text{m}$ , respectivamente. A estria terminal também mostrou atividade NADPH-diaforase (Fig. 36A), assim como o primórdio de hipocampo (9  $\mu\text{m}$ ) e a área septal (10  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 35).

No diencéfalo, a reação NADPH-diaforase localizou-se nas porções dorsal e ventral do núcleo geniculado (8  $\mu\text{m}$ ), nos núcleos suprapeduncular (11  $\mu\text{m}$ ) e entopeduncular (13  $\mu\text{m}$ ), e na região supramamilar (Fig. 37), cujos neurônios tinham 12  $\mu\text{m}$  de tamanho. No hipotálamo, a atividade desta enzima esteve presente nas áreas lateral (13  $\mu\text{m}$ ), medial (10  $\mu\text{m}$ ) e periventricular (Fig. 34F), onde os neurônios mediram 12  $\mu\text{m}$ . Na região hipotalâmica ventral não foi encontrada nenhuma célula positiva, porém houve uma grande quantidade de fibras reativas. A região da eminência média desenvolveu forte atividade a esta enzima (Fig. 34F), assim como o órgão subcomissural (Fig. 37).

No mesencéfalo, os neurônios positivos estavam localizados em diversos núcleos. No tecto óptico (Figs. 37, 38), esta reação ocorreu em células das camadas cinzenta central (11  $\mu\text{m}$ ) e periventricular (12  $\mu\text{m}$ ). Nesta última, os neurônios emitiam prolongamentos reativos que podiam chegar às camadas mais superficiais,

enquanto àqueles da camada cinzenta central mostravam-se perpendiculares a esta direção. As outras camadas do tecto óptico foram negativas. A atividade NADPH-diaforase também esteve presente no torus semicircularis (12  $\mu\text{m}$ ) e em seu núcleo laminar (11  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 38). O núcleo rubro (Fig. 37) e a substância nigra (Fig. 38) foram outras áreas reativas, cujos neurônios apresentavam forma piramidal e mediam em torno de 12 e 17  $\mu\text{m}$ , respectivamente. A atividade da NADPH-diaforase ainda foi detectada na área tegmental ventral (11  $\mu\text{m}$ ), nos núcleos profundos do mesencéfalo (11  $\mu\text{m}$ ) e no núcleo do fascículo longitudinal medial (Fig. 37), cujos somas tinham 12  $\mu\text{m}$ .

Na medulla oblonga, a atividade da NADPH-diaforase localizou-se em neurônios dos núcleos reticulares superior, medial e inferior, em somas de aproximadamente 17  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Figs. 39, 40, 41, 42A). Os núcleos superior e inferior da rafe também reagiram positivamente a esta técnica histoquímica, a qual foi encontrada em neurônios de 11  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio (Figs. 39, 40, 42A). Outras regiões reativas foram o locus coeruleus e os núcleos do V (Figs. 40, 41, 42A-B), VI (Fig. 41), VII (Fig. 41), X (Fig. 42A) e XII (Fig. 42A-B) pares cranianos. Estes neurônios marcados tinham somas de 10, 15, 8, 10, 13 e 13  $\mu\text{m}$ , respectivamente. O núcleo vestibular também mostrou-se positivo em toda sua extensão, estando a reação localizada em neurônios de 14  $\mu\text{m}$  (Figs. 39, 40, 41, 42A). A atividade NADPH-diaforase ainda ocorreu em células (12  $\mu\text{m}$ ) do núcleo coclear (Fig. 39, 40, 41). Nesta região, observou-se a presença de fibras reativas comunicando este núcleo com o núcleo vestibular (Fig. 39). Outras fibras, juntamente com neurônios (10  $\mu\text{m}$ ),

apresentando reação NADPH-diaforase foram observados na região do núcleo do trato solitário (Fig. 42A-B). Esta atividade ainda foi detectada no núcleo ambíguo (Fig. 42B), onde os neurônios mediram 10  $\mu\text{m}$ , e na região da oliva inferior (Fig. 42B), cujas somas tinham 12  $\mu\text{m}$  de tamanho. Merece ser destacado aqui a grande quantidade de células (12  $\mu\text{m}$ ) reativas a NADPH-diaforase que ocorreram ao longo do fascículo longitudinal medial (Fig. 40).

No cerebelo, a atividade estava presente nas camadas granular e molecular. As células em cesto (6  $\mu\text{m}$ ) foram reativas e as células de Purkinje foram negativas. Entretanto, encontraram-se inúmeras fibras positivas nesta região, as quais rodeavam os somas das células de Purkinje e se dirigiam à camada granular. Estas fibras descreviam um trajeto que se mostrava semelhante a um cesto (Fig. 25A). Os núcleos profundos do cerebelo também desenvolveram atividade NADPH-diaforase, estando esta localizada em neurônios de 11  $\mu\text{m}$  (Fig. 39).

Na medula espinal, a região cervical alta apresentou reatividade nas regiões dorsais e ventrais (Fig. 43A). No corno dorsal, uma intensa atividade NADPH-diaforase estava presente na área Ia. Uma reação também forte, porém com menor intensidade, foi observada nas áreas Ib, II e III (Fig. 43A-C). Esta atividade também ocorreu em somas e prolongamentos neuronais. Por sua localização, estes neurônios reativos pareciam corresponder às células da comissura dorsal e da coluna lateral do corno dorsal (Fig. 43A). Nesta última, os neurônios gigantes ipsilateral e contralateral tinham somas com diâmetros médios de 9  $\mu\text{m}$ . As células da comissura dorsal (Fig.

43A-B) apresentaram forma fusiforme e mediram em torno de 7  $\mu\text{m}$ . Destas, podia-se visualizar a emergência de prolongamentos em suas extremidades (Fig. 43D). Outros neurônios positivos ao tratamento da NADPH-diaforase estavam localizados na região látero-dorsal da coluna lateral, distribuindo-se radialmente em relação à superfície do corno dorsal (Fig. 43C). Estes mediram aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ . No corno ventral, esta enzima esteve presente em escassos neurônios motores (Fig. 43E), os quais mediram em torno de 8  $\mu\text{m}$ . Além destes tipos celulares positivos, a atividade NADPH diaforase medular ainda ocorreu em células (6  $\mu\text{m}$ ) dispersas pela substância branca ventral, lateral e dorsal (Fig. 43A, E e F).

### 3- Efeitos das distintas condições experimentais sobre as atividades da glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase, e a imunorreatividade da SP no sistema nervoso central da tartaruga *Trachemys dorbigni*

#### 3.1- Desnervação periférica

A secção do nervo ciático provocou algumas alterações nas reações histoquímicas e imunohistoquímicas avaliadas. Antes da abordagem destas respostas, será apresentada a descrição destas atividades no segmento da medula espinal lombar de tartarugas em condições basais, visto que estes resultados não foram apresentados nos estudos de mapeamento anteriormente descritos.

### 3.1.1- Atividade da citocromo oxidase

A atividade da citocromo oxidase da medula espinal lombar de tartarugas *Trachemys dorbigni*, em condições basais, teve o mesmo padrão de distribuição da medula espinal cervical, localizando-se em neurônios motores (24  $\mu\text{m}$ ), da coluna lateral (15  $\mu\text{m}$ ) e da comissura dorsal (8  $\mu\text{m}$ ). Esta atividade ainda foi observada no núcleo marginal (15  $\mu\text{m}$ ) e em células dispersas pelo funículo lateral (17  $\mu\text{m}$ ). As células do gânglio raquidiano, por sua vez, mostraram atividade moderada desta enzima, a qual se localizou em somas neuronais de 37  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio.

A secção do nervo ciático não ocasionou alterações da atividade citocromo oxidase do encéfalo, da medula espinal aos níveis cervical e lombar, e das células do gânglio raquidiano nos intervalos de observações considerados neste estudo, ou seja, 7, 15, 30, 60 e 90 dias.

### 3.1.2- Atividade da NADPH-diaforase

A atividade da NADPH-diaforase da medula espinal lombar da tartaruga em condições basais teve o mesmo padrão de distribuição apresentado pelo segmento cervical. As células do gânglio raquidiano, nestas condições, já apresentaram uma atividade intensa, a qual se localizou em neurônios de 16 e 24  $\mu\text{m}$  (Fig. 44A-B).

A desnervação periférica resultou em diversas modificações na atividade NADPH-diaforase, tanto nos gânglios raquidianos estudados como ao longo do neuroeixo. No gânglio raquidiano houve um acréscimo em sua expressão nos somas

reativos (12 e 24  $\mu\text{m}$ ), sendo este aumento observado aos 7 e 15 dias após a secção nervosa (Fig. 44C-D). Aos 30 dias, entretanto, observou-se redução da atividade NADPH-diaforase nas células de menor tamanho (Fig. 44E), sendo este novo padrão enzimático muito similar àquele das células controles. Este mesmo perfil ocorreu aos 60 e 90 dias (Fig. 44F).

No corno dorsal da medula espinal lombar houve um aumento da atividade NADPH-diaforase já aos 7 dias após o procedimento cirúrgico, tanto no lado ipsilateral quanto no contralateral. Este manifestou-se por um aumento no número de fibras positivas na área Ia, Ib, II e III. Este acréscimo também ocorreu nos neurônios reativos da comissura dorsal e da coluna lateral do corno dorsal, bem como nos neurônios radiais positivos. Além destas modificações, observou-se uma maior reatividade do neuropilo. Paralelo a estas mudanças, ocorreu um acréscimo da atividade desta enzima nas células gliais e endoteliais desta região. Um fato interessante foi a presença de grânulos com atividade NADPH-diaforase nos motoneurônios (13  $\mu\text{m}$ ) do lado ipsilateral à lesão, os quais sempre se mostraram negativos no animal em condições basais (Fig. 45A).

Este mesmo padrão de resposta foi encontrado aos 15 (Fig. 46A) e 30 dias após a secção do nervo ciático, havendo apenas uma maior atividade nas células gliais e endoteliais. Outra diferença refere-se à maior quantidade de grânulos positivos presentes nos neurônios motores aos 15 dias. Entretanto, aos 30 dias, esta positividade à NADPH-diaforase já apareceu como uma coloração homogênea-moderada por todo o citoplasma celular (Fig. 45B).

Aos 60 dias após a desnervação periférica, a atividade NADPH-diaforase do corno dorsal apresentou uma pequena redução nas camadas Ia, Ib, II e III. A reatividade das células gliais e endoteliais ainda foi intensa, havendo, porém, uma discreta redução no número destas células positivas. A atividade dos neurônios motores acentuou-se, mostrando agora uma coloração azul violácea forte e homogênea (Fig. 45C).

Aos 90 dias, o padrão de atividade NADPH-diaforase do corno dorsal da medula espinal lombar foi mais reduzido, porém a reação das áreas Ia, Ib, II e III ainda mostrou-se forte (Fig. 46B). Nos neurônios motores do corno ventral, a positividade foi ainda maior. Nestas células, a reação positiva apareceu como uma coloração azul mais intensa do que a anteriormente descrita, tendendo ao azul violáceo (Fig. 45D). A reatividade das células gliais e endoteliais apresentou-se similar àquela descrita para estes tipos celulares aos 60 dias após a desnervação periférica

A medula espinal cervical, por sua vez, não modificou o padrão de distribuição da atividade NADPH-diaforase dos cornos dorsal e ventral. Em nenhum momento houve expressão desta enzima em neurônios motores do lado ipsilateral à lesão. As únicas alterações decorrentes da desnervação periférica foram um aumento da atividade desta enzima nas células gliais e endoteliais. Este acréscimo iniciou-se aos 7 dias após a secção, intensificando-se aos quinze dias. Este quadro se manteve aos 30 dias. Aos 60 dias, observou-se uma discreta redução na quantidade de células reativas. Apesar deste número ser menor aos 90 dias, as células positivas mostravam-se dispersas pelo tecido e exibiam ainda uma intensa coloração azul.

As modificações das diversas regiões do encéfalo também já foram observadas aos 7 dias. Neste período, alguns neurônios (20  $\mu\text{m}$ ) dos núcleos reticulares medial e inferior, bem como dos núcleos superior e inferior da rafe (10  $\mu\text{m}$ ) apresentaram um padrão de positividade diferente daquele observado na tartaruga em condições basais (Fig. 47). Estes neurônios, ao invés da coloração azul violácea homogênea, exibiram grânulos fortemente reativos dispersos por seu citoplasma. Esta resposta ocorreu em todos os outros intervalos considerados (Fig. 48C-F), não havendo sinais de sua recuperação aos 90 dias.

Além disso, a reação positiva à NADPH-diaforase apareceu em neurônios situados em regiões que antes não expressavam esta atividade, como é o caso do núcleo dorso-medial anterior do tálamo (Fig. 49E), cujas somas mediram 4  $\mu\text{m}$ , do núcleo do istmo (Fig. 48B), onde os neurônios tinham diâmetro de 12  $\mu\text{m}$ , e do núcleo mesencefálico do V par craniano (Fig. 48A), tendo estas células 30  $\mu\text{m}$  de tamanho. O primeiro núcleo citado já desenvolveu uma reatividade moderada aos 7 dias, a qual se manteve similar nos outros intervalos analisados. O núcleo do istmo também se mostrou positivo aos 7 dias, porém essa atividade apareceu bastante difusa e pouco pronunciada. Uma positividade mais delimitada e de intensidade moderada ocorreu apenas aos 90 dias após a secção do nervo periférico. O núcleo mesencefálico do V par craniano exibiu grânulos fortemente reativos já aos 7 dias. Estes se intensificaram aos 15 dias, mantendo-se inalterados nos demais períodos estudados.

A região do estriado (12  $\mu\text{m}$ ) e da eminência dorsal ventricular do telencéfalo (16  $\mu\text{m}$ ) foram outras áreas a mostrarem modificações na atividade NADPH-diaforase ao longo das observações. Aos 7 dias, suas reatividades apresentaram-se similares àquelas da tartaruga em estado basal. Entretanto, aos 15 dias, começou a detectar-se uma redução no número de neurônios reativos, a qual foi se acentuando nos outros intervalos considerados. Aos 90 dias, houve um número bem reduzido de neurônios positivos. Todavia, os neurônios positivos que permaneciam mostravam atividade similar àquela observada nestas regiões dos animais controles (Fig. 49A-D).

Além das modificações neuronais, houve ainda uma maior atividade NADPH-diaforase em células gliais e endoteliais, sendo esta, porém, pouco pronunciada aos 7 dias. Uma acentuação desta reatividade ocorreu aos 15 dias, onde houve uma intensa coloração azul violácea nos prolongamentos dos tanicitos de diversas áreas do encéfalo (Fig. 49F). Esta atividade manteve-se aos 30 e aos 60 dias, havendo, entretanto, uma discreta redução aos 90 dias.

### 3.1.3- Substância P

Os cortes da medula espinal cervical alta e lombar de tartarugas *Trachemys dorbigni*, em condições basais, apresentaram intensa imunorreatividade à SP, a qual localizou-se nos cornos dorsal e ventral (Fig. 50A). No corno dorsal, este peptídeo foi detectado em fibras curtas e longas das áreas Ia (Figs. 50A-B, 51A), as quais podiam chegar até a área III (Fig. 51A). Algumas das fibras reativas cruzavam a linha média e chegavam ao lado contralateral (Fig. 51A), enquanto outras permaneciam no lado ipsilateral e podiam alcançar o corno ventral, onde pareciam rodear o soma de

motoneurônios, os quais foram sempre negativos a este tratamento imunohistoquímico (Fig. 50A). Nenhuma imunorreatividade foi observada nas áreas Ib e II (Figs. 50A-C, 51A). Todavia, esta imunorreatividade da SP não estava presente apenas em fibras. Ela também foi observada no soma de alguns neurônios (20  $\mu$ m) da coluna lateral do corno dorsal (Fig. 50C-D). A reatividade à SP ainda foi detectada nos funículos lateral e anterior.

A secção do nervo ciático provocou uma diminuição do número de fibras imunorreativas à SP na medula espinal lombar e cervical alta desta espécie de tartaruga em estudo. Esta redução já foi detectada no sétimo dia após este procedimento experimental (Fig. 51B), sendo também observada aos 15 (Fig. 51C), 30 (Fig. 52A) e 60 dias (Fig. 52B). O mais interessante é que esta diminuição da expressão localizou-se preferencialmente naquelas fibras longas que se estendiam até a área III (Figs. 51B-C, 52A-B). Entretanto, alguns cortes exibiam também uma escassa redução naquelas fibras imunorreativas curtas, as quais chegavam à área Ia (Figs. 51C, 52A). Aos 90 dias, houve um aumento na quantidade de fibras imunorreativas à SP nestes segmentos da medula espinal de tartarugas desnervadas, podendo-se observar fibras longas que se estendiam até a área III e pareciam cruzar a linha média e chegar ao lado contralateral (Fig. 52C).

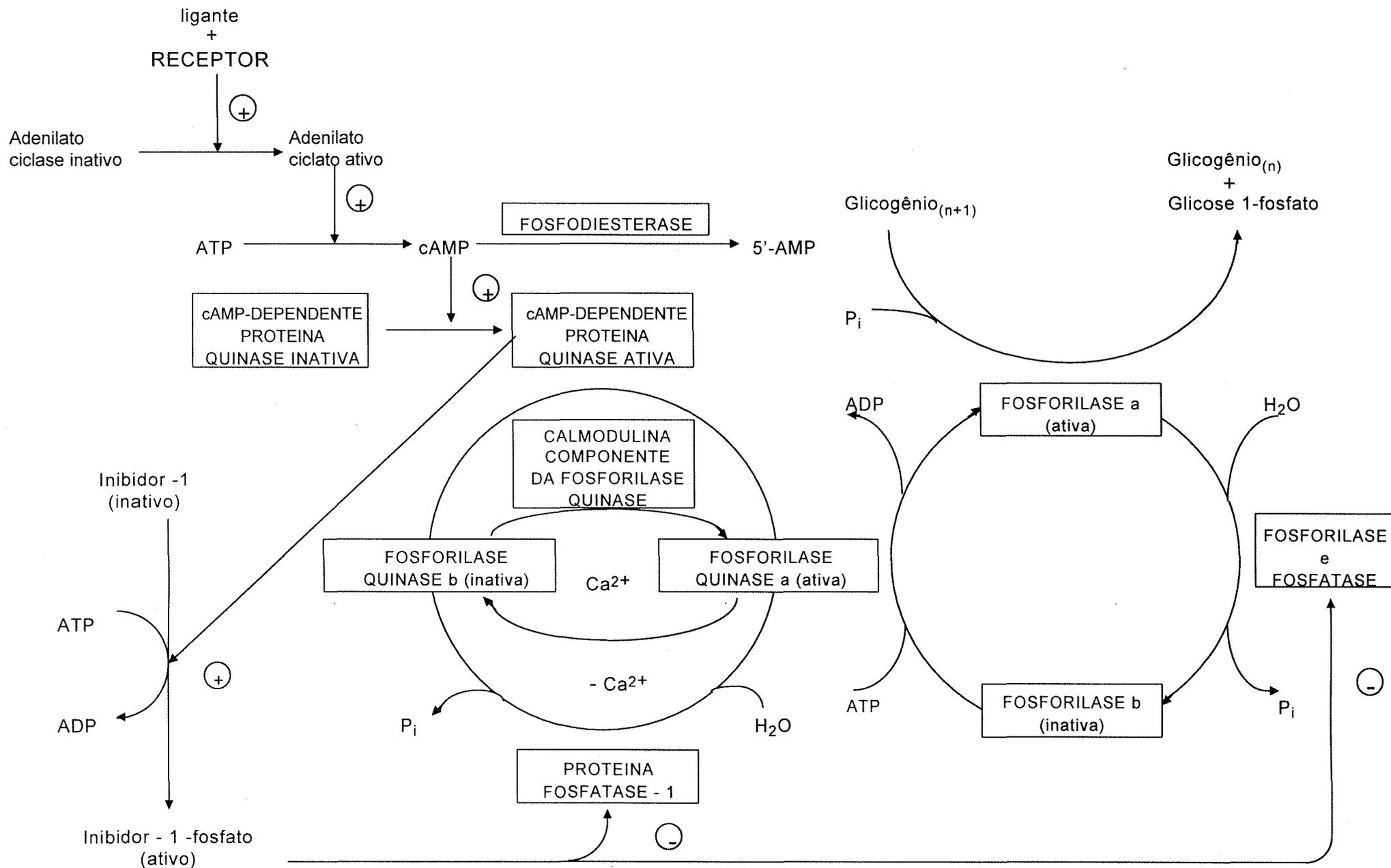
A imunorreatividade das células do gânglio raquidiano mostrou-se difusa e não seguiu um padrão regular de resposta. É possível que isto tenha sido consequência da falta de tratamento prévio das tartarugas com colchicina. O mapeamento desta atividade no tecido nervoso destes animais necessitou este procedimento (REINER et

al., 1984). Todavia, é possível também que para esta observação seja necessário outro tipo de fixação do tecido. Contudo, não houve disponibilidade de tartarugas para a realização destes estudos. Por este motivo, os resultados da imunorreatividade da SP em células do gânglio raquidiano destes animais não será apresentada neste momento.

### 3.2- Jejum

Os métodos histoquímicos utilizados não revelaram alterações nas atividades das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase do encéfalo da tartaruga *Trachemys dorbigni* após 90 dias de jejum. Ao final deste intervalo, os padrões de distribuições das referidas enzimas mostraram-se iguais àqueles descritos nos animais em condições basais. Além disso, aparentemente não ocorreram alterações na intensidade das colorações desenvolvidas pelas células reativas ao longo do neuroeixo desta espécie de tartaruga.

Fig. 1- Esquema mostrando o mecanismo de regulação da enzima glicogênio fosforilase (Modificado de MURRAY et al., 1990).



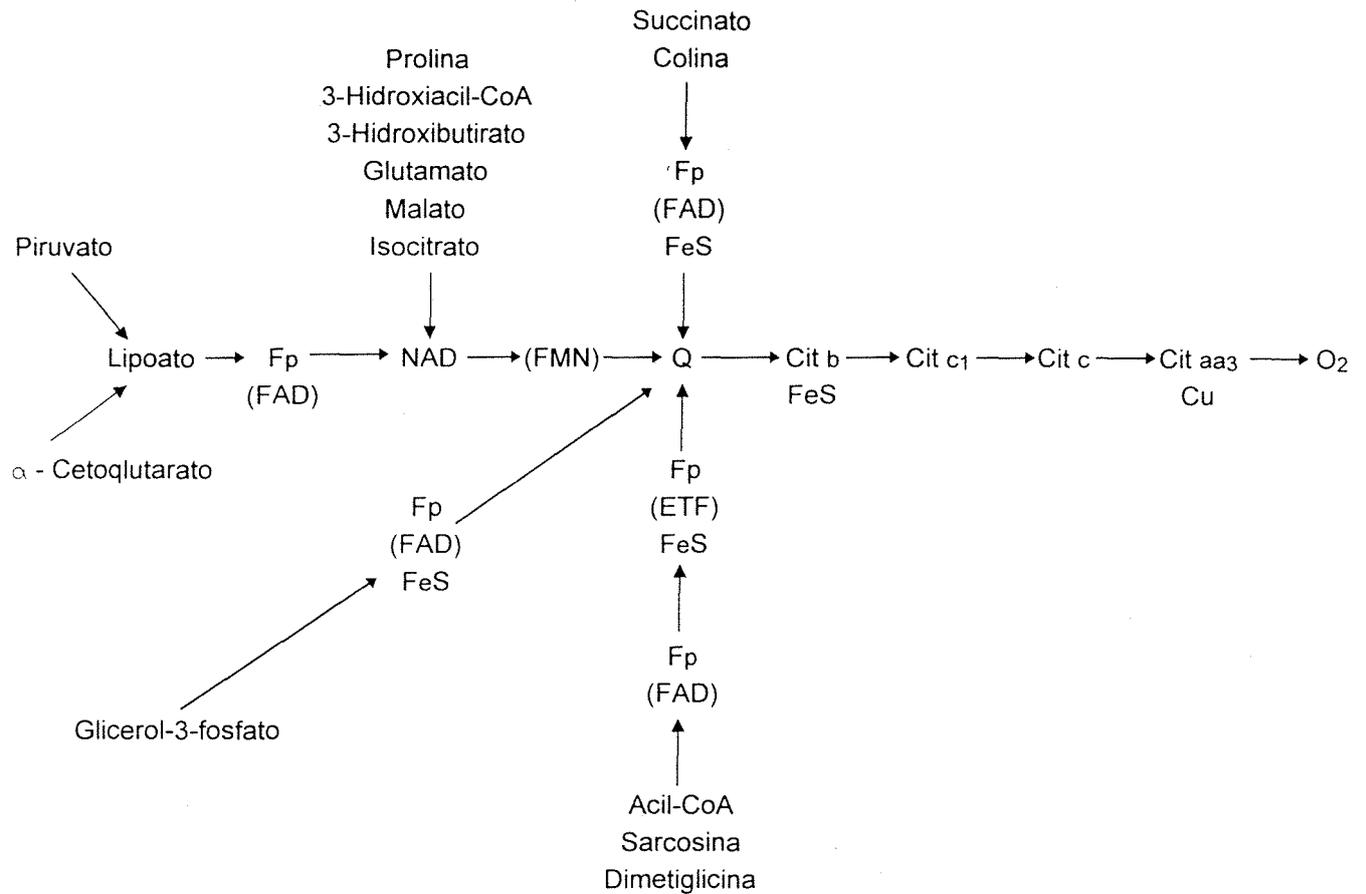


Fig 2 - Componentes da cadeia respiratória nas mitocôndrias.

- Cit aa3 - Citocromo oxidase
- Cit b - Citocromo b
- Cit c - Citocromo c
- Cit c1 - Citocromo c1
- Cu - Cobre
- FAD - Flavina-adenina-dinucleotídeo
- FeS - Proteína ferro-enxôfre
- FMN - Flavina-mononucleotídeo
- Fp - Flavoproteína
- NAD - Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
- Q - Coenzima ubiquinona

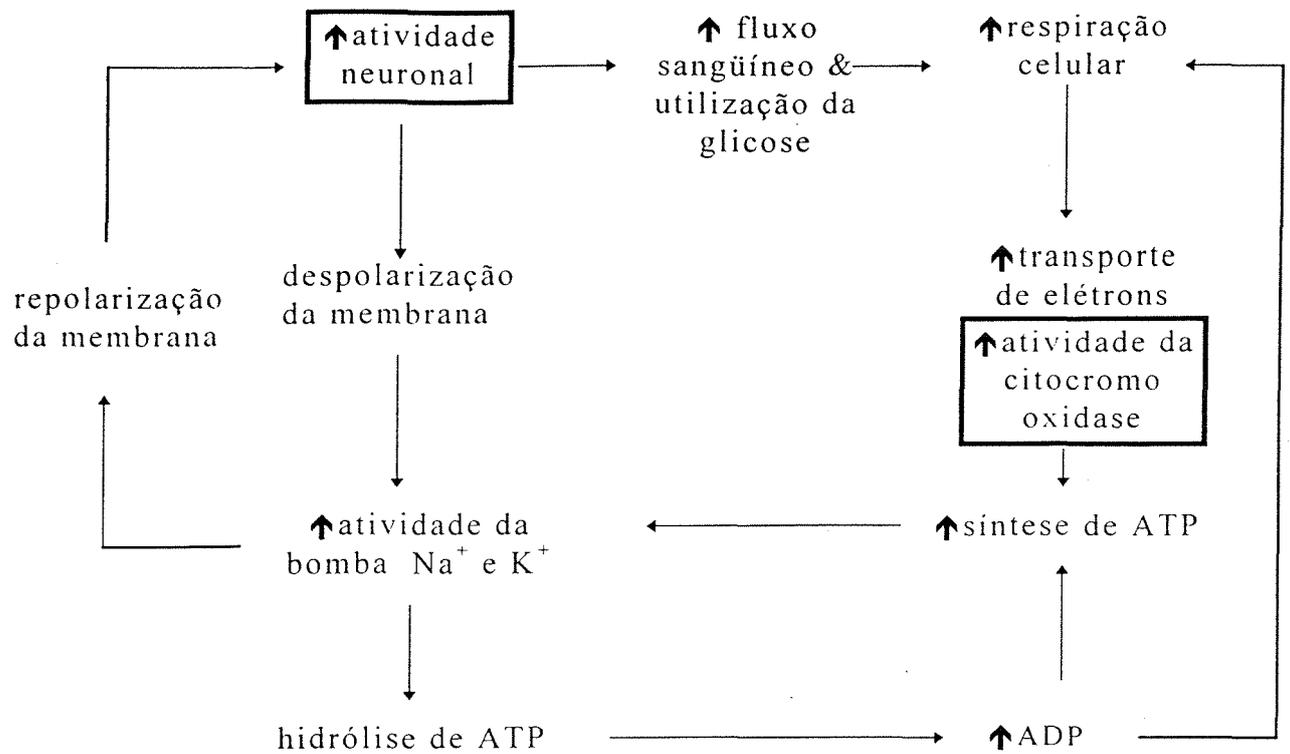


Fig. 3- Diagrama esquemático simplificado mostrando a relação entre atividade neuronal, transporte iônico ativo, metabolismo oxidativo, atividade citocromo oxidase e produção de energia. O transporte de elétrons e a atividade da citocromo oxidase são obtidos da respiração celular (Wong- Riley, M. T. T. , 1989).

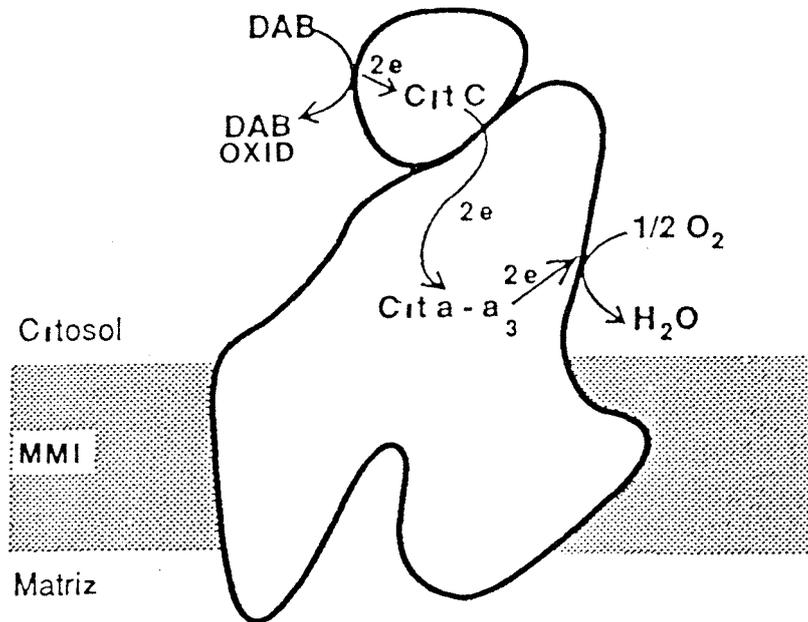


Fig. 4- Representação esquemática do modelo da citocromo oxidase como uma proteína integral transmembranar da membrana mitocondrial interna (MMI). A citocromo oxidase (Cit a-a<sub>3</sub>) catalisa a transferência de elétrons (e) do citocromo c (Cit c) para o oxigênio (O<sub>2</sub>) formando água (H<sub>2</sub>O). Os elétrons são liberados quando a diaminobenzidina (DAB) é oxidada (DAB OXID). Esquema apresentado no trabalho de WONG-RILEY (1989).

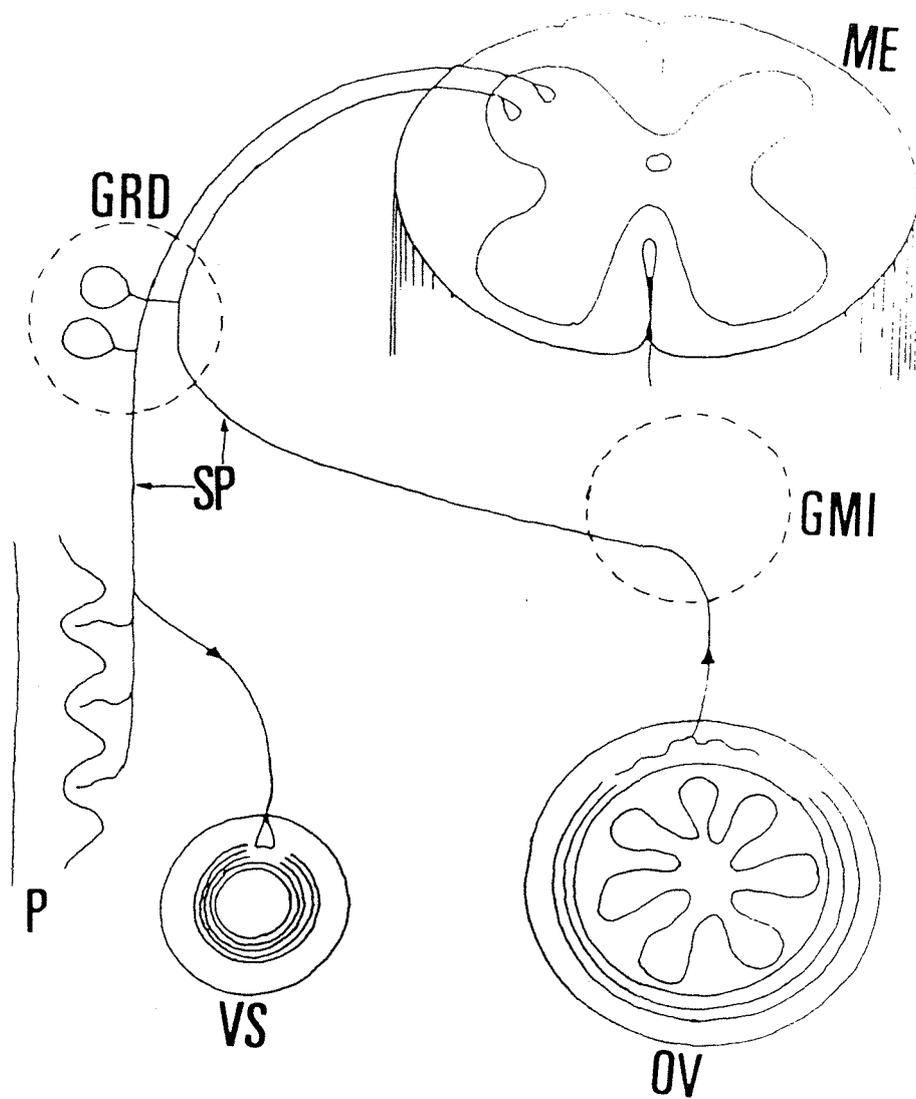


Fig. 5- Representação esquemática de neurônios aferentes primários somáticos e viscerais, e do sistema nervoso simpático que sintetizam substância P (**SP**). **GMI**: Gânglio mesentérico inferior; **GRD**: Gânglio da raiz dorsal; **ME**: Medula espinal; **P**: Pele; **OV**: Órgão visceral; **VS** vaso sanguíneo (Modificado de BRADFORD, 1986).

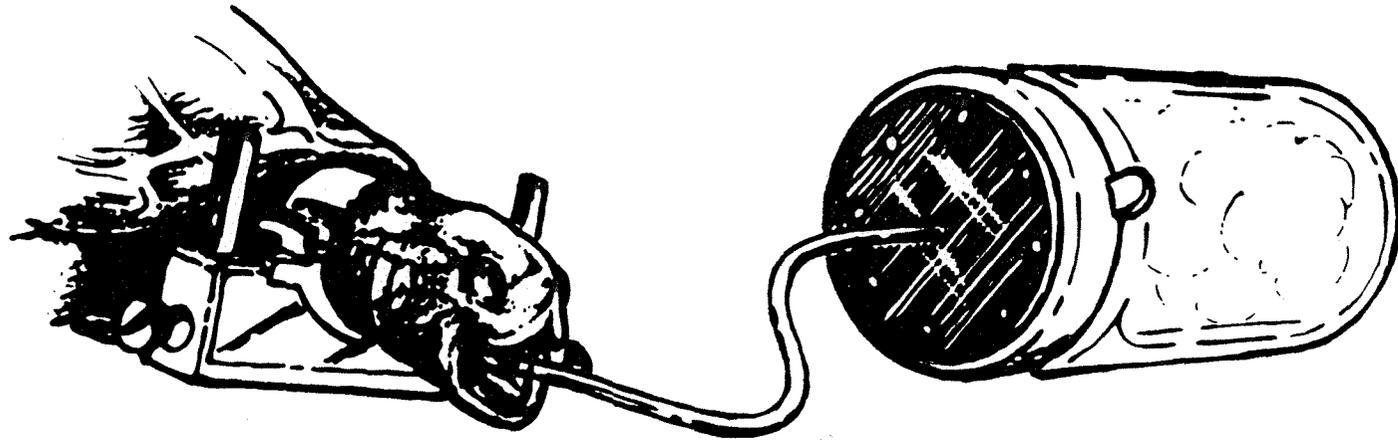


Fig. 6- Desenho esquemático mostrando a seqüência de ordenação dos aparelhos utilizados na anestesia das tartarugas. O frasco de vidro continha chumaços de algodão embebidos em éter e os furos na tampa permitiam a entrada do ar atmosférico. A tartaruga respirava essa mistura gasosa através da cânula introduzida previamente em traquéia (BELLÓ & BELLÓ-KLEIN, 1991, com permissão dos autores).

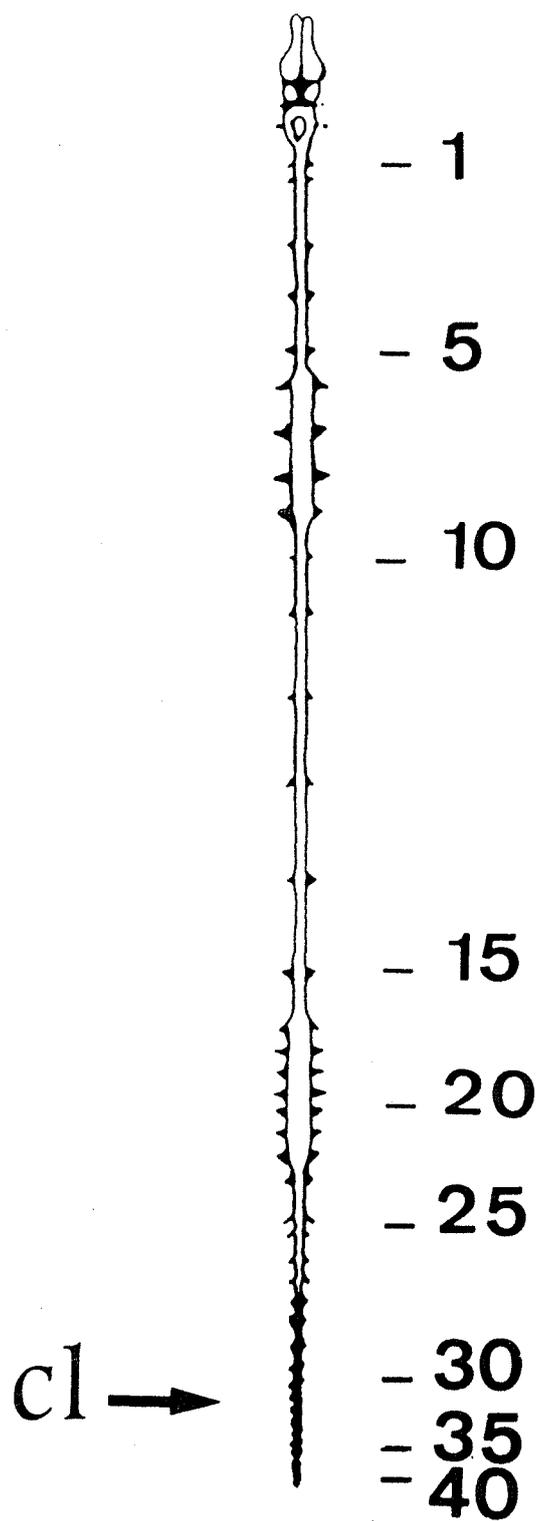


Fig. 7- Representação esquemática do sistema nervoso central de tartaruga mostrando, em particular, o número e a distribuição dos segmentos da medula espinal. Cl- nível da cloaca (KUSUMA et al., 1979).

Fig. 8- Representação esquemática de secções coronais do encéfalo da tartaruga *Trachemys dorbigni* mostrando as regiões positivas ao procedimento histoquímico da glicogênio fosforilase (●) e da citocromo oxidase (▲). **A**: Bulbo Olfatório; **B-D**: Telencéfalo. cd- córtex dorsal; cdm- córtex médio dorsal; cm- córtex medial; CO- quiasma óptico; cp- córtex piriforme; cpv- córtex piriforme ventral; DVR- eminência ventricular dorsal do telencéfalo; GCL- camada de células granulares; GL- camada glomerular; MCL- camada de células mitrais; nDB- núcleo da banda diagonal de Broca; nPH- núcleo periventricular hipotalâmico; PH- primórdio de hipocampo; PT- espessamento palial; Str- estriado; TO- tracto óptico; TuOL- tubérculo olfatório.

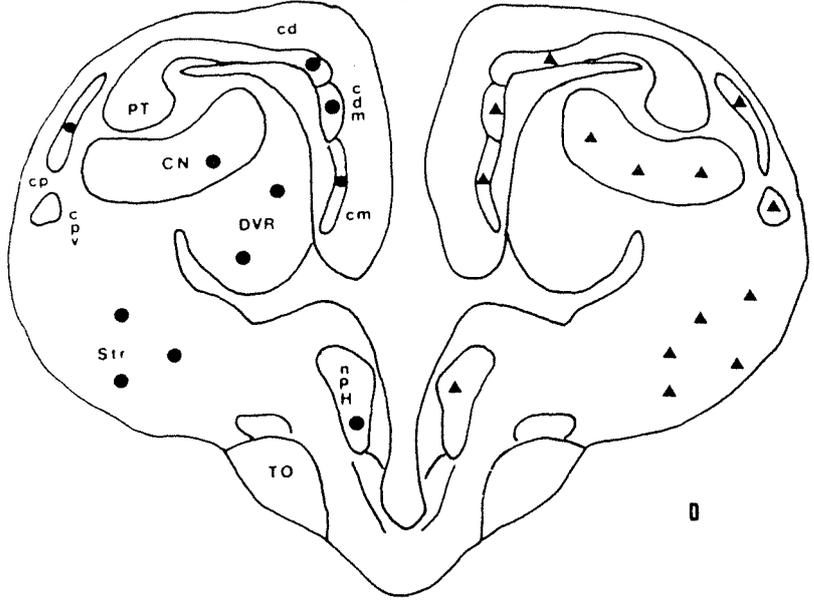
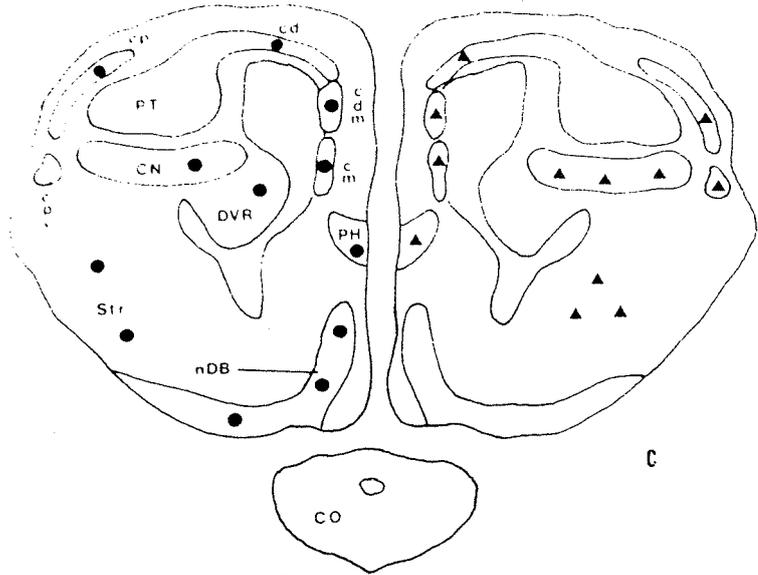
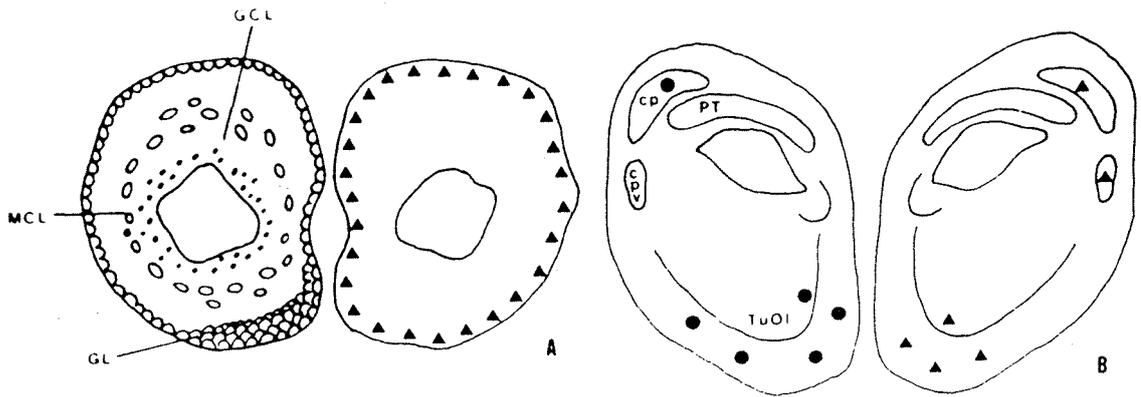
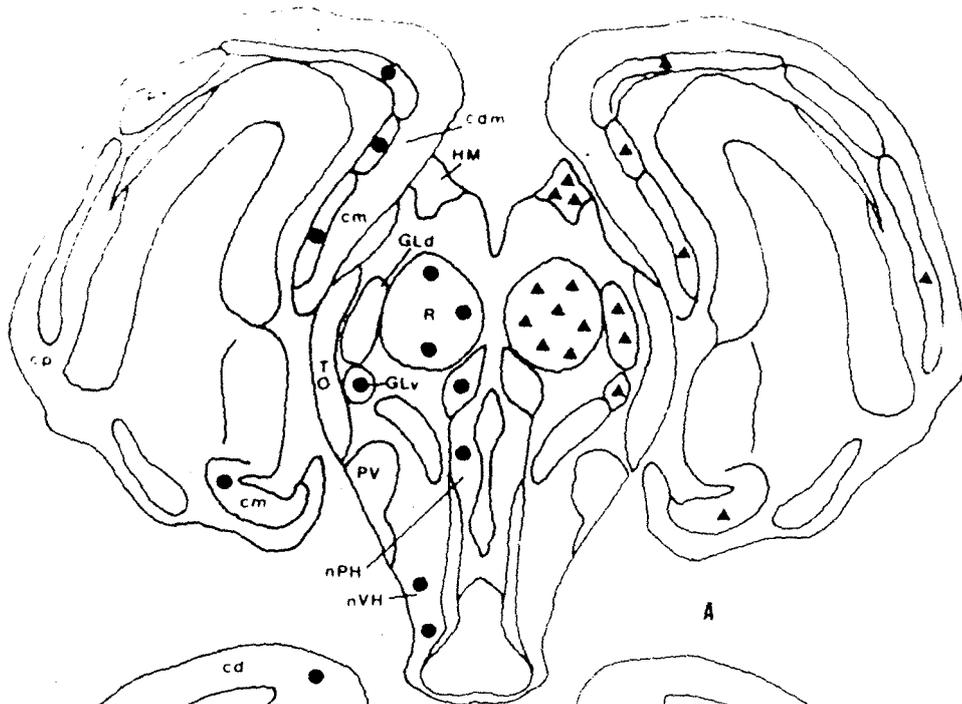
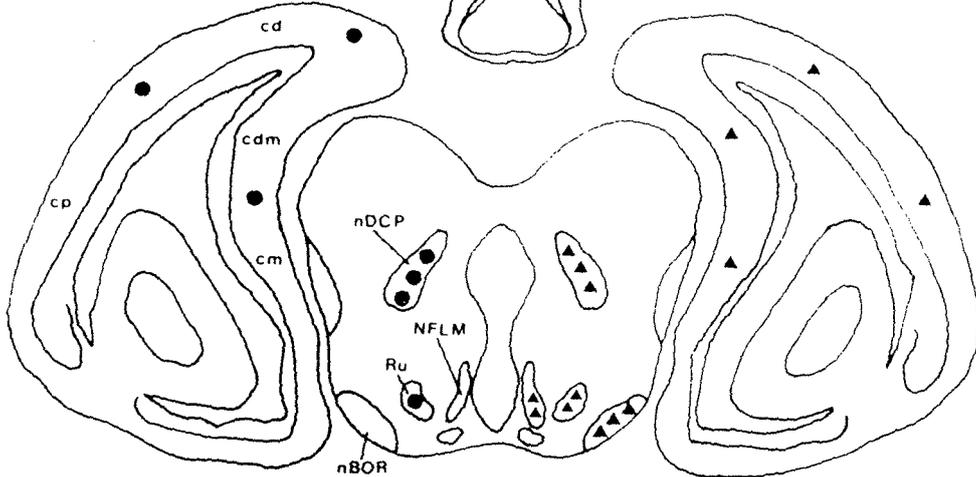


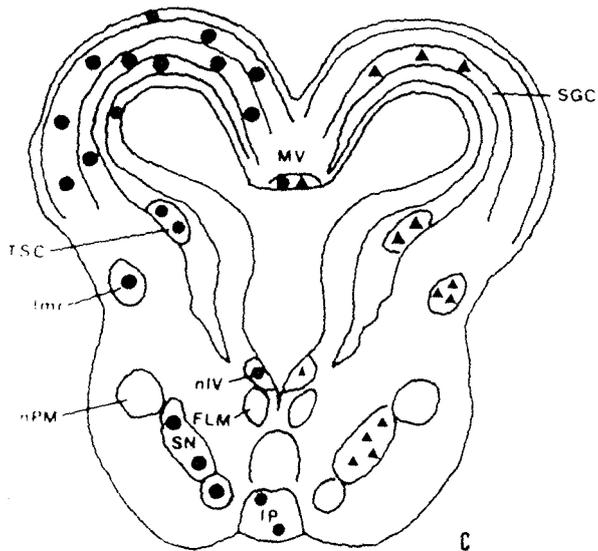
Fig. 9- Representação esquemática de secções coronais do encéfalo da tartaruga *Trachemys dorbigni* mostrando as regiões positivas ao procedimento histoquímico da glicogênio fosforilase (●) e da citocromo oxidase (▲). **A:** Telencéfalo e Diencéfalo; **B:** Telencéfalo e Mesencéfalo; **C:** Mesencéfalo. cd- córtex dorsal; cdm- córtex médio dorsal; cm- córtex medial; cp- córtex piriforme; Gld- porção dorsal do núcleo geniculado lateral; Glv- porção ventral do núcleo geniculado lateral; HM- núcleo habenular medial, Imr- porção magnocelular rostral do núcleo do istmo; IP- núcleo interpeduncular; nBOR- núcleo basal da raiz óptica; nDCP- núcleo dorsal da comissura posterior; NFLM- núcleo do fascículo longitudinal medial; nIV- núcleo do IV par craniano; nPH- núcleo periventricular hipotalâmico; nPM- núcleo profundo do mesencéfalo; nVH- núcleo médio ventral hipotalâmico; PT- espessamento palial; PV- pedúnculo ventral do fascículo prosencefálico lateral; R- núcleo rotundus; Ru- núcleo rubro; SGC- camada cinzenta central; SN- substância nigra; TO- tracto óptico; TSC- torus semicircularis.



A



B



C

Fig. 10- Representação esquemática de secções coronais do encéfalo e da medula espinal cervical alta da tartaruga *Trachemys dorbigni* mostrando as regiões positivas ao procedimento histoquímico da glicogênio fosforilase (●) e da citocromo oxidase (▲). A-E: Medulla Oblonga; F: Medula Espinal. Cb- cerebelo; Cbl- núcleo cerebelar lateral; Cbm- núcleo cerebelar medial; FD- funículo dorsal; FL- funículo lateral; FV- funículo ventral; GCL- camada de células granulares; Imc- porção magnocelular caudal do núcleo ístmo; Ipc- porção parvocelular do núcleo ístmo; LoC- locus coeruleus; ML- camada molecular; MN- núcleo marginal; nTS- núcleo do trato solitário; nVI- núcleo do VI par craniano; nVII- núcleo do VII par craniano; nX- núcleo do X par craniano; nXII- núcleo do XII par craniano; PCL- camada de células de Purkinje; PrV- núcleo principal do V par craniano; Rai- núcleo inferior da rafe; Ras- núcleo superior da rafe; Ri- núcleo reticular inferior; Ris- núcleo reticulat ístmico; Rm- núcleo reticular medial; Rs- núcleo reticular superior; SGD- substância cinzenta dorsal; SGV- substância cinzenta ventral; TeO- tecto óptico; Ttd- núcleo descendente do V par craniano; VeD- núcleo vestibular descendente; VeL- núcleo vestibular lateral.

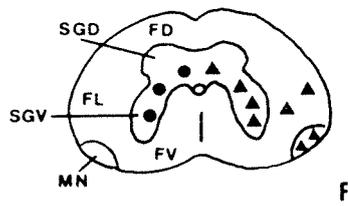
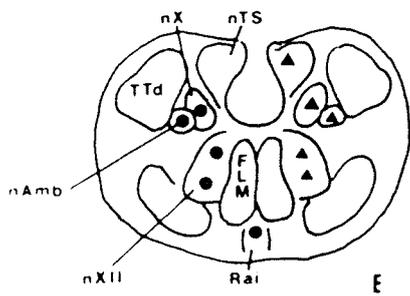
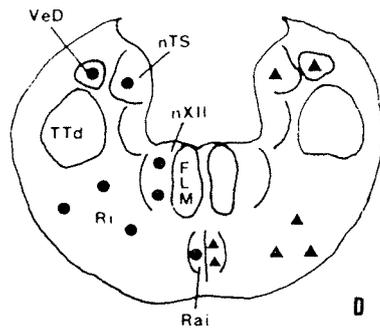
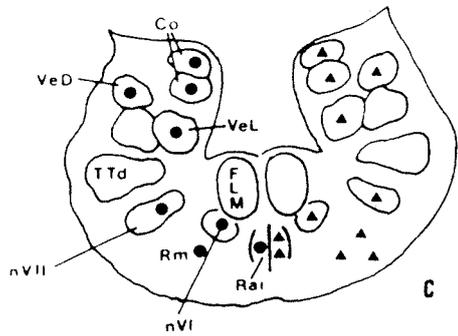
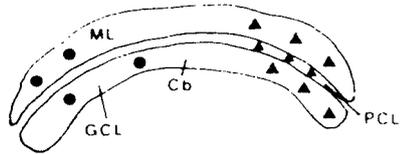
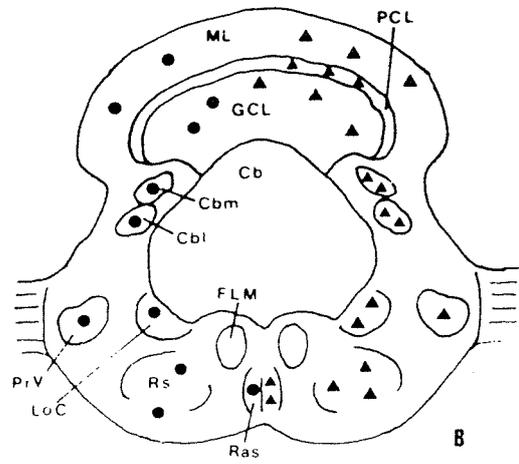
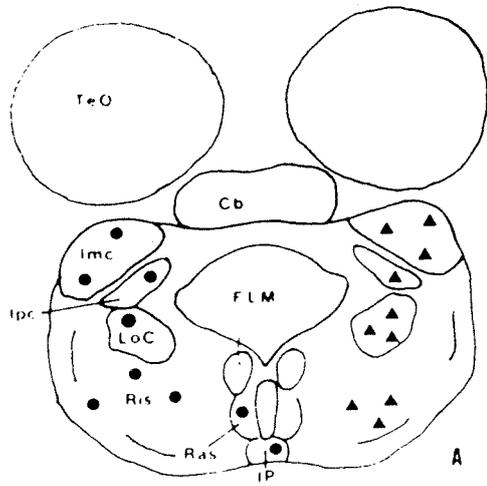


Fig. 11- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de tartaruga *Trachemys dorbigni*, adulta, mostrando diversas regiões positivas ao procedimento histoquímico da glicogênio fosforilase. **A:** Reatividade nas camadas molecular (seta vazada) e plexiforme (asterisco) do córtex medial. Esta atividade também é observada em neurônios piramidais (setas cheias) desta região. **B:** Neurônios positivos na área da eminência ventricular dorsal do telencéfalo (setas). **C:** Positividade em somas neuronais (setas) do núcleo periventricular hipotalâmico. **D:** Atividade glicogênio fosforilase em neurônios do núcleo rubro (setas). **E:** Intensa positividade nas camadas do tecto óptico. **F:** Neurônios positivos no núcleo mesencefálico do V par craniano (setas). **V:** Terceiro ventrículo. Barras de calibração: A,C: 70  $\mu\text{m}$ ; B,D: 30  $\mu\text{m}$ ; E-F; 200  $\mu\text{m}$ .

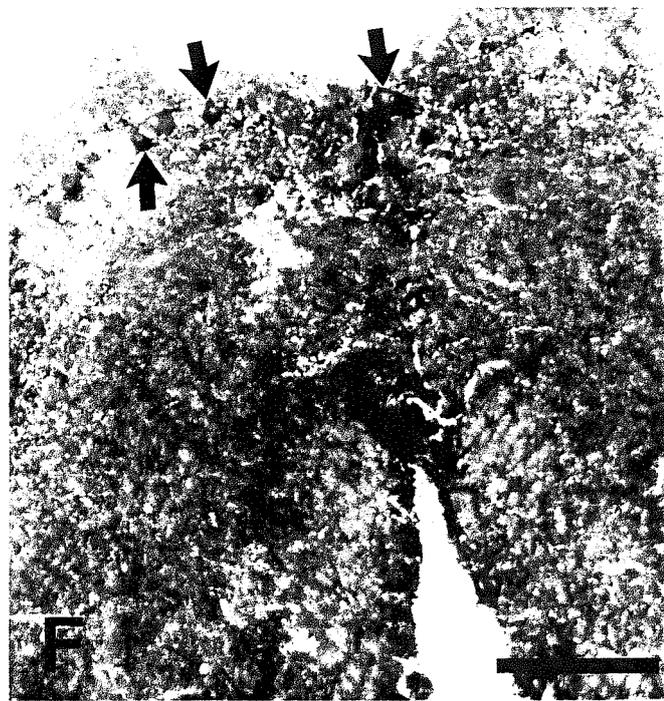
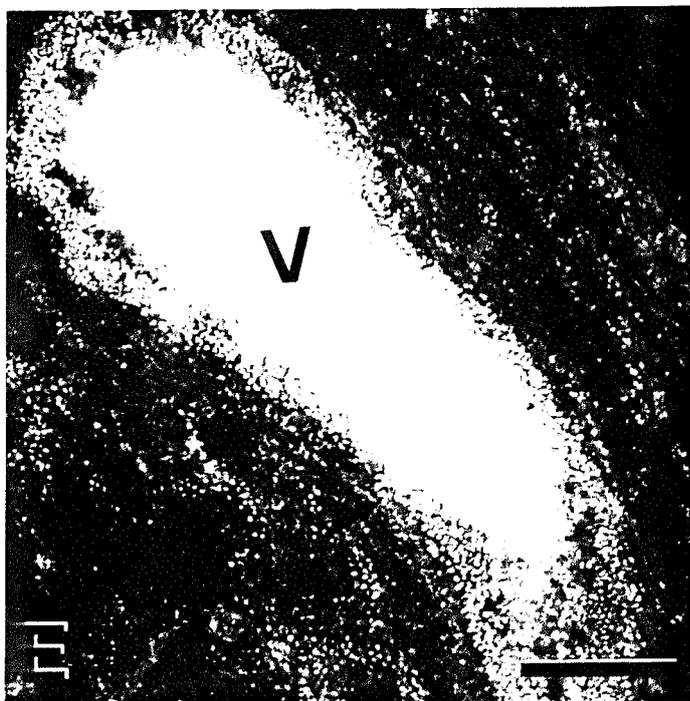
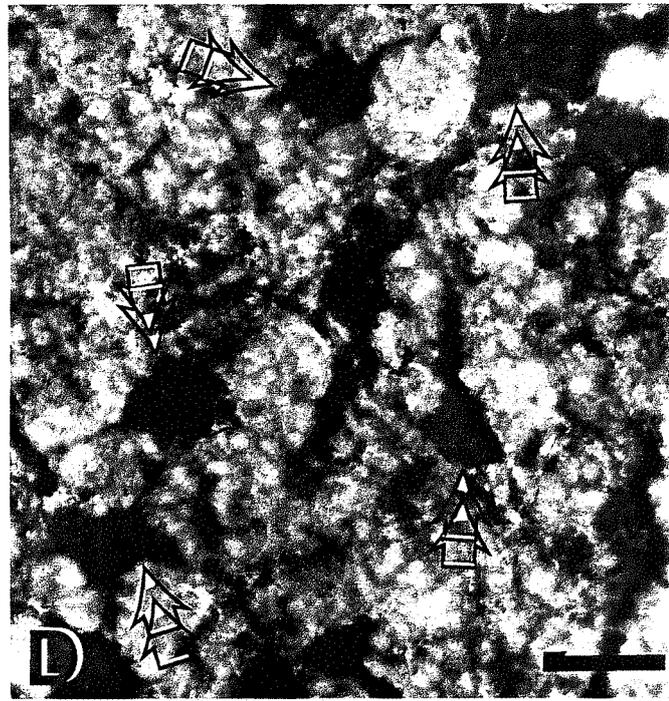
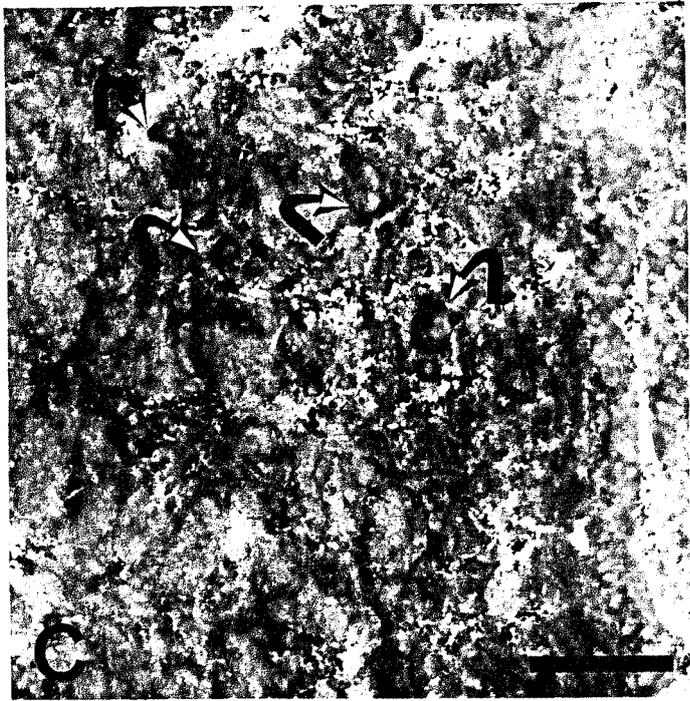
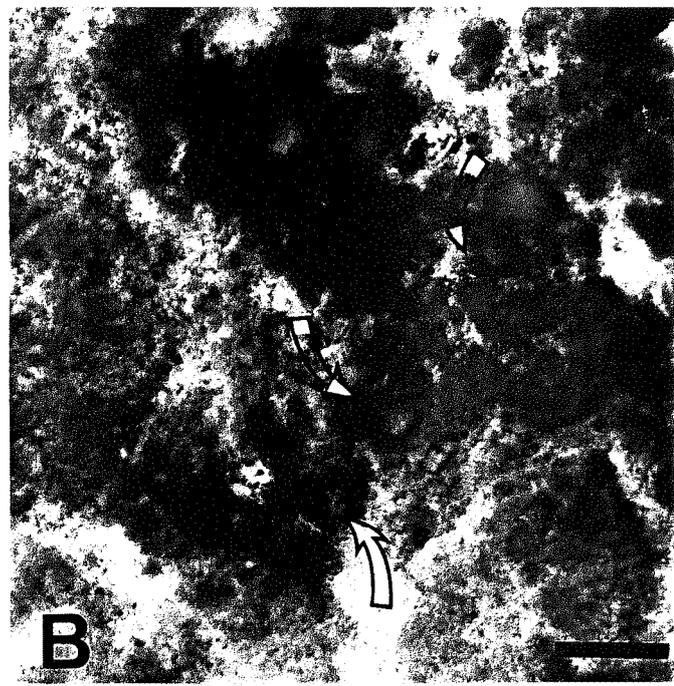
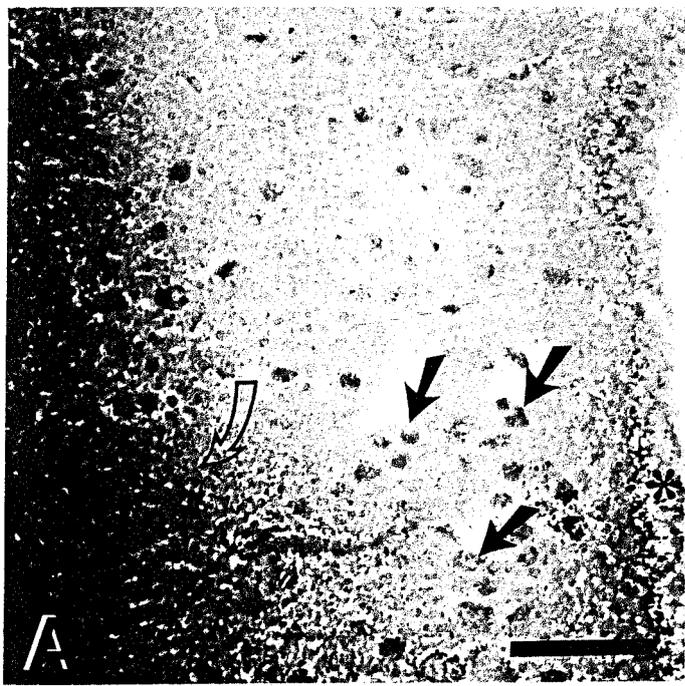


Fig. 12- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de tartaruga *Trachemys dorbigni*, adulta, mostrando diversas regiões reativas ao procedimento histoquímico da glicogênio fosforilase. **A:** Neurônios com atividade positiva no núcleo do ístmo (setas). **B:** Somas neuronais reativos no núcleo do III par craniano (setas). **C:** Atividade glicogênio fosforilase em neurônios do núcleo do IV par craniano (setas). **D:** Reação positiva em neurônios fusiformes da substância nigra (setas). **E:** Reatividade em somas neuronais localizados no locus coeruleus (setas). **F:** Reação glicogênio fosforilase em células nervosas do núcleo do VII par craniano (setas). **FLM:** Fascículo longitudinal medial. Barras de calibração: A, C, D, E, F: 70  $\mu$ m; B: 30  $\mu$ m.

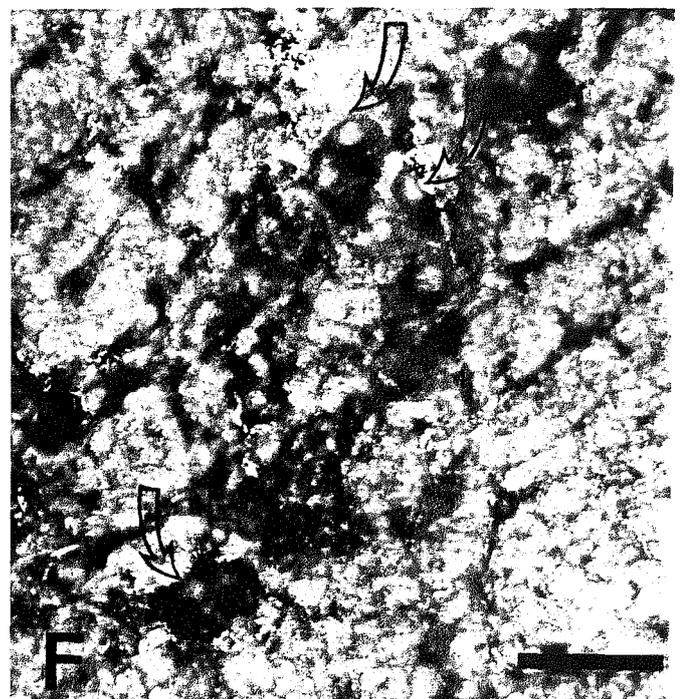
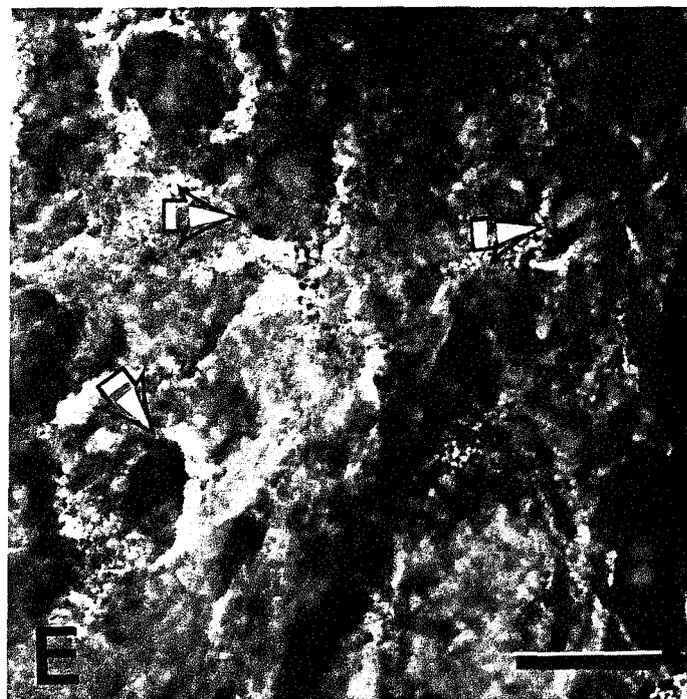
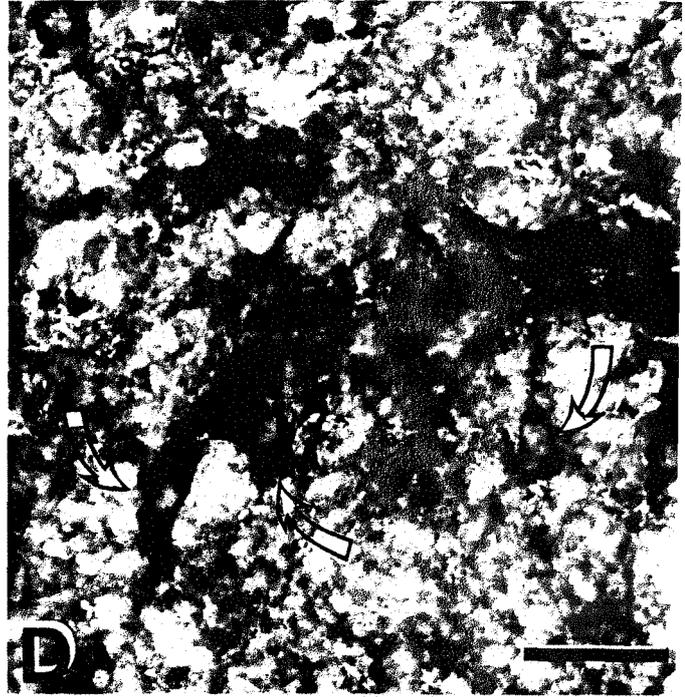
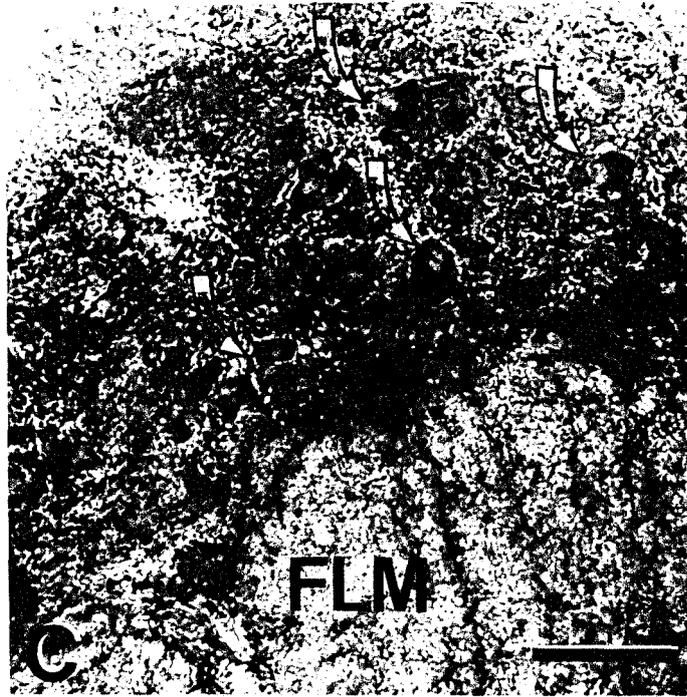
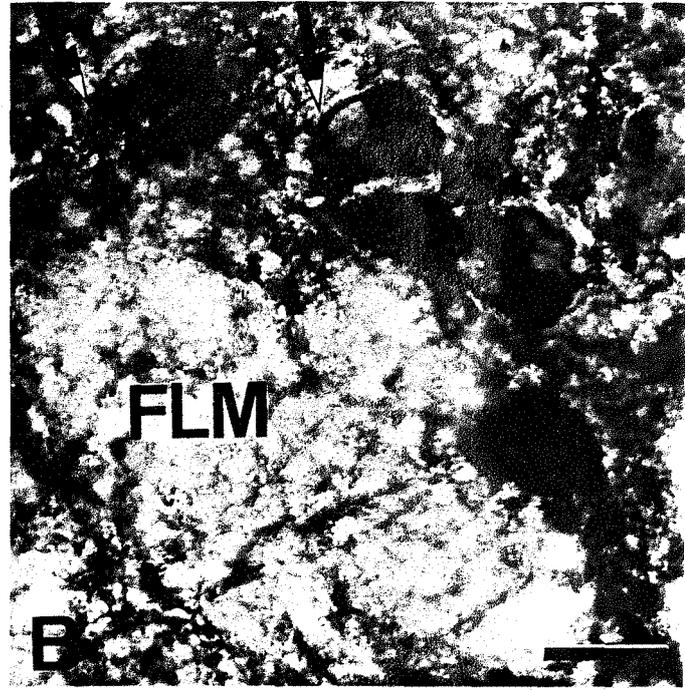
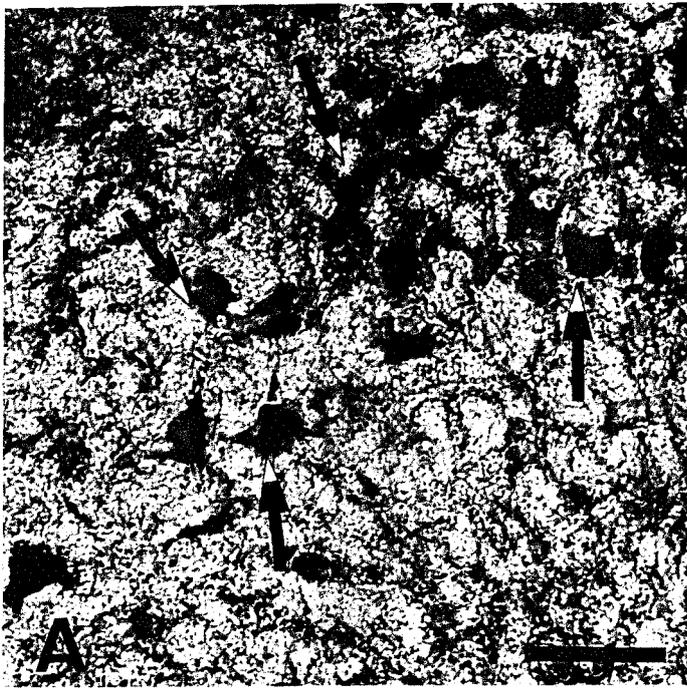


Fig. 13- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo e da medula espinal cervical alta de tartaruga *Trachemys dorbigni*, adulta, mostrando diversas regiões positivas ao procedimento histoquímico da glicogênio fosforilase. **A:** Neurônio reativo no núcleo motor do V par craniano (seta). **B:** Atividade glicogênio fosforilase em neurônios do núcleo do X par craniano (setas). **C:** Reação positiva em somas neuronais (setas) do núcleo inferior da rafe (Ri) e do núcleo reticular medial (Rm). **D:** Somas neuronais reativos no núcleo do XII par craniano (setas). **E:** Atividade positiva em motoneurônio (seta) da medula espinal cervical alta. **F:** Reatividade em neurônios comissurais dorsais da medula espinal (setas). Barra de calibração: A-D: 70  $\mu\text{m}$ ; E: 10  $\mu\text{m}$ ; F: 30  $\mu\text{m}$ .

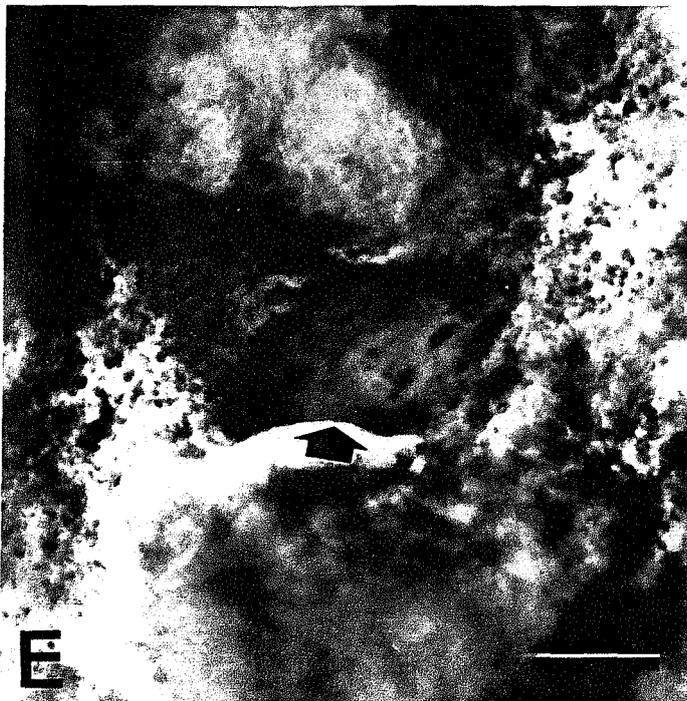
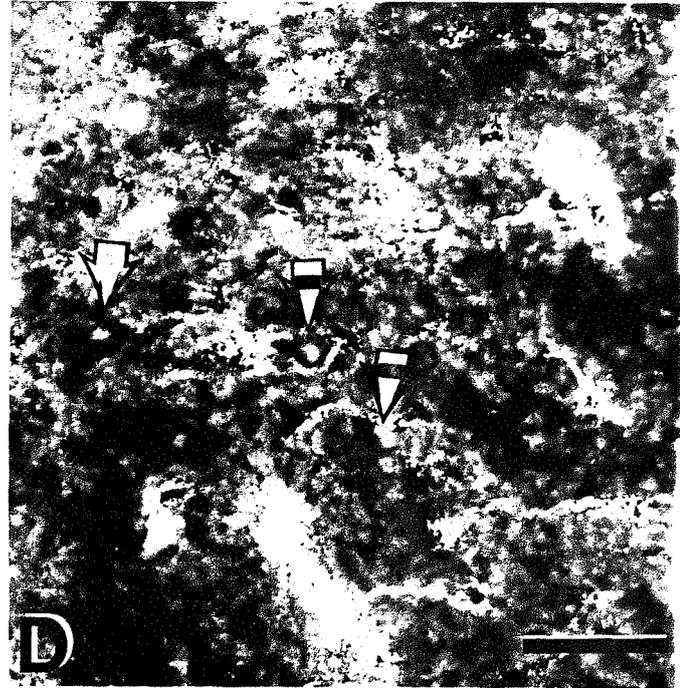
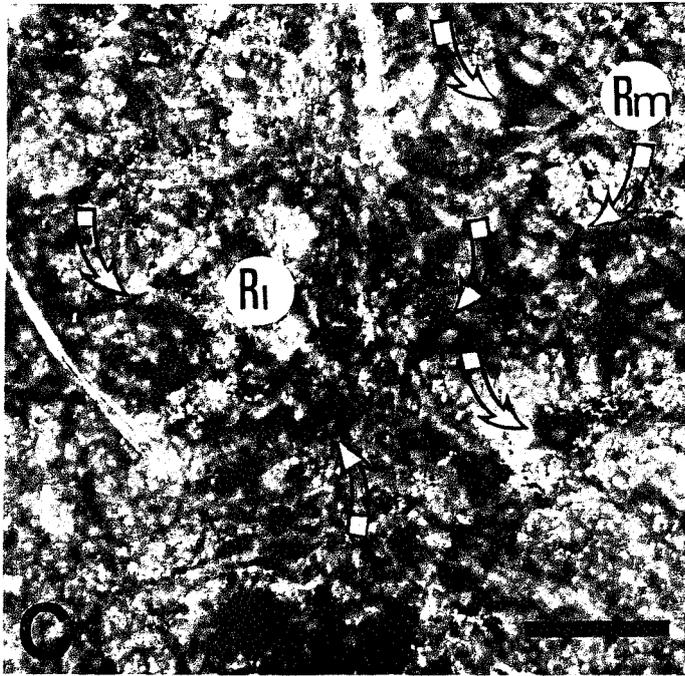
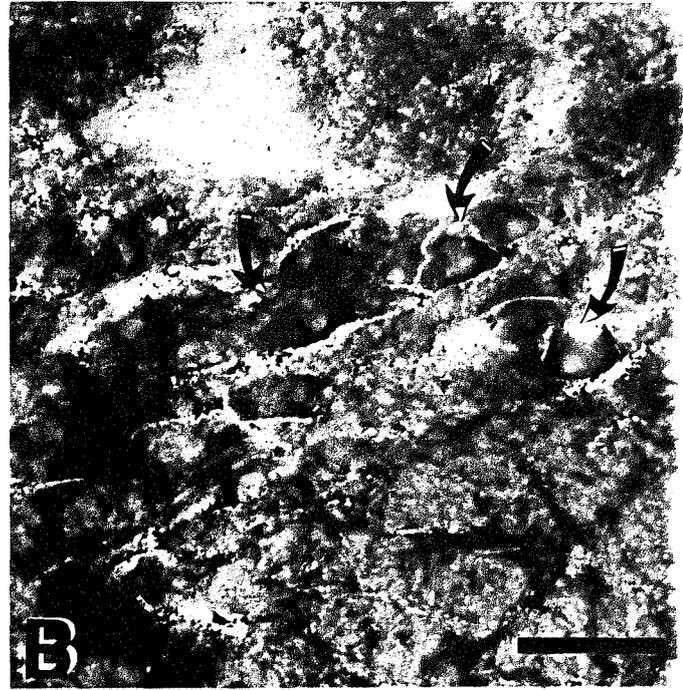


Fig. 14- Fotomicrografias de seções coronais do encéfalo de tartaruga *Trachemys dorbigni*, adulta, mostrando diversas regiões positivas ao procedimento histoquímico da citocromo oxidase. **A:** Reação positiva nos glomérulos olfativos (setas). **B:** Reatividade moderada nas células piramidais (setas cheias) do córtex medial. A camada molecular apresenta-se dividida em duas sub-camadas. Uma com fraca (asterisco) e outra com intensa (seta vazada) positividade. A camada plexiforme mostra escassa reação a citocromo oxidase (estrela). **C:** Neurônios reativos no núcleo central da eminência ventricular dorsal do telencéfalo (setas). **D:** Somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) neuronais na região do estriado. **E:** Neurônios com atividade citocromo oxidase no núcleo rotundus (setas). **F:** Reação citocromo oxidase em neurônios da habênula medial (setas). Barras de calibração: A-D: 70  $\mu\text{m}$ ; E-F: 30  $\mu\text{m}$ .

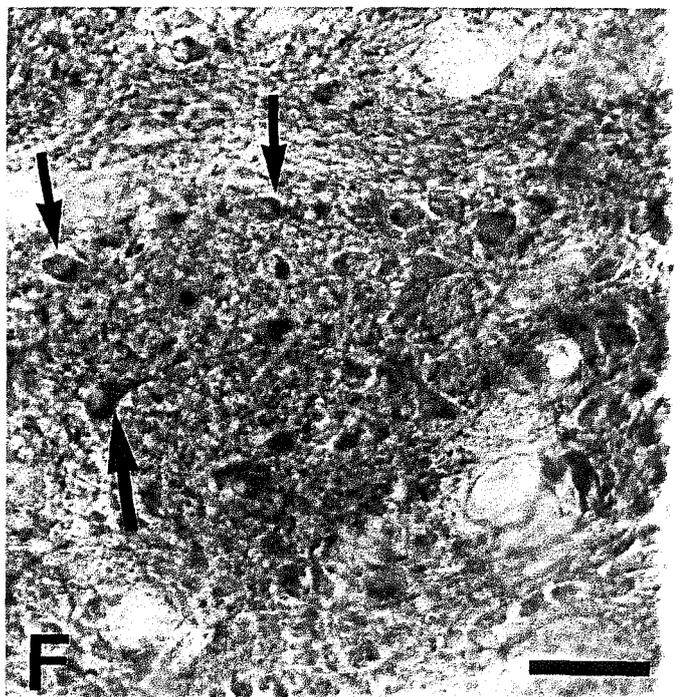
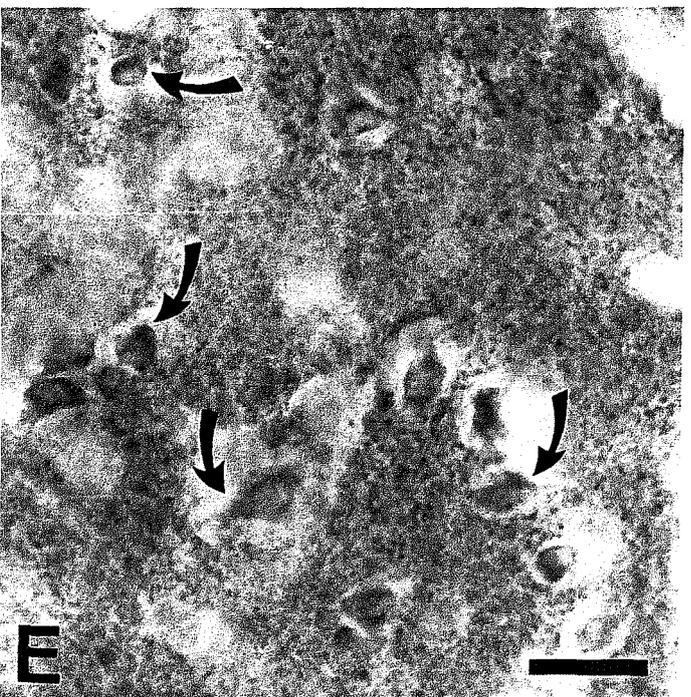
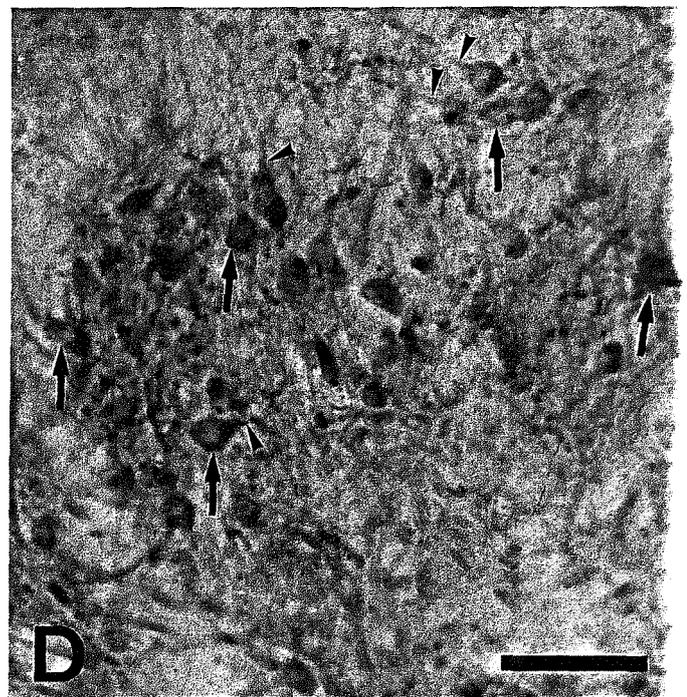
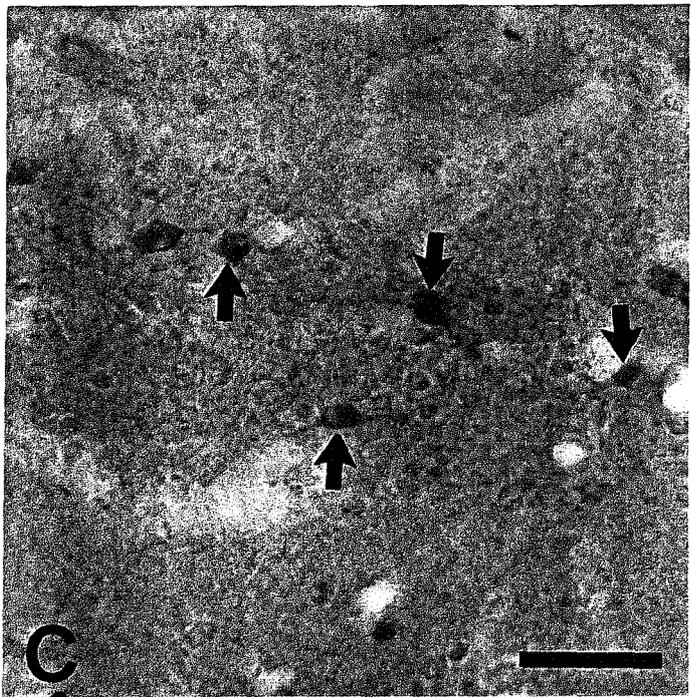
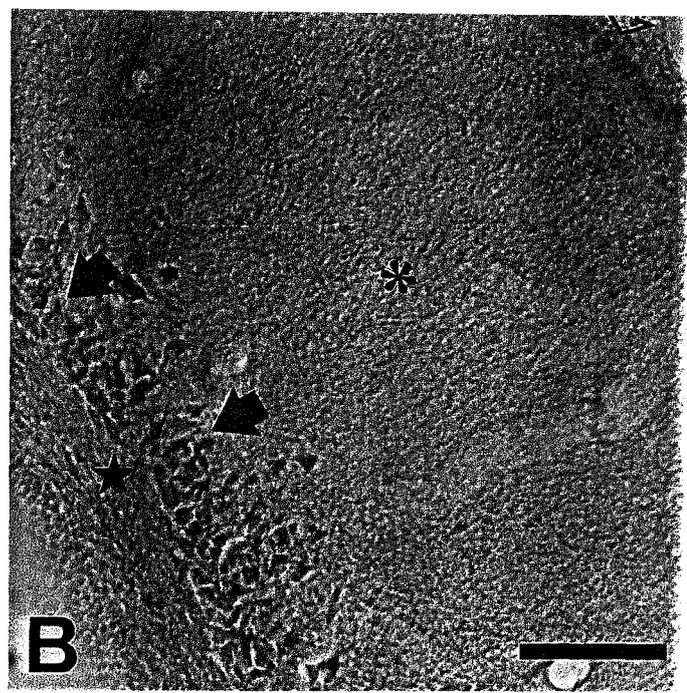
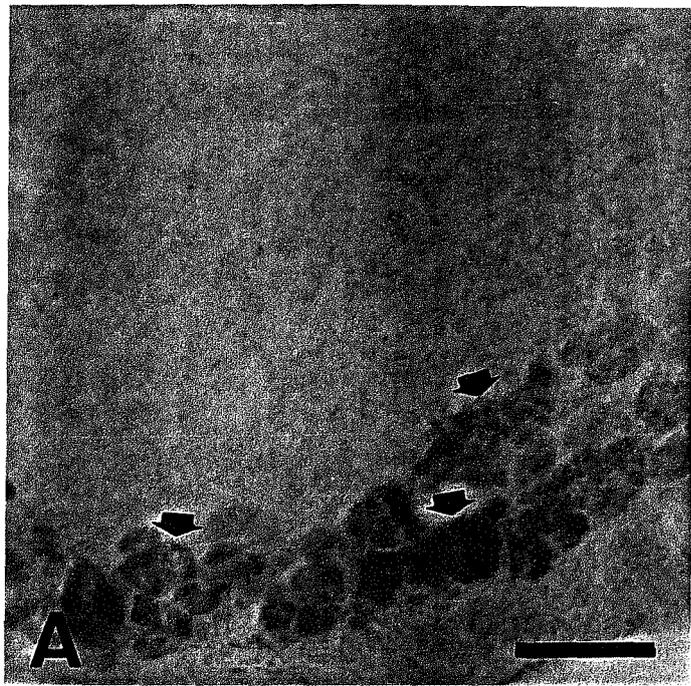


Fig. 15- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de tartaruga *Trachemys dorbigni*, adulta, mostrando diversas regiões reativas ao procedimento histoquímico da citocromo oxidase. **A:** Neurônios positivos no núcleo dorsal da comissura posterior (setas). **B:** Reação citocromo oxidase em somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) de neurônios da camada cinzenta central do tecto óptico. **C:** Somas (setas) e prolongamentos (cabeça de seta) neuronais no núcleo rubro. **D:** Reação positiva em somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) de neurônios do núcleo do istmo. **E:** Atividade citocromo oxidase em células nervosas do núcleo do III par craniano (setas). **F:** Neurônios reativos no núcleo do IV par craniano (setas). **FLM:** Fascículo longitudinal medial; **V:** Terceiro ventrículo. Barras de calibração: A, C, D: 70  $\mu\text{m}$ ; B: 30  $\mu\text{m}$ ; E-F: 200  $\mu\text{m}$ .

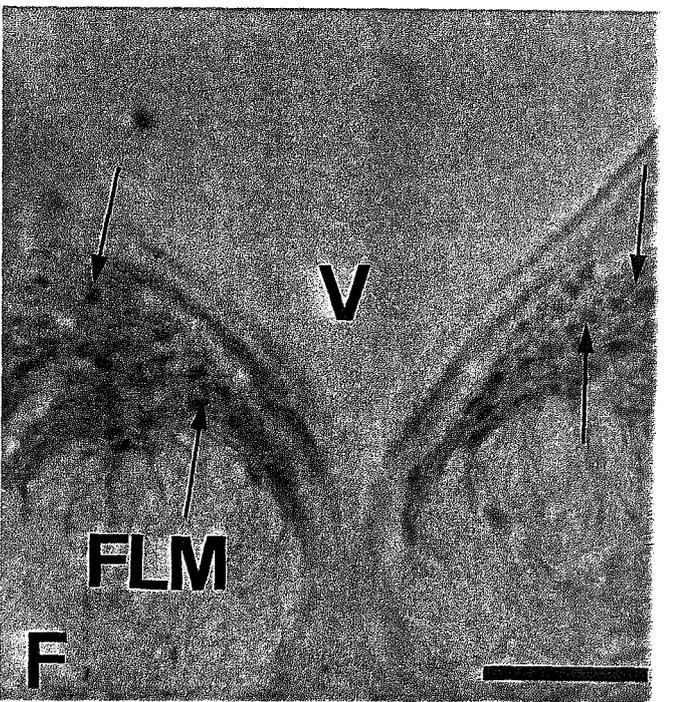
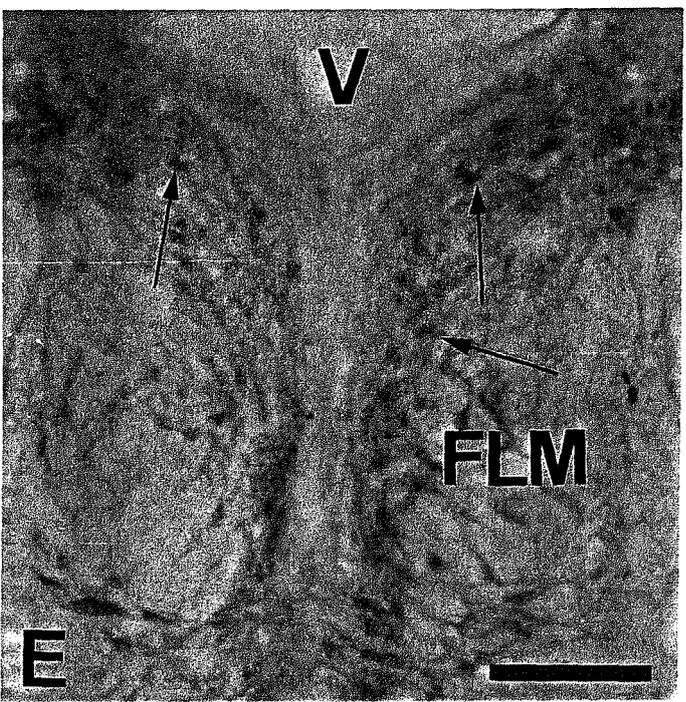
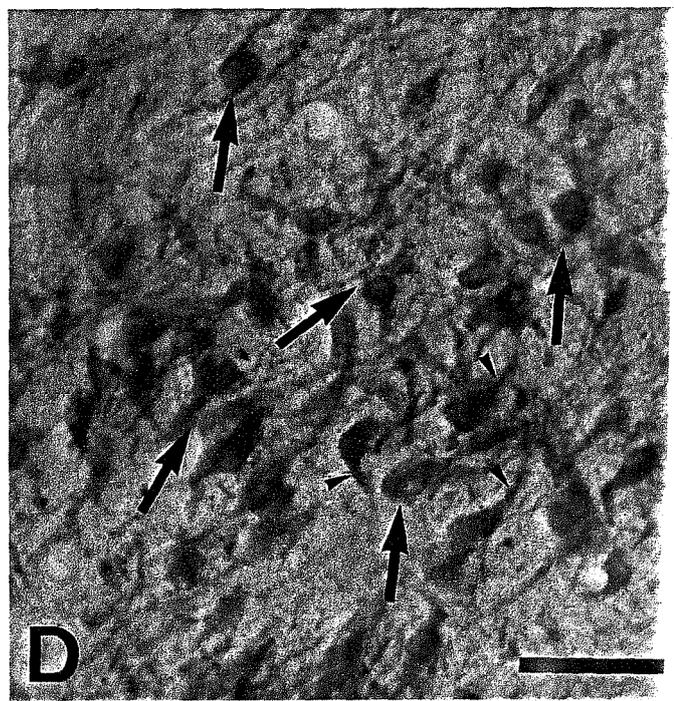
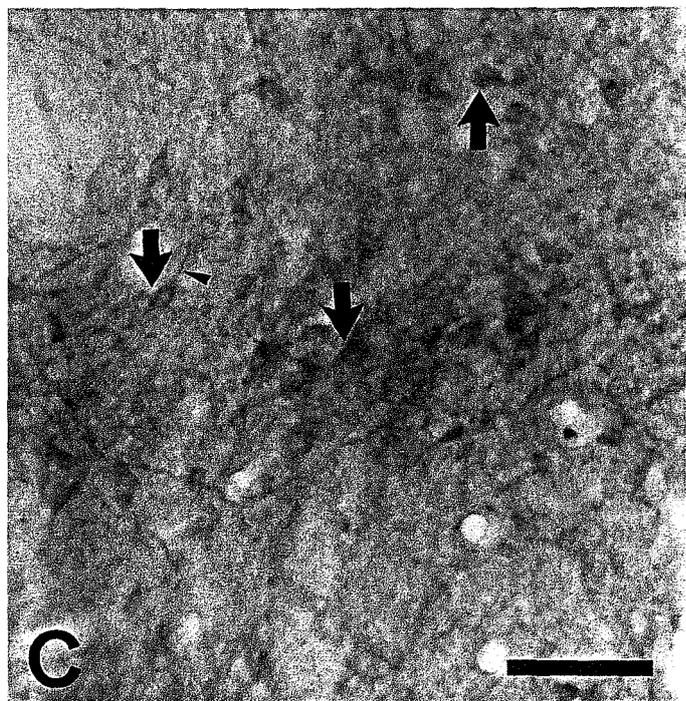
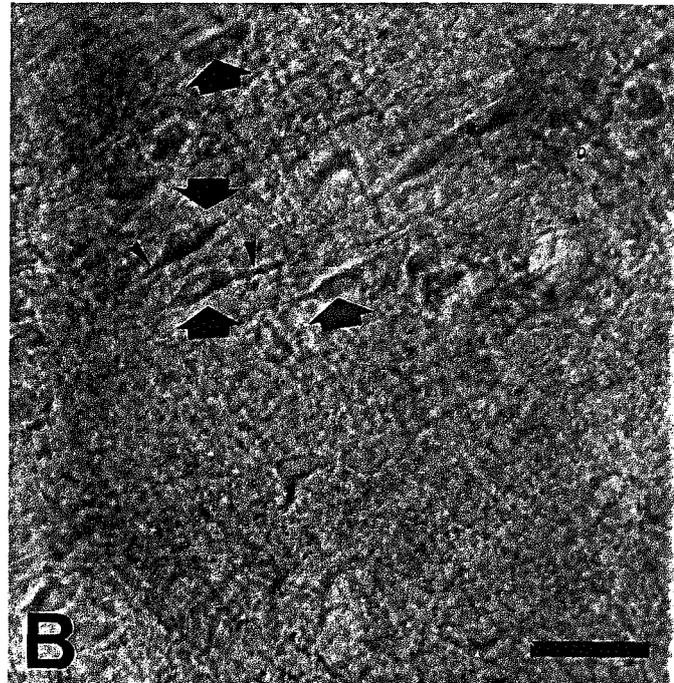
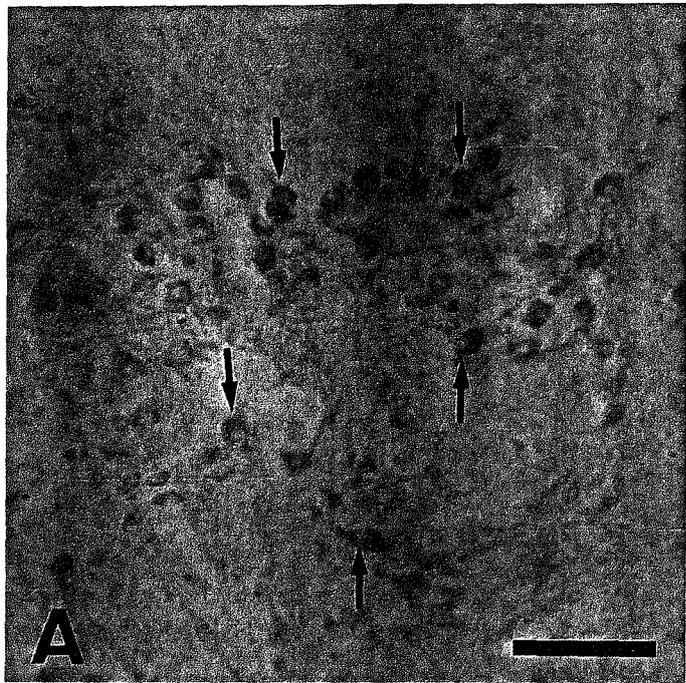


Fig. 16- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de tartaruga *Trachemys dorbigni*, adulta, mostrando diversas regiões positivas ao procedimento histoquímico da citocromo oxidase. **A:** Positividade na região do torus semicircularis (TSC) e do núcleo mesencefálico do V par craniano (asterisco). **B:** Somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) de neurônios reativos da região da substância nigra. **C:** Atividade enzimática no soma (setas) e nos prolongamentos (cabeças de setas) de neurônios do núcleo reticular inferior. **D:** Atividade citocromo oxidase nos somas (setas) e nos prolongamentos (cabeça de seta) neuronais do núcleo vestibular lateral. **E:** Somas (setas) e prolongamentos (cabeça de seta) de neurônios reativos localizados no núcleo inferior da rafe. **F:** Reação positiv nos somas (setas) e nos prolongamentos (cabeças de setas) de neurônios fusiformes do núcleo do XII par craniano. Barras de calibração: A: 200  $\mu\text{m}$ ; B: 70  $\mu\text{m}$ ; C-F: 30  $\mu\text{m}$ .

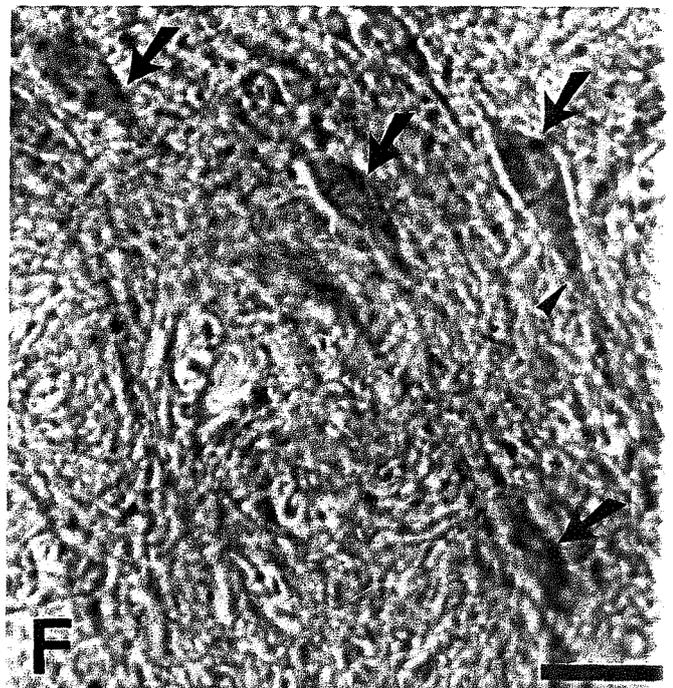
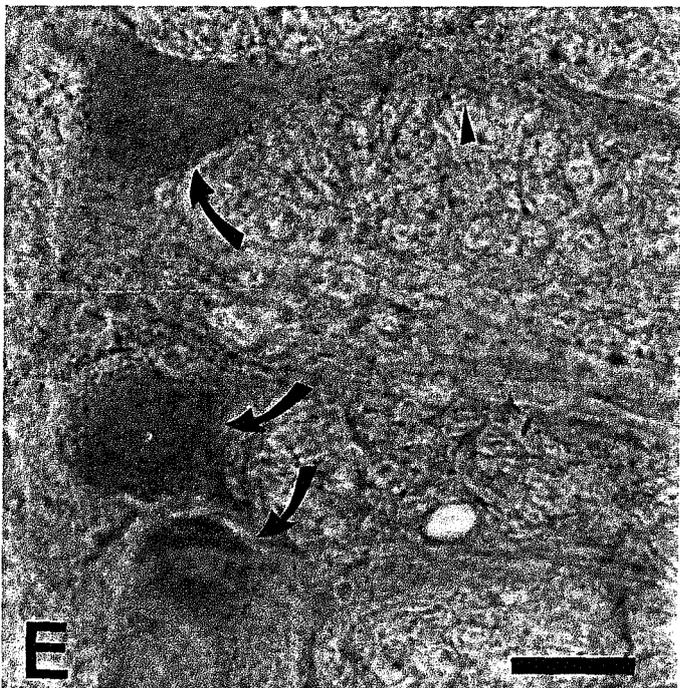
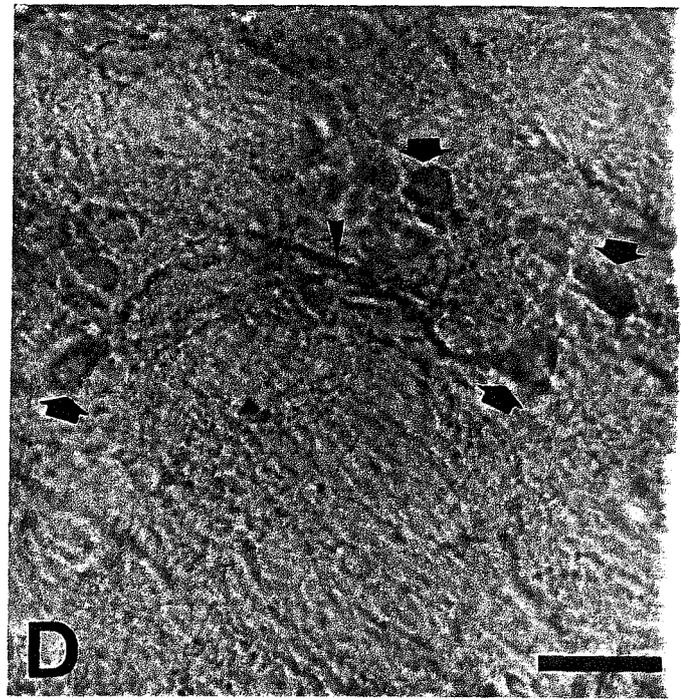
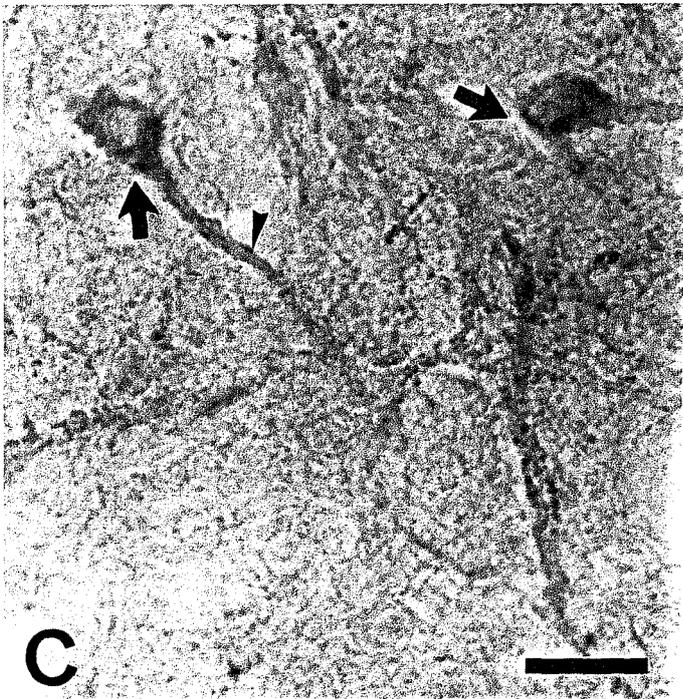
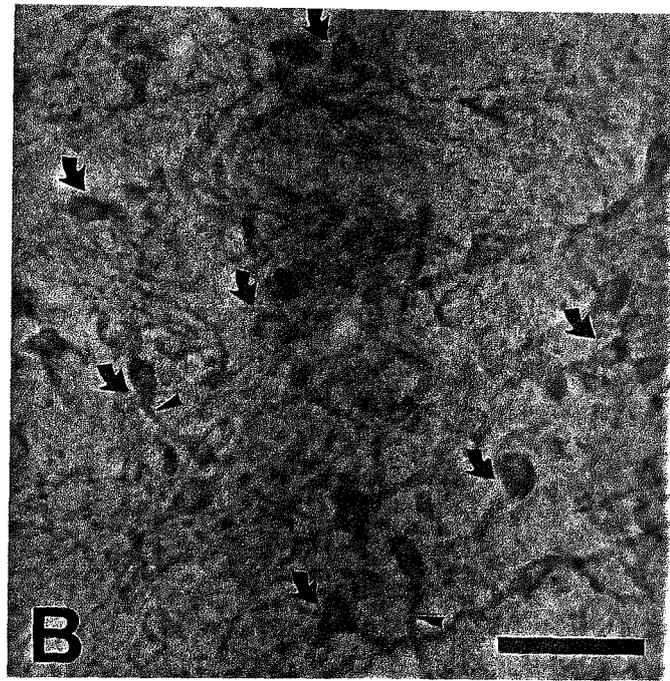
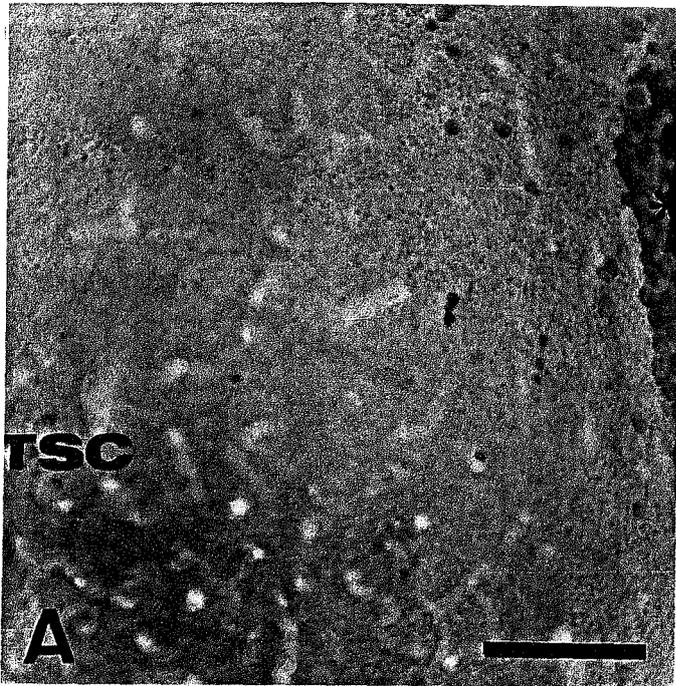


Fig. 17- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo e da medula espinal cervical alta de tartaruga *Trachemys dorbigni*, adultas, mostrando diversas regiões reativas ao procedimento histoquímico da citocromo oxidase. **A:** Reação positiva nas camadas granular (asterisco), molecular (estrela) e de células de Purkinje (setas) do cerebelo. Nesta última camada, a atividade também é observada nos prolongamentos (cabeças de setas) destas células. **B:** Neurônios positivos no núcleo profundo medial do cerebelo (setas). **C:** Reação enzimática no corno ventral (asterisco) e no núcleo marginal (seta) da medula espinal cervical alta. **D:** Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior mostrando a reatividade nos somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) de motoneurônios do corno ventral da medula espinal. **E:** Detalhe em maior aumento da fotomicrografia C ressaltando a atividade citocromo oxidase nos somas neuronais do núcleo marginal. **F:** Somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) de neurônios fusiformes localizados no funículo lateral da medula espinal. Barras de calibração: A, B, D, F: 70  $\mu\text{m}$ ; C: 200  $\mu\text{m}$ ; E: 30  $\mu\text{m}$ .

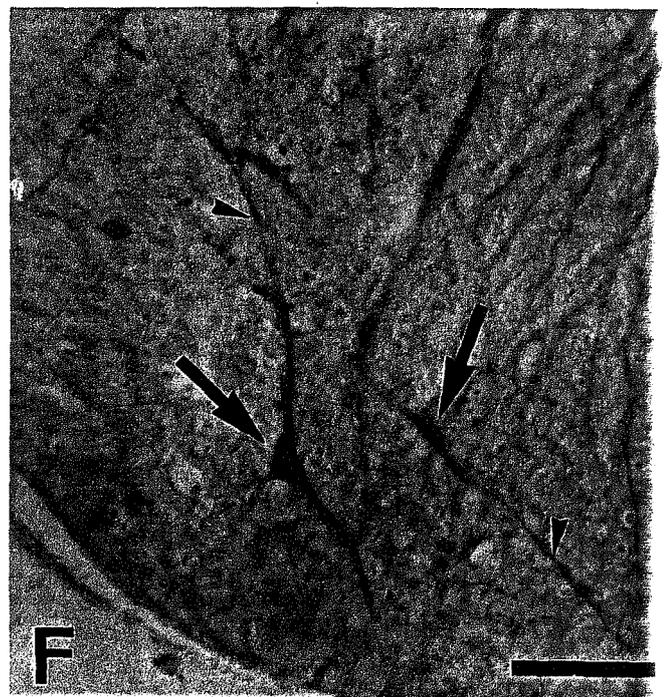
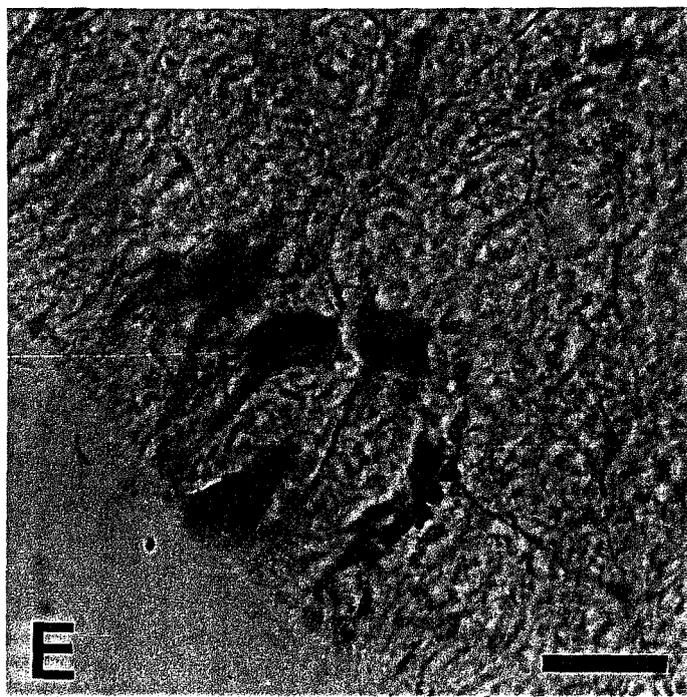
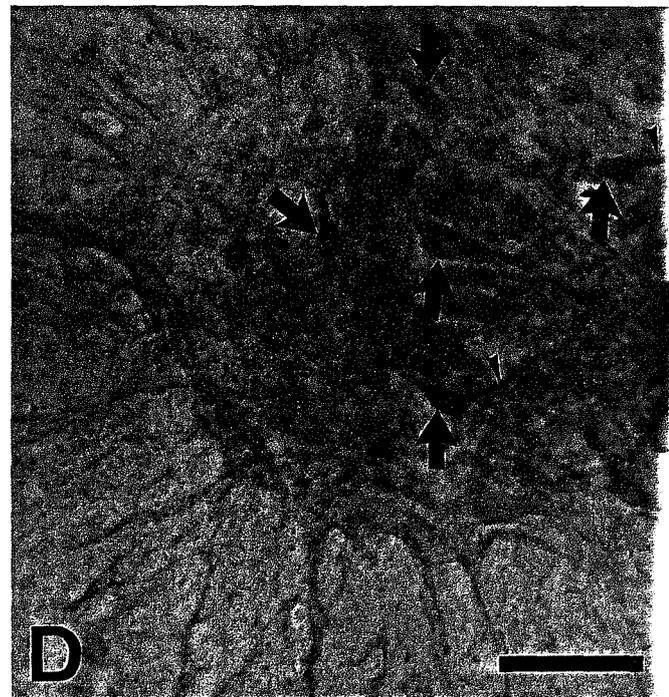
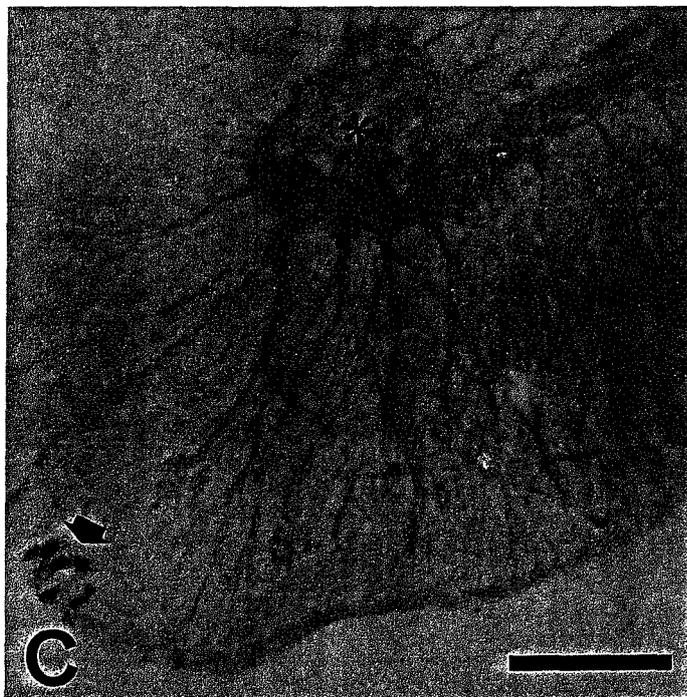
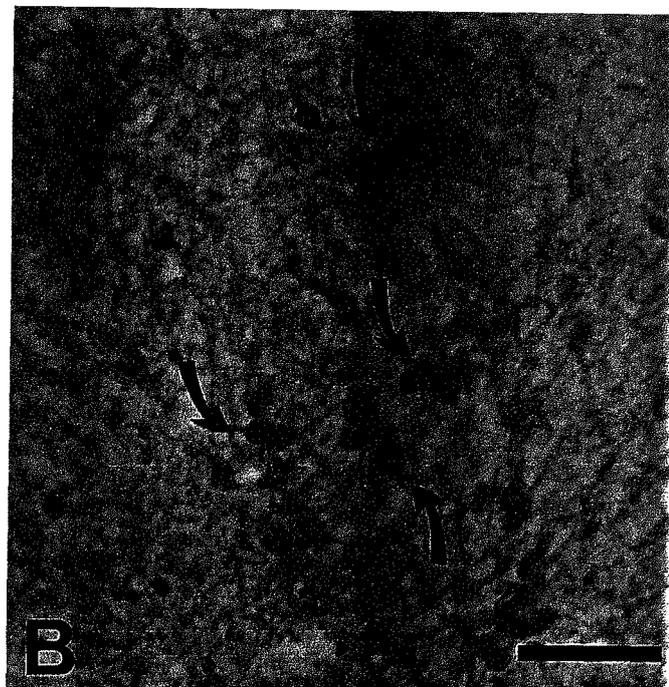
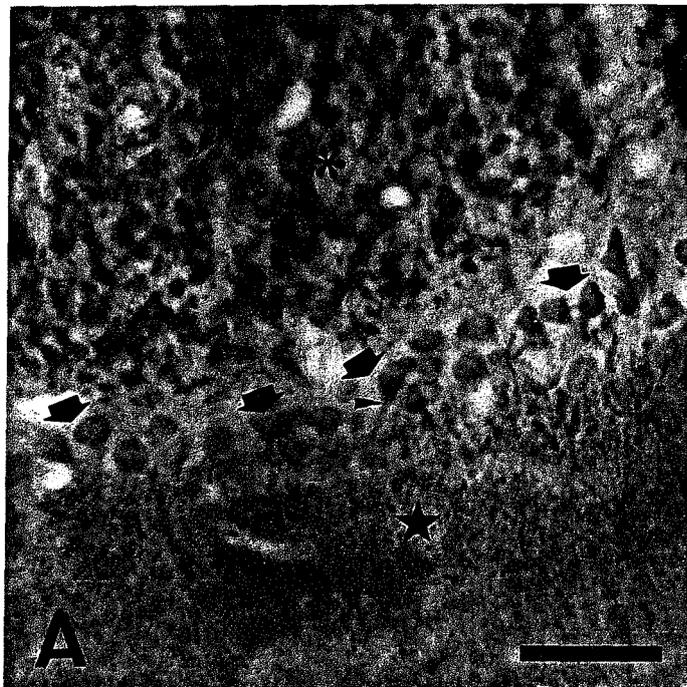


Fig. 18- Representação esquemática de secções coronais do encéfalo da tartaruga *Trachemys dorbigni* mostrando as regiões positivas ao procedimento histoquímico da NADPH-diaforase (●). **A:** Bulbo Olfatório; **B-G:** Telencéfalo e Diencefalo; **H:** Telencéfalo e Mesencéfalo; **I:** Mesencéfalo. A- núcleo accumbens; ADVR- eminência ventricular dorsal anterior do telencéfalo; BDVR- eminência ventricular dorsal basal do telencéfalo; D- córtex dorsal; DM- córtex médio dorsal; GCL- camada de células granulares; GL- camada glomerular; IP- núcleo interpeduncular; LFB- fascículo prosencefálico lateral; LH- núcleo habenular lateral; LS- núcleo septal lateral; M- córtex medial; ME- eminência média; MFB- fascículo prosencefálico medial; ML- camada de células mitrais; mM- núcleo supramamilar medial; MS- núcleo septal medial; nAC- núcleo da comissura anterior; nEP- núcleo entopeduncular; nPH- núcleo periventricular hipotalâmico; nPM- núcleo profundo do mesencéfalo; nSP- núcleo suprapeduncular; nVH- núcleo médio ventral hipotalâmico; Ru- núcleo rubro; SN- substância nigra; So- núcleo supraóptico; OC- quiasma óptico; OT- tracto óptico; P- córtex piriforme; Pd- pedúnculo dorsal do fascículo prosencefálico lateral; PGS- camada cinzenta periventricular; PH- primórdio de hipocampo; Po- área pre-óptica; PV- núcleo paraventricular hipotalâmico; Pv- pedúnculo ventral do fascículo prosencefálico lateral; R- núcleo rotundus; Str- estriado; Tel- telencéfalo; TSC- torus semicircularis; TuOl- tubérculo olfatório; VTA- área tegmental ; 3n- III nervo craniano.

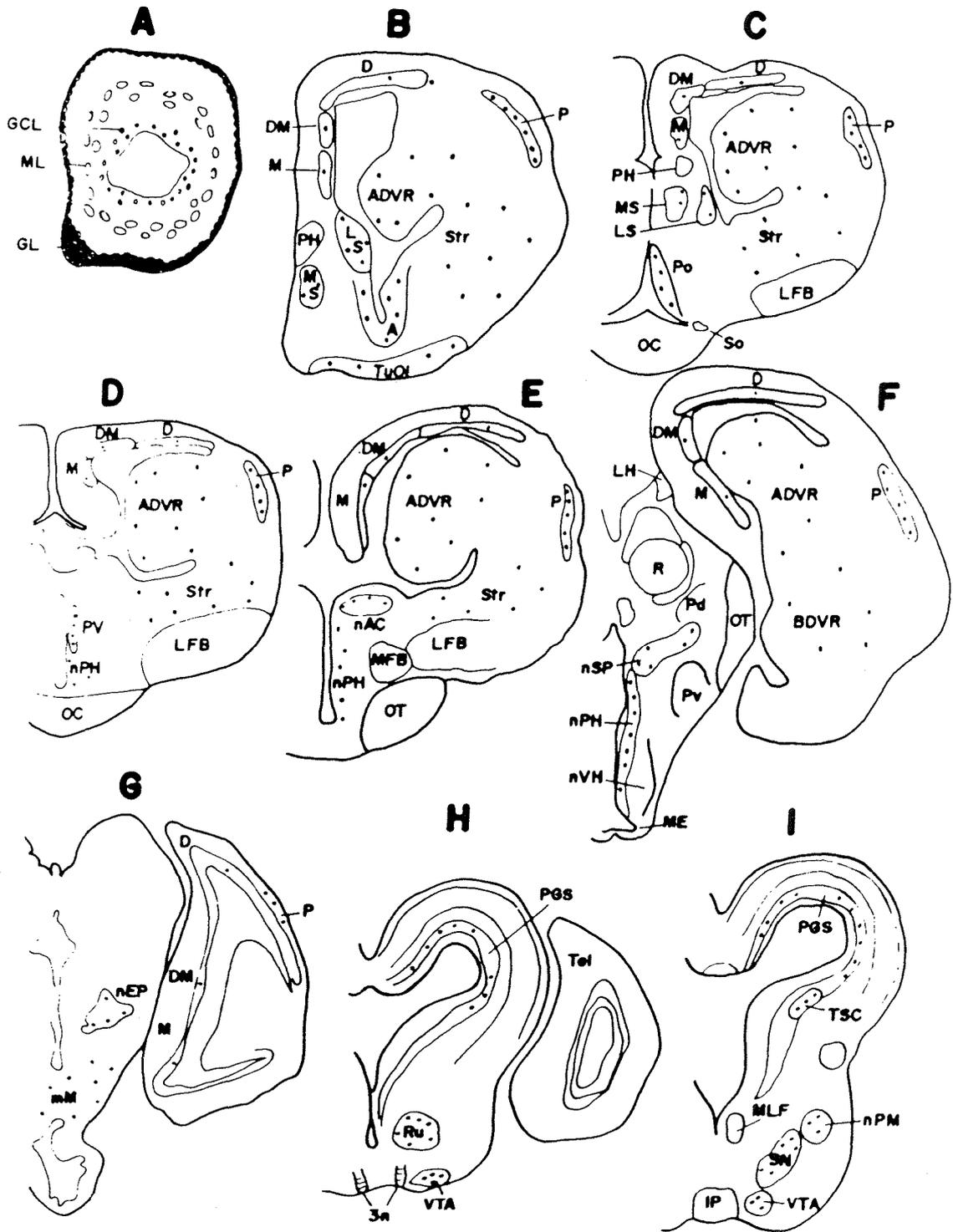


Fig. 19- Representação esquemática de secções coronais do encéfalo e da medula espinal cervical alta da tartaruga *Trachemys dorbigni* mostrando as regiões positivas ao procedimento histoquímico da NADPH-diaforase (●). **J-O**: Medulla Oblonga; **P**: Medula Espinal. Cb- cerebelo; CN- neurônios comissurais; Co- núcleo coclear; DGM- substância cinzenta dorsal; DTT- núcleo descendente do V par craniano; Dve- núcleo vestibular descendente; GCL- camada de células granulares; Lcb- núcleo cerebelar lateral; LVe- núcleo vestibular lateral; ML- camada molecular; MLF- fascículo longitudinal medial; mV- núcleo motor do V par craniano; nAmb- núcleo ambíguo; nTS- núcleo do trato solitário; nVI- núcleo do VI par craniano; nVII- núcleo do VII par craniano; nVH- núcleo médio ventral hipotalâmico; nX- núcleo do X par craniano; nXII- núcleo do XII par craniano; OI- oliva inferior; PrV- núcleo principal do V par craniano; Ri- núcleo reticular inferior; Rm- núcleo reticular medial; Rs- núcleo reticular superior; Sve- núcleo vestibular superior; VGM- substância cinzenta ventral.

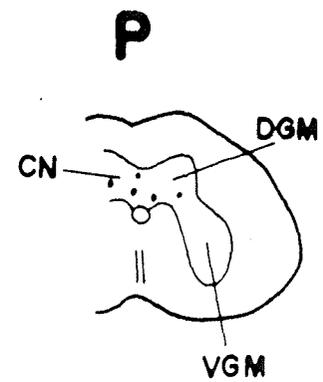
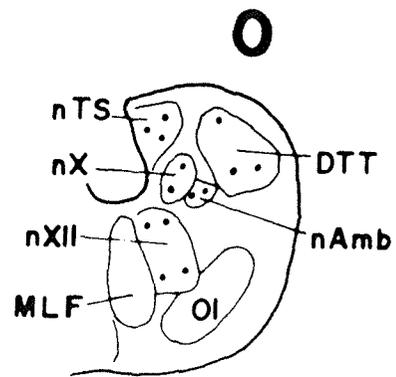
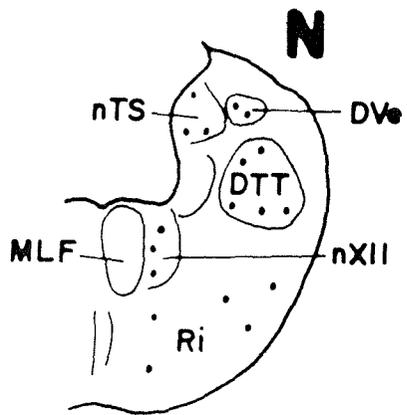
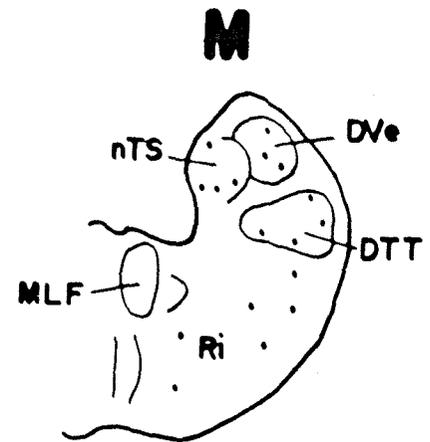
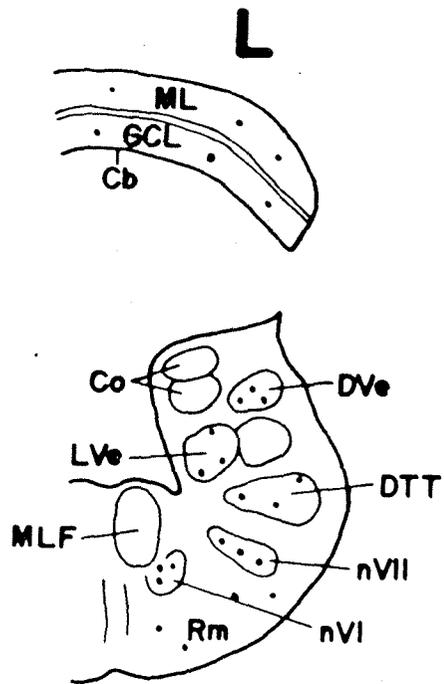
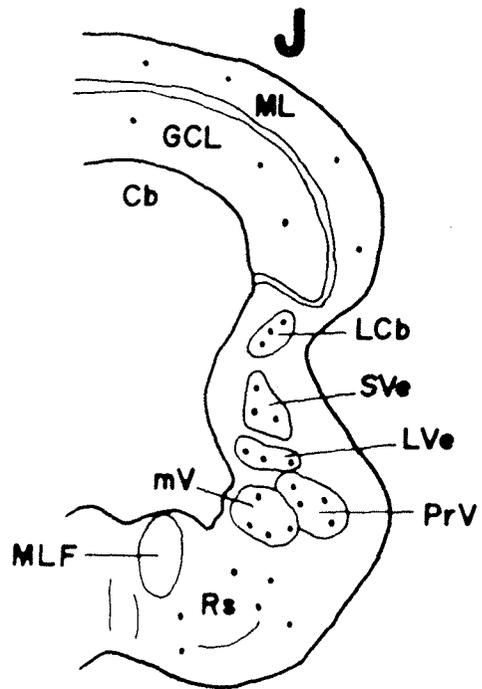


Fig. 20- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de tartaruga *Trachemys dorbigni*, adultas, mostrando atividade NADPH-diaforase. **A:** Reação positiva na camada glomerular (setas) e em neurônios da camada granular interna (asterisco) do bulbo olfatório. **B:** Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior mostrando a positividade dos somas (setas) e dos prolongamentos (cabeça de seta) das células da camada granular interna. **C:** Atividade NADPH-diaforase em somas neuronais localizados no núcleo accumbens (setas). **D:** Reatividade em somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) de neurônios do tubérculo olfatório. **E:** Reação positiva no soma (seta vazada) e nos prolongamentos (setas cheias) de neurônios da eminência ventricular dorsal do telencéfalo. **F:** Atividade positiva em neurônio localizado na região do estriado. Barras de calibração: A: 200  $\mu\text{m}$ ; B: 30  $\mu\text{m}$ ; C-E: 70  $\mu\text{m}$ ; F: 10  $\mu\text{m}$ .

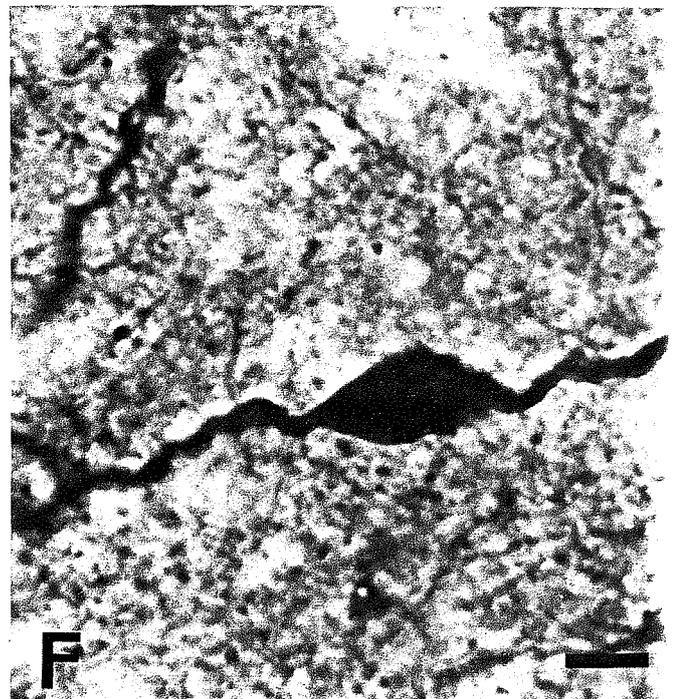
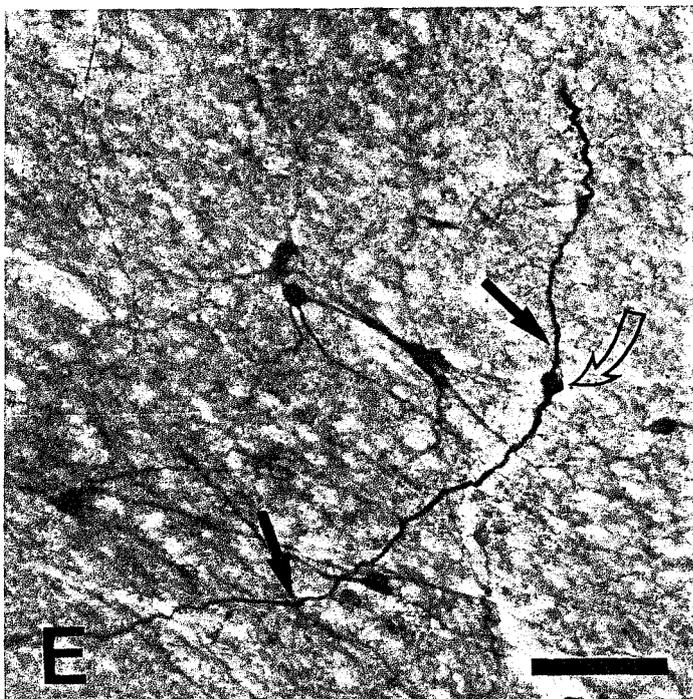
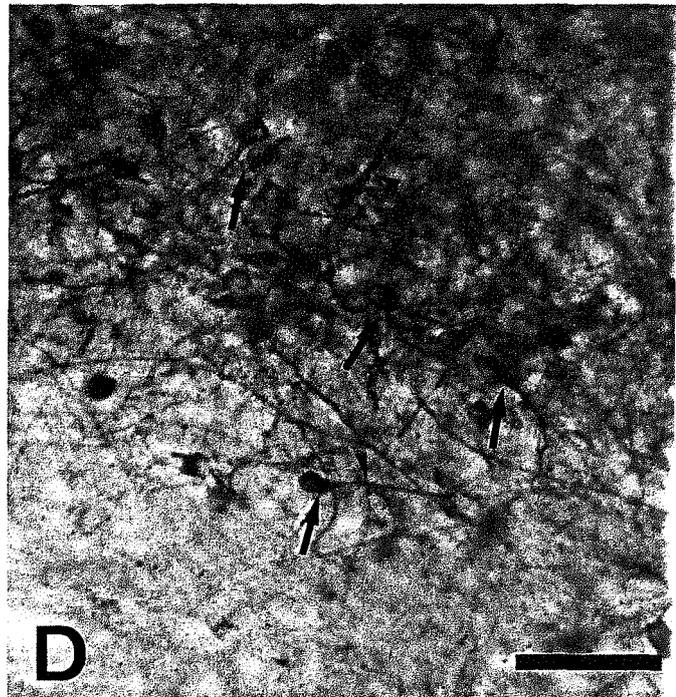
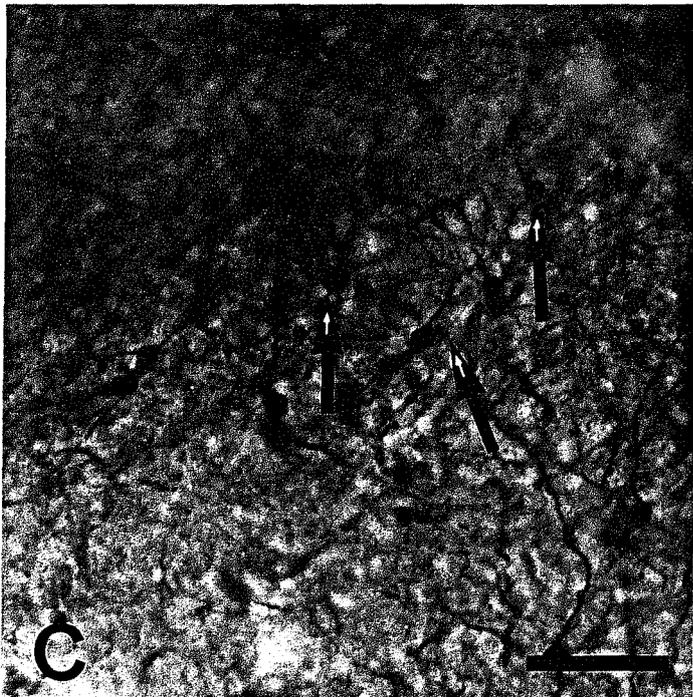
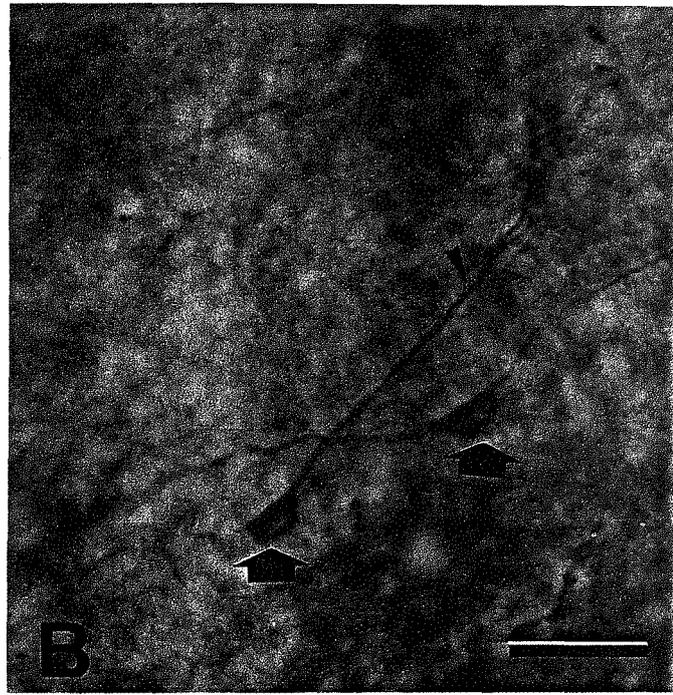
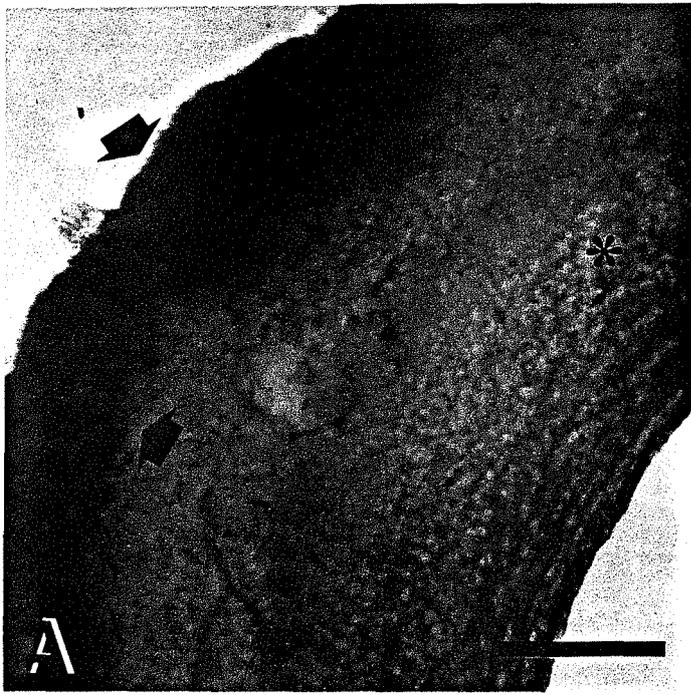


Fig. 21- Fotomontagem de uma secção coronal do telencéfalo de tartaruga *Trachemys dorbigni* adulta mostrando a distribuição da atividade NADPH-diaforase em neurônios (setas) localizados nas regiões da eminência ventricular dorsal anterior (**ADVR**), do estriado (**Str**) e do córtex piriforme (**C**). **V**: Ventrículo lateral. Barra de calibração: 200  $\mu$ m.

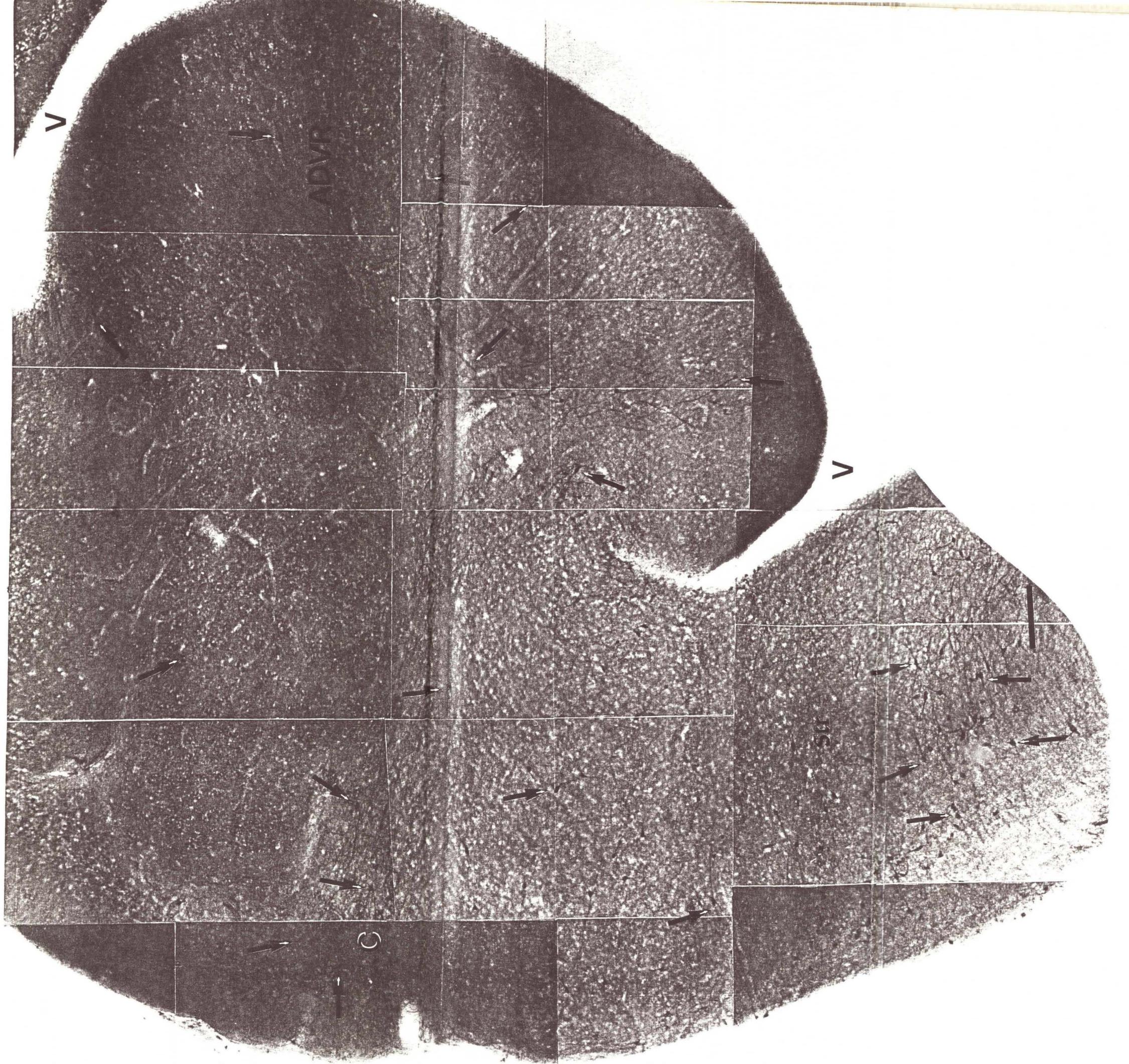


Fig. 22- Fotomontagem do córtex médio dorsal de tartarugas *Trachemys dorbigni* adulta (**A**) e *Pseudemys scripta elegans* jovem (**B**) mostrando a distribuição da atividade NADPH-diaforase em neurônios piramidais (setas curvas cheias) e nos prolongamentos em forma de rosário (setas curvas vazadas da figura B) da camada molecular. Barras de calibração: A: 70  $\mu\text{m}$ ; B: 30  $\mu\text{m}$ .

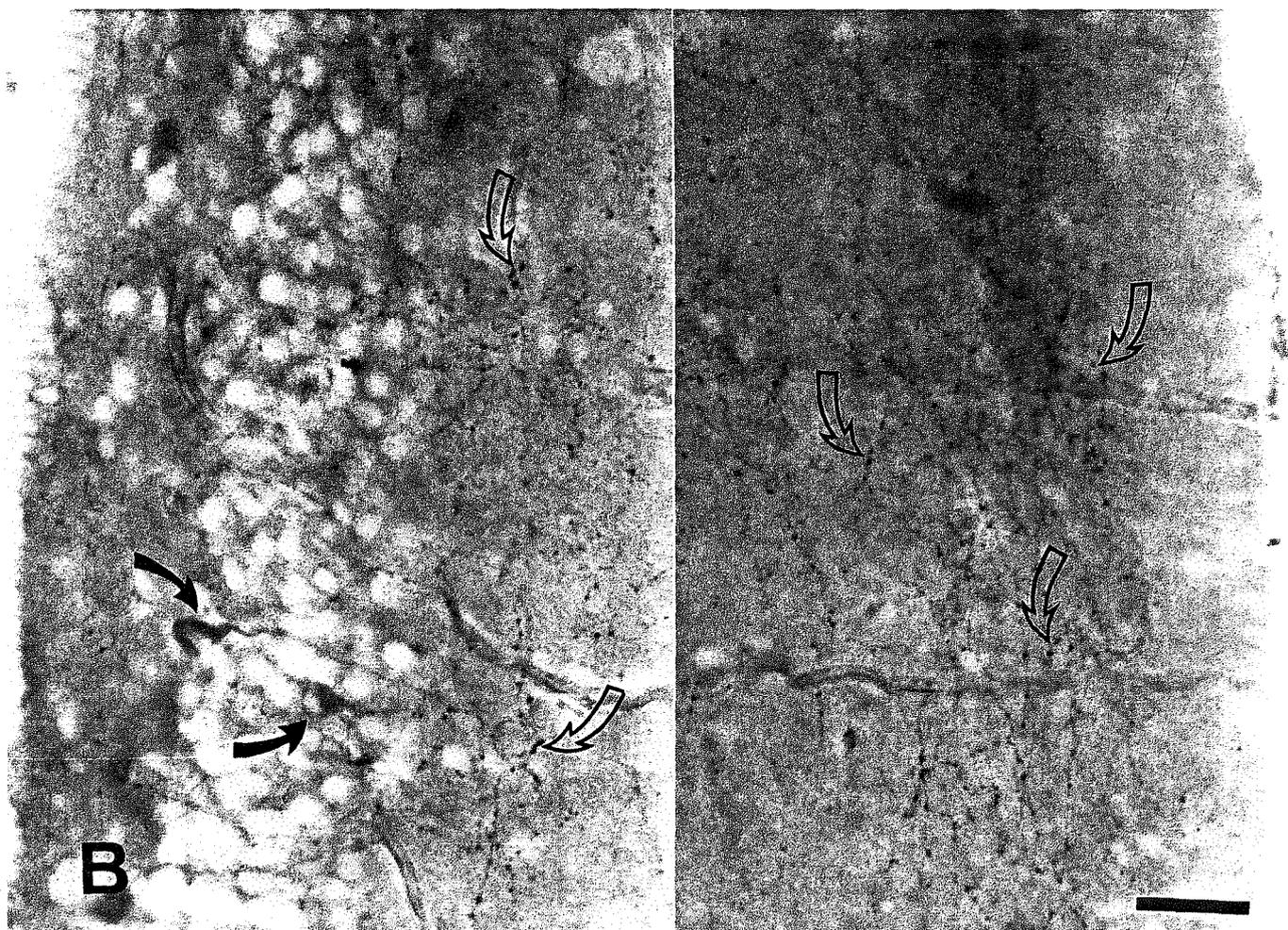
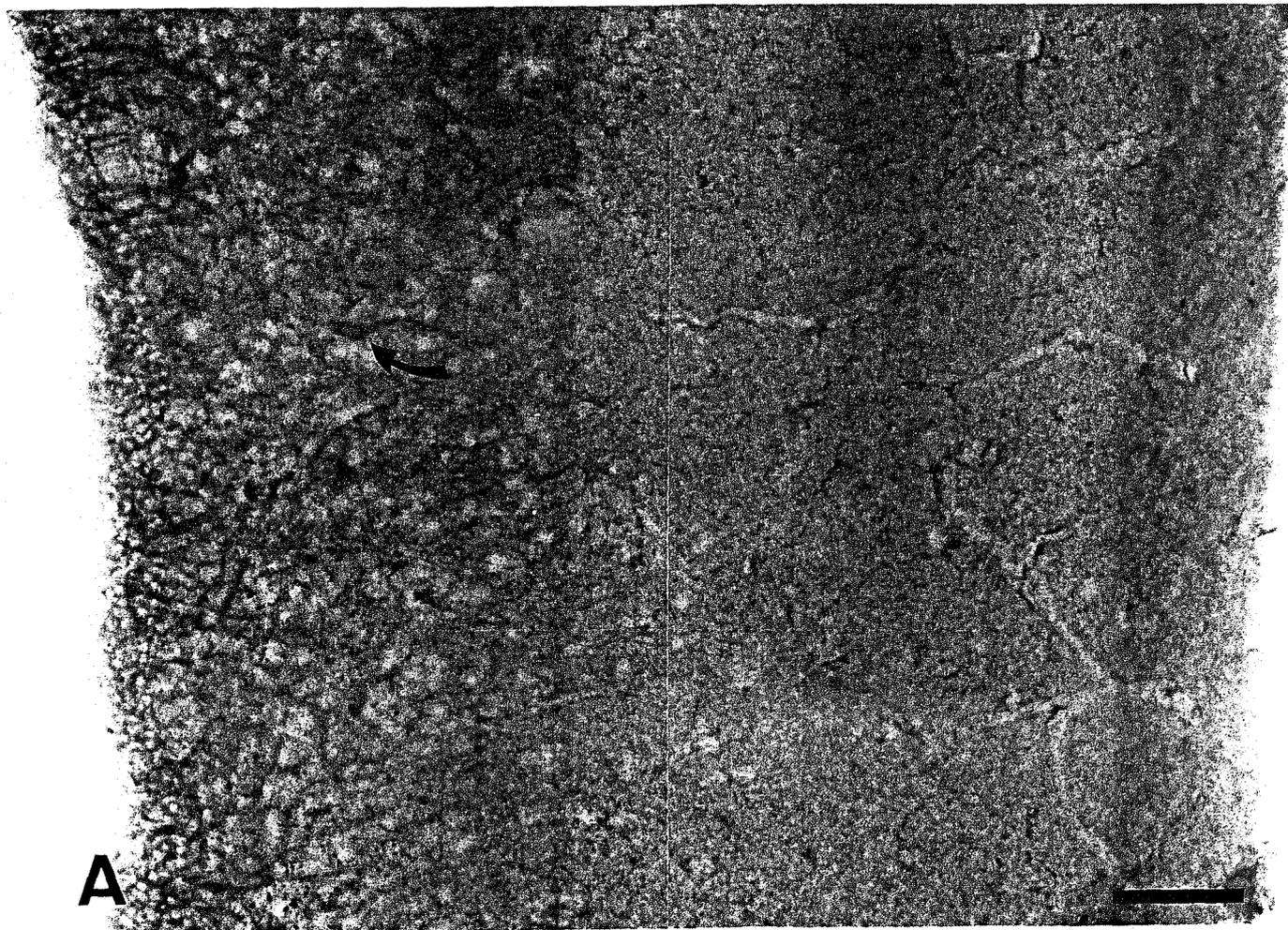


Fig. 23- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de tartaruga *Trachemys dorbigni*, adulta, mostrando regiões positivas ao procedimento histoquímico da NADPH-diaforase. **A:** Positividade em neurônios localizados no núcleo periventricular hipotalâmico (setas). **B:** Somas neuronais reativos na região do hipotálamo lateral. **C:** Somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) de neurônios positivos no núcleo supramamilar. **D:** Reação NADPH-diaforase em células nervosas localizadas na camada cinzenta periventricular (setas) do tecto óptico. **E:** Reatividade em somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) de neurônios do núcleo rubro. **F:** Neurônio positivo na região da substância nigra. Barras de calibração: A-C: 30  $\mu\text{m}$ ; D: 70  $\mu\text{m}$ ; E: 200  $\mu\text{m}$ ; F: 10  $\mu\text{m}$ .

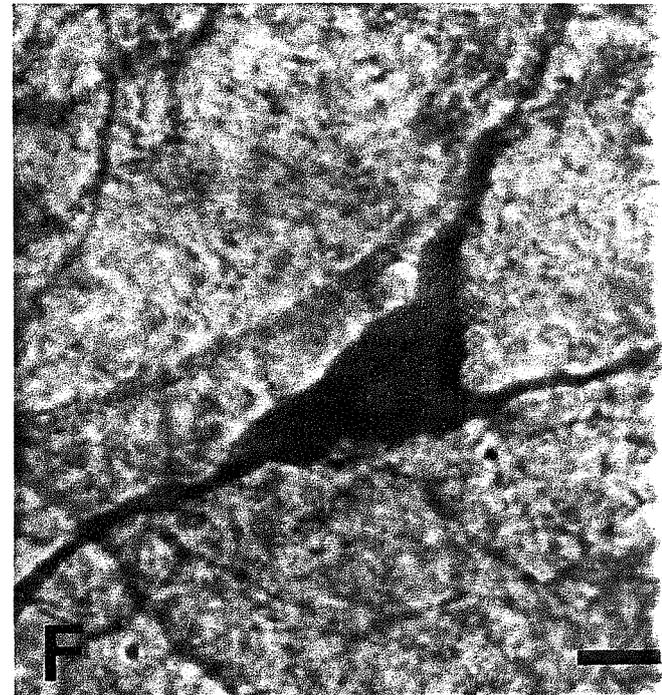
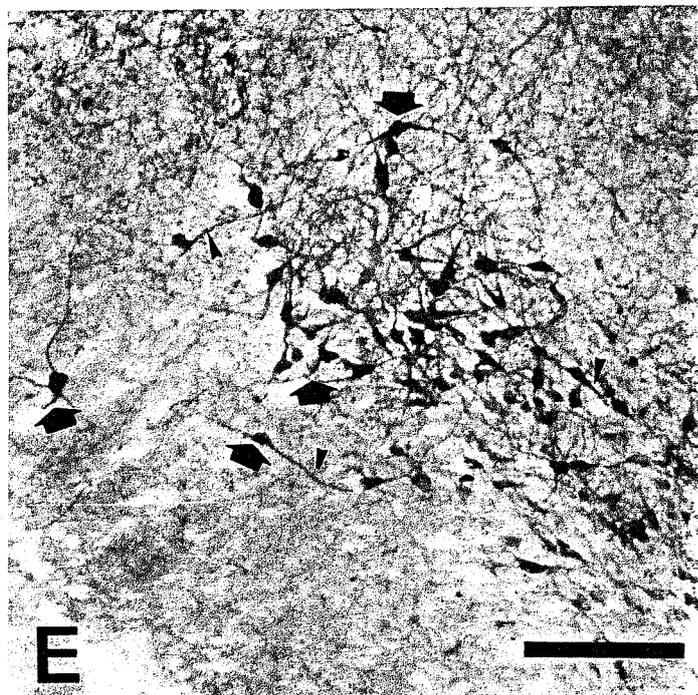
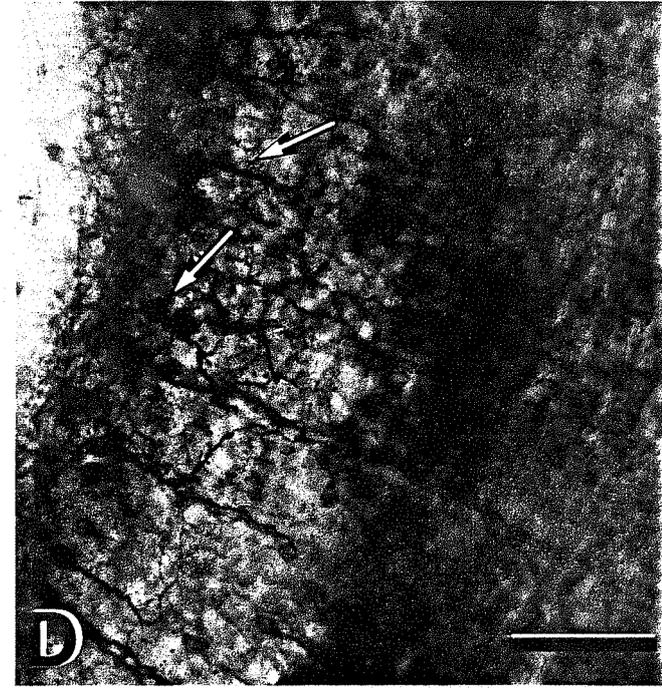
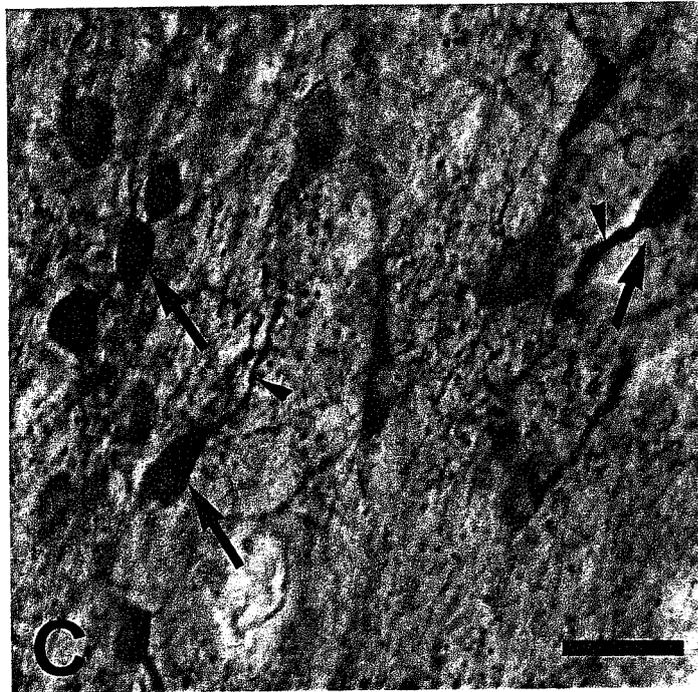
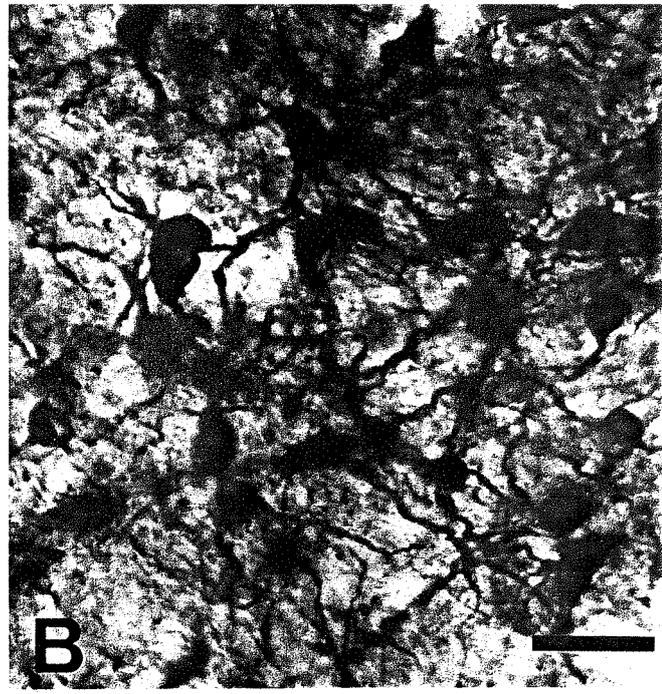
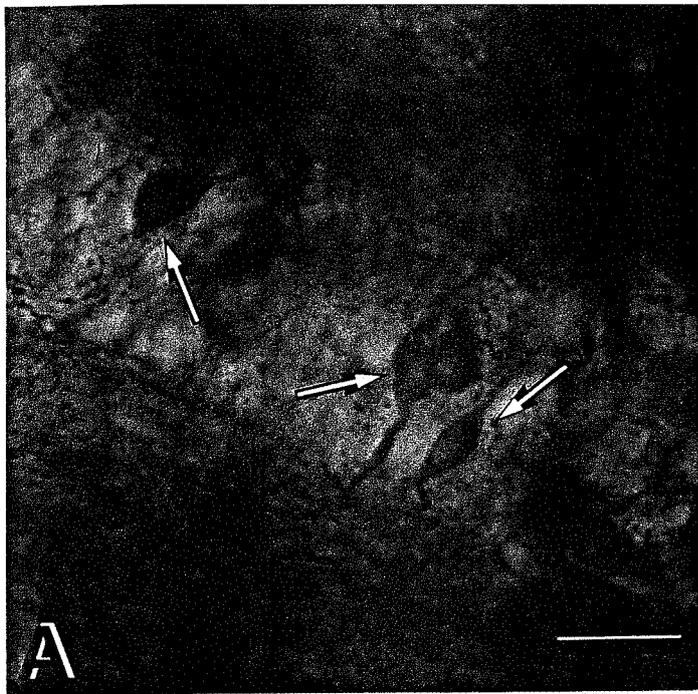


Fig. 24- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo e da medula espinal cervical alta de tartaruga *Trachemys dorbigni*, adulta, mostrando diversas regiões reativas ao procedimento histoquímico da NADPH-diaforase: **A**: Reação positiva em somas (setas) e prolongamentos (cabeça de seta) do locus coeruleus. **B**: Somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) positivos localizados no núcleo profundo lateral do cerebelo. **C**: Atividade NADPH-diaforase em neurônios do núcleo do XII par craniano. **D**: Neurônio positivo no núcleo reticular inferior. **E**: Somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) reativos no núcleo do trato solitário. **F**: Reação positiva em somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) neuronais da coluna lateral do corno dorsal da medula espinal cervical alta. Barras de calibração: A: 200  $\mu\text{m}$ ; B, C, F: 70  $\mu\text{m}$ ; D-E: 30  $\mu\text{m}$ .

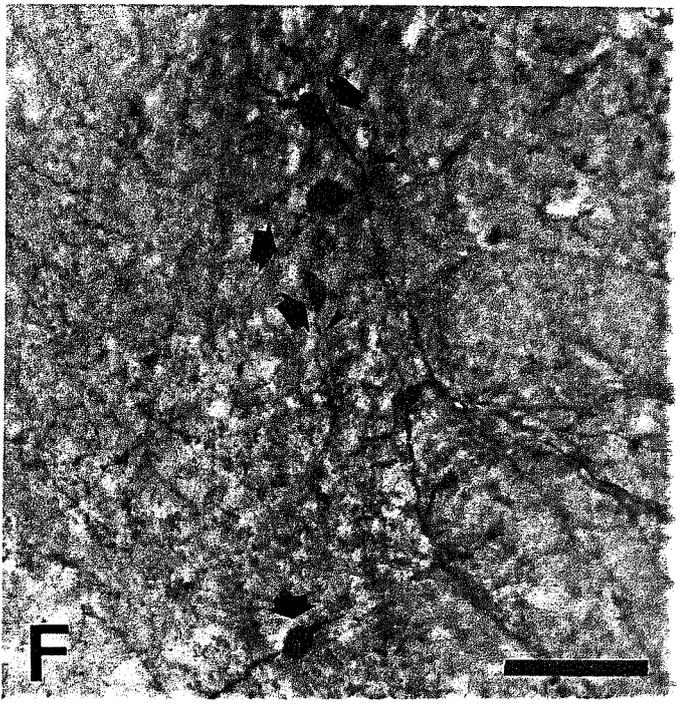
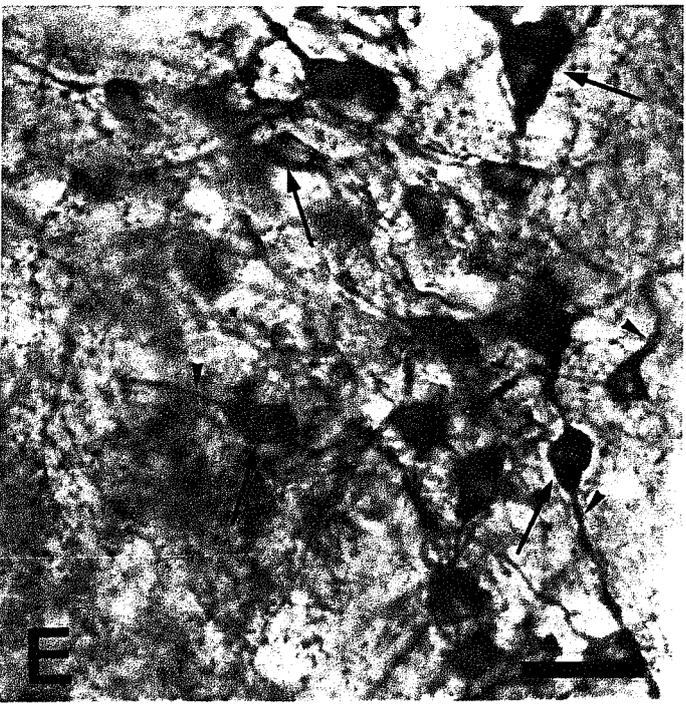
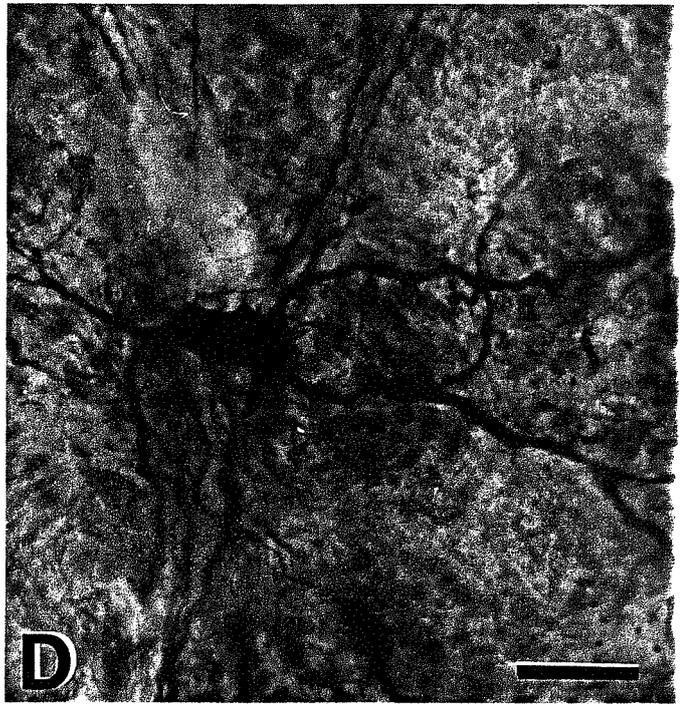
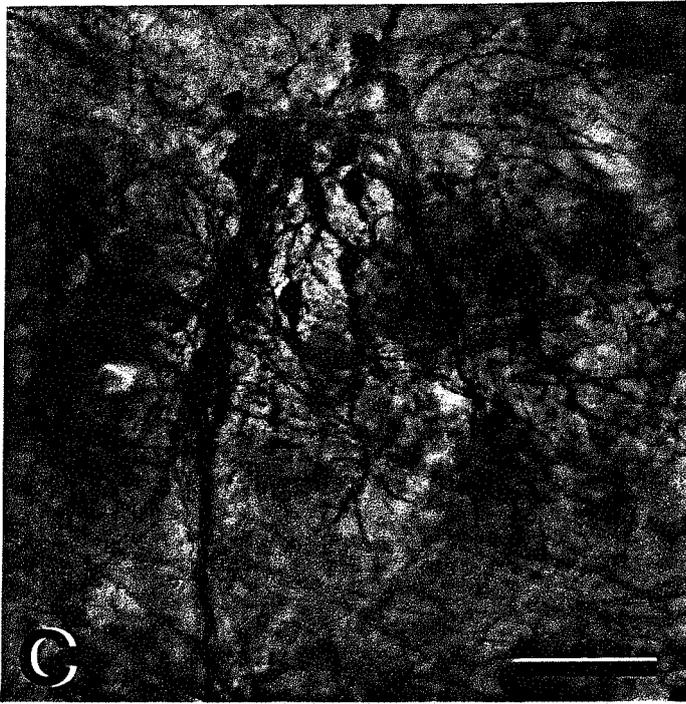
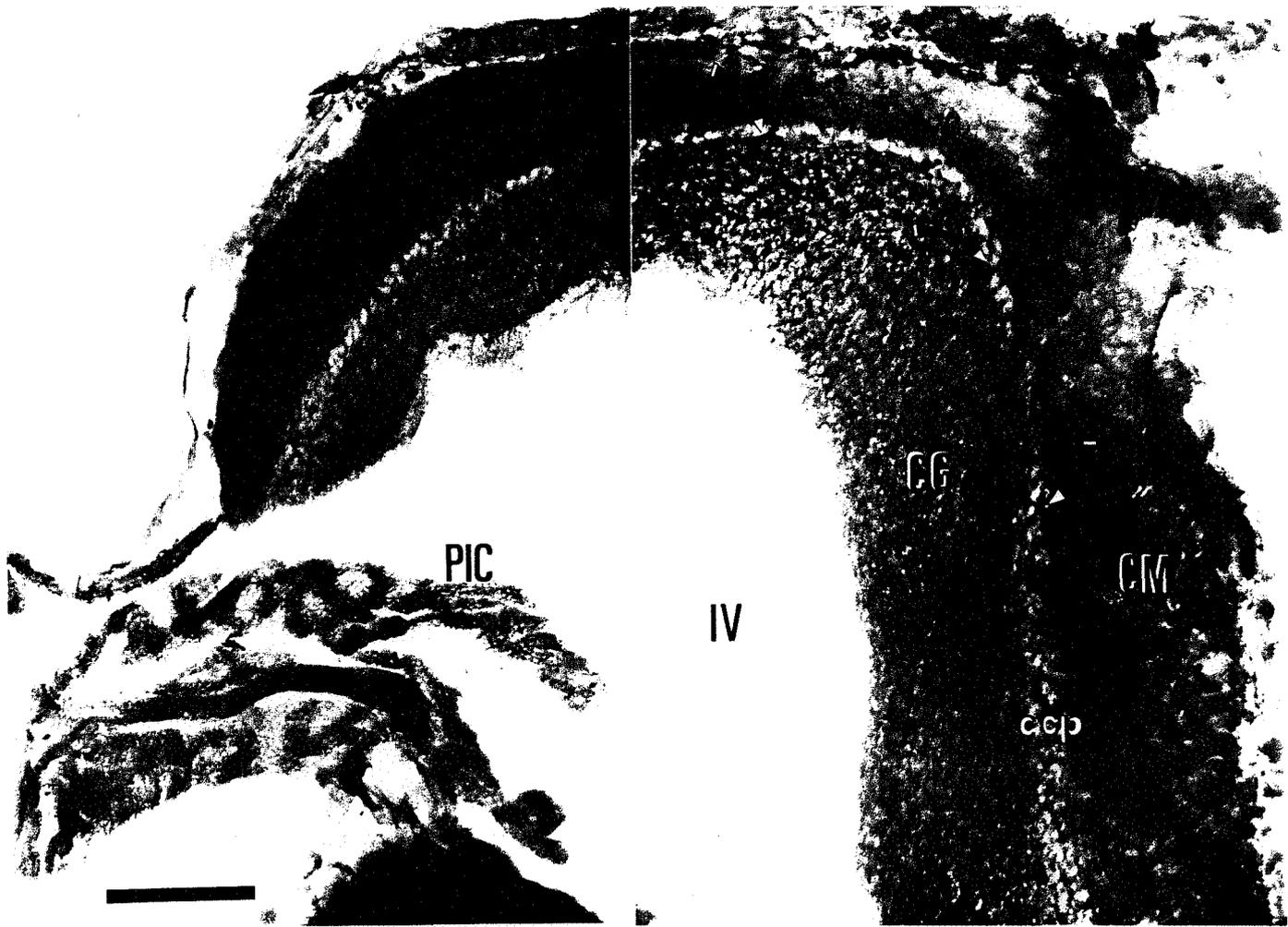


Fig. 25- Fotomontagem do cerebelo de tartarugas *Pseudemys scripta elegans* jovem (**A**) e *Trachemys dorbigni* adulta (**B**) mostrando a reação NADPH-diaforase nas camadas granular (**CG**) e molecular (**CM**). As células de Purkinje foram negativas a este tratamento histoquímico, mas pode-se observar a presença de prolongamentos positivos formando cestas em volta do soma destas células (setas) em ambas as espécies de tartarugas. **PIC**: Plexo coriódio; **IV**: Quarto ventrículo. Barra de calibração: 200  $\mu$ m.



**A**



**B**

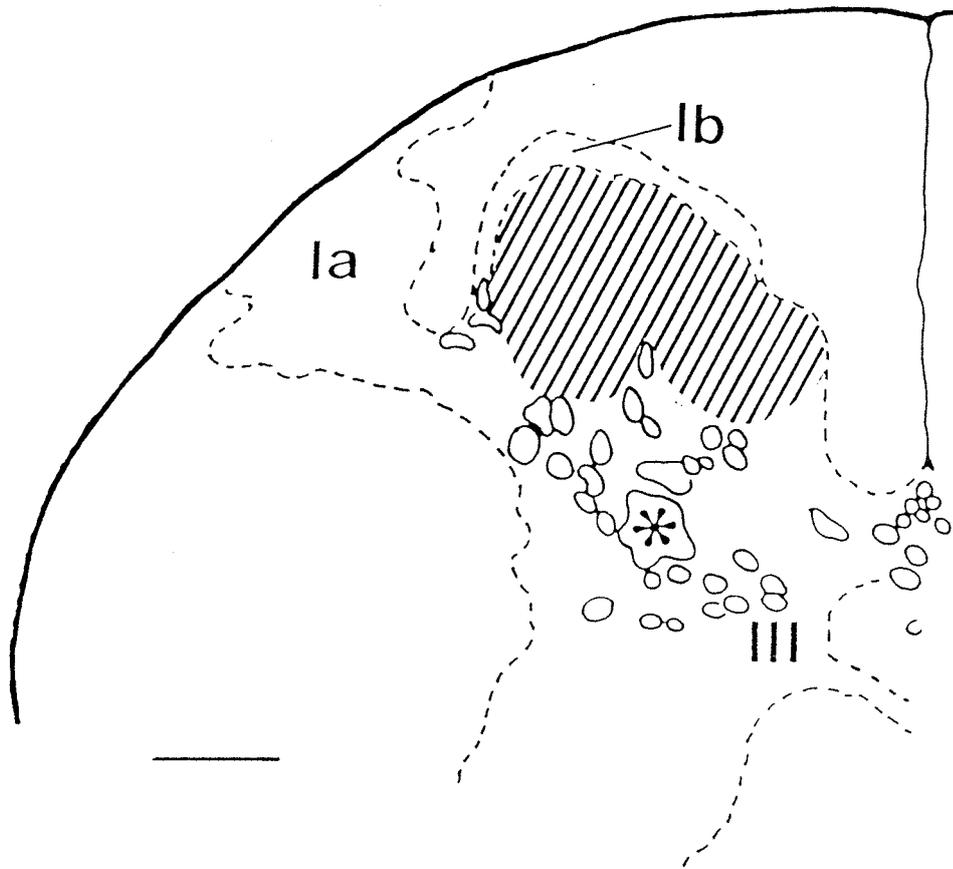


Fig. 26- Representação esquemática de secção da medula espinal de tartaruga mostrando a disposição das áreas Ia, Ib e III, e de somas neuronais de pequenos e médios diâmetros (círculos pequenos), e de neurônios gigantes (asterisco). A área hachurada representa a área II. Barra de calibração: 50  $\mu$ m. (Obtido do trabalho de FERNANDEZ et al., 1993).

Fig. 27- Fotomontagem de secções coronais do corno dorsal da medula espinal cervical alta de tartaruga *Trachemys dorbigni* adulta mostrando o padrão de distribuição da atividade NADPH-diaforase nas áreas **Ia**, **Ib**, **II** e **III** desta região medular. A positividade desta enzima também está presente em neurônios da comissura dorsal (**CDC**) e da coluna lateral do corno dorsal (**LCDH**), além das células endimárias do canal central (**CC**). A seta cheia indica a presença de reação positiva em neurônio radial, enquanto a seta vazada aponta um neurônio gigante reativo, cujo prolongamento parece dirigir-se ao lado contralateral. Barra de calibração: 70  $\mu$ m.



Ia

Ib

II

III

CDC

LCDH



Fig. 28- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem mostrando diversas regiões positivas ao procedimento histoquímico da glicogênio fosforilase. **A:** Reação positiva em neurônios piramidais (setas) do córtex medial. As camadas molecular (asterisco) e granular (estrela) não se apresentam reativas. **B:** Somas neuronais positivos na região da eminência ventricular dorsal do telencéfalo (setas). **C:** Atividade glicogênio fosforilase em neurônios localizados na região do estriado (setas). **D:** Reação enzimática em somas neuronais do núcleo geniculado ventral (setas). **E:** Neurônios reativos no núcleo rotundus (setas). **F:** Neurônios com atividade glicogênio fosforilase no hipotálamo periventricular (setas). **V:** Terceiro ventrículo. Barras de calibração: A, E, F: 70  $\mu\text{m}$ ; B, C, D: 30  $\mu\text{m}$ .

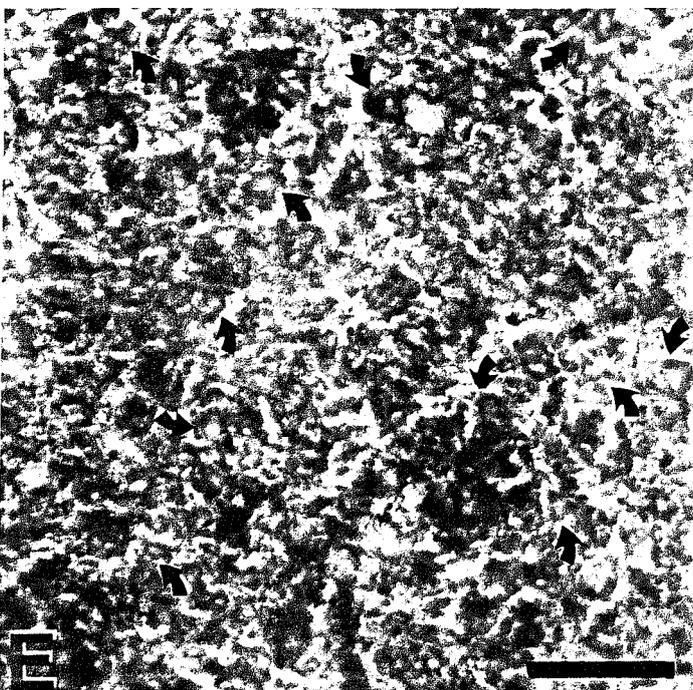
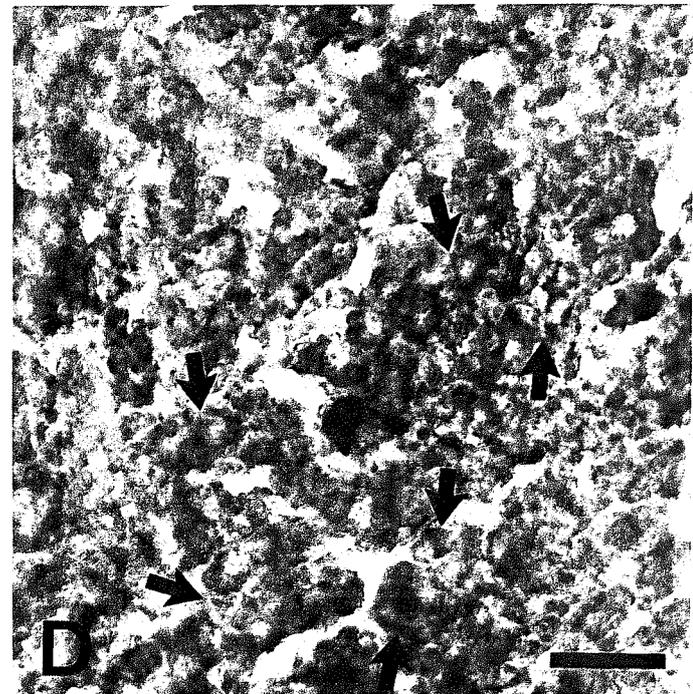
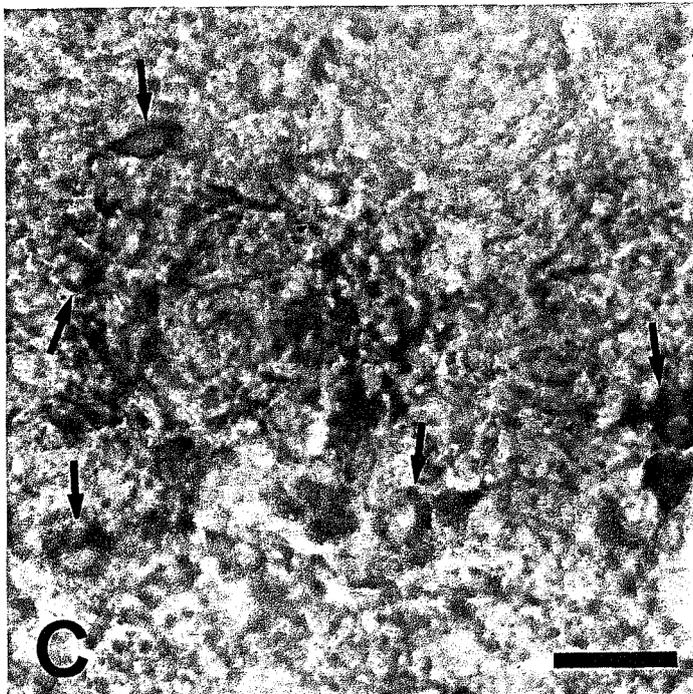
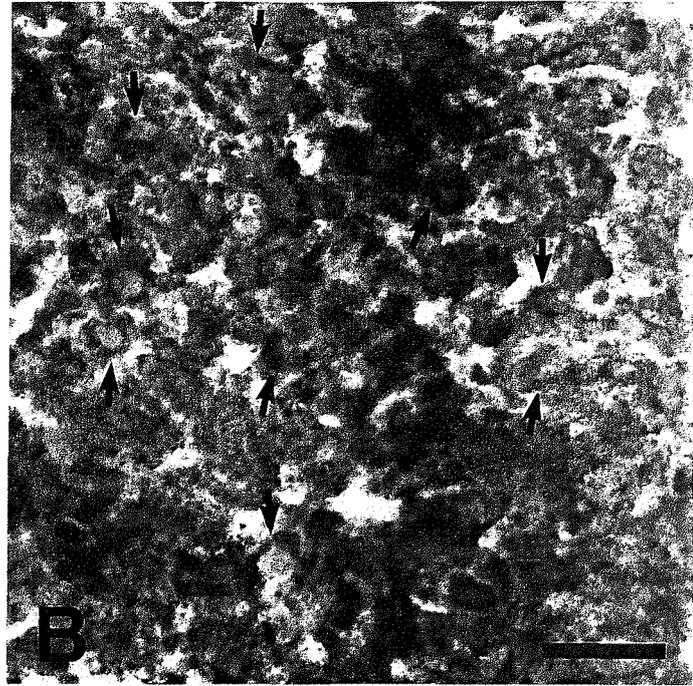
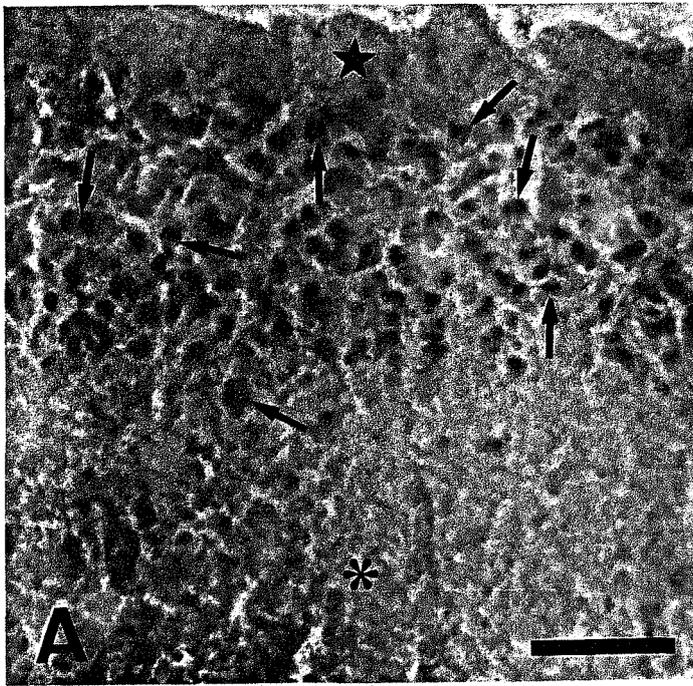


Fig. 29- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem mostrando diversas regiões reativas ao procedimento histoquímico da glicogênio fosforilase. **A:** Positividade em neurônios localizados na camada cinzenta central (setas) do tecto óptico. **B:** Neurônios reativos no núcleo mesencefálico do V par craniano (setas). **C:** Somas neuronais positivos no núcleo do III par craniano (setas). **D:** Reação glicogênio fosforilase em neurônios do núcleo do ístmo (setas). **E:** Atividade glicogênio fosforilase em neurônios da substância nigra (setas). **F:** Reação positiva em somas neuronais do locus coeruleus (setas vazadas). **FLM:** Fascículo Longitudinal Medial; **V:** Aqueduto de Silvio. Barras de calibração: A-D: 70  $\mu\text{m}$ ; E-F: 30  $\mu\text{m}$ .

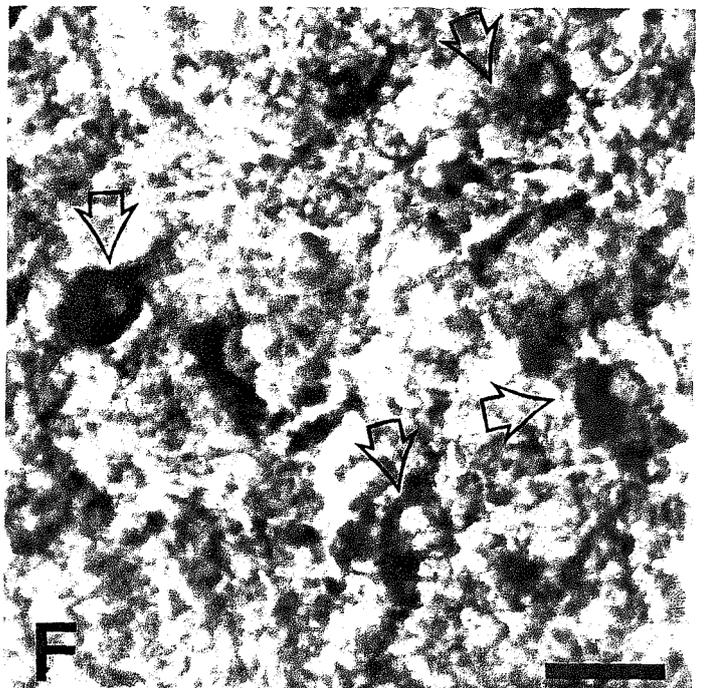
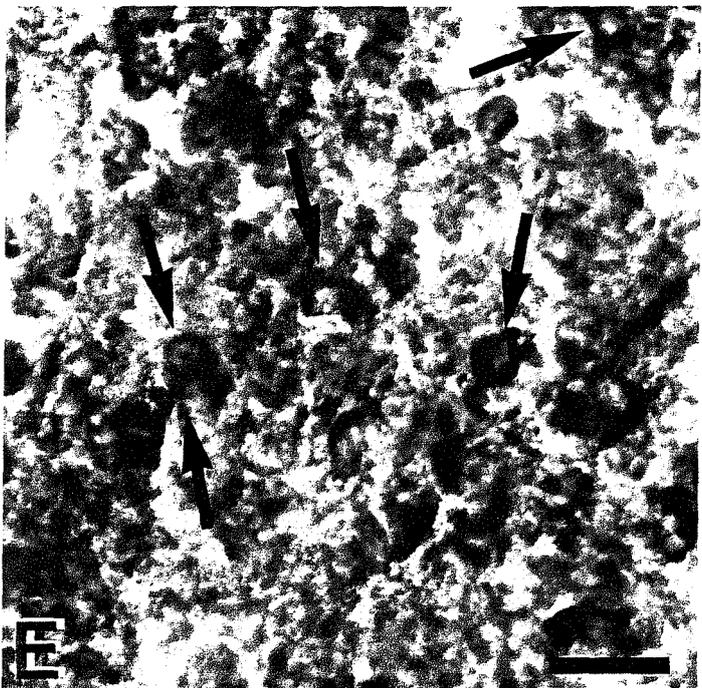
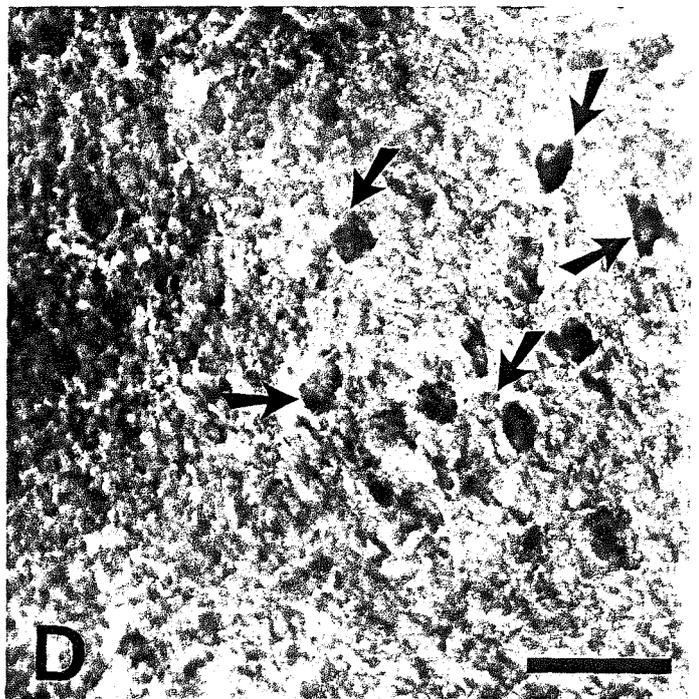
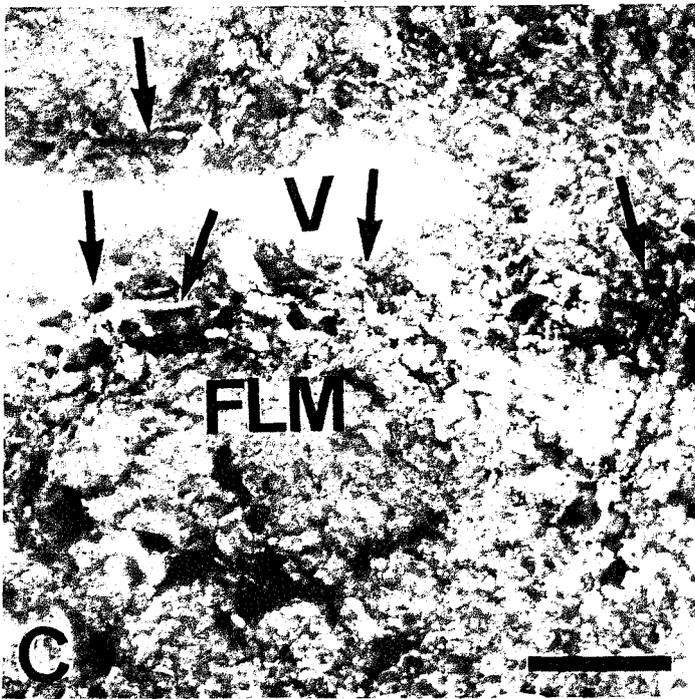
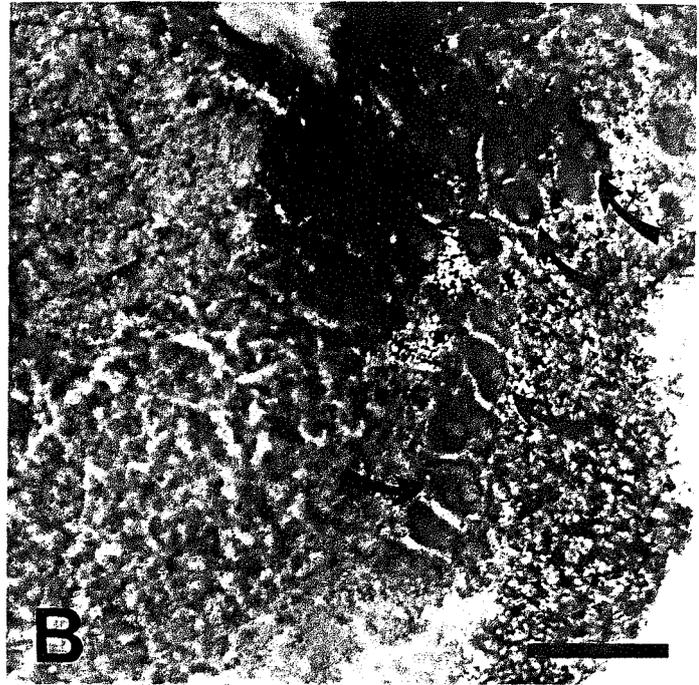
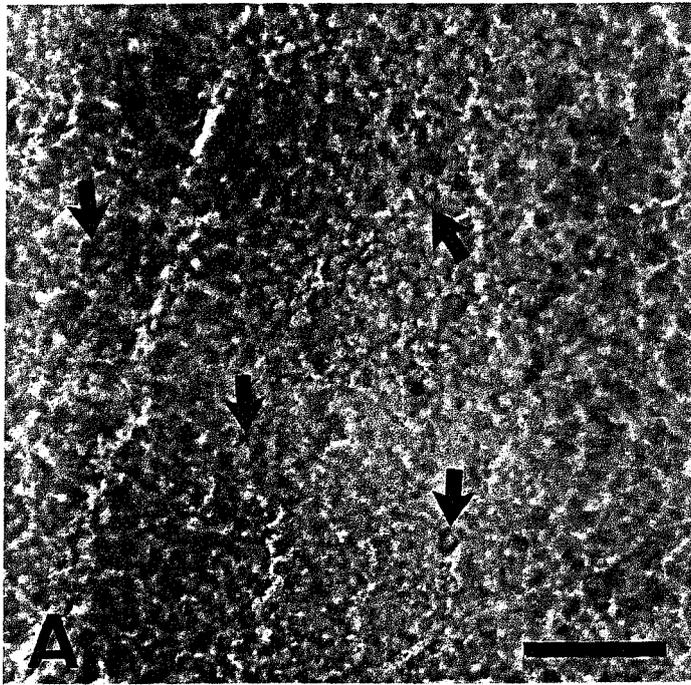


Fig. 30- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo e da medula espinal cervical alta de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem mostrando diversas regiões reativas ao procedimento histoquímico da glicogênio fosforilase. **A:** Reação positiva em neurônios do núcleo vestibular superior (setas). **B:** Positividade em somas neuronais do núcleo coclear (setas). **C:** Atividade glicogênio fosforilase em neurônios do núcleo do X par craniano (setas). **D:** Reação enzimática em neurônio do núcleo reticular inferior (seta vazada). **E:** Somas neuronais positivos no núcleo inferior da rafe (setas). **F:** Neurônios com atividade glicogênio fosforilase no corno ventral da medula espinal cervical alta (setas). Barras de calibração: A-E: 30  $\mu\text{m}$ ; F: 70  $\mu\text{m}$ .

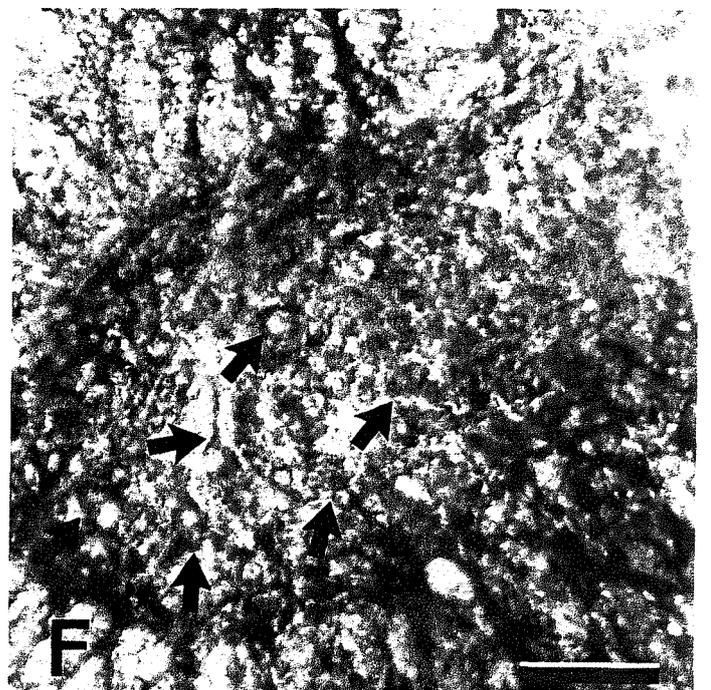
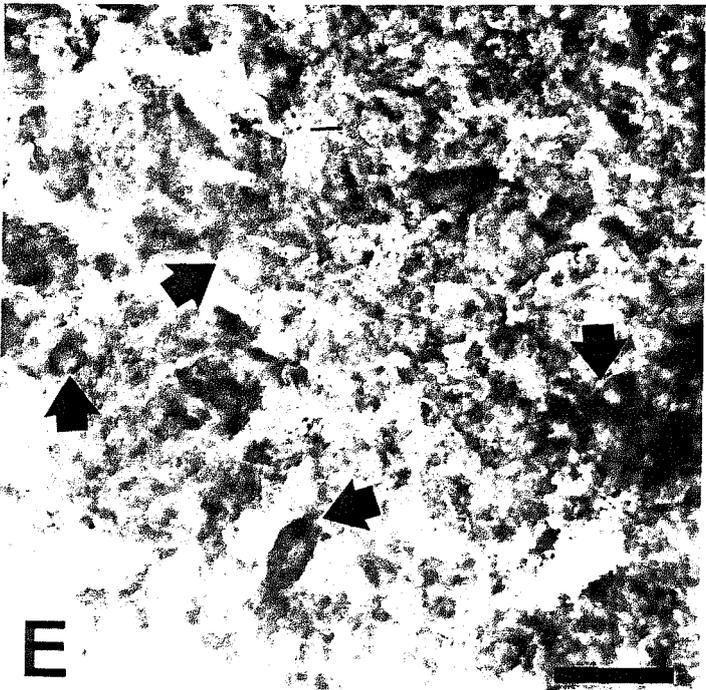
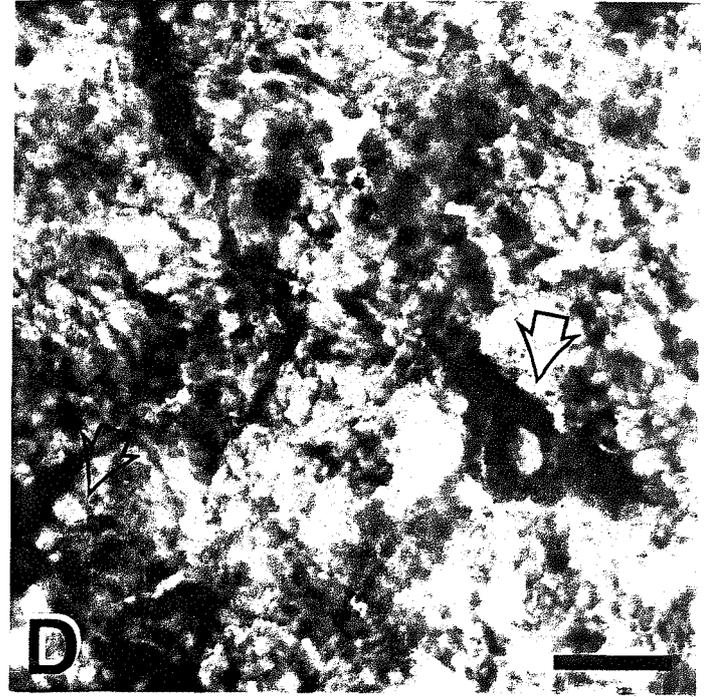
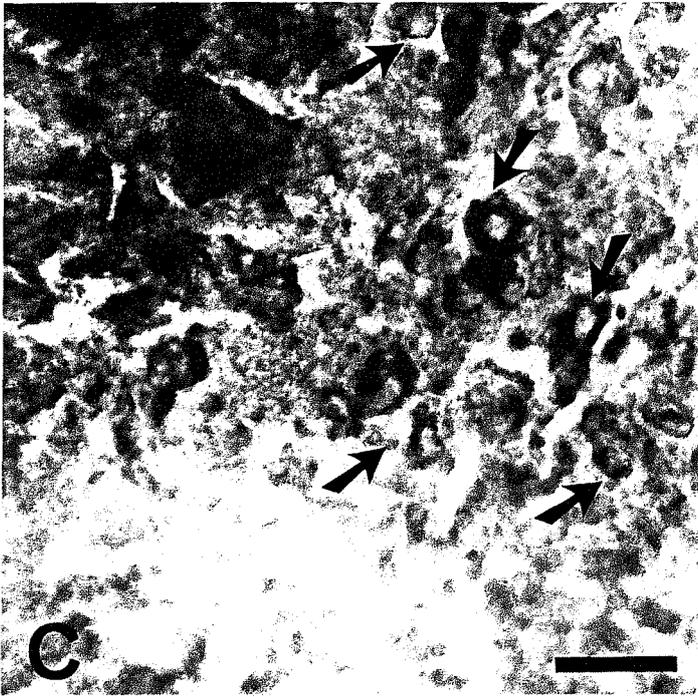
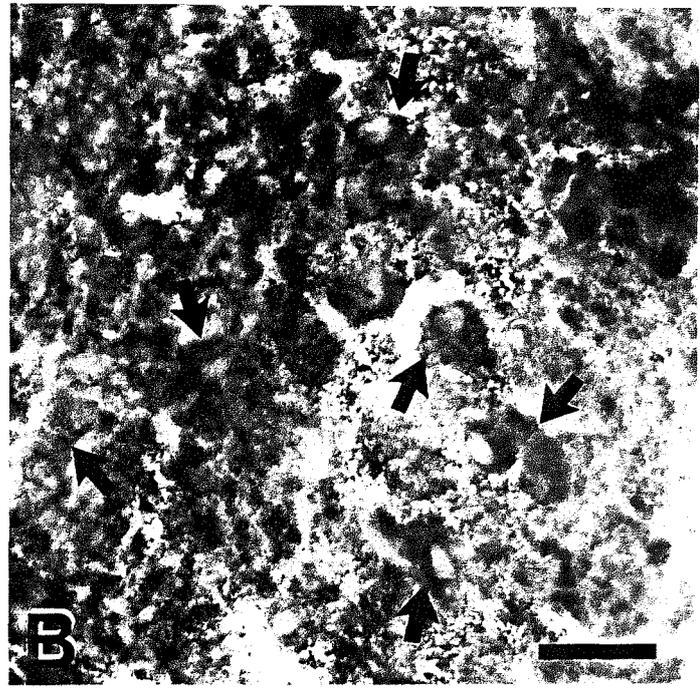
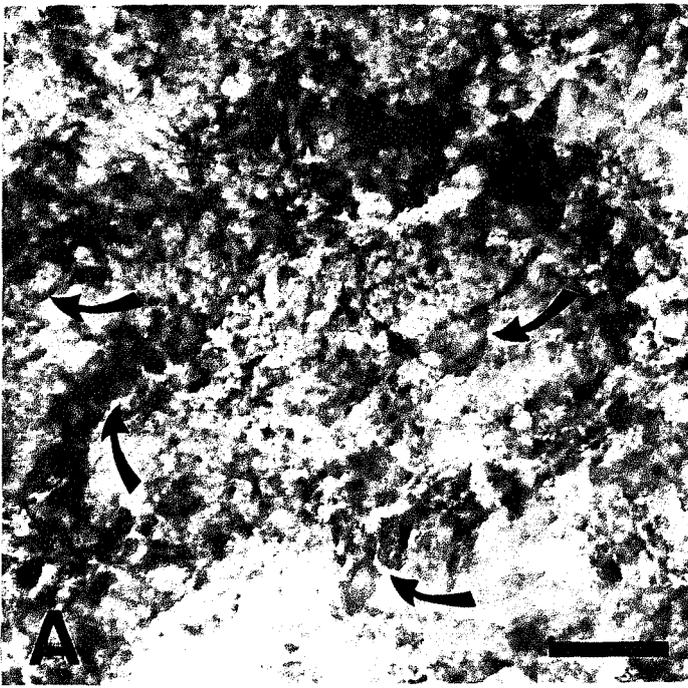


Fig. 31- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem mostrando diversas regiões reativas ao procedimento histoquímico da citocromo oxidase. **A:** Intensa reação positiva em neurônios piramidais (setas) do córtex medial. As camadas molecular (asterisco) e plexiforme também mostram forte reatividade. **B:** Atividade citocromo oxidase em neurônios localizados na eminência ventricular dorsal do telencéfalo (setas). **C:** Somas neuronais reativos na região do estriado (setas). **D:** Reação citocromo oxidase em neurônios localizados no núcleo habenular medial (setas). **E:** Neurônios positivos localizados no núcleo rotundus (setas). **F:** Atividade enzimática em somas neuronais do núcleo geniculado ventral. Barras de calibração: A, E, F: 70  $\mu\text{m}$ ; B, C, D: 30  $\mu\text{m}$ .

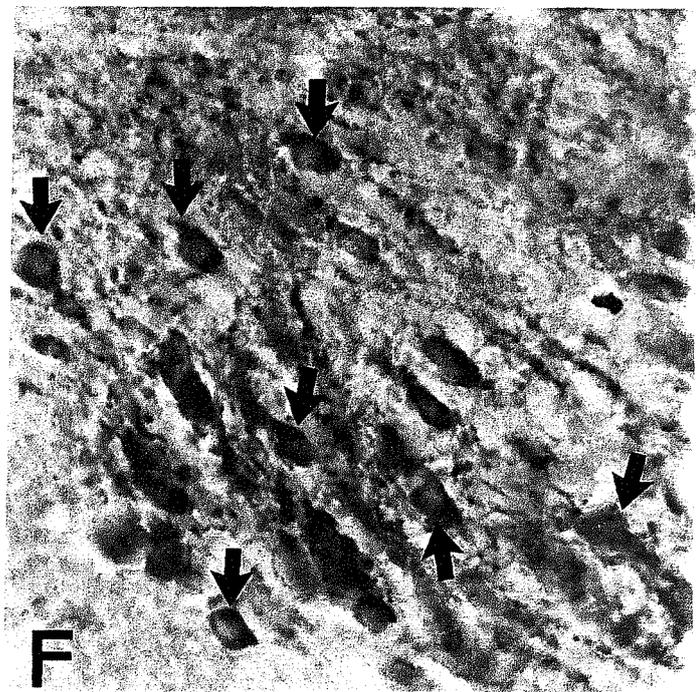
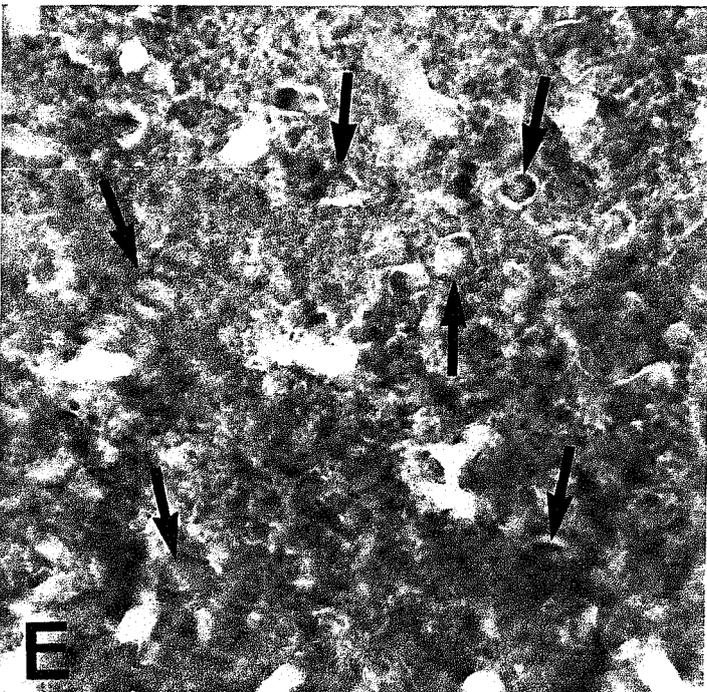
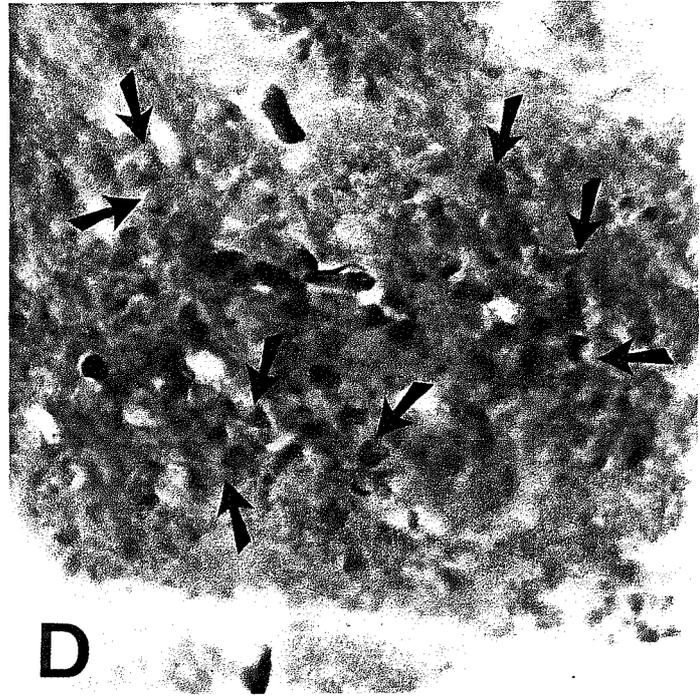
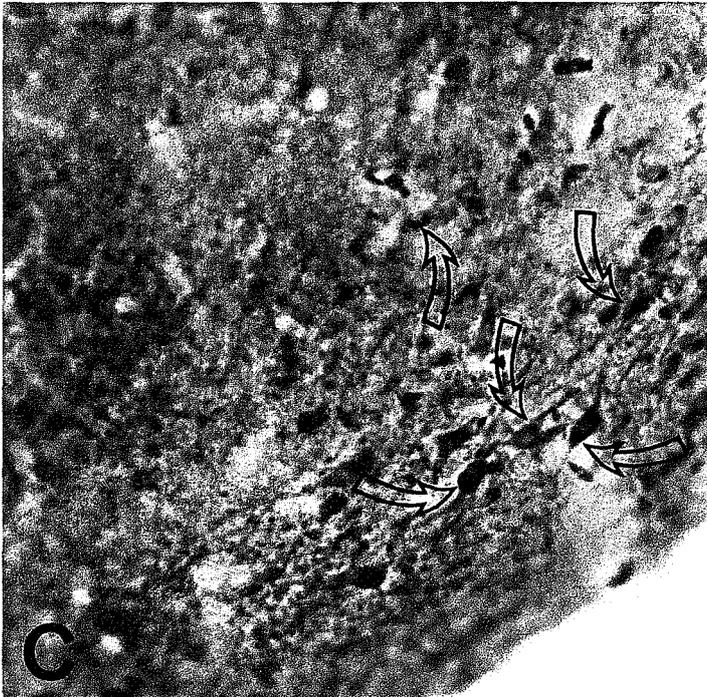
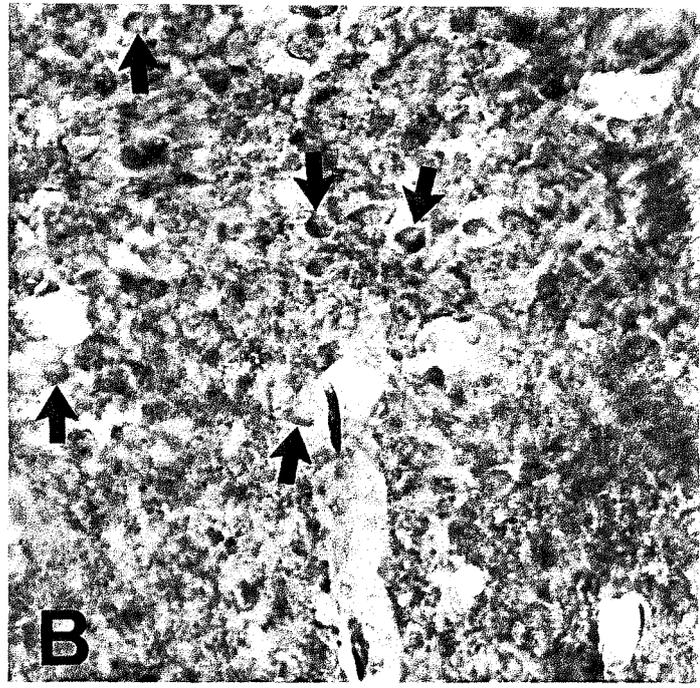
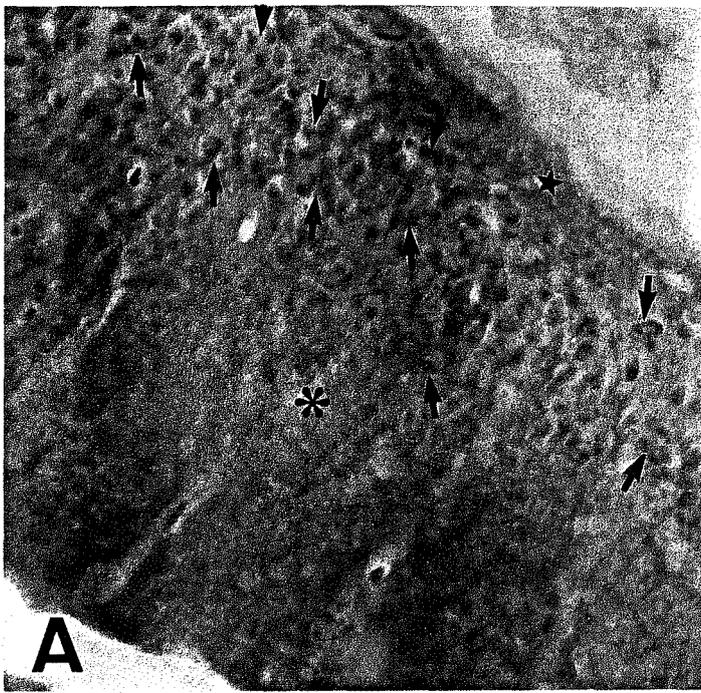


Fig. 32- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de tartarugas *Pseudemys scripta elegans* jovens mostrando diversas regiões positivas ao procedimento histoquímico da citocromo oxidase. **A:** Atividade enzimática em neurônios localizados no núcleo dorsal da comissura posterior (setas). **B:** Reação positiva em neurônios (setas) localizados na camada cinzenta central do tecto óptico. **C:** Positividade em somas neuronais do núcleo do III par craniano (setas). **D:** Reação citocromo oxidase em neurônios do núcleo do istmo (setas). **E:** Atividade citocromo oxidase em somas neuronais do núcleo vestibular lateral. **F:** Reação positiva nas camadas granular (asterisco), molecular (estrela) e de células de Purkinje (setas) do cerebelo. **FLM:** Fascículo longitudinal medial; **IV:** Quarto ventrículo; **V:** Aqueduto de Silvío. Barras de calibração: A, B, C, D, F: 30  $\mu\text{m}$ ; B, E: 70  $\mu\text{m}$ .

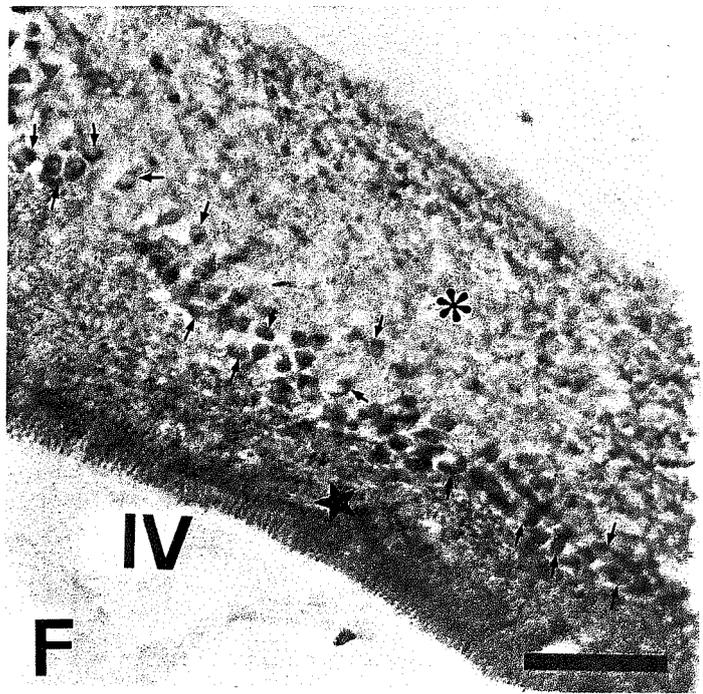
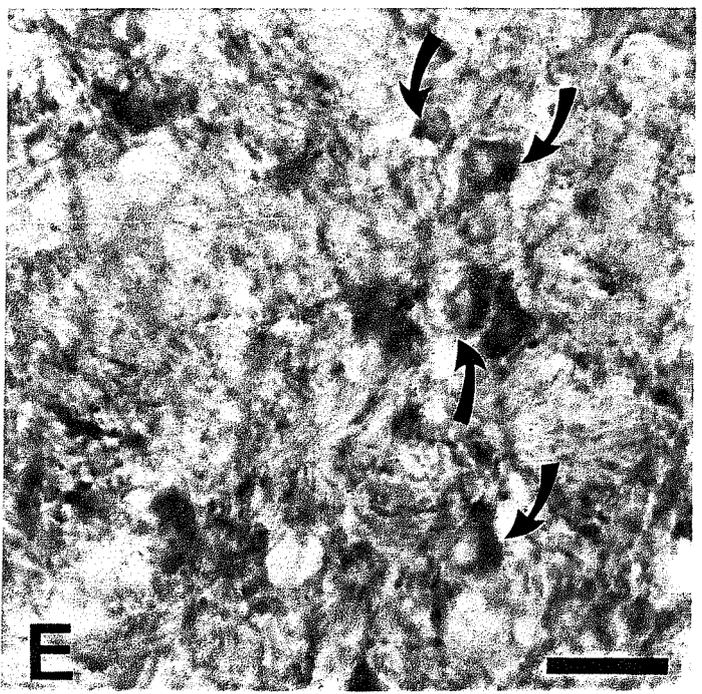
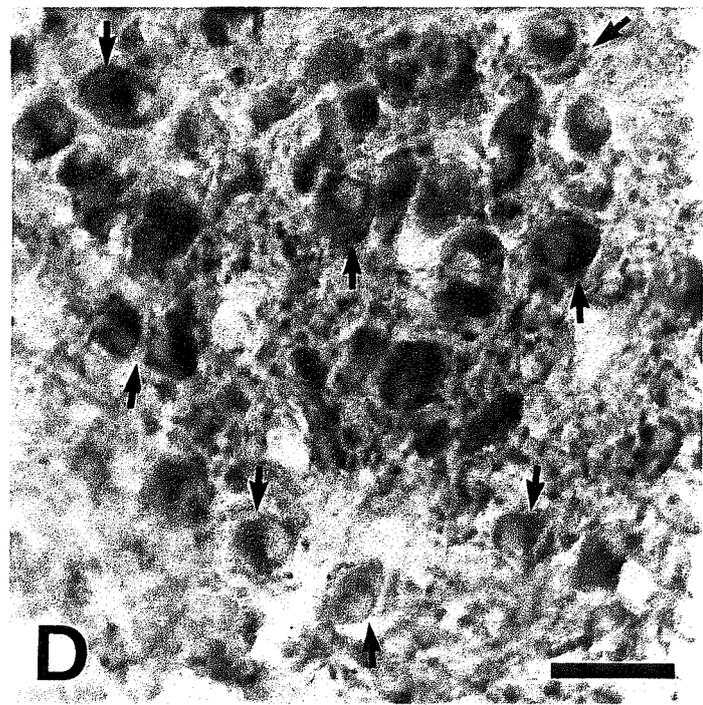
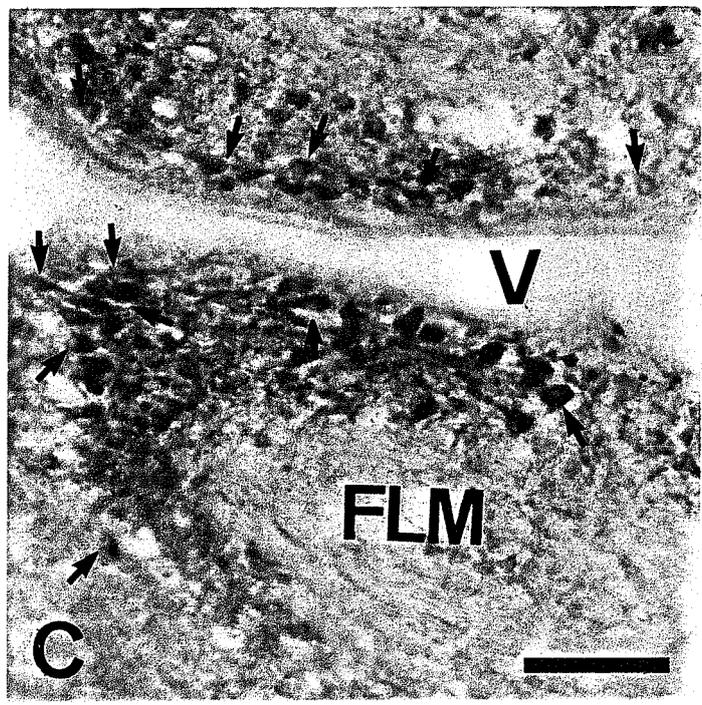
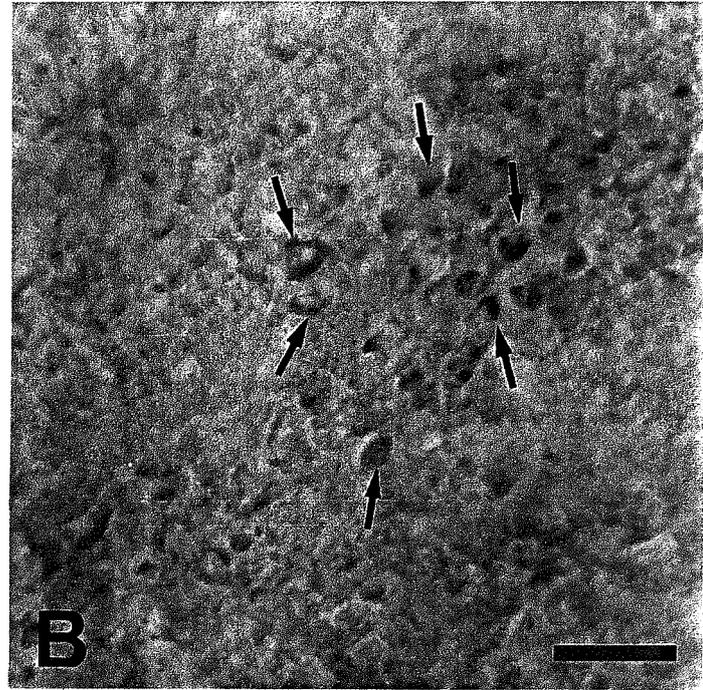
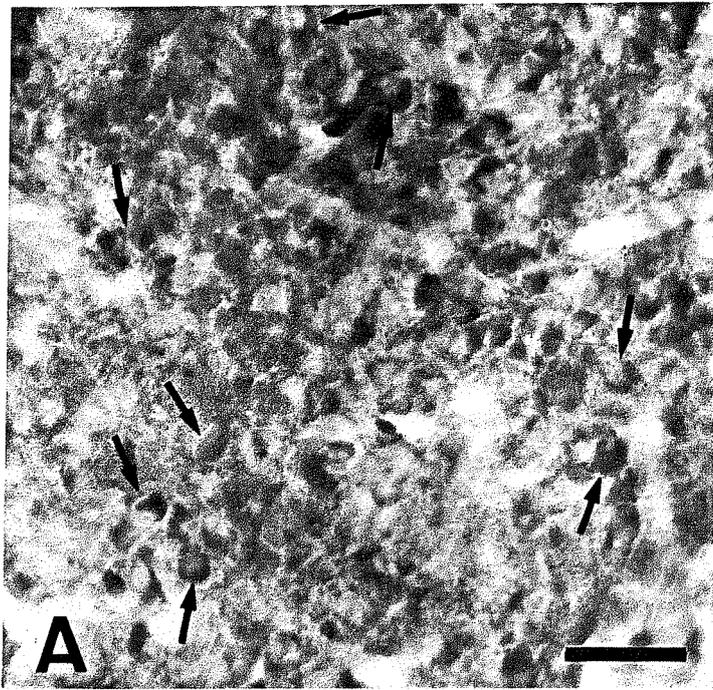


Fig. 33- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo e da medula espinal cervical alta de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem mostrando reação citocromo oxidase em diversas regiões. **A:** Reação positiva em neurônios localizados no núcleo coclear (setas). **B:** Neurônios reativos no núcleo do VI par craniano (setas). **C:** Somas (setas vazadas) e prolongamentos (cabeças de setas) neuronais positivos do núcleo reticular inferior. **D:** Atividade citocromo oxidase em motoneurônios do corno ventral da medula espinal cervical alta (setas). **E:** Reação citocromo oxidase em células nervosas do núcleo marginal. **F:** Soma (seta) e prolongamento (cabeça de seta) neuronal reativo no funículo lateral da medula espinal cervical alta. **FLM:** Fascículo Longitudinal Medial. Barras de calibração: A, B, D: 30  $\mu\text{m}$ ; C: 70  $\mu\text{m}$ ; E-F: 10  $\mu\text{m}$ .

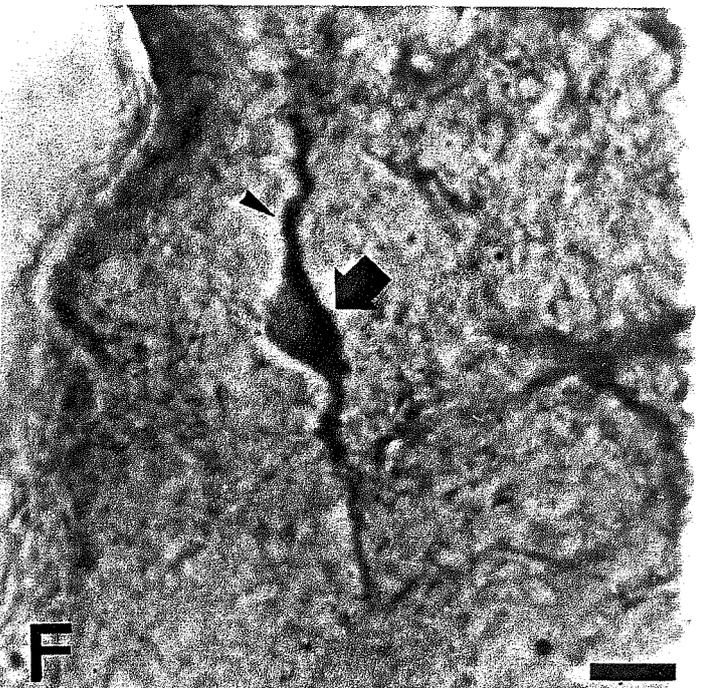
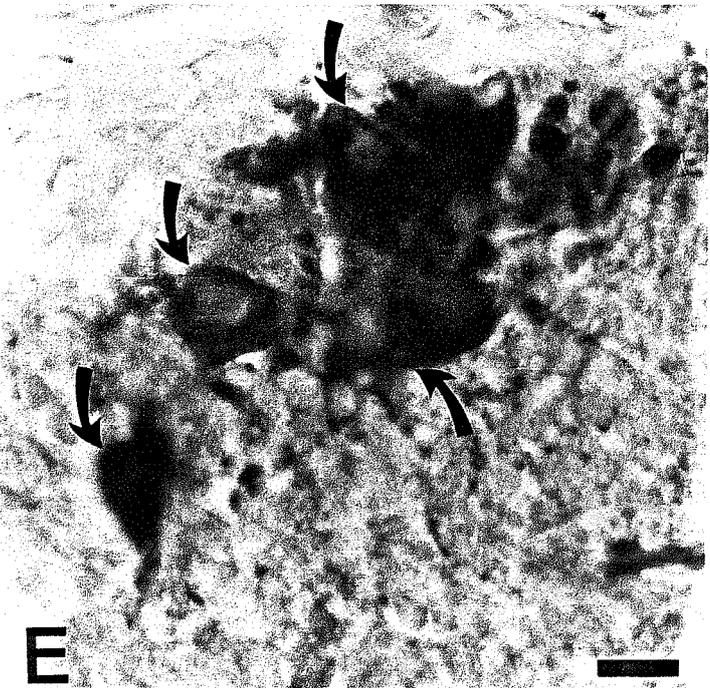
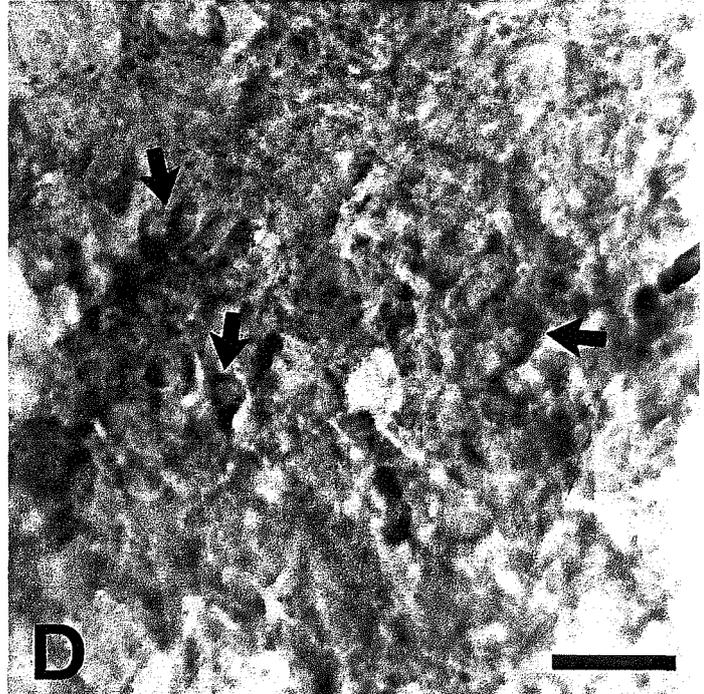
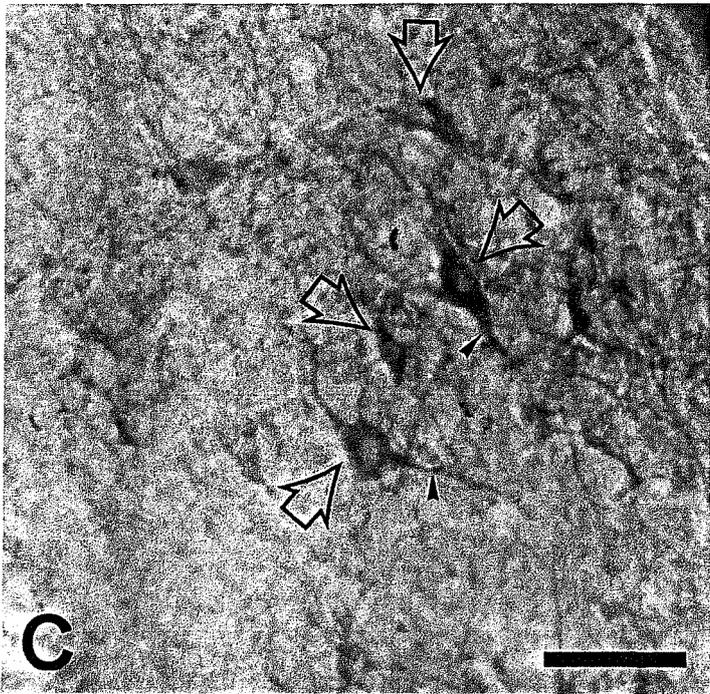
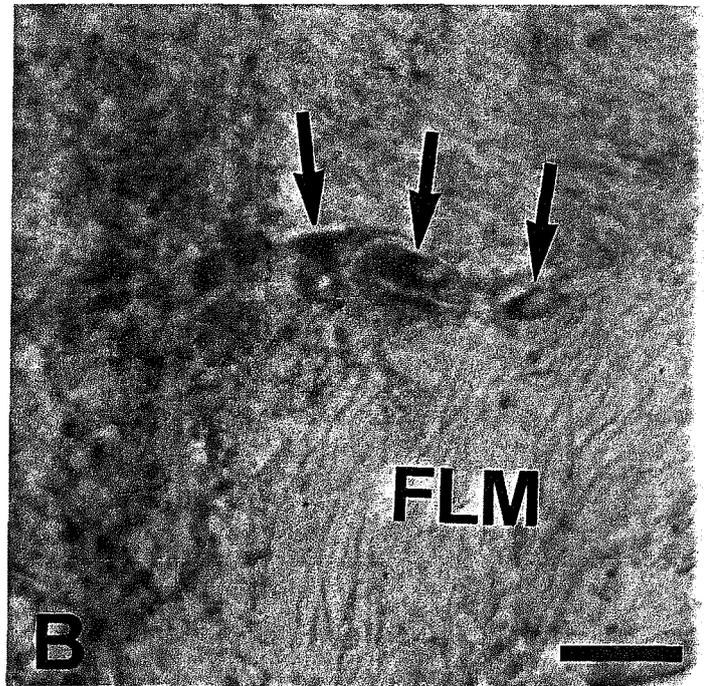
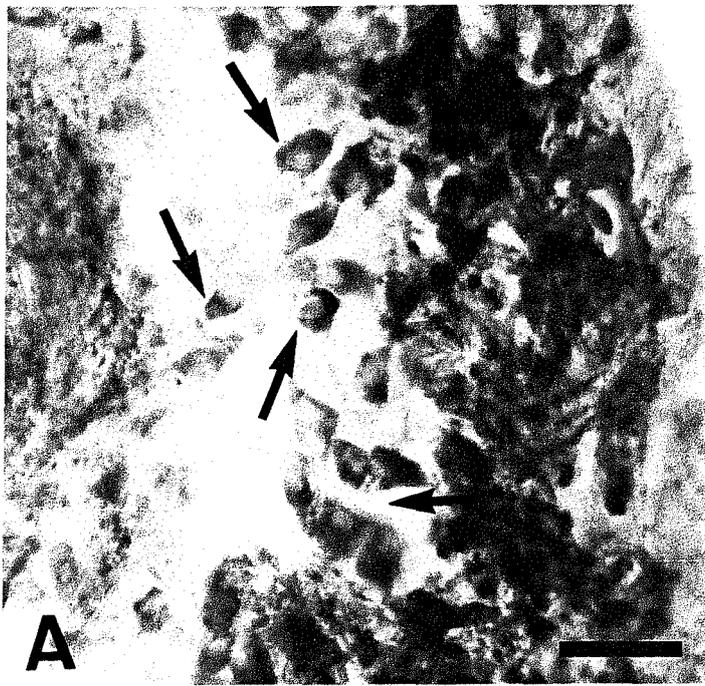


Fig. 34- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem mostrando diversas regiões positivas ao procedimento histoquímico da NADPH-diaforase. **A:** Positividade em neurônios localizados no córtex piriforme (setas). **B:** Somas (setas vazadas) e prolongamentos (cabeças de setas) neuronais reativos no núcleo accumbens. **C:** Atividade NADPH-diaforase em somas (setas) e prolongamentos (cabeça de seta) de neurônios da eminência ventricular dorsal do telencéfalo. **D:** Reação positiva em somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) de neurônios da região do estriado. **E:** Neurônios (setas) positivos na região da amígdala. **F:** Reação NADPH-diaforase em somas neuronais do hipotálamo medial (seta curva) e do hipotálamo lateral (seta reta). O asterisco indica a presença de reatividade na região da eminência média. **V:** Terceiro ventrículo. Barras de calibração: A, B, C, E: 70  $\mu\text{m}$ ; D: 30  $\mu\text{m}$ ; F: 200  $\mu\text{m}$ .

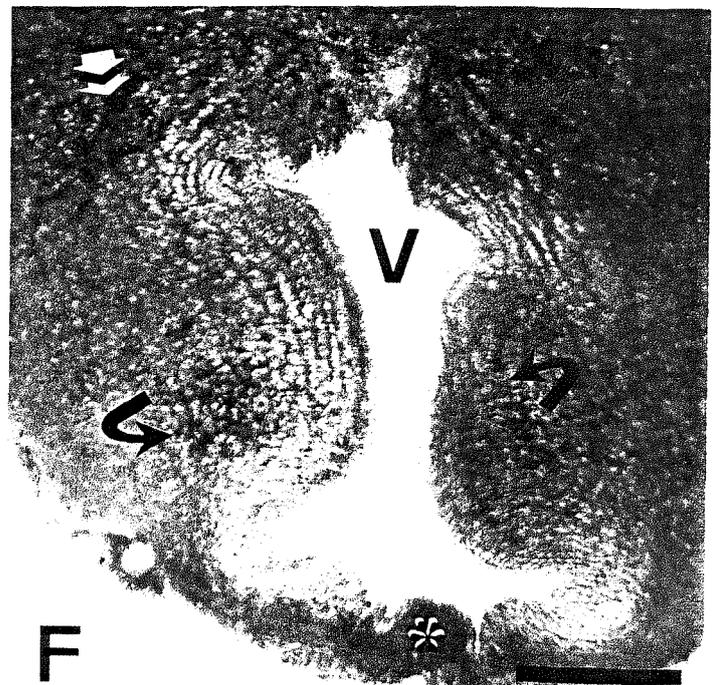
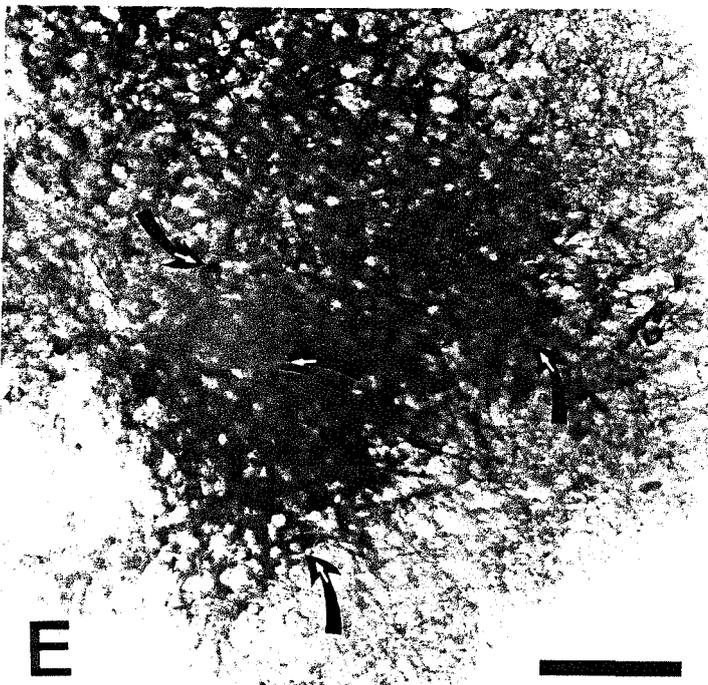
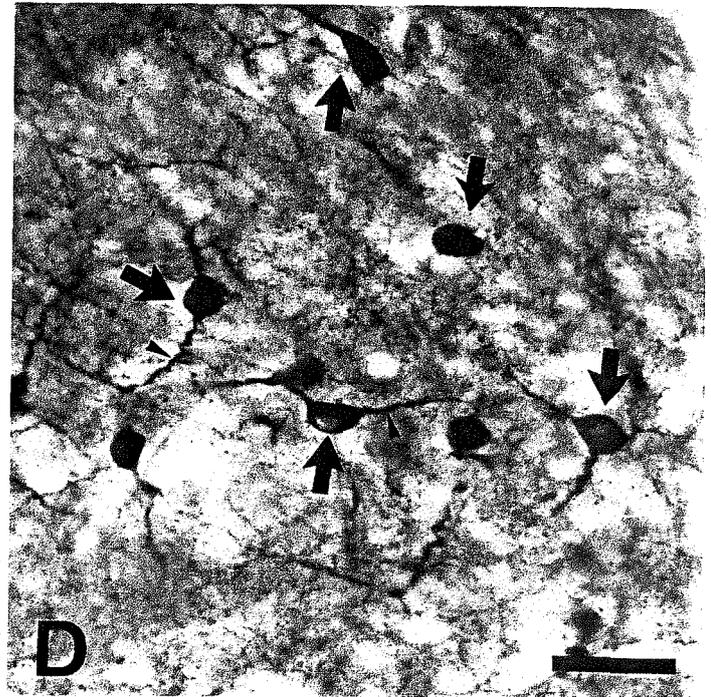
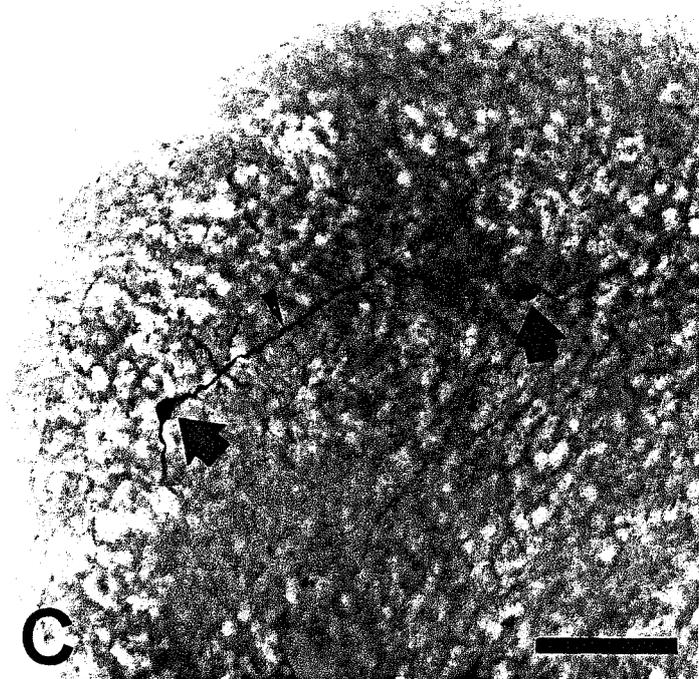
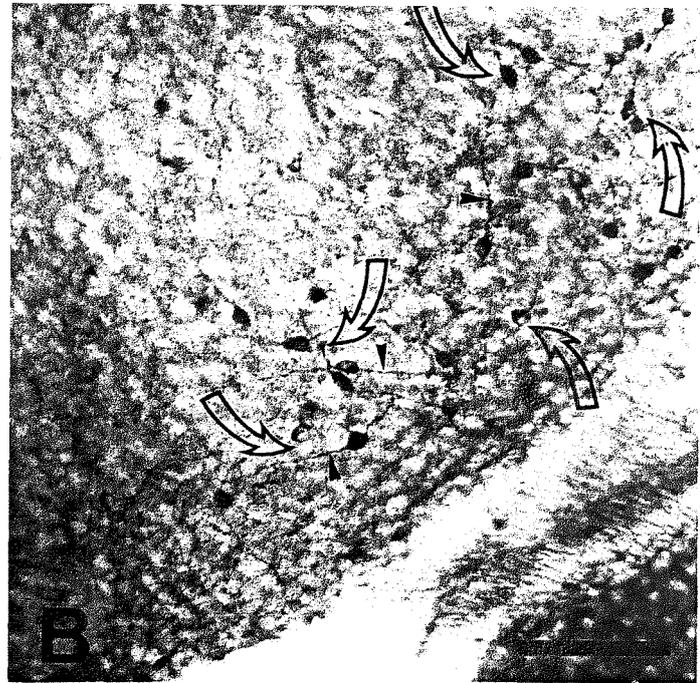
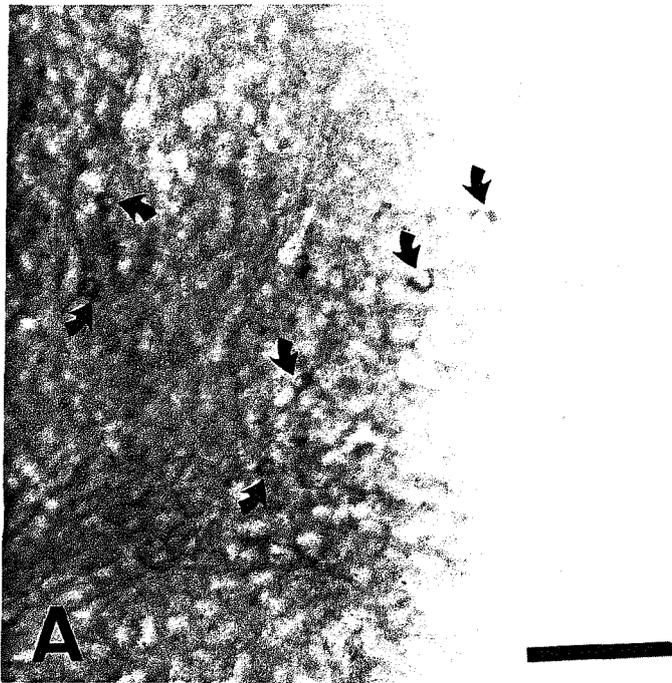


Fig. 35- Fotomontagem de secção coronal do hemisfério telencefálico de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem mostrando a atividade NADPH-diaforase em somas (setas finas cheias) e em prolongamentos (seta branca larga) neuronais. **ADVR**- eminência ventricular dorsal; **cd**- córtex dorsal; **cdm**- córtex médio dorsal; **cm**- córtex medial; **cp**- córtex piriforme; **nAc**- núcleo accumbens; **PH**-primórdio de hipocampo; **SL**: núcleo septal lateral; **SM**: núcleo septal medial; **Str**-estriado; **V**: Ventrículo lateral. Barra de calibração: 200  $\mu$ m.

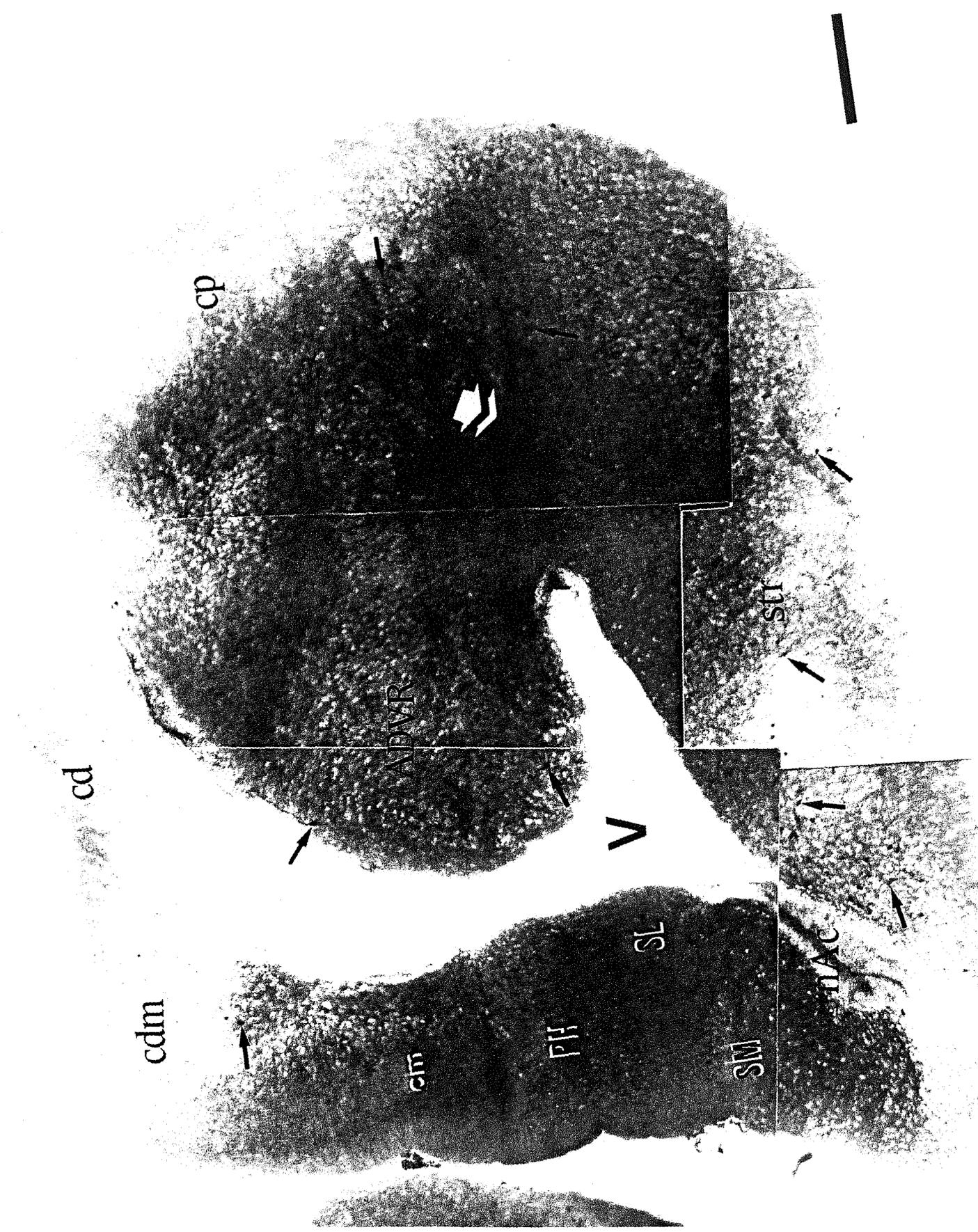


Fig. 36- Região telencefálica de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem. **A:** Fotomontagem mostrando a presença de atividade NADPH-diaforase na região da estria terminal (**STe**) e em neurônios do núcleo do tubérculo olfatório (**nToe**). **B:** Fotomontagem mostrando somas neuronais com reação NADPH-diaforase nas regiões do estriado (**Str**) e do globus pallidus (**GP**). **FPL:** Fascículo prosencefálico lateral, **FPM:** Fascículo prosencefálico medial; **PIC:** Plexo coriódio; **V:** Ventrículo lateral. Barras de calibração: 200  $\mu\text{m}$ .

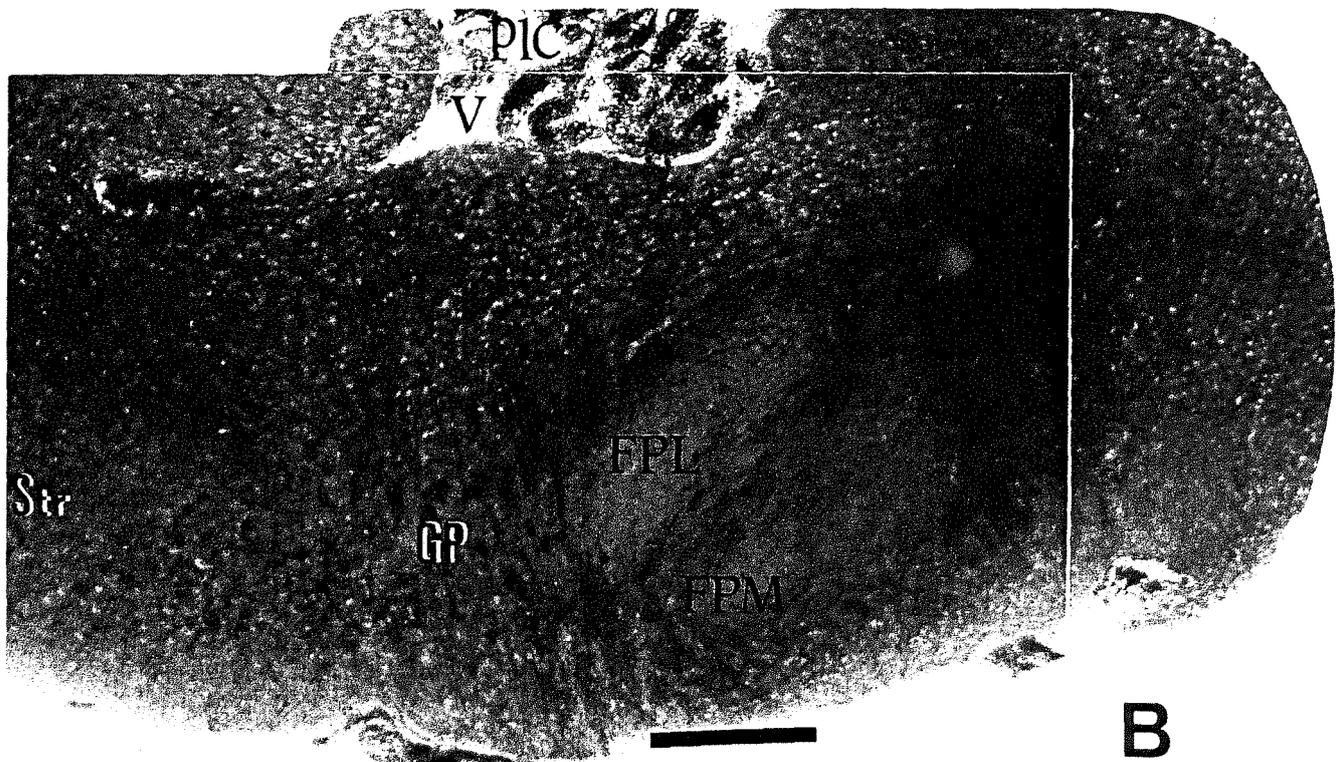
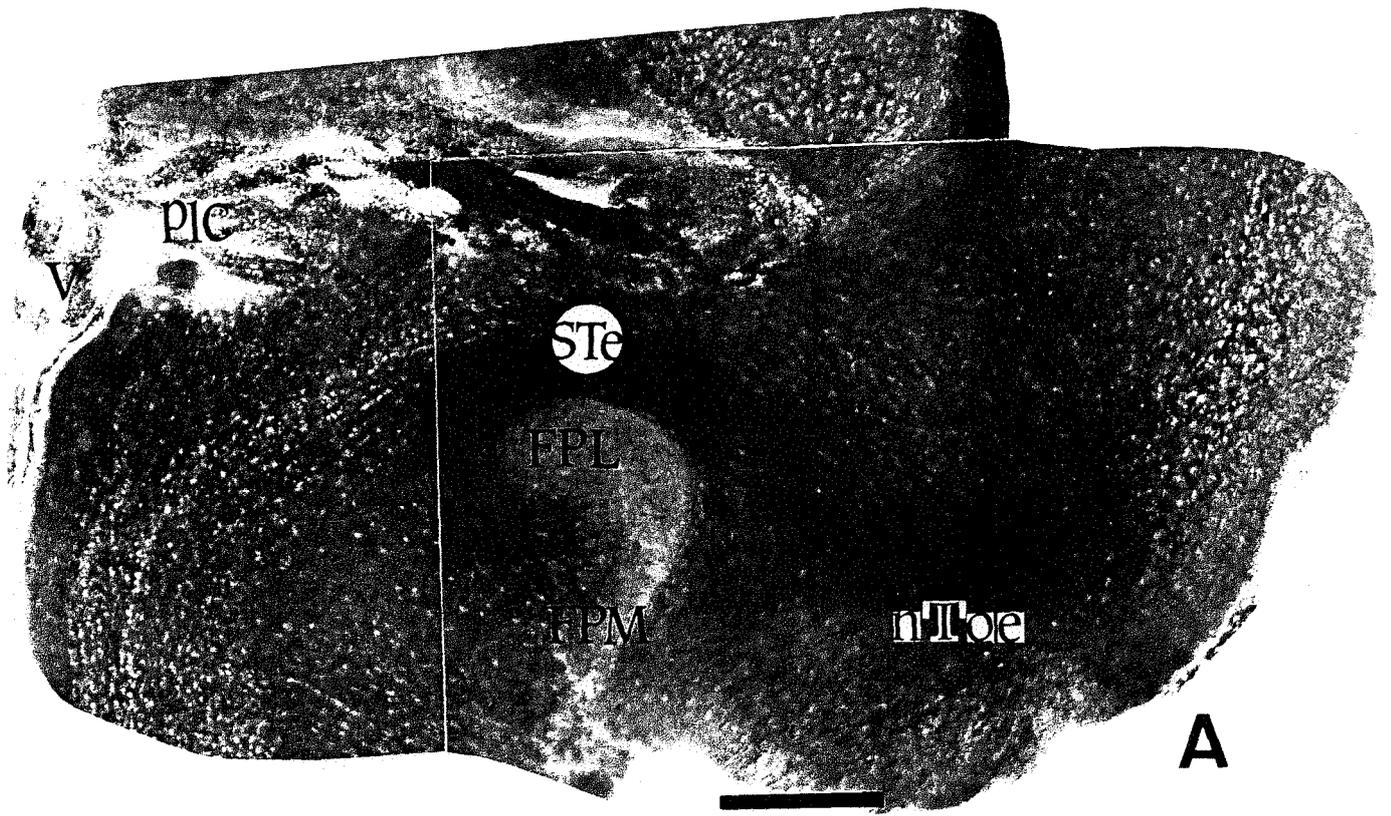
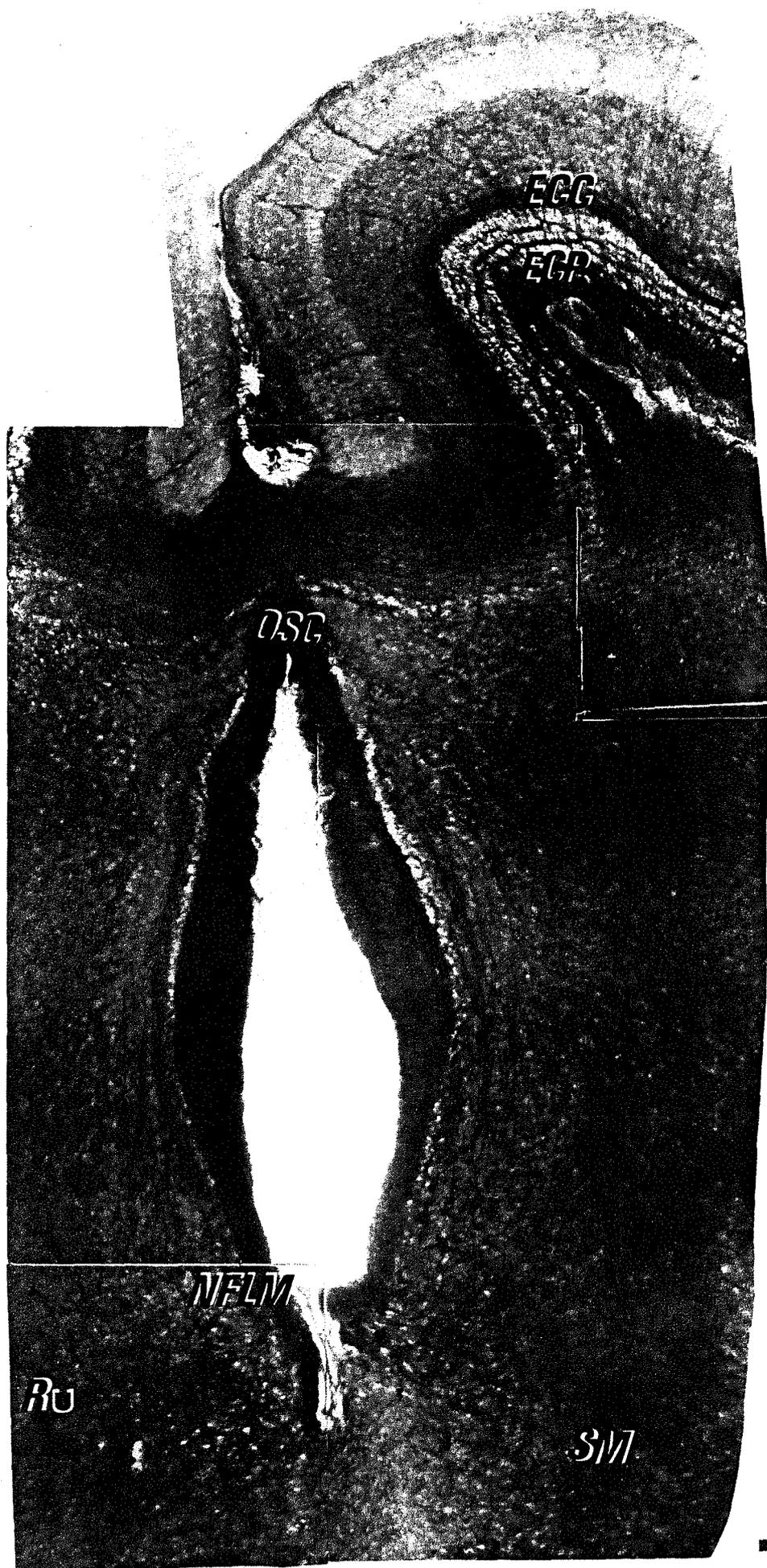


Fig. 37- Fotomontagem de uma secção oblíqua do encéfalo de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem mostrando o padrão de distribuição da atividade NADPH-diaforase em algumas regiões do diencéfalo e do mesencéfalo. **ECC**: camada cinzenta central do tecto óptico; **ECP**: camada cinzenta periventricular do tecto óptico; **NFLM**: núcleo do fascículo longitudinal medial; **OSC**: órgão subcomissural; **Ru**: núcleo rubro; **SM**: núcleo supramamilar; Barra de calibração: 200  $\mu$ m.



ECC

EGR

DSC

NFLM

Ru

SM

Fig. 38- Fotomontagem do mesencéfalo de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem mostrando o padrão de distribuição da atividade NADPH-diaforase. **ATV**- núcleos tegmentais ventrais; **ECC**- camada cinzenta central; **ECP**- camada cinzenta periventricular; **III**: Terceiro ventrículo; **La**- núcleo laminar do torus semicircularis; **nPM**: núcleos profundos do mesencéfalo; **SN**- substância nigra; **TSC**- torus semicircularis; **V**: Aqueduto de Silvio; **3n**: emergência do terceiro par craniano. Barra de calibração: 200  $\mu$ m.

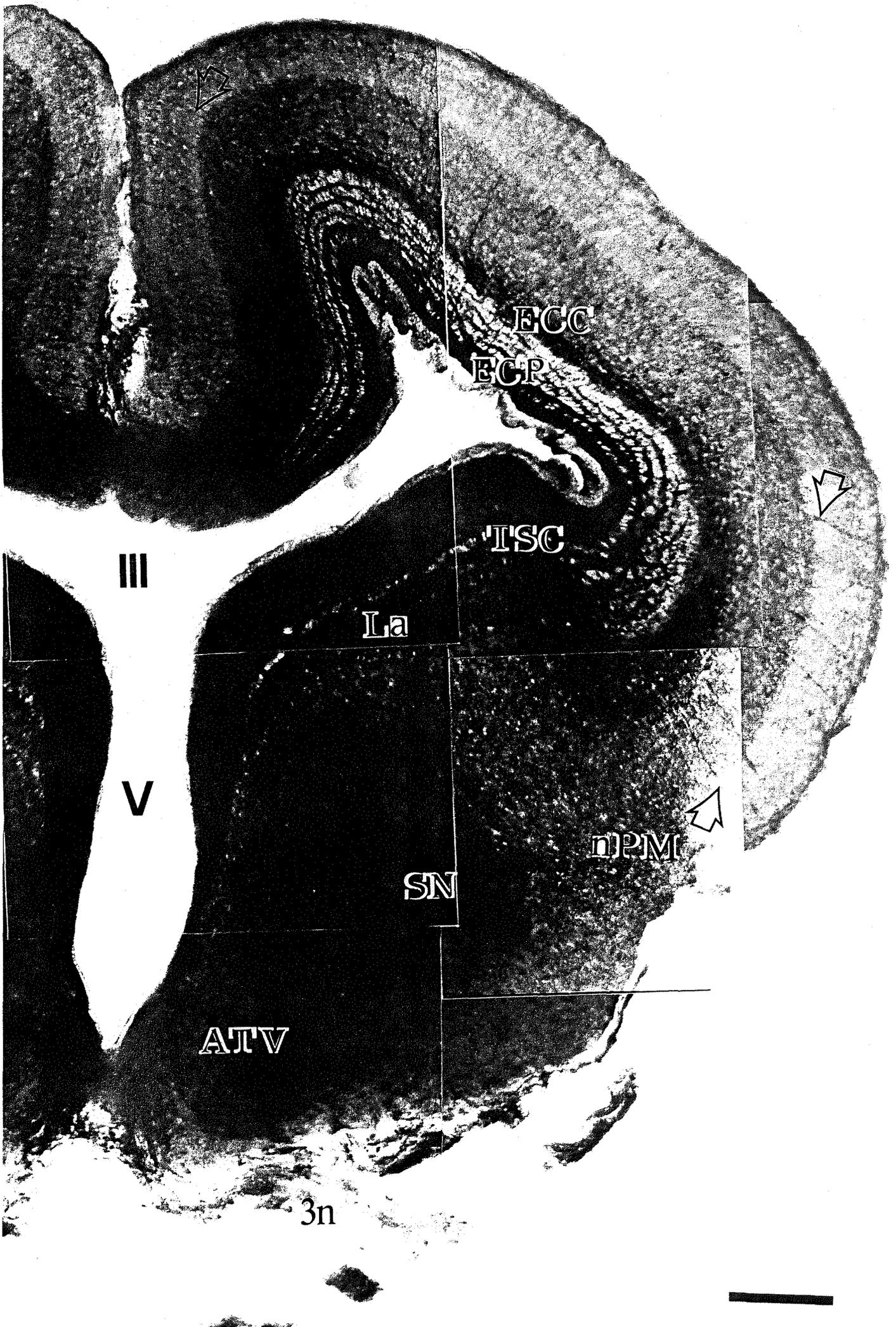


Fig. 39- Fotomontagem do rombencéfalo de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem mostrando neurônios com reação NADPH-diaforase nas regiões do núcleo do coclear (**Co**); do núcleo vestibular descendente (**VeD**); dos núcleos medial (**CbM**) e lateral (**CbL**) do cerebelo; e do núcleo superior da rafe (**Ras**). A seta vazada indica fibras positivas que conectam o núcleo coclear e o núcleo vestibular descendente. As setas cheias pequenas apontam para somas neuronais reativos na região do núcleo reticular medial. **FLM**: Fascículo longitudinal medial; **V**: Quarto ventrículo. Barra de calibração: 200  $\mu$ m.



L69

L67

V

L69

L67

L69

L67

Fig. 40- Fotomontagem da medulla oblonga de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem mostrando diversos núcleos com atividade NADPH-diaforase. **CO**-núcleo coclear; **Rai**- núcleo inferior da rafe; **Rm**- núcleo reticular medial; **TTd**- núcleo descendente do trigêmeo; **VeD**- núcleo vestibular descendente. A área em destaque será apresentada em maior aumento na próxima fotomontagem. Notar a presença de corpos celulares positivos no fascículo longitudinal medial (**FLM**). Barra de calibração: 200  $\mu\text{m}$ .



Fig. 41- Detalhe em maior aumento da área em destaque da fotomontagem anterior mostrando a atividade NADPH-diaforase em somas e prolongamentos neuronais dos núcleos coclear (**Co**), do VI par craniano (**nVI**), do VII par craniano (**nVII**), do reticular medial (**Rm**), do descendente do trigêmio (**TTd**) e do vestibular lateral (**VeL**). Barra de calibração: 70  $\mu$ m.



Fig. 42- Medulla Oblonga de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem. **A:** Fotomontagem mostrando a presença de atividade NADPH-diaforase em neurônios do núcleo do trato solitário (**nTS**), do núcleo vestibular descendente (**VeD**), dos núcleos do **X** e **XII** pares cranianos, do núcleo descendente do trigêmeo (**TTd**) e dos núcleos reticular inferior (**Ri**) e inferior da rafe (**Rai**). **B:** Atividade NADPH-diaforase em neurônios do núcleo do trato solitário (**nTS**), do núcleo descendente do trigêmeo (**TTd**), do núcleo ambíguo (**nAmb**), do núcleo do **XII** par craniano e da oliva inferior (**OI**). **V:** Quarto ventrículo. Barras de calibração: 200  $\mu\text{m}$ .

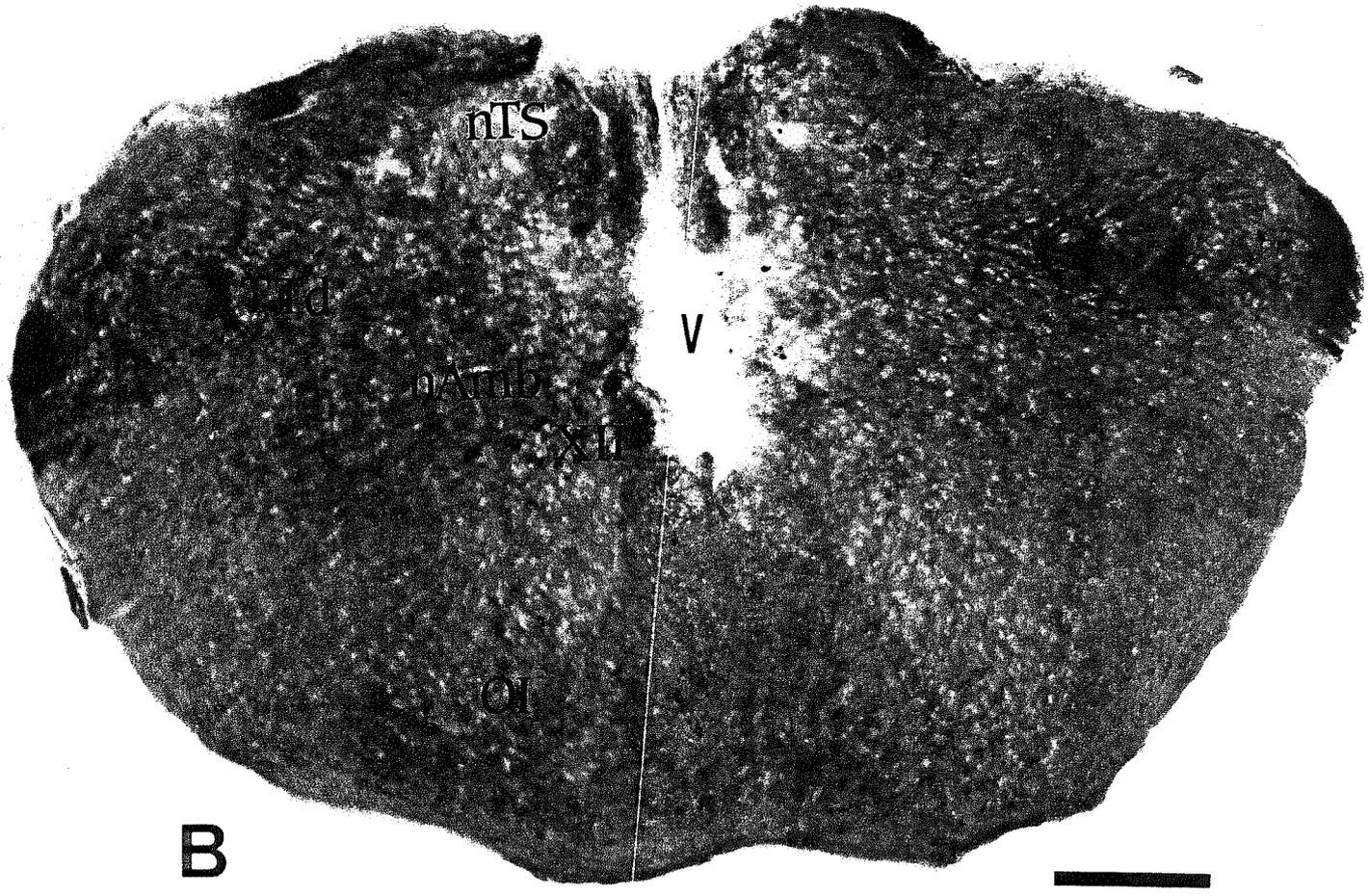
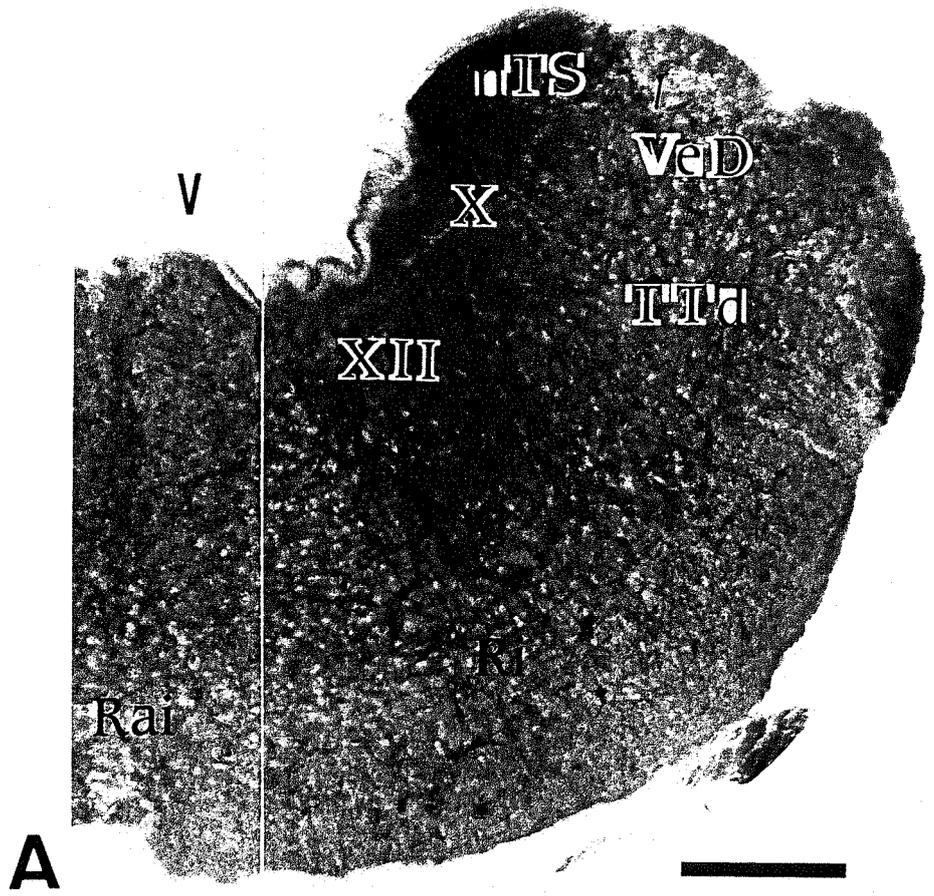


Fig. 43- Fotomicrografias de secções coronais da medula espinal cervical alta de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* jovem mostrando a distribuição da atividade NADPH-diaforase. **A:** Vista topográfica da medula espinal cervical alta onde se observa a intensa reatividade nas áreas Ia, Ib, II e III, e em somas neuronais (setas cheias maiores) da coluna lateral dorsal (**LCDH**) e em neurônios (seta cheia curva) da comissura dorsal (**CDC**). A seta vazada indica a positividade em motoneurônio do corno ventral, enquanto as setas pequenas cheias apontam para somas celulares reativos dispersos pelo funículo ventral. **B:** Detalhe em maior aumento da parte superior do corno dorsal mostrando a reatividade das áreas Ia, Ib, II e III e neurônios positivos na comissura dorsal (setas curvas cheias). A seta vazada indica soma de neurônio radial. **C:** Reação NADPH-diaforase nas áreas Ia e II do corno dorsal e em soma de neurônio radial (seta). **D:** Atividade NADPH-diaforase em soma (seta) e prolongamento (cabeça de seta) de um neurônio "bitufted" da **CDC**. **E:** Reação positiva em neurônios da coluna lateral do corno dorsal (setas cheias) e de motoneurônio (seta vazada) do corno ventral. Notar a presença de corpos celulares positivos no funículo lateral (setas cheias pequenas). **F:** Reatividade em células localizadas no funículo ventral (setas). Barras de calibração: A: 200  $\mu\text{m}$ ; B; E; F: 70  $\mu\text{m}$ ; C-D: 30  $\mu\text{m}$ .

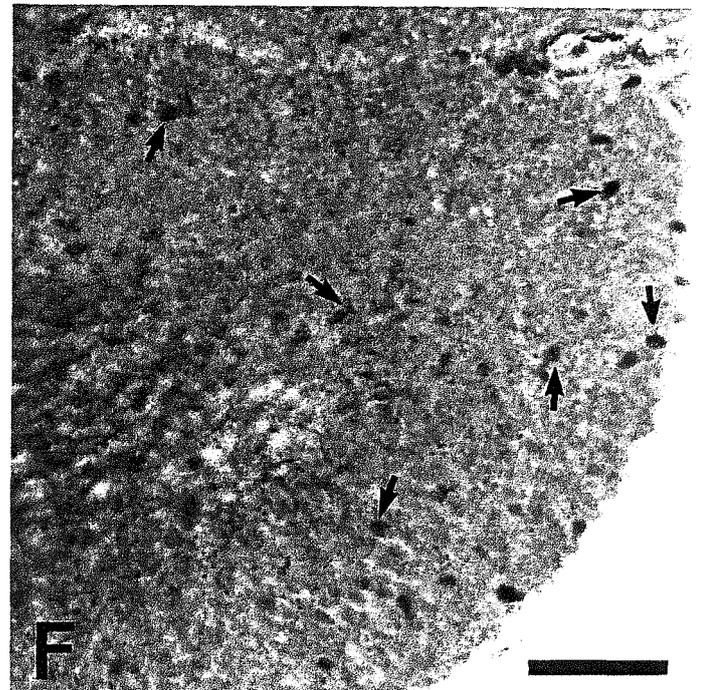
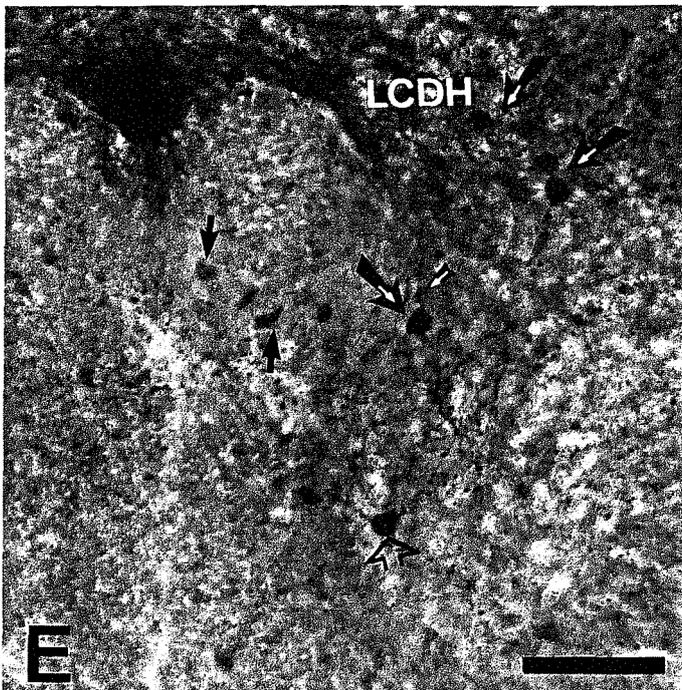
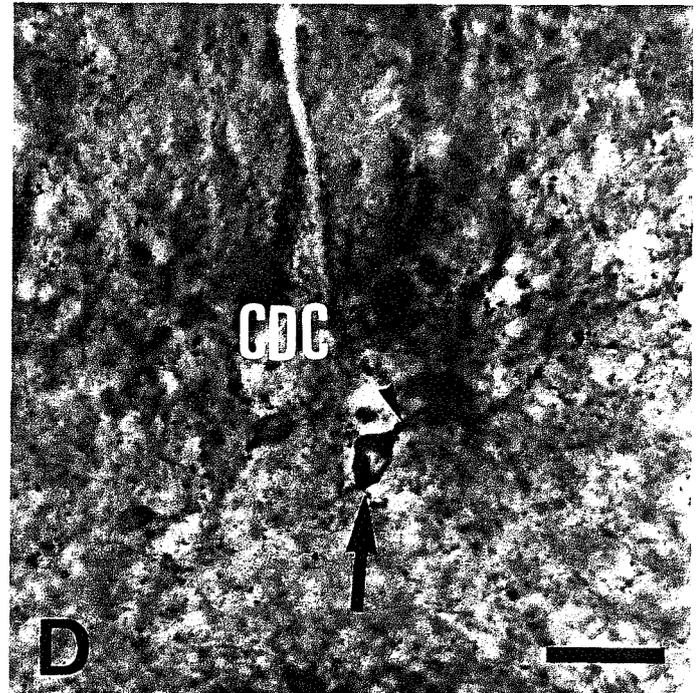
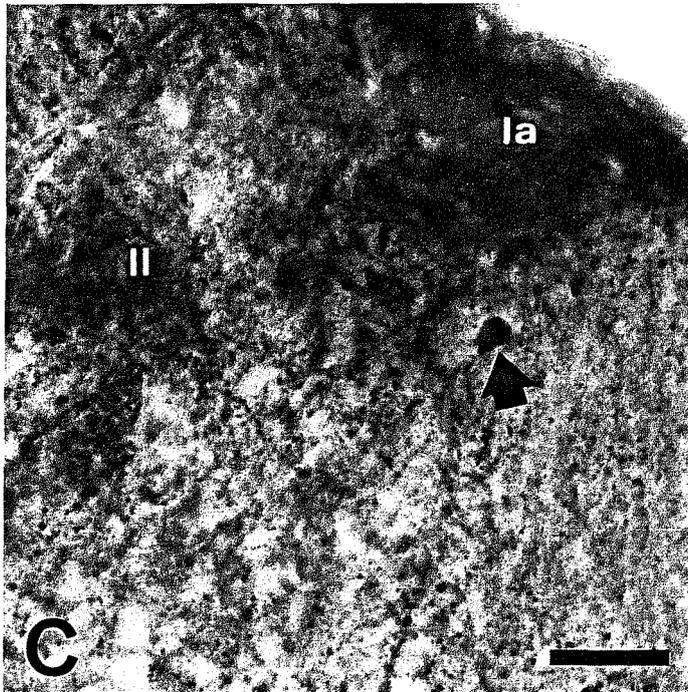
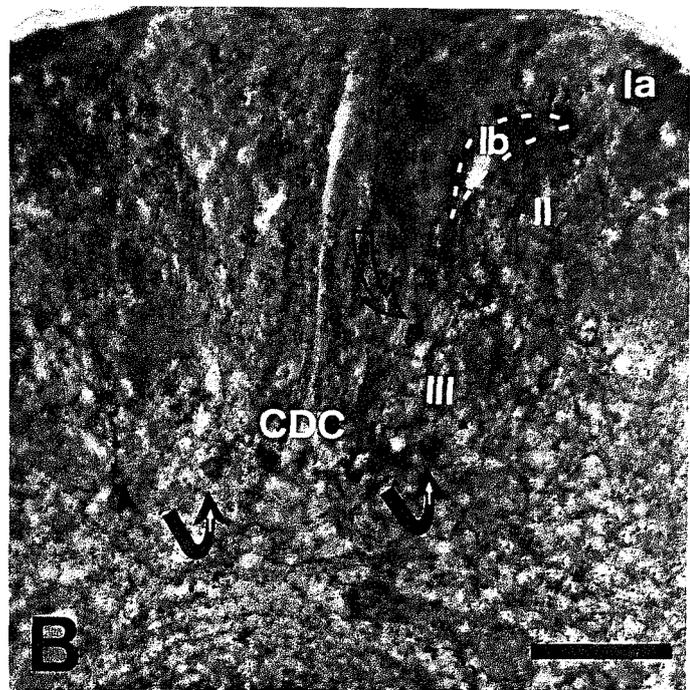
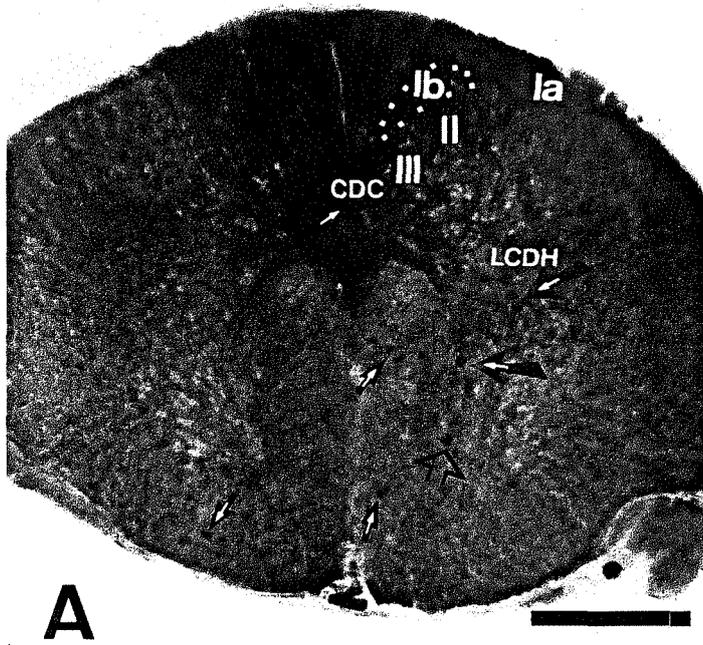


Fig. 44- Fotomicrografias de secções coronais de gânglio raquidiano de tartaruga *Trachemys dorbigni* adulta mostrando o padrão de atividade da NADPH-diaforase. **A:** Reação positiva em somas neuronais de 16 (setas cheias) e 24  $\mu\text{m}$  de diâmetro (setas vazadas) do gânglio raquidiano de tartaruga em condições basais. **B:** Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior destacando os somas de 16 (setas cheias) e 24  $\mu\text{m}$  de diâmetros (setas vazadas). Notar o núcleo celular negativo. **C:** Intensa atividade NADPH-diaforase em neurônios do gânglio raquidiano de tartarugas após 15 dias da secção do nervo ciático. **D:** Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior mostrando que a reação positiva localizou-se em somas neuronais de 16 (setas cheias) e 24  $\mu\text{m}$  de diâmetros (setas vazadas). Esta reação NADPH-diaforase apresenta uma discreta redução nos neurônios menores do gânglio raquidiano de tartarugas após 30 (**E**) e 90 (**F**) dias da desnervação periférica (setas). Barras de calibração: A, C, E, F: 200  $\mu\text{m}$ ; B, D: 30  $\mu\text{m}$ .

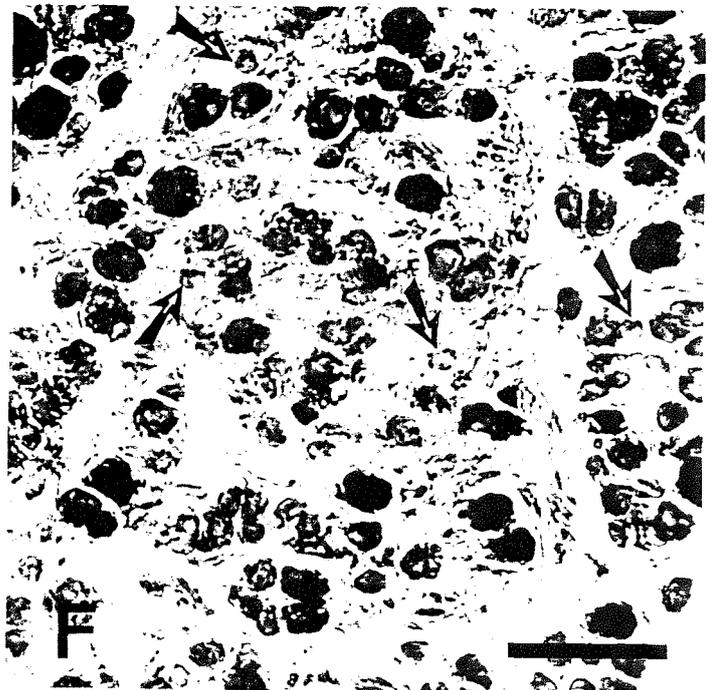
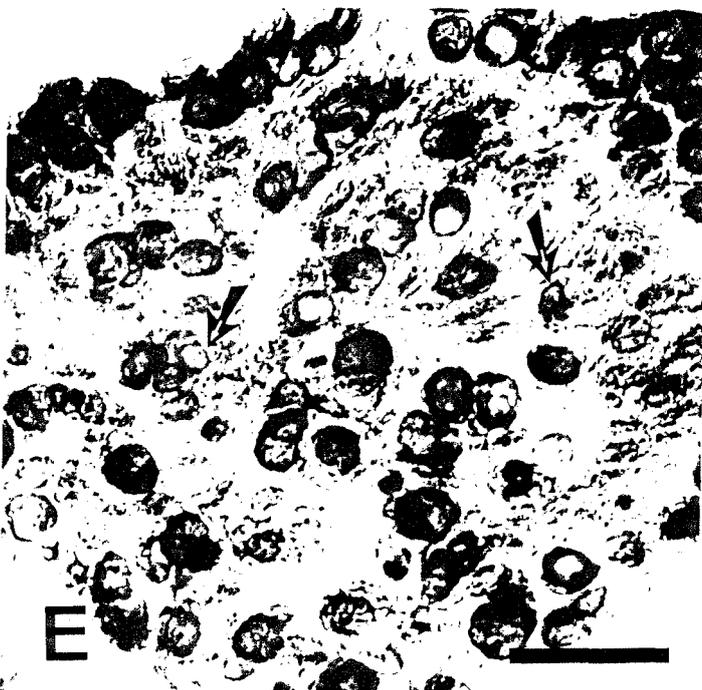
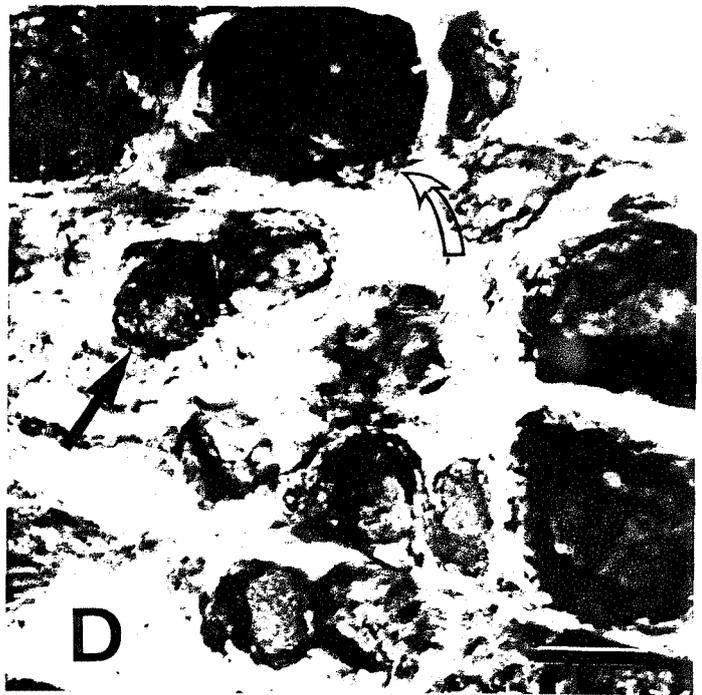
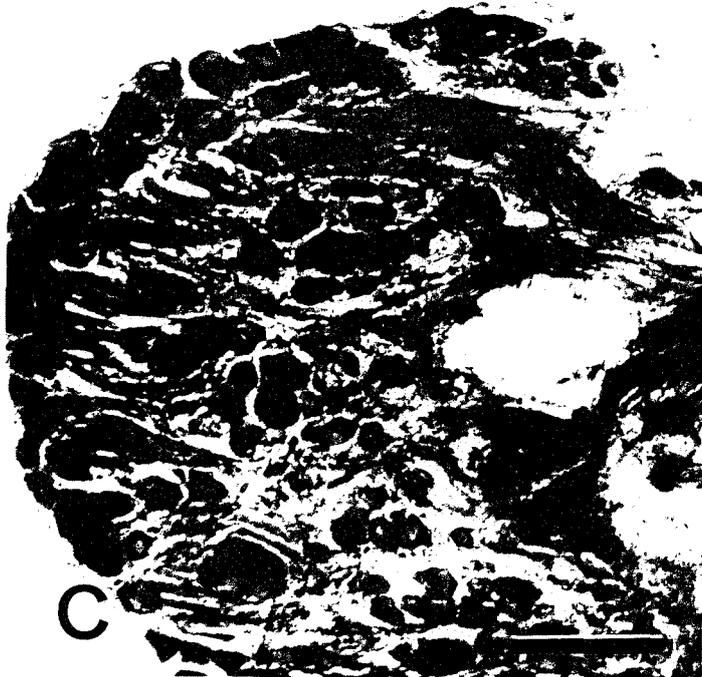
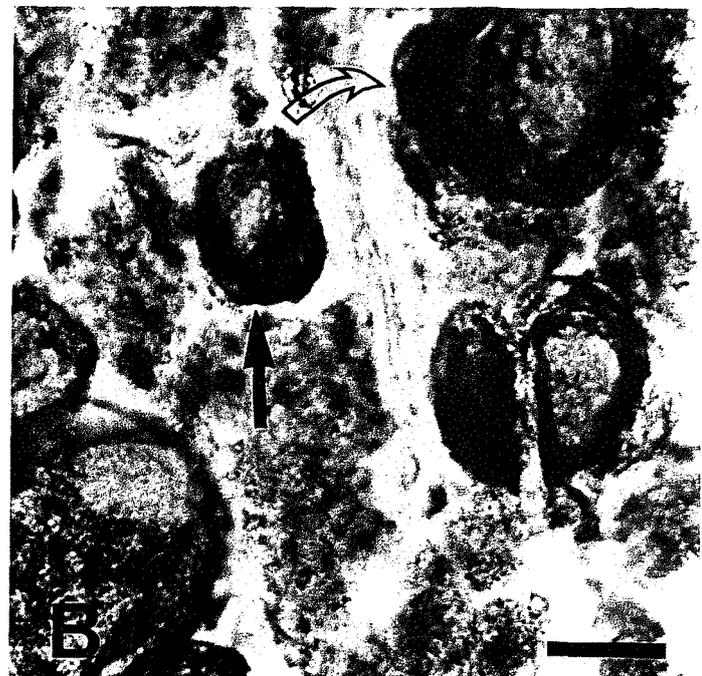
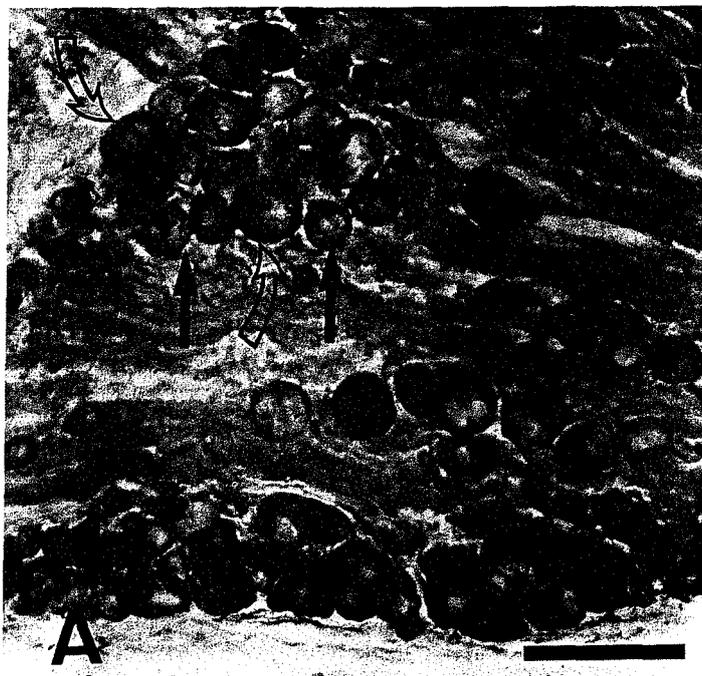


Fig. 45- Fotomicrografias de secções coronais da medula espinal lombar de tartaruga *Trachemys dorbigni* adulta mostrando a presença de atividade NADPH-diaforase em neurônios motores do corno ventral após 7 (**A**), 30 (**B**), 60 (**C**) e 90 (**D**) dias da secção do nervo ciático (setas). Note que esta atividade apresentou-se com um aspecto granular aos 7 dias, o qual se tornou uma coloração homogênea nos demais períodos apresentados, sendo esta reatividade intensa aos 90 dias. A secção da fotomicrografia **A** foi submetida a coloração de hematoxilina e eosina após o tratamento histoquímico da NADPH-diaforase. Barras de calibração: A: 70  $\mu$ m; B-D: 30  $\mu$ m.

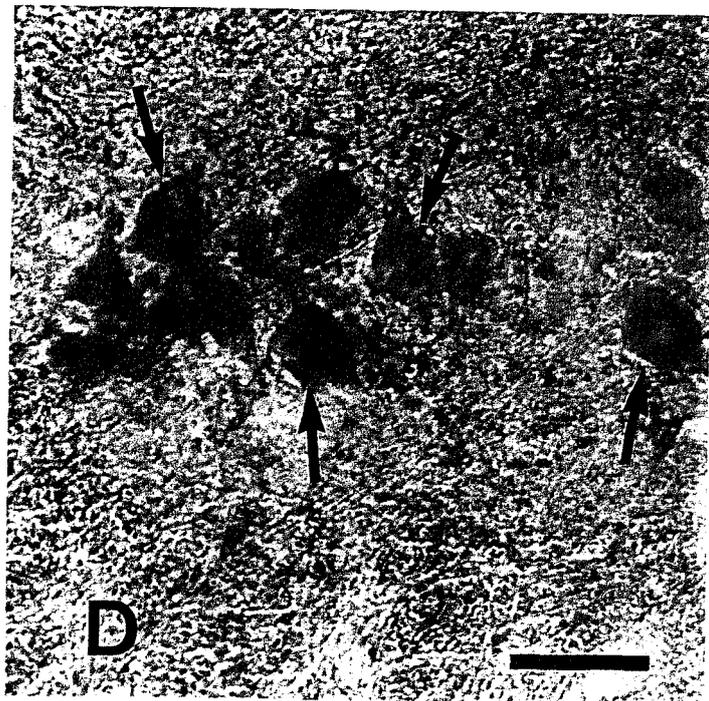
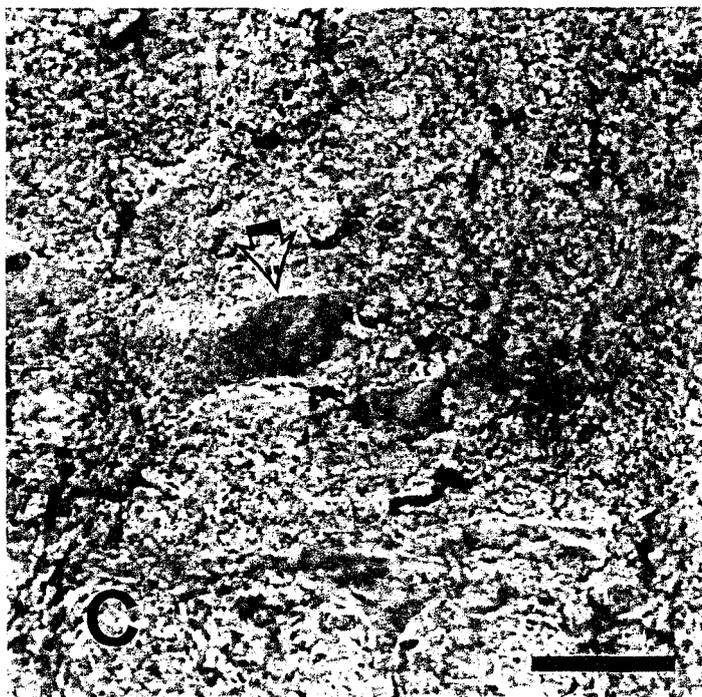
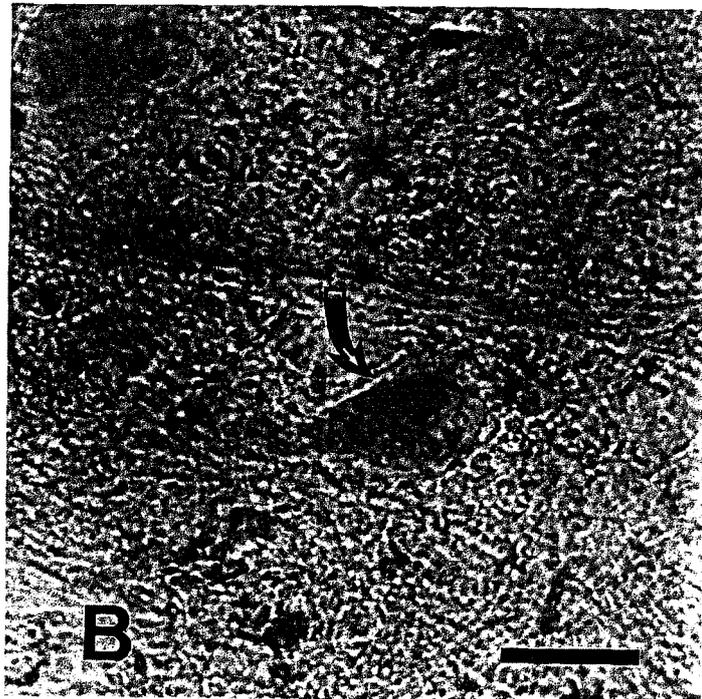
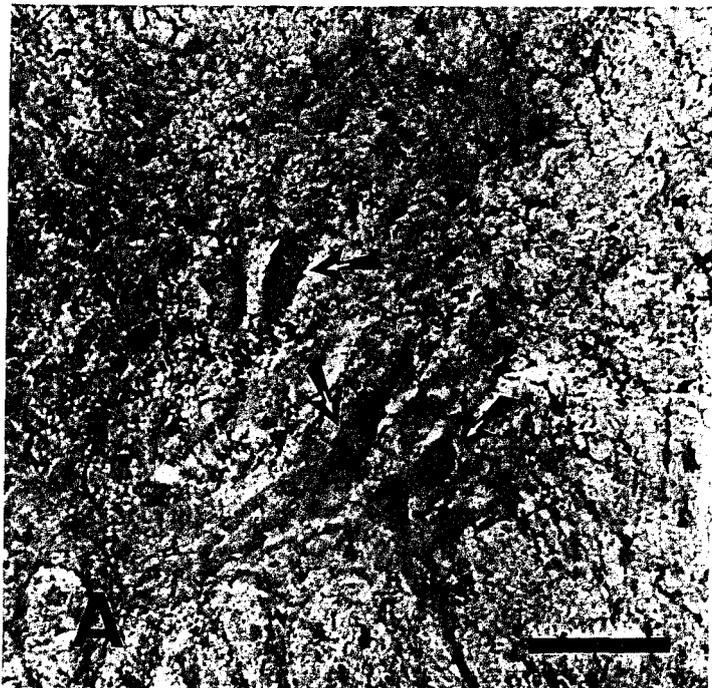


Fig. 46- Fotomicrografias de secções coronais da medula espinal lombar de tartaruga *Trachemys dorbigni* adulta mostrando o padrão de atividade da NADPH-diaforase após diferentes intervalos da secção do nervo ciático. **A**: Intensa reatividade nas áreas **Ia**, **Ib**, **II** e **III** após 15 dias do procedimento cirúrgico. Uma forte positividade é observada no neuropilo da substância cinzenta e nas células gliais deste segmento da medula espinal. **B**: Atividade NADPH-diaforase nas áreas **Ia**, **Ib** e **II** da medula espinal lombar após 90 dias da desnervação periférica. As setas indicam a presença de uma intensa reatividade em somas de motoneurônios do corno ventral. Barras de calibração: 200  $\mu$ m.

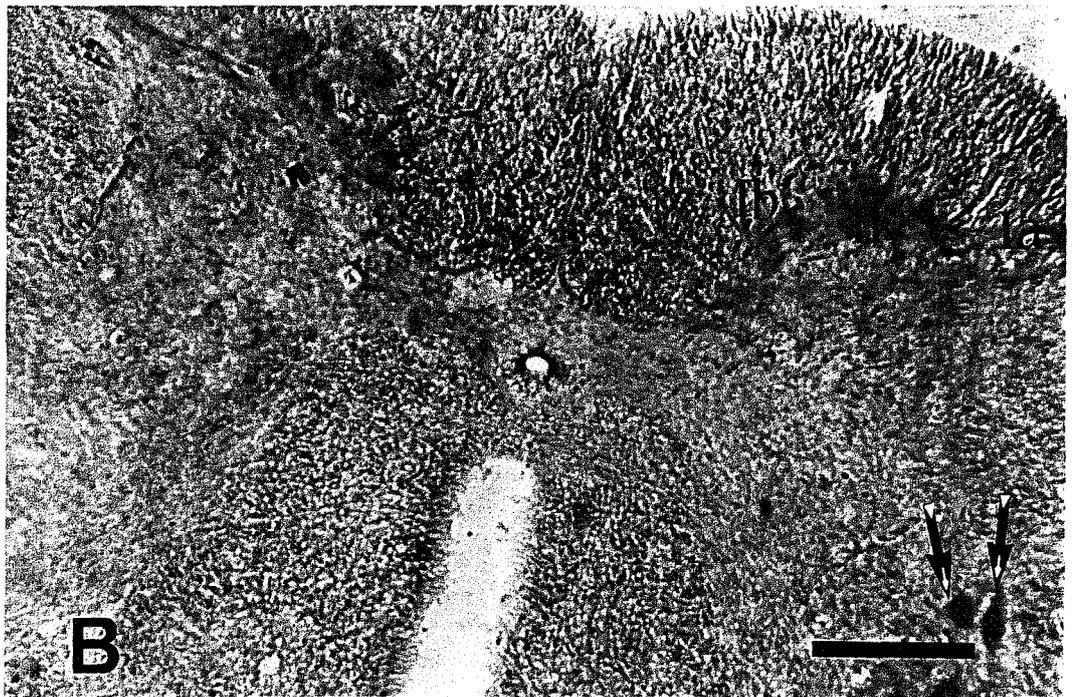
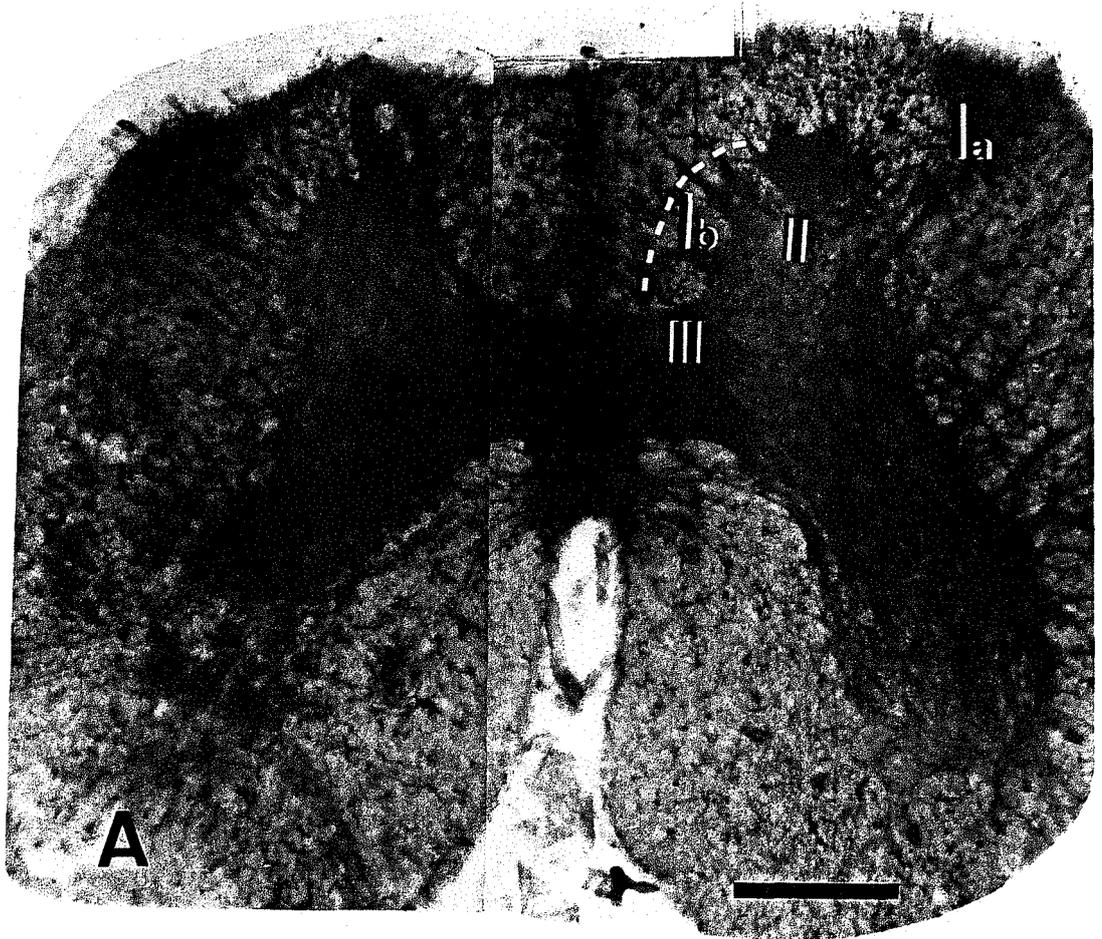
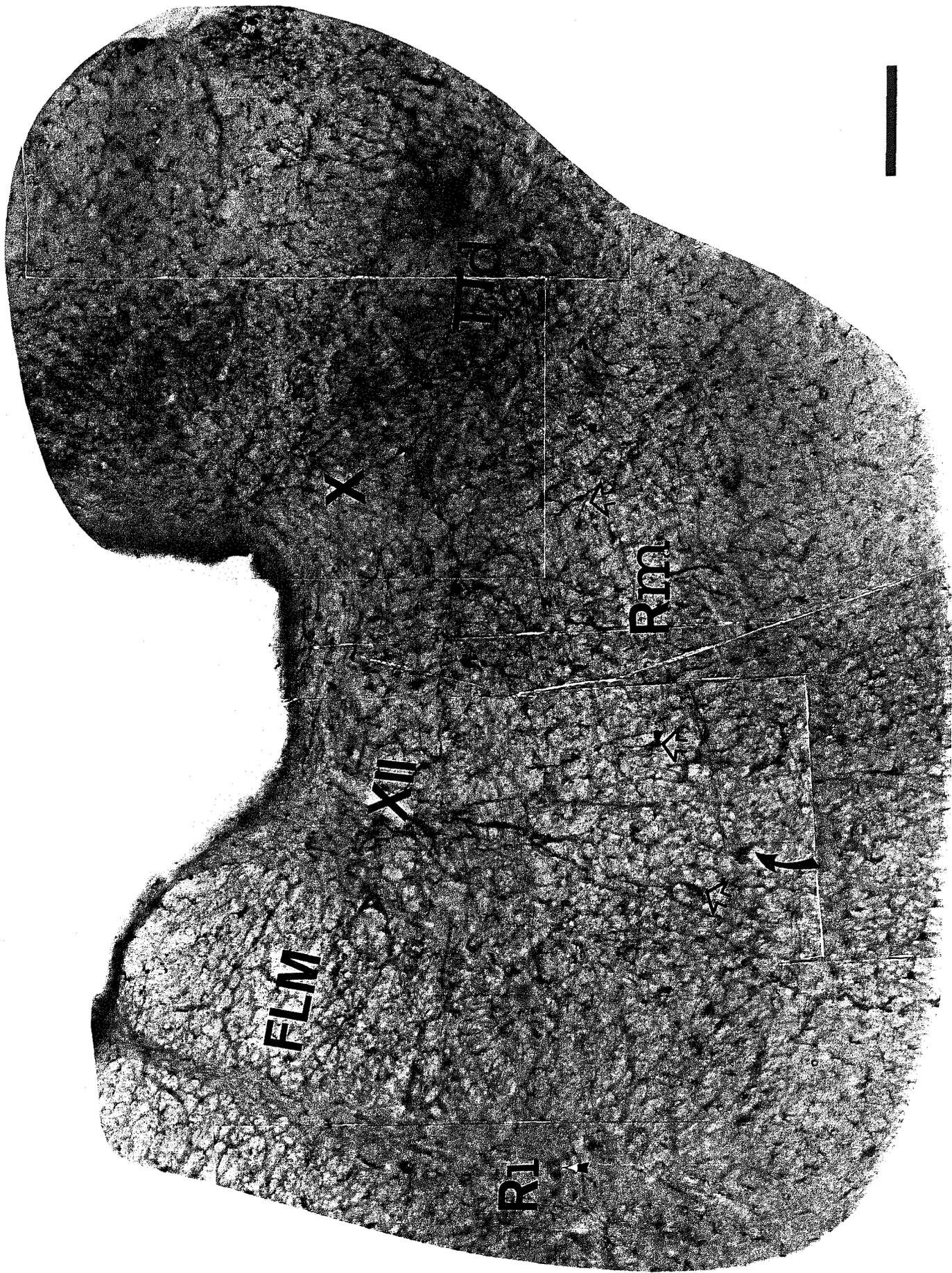


Fig. 47- Fotomontagem da medulla oblonga de tartaruga *Trachemys dorbigni* adulta mostrando o padrão de atividade da NADPH-diaforase em distintos núcleos após 15 dias da secção do nervo ciático. Observar a reação granular em alguns somas neuronais do núcleo reticular medial (seta cheia curva) e do núcleo inferior da rafe (cabeça de setas). Notar a reação homogênea (setas vazadas) em neurônios do núcleo reticular medial (**Rm**), dos núcleos do **X** e do **XII** pares cranianos, e do núcleo descendente do trigêmio (**TTd**). Notar a intensa reatividade das células gliais. **FLM**: Fascículo longitudinal medial; **Ri**: Núcleo inferior da rafe. Barra de calibração: 200  $\mu$ m.



FLM

XII

X

R1

RIM

TID



Fig. 48- Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de tartaruga *Trachemys dorbigni* adulta mostrando a presença de reação NADPH-diaforase em diversas regiões após a secção do nervo ciático. **A:** Reação granular em somas neuronais do núcleo mesencefálico do V par craniano após 30 dias da desnervação. **B:** Neurônios moderadamente reativos no núcleo do ístmo (setas) aos 15 dias da secção nervosa periférica. **C:** Atividade granular em soma neuronal (seta) localizado no núcleo reticular inferior após 15 dias da desnervação periférica. **D:** Neurônio (seta) com reação granular positiva no núcleo inferior da rafe aos 15 dias da secção do ciático. **E:** Atividade NADPH-diaforase granular em soma neuronal (seta) localizado no núcleo reticular inferior após 30 dias da desnervação periférica. **F:** Presença de grânulos positivos em neurônio do núcleo reticular inferior após 90 dias da secção nervosa periférica. Barras de calibração: A, C, D, E, F: 30  $\mu\text{m}$ ; B: 70  $\mu\text{m}$ .

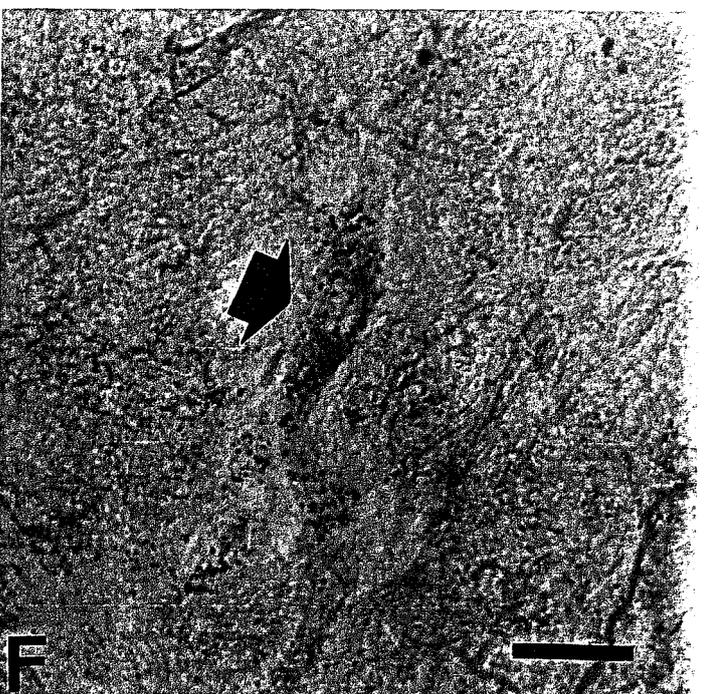
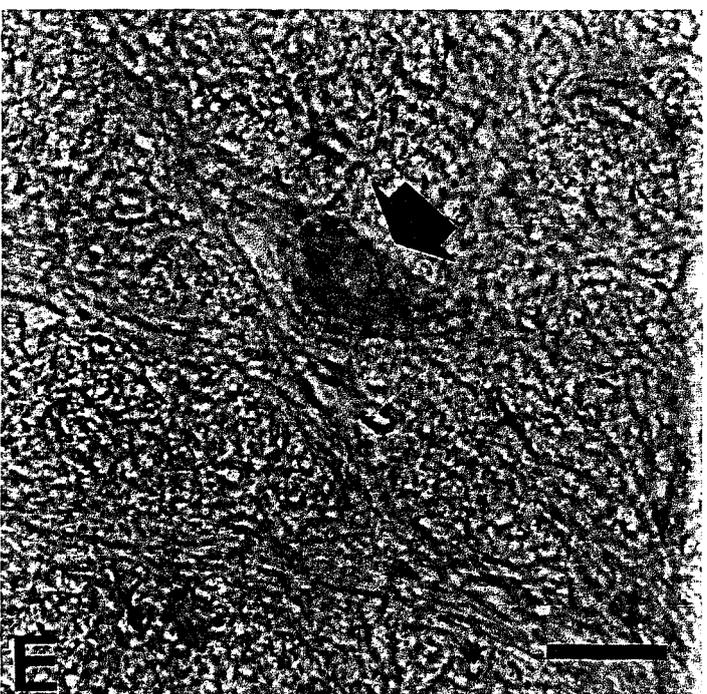
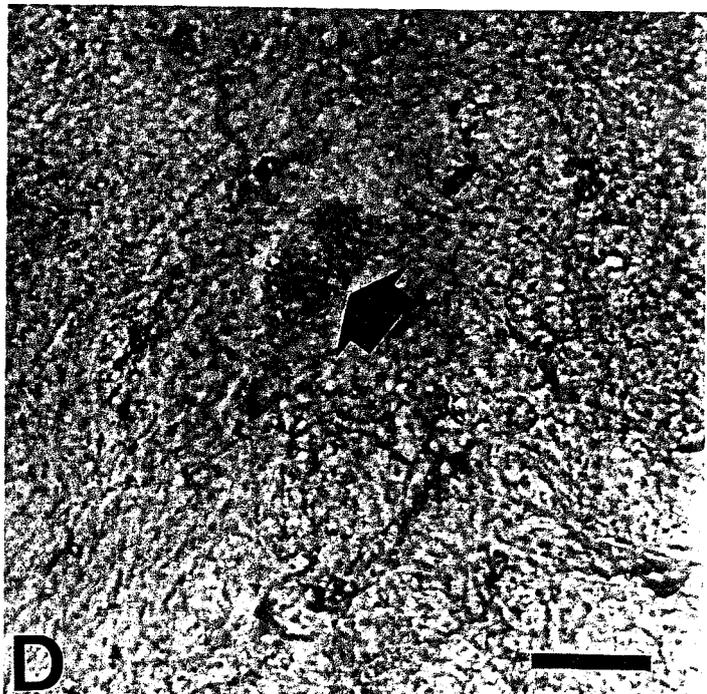
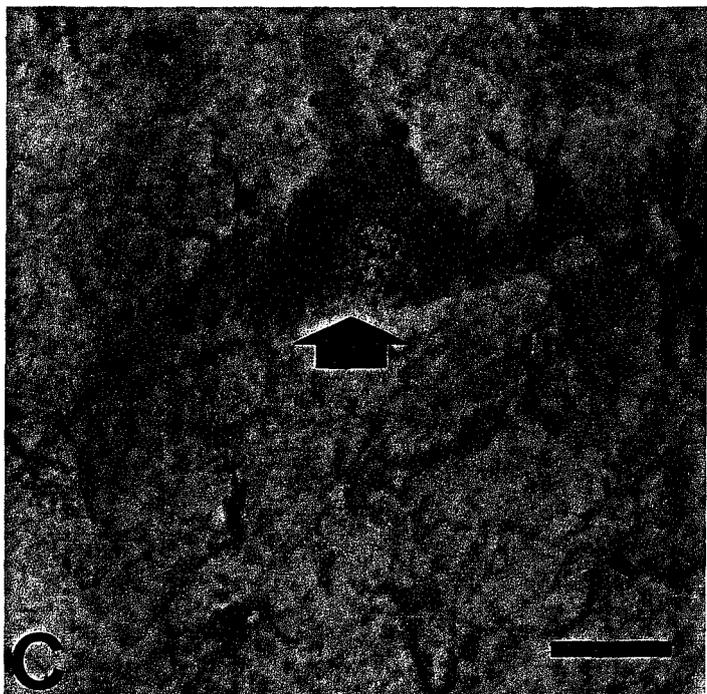
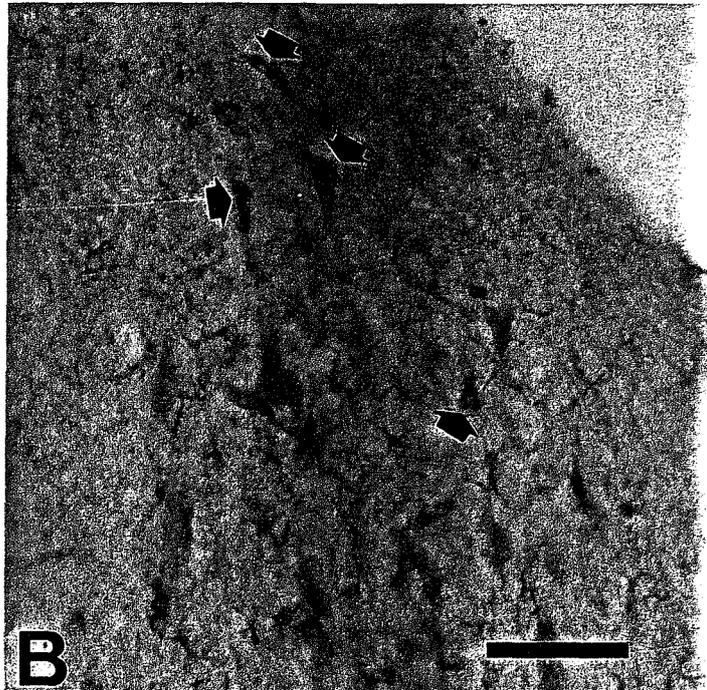
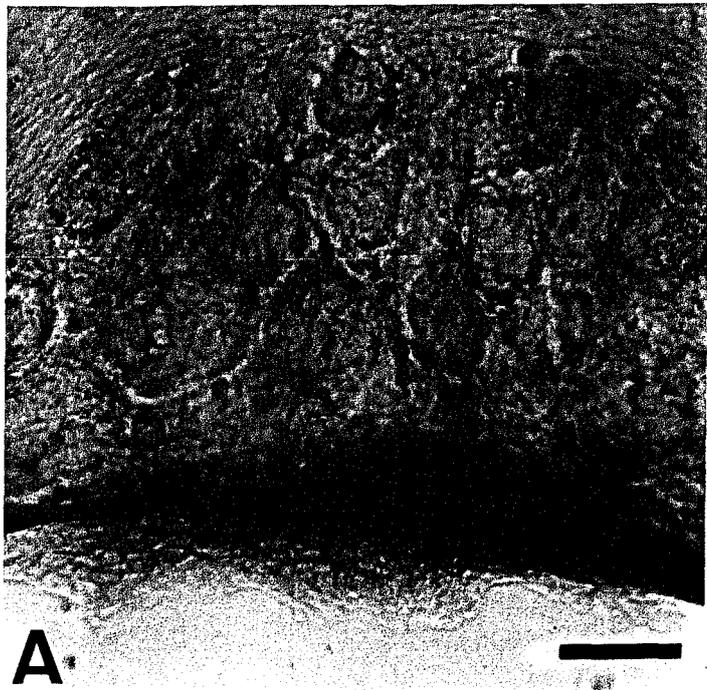


Fig. 49- Fotomicrografias de secções coronais de diversas regiões positivas ao procedimento histoquímico da NADPH-diaforase no encéfalo de tartaruga *Trachemys dorbigni* adulta submetida à secção do nervo ciático. **A:** Somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) de neurônios reativos na eminência ventricular dorsal do telencéfalo após 15 dias do procedimento cirúrgico. **B:** Reação positiva em somas (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) neuronais localizados na região do estriado aos 15 dias após a secção nervosa periférica. **C:** Atividade NADPH-diaforase em neurônios (setas) da eminência ventricular dorsal do telencéfalo após 60 dias da secção do ciático. **D:** Reação NADPH-diaforase em soma (seta) e prolongamento (cabeça de seta) de neurônio da região do estriado aos 60 dias da desnervação periférica. **E:** Neurônios positivos no núcleo dorso medial anterior do tálamo após 90 dias da secção nervosa periférica. **F:** Reação NADPH-diaforase nos prolongamentos de tanicitos localizados na região da eminência média aos 15 dias da secção do ciático. Barras de calibração: A-C: 70  $\mu$ m; D-F: 30  $\mu$ m.

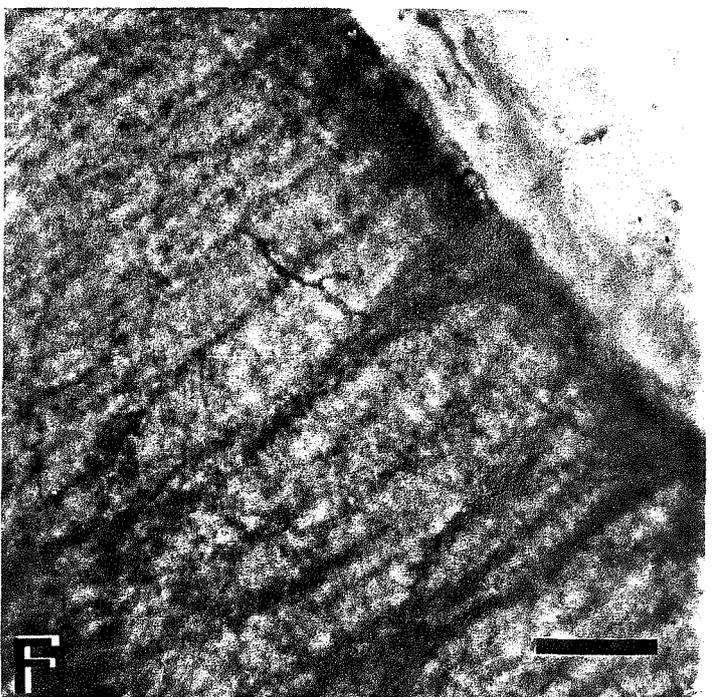
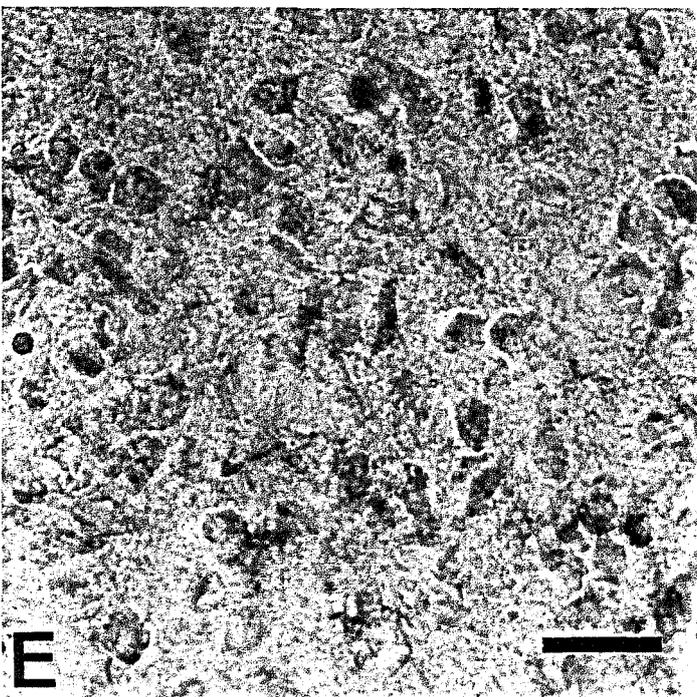
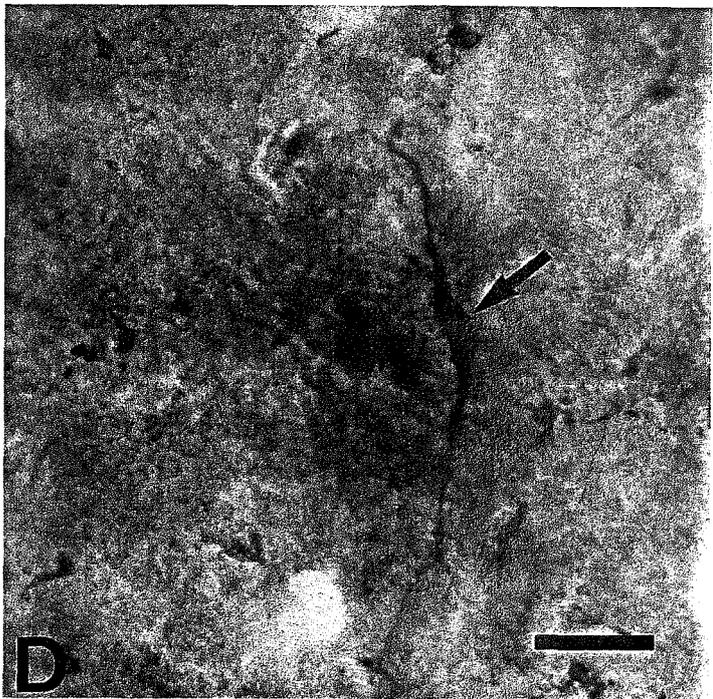
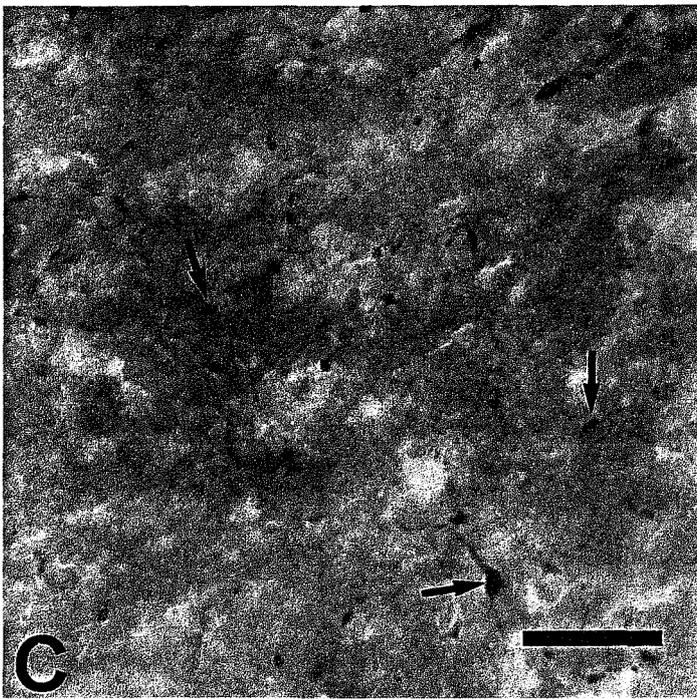
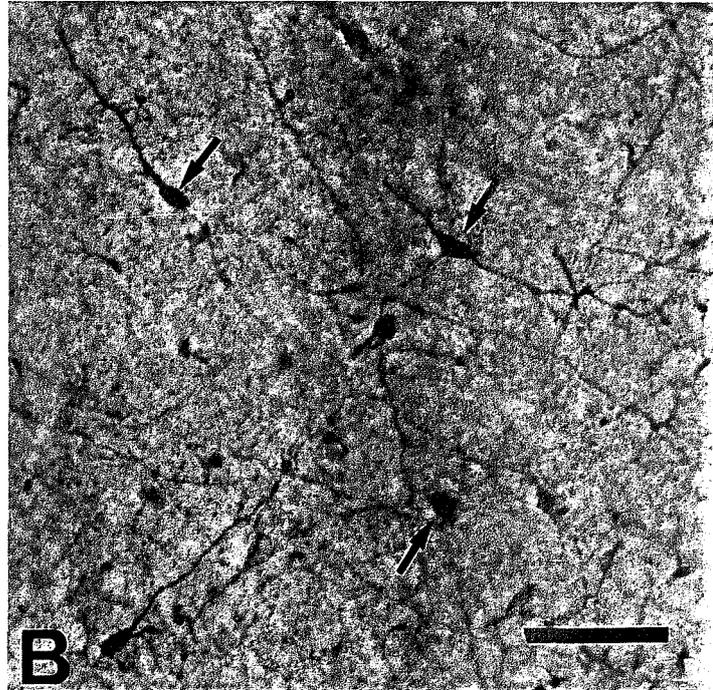
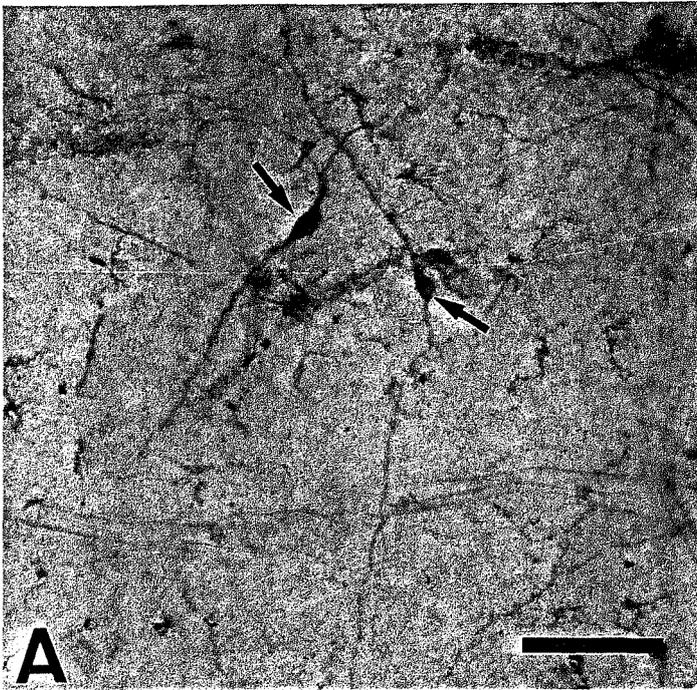


Fig. 50- Medula espinal lombar de tartaruga *Trachemys dorbigni* adulta, em condições basais. **A:** Vista topográfica de uma secção coronal desta região mostrando o predomínio da imunorreatividade da SP na área **Ia**. Esta imunorreatividade ainda é observada na área **III** e no corno ventral (setas), onde parece envolver os somas de motoneurônios, os quais se apresentam negativos. A área em destaque é apresentada na descrição da próxima fotomicrografia. **B:** Detalhe em maior aumento da área destacada anteriormente mostrando o padrão da SP nas fibras imunorreativas localizadas na área **Ia**. **C:** Vista topográfica de uma secção coronal da medula espinal lombar ressaltando a imunorreatividade das áreas **Ia** e **III** e a presença desta atividade no corno ventral deste segmento da medula (setas). A área em destaque mostra células imunorreativas a SP (cabeça de seta) localizadas na região da coluna lateral do corno dorsal (**LCDH**). **D:** Detalhe em maior aumento da área em destaque da fotomicrografia anterior mostrando a imunorreatividade de neurônios (cabeças de setas) da área **III**. As áreas **II** e **Ib** não possuem fibras imunorreativas. Barras de calibração: A, C: 200  $\mu$ m; B, D: 70  $\mu$ m.

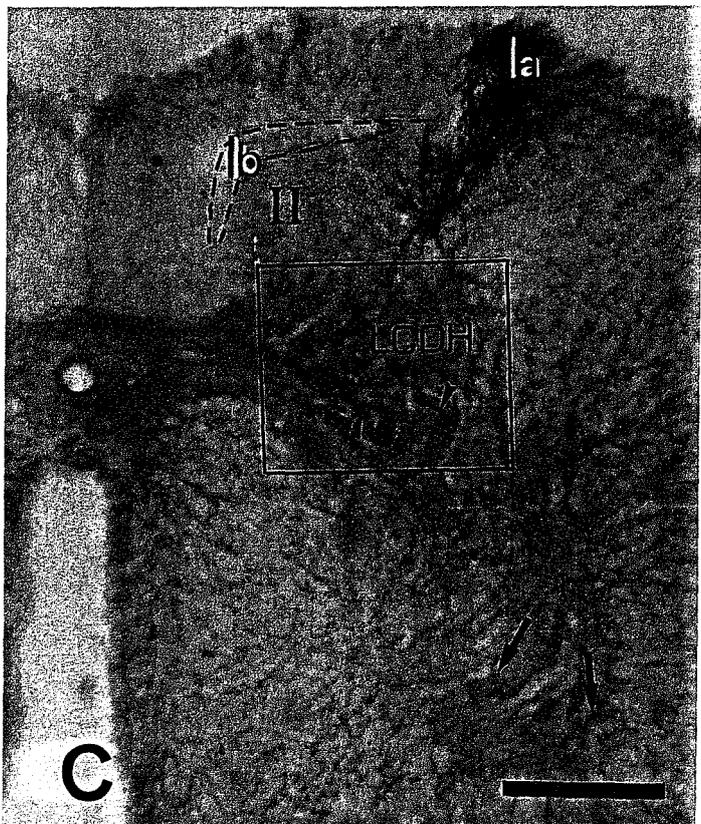
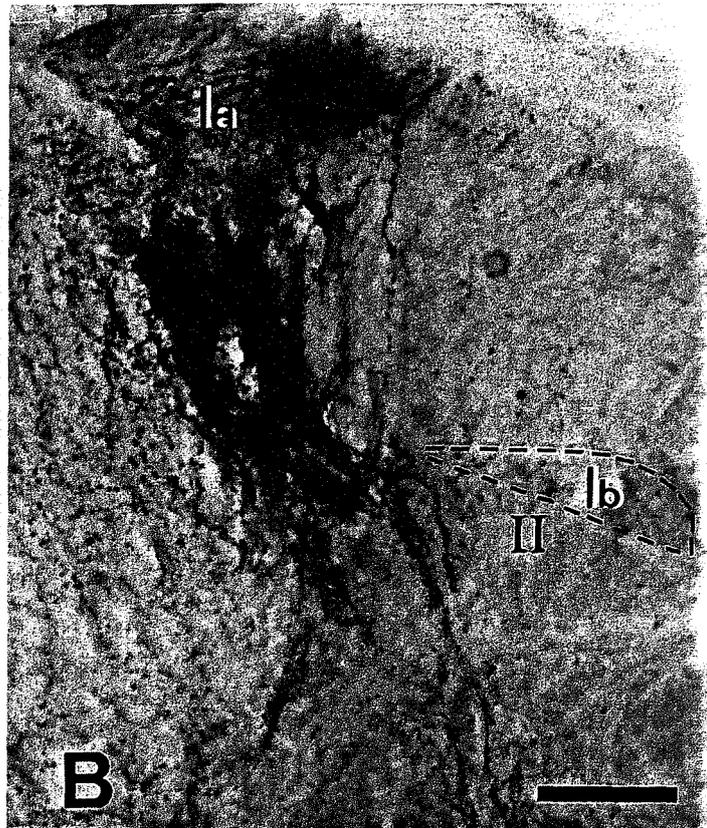
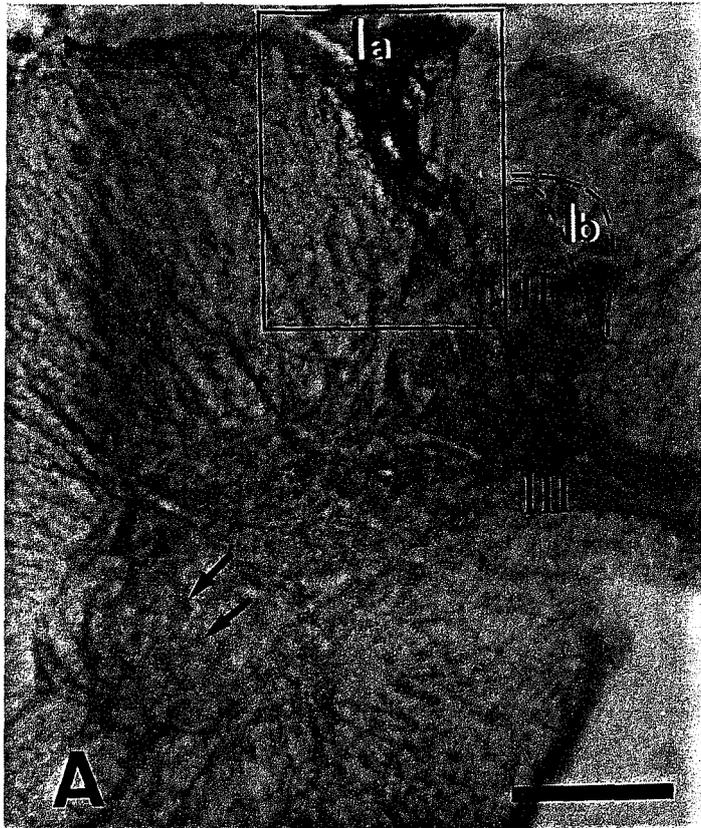


Fig. 51- Fotomicrografias de vistas topográficas de secções coronais da medula espinal lombar de tartaruga *Trachemys dorbigni* adulta mostrando o padrão de imunorreatividade à SP em animais em condições basais (**A**) e após 7 (**B**) e 15 (**C**) dias da secção do nervo ciático. Observe que este peptídeo está presente em fibras longas e curtas da área **Ia**. As fibras longas chegam até a área **III**. Entretanto, a secção nervosa periférica provocou uma redução na quantidade das fibras longas imunorreativas no lado ipsilateral à desnervação (seta). As áreas **II** e **Ib** apresentaram-se sempre negativas. Barra de calibração: A-C: 200  $\mu$ m.

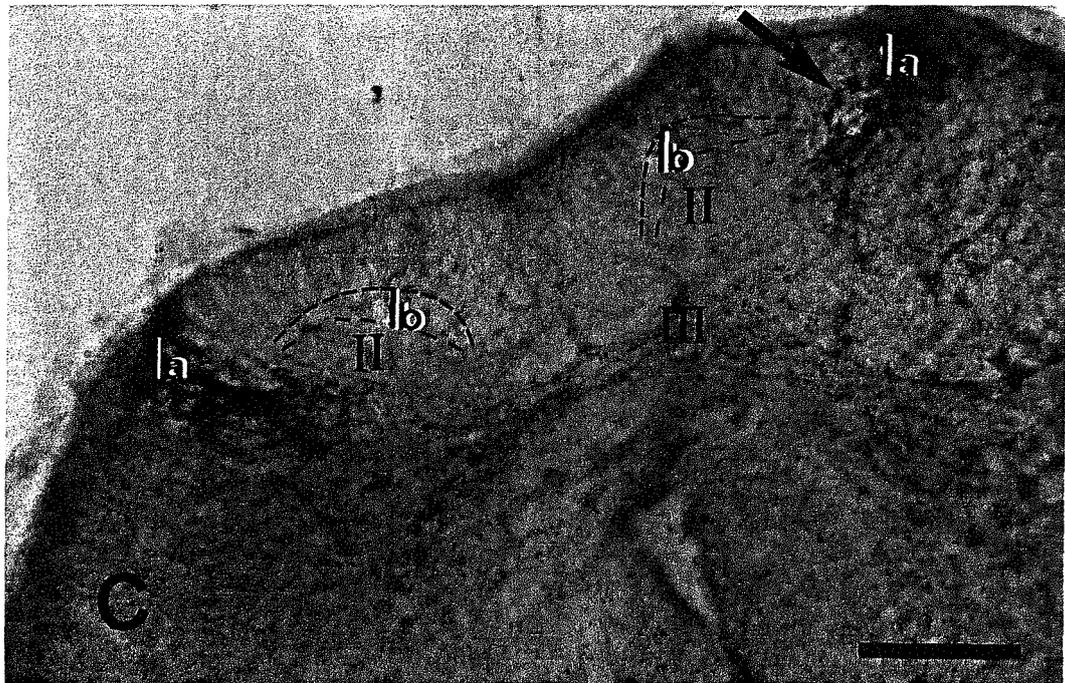
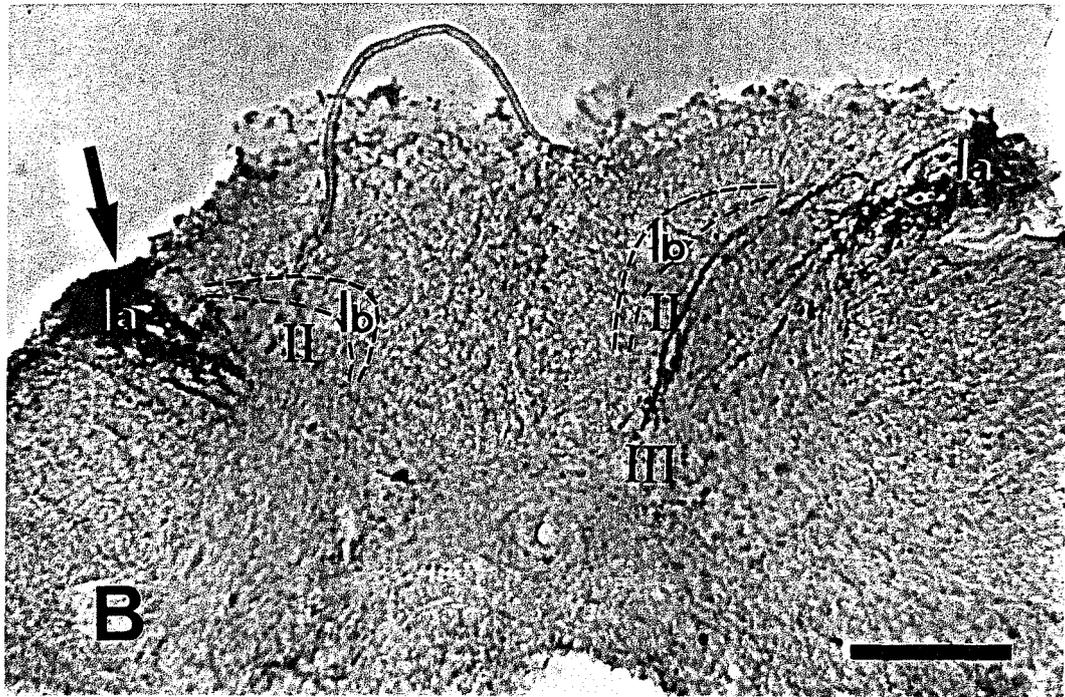
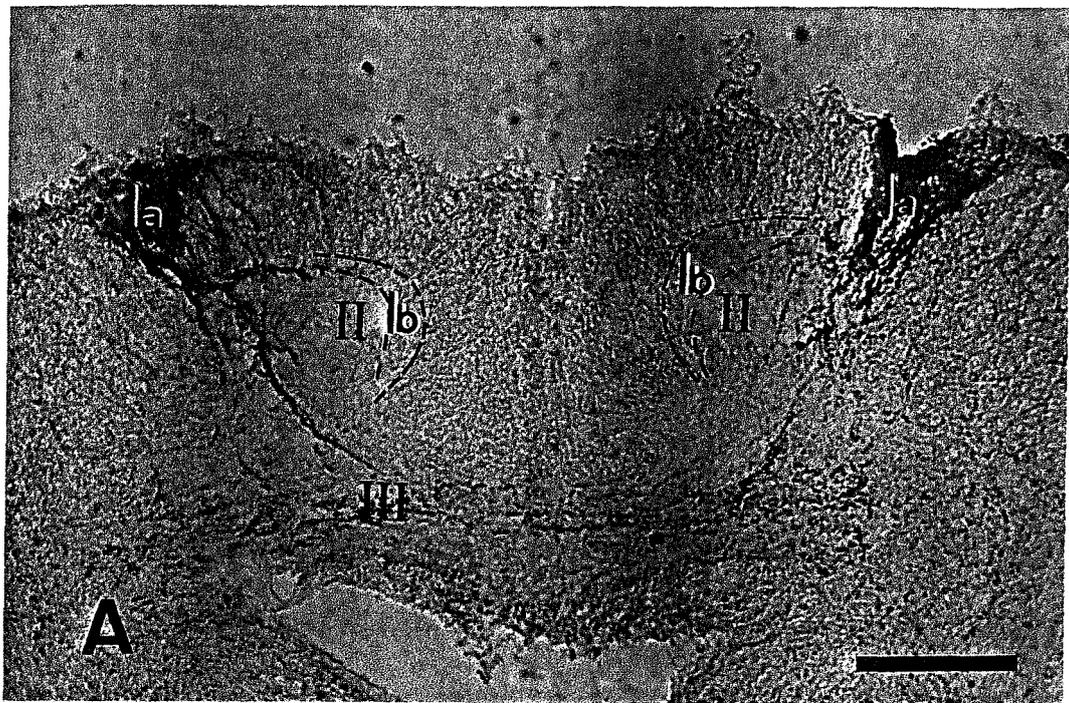
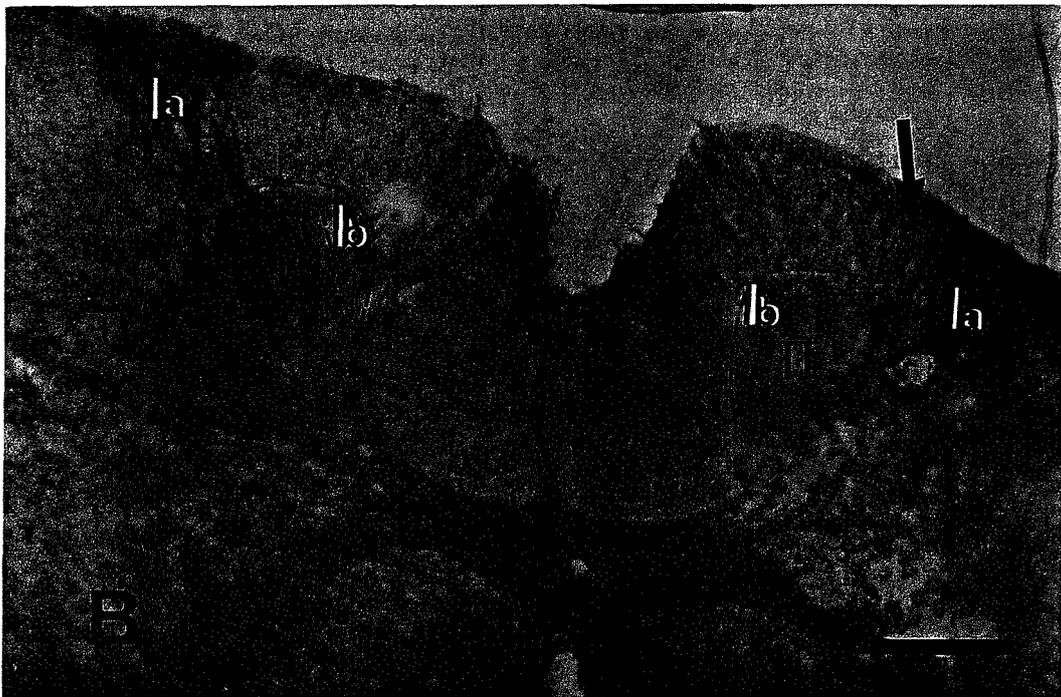
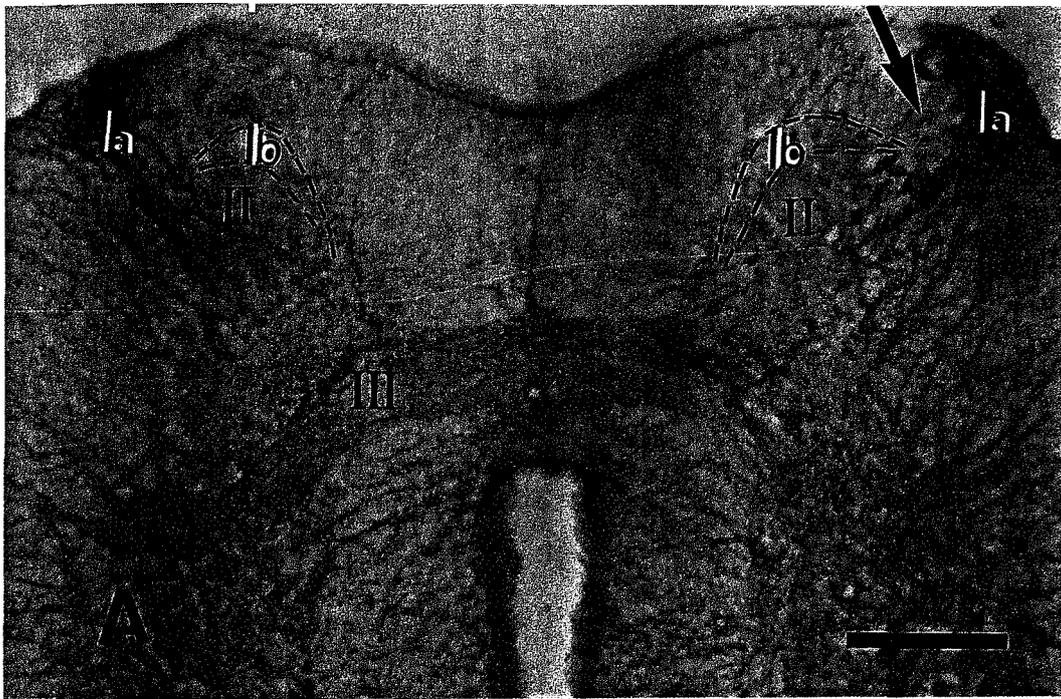


Fig. 52- Fotomicrografias de vistas topográficas de secções coronais da medula espinal lombar de tartaruga *Trachemys dorbigni* adulta mostrando o padrão de imunorreatividade da SP após 30 (A), 60 (B) e 90 (C) dias da secção do nervo ciático. Notar que a quantidade de fibras longas imunorreativas que chegam a área III apresentou-se reduzida no lado ipsilateral à secção nervosa periférica (seta) nos períodos de 30 e 60 dias, porém ocorreu uma recuperação após os 90 dias da desnervação. As áreas II e Ib da medula espinal lombar apresentaram-se sempre negativas. Barras de calibração: A-C: 200 µm.



Edula  
grão  
do  
que  
osa  
ma  
edula  
A-C:

**DISCUSSÃO**

Distribuição da atividade glicogênio fosforilase e citocromo oxidase no sistema nervoso central de *Trachemys dorbigni*, adultas, em condições basais

Este estudo constatou a presença e a distribuição das enzimas glicogênio fosforilase e citocromo oxidase no encéfalo e na medula espinal cervical alta de tartarugas *Trachemys dorbigni*, em condições basais. As reações positivas localizaram-se em diversas áreas do sistema nervoso central. Suas distribuições ao longo deste tecido apresentaram-se muito similares, sendo estas exatamente as mesmas para a glicogênio fosforilase total e a glicogênio fosforilase a. Esta semelhança também foi observada em ratos (COOPERSMITH & LEON, 1987; HARLEY & BIELAJEW, 1992).

De um modo geral, a reação glicogênio fosforilase mostrou-se intensa em praticamente todas as áreas positivas, enquanto a atividade citocromo oxidase foi muito variável. É bem provável que esta resposta enzimática esteja representando a atividade metabólica destes neurônios, pois um conceito fundamental do mapeamento metabólico é que a utilização energética do tecido nervoso está acoplada à atividade funcional dos neurônios (DIROCCO et al., 1989; ERECINSKA & SILVER, 1989).

Está bem demonstrado na literatura que a atividade citocromo oxidase é determinada pela intensidade do metabolismo oxidativo (Fig. 2, 3), enquanto aquela da glicogênio fosforilase representa o metabolismo glicolítico (Fig. 1). Deste modo, parece lícito sugerir que tanto o metabolismo oxidativo como o glicolítico são responsáveis pela demanda funcional em praticamente as mesmas regiões do sistema

nervoso central da tartaruga *Trachemys dorbigni*. É provável que a preponderância de uma ou outra via dependerá das condições metabólicas favoráveis ou não à sua maior expressão. Por exemplo, quando o animal se encontrar em condições aeróbicas, deverá prevalecer o metabolismo oxidativo. Porém, em condições hipóxicas ou anóxicas, deve predominar a via glicolítica. É sabido que a sobrevivência do tecido nervoso de tartarugas anóxicas resulta da redução da taxa metabólica e da ativação do metabolismo glicolítico (LUTZ et al., 1985).

As tartarugas passam normalmente por situações de hipóxia ou anoxia, as quais ocorrem durante o período de hibernação e, às vezes, durante a alimentação. Estes animais alimentam-se dentro d'água, permanecendo um tempo considerável mergulhados durante essa atividade. Gregory (1982) relatou que as tartarugas aquáticas freqüentemente se enterram na lama, no fundo de lagos ou debaixo de detritos durante a hibernação, sendo estes locais com pouca ou nenhuma disponibilidade de oxigênio. Nesta situação, ocorre um aumento da concentração do ácido láctico circulante, indicando a utilização de vias anaeróbicas para a manutenção da produção de ATP (JOHLIN & MORELAND, 1933; ULTSCH & JACKSON, 1982; ULTSCH et al., 1985). A tartaruga *Chrysemys dorbigni* apresentou maiores períodos de mergulho voluntário durante o inverno (SANTOS et al., 1990). Além disso, foi difícil sua captura nesta época do ano (PARTATA, 1992).

Durante mergulhos voluntários rotineiros de tartarugas, a pressão parcial do oxigênio das artérias pode cair até aproximadamente 20 torr (LUTZ, 1992). Esta situação provavelmente não ocasionará mudanças no consumo de ATP (LUTZ et al.,

1985). Cálculos da produção anaeróbica de ATP indicam que a glicólise é estimulada no início do período hipóxico (LUTZ et al., 1984; KELLY & STOREY, 1988), sendo esta capaz de sustentar a produção normal, ou praticamente normal, de ATP, apesar da redução da fosforilação oxidativa. A baixa afinidade da citocromo oxidase encefálica de tartarugas ao oxigênio, quando comparada com aquela de ratos, poderia facilitar a estimulação compensatória inicial da glicólise (SICK et al., 1982; LUTZ et al., 1985). Já quando a anoxia é estabelecida, há uma depressão da atividade metabólica do animal, a qual possibilita sua sobrevivência apesar do baixo rendimento energético da glicólise anaeróbica (KELLEY & STOREY, 1988).

Contudo, a maior expressão da via glicolítica ou da via oxidativa não induz necessariamente à inibição imediata da outra rota metabólica. Em encéfalo de tartarugas, a transição para a anoxia é acompanhada de um acréscimo da concentração de lactato e uma diminuição das reservas de fosfocreatina, as quais ocorrem antes da redução total da atividade da citocromo oxidase (LUTZ et al., 1984). Este resultado indica a ativação da glicólise quando ainda a via oxidativa encontra-se atuante, ou seja, demonstra um paralelismo entre as duas rotas para a produção de ATP. De acordo com Lutz et al. (1985), estes dados também sugerem a inexistência do conhecido efeito Pasteur em tecido nervoso intacto de tartarugas, muito embora Robin et al. (1979) não tenham observado este padrão de resposta em fatias deste tecido de tartarugas. Porém, estes últimos autores sugerem que o estado redox da citocromo oxidase poderia controlar o começo da glicólise anaeróbica, uma vez que a atividade desta enzima mostra-se variável ao longo do período de mergulho voluntário de tartarugas.

Com base nestes conhecimentos, fica explícita a existência de uma provável inter-relação entre atividade citocromo oxidase e glicogênio fosforilase. A similaridade na distribuição destas enzimas no encéfalo da tartaruga *Trachemys dorbigni* favorece a existência de uma relação íntima entre ambas, mas, ao mesmo tempo, demonstra a necessidade de estudos mais detalhados sobre o metabolismo hipóxico e anóxico das tartarugas.

É interessante destacar que a distribuição da glicogênio fosforilase e da citocromo oxidase apresentaram-se similar àquela do glicogênio (PARTATA & ACHAVAL-ELENA, 1995). Todavia, as enzimas tiveram uma distribuição mais ampla do que a do polissacarídeo. Esta diferença é particularmente interessante no telencéfalo. Nesta região, a reatividade glicogênio fosforilase ocorreu em todas as camadas corticais e na região do estriado, porém, o glicogênio foi encontrado apenas na camada de células piramidais. Esta maior expressão da enzima também foi observada no neopálio de alguns representantes da ordem Rodentia (SHIMIZU & OKADA, 1957). É intrigante esta diferença entre enzima e substrato, mas pode-se suspeitar que elas tenham sido conseqüências do estresse produzido durante a manipulação do animal para a obtenção dos tecidos. É sabido que a reserva glicogênica do encéfalo é rapidamente mobilizada após a morte do animal, sendo, inclusive, mais rápida em algumas áreas do que em outras (IBRAHIM, 1975). Esta susceptibilidade do glicogênio encefálico poderia ser responsável pelas diferenças observadas na distribuição deste polissacarídeo e de sua respectiva enzima de degradação.

Apesar destas disparidades, nota-se uma similaridade na distribuição do glicogênio e da glicogênio fosforilase. O glicogênio parece constituir uma importante fonte de energia para o encéfalo de tartarugas. O tratamento destes animais com iodoacetato, um inibidor da via glicolítica, ocasionou diminuição no tempo de sobrevivência à anoxia (BELKIN, 1962). Além disso, há uma queda do conteúdo glicogênico encefálico de alguns representantes dos répteis, dos peixes e dos ciclóstomas durante hipoglicemia decorrente da administração de insulina (PLISETSKAYA, 1968). Em *Chrysemys dorsalis*, observou-se uma diminuição acentuada na reserva glicogênica do encéfalo após 72 horas da administração periférica de insulina, havendo também uma tendência de sua redução após 30 dias de jejum (PARTATA, 1992). Assim, a similaridade na distribuição do glicogênio e da glicogênio fosforilase, além de reforçar o papel energético proposto para o glicogênio, garante sua mobilização para o fornecimento de moléculas de glicose quando for necessário.

A distribuição da glicogênio fosforilase e da citocromo oxidase da tartaruga em estudo foi similar àquela descrita em ratos (HARLEY & BIELAJEW, 1992). Este resultado é muito interessante, uma vez que, em mamíferos, os astrócitos constituem o sítio primário de deposição do glicogênio encefálico (CATALDO & BROADWELL, 1986; MAGISTRETTI et al., 1993), e o principal local de captação e processamento da glicose até lactato ou alanina (DRINGEN et al., 1993a; b; TSACOPOULOS & MAGISTRETTI, 1996). Na tartaruga, ao contrário, a reserva glicogênica do tecido nervoso prevalece nos neurônios (PARTATA & ACHAVAL-ELENA, 1995). É possível que esta diferença seja consequência do menor número de

células gliais para um dado soma neuronal de determinado tamanho que existe nos répteis quando comparados com os mamíferos (PANNESE et al., 1975). Deste modo, pode-se sugerir que as células gliais tenham pouca ou nenhuma participação nos eventos metabólicos do tecido nervoso de tartarugas, sendo provável que a conquista deste papel funcional da glia ocorreu durante o processo evolutivo dos mamíferos, como consequência do aumento em seu número. Entretanto, deve-se considerar também a possibilidade de que a relação entre neurônio e células gliais já tenham um papel significativo nas tartarugas, porém prevalecendo ainda a representação neuronal nestes eventos. Contudo, o esclarecimento desta questão necessita da demonstração da relação metabólica entre neurônios e células gliais no sistema nervoso central de tartarugas e de outros representantes dos vertebrados.

Todavia, a similaridade na distribuição das enzimas glicogênio fosforilase e citocromo oxidase no tecido nervoso de tartarugas e ratos permite a especulação de que provavelmente tais semelhanças também ocorram entre tartarugas e outros representantes dos vertebrados. Porém, até o presente momento, é impossível responder a esta questão, pois, como apresentado na introdução desta tese, ainda é muito pequena a representatividade dos estudos de mapeamento destas enzimas entre os vertebrados. Contudo, sabe-se que a atividade citocromo oxidase apresenta-se muito variada entre as diversas espécies de mamíferos estudadas (KAGEYAMA & WONG-RILEY, 1982; KAGEYAMA & WONG-RILEY, 1986; KISH et al., 1992; HEVNER et al., 1993; HEVNER et al., 1995), enquanto a glicogênio fosforilase parece variar de acordo com a idade do animal (SHIMIZU & OKADA, 1957). É provável que estas variações representem a necessidade de cautela nas conclusões dos

estudos de atividade destas enzimas em diferentes espécies. Assim sendo, os resultados de um dado animal qualquer não devem ser generalizados para outras espécies, pois podem expressar apenas a atividade do animal em questão. Deste modo, os resultados referentes à tartaruga *Trachemys dorbigni* não devem ser tomados como representativo das tartarugas, muito embora possa ser considerado como ponto de referência para posteriores estudos metabólicos do sistema nervoso central desses animais. A realização do mapeamento da glicogênio fosforilase e da citocromo oxidase em outras espécies de tartarugas trarão maiores esclarecimentos sobre o seu metabolismo encefálico local.

Todavia, merece destaque, neste momento, os resultados experimentais de Xia et al. (1992), os quais demonstraram que a atividade citocromo oxidase do encéfalo da tartaruga *Pseudemys scripta elegans* foi menor do que aquela obtida neste tecido de ratos adultos e recém-nascidos. Na tartaruga, as áreas mais reativas foram o córtex, o núcleo central da eminência ventricular dorsal do telencéfalo e o paleoestriado augmentatum, enquanto em ratos, tanto adulto como recém-nascido, a maior positividade localizou-se nas regiões da amígdala, do hipotálamo e do cerebelo. Estes resultados mostram diferenças entre a atividade citocromo oxidase em encéfalo de tartarugas e de ratos. Outros estudos também relatam a existência de diferenças na atividade desta enzima nestas espécies. Em condições normóxicas, a atividade da citocromo oxidase apresentou-se mais reduzida em encéfalo de tartarugas do que em ratos (SICK et al., 1982). Além disso, a relação entre tensão do oxigênio e a frequência redox da citocromo oxidase foi menor em encéfalo de tartarugas do que neste tecido de ratos, o que sugere que o estado redox da citocromo oxidase é menos

sensível às mudanças da tensão do oxigênio em tartarugas do que em ratos (LUTZ et al., 1985).

Todas as áreas que apresentaram atividade citocromo oxidase em *Pseudemys scripta elegans* (XIA et al., 1992), também foram positivas em *Trachemys dorbigni*. Entretanto, a comparação entre estes resultados é praticamente impossível, pois a atividade citocromo oxidase da primeira espécie de tartaruga foi obtida principalmente por método bioquímico, não havendo uma descrição detalhada das áreas encefálicas que apresentaram positividade à detecção histoquímica desta enzima.

Todavia, os resultados aqui obtidos podem ser comparados com os dados referentes às conexões sinápticas do tecido nervoso dos répteis, assim permitindo a associação da atividade das enzimas glicogênio fosforilase e citocromo oxidase com as funções sensoriais e motoras da tartaruga *Trachemys dorbigni*.

Nesta espécie de tartaruga, os glomérulos olfativos foram positivos à citocromo oxidase, mas negativos à glicogênio fosforilase. Esta última enzima foi encontrada na camada de fibras aferentes e na camada granular. Entretanto, em *Chrysemys dorbigni*, a reserva glicogênica do bulbo olfatório localizou-se nos glomérulos e na camada de fibras aferentes (PARTATA & ACHAVAL-ELENA, 1995). É interessante esta diferença na distribuição da glicogênio fosforilase e do glicogênio. Todavia, isto também foi observado com a enzima de síntese deste polissacarídeo no encéfalo de ratos. Nestes animais, a maior concentração glicogênica localizou-se no mesencéfalo e no diencéfalo (SVORAD, 1958; 1959), enquanto a

imunorreatividade à glicogênio sintetase predominou nas áreas do hipocampo, neocórtex cerebral, estriado e córtex cerebelar (INQUE et al., 1988). Nenhuma explicação foi encontrada para estas divergências, porém, merece ser destacado aqui que os padrões de distribuição das enzimas glicogênio fosforilase e citocromo oxidase do bulbo olfatório de tartarugas foi similar àquele descrito em ratos (COOPERSMITH & LEON, 1987; HEVNER et al., 1995).

É sabido que a região cortical destes animais mostra-se bem diferenciada, tendo áreas especializadas no recebimento de projeções olfativas, visuais, somatossensoriais e auditivas. Em tartarugas e crocodilos, as aferências visuais, somatossensoriais e auditivas possuem representatividade principalmente na região médio-rostral do córtex dorsal, porém podem também finalizar no córtex medial. As vias olfativas projetam-se principalmente para o córtex piriforme ou lateral, embora também ocorram pequenas terminações no córtex medial (BELEKHOVA, 1979). Como todas estas áreas apresentaram atividade das duas enzimas consideradas, parece lícito sugerir a participação de ambas nas funções corticais.

Deve ser destacado, neste momento, que a atividade citocromo oxidase do córtex de *Trachemys dorbigni* mostrou-se similar àquela descrita em lagartos, muito embora tenha ocorrido algumas pequenas diferenças. Nos lagartos, houve poucas células positivas na camada piramidal, enquanto em *Trachemys dorbigni* observaram-se inúmeros neurônios moderadamente reativos. A camada molecular do córtex desta tartaruga apresentou-se dividida em duas zonas, sendo a mais superficial com intensa reatividade e a outra com positividade moderada, porém com esparsas células reativas

(REGIDOR & POCH, 1988). Já em lagartos, a camada molecular mostrou-se subdividida em três zonas. A mais superficial praticamente não apresentou reatividade, sendo esta muito moderada na zona intermediária e intensa na zona adjacente à camada de células piramidais. Neste animal, a camada plexiforme é que se mostrou dividida em duas zonas, sendo aquela logo abaixo da camada de células piramidais fortemente reativa, enquanto a outra foi negativa, mas se observaram escassas células com reação positiva. Na tartaruga também observou-se este padrão laminar, porém sem células reativas. No córtex piriforme das tartarugas, detectaram-se neurônios com atividade citocromo oxidase. Entretanto, em lagartos, esta região mostrou-se negativa à detecção histoquímica desta enzima (REGIDOR & POCH, 1988). É possível que estes resultados indiquem diferenças entre as espécies. Todavia, deve ser também considerada a possibilidade de que estas tenham resultado de alterações metabólicas decorrentes da manipulação dos animais no momento de sua utilização experimental (WONG-RILEY, 1989). O estresse ocasionado pela manipulação poderia suprimir ou estimular a atividade citocromo oxidase nas diferentes áreas corticais, explicando as pequenas variações observadas.

Em répteis, as aferências ao núcleo rotundus provém do tecto óptico (pelo tracto tecto-talâmico) e suas eferências transitam pelo fascículo telencefálico lateral terminando no estriado (paleoestriado lateral). O estriado, por sua vez, constitui o centro motor do paleoencéfalo (ANTHONY, 1970). O núcleo reuniens também recebe aferências do tecto óptico, além daquelas provenientes do corpo geniculado medial (ANTHONY, 1970). O tecto óptico, por sua vez, está recebendo aferências da medula espinal (pelo tracto espino-tectal), do diencéfalo (pelos tractos tálamo-tectal e

habênulo-tectal), do telencéfalo (pelo tracto estriado-tectal) e da retina (ANTHONY, 1970; ten DONKELAAR & NIEUWENHUYS, 1979). Com base nestas conexões, pode-se sugerir o envolvimento dos núcleos talâmicos rotundus e reuniens na sensibilidade geral dos répteis, uma vez que recebem aferências do tecto óptico que, por sua vez, recebe projeções da medula espinal. Além disso, está descrito o envolvimento de grupos celulares dos núcleos rotundus e reuniens no processamento de informações de vias visuais e auditivas que fazem sinapses nestas áreas e projetam a diferentes regiões da eminência ventricular dorsal do telencéfalo (HALL & EBNER, 1970; REINER & POWER, 1978; 1980; 1983; BALABAN & ULINSKI, 1981a, b). Esta última região ainda recebe aferências do córtex (NORTHCUTT, 1970; LOHMAN & MENTINK, 1972; BUTLER, 1976; GAIDAENKO, 1978; LOHMAN & van WORDEN-VERKLEY, 1978), da medulla oblonga (HALL & EBNER, 1970; PARENT & POITRAS 1974; DUBÉ & PARENT, 1978, LOHMAN & van WOERDEN-VERKLEY, 1978; ULINSKI, 1978; PARENT, 1979) e do estriado (BELEKHOVA et al., 1978).

Nos répteis, o hipotálamo agrupa os centros vegetativos do paleoencéfalo, embora o rinencéfalo também possua envolvimento em funções vegetativas nestes animais. As aferências ao hipotálamo provém de diversos grupos neuronais do telencéfalo (córtex, hipocampo e estriado) e suas células, por sua vez, fazem sinapses no tecto óptico e no tegmento mesencefálico, os quais comandam a motricidade visceral, sendo que algumas de suas fibras formam parte da neurohipófise (ANTHONY, 1970).

A tartaruga *Trachemys dorbigni* apresentou atividade glicogênio fosforilase nos núcleos hipotalâmicos ventrais, onde se encontram, dentre outros, os núcleos supra-óptico e paraventricular (ANTHONY, 1970). Algumas das fibras destes núcleos destinam-se à neurohipófise, estando envolvidas nos processos de neurosecreção. As outras fibras do núcleo supra-óptico dirigem-se à eminência média (ANTHONY, 1970). Quanto ao restante das fibras provenientes do núcleo paraventricular, sabe-se que em ratos estas terminam na eminência média (VANDESANDE et al., 1977), no tronco cerebral e na medula espinal (CONRAD & PFAFF, 1976; SAPER et al., 1976). Estas fibras vão inervar regiões associadas com o sistema nervoso autônomo, inclusive o núcleo de Edinger-Westphal, o núcleo parabraquial, o núcleo do trato solitário, o núcleo motor dorsal do nervo vago e a coluna intermediolateral da medula espinal, assim como a substância cinzenta periaqueductal, o núcleo pedunculopontino, o locus coeruleus, a zona marginal do núcleo trigeminal sensorial e a substância cinzenta central espinal (SWANSON & McKELLAR, 1979; SWANSON & HARTMAN, 1980; SWANSON et al., 1984). Este núcleo também está envolvido nos mecanismos de ingesta hídrica (SWANSON et al., 1986). Estas comunicações não foram demonstradas no núcleo paraventricular dos répteis, porém, como ocorrem muitas semelhanças, tanto morfológicas como fisiológicas, entre os répteis e os mamíferos, pode-se pensar na existência destas conexões sinápticas no núcleo paraventricular de tartarugas. Entretanto, apenas futuros estudos poderão esclarecer esta hipótese.

O núcleo rubro, nos répteis, é considerado um centro motor, o qual possui função motora associativa. Para ele convergem as eferências dos centros

mesencefálicos, via fascículo pretectal descendente, além daquelas dos centros vestibulares, pelas fibras do núcleo tangencial que percorrem o fascículo longitudinal medial, e do cerebelo, através de fibras do braço conjuntivo pelo fascículo longitudinal medial. As eferências deste núcleo constituem a via rubro-espinal. Este feixe torna-se componente do fascículo longitudinal medial ipsilateral e faz sinapse nos motoneurônios (ANTHONY, 1970), sendo assim um importante componente da motricidade dos répteis. Além disso, demonstrou-se, em *Chrysemys picta*, que o núcleo rubro recebe proeminente aferência, e também envia terminações para o núcleo cerebelar lateral contralateral. O núcleo cerebelar lateral, por sua vez, recebe aferências do núcleo reticular lateral ipsilateral, o qual está recebendo projeções diretas do núcleo rubro via tracto rubro-espinal (SARRAFIZADEH & HOUK, 1994). Neste estudo, relatou-se ainda que a maioria, senão todas as fibras rubro-cerebelares são colaterais do tracto rubro-espinal, e em torno de 17-26% dos neurônios rubro-espinais enviam colaterais ao cerebelo, o que é menor do que a percentagem de 37% descrita para ratos (HUISMAN et al., 1983), mas levemente superior àquela observada em gatos (ECCLES et al., 1975; ROBINSON et al., 1987). O núcleo rubro, em tartarugas, parece receber também projeções descendentes do núcleo suprapeduncular. No entanto, não está claro se estas aferências fazem sinapses em neurônios rubro-espinais, em interneurônios gabaérgicos localizados no núcleo rubro ou em ambos os tipos. Todavia, esta conexão pode ser importante para a modulação da atividade pré-motora descendente. Outra projeção proeminente para o núcleo rubro, em tartarugas, provém da formação reticular rombencefálica rostral, a qual recebe aferências bilaterais da medula espinal. Esta projeção ascendente ipsilateral representa outro sítio de transmissão somatossensorial para o núcleo rubro. Além

disso, a formação reticular rombencefálica parece atuar como um centro de integração da informação sensorial oriunda de múltiplos sítios da medula espinal, antes destas serem passadas para o núcleo rubro ou para outros centros mesencefálicos (SARRAFIZADEH & HOUK, 1994). Em répteis, sabe-se também que a via rubro-espinal envia algumas terminações para o córtex cerebelar (BANGMA & ten DONKELAAR, 1982; KÜNZLE, 1983). Nestes animais também parece existir uma rudimentar via rubro-olivar (ten DONKELAAR & De BOER-VAN HUIZEN, 1981; SARRAFIZADEH & HOUK, 1994).

O núcleo do istmo recebe as eferências do teto óptico, através do tracto tecto-ístmico, do colículo caudal e do núcleo coclear, sendo, porém, deste último via lemnisco lateral. As eferências desse núcleo fazem sinapses no tecto óptico pelo tracto istmo-tectal, no núcleo profundo do mesencéfalo e no núcleo do istmo contralateral pelas fibras comissurais, sendo que algumas destas terminam no colículo caudal. Como a partir dos anfíbios existe o feixe istmo-talâmico, é possível que nos répteis também se encontre esta comunicação (ANTHONY, 1970). A porção parvocelular deste núcleo origina as projeções centrifugas para a retina do olho contralateral (WEILER, 1985). Portanto, o núcleo do istmo, além de receber e exercer influências em centros visuais e auditivos, também poderia influenciar estruturas envolvidas na sensibilidade geral, uma vez que recebe e projeta parte de suas eferências para o tecto óptico, o qual está envolvido nas sensibilidades extero e proprioceptivas (ANTHONY, 1970; ten DONKELAAR & NIEUWENHUYS, 1979).

Na espécie de tartaruga em estudo, houve igualdade na distribuição da glicogênio fosforilase e da citocromo oxidase na medulla oblonga, onde ocorreram apenas variações na intensidade das reações histoquímicas. Estas enzimas estavam presentes nos núcleos V, VI, VII X e XII pares cranianos, bem como nos núcleos reticulares superior, medial e inferior, e nos núcleos superior e inferior da rafe. Estes últimos núcleos fazem parte da formação reticulada e interacionam-se com o cerebelo, o tecto mesencefálico, o tegmento, os núcleos dos nervos cranianos e a medula espinal (ANTHONY, 1970).

Nos répteis, a formação reticular que está interposta entre os centros motores da medula espinal e os centros motores encefálicos (núcleo rubro e complexo estriado) parece coordenar a atividade motora da medula espinal, regular o tono postural e, pelas fibras retículo-espinais, influenciar neurônios próprio-espinais. Deste modo, possui então relação com os músculos responsáveis pelo trabalho respiratório. Como esta estrutura parece análoga à formação reticular dos mamíferos, acredita-se que receba aferências hipotalâmicas e rinencefálicas, responsáveis pelo controle das funções vegetativas (ANTHONY, 1970).

As fibras provenientes do núcleo reticular inferior fazem parte do fascículo longitudinal medial, o qual descende para a medula espinal. As fibras retículo-espinais do funículo lateral originam-se no núcleo reticular inferior e no núcleo inferior da rafe, enquanto aquelas fibras do funículo ventral procedem dos núcleos reticulares medial, superior e do ístmo (ARIENS-KAPPERS et al., 1936). Esta via poderia ser chamada via final comum, através da qual o telencéfalo e o tronco encefálico influenciariam os

motoneurônios medulares, já que os répteis não possuem o tracto corticoespinal (KUSUMA et al., 1979).

Os neurônios do núcleo vestibular, porções lateral, medial, superior e descendente também apresentaram reação positiva à glicogênio fosforilase e à citocromo oxidase. Este núcleo está envolvido na manutenção do equilíbrio na tartaruga, recebendo aferências oriundas das regiões vestibulares do ouvido interno, semelhante aos outros amniotas, além de aferências da medula espinal, cerebelo, alguns núcleos dos nervos cranianos, e dos centros coclear, trigeminal e vagal. Suas eferências destinam-se ao cerebelo, tronco encefálico, em particular aos núcleos do III, IV e VI pares cranianos, e medula espinal (PEARSON & PEARSON, 1976; ten DONKELAAR & NIEUWENHUYS, 1979; RUIGROK et al., 1985), demonstrando a importância destas células nestes animais.

Na medula espinal de *Trachemys dorbigni*, a reação citocromo oxidase foi mais ampla do que aquela da glicogênio fosforilase, localizando-se nos neurônios motores e comissurais, no núcleo marginal e em neurônios dispersos pelo funículo lateral, enquanto a expressão da glicogênio fosforilase ocorreu apenas em neurônios motores e comissurais. Estas diferenças são intrigantes e difíceis de serem explicadas, pois, até o presente momento, desconhece-se a função do núcleo marginal. A presença de forte reatividade à citocromo oxidase, neste núcleo, sugere a existência de um elevado metabolismo oxidativo, o qual poderia estar desempenhando um importante papel funcional na medula espinal.

Os padrões de distribuições da glicogênio fosforilase e da citocromo oxidase da tartaruga *Trachemys dorbigni* não foram similares aos de quaisquer neurotransmissores conhecidos. Entretanto, pode ser sugerido o envolvimento destas enzimas nas vias visual e olfativa de tartarugas, uma vez que os seus núcleos apresentaram-se reativos. Nas tartarugas, a via visual está composta por duas porções: uma que sai da retina, passa pelo núcleo geniculado dorsal e finaliza no córtex dorsal, e outra, onde as projeções retinianas fazem conexões no tecto óptico e daí seguem para o núcleo rotundus, terminando na eminência dorsal ventricular do telencéfalo (ANTHONY, 1970; EBBESSON, 1972; HALL, 1972; HALL et al., 1977; HERGUETA et al., 1993). As eferências do nervo olfativo destinam-se ao bulbo olfatório, de onde a grande maioria dirige-se ao córtex piriforme, mas algumas vão até a amígdala, a banda diagonal de Broca, ao tubérculo olfatório, ao estriado e ao septo e a habênula. Algumas destas também chegam ao hipocampo (ANTHONY, 1970).

Com base nas informações acima apresentadas, pode-se sugerir a existência de metabolismo oxidativo e glicolítico em uma grande quantidade de núcleos sensoriais e motores do tecido nervoso de *Trachemys dorbigni*. Assim sendo, o funcionamento destas áreas não será afetado na falta de oxigênio, pois, como discutido anteriormente, parece haver uma inter-relação entre a atividade citocromo oxidase e glicogênio fosforilase no início das mudanças hipóxicas. A manutenção da funcionalidade destas regiões, independente da disponibilidade de oxigênio, torna as tartarugas mais preparadas a enfrentar situações adversas do que os mamíferos, o que é uma realidade. Isto leva ao questionamento de que esta característica talvez tenha

sido perdida com o decorrer da evolução, ou tenha sido suprimida pela aquisição de outras vias e conexões nos mamíferos. Entretanto, é intrigante a semelhança observada na distribuição destas enzimas e aquela descrita para os mamíferos (SHIMIZU & OKADA, 1957). Mas, deve ser lembrado que o estado redox da citocromo oxidase mostra diferenças em encéfalos de tartarugas e ratos (SICK et al., 1982; LUTZ et al., 1985). Frente a estes resultados, fica evidente a necessidade de estudos mais detalhados sobre o metabolismo encefálico de tartarugas, os quais poderão não apenas contribuir para o entendimento do metabolismo deste tecido, mas também fornecer subsídios para o esclarecimento das mudanças decorrentes da evolução, as quais resultaram na perda da capacidade de tolerância à anoxia pelos mamíferos.

Está demonstrado na literatura que a atividade citocromo oxidase possui uma correlação direta com o tipo de sinapse que um determinado neurônio pós-sináptico está recebendo. Se esta aferência for predominantemente excitatória, há maior expressão da atividade citocromo oxidase, ficando esta diminuída na situação de inibição. Este padrão de resposta pode ocorrer tanto no soma, como nos dendritos e no axônio de um neurônio (KAGEYAMA & WONG-RILEY, 1982; MJAATVEDT & WONG-RILEY, 1988). Nesta situação, a atividade citocromo oxidase parece relacionar-se mais com o trabalho das bombas iônicas, para o restabelecimento do potencial de membrana, do que com o crescimento celular ou com a síntese de neurotransmissores. Lehrer (1973) observou que, em fatias cerebelares, o metabolismo oxidativo foi maior após o período de crescimento celular intenso. É sabido também que a taxa de crescimento do sistema nervoso é menor do que aquela

dos demais tecidos, porém possui maior metabolismo oxidativo (LOWRY, 1975; WONG-RILEY et al., 1987). Neste tecido, demonstrou-se ainda que a síntese de neurotransmissores requer apenas 1% do suprimento energético total gasto pela bomba iônica (BACHELARD, 1975). Além disso, diversos estudos mostraram uma diminuição do metabolismo oxidativo após remoções de aferências excitatórias de vários sistemas sensoriais (WONG-RILEY, 1979; WONG-RILEY & WELT, 1980; WONG-RILEY & RILEY, 1983).

A similaridade observada na distribuição da citocromo oxidase e da glicogênio fosforilase em encéfalos de *Trachemys dorbigni* e de ratos (HARLEY & BIELAJEW, 1992) sugere que a expressão da glicogênio fosforilase pode não apenas refletir a atividade glicolítica desta região, mas também representar as necessidades metabólicas e sinápticas neuronais. Drummond & Bellward (1970) observaram uma correlação grosseira entre atividade glicogênio fosforilase e densidade sináptica. Entretanto, a realização de estudos mais detalhados sobre esta questão possibilitará averiguar se há realmente correspondência entre a expressão desta enzima e a atividade sináptica do tecido nervoso.

Esta e todas as outras questões anteriormente apresentadas foram frutos da abordagem histoquímica aqui delineada, e dos escassos estudos referentes ao metabolismo encefálico das tartarugas. Deve ser destacado que o presente estudo foi a primeira demonstração de um possível mapa metabólico local do tecido nervoso destes animais. Isto deixa bem evidente a necessidade de um entendimento mais acentuado neste campo, não apenas para o conhecimento das particularidades deste

tecido, mas principalmente para haver um maior esclarecimento sobre as mudanças decorrentes da evolução, as quais tornaram o encéfalo dos mamíferos mais vulnerável à falta de oxigênio. Além disso, deve ser ressaltado que os resultados do presente estudo servirão como ponto de referência para posteriores estudos do metabolismo encefálico de tartarugas, permitindo também comparações com outras espécies, o que ajudará no entendimento filogenético da atividade das enzimas glicogênio fosforilase e citocromo oxidase.

#### Distribuição da NADPH-diaforase no sistema nervoso central de tartarugas

##### *Trachemys dorbigni*, adultas, em condições basais

O encéfalo desta espécie de tartaruga mostrou reação positiva à NADPH-diaforase em diferentes áreas do sistema nervoso central. Resultado semelhante foi encontrado em *Pseudemys scripta elegans* (BRÜNING et al., 1994). Porém, ao contrário do que está apresentado no presente trabalho, esses autores relatam atividade NADPH-diaforase moderada nos glomérulos olfativos, uma negatividade nos neurônios do núcleo central da eminência dorsal ventricular do telencéfalo e positividade apenas no núcleo hipotalâmico periventricular, localizado próximo da comissura anterior, e aquele da região dorsal do núcleo hipotalâmico ventromedial. Outra diferença pronunciada é a pouca quantidade de neurônios reativos no núcleo rubro, o qual apresentou inúmeras células positivas em *Trachemys dorbigni*. Cabe ainda mencionar a reatividade das áreas do núcleo do fascículo longitudinal medial, do núcleo mesencefálico do V par e do núcleo interpeduncular em *Pseudemys scripta elegans*, os quais foram negativos no presente estudo. Em *Pseudemys scripta elegans*,

observa-se ainda reação positiva no núcleo vestibular superior, no núcleo funicular dorsal e no núcleo laminar do torus semicircularis, e uma negatividade no núcleo hipoglosso. Em *Trachemys dorbigni*, a positividade do núcleo vestibular localizou-se em todos os seus subnúcleos (superior, inferior e descendente) e no núcleo do hipoglosso, mas os núcleos funicular dorsal e laminar do torus semicircularis mostraram-se negativos.

Não há explicações conclusivas para essas diferenças. Contudo, pode-se supor que elas tenham resultado da preparação dos tecidos. Naquele trabalho, as tartarugas foram submetidas à uma perfusão intra-cardíaca com paraformaldeído 4% diluído em TP. No presente trabalho, os tecidos eram colocados nesta mesma solução fixadora, porém acrescida de 0,2% de gluteraldeído. No entanto, há evidências experimentais de que o padrão de reatividade da NADPH-diaforase é idêntico em tecidos fixados com paraformaldeído somente e naqueles com esta solução acrescida de gluteraldeído, sendo que nesta última situação houve diminuição da intensidade da coloração de fundo, ou seja, do “background” (VALTSCHANOFF et al., 1993; TAKEMURA et al., 1996). Além disso, a fixação do tecido nervoso das tartarugas *Trachemys dorbigni*, desnervadas, foi realizada de forma similar aos procedimentos descritos por Brüning et al. (1994), ou seja, perfusão intra-cardíaca somente com paraformaldeído 4% diluído em TP sem resultar em diferenças na atividade NADPH-diaforase. Assim, parece mais provável que as divergências observadas na distribuição da NADPH-diaforase nestas duas espécies de tartarugas sejam o resultado de diferenças entre as espécies. Apesar de não haver evidências experimentais, é possível que diferentes circuitos neuronais possam estar envolvidos no controle de funções

similares nas tartarugas. Também parece plausível a hipótese de que estes circuitos utilizem diferentes neurotransmissores em suas conexões. Porém, somente a realização de estudos mais detalhados sobre este tema poderão esclarecer estas hipóteses. Além disso, é evidente que o conhecimento das estruturas nitrérgicas em diferentes espécies de tartarugas permitirá a elaboração de hipóteses mais plausíveis sobre a evolução do óxido nítrico dentro do grupo das tartarugas, contribuindo também para o entendimento do processo evolutivo dos vertebrados.

É necessário, entretanto, determinar se as regiões NADPH-diaforase positivas são imunorreativas à NOS, pois em *Pseudemys scripta elegans* houve pequenas diferenças na distribuição destas moléculas, ou seja, algumas foram positivas ao procedimento histoquímico da NADPH-diaforase, mas negativas ao tratamento imunohistoquímico da NOS (BRÜNING et al., 1994). As áreas onde ocorreram estas divergências foram: o nervo e os glomérulos olfativos, os núcleos hipotalâmicos supra-óptico e paraventricular, o órgão subcomissural, o núcleo mesencefálico do V par e o núcleo vestibular superior.

Essas diferenças na distribuição da NADPH-diaforase e da NOS também ocorreram no encéfalo de *Carassius auratus*, onde se realizou o mapeamento histoquímico desta enzima juntamente com a técnica imunohistoquímica da NOS usando um anticorpo desenvolvido contra a enzima de mamífero (BRÜNING et al., 1995). No entanto, neste estudo, a pré-incubação dos cortes com uma solução de TP com Triton X-100 minimizou-as. Este efeito não pôde ser explicado. Os autores sugerem que eles possam estar indicando que aquela atividade NADPH-diaforase não

relacionada à NOS é mais instável e menos sensível aos métodos de fixação. Mas, por outro lado, é possível que a atividade NOS é que seja instável e pouco sensível aos métodos de fixação utilizados, só que estaria em maior concentração. Deste modo, o tecido poderia tolerar perdas maiores sem grandes mudanças na atividade histoquímica. Um pré-requisito para a preservação da atividade NADPH-diaforase relacionada à NOS é a fixação do tecido com paraformaldeído (MATSUMOTO et al., 1993a). No trabalho de Brüning et al. (1994) e no presente estudo a fixação foi efetuada em paraformaldeído, porém, neste último foi realizada uma pré-incubação dos cortes com solução de TP e Triton X-100, o que fortalece a possibilidade de que a atividade NADPH-diaforase aqui descrita relacione-se com a NOS.

Os glomérulos olfativos, alguns neurônios da camada granular interna do bulbo olfatório e a região do tubérculo olfatório da tartaruga *Trachemys dorbigni* foram positivos à NADPH-diaforase. Em ratos também ocorreu esta atividade enzimática (VILLALBA et al., 1989; VINCENT & KIMURA, 1992). Entretanto, a presença de neurônios reativos no córtex piriforme parece ser uma característica apenas das tartarugas. A positividade destas estruturas sugerem o envolvimento do óxido nítrico no sistema olfativo de tartarugas, assim como foi sugerido para ratos. Está demonstrado na literatura que o córtex piriforme de tartarugas recebe aferências diretas do bulbo olfatório (BELEKHOVA, 1979). Entretanto, deve ser lembrado que em *Pseudemys scripta elegans* os glomérulos não foram imunorreativos à NOS (BRÜNING et al., 1994), o que, de certa forma, coloca em questão este possível papel do óxido nítrico na via olfativa de tartarugas. Porém, pode ser que em *Trachemys dorbigni* esta área apresente imunorreatividade à NOS.

Em mamíferos, o bulbo olfatório é uma das regiões encefálicas com maior expressão da NOS (BREDT et al., 1991). Nestes animais, as células periglomerulares mostram atividade NADPH-diaforase (VINCENT & KIMURA, 1992) e, segundo critérios morfológicos, estas células positivas parecem ser neurônios com atividade dopaminérgica. Células periglomerulares dopaminérgicas no bulbo olfatório de tartarugas foram identificadas (HALÁSZ et al., 1982; SMEETS et al., 1987), porém estas não parecem possuir atividade NADPH-diaforase. É possível que as células com atividade catecolaminérgica e NOS sejam algum tipo diferente de neurônio, o qual não está presente em tartarugas. Mas também deve ser considerada a possibilidade de que este tipo celular se encontre no bulbo olfatório de tartarugas, porém não expressando a atividade NOS.

É possível que as células reativas do tubérculo olfatório da tartaruga *Trachemys dorbigni* também expressem SP (REINER et al., 1984). Além disso, pode-se sugerir que aquelas da parte ventral do telencéfalo basal correspondam a neurônios imunorreativos à colina acetiltransferase (ChAT) (MUFSON et al., 1984; MEDINA et al., 1993), assim constituindo parte do complexo colinérgico celular basal do telencéfalo de tartarugas.

Ambas as espécies de tartarugas mostraram escassas células NADPH-diaforase positivas na área cortical. Entretanto, em lagartos, esta região apresentou inúmeros neurônios reativos (REGIDOR & POCH, 1988). Esta diferença é muito intrigante e pode representar alterações na expressão do óxido nítrico dentro do grupo dos

répteis. No entanto, esta amostragem é muito pequena, sendo necessário a realização de estudos em outros representantes deste grupo.

Por outro lado, diversos estudos salientam a sobrevivência de neurônios corticais de tartarugas após exposições em concentrações de glutamato consideradas letais a estas células de mamíferos (WILSON & KRIEGSTEIN, 1991). Há evidências, nestes últimos animais, do envolvimento do óxido nítrico nesta toxicidade do glutamato (DAWSON et al., 1991). Brüning et al. (1994) sugeriram que a resistência dos neurônios corticais de tartarugas poderia estar relacionada com a baixa expressão do óxido nítrico nestas células. Os resultados do presente estudo fortalecem esta hipótese, uma vez que também houve baixa atividade NADPH-diaforase no encéfalo da tartaruga *Trachemys dorbigni*. É possível que esta pouca reatividade ao óxido nítrico seja uma característica das tartarugas.

A reatividade de células do estriado de *Trachemys dorbigni* assemelha-se aos resultados obtidos em ratos (VINCENT & KIMURA, 1992), codornas (PANZICA et al., 1994), gatos (MIZUKAWA et al., 1989) e homem (KOWALL et al., 1987). Em *Pseudemys scripta elegans*, ao contrário, esta região apresentou poucos neurônios positivos (BRÜNING et al., 1994). Em mamíferos, a NADPH-diaforase é considerada um marcador para alguns neurônios estriatais. Estes também mostram positividade ao neuropeptídeo Y e à somatostatina (VINCENT et al., 1983). É possível que os neurônios reativos do estriado da tartaruga *Trachemys dorbigni* também expressem imunorreatividade à somatostatina, uma vez que este peptídeo

está presente em neurônios da área d (equivalente ao núcleo accumbens) e da região do globus pallidus de tartarugas (BEAR & EBNER, 1983).

A presença de neurônios NADPH-diaforase positivos na eminência dorsal ventricular do telencéfalo e nas camadas cinzentas periventricular e central do tecto óptico sugere o envolvimento do óxido nítrico em vias visuais e auditivas de tartarugas, assim como foi sugerido para aves e mamíferos. Como descrito anteriormente, a eminência dorsal ventricular do telencéfalo recebe aferências de áreas envolvidas com o processamento visual e auditivo, e o tecto óptico é uma das regiões participantes de uma porção da via visual de tartarugas. No entanto, pode-se também pensar que os neurônios reativos da eminência dorsal ventricular sejam aqueles que possuem conexões sinápticas com o estriado (BELEKHOVA et al., 1978). Sendo assim, poderiam atuar sobre a motricidade destes animais.

Em mamíferos, observou-se imunorreatividade à NOS em neurônios dos núcleos hipotalâmicos supra-óptico e paraventricular. No entanto, em tartarugas, aves e peixes estas áreas foram negativas ao tratamento imunohistoquímico da NOS (BRÜNING, 1993; BRÜNING et al., 1994; BRÜNING et al., 1995). Porém, em *Trachemys dorbigni* foram observadas células NADPH-diaforase positivas no núcleo paraventricular. Além disso, fibras reativas estavam presentes na região correspondente ao hipotálamo ventral. Esta não correspondência entre atividade NADPH-diaforase e NOS nestas regiões pode estar indicando que a expressão da NADPH-diaforase provavelmente não corresponda a atividade da NOS, muito embora ainda não tenham sido realizados estudos de imunorreatividade à NOS na

tartaruga *Trachemys dorbigni*. Se este for o caso, se pode sugerir que a função do óxido nítrico como um co-transmissor de neurônios magnocelulares hipotalâmicos ocorre apenas em mamíferos, possivelmente constituindo uma característica muito recente.

A distribuição da atividade NADPH-diaforase no tecto óptico de tartarugas mostrou um padrão distinto. O mesmo foi observado em aves (BRÜNING, 1993) e no colículo superior de ratos (VINCENT & KIMURA, 1992). Em aves, a distribuição da NADPH-diaforase assemelhou-se àquela descrita para ChAT e para SP. No entanto, desconhece-se a distribuição de neurônios colinérgicos no tecto óptico de tartarugas. Entretanto, sabe-se da existência de SP nos neurônios da camada cinzenta periventricular destes animais (REINER et al., 1984). É possível que este peptídeo esteja colocalizado com o óxido nítrico nesta área, e que estas células também expressem ChAT. O conhecimento das células com imunorreatividade à ChAT ajudaria a esclarecer esta hipótese.

A reatividade dos neurônios da área tegmental ventral da espécie de tartaruga estudada foi similar à observada em aves e mamíferos (VINCENT & KIMURA, 1992; PANZICA et al., 1994). Já a positividade dos neurônios da substância nigra parece ser uma característica apenas das tartarugas e das aves (PANZICA et al., 1994). De acordo com Brüning et al. (1994), estas células positivas da substância nigra poderiam corresponder a neurônios catecolaminérgicos ou colinérgicos observados nesta área.

Recentemente foi sugerido que os neurônios NADPH-diaforase positivos do locus coeruleus de lagartos poderiam corresponder às células colinérgicas observadas nesta região (LUEBKE et al., 1992). Esta hipótese também foi apresentada para aves (BRÜNING, 1993), gatos (REINER & VINCENT, 1987) e homem (MESULAM et al., 1989). Dada a presença desta enzima em neurônios deste núcleo de tartarugas, parece lícito suspeitar desta relação também nestes animais.

Em ratos, o cerebelo mostra-se como uma das áreas com maior imunorreatividade à NOS, estando esta localizada principalmente nas células granulares (KOH et al., 1986; FORSTERMANN et al., 1990). Porém, a camada molecular também apresentou-se reativa. Já as células de Purkinje foram negativas a esta detecção histoquímica (KNOWLES et al., 1988). Este mesmo padrão de distribuição foi observado em tartarugas e aves (BRÜNING, 1993; BRÜNING et al., 1994). Todavia, no peixe *Carassius auratus* e no salmão, algumas células de Purkinje do lobo medial da válvula cerebelar e aquelas localizadas na área de transição para o corpo desenvolveram reação NADPH-diaforase (HOLMQVIST et al., 1994; BRÜNING et al., 1995). Este resultado sugere a presença de óxido nítrico em células de Purkinje de peixes. É possível que este fato seja o resultado do aparecimento precoce desta molécula durante a evolução dos vertebrados, sendo esta característica, porém, perdida ao longo deste processo. É sabido que, em anfíbios, as células de Purkinje também se mostram negativas à NADPH-diaforase (MUÑOZ et al., 1996). Entretanto, há também a possibilidade de que a perda da atividade NADPH-diaforase das células de Purkinje tenha ocorrido ainda durante o decorrer da evolução dos teleósteos. Todavia, recentemente observou-se a existência de imunorreatividade à

NOS em células de Purkinje do cerebelo de humanos (EGBERONGBE et al., 1994). Este dado coloca em questão a hipótese acima apresentada, pois contraria todas as outras observações realizadas em vertebrados. Deste modo, parece ser necessário ter muita cautela na avaliação desse resultado.

O cerebelo de mamíferos é o local onde ocorre a mais simples seqüência de eventos que resulta na formação de óxido nítrico. Nesta região, os receptores do tipo NMDA localizam-se nas células granulares e em cesto, cujas eferências destinam-se às células de Purkinje. A ligação do glutamato aos receptores NMDA desencadeia a formação de óxido nítrico, o qual se difunde até as células de Purkinje provocando a ativação da proteína guanilato ciclase. Todavia, ainda não está determinado se a guanilato ciclase é o alvo universal do óxido nítrico, nem se a transmissão nitrérgica utiliza exclusivamente esta proteína. Entretanto, sabe-se que suas distribuições diferem acentuadamente nesta região (ZHANG & SNYDER, 1995). É possível que este circuito também exista no cerebelo de tartarugas, pois neste animal houve fibras reativas que deixavam a camada molecular e se dirigiam para a camada de células de Purkinje, onde pareciam circundar os somas destes neurônios formando cestos. Estas fibras pareciam ser oriundas das células em cesto, as quais também se mostraram positivas. A presença de reatividade nestas células parece constituir uma característica recente, uma vez que esta mesma resposta ocorreu em anfíbios (MUÑOZ et al., 1996), mas não em *Carassius auratus* (BRÜNING et al., 1995). Todavia, deve ser destacada a negatividade desta reação nas células em cesto de codornas (PANZICA et al., 1994), mas sua presença nestas células de galinha (BRÜNING, 1993).

O cerebelo de mamíferos constitui um bom modelo para os estudos de depressão a longo tempo (LTD), a qual parece estar relacionada com a aprendizagem motora cerebelar (ITO, 1989). Nesta região, a LTD pode ser induzida em células de Purkinje por uma estimulação simultânea das fibras paralelas e trepadeiras, levando à ativação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropinato) e metabotrópicos (LINDEN et al., 1991; LINDEN, 1994). A ativação destes receptores ocasiona a formação de óxido nítrico, o qual parece desempenhar um importante papel no fenômeno da LTD, visto que esta pode ser bloqueada pela administração de inibidores desta molécula (CREPEL & JAILLARD, 1990; ITO & KARACHOT, 1990; DANIEL et al., 1993). É provável que este sistema também exista no cerebelo de tartarugas. Se isto realmente ocorrer, o cerebelo de tartarugas pode constituir um bom modelo para estudos de LTD, visto que suas reações metabólicas são mais lentas.

Em *Trachemys dorbigni* a atividade NADPH-diaforase localizou-se nos núcleos V, VI, VII, X e XII pares cranianos. Este resultado é intrigante e difícil de ser explicado. Em *Pseudemys scripta elegans*, esta enzima esteve presente apenas no núcleo do trato solitário, no núcleo principal e descendente do trigêmio e no núcleo perihipoglossal (BRÜNING et al., 1994). Todas estas regiões foram positivas no peixe *Carassius auratus*, havendo também uma expressão da NADPH-diaforase no núcleo do nervo facial (BRÜNING et al., 1995). Na rã, a reatividade a esta enzima ocorreu no núcleo do trigêmio e no núcleo do trato solitário (MUÑOZ et al., 1996). Nas aves, esta positividade também restringiu-se aos núcleos principal e descendente do trigêmio e ao núcleo do nervo vago (BRÜNING, 1993; PANZICA et al., 1994).

Em mamíferos, Sandell (1984) descreveu reação positiva a esta enzima nos núcleos motores dos pares cranianos. No entanto, Vincent & Kimura (1992) não observaram esta positividade nestas áreas do tecido nervoso de ratos. Todavia, ela ocorreu em alguns núcleos sensitivos da medulla oblonga, sendo estes o núcleo do trato solitário, o núcleo espinal do trigêmio e o núcleo da coluna dorsal. No gato, a atividade NADPH-diaforase foi encontrada apenas nos núcleos dos nervos facial e vago (MIZUKAWA et al., 1989). Contudo, em todas estas espécies, notou-se uma grande quantidade de fibras reativas, principalmente fibras aferentes, nestes núcleos ou nas áreas próximas a eles. Assim, pode-se sugerir que o óxido nítrico tenha algum papel na regulação de vias sensoriais que chegam nesta região do tecido nervoso de vertebrados. Porém, permanece em debate a possível existência de óxido nítrico em núcleos dos pares cranianos de vertebrados.

A positividade de neurônios do núcleo reticular parece ser uma característica comum de tartarugas (BRÜNING et al., 1994; o presente estudo), lagartos (LUEBKE et al., 1992) e rãs (MUÑOZ et al., 1996). Inúmeros estudos tem demonstrado a existência de conexões sinápticas entre este núcleo e a medula espinal nestas espécies (ten DONKELAAR, 1982; TÓTH et al., 1985). Deste modo, pode-se supôr que os neurônios NADPH-diaforase positivos do núcleo reticular correspondam às células que interagem com a medula espinal. Recentemente, observou-se que, em lampréias, os neurônios NADPH-diaforase positivos são aqueles com conexão sináptica com a medula espinal (SCHOBER et al., 1994). Assim, parece válida a sugestão do aparecimento precoce do óxido nítrico nos sistemas retículo-espinais de vertebrados.

Na medula espinal, a atividade da NADPH-diaforase foi encontrada em fibras das áreas Ia, Ib, II e III, bem como nos neurônios da comissura dorsal e da coluna lateral. Nesta coluna, os neurônios gigantes ipsilaterais emitiam prolongamentos que se dirigiam à substância branca. Baseado nos dados de Kusuma et al. (1979), pode-se sugerir que estes neurônios constituem células de origem de vias ascendentes longas. As células fusiformes reativas da comissura dorsal provavelmente correspondam aos neurônios “bitufted” descritos por Fernández et al. (1993). É possível ainda que os neurônios distribuídos radialmente na região látero-dorsal da coluna lateral do corno dorsal sejam os neurônios radiais apresentados por estes autores citados. A existência de atividade NADPH-diaforase em fibras da região Ia do corno dorsal da medula espinal sugere a participação do óxido nítrico na sensibilidade geral desta tartaruga, uma vez que a área Ia é análoga ao trato de Lissauer dos mamíferos. As fibras positivas das áreas Ib, II e III também possuem este envolvimento, visto que nelas chegam também terminações de colaterais do gânglio raquidiano (TRUJILLO-CENÓZ et al., 1990).

Deve ser mencionado, neste momento, a grande dificuldade de relacionar os dados obtidos na medula espinal desta tartaruga com aqueles descritos em ratos. Isto decorreu do fato de que na tartaruga não se observa o padrão laminar característico dos mamíferos, o que dificulta a identificação dos grupos neuronais. Além disso, praticamente não existem estudos eletrofisiológicos da medula espinal de tartarugas, exceto pela publicação recente de Fernández et al. (1996). Deste modo, as homologias entre os tipos neuronais de tartarugas e ratos foram estabelecidas apenas em critérios morfológicos.

O padrão de distribuição da atividade NADPH-diaforase da medula espinal da tartaruga *Trachemys dorbigni* mostrou-se similar àquele descrito em ratos e camundongos. Nestes animais, esta atividade localizou-se principalmente nas lâminas II e III do corno dorsal, em torno do canal central (lâmina X) e em núcleos autonômicos pré-ganglionares. Algumas células também estavam presentes na coluna intermédio-lateral, não havendo, entretanto, nenhuma atividade nos motoneurônios (ANDERSON, 1992; VALTSCHANOFF et al., 1992). Um padrão semelhante também foi encontrado em *Carassius auratus* (BRÜNING et al., 1995). Todavia, a atividade desta enzima apresentou-se com distribuição bem mais ampla na medula espinal de rã, tendo, inclusive, reação NADPH-diaforase positiva em motoneurônios do corno ventral (CROWE et al., 1995; MUÑOZ et al., 1996). Deste modo, parece lícito sugerir que o envolvimento do óxido nítrico nas funções medulares começou muito cedo na evolução, mas manteve-se funcionando durante todo o processo evolutivo dos vertebrados. No entanto, é difícil entender esta maior expressividade desta enzima na medula espinal de rã.

A extensa expressão da NADPH-diaforase na medula espinal de vertebrados sugere a participação do óxido nítrico em diversas funções deste tecido. De acordo com Valtschanoff et al. (1992), a abundância de neurônios e fibras reativas a esta enzima na medula espinal de ratos poderia estar indicando o possível envolvimento do óxido nítrico na função visceral, na vascularização e no processamento sensorial medular. Dada a similaridade entre os resultados de ratos, tartarugas e peixe, pode-se sugerir também a participação do óxido nítrico nestas funções destas duas últimas espécies.

Esta ampla distribuição da atividade NADPH-diaforase no sistema nervoso central da tartaruga *Trachemys dorbigni* pode estar indicando um importante papel para o óxido nítrico neste tecido. Sabe-se que, em mamíferos, esta molécula pode atuar na plasticidade neuronal, na frequência de despolarização e na modulação de canais iônicos de neurônios, na liberação e captação de neurotransmissores centrais, na regulação de funções neuroendócrinas e na regulação do fluxo sanguíneo encefálico (GARTHWAITE & BOULTON, 1995). Embora inexistam estes estudos em tartarugas, parece lícito pensar na possibilidade de que esta molécula também esteja desempenhando estas funções no tecido nervoso destes animais, uma vez que existem muitas similaridades funcionais entre répteis e mamíferos.

Quando se fala em plasticidade sináptica, não se pode esquecer dos modelos moleculares de memória e de aprendizagem que envolvem os mecanismos de LTP, os quais são especialmente estudados no hipocampo, no cerebelo e no córtex de mamíferos (GARTHWAITE & BOULTON, 1995). Este mecanismo funcional resulta em uma melhora da eficiência sináptica devido ao prolongamento dos eventos sinápticos. Este fato parece ser decorrente de um padrão específico de estimulação neuronal, o qual requer a ativação de receptores pós-sinápticos do tipo NMDA e o influxo de íons cálcio resultante desta ativação (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Este mecanismo parece ser mantido pelo aumento na liberação de glutamato pelos terminais pré-sinápticos. Sendo assim, há necessidade da liberação de um mensageiro trans-sináptico retrógrado para atuar sobre o terminal pré-sináptico. Como o óxido nítrico é uma molécula com facilidade de difusão e é formado pelo aumento do influxo de íons cálcio decorrente da ativação de receptores do tipo NMDA, esta

molécula é um forte candidato ao papel de mensageiro trans-sináptico retrógrado (GARTHWAITE et al., 1988; GALLY et al., 1990), muito embora os resultados experimentais destes estudos sejam muito contraditórios (GARTHWAITE & BOULTON, 1995). É possível que o tecido nervoso de tartarugas possua estes mecanismos de LTP, os quais poderiam estar envolvidos nos processos de memória destes animais, cujos estudos são totalmente inexistentes até o presente momento. Sendo assim, parece válido sugerir que as tartarugas possam constituir um modelo propício aos estudos de indução de LTP.

O maior estímulo pós-sináptico para a formação do óxido nítrico é a ativação do receptor glutamatérgico. De maior importância é o receptor do tipo NMDA, o qual está associado a uma alta permeabilidade ao cálcio. No entanto, outros tipos de receptores glutamatérgicos, tais como o AMPA, o kainato e os receptores metabotrópicos, também parecem estar implicados na formação do óxido nítrico (SOUTHAM et al., 1991; OKADA, 1992). No entanto, o glutamato não parece ser o único neurotransmissor responsável pela síntese desta molécula. Há evidências experimentais demonstrando que outros neurotransmissores ou neuromoduladores, como a serotonina, bradicinina, endotelina, acetilcolina e noradrenalina, podem induzir a formação de óxido nítrico (DRUMMOND, 1983; REISER, 1990a; b).

Deste modo, pode-se especular se a ampla atividade NADPH-diaforase e NOS em encéfalos de tartarugas possui alguma relação com a alta resistência desses animais à anoxia. É possível que esta característica não resulte apenas da queda da taxa metabólica e da ativação de vias glicolíticas como foi proposto por Lutz et al.

(1985), mas também de um certo controle na formação do óxido nítrico. Está demonstrado que uma característica do tecido nervoso de tartarugas submetidas à anoxia é uma diminuição acentuada na liberação do neurotransmissor excitatório glutamato (NILSSON et al., 1990; NILSSON & LUTZ, 1991), o que impede um aumento na concentração do óxido nítrico nesta situação. Isto pode ser muito importante para a sobrevivência do tecido nervoso, uma vez que um acréscimo na produção ou na liberação desta molécula poderia reverter seu efeito benéfico, tornando-a citotóxica (YU, 1994). Desta forma, parece válido perguntar se a perda da capacidade de regulação da liberação de glutamato pelo tecido nervoso de mamíferos é uma das causas de sua susceptibilidade à hipóxia e à anoxia. Assim sendo, pode-se ainda questionar a probabilidade de que esta característica tenha sido perdida durante o processo evolutivo destes animais, ou que esteja presente, mas muito diminuída pelo desenvolvimento de outras vias consideradas mais importantes para a sobrevivência dos mamíferos.

Por outro lado, a distribuição da atividade NADPH-diaforase e da NOS do encéfalo de tartarugas não parece associada com nenhum neurotransmissor central. Em mamíferos, a maioria das informações sobre o possível papel do óxido nítrico na neurotransmissão resultaram do conhecimento de sua colocalização com outros transmissores e do fato de que esta molécula é capaz de influenciar a liberação de neurotransmissores (GARTHWAITE et al., 1988; DICKIE et al., 1992; HANBAUER et al., 1992; PRAST & PHILIPPU, 1992; SORKIN, 1993; BUGNON et al., 1994; GUEVARA-GUZMAN et al., 1994; MONTAGUE et al., 1994; POGUN et al.,

1994). Isto sugere a necessidade de verificar estas possibilidades no tecido nervoso de tartarugas.

Todavia, deve-se ressaltar que a diversidade de células reativas à NADPH-diaforase no encéfalo e na medula espinal de tartarugas *Trachemys dorbigni* constitui um forte indício do envolvimento do óxido nítrico em diferentes aspectos do processamento de informações sensório-motoras, assim como foi sugerido para o tecido nervoso de aves e mamíferos. Já no contexto evolutivo, pode-se supôr que a abordagem aqui apresentada oferece indícios da conservação do óxido nítrico durante o processo evolutivo das tartarugas, aves e mamíferos, estando esta provavelmente presente em todos os seus ancestrais. Além disso, seu aparecimento deve ter sido muito precoce na evolução dos vertebrados, uma vez que sua reatividade já foi descrita em encéfalos de peixes.

Distribuição da glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase no sistema nervoso central de *Pseudemys scripta elegans*, jovens, em condições basais

O presente estudo demonstrou a distribuição das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase no encéfalo e na medula espinal cervical alta de tartarugas *Pseudemys scripta elegans*, jovens, em condições basais. Esta distribuição apresentou-se muito similar àquela descrita para *Trachemys dorbigni*, adultas, em condições basais. Assim sendo, todas as questões e hipóteses já

apresentadas para *Trachemys dorbigni* tornam-se válidas também para *Pseudemys scripta elegans*.

Esta similaridade denota um estágio avançado de desenvolvimento neural de tartarugas juvenis, sugerindo o amadurecimento precoce de estruturas nervosas, os quais provavelmente devem acontecer ainda no estágio embrionário. No entanto, a análise morfométrica dos neurônios mostrou que estes ainda se encontravam em fase de crescimento. Em ratos também ocorre crescimento pós-natal neuronal, porém este acontece até o décimo primeiro dia após o nascimento. No homem, esta fase compreende o intervalo de 210-280 dias da gestação (McILWAIN, 1955). Este resultado demonstra uma diferença interessante entre tartarugas e mamíferos. Apesar do amadurecimento precoce do tecido nervoso destes primeiros animais, a fase de crescimento dos neurônios mostra-se mais longa do que aquela observada em ratos.

Apesar da grande semelhança entre os resultados histoquímicos do tecido nervoso de *Pseudemys scripta elegans* e *Trachemys dorbigni*, notou-se diferenças interessantes nestes. Dentre estas, merece destaque aquelas da região cortical. Nesta área, todos os procedimentos histoenzimológicos utilizados apresentaram respostas diferentes. A técnica da glicogênio fosforilase não apresentou o padrão laminar típico de *Trachemys dorbigni*. A atividade da citocromo oxidase mostrou-se intensa em todas as camadas corticais. O método da NADPH-diaforase revelou um número maior de neurônios e fibras positivas no córtex de *Pseudemys scripta elegans*, sendo esta resposta similar àquela descrita por Brüning et al. (1994) nesta mesma espécie. Há uma considerável probabilidade de que estas diferenças tenham relação com o

diferente estágio de desenvolvimento da região cortical destas espécies de tartarugas. Entretanto, também deve ser considerada a possibilidade de que elas tenham sido conseqüências do fato dos animais serem espécies diferentes.

É possível que o córtex de *Pseudemys scripta elegans* tenha mostrado este padrão histoquímico em decorrência de sua imaturidade nesta etapa de desenvolvimento pós-natal. Em lagartos, sabe-se que há uma neurogênese pós-natal em algumas regiões corticais, o que ocasiona um aumento do número de neurônios e um acréscimo em seus campos sinápticos. No córtex medial, estes valores podem até quadruplicar do período perinatal até a idade adulta (LÓPEZ-GARCÍA et al., 1984; LÓPEZ-GARCÍA et al., 1988). É possível que o córtex de tartarugas também apresente esta diferenciação. Se isto realmente ocorrer, as conexões sinápticas desta região não devem estar prontas ao nascimento, mas vão sendo estabelecidas durante o desenvolvimento pós-natal cortical. Como conseqüência, sua atividade metabólica também deve sofrer modificações ao longo deste desenvolvimento.

Este certo grau de imaturidade cortical ao nascimento não parece ser uma característica dos répteis, pois também foi observado nos mamíferos. Em gatos, detectou-se que as estruturas corticais amadurecem posteriormente àquelas subcorticais, sendo que os padrões de atividade do adulto começaram a ser estabelecidos a partir da quinta semana de vida pós-natal (HOVDA et al., 1992). É impossível a determinação da idade das tartarugas utilizadas no presente estudo. Porém, dada a lentidão de suas respostas metabólicas (McDOUGAL et al., 1968),

parece válido sugerir que o término do estabelecimento das conexões sinápticas corticais destes animais seja bem mais tarde do que o observado em gatos.

A inexpressividade de atividade glicogênio fosforilase e a intensa reação citocromo oxidase do córtex da tartaruga *Pseudemys scripta elegans*, jovem, fortalece a hipótese, já apresentada, de uma possível inter-relação entre estas duas enzimas. Parece lícito sugerir que o aparecimento de uma está vinculado ao aparecimento da outra, ou que o estímulo para o aparecimento de uma é a presença da outra enzima. Em mamíferos, parece ocorrer primeiro o estabelecimento do metabolismo oxidativo, ao qual se segue o aparecimento do metabolismo glicolítico (CHUGANI et al., 1991, HOVDA et al., 1992). Esta diferença possivelmente esteja refletindo a necessidade do tecido nervoso de mamíferos possuírem o metabolismo oxidativo pronto antes do começo da utilização de glicose. É sabido que a exposição do tecido nervoso destes animais à anaerobiose ocasiona a formação de ácido láctico, o que resulta em acidose, disfunção celular e eventual morte celular (BECKER, 1985; KALIMO et al., 1981a; b; REHNCRONA et al., 1981; UNTERBERG et al., 1988). Portanto, poderia ser extremamente prejudicial para o desenvolvimento deste sistema, a utilização da glicose antes da maturação da via oxidativa. Com base nos resultados obtidos na tartaruga *Pseudemys scripta elegans*, pode-se supôr que este comportamento enzimático também exista nestes animais. Entretanto, dada a alta resistência das tartarugas à anoxia (ULTSCH & JACKSON, 1982; JACKSON & HEISLER, 1983; ULTSCH, 1985), é possível que o estabelecimento do metabolismo oxidativo aconteça muito precocemente durante o desenvolvimento, estando este já pronto ao nascimento. A via glicolítica poderia seguir este perfil oxidativo, porém tendo um

início mais tardio. Desta forma, é possível que certas áreas ainda não estejam apresentando esta atividade ao nascimento. Isto explicaria a diferença observada no mapeamento da atividade glicogênio fosforilase no córtex da tartaruga jovem e a grande similaridade na distribuição das enzimas glicogênio fosforilase e citocromo oxidase nas outras áreas do neuroeixo deste animal. Entretanto, esta questão só será esclarecida mediante a determinação da atividade destas enzimas durante o desenvolvimento embrionário de tartarugas.

Contudo, não se pode contestar que as vias oxidativa e glicolítica encontram-se atuantes no tecido nervoso da tartaruga *Pseudemys scripta elegans*. Assim, parece lícito sugerir que o principal substrato energético provavelmente seja a glicose. Porém, não se pode descartar a possibilidade de que outras moléculas, tais como o lactato e os corpos cetônicos desempenham ainda um papel significativo nos eventos metabólicos deste tecido, assim como foi observado em mamíferos. Diversos experimentos mostraram que no período inicial da vida pós-natal, até o período de amamentação, os cérebros de humanos e de ratos utilizam uma mistura de lactato, corpos cetônicos e glicose, tornando-se dependentes obrigatórios da glicose no adulto (LEONG & CLARK, 1984; CUEZVA, 1988; MEDINA, 1988). Como nas tartarugas as respostas metabólicas são muito similares àquelas dos mamíferos, é possível a ocorrência desta semelhança. Se esta realmente existir, deve englobar um período maior nas tartarugas, visto que seu metabolismo é mais lento (McDOUGAL et al., 1968), o que torna possível sua existência na etapa de desenvolvimento em que se encontra a tartaruga em estudo.

Deve ser lembrado que a atividade citocromo oxidase ainda possui correlação positiva com a densidade capilar e o fluxo sanguíneo em mamíferos jovens e adultos, sendo esta pouco significativa nos animais neonatos (GROSS et al., 1986; KLEIN et al., 1986; BOROWSKY & COLLINS, 1989; TUOR et al., 1994). Apesar desta insignificância em neonatos, observou-se que estes três parâmetros encontraram-se heterogêneos no córtex parietal, sendo suas distribuições homogêneas na medulla oblonga (TUOR et al., 1994). Desta forma, o grau de correlação entre fluxo sanguíneo local, atividade citocromo oxidase e densidade capilar da região cortical de mamíferos depende do estágio de desenvolvimento pós-natal do animal, o que não acontece na medulla oblonga. Com base nestas informações e nos dados do presente estudo, parece válida a sugestão de que a alta atividade da citocromo oxidase na região cortical de tartarugas jovens pode relacionar-se com o fato de ainda estar acontecendo o estabelecimento da angiogênese e da densidade capilar nesta área, atividade esta já finalizada na medulla oblonga, cujo padrão de distribuição foi similar àquele do animal adulto.

Um fato que precisa ser enfatizado, neste momento, é o predomínio de intensa atividade glicogênio fosforilase nas áreas filogeneticamente mais antigas de *Pseudemys scripta elegans* jovens, enquanto em *Trachemys dorbigni* esta atividade apresentou-se forte ao longo de todo o neuroeixo. Este padrão de tartarugas juvenis assemelhou-se muito com aquele descrito para o glicogênio encefálico de *Chrysemys dorbigni* (PARTATA & ACHAVAL-ELENA, 1995). Nesta espécie, este polissacarídeo pareceu concentrar-se nas áreas mais antigas, sendo sua atividade muito pouco expressiva na região cortical. Nesta área, apenas escassas células

piramidais foram reativas. Este resultado difere daquele observado em ratos, onde o glicogênio localizou-se nas partes mais antigas no período pós-natal, sendo que durante o processo de maturação do tecido nervoso, este aumentou nas áreas mais recentes e diminuiu naquelas filogeneticamente mais antigas (GHOSH & GUHA, 1978). Já a atividade da enzima glicogênio fosforilase de ratos mostrou um acréscimo durante o desenvolvimento do tecido nervoso, sendo que a imunorreatividade do animal adulto foi estabelecida aos 22 dias após o nascimento. Os primeiros neurônios a expressarem esta atividade localizaram-se no tronco encefálico e a atividade cortical somente foi observada aos 22 dias (PFEIFFER et al., 1993). Estes resultados denotam uma similaridade no perfil de aparecimento da atividade glicogênio fosforilase entre ratos e tartarugas. Porém, mostram uma divergência no padrão glicogênico do tecido nervoso destas espécies. Provavelmente a maior representação cortical do glicogênio encefálico de ratos seja uma consequência do maior envolvimento desta região nas funções motoras e sensitivas deste animal, o que não deve ocorrer em tartarugas, uma vez que centros inferiores, como os núcleos rubro e istmo, apresentam grande responsabilidade nestas funções (ANTHONY, 1970).

Como o rato é uma espécie não precoce, suas variações na atividade da glicogênio fosforilase neural podem indicar diferentes papéis para o glicogênio encefálico. Neste animal adulto, esta reserva parece ser importante como uma fonte de fácil mobilização para as situações de emergência. A presença deste polissacarídeo nos astrócitos constitui uma forte indicação para esta hipótese, uma vez que estas células parecem metabolizar o glicogênio para preferencialmente beneficiar outros tipos celulares (DRINGEN et al., 1993a). Além disso, a atividade glicogênio

fosforilase e glicogênica parece localizar-se nos astrócitos (CATALDO & BROADWELL, 1986; PFEIFFER et al., 1993). Já no animal perinatal, o glicogênio deve servir para atender as demandas energéticas de curta duração que ocorrem ao nascimento. Isto é refletido pela diminuição acentuada desta reserva durante o primeiro dia pós-natal (KOHLE & VANNUCCI, 1977). As tartarugas, por sua vez, parecem nascer com o encéfalo em um estágio bem avançado de desenvolvimento. Deste modo, sua reserva glicogênica deve exercer o mesmo papel em animais jovens e adultos, isto é, servindo como uma fonte de fácil acesso nas situações emergenciais. A similaridade na distribuição da enzima glicogênio fosforilase em ratos e tartarugas provavelmente reflete a facilidade de utilização desta reserva independente da função do glicogênio.

Cabe destacar ainda a presença de atividade glicogênio fosforilase e citocromo oxidase nas camadas molecular e plexiforme do córtex de *Trachemys dorbigni*, enquanto em *Pseudemys scripta elegans* estas camadas foram fortemente reativas à citocromo oxidase e inexpressivas à glicogênio fosforilase. Estes resultados sugerem o envolvimento destas enzimas nas aferências e eferências da região cortical de tartarugas. Como já apresentado, estas duas enzimas podem refletir não apenas a existência de vias glicolítica e oxidativa em uma dada área, mas também representar as necessidades sinápticas desta região (DRUMMOND & BELLWARD, 1970; KAGEYAMA & WONG-RILEY, 1982; MJAATVEDT & WONG-RILEY, 1988). A intensa atividade da citocromo oxidase pode também estar refletindo o intenso trabalho metabólico para o estabelecimento das conexões sinápticas desta região. Provavelmente o envolvimento da glicogênio fosforilase aconteça em um estágio mais

tardio. Um suporte para esta hipótese foi a intensa reação positiva à citocromo oxidase em neurônios e no neuropilo da tartaruga jovem, enquanto a reatividade da glicogênio fosforilase mostrou-se forte nas áreas filogeneticamente mais antigas, estando fraca nas regiões mais recentes.

A similaridade da atividade NADPH-diaforase cortical observada entre o presente trabalho e aquele de Brüning et al. (1994) provavelmente deve-se ao fato de que as tartarugas utilizadas por estes autores não eram animais tão adultos quanto as *Trachemys dorbigni*, visto que seu tamanho era bem menor do que estas. Deste modo, as tartarugas deste prévio trabalho poderiam ainda se encontrar em uma fase precoce do desenvolvimento cortical.

Uma característica da expressão NADPH-diaforase do córtex de *Pseudemys scripta elegans*, jovens, foram os prolongamentos positivos em forma de “rosário”. Este mesmo perfil foi observado em ramificações dendríticas do corno dorsal da medula espinal de tartarugas *Chrysemys dorbigni* jovens (FERNÁNDEZ et al., 1993). Segundo estes autores, estas formações poderiam constituir artefatos resultantes de danos teciduais. Todavia, elas também ocorreram em axônios funiculares que percorriam a substância cinzenta e branca do espessamento posterior da medula espinal de *Trachemys scripta elegans* (BERKOWITZ & STEIN, 1994). Para estes autores, estas formações correspondem a prováveis botões sinápticos. Estes prolongamentos em forma de rosário ainda foram observados em neurônios da substância gelatinosa de gatos, em cujas dilatações havia material microvesicular que estava associado com as junções sinápticas dendro-dendríticas (GOBEL et al., 1980),

e no neocórtex de ratos neonatos (YAN et al., 1994). O mais interessante é que estes processos também ocorrem na região do estriado de pacientes em estágio avançado da síndrome de Huntington (FERRANTE et al., 1985) e em estriado de ratos pré-tratados com nucleotídeos da guanina, seguido por um tratamento com ácido quinolínico (MALCON et al., submetido). Como ainda não há explicações conclusivas para estas formações, elas constituem um campo fértil para a realização de posteriores pesquisas.

No encéfalo de *Pseudemys scripta elegans* jovens, a atividade NADPH-diaforase apresentou-se mais ampla do que aquela obtida em *Trachemys dorbigni*, estando esta reação localizada em muitos sistemas de fibras e em um número maior de neurônios. Todavia, este foi similar àquele descrito por Brüning et al. (1994). Porém, a comparação destes estudos mostra resultados intrigantes. Estes dados da literatura não relatam positividade nos núcleos dos VI, VII, X e XII pares cranianos, os quais foram positivos no presente estudo. Outro foco de divergência refere-se ao núcleo vestibular, onde, segundo a literatura, há reatividade apenas em seu subnúcleo superior. Entretanto, o estudo de tartarugas juvenis detectou atividade NADPH-diaforase em todos os subnúcleos desta região. De acordo com Brüning et al. (1994), o núcleo mesencefálico do V par e o núcleo supra-óptico são reativos à NADPH-diaforase, o que diverge dos resultados do presente estudo. É difícil explicar estas diferenças. Elas podem ser conseqüências do diferente estágio de maturação do tecido nervoso. Os animais utilizados nessa pesquisa possuíam comprimento de carapaça de 12-25 cm, o que é bem maior do que os valores obtidos nos animais do presente estudo (3-4 cm). No entanto, é interessante o fato de que a resposta do animal juvenil

foi a mesma obtida em *Trachemys dorbigni* adultas. Esta similaridade sugere a retenção desta atividade na espécie *Trachemys dorbigni*, enquanto esta característica parece ser perdida ou suprimida em *Pseudemys scripta elegans*. Todavia, é difícil explicar o motivo desta retenção. Como em mamíferos, os neurônios com atividade NADPH-diaforase mostram-se resistentes à hipóxia (FERRIERO et al., 1988; UEMURA et al., 1990), pode-se suspeitar que a maior presença dessa atividade no tecido nervoso de tartarugas resulte em maior resistência local à falta de oxigênio. Entretanto, sabe-se que ambas as espécies de tartarugas são resistentes a esta situação (ROBIN et al., 1964; JACKSON & SILVERBLATT, 1974; ULTSCH et al., 1985; SANTOS et al., 1990; WARE, 1993).

Com base neste conhecimento, parece válido associar a presença de atividade NADPH-diaforase em regiões similares do tecido nervoso de *Trachemys dorbigni*, adulta, e de *Pseudemys scripta elegans*, jovem, como o resultado do papel desempenhado pelo óxido nítrico nestas áreas. É possível que esta molécula esteja envolvida em diferentes circuitos neuronais para o controle de funções similares nas tartarugas. Deste modo, a presença da atividade NADPH-diaforase na tartaruga *Trachemys dorbigni*, adulta, significa a manutenção destes circuitos expressos apenas em tartarugas *Pseudemys scripta elegans* jovens.

No entanto, pode outra vez ser questionada a possibilidade de que as diferenças entre os dados do presente trabalho e aquele de Brüning et al. (1994) tenham decorrido das divergências existentes no método da NADPH-diaforase. Entretanto, cabem aqui todas as respostas já apresentadas anteriormente. Contudo, deve ser

relembrado que esta discrepância entre atividade NADPH-diaforase também foi encontrada em estudos de encéfalos de ratos (SANDELL, 1984; VICENT & KIMURA, 1992).

Em *Pseudemys scripta elegans*, a atividade NADPH-diaforase do corno dorsal da medula espinal localizou-se nas áreas Ia, Ib, II e III, e em neurônios da coluna lateral e da comissura dorsal, bem como em células radiais da região látero-dorsal da coluna lateral. Este padrão de distribuição diferiu daquele observado em *Chrysemys dorsbigni* juvenil (RADMILOVICH et al., no prelo). Neste estudo, a reação NADPH-diaforase ocorreu em numerosos somas neuronais com diâmetro médio de 10-15  $\mu\text{m}$ , onde processos dendríticos opostos distribuíam-se radialmente em relação ao eixo da medula espinal. Esta reação enzimática também foi detectada em neurônios (15-20  $\mu\text{m}$ ) com tronco dendrítico curto, de onde partiam longas ramificações que se distribuíam no sentido rostro-caudal, e em neurônios "bitufted" da substância cinzenta localizada acima do canal central. Não há menção quanto à resposta das áreas Ia, Ib, II e III. Além disso, não se observou reatividade em neurônios gigantes. É possível que estas diferenças sejam conseqüências do diferente período de incubação dos cortes com o meio para NADPH-diaforase. Neste trabalho da literatura, este período compreendeu 30-60 minutos, enquanto no presente estudo este intervalo foi 4 horas. O menor período poderia não ter sido suficiente para ocorrer a reação em todas as áreas positivas, pois uma característica da tartaruga é a lentidão de seus processos metabólicos (McDOUGAL et al., 1968). Assim, se pode supôr que nem todas as regiões reativas apareceram positivas ao término deste intervalo curto, ou ainda, que em algumas delas a atividade pudesse encontrar-se no início, desenvolvendo, então,

uma fraca reatividade. Neurônios com fraca intensidade de reação ocorreu no estudo de Radmilovich et al. (no prelo), porém estas células foram consideradas negativas, não havendo descrição de sua localização. Isto dificulta a comparação entre estes estudos. Entretanto, estudo prévio de mapeamento da atividade NADPH-diaforase no encéfalo de *Pseudemys scripta elegans* reforça esta hipótese, pois neste o período de incubação foi de 1-3 horas (BRÜNING et al., 1994). Apesar das evidências favorecerem esta hipótese, não se deve descartar a possibilidade de que as diferenças observadas sejam conseqüências da utilização de espécies diferentes nos estudos. Entretanto, na tartaruga *Trachemys dorbigni*, adulta, a atividade NADPH-diaforase apresentou-se similar àquela observada em *Pseudemys scripta elegans*, havendo, apenas, uma menor quantidade de fibras reativas na área Ia.

De acordo com Trujillo-Cenóz et al. (1990), a área Ia de tartaruga mostra-se análoga ao trato de Lissauer dos mamíferos. Deste modo, pode-se pensar em um envolvimento maior do óxido nítrico na sensibilidade geral de tartarugas jovens, o qual parece ser reduzido com o decorrer do desenvolvimento pós-natal do tecido nervoso. Esta resposta da tartaruga adulta foi similar ao que está descrito em ratos, onde também houve baixa reatividade NADPH-diaforase nas fibras aferentes que chegavam ao corno dorsal da medula espinal (VALTSCHANOFF et al., 1992). Todavia, a maior expressão da NADPH-diaforase da medula espinal destes animais ocorreu durante o desenvolvimento embrionário. Nesta etapa, alguns tipos neuronais expressaram transitoriamente a atividade NADPH-diaforase, enquanto outros mostraram-se reativos em todas as etapas do desenvolvimento. Houve ainda aqueles grupos neuronais onde esta enzima manifestou-se apenas nas etapas tardias do

desenvolvimento (WETTS et al., 1995; TAKEMURA et al., 1996). Estes resultados, porém, diferem bastante do que foi relatado na medula de anfíbios. Nestes animais, tanto adulto quanto girinos em metamorfose, todas as terminações axonais dos gânglios sensoriais foram positivas ao tratamento da NADPH-diaforase (CROWE et al., 1995). Estes resultados apontam para uma maior participação do óxido nítrico nas funções da medula espinal de vertebrados neonatos, o qual parece sofrer uma redução no animal adulto, ocorrendo esta a partir dos répteis. Entretanto, é necessário muita cautela nesta afirmação pela falta de dados referentes ao desenvolvimento da medula espinal de peixes e aves. Todavia, é intrigante a manutenção desta ampla atividade NADPH-diaforase na medula espinal de anfíbios.

Outro resultado interessante com a técnica da NADPH-diaforase na medula espinal de tartaruga *Pseudemys scripta elegans* foi a presença dessa atividade em neurônios motores, a qual não foi detectada no animal adulto. Isto sugere a possibilidade de ter ocorrido supressão desta enzima durante o processo de desenvolvimento pós-natal da medula espinal destes animais. Pode-se falar em silenciamento gênico pelo fato de que a secção do nervo ciático induziu o retorno dessa atividade nestes tipos neuronais (o presente estudo). Esta indução de síntese *de novo* após injúria neuronal também ocorreu em ratos (WU, 1992; 1993; CLOWRY, 1993). Entretanto, nestes animais, a atividade NADPH-diaforase de motoneurônios ocorreu apenas em um número pequeno de células autonômicas e somáticas durante o desenvolvimento embrionário, estando esta atividade inexpressiva ao nascimento (WETTS et al., 1995). Todavia, a atividade da NOS parece ser importante para a aquisição das características maduras dos neurônios motores do corno ventral de

ratos (KALB & AGOSTINI, 1993). Entretanto, em anfíbios, a atividade NADPH-diaforase de motoneurônios das colunas medial e lateral do corno ventral da medula espinal permanece durante toda a vida do animal (CROWE et al., 1995; MUÑOZ et al., 1996). Porém, não foram encontrados dados referentes ao desenvolvimento deste tecido em aves e peixes. Mas, frente aos resultados aqui apresentados, parece válido articular a possibilidade de que a evolução gerou um silenciamento na expressão do óxido nítrico em neurônios motores do corno ventral de mamíferos, o qual deve ter ocorrido gradualmente, assim explicando a positividade permanente desta atividade em neurônios motores da medula de anfíbios e sua transitória expressividade em tartarugas.

Parece importante destacar aqui a presença de neurônios reativos à NADPH-diaforase ao longo do fascículo longitudinal medial e na substância branca da medula espinal de tartarugas jovens. A presença de corpos neuronais na substância branca da medula espinal de tartarugas juvenis também foi observado em um estudo onde se empregou a técnica de Golgi (FERNÁNDEZ et al., 1993). Mas isto não parece ocorrer apenas em tartarugas. Somas neuronais também foram descritos na substância branca da medula espinal de mamíferos (RÉTHELYI, 1984). Esta maior atividade NADPH-diaforase no tecido nervoso de *Pseudemys scripta elegans* jovem foi muito similar aos dados de Brüning et al. (1994), muito embora estes autores não mencionaram nada quanto a quantidade de neurônios. No entanto, a ampla reatividade à esta enzima possivelmente esteja indicando o envolvimento do óxido nítrico durante as modificações pós-natais deste tecido.

Uma maior expressividade da atividade NADPH-diaforase em animais juvenis também foi descrita em outros representantes dos vertebrados. Em ratos, está demonstrada a existência de uma expressão transitória da NOS na maioria dos neurônios da placa cortical, do epitélio olfativo e em todas as células dos gânglios sensitivos, cujas atividades são perdidas ou diminuídas no animal adulto (BREDT & SNYDER, 1994). Ainda, no tecido nervoso do rato, observou-se que a atividade NADPH-diaforase neocortical correlaciona-se positivamente com a diferenciação laminar desta região (YAN et al., 1994). Em aves, também foi detectada uma acentuada imunorreatividade à NOS durante o desenvolvimento dos neurônios dos gânglios raquidianos, a qual se reduziu no animal adulto (WARD et al., 1994). Além disso, acredita-se que o óxido nítrico esteja envolvido na preparação do substrato inicial para a aprendizagem sonora das aves, uma vez que a atividade NADPH-diaforase mostrou-se mais intensa nas áreas vizinhas aos núcleos com esta função do que propriamente nestes núcleos, sendo esta diminuída com o decorrer do desenvolvimento (WALLHÄUSSER-FRANKE et al., 1995). Em anfíbios, a expressão da NADPH-diaforase da medula espinal não sofreu alterações durante as modificações pós-natais do tecido nervoso, sugerindo que o óxido nítrico possa estar relacionado com processos independentes do estágio de desenvolvimento neural (CROWE et al., 1995). Isto não parece ocorrer em tartarugas, aves e mamíferos. Deste modo, pode-se sugerir que a participação do óxido nítrico em aspectos funcionais do desenvolvimento do tecido nervoso tenha sido adquirida a partir dos répteis. Entretanto, não há dados sobre os peixes. Mas, por outro lado, parece válido também sugerir que a participação desta molécula tenha sido retida no anfíbio e suprimida a partir dos répteis.

Contudo, não se pode contestar a variação da atividade da NADPH-diaforase e da NOS durante os eventos de formação e diferenciação do tecido nervoso. Entretanto, muitas são as perguntas quanto ao papel dessas expressões. Há evidências experimentais sugerindo que o óxido nítrico poderia atuar como um fator trófico no desenvolvimento, cuja indução seria feita pelo fator de crescimento neuronal (PEUNOVA & ENIKOLOPOV, 1995). De fato, a produção local de óxido nítrico parece desempenhar um importante papel na diferenciação dos neurônios motores do corno ventral da medula espinal de ratos neonatos (KALB & AGOSTINI, 1993). A ela também é conferido um papel central na formação, segregação e modelamento do neuropilo durante os estágios tardios do desenvolvimento (GALLY et al., 1990), bem como durante o estabelecimento de conexões retino-tectais (WILLIAMS et al., 1994). Dada a ampla distribuição da atividade NADPH-diaforase no encéfalo de tartarugas *Pseudemys scripta elegans* juvenis, pode-se suspeitar da participação do óxido nítrico em funções similares ou iguais a estas no tecido nervoso destes animais. Entretanto, esta questão necessita de posteriores estudos. Esta necessidade não se restringe apenas às tartarugas, mas aos diversos representantes dos vertebrados.

Apesar destas lacunas nos estudos do tecido nervoso de tartarugas, os resultados deste presente estudo permite classifica-las como animais precoces, ou seja, nascem com o tecido nervoso em um estágio avançado de desenvolvimento. Isto faz com que estes animais sejam capazes de executar tarefas complexas já ao nascimento. Todavia, os posteriores estudos realizados em áreas corticais de tartarugas jovens precisam considerar a etapa de desenvolvimento desta região, uma

vez que seus padrões metabólicos parecem ser estabelecidos mais tardiamente do que as demais áreas.

Efeitos das distintas condições experimentais sobre as atividades glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase, e a imunorreatividade da SP no sistema nervoso central da tartaruga *Trachemys dorbigni*

1- Secção do nervo ciático

A secção do nervo ciático não ocasionou nenhuma alteração na atividade da citocromo oxidase nos períodos experimentais considerados. Possivelmente este comportamento deve-se ao fato de que suas modificações tenham ocorrido muito cedo, sendo, logo em seguida, recuperadas. Em ratos, a atividade desta enzima é um dos indicadores mais precoces de injúria neuronal (NELSON & SILVERSTEIN, 1994). Deste modo, o intervalo de sete dias pode representar um tempo muito extenso para a observação de possíveis modificações em sua atividade.

Entretanto, também deve ser considerada a possibilidade de que as mudanças na expressão da citocromo oxidase ocorram tardiamente, não podendo serem detectadas nos intervalos analisados. Esta hipótese decorreu do conhecimento de que, no núcleo cuneato de gatos, a desnervação de uma das patas anteriores provocou uma sutil diminuição na expressão desta enzima após 4 semanas. Esta diferença se tornou mais evidente após 13 semanas, porém não sendo ainda significativa nas medidas de densitometria. Elas só se tornaram significantes nas observações realizadas após 52 semanas (AVENDAÑO & DYKES, 1996). Esta redução após longos intervalos

também foi descrita por outros autores (GOLDBERGER et al., 1993). Deste modo, parece necessário o acompanhamento das tartarugas desnervadas durante períodos mais prolongados.

Todavia, ainda há a possibilidade de que a desnervação periférica de tartarugas não resulte em alterações na atividade da citocromo oxidase. No núcleo cuneato de macacos, a atividade desta enzima apresentou-se normal após 12 anos de rizotomia dorsal (RAUSELL et al., 1992). Apesar deste período extenso, pode-se sugerir que a atividade citocromo oxidase detectada tenha sido oriunda dos neurônios que permaneceram vivos, os quais poderiam ter ampliado suas conexões sinápticas.

A atividade NADPH-diaforase mostrou um acréscimo em sua expressão no corno dorsal da medula espinal e nas células pequenas (12  $\mu\text{m}$ ) e grandes (24  $\mu\text{m}$ ) dos gânglios raquidianos de *Trachemys dorbigni* após a secção do nervo ciático. Esta resposta foi similar àquela descrita em mamíferos (ZHANG et al., 1993; FIALLOS-ESTRADA et al., 1993; TRAUB et al., 1994). Nestes animais, o aumento da expressão desta enzima começou ao 3º dia após a secção e permaneceu aumentada até mais de 150 dias (FIALLOS-ESTRADA et al., 1993). Entretanto, nas tartarugas, observou-se, aos 30 dias, uma redução da atividade NADPH-diaforase nas células pequenas dos gânglios raquidianos, sendo este novo padrão similar àquele do animal controle. Isto denota uma diferença entre tartarugas e mamíferos, a qual é difícil de ser explicada. É possível que este comportamento das tartarugas tenha alguma relação com a transmissão nociceptiva, uma vez que, em mamíferos, estas células pequenas desta região estão envolvidas com esta sensação (WILLIS, 1985). No corno dorsal,

ao contrário, esta reação enzimática ainda estava elevada aos 90 dias após a secção nervosa periférica. Desta forma, se pode suspeitar da permanência deste acréscimo por um período igual ou maior do que aquele observado nos mamíferos. A suposição de um espaço maior para as tartarugas deve-se à lentidão de seus processos metabólicos (McDOUGAL et al., 1968). É possível também que o início deste aumento seja tão precoce nas tartarugas como foi em ratos. Mas para responder esta questão é preciso realizar estudos da NADPH-diaforase em intervalos de tempo menor do que 7 dias.

O padrão de atividade da NADPH-diaforase do gânglio raquidiano e do corno dorsal da medula espinal de tartarugas foi igual, tanto no lado seccionado como no intacto. Isto é similar a alguns dados obtidos em ratos (FIALLOS-ESTRADA et al., 1993; TRAUB et al., 1994). Porém, nestes últimos animais, há resultados onde o aumento da atividade NADPH-diaforase foi apenas ipsilateral à secção do nervo (ZHANG et al., 1993). Não há explicações disponíveis para estas divergências. Todavia, a existência de modificações bilaterais na expressão da NADPH-diaforase sugere que as projeções periféricas que estão chegando à medula espinal pelo lado seccionado, cruzam a linha média e vão fazer contatos sinápticos no lado contralateral, induzindo a ativação desta enzima neste local. De fato, há evidências experimentais demonstrando que, em mamíferos, algumas vias provenientes dos gânglios sensitivos, cruzam a linha média após chegarem a medula espinal, finalizando no lado contralateral (ECCLES & SCHADÉ, 1964). Isto também foi observado na medula espinal de répteis, inclusive de tartarugas (ECCLES & SCHADÉ, 1964;

TRUJILLO-CENÓZ et al., 1990). Esta pode ser a causa da resposta bilateral da atividade NADPH-diaforase após desnervação de ratos e tartarugas.

Em ratos, supõe-se que o aumento da atividade NADPH-diaforase, ocasionado pela desnervação periférica, esteja associado com inúmeras funções. Uma delas poderia ser a liberação de óxido nítrico pelos terminais periféricos, o qual iria agir sobre alvos tais como a pele e os músculos (FIALLOS-ESTRADA et al., 1993). Esta molécula também poderia exercer efeitos sobre os próprios neurônios medulares, assim contribuindo para a hipersensibilidade detectada em neurônios da medula espinal (ZIMMERMANN, 1991). Ela também poderia ativar células gliais do gânglio raquidiano, cuja estimulação exerceria um efeito trófico importante em neurônios lesados (MORRIS et al., 1992). O aumento da difusão do óxido nítrico ainda poderia ocasionar sua própria interação com o neurônio lesado, contribuindo, assim, para a perda da função desta célula (FIALLOS-ESTRADA et al., 1993) ou para sua sobrevivência. Sabe-se que as células com atividade NADPH-diaforase mostram-se mais resistentes à isquemia e a insultos degenerativos ou tóxicos (FERRANTE et al., 1985; KOH et al., 1986; UEMURA et al., 1990). Outro fato que apóia esta hipótese de resistência celular são as evidências de co-localização do óxido nítrico com c-JUN, o qual poderia controlar a expressão do gen da NOS, impedindo uma ativação exagerada desta enzima (FIALLOS-ESTRADA et al., 1993).

Uma ação importante do óxido nítrico, em mamíferos, é a vasodilatação, cujo efeito está bem documentado na literatura (MONCADA et al., 1991). Na periferia, este efeito parece ser somado àquele da SP e do peptídeo relacionado com o gen da

calcitonina (CGRP). Como uma característica da desnervação periférica destes animais é uma queda na expressão e na liberação destes peptídeos (WHITE et al., 1989), parece lícito sugerir que o aumento do óxido nítrico seja um mecanismo compensatório para esta redução. Um forte apoio para esta hipótese é a demonstração de que a maioria dos neurônios NADPH-diaforase positivos também possuem imunorreatividade para a SP e para o CGRP (AIMI et al., 1991).

É possível que estas funções do óxido nítrico também ocorram em tartarugas, muito embora nenhuma delas tenha sido demonstradas neste animal. Porém, dada a grande similaridade das respostas metabólicas de ratos e tartarugas, esta hipótese não parece absurda, mas, ao contrário, muito plausível.

Apesar da grande similaridade nas reações NADPH-diaforase do gânglio raquidiano e da medula espinal de ratos e tartarugas desnervados, encontrou-se uma diferença marcante, a expressão dessa atividade em motoneurônios da medula espinal de tartarugas. Esta atividade restringiu-se apenas ao lado ipsilateral à lesão. A grande maioria dos estudos de desnervação em ratos não descrevem esta resposta (ANDERSON, 1992; FIALLOS-ESTRADA et al., 1993; VIZZARD et al., 1993; TRAUB et al., 1994). Os únicos resultados semelhantes ocorreram após desnervação de animal neonato (CLOWRY, 1993) e após avulsão da raiz ventral da medula espinal (WU, 1992; 1993).

Esta expressão da NADPH-diaforase em neurônios motores de tartarugas desnervadas já apareceu aos 7 dias, intensificando-se nos períodos posteriores de

observação. Em ratos, estes neurônios também apresentaram esta reatividade após 1 semana da avulsão da raiz ventral da medula espinal (WU, 1993), porém, sua maior reatividade ocorreu após 4 semanas da cirurgia, enquanto na tartaruga esta apareceu aos 90 dias da desnervação. Esta diferença provavelmente seja o resultado das diferentes taxas metabólicas dessas espécies.

Entretanto, em ratos, os motoneurônios reativos do lado ipsilateral à lesão emitiam neuritos que deixavam a substância cinzenta e iam finalizar em torno das células endoteliais ou da superfície pial da medula espinal (WU, 1993). Este autor sugere que isto seja uma tentativa de regeneração neuronal quando a concentração de óxido nítrico encontra-se moderada, sendo estas degeneradas à medida que esta molécula aumenta acentuadamente. Na tartaruga não ocorreu a formação destes neuritos nos intervalos observados. Isto pode denotar uma diferença entre estas espécies, ou um atraso das tartarugas em desenvolver esta resposta, sendo esta indução realizada em um período mais tardio.

A presença de atividade NADPH-diaforase em neurônios motores de tartarugas pareceu restringir-se apenas ao segmento de medula lombar, muito embora não tenham sido procurados nos segmentos torácico e sacral. Todavia, esta não ocorreu na medula cervical. Em ratos, esta reatividade foi detectada apenas nos segmentos lombares diretamente relacionados com a avulsão (WU, 1993). Segundo este autor, esta resposta deve relacionar-se com a perda dos fatores tróficos produzidos pelas células de Schwann. Provavelmente estes fatores inibiam a expressão desta enzima. Com sua perda, esta pôde manifestar-se ativamente. É possível que isto também seja a

causa do retorno desta atividade após a desnervação de tartarugas adultas. Entretanto, é intrigante o fato de que, em tartarugas, esta reatividade apareceu após secção nervosa periférica, enquanto em ratos adultos foi necessário um procedimento mais drástico, como a avulsão da raiz ventral. Nesta situação, provavelmente ocorreu uma perda bem acentuada da interação entre o neurônio e as células gliais, enquanto a desnervação periférica ainda poderia manter parte deste envolvimento. No entanto, nas tartarugas, a secção de nervo periférico já deveria estar ocasionando um grau elevado de perda desta interação. Esta hipótese não parece tão absurda pelo fato de que o número de células satélites para um corpo celular neuronal, de determinado tamanho, é bem menor nos répteis do que nos mamíferos (PANNESE et al., 1975). Assim, apesar da desnervação periférica ser um procedimento menos danificante, já resultaria em uma perda significativa da inter-relação entre neurônio e célula glial.

Todavia, deve ser considerada também a possibilidade de que o retorno da expressão da NADPH-diaforase após desnervação de tartarugas e ratos neonatos, bem como após avulsão da raiz ventral da medula espinal de ratos adultos seja consequência da indução de síntese *de novo* desta enzima pela maior ativação de fatores tróficos. Possivelmente, em mamíferos, esta resposta dependa da intensidade do estímulo e da idade do animal. No rato neonato, esta indução já após desnervação periférica deve relacionar com a maior expressão de fatores tróficos pela imaturidade do tecido nervoso, enquanto a expressão destas moléculas encontra-se diminuída no animal adulto (GORIN & JOHNSON, 1980). O retorno da atividade NADPH-diaforase em neurônios motores de tartarugas adultas desnervadas deve relacionar-se com o aumento destes fatores já nesta situação. Provavelmente isto seja decorrente da

existência de uma maior atividade dos fatores tróficos em tartarugas adultas do que em ratos adultos. Nestes últimos, sabe-se que os fatores tróficos continuam sendo necessários para a sobrevivência de muitos neurônios simpáticos, sendo esta atividade silenciada nos neurônios sensoriais (GORIN & JOHNSON, 1980). É possível que nas tartarugas um número maior de neurônios continuam dependentes da ação de fatores tróficos para a sua sobrevivência, assim existindo uma maior atividade neste animal do que em ratos adultos. Conseqüentemente, um estímulo mais fraco já resultaria em um aumento significativo destas moléculas, fazendo com que elas pudessem exercer seus efeitos.

A hipótese de indução de fatores tróficos na regeneração parece plausível pelo fato de que diversos estudos demonstram que os processos de regeneração recapitulam aqueles padrões existentes durante o desenvolvimento, principalmente com relação aos genes citoesqueléticos (HOFMANN & CLEVELAND, 1988; MILLER et al., 1989), a síntese de proteínas celulares (DASTON & RATNER, 1991) e a composição do ambiente extracelular (MARTINI & SCHACHNER, 1988).

Um estudo recente propôs uma possível estratégia de interação entre os fatores tróficos e os processos de regeneração neural (BLOTTNER & BAUMGARTEN, 1994). De acordo com este estudo, um neurônio periférico lesado apresenta uma deficiência de fatores tróficos devido aos danos ocasionados no transporte axonal retrógrado e/ou pela perda dos fatores liberados pelo alvo periférico. Para conseguir sua reposição, o neurônio deve promover a ativação de fatores gênicos envolvidos na síntese destas moléculas, ou utilizar a captação dos fatores provenientes de vias

aferentes que chegam à célula lesada, os quais se dirigiam ao local da lesão pelo transporte anterógrado. Estes fatores tróficos também poderiam ser obtidos de células de Schwann intactas que existem à volta do axônio lesado. Outra possibilidade seria a ativação das células de Schwann pelos fatores liberados pelos macrófagos, os quais poderiam estimular a produção de fatores tróficos nas células de Schwann, ou agirem diretamente na área de lesão. Estes fatores provenientes dos macrófagos poderiam ainda estimular a proliferação de elementos mesenquimais envolvidos no reparo tecidual e na vascularização da área lesada.

Um dos fatores tróficos formados durante o processo de desenvolvimento do tecido nervoso é o fator de crescimento neuronal (NGF), cuja expressão parece ser capaz de ativar a enzima NOS em cultura de células PC12 (PEUNOVA & ENIKOLOPOV, 1995). No entanto, esta molécula também parece exercer efeitos nos mecanismos de hiperalgia. Sua administração resulta em um quadro muito similar àquele dos processos de inflamação tecidual. Além disso, a concentração desta molécula aumenta nos tecidos danificados, sendo este acréscimo observado dentro de horas após os danos celulares, havendo, inclusive, um aumento no transporte retrógrado deste fator no nervo ciático lesado (LEWIN & MENDELL, 1993).

O NGF e alguns dos outros fatores tróficos parecem atuar impedindo a morte celular. A administração local prévia destas moléculas previne parcialmente a morte neuronal decorrente da desnervação periférica (YIP et al., 1984; OTTO et al., 1987; ROGISTER et al., 1993). Recentemente, foi demonstrado a existência de uma correlação positiva entre fatores tróficos e atividade da NOS. Isto decorreu da

observação de que, a sobrevivência de neurônios simpato-adrenais, bem como a manutenção destas vias após administração *in vivo* de alguns fatores tróficos, dependeu da preservação da atividade NOS (BLOTTNER & BAUMGARTEN, 1992; BLOTTNER et al., 1993). Deste modo, parece lícito sugerir que a ativação da atividade NADPH-diaforase em motoneurônios de tartarugas desnervadas relacionar-se-ia com a sobrevivência destes neurônios. Isto parece bem plausível pelo fato de que as células positivas à esta enzima são mais resistentes aos insultos citotóxicos (FERRANTE et al., 1985; KOH et al., 1986; MALCON et al., submetido).

O óxido nítrico também parece desempenhar efeitos hiperalgésicos. Na literatura há diversos estudos demonstrando a sua participação nestas situações (KITTO et al., 1992; MELLER et al., 1992a; b; SOLODKIN et al., 1992), bem como seu aumento após secção de nervo periférico (FIALLOS-ESTRADA et al., 1993; TRAUB et al., 1994; o presente estudo). Todavia, há resultados experimentais sugerindo que o aumento da atividade NADPH-diaforase após secção nervosa periférica não possui qualquer relação com a nocicepção. Isto decorreu da observação de que há diferenças na distribuição desta atividade e na expressão da proteína c-Fos após inflamação unilateral da pata posterior de ratos (TRAUB et al., 1994). No entanto, é necessário ter muita cautela na interpretação destes resultados, uma vez que a ativação da c-Fos parece não corresponder unicamente com a nocicepção. Em ratos, observou-se que a parte da medula espinal correspondente ao lado não submetido à estimulação nociceptiva periférica apresentou expressão desta proteína (NARANJO et al., 1991; ACHAVAL, 1991). Apesar desta atividade ter sido de fraca intensidade, esta resposta não pôde ser descartada. A autora sugere que esta reação

deve ter sido consequência da exposição do animal à nova situação, a qual desencadeou um comportamento de alarme ou estresse, ativando alguns grupos de neurônios capazes de sintetizar a proteína c-Fos. Nas situações onde o óxido nítrico não parece estar diretamente envolvido com a transmissão nociceptiva, postula-se que o acréscimo da atividade NADPH-diaforase em animais submetidos à injúria neuronal relaciona-se com o aumento do metabolismo local e com o comportamento prévio e/ou decorrente da dor. Isso adveio da observação de que a injúria neural, produzida mecânica ou quimicamente a uma das patas posteriores do animal, resultou em um estado de sensibilização propagável, que tornou a outra pata mais vulnerável aos próximos insultos nervosos (LEAH et al., 1992). Além disso, detectou-se um aumento bilateral no consumo da 2-desoxiglicose na medula espinal e no tronco cerebral após injúria unilateral (MAO et al., 1992) e inflamação decorrente da administração de formalina (PORRO et al., 1991a; b).

Dada a inexistência de dados sobre a transmissão nociceptiva em tartarugas, é praticamente impossível relacionar os dados obtidos no presente estudo com esta via, ou excluir a participação da atividade NADPH-diaforase neste sistema sensitivo. Deste modo, este constitui um campo fértil para a realização de posteriores pesquisas, não apenas em tartarugas, mas também em ratos, o que poderá trazer subsídios à polêmica acima apresentada.

Outro foco de atenção deve ser dado ao estudo destas modificações ao longo do neuroeixo, visto que até o presente momento, são inexistentes dados experimentais sobre as modificações encefálicas após secção de nervo periférico em mamíferos. Os

diversos estudos que existem referem-se apenas à atividade dos motoneurônios de alguns pares cranianos, de neurônios hipocâmpais e de células neocorticais (GONZÁLEZ et al., 1987; HAVTON & KELLERTH, 1987; REGIDOR et al., 1993; VIZZARD et al., 1993; WU, 1993; RUAN et al., 1994; TRAUB et al., 1994; VIZZARD et al., 1994; YU, 1994; RUAN et al., 1995).

Uma característica comum de todos estes trabalhos foi o aumento da atividade NADPH-diaforase e da NOS após danos neurais. No entanto, a atividade NADPH-diaforase encefálica de tartarugas desnervadas pareceu reduzir-se em algumas regiões. Esta observação decorreu do aparecimento de grânulos positivos em alguns neurônios dos núcleos reticulares medial e inferior, bem como dos núcleos superior e inferior da rafe, os quais apresentavam anteriormente uma coloração intensa e homogênea após a detecção histoquímica desta enzima. Este padrão de reação já foi observado aos 7 dias e manteve-se assim nos demais períodos analisados. Além disso, com o aumento dos intervalos de observações, notou-se uma redução na quantidade de neurônios reativos nas regiões da eminência dorsal ventricular do telencéfalo e do estriado. Todavia, não foram detectados sinais de morte celular, o que sugere que a diminuição da reatividade à NADPH-diaforase não foi consequência da perda neuronal. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que a morte neuronal ocorra mais tardiamente do que o maior intervalo de observação analisado, ou seja, após 90 dias, uma vez que as reações químicas em tartarugas são bem mais lentas do que em ratos. Nestes animais, a avulsão do nervo facial resultou em perda celular em seu núcleo após 5 dias, sendo que este valor chegou a 60% aos 30 dias após a cirurgia (RUAN et al., 1995). Estes autores não apresentaram possíveis explicações para este fenômeno.

Entretanto, descrevem que, inicialmente, não houve morte neuronal, provavelmente pela grande perfusão sangüínea decorrente da dilatação dos vasos pela intensa atividade NADPH-diaforase presente. Nesta fase, houve pouca reatividade neuronal à NOS. Porém, quando o lúmen vascular retornou ao tamanho normal, os neurônios começaram a aumentar a atividade desta enzima. Este aumento na expressão da NOS provavelmente resultou em uma maior produção de óxido nítrico, o qual poderia ser o responsável pela morte celular tardia. Outros autores também atribuem este papel para o óxido nítrico (VIGÉ et al., 1993). É possível que a formação tardia desta molécula também resulte em morte neuronal nas tartarugas desnervadas periféricamente, uma vez que após 90 dias a atividade NADPH-diaforase das células gliais e endoteliais do encéfalo mostravam-se ainda bem intensas. Esta atividade endotelial possivelmente estava mantendo um elevado fluxo sangüíneo pelo tecido nervoso, assim impedindo a morte de neurônios. Conhecendo a lentidão das respostas metabólicas de tartarugas (McDOUGAL et al., 1968), parece lícito sugerir que estes animais necessitem de um tempo mais longo para o retorno às condições vasculares basais.

Para uma maior complicação deste quadro, a reação NADPH-diaforase encefálica de tartarugas desnervadas ainda apareceu no núcleo dorsomedial anterior do tálamo, o qual não expressava sua atividade nos animais controles. Além disso, observou-se uma fraca reatividade desta enzima no núcleo do ístmo e no núcleo mesencefálico do V par craniano, os quais também apareciam negativos anteriormente. É possível que esta indução esteja relacionada com a morte de neurônios destas regiões, as quais parecem receber aferências de centros envolvidos

com a sensibilidade geral dos répteis (ANTHONY, 1970). Entretanto, deve ser considerada também a possibilidade de que a indução desta expressão da NADPH-diaforase resulte na preservação destes grupos neuronais, tornando-os mais resistente aos insultos citotóxicos (BEAL et al., 1986; KOH et al., 1986; MALCON et al., submetido).

Diversos estudos realizados em mamíferos salientam que a concentração de óxido nítrico acumulado ou produzido pode ser um importante fator na determinação de regeneração ou degeneração celular (WU, 1993; YU, 1994). Sua capacidade de promover regeneração decorreu do conhecimento de que esta molécula foi capaz de proteger o miocárdio e o intestino de danos originados do quadro de isquemia/reperfusão, por atuar através de uma variedade de ações citoprotetoras, como por exemplo seu papel como inativador dos radicais superóxidos formados (RUBANYI et al., 1991; GABOURY et al., 1993). Esta capacidade também foi demonstrada em cultura de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos (WINK et al., 1993) e após trauma cerebral (YU, 1994). Entretanto, sua produção ou liberação indiscriminada pode reverter este papel e torná-la uma molécula citotóxica, a qual parece ser capaz de inibir enzimas envolvidas na síntese do DNA, no transporte de elétrons mitocondriais e no ciclo do ácido tricarboxílico (HIBBS et al., 1987; GREEN et al., 1991). Porém, não é apenas sua quantidade o fator determinante da ação protetora ou citotóxica, parece que o estado redox do óxido nítrico também tem uma importância acentuada nestes papéis (LIPTON et al., 1993). Baseado nestes dados, parece válida a suposição de que a diminuição da atividade NADPH-diaforase do encéfalo de tartarugas constitui um mecanismo de defesa contra os aumentos

observados na medula espinal, no gânglio raquidiano, nas células gliais e nas células endoteliais, o que, de certa forma, poderia ser fatal para a sobrevivência de neurônios. Entretanto, também deve ser considerada a possibilidade de que a queda na expressão da NADPH-diaforase resulta em uma vulnerabilidade destas células a agentes citotóxicos, indicando ser esta uma fase muito susceptível a danos neurais externos.

O padrão de distribuição da SP na medula espinal de *Trachemys dorbigni* foi muito semelhante àquela descrita nesta mesma região de *Chrysemys dorbigni* jovens (LUTHMAN et al., 1991). Todavia, a imunorreatividade à SP no primeiro animal citado foi mais ampla. No trabalho prévio, as fibras positivas a este peptídeo foram detectadas principalmente na área Ia, porém, muitas destas chegavam até a área III. Estas fibras imunomarcadas ainda podiam cruzar a linha média e alcançar o lado contralateral da medula espinal. Em *Trachemys dorbigni*, além desta distribuição, também foram observadas fibras imunorreativas que chegavam ao corno ventral, onde estavam rodeando o soma de motoneurônios, e aos funículos lateral e anterior. Parece possível que estas diferenças tenham alguma relação com o estágio de desenvolvimento da medula espinal. Neste trabalho, as tartarugas eram animais jovens, enquanto no presente estudo estas se encontravam na fase adulta. Porém, há resultados experimentais demonstrando a presença de fibras imunorreativas à SP na região ventromedial do corno dorsal de tartarugas *Chrysemys picta picta* e *Pseudemys scripta* (REINER et al., 1984). De acordo com Luthman et al. (1991), esta imunorreatividade da região ventromedial apresentada neste estudo deveria ter resultado do fato deste ter sido realizado em medula cervical, enquanto seus dados foram obtidos em segmentos medulares tóraco-lombares. Entretanto, o nosso estudo

foi realizado em cortes de medula espinal cervical e lombar, sendo a distribuição da atividade igual em todos eles. Isto coloca em questionamento a proposta apresentada por estes autores, deixando em aberto esta discussão.

A secção do nervo ciático de tartarugas *Trachemys dorbigni* provocou redução da imunorreatividade à SP em fibras longas e curtas da área Ia do corno dorsal da medula espinal, no lado ipsilateral à desnervação. Esta diminuição é similar ao que foi observado em mamíferos (JESSELL et al., 1979; TESSLER et al., 1980; 1981; 1984; BARBUT et al., 1981; EL-BOHY & LAMOTTE, 1993). Nestes animais, o decréscimo da atividade deste peptídeo parece iniciar-se no 5º dia após a cirurgia (BARBUT et al., 1981), embora haja evidências experimentais de que esta redução começa após 7 dias (JESSELL et al., 1979). É provável que as tartarugas também apresentem esta mesma resposta temporal, uma vez que aos 7 dias já foi detectada diminuição no padrão de imunorreatividade da SP do corno dorsal da medula espinal destes animais.

Em ratos, observou-se uma recuperação parcial da imunorreatividade da SP da medula espinal, após injúria axonal provocada por injeções de pronase no nervo ciático, aos 4-9 meses (EL-BOHY & LAMOTTE, 1993). Nas tartarugas, no entanto, um padrão de imunorreatividade similar àquele do animal controle ocorreu aos 90 dias. Deste modo, pode-se supôr que, nos ratos, a recuperação das fibras contendo SP acontece mais tardiamente do que nas tartarugas. Entretanto, deve ser considerado o fato de que a análise das mudanças ocorridas na medula de ratos considerou somente os intervalos de 10-13 dias e de 4-9 meses, deixando um espaço muito

grande entre as observações. Sendo assim, é possível que a recuperação do padrão de imunorreatividade da SP na medula espinal de ratos seja semelhante aos resultados observados na tartaruga.

Diversos estudos eletrofisiológicos e comportamentais indicam o envolvimento da SP na transmissão nociceptiva. Nesta situação, este peptídeo parece agir como um mediador excitatório (LEMBECK, 1953; HÖKFELT et al., 1975; HENRY, 1976; JESSELL & IVERSEN, 1977; KRNJEVIC', 1977; WRIGHT & ROBERTS, 1978; HAYES & TYERS, 1979; PIERCEY et al., 1981a; b). É possível que a SP também exerça estas funções em tartarugas, muito embora não existam dados experimentais na literatura apontando tais efeitos. Contudo, as semelhanças entre muitas respostas de tartarugas e ratos constituem um forte indício para a formulação de tal hipótese. Outro suporte a esta questão é a suposta analogia entre a área Ia da medula espinal de tartarugas e o trato de Lissauer dos mamíferos (TRUJILLO-CENÓZ et al., 1990). Deve ser lembrado, neste momento, que a maior imunorreatividade à SP de tartarugas localizou-se na área Ia.

Apesar deste estudo de tartarugas desnervadas ter considerado um número muito pequeno de marcadores metabólicos, as respostas obtidas permitem algumas considerações interessantes. A secção periférica provocou uma alteração neuroquímica que precedeu a detecção de morte neuronal. Esta reação foi similar àquela observada em mamíferos (RISLING et al., 1983; TESSLER et al., 1985). Entretanto, esta resposta neuroquímica de mamíferos desnervados parece ser totalmente independente da perda celular, uma vez que ela ocorre após impedimento

da morte neuronal (KLEIN et al., 1991). Desta forma, pode-se sugerir que estas modificações histoquímicas e imunohistoquímicas constituem uma resposta adaptativa às alterações sinápticas decorrentes da axotomia periférica. É sabido que o bloqueio temporário ou permanente dos impulsos neurais que chegam à medula espinal resulta em mudanças pós-sinápticas tanto na regulação gênica quanto na expressão de inúmeros transmissores e moléculas metabólicas (JONES, 1990; PERSSON et al., 1993; SHENG et al., 1993; WONG-RILEY et al., 1994). Todavia, isto não quer dizer que a natureza das modificações neurais ocasionadas pela desnervação periférica estejam completamente entendidas em mamíferos. Embora seja demonstrada uma redução imediata de sinais aferentes provenientes do nervo seccionado, há também estudos mostrando que a maioria da atividade espontânea gerada nos gânglios raquidianos parece não sofrer nenhuma alteração após a secção nervosa periférica (LU et al., 1993). Isto leva à dedução de que a desnervação não resulta em mudanças no “background” das atividades neurais que chegam à medula espinal. Sendo assim, pode-se aceitar a proposta sugerida por Avendaño & Dykes (1996) de que esta situação experimental ocasiona alterações nos sinais aferentes que estão chegando à medula espinal, e não na redução ou na remoção desta comunicação. Para estes autores, esta modificação do padrão normal poderia constituir o fator primário na indução das modificações neuroquímicas iniciais, as quais, por sua vez, poderiam representar a tentativa de adaptação às novas condições. Contudo, o passar do tempo deveria induzir uma diminuição no suprimento de fatores tróficos e uma redução na demanda metabólica como conseqüência de uma redução nos impulsos aferentes, o que resultaria em uma redução da massa citoplasmática e uma perda da capacidade de

manter o funcionamento das projeções eferentes. Nesta etapa poderia acontecer a morte neuronal.

Todas estas possibilidades também podem ser questionadas para as tartarugas, uma vez que o padrão obtido no presente estudo foi similar aos resultados descritos em mamíferos. Entretanto, as diferenças anteriormente destacadas podem constituir uma particularidade das tartarugas, bem como representar estágios bem iniciais das respostas observadas em mamíferos, as quais devem ocorrer tão rapidamente que acabam não sendo detectadas. Tanto em uma como em outra possibilidade, as tartarugas apresentam-se como excelentes modelos experimentais para os estudos de desnervação periférica, constituindo-se modelos que possibilitam o acompanhamento mais detalhado dos processos de mudanças oriundos desta situação experimental, bem como modelos que possam tanto esclarecer as seqüências de eventos quanto explicar os fenômenos adquiridos ou perdidos durante a evolução dos mamíferos. Isto possibilitará uma maior compreensão dos mecanismos de regeneração neural, o que, sem dúvida nenhuma, trará uma extraordinária contribuição possibilitando introduzir procedimentos que induzam à recuperação neural.

## 2- Jejum de 90 dias

Esta situação experimental não provocou alterações nas expressões das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase do encéfalo da tartaruga *Trachemys dorbigni*. Todavia, não se pode afirmar que o jejum de 90 dias não induz modificações nas atividades destas enzimas. É possível que pequenas mudanças tenham ocorrido, porém não puderam ser detectadas pelos métodos

histoquímicos utilizados no presente estudo. Há a possibilidade de que o emprego de técnicas bioquímicas possam demonstrar alterações na atividade dessas enzimas. Além disso, é possível sugerir também a utilização de densitometria óptica, onde se faz a comparação da intensidade de coloração observada nos cortes controles com aquelas obtidas nos tecidos dos animais submetidos às condições experimentais impostas pelo pesquisador. Como a intensidade de coloração desenvolvida nas regiões reativas do encéfalo da tartaruga *Trachemys dorbigni* foi intensa, é possível que a análise visual do observador não tenha conseguido detectar as prováveis discretas variações na intensidade da reatividade.

É sabido que, em mamíferos, o glicogênio tem um papel central no controle da glicogênio fosforilase. No fígado destes animais, observou-se que a atividade desta enzima possui uma relação direta com o teor glicogênico, de modo que uma maior concentração deste polissacarídeo leva a uma maior percentagem de enzima na forma ativa. Sendo assim, uma modificação na atividade glicogenolítica estaria associada a mudanças relativas nas quantidades das formas a e b da enzima (HEMS & WHITTON, 1980). Com relação à reserva glicogênica do fígado de tartarugas, sabe-se que o jejum de 90 dias provocou uma redução significativa na concentração deste polissacarídeo (MACHADO, 1977). Portanto, parece lícito sugerir que nas tartarugas em estudo também houve esta mobilização, a qual poderia ter mantido um fornecimento adequado de glicose ao tecido nervoso, não havendo a necessidade de utilização de sua própria reserva. Desta forma, nenhuma alteração ocorreria na atividade da glicogênio fosforilase. Este fornecimento contínuo de substrato energético não possibilitaria alterações no metabolismo das células neurais deste

tecido, o que poderia ter proporcionado a manutenção da atividade da citocromo oxidase. Não havendo modificações nas taxas metabólicas, isto poderia também ser o determinante da inalterabilidade da expressão da NADPH-diaforase.

Entretanto, em trabalho prévio, demonstrou-se que o jejum de 30 dias não ocasionou mudanças significativas na concentração glicogênica do encéfalo de *Chrysemys dorsalis*. Todavia, esta reserva manifestou uma tendência de redução ao final deste período de jejum. Deste modo, pode-se sugerir que após 90 dias de jejum ocorreria uma alteração neste polissacarídeo. Entretanto, deve-se ressaltar que os experimentos realizaram-se durante o verão, enquanto os dados do presente estudo foram obtidos no inverno. Está demonstrado que as reservas glicogênicas da tartaruga *Chrysemys dorsalis* sofrem modificações sazonais, estando aquela do encéfalo mais alta no inverno do que no verão (PARTATA & MARQUES, 1994). Além disso, é sabido que o jejum induz uma redução da taxa metabólica de tartarugas (RAPATZ & MUSACCHIA, 1957). Desta forma, é possível que a inalterabilidade da atividade da glicogênio fosforilase se deve a estas peculiaridades das tartarugas. Mas, por outro lado, a atividade da glicogênio fosforilase pode não acompanhar as alterações do teor do glicogênio tecidual. Em rã não houve um sincronismo entre a atividade da glicogênio fosforilase e o conteúdo do glicogênio hepático, estando a atividade desta enzima ainda aumentando quando a reserva glicogênica encontrava-se com valores mínimos (SCAPIN & GIUSEPPE, 1994).

Mas, por outro lado, merece ser considerada a possibilidade de que o jejum tenha ocasionado mudanças na atividade da glicogênio fosforilase, só que em estágios

bem iniciais, os quais não foram estudados. Parece ser importante o acompanhamento da atividade desta enzima em intervalos mais curtos durante os primeiros dias de jejum. Para a verificação desta hipótese, seria necessário o acompanhamento da atividade da glicogênio fosforilase com a utilização de técnicas bioquímicas, as quais, como já salientado, são mais sensíveis a pequenas modificações metabólicas.

Com base nestas questões, fica explícita a necessidade de estudos mais detalhados sobre os efeitos do jejum e a atividade das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase no encéfalo de tartarugas.

## **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

No presente trabalho foi demonstrado que as enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase possuem um padrão similar de distribuição no sistema nervoso central (SNC) da tartaruga *Trachemys dorbigni* adulta. Assim sendo, as vias glicolítica e oxidativa, bem como a síntese de óxido nítrico ocorrem em praticamente os mesmos grupos neuronais. É interessante que esse perfil de distribuição enzimática no SNC de tartaruga foi semelhante àquele descrito nos mamíferos. Sabe-se, porém, que a tartaruga possui menor quantidade de células gliais em relação ao número de neurônios. É possível que este fato esteja relacionado com sua maior tolerância à anoxia. Provavelmente, o aumento de células gliais nos mamíferos tenha resultado na perda dessa capacidade como consequência do maior envolvimento destas células no metabolismo do tecido nervoso. Serão necessários novos estudos para tentar esclarecer essa hipótese, como por exemplo, comparar em distintas espécies animais a interação das células gliais com os neurônios e a tolerância a anoxia. Futuros experimentos deverão também verificar o padrão de atividade das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase durante a exposição de tartarugas a diferentes períodos de anoxia.

O padrão de distribuição da glicogênio fosforilase e da citocromo oxidase no tecido nervoso de tartarugas jovens é similar àquele da tartaruga adulta. Entretanto, a atividade NADPH-diaforase mostra-se mais ampla no animal jovem do que no adulto. Provavelmente, isto esteja indicando uma participação acentuada do óxido nítrico no desenvolvimento do SNC de tartarugas, assim como é especulado para mamíferos. O padrão enzimático delineado no presente estudo parece indicar que as tartarugas já devem nascer com o tecido nervoso em um estágio avançado de desenvolvimento, o

que permitiria a realização de tarefas complexas nessa fase. Considerando a classificação estabelecida para os mamíferos, supõe-se que as tartarugas constituem exemplos de animais precoces.

As alterações neuroquímicas observadas após a secção do nervo ciático de tartarugas *Trachemys dorbigni*, adultas, constituem, provavelmente, uma resposta adaptativa às alterações sinápticas decorrentes da axotomia periférica, assim como foi sugerido para os mamíferos. Desta forma, as tartarugas tornam-se valiosos modelos experimentais para a realização desses estudos, uma vez que, diferente dos mamíferos, possuem uma lentidão nas respostas metabólicas. Deste modo, é possível o acompanhamento passo a passo das alterações neuroquímicas oriundas da desnervação periférica. Os resultados desses experimentos poderão trazer subsídios ao entendimento das modificações decorrentes dessa situação experimental, e sobre as quais ainda existe muita especulação até o presente momento.

É provável que a permanência do padrão basal de distribuição das enzimas glicogênio fosforilase, citocromo oxidase e NADPH-diaforase após jejum de 90 dias na tartaruga seja consequência da lentidão de seus processos metabólicos. Todavia, não se pode descartar a possibilidade de que as técnicas histoquímicas utilizadas tenham sido incapazes de detectar pequenas variações que poderiam ter ocorrido. Desta forma, torna-se necessário o emprego de métodos mais sensíveis, os quais poderão fornecer dados mais conclusivos.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam também que seria importante realizar outros estudos, tais como, o mapeamento imunohistoquímico da enzima óxido nítrico sintetase, que poderá revelar se a distribuição da NADPH-diaforase, aqui apresentada, identifica realmente os neurônios capazes de sintetizar o óxido nítrico; a determinação da possível co-localização de atividade NADPH-diaforase com neurotransmissores clássicos; e o mapeamento imunohistoquímico da proteína c-Fos, cujos resultados trarão contribuição ao entendimento da transmissão nociceptiva em tartarugas.

Conclui-se, a partir deste estudo histoquímico e imunohistoquímico do sistema nervoso central de tartarugas em condições basais e após distintas situações experimentais, que há necessidade de uma abordagem funcional mais detalhada de seu tecido nervoso, não apenas para o entendimento de suas peculiaridades, mas também para a compreensão de muitas questões ainda especulativas nos mamíferos, as quais, analisadas numa perspectiva evolutiva, poderão ser esclarecidas. É indiscutível a posição estratégica das tartarugas na filogenia dos vertebrados. Além disso, há inúmeros exemplos na literatura de que a identificação de similaridades e diferenças de estrutura e função entre as espécies permite constatar que algumas delas, de acordo com certas peculiaridades, possam servir como modelo ideal para o estudo de processos fisiológicos básicos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABE, T; YAMADA, Y; HASHIMOTO, P. H. & SHIMIZU, N. (1963). Histochemical study of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the brain of normal adult rat. *Med. J. Osaka Univ.* 14: 67-98.
- ACHAVAL, M. (1991). Expressão da proteína c-FOS no sistema nervo central do rato após estimulação nociceptiva periférica. Porto Alegre: UFRGS, 1991. Tese (Doutorado)- Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- ADAMS, C. W. M. (1965). *Neurohistochemistry*. New York, Elsevier Publishing Company, 753p.
- AGUILA, M. C. (1994). Growth hormone-releasing factor increases somatostatin release and mRNA levels in the rat periventricular nucleus via nitric oxide by activation of guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 782-786.
- AIMI, Y; FUJIMURA, M; VINCENT, S. R. & KIMURA, H. (1991). Localization of NADPH-diaphorase containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J. Comp. Neurol.* 306: 382-392.
- ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K. & WATSON, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Publishing. 1294 p.
- ANDERSON, C. R. (1992). NADPH diaphorase-positive neurons in the rat spinal cord include a subpopulation of autonomic preganglionic neurons. *Neurosci. Lett.* 139: 280-284.
- ANDO, A; DOMOTO, T; TSUMORI, T. & YASUI, Y. (1996). Changes of NADPH-diaphorase activity in the lumbosacral intermediolateral neurons of the rat after pelvic axotomy. *Brain Res. Bull.* 40: 37-42.
- ANTHONY, J. (1970). Le Névraxe des Reptiles. In: Grassé, P-P. *Traité de Zoologie*. Paris, Masson. XIV (II): 680p+ XXXII
- ARIENS KAPPERS, C. V; HUBER, C. G. & CROSBY, E. C. (1936). *The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man*. New York, The McMillan Company. 1864 p.
- AVENDAÑO, C. & VERDU, A. (1992). Area 3a in the cat. I. A reevaluation of its location and architecture on the basis of Nissl, myelin, acetylcholinesterase, and cytochrome oxidase staining. *J. Comp. Neurol.* 321: 357-372.

- AVENDAÑO, C. & DYKES, R. W. (1996). Evolution of morphological and histochemical changes in the adult cat cuneate nucleus following forelimb denervation. *J. Comp. Neurol.* 370: 479-490.
- BACHELARD, H. S. (1975). Energy utilized by neurotransmitters. In: INGUAR, D. H. & LASSEN, N. A. *Brain Work. Alfred Benzon Symposium.* New York, Academic Press, pp. 79-81.
- BALABAN, C. D. & ULINSKI, P. S. (1981a). Organization of thalamic afferents to anterior dorsal ventricular ridge in turtles. I. Projections of thalamic nuclei. *J. Comp. Neurol.* 200: 95-129.
- BALABAN, C. D. & ULINSKI, P. S. (1981b). Organization of thalamic afferents to anterior dorsal ventricular ridge in turtles. II. Projections of rotundo-dorsal nucleus map. *J. Comp. Neurol.* 200: 131-150.
- BANGMA, G. C. & ten DONKELAAR, H. J. (1982). Afferent connections of the cerebellum in various types of reptiles. *J. Comp. Neurol.* 207: 255-273.
- BARBUT, D; POLAK, J. M. & WALL, P. D. (1981). Substance P in spinal cord dorsal horn decreases following peripheral nerve injury. *Brain Res.* 205: 289-298.
- BARR, G. A; ECKENRODE, T. C. & MURRAY, M. (1987). Normal development and effects of early deafferentation on choline acetyltransferase, substance P and serotonin-like immunoreactivity in the interpeduncular nucleus. *Brain Res.* 418: 310-313.
- BEAL, R. J. & PRIVITERA, C. A. (1973). Effects of cold exposure on cardiac metabolism of the turtle *Pseudemys (Chrysemys) picta*. *Am. J. Physiol.* 224: 435-441.
- BEAL, M. F; KOWALL, N. W; ELLISON, D. W; MAZUREK, M. F; SWARTZ, K. J. & MARTIN, J. B. (1986). Replication of the neurochemical characteristic of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321: 168-171.
- BEAR, M. F. & EBNER, F. F. (1983). Somatostatin-like immunoreactivity in the forebrain of *Pseudemys* turtles. *Neuroscience* 9: 297-307.
- BECKER, D. P. (1985). Brain acidosis in head injury: a clinical trial. In: Becker, D. P; Povlishock, J. T. (eds.). *Central Nervous*

System Trauma Status Report. Richmond, Byrd Press, pp. 229-242.

- BELEKHOVA, M. G; KOSAREVA, A. A; VESELKIN, N. P. & ERMAKOVA, T. V. (1978). Telencephalic afferent connections in the turtle *Emys orbicularis*: A peroxidase study. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 14: 97-103.
- BELEKHOVA, M. G. (1979). Neurophysiology of the forebrain. In: GANS, C. *Biology of the reptilia*. New York Academic Press, 10, cap. 7, p. 287-388.
- BELKIN, D. A. (1962). Anaerobiose in diving turtles (abstract). *The Physiologist* 5: 105.
- BELLÓ, A. A. & BELLÓ-KLEIN, A. (1991). A technique to anesthetize turtles with ether. *Physiol. & Behav.* 50: 847-848.
- BERKOWITZ, A. & STEIN, P. S. G. (1994). Descending propriospinal axons in the hindlimb enlargement of the red-eared turtle: cells of origin and funicular courses. *J. Comp. Neurol.* 346: 321-336.
- BERKSON, H. (1966). Physiological adjustments to prolonged diving in the Pacific green turtle (*Chelonia agassizii*). *Comp. Biochem. Physiol.* 18: 101-119.
- BLISS, T. V. P. & COLLINGRIDGE, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-40.
- BLOTTNER, D. & BAUMGARTEN, H. G. (1992). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) counteracts bFGF-induced survival of nitric oxide synthase (NOS)- positive spinal cord neurons after target-lesion *in vivo*. *J. Neurosci. Res.* 32: 471-480.
- BLOTTNER, D; SCHIMIDT, H. H. H. W. & BAUMGARTEN, H. G. (1993). Nitroergic autonomic neurones in rat spinal cord. *Neuroreport* 4: 923-926.
- BLOTTNER, D. & BAUMGARTEN, H. G. (1994). Neurotrophs and regeneration *in vivo*. *Acta Anat.* 150: 235-245.
- BOHME, G. A; BON, C; STUTZMANN, J. M; DOBLE, A. & BLANCHARD, J.-C. (1991). Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharmac.* 199: 379-381.

- BÔMONT, L; BILGER, A; BOYET, S; VERT, P. & NEHLIG, A. (1992). Acute hypoxia induces specific changes in local cerebral glucose utilization at different postnatal ages in the rat. *Dev. Brain Res.* 66: 33-45.
- BON, C; BOHME, G. A; DOBLE, A; STUTZMANN, J-M; BLANCHARD, J-C. (1992). A role for nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Neurosci.* 4: 420-424.
- BOOTH, R. F. G; PATEL, T. B. & CLARK, J. B. (1980). The development of enzymes of energy metabolism in the brain of a precocial (Guinea pig) and non-precocial (rat) species. *J. Neurochem.* 34: 17-25.
- BOROWSKY, I. W. & COLLINS, R. C. (1989). Metabolic anatomy of brain: A comparison of regional capillary density, glucose metabolism, and enzyme activities. *J. Comp. Neurol.* 288: 401-413.
- BOULTON, C. L; IRVING, A. J; SOUTHAM, E; POTIER, B; GARTHWAITE, J. & COLLINGRIDGE, G. (1994). The nitric oxide-cyclic GMP pathway and synaptic depression in rat hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* 6: 1528-1535.
- BRADFORD, H. F. (1986). *Chemical neurobiology*. New York, W. H. Freeman and Company. p. 265-310.
- BRECKENRIDGE, B. M. & NORMAN, J. H. (1962). Glycogen phosphorylase in brain. *J. Neurochem.* 9: 383-392.
- BRECKENRIDGE, B. M. & NORMAN, J. H. (1965). The conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in brain. *J. Neurochem.* 12: 51-57.
- BREDT, D. S; GLATT, C. E; HWANG, P. M; FOTUHI, M. & DAWSON, T. M. (1991). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH-diaphorase. *Neuron* 7: 615-624.
- BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. (1994). Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory neurons. *Neuron* 13: 301-313.
- BRÜNING, G. (1993). Localization of NADPH-diaphorase in the brain of the chicken. *J. Comp. Neurol.* 334: 192-208.

- BRÜNING, G; WIESE, S. & MAYER, B. (1994). Nitric oxide synthase in the brain of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J. Comp. Neurol.* 348: 183-206.
- BRÜNING, G; KATSBACH, R. & MEYER, B. (1995). Histochemical and immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the central nervous system of the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Neurol.* 358: 353-382.
- BUGNON, O; SCHAAD, N. C. & SCHORDERET, M. (1994). Nitric oxide modulates endogenous dopamine release in bovine retina. *Neuroreport* 5: 401-404.
- BUISSON, A; PLATKINE, M. & BOULU, R. G. (1992). The neuroprotective effect of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Br. J. Pharmacol.* 106: 766-767.
- BUTLER, A. B. (1976). Telencephalon of the lizard *Gekko gekko* (Linnaeus): some connections of the cortex and dorsal ventricular ridge. *Brain, Behav. Evol.* 13: 396-417.
- CASAGRANDE, V. A. & CONDO, G. J. (1988). The effect of altered neuronal activity on the development of layers in the lateral geniculate nucleus. *J. Neurosci.* 8: 395-416.
- CATALDO, A. M. & BROADWELL, R. D. (1986). Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions: neurons and glia. *J. Electron. Microsc. Tech.* 3: 413-437.
- CECCATELLI, S; HULTING, A-L; ZHANG, X; GUSTAFSSON, L. & VILLAR, M. (1993). Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11292-11296.
- CHAN-PALAY, V. & PALAY, S. L. (1977). Immunocytochemical identification of substance P cells and their processes in rat sensory ganglia and their terminals in the spinal cord: light microscopic studies. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74: 3597-3601.
- CHANG, M. M. & LEEMAN, S. E. (1970). Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J. Biol. Chem.* 245: 4784-4790.

- CHETKOVICH, D. M; KLANN, E; SWEATT, J. D. (1993). Nitric oxide synthase-independent long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *Neuroreport* 4: 919-922.
- CHUGANI, H. T; HOVDA, D. A; VILLABLANCA, J. R; PHELPS, M. E; XU, W-F. (1991). Metabolic maturation of the brain: a study of local cerebral glucose utilization in the developing cat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11: 35-47.
- CLOWRY, G. J. (1993). Axotomy induces NADPH diaphorase activity in neonatal but not adult motoneurons. *Neuroreport* 5: 361-364.
- COBCROFT, M; VACCARO, T. & MITROFANIS, J. (1989). Distinct patterns of distributions among NADPH-diaphorase neurones of the guinea pig retina. *Neurosci. Lett.* 103: 1-7.
- CONRAD, L. C. A. & PFAFF, D. W. (1976). Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. II An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 169: 221-262.
- COOPERSMITH, R. & LEON, M. (1987). Glycogen phosphorylase activity in the olfactory bulb of the young rat. *J. Comp. Neurol.* 261: 148-154.
- COSTA, A; TRAINER, P; BESSER, M; GROSSMAN, A. (1993). Nitric oxide modulates the release of corticotropin -releasing hormone from the rat hypothalamus *in vitro*. *Brain Res.* 605: 187-192.
- COULSON, R.A. & HERNANDEZ, T. (1974). Intermediary metabolism of reptiles. In: Florkin, M; Scheer, B. T; eds. *Chemical Zoology: Amphibia and Reptilia*. New York: Academic Press. Cap. 9, p. 217-247.
- CREPEL, F. & JAILLARD, D. (1990). Protein kinases, nitric oxide and long-term depression of synapses in the cerebellum. *Neuroreport* 4: 133-136.
- CROCKETT, D. P; MASLANY, S; HARRIS, S. L. & EGGER, M. D. (1993). Enhanced cytochrome -oxidase staining of the cuneate nucleus in rat reveals a modifiable somatotopic map. *Brain Res.* 612: 41-55.
- CROWE, M. J; BROWN, T. J; BRESNAHAN, J. C. & BEATTIE, M. S. (1995). Distribution of NADPH-diaphorase reactivity in the

- spinal cord of metamorphosing and adult *Xenopus laevis*. Dev. Brain Res. 86: 155-166.
- CUELLO, A. C. (1978). The distribution of substance P immunoreactive fibers in rat central nervous system. J. Comp. Neurol. 178: 129-156.
- CUEZVA, J. M. (1988). Glucólisis y gluconeogénesis, en el feto y neonato. In: Herrera, E. Bioquímica Perinatal. Aspectos Básicos y Patológicos. Cap. XI. Madrid, Editorial Ceura-Madrid. p. 227-252.
- da COSTA, J. C; RUSSO, R. E; GUILLERMO, G. & VELLUTI, J. C. (1992a). Bases celulares da epilepsia. J. L. B. E. 5: 9-17.
- da COSTA, J. C; RUSSO, R. E; GUILLERMO, G. & VELLUTI, J. C. (1992b). Atividade epileptiforme interectal espontânea e ictal induzida no cérebro isolado *in vitro* da tartaruga. J. L. B. E. 5: 117-127.
- da COSTA, J. C. (1993). Atividade epiletiforme interictal espontânea e ictal induzida *in vitro* em cérebro isolado da tartaruga *Chrysemys dorsalis*: um modelo experimental para o estudo da epilepsia. Porto Alegre: UFRGS, 1993. Tese Doutorado em Ciências Biológicas, Concentração Fisiologia-Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- DANIEL, H; HEMART, N; JAILLARD, D; CREPEL, F. (1993). Long-term depression requires nitric oxide and guanosine 3':5'cyclic monophosphate production in rat cerebellar Purkinje cells. Eur. J. Neurosci. 5: 1079-1082.
- DASTON, M. M. & RATNER, N. (1991). Expression of P30, a protein with adhesion properties, in Schwann cells and neurons of the developing and the regenerating peripheral nerve. J. Cell. Biol. 112: 1229-1239.
- DAWSON, V. L; DAWSON, T. M; LONDON, E. D; BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6368-6371.
- DAWSON, V. L; DAWSON, T. M; BARTLEY, D. A; UHL, G. R. & SNYDER, S. H. (1993). Mechanisms of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. J. Neurosci. 13: 2651-2661.

- De FELIPE, M. C; MOLINERO, M. T. & DEL RÍO, J. (1989). Long-lasting neurochemical and functional changes in rats induced by neonatal administration of substance P antiserum. *Brain Res.* 485: 301-308.
- DE RIBAUPIERRE, F. (1968). Localization, synthese et utilization du glycogen dans le ganglion sympathique cervical du cou. *Brain Res.* 11: 42-64.
- DEHAY, C. & KENNEDY, H. (1988). The maturational status of thalamocortical and collosal connections of visual areas V1 and V2 in the newborn monkey. *Behav. Brain Res.* 29: 237-244.
- DICKIE, B. G. M; LEWIS, M. J; DAVIES, J. A. (1992). NMDA-induced release of nitric oxide potentiates asprstare overflow from cerebellar slices. *Neurosci Lett.* 138: 145-148.
- DIFIGLIA, M; GRAVELAND, G. A. & SCHIFF, L. (1987). Cytochrome oxidase activity in the rat caudate nucleus: light and electron microscopic observations. *J. Comp. Neurol.* 255: 137-145.
- DINERMAN, J. L; DAWSON, T. M; SCHELL, M. J; SNOWMAN, A; SNYDER, S. H. (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramid cells: implications for synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4214-4218.
- DIROCCO, R. J; KAGEYAMA, G. H. & WONG-RILEY, M. T. T. (1989). The relationship between CNS metabolism and cytoarchitecture: a review of <sup>14</sup>C-deoxyglucose studies with correlation to cytochrome oxidase histochemistry. *Comput. med. Imag. Graphics* 13: 81-92.
- DRINGEN, R; GEBHARDT, R. & HAMPRECHT, B. (1993a). Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighbouring cells. *Brain Res* 623: 208-214.
- DRINGEN, R; WIESINGER, H. & HAMPRECHT, B. (1993b). Uptake of L-lactate by cultured rat brain neurons. *Neurosci. Lett.* 163: 5-7.
- DRUMMOND, G. I. & BELLWARD, G. (1970). Studies on phosphorylase b kinase from neural tissue. *J. Neurochem.* 17: 475-482.
- DRUMMOND, G. I. (1983). Cyclic nucleotides in the nervous system. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 15: 373-494.

- DUBÉ, L. & PARENT, A. (1978). Histofluorescence study of the catecholaminergic innervation of the avian forebrain. *Soc. Neurosci. Abstr.* 4: 271.
- DUCKETT, S. & PEARSE, A. G. E. (1964). The nature of the solitary active cells of the central nervous system. *Experimentia* 20: 259-260.
- EBBENSSON, S. O. E. (1972). A proposal for a common nomenclature for some optic nuclei in vertebrates and the evidence for a common origin of two such cell groups. *Brain, Behav. Evol.* 6: 75-91.
- ECCLES, J. C. & SCHADÉ, J. P. (1964). *Organization of the Spinal Cord*. New York, Elsevier Publishing Company, 285p.
- ECCLES, J. C.; RANTUCCI, T; SCHEID, P. & Á BORÍKOVÁ, H. (1975). Somatotopic studies on red nucleus: spinal projection level and respective fields. *J. Neurophysiol.* 38: 965-980.
- EDWARDS, C; NAHORSKI, S. R. & ROGERS, K. J. (1974). *In vivo* changes of cerebral cyclic adenosine 3'5'-monophosphate induced by biogenic amines: association with phosphorylase activation. *J. Neurochem.* 22: 565-572.
- EGBERONGBE, Y. I; GENTLEMAN, S. M; FALKAI, P; BOGERTS, B; POLAK, J. M. & ROBERTS, G. W. (1994). The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neuroscience* 59: 561-578.
- EL-BOHY, A. & LAMOTTE, C. C. (1993). Deafferentation -induced changes in neuropeptides of the adult rat dorsal horn following pronase injection of the sciatic nerve. *J. Comp. Neurol.* 336: 545-554.
- ELLISON, D. W; KOWALL, N. W. & MARTIN, J. B. (1987). Subset of neurons characterized by the presence of NADPH-diaphorase in human substantia innominata. *J. Comp. Neurol.* 269: 233-245.
- ERECINSKA, M. & SILVER, I. A. (1989). ATP and brain function. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 9: 2-19.
- FARACI, F. M. & BRIAN, J. E. (1994). Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke* 25: 692-703.
- FERNÁNDEZ, A; RADMILOVICH, M. & TRUJILLO-CENÓZ, O. (1993). Neuronal types in the spinal dorsal gray of the turtle

- Chrysemys d'orbigni*: a Golgi study. *Cell Tissue Res.* 272: 355-368.
- FERNÁNDEZ, A; RADMILOVICH, M; RUSSO, R. E; HOUNSGAARD, J. & TRUJILLO-CENÓZ, O. (1996). Monosynaptic connections between primary afferents and giant neurons in the turtle spinal dorsal horn. *Exp. Brain Res.* 482: 1-10.
- FERRANTE, R. J; KOWALL, N. W; BEAL, M. F; RICHARDSON, E. P. JR; BIRD, E. D. & MARTIN, J. B. (1985). Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* 230: 561-563.
- FERRIERO, D. M; ARCAVI, L. J; SAGAR, S. M; McINTOSH, T. K. & SIMON, R. P. (1988) Selective sparing of NADPH-diaphorase neurons in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann. Neurol.* 24: 670-676.
- FIALLOS-ESTRADA, C. E; KUMMER, W; MAYER, B; BRAVO, K; ZIMMERMANN, M. & HERDEGEN, T. (1993). Long-lasting increase of nitric oxide synthase immunoreactivity, NADPH-diaphorase reaction and c-JUN co-expression in rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection. *Neurosci Lett.* 150: 169-173.
- FIORILLO, C; BRAFORD JR. , M. R. & SMITH, D. (1993). NADPH-diaphorase (ND) staining in goldfish (*Carassius auratus*) central nervous system. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19: 161.
- FLEXNER, L. B. (1955). Enzymatic and functional patterns of the developing mammalian brain. In: Waelsch, H. *Biochemistry of the developing nervous system.* New York: Academic Press. pp. 281-295.
- FOLBERGRAVÁ, J. (1975). Changes in glycogen phosphorylase activity and glycogen levels of mouse cerebellar cortex during convulsion induced by homocysteine. *J. Neurochem.* 24: 15-20.
- FORSTERMANN, U; GORSKY, L. E; POLLOCK, J. S; SCHIMIDT, H. H. H. W; HELLER, M. & MURAD, F. (1990). Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 727-732.
- FOSCHINI, D. R; EGGER, M. D. & CROCKETT, D. P. (1994). The mutability of low-affinity nerve growth factor receptor (p<sup>75</sup>NGFR) expression in the rat cuneate nucleus following perinatal injury

- and adult deafferentations: comparisons with cytochrome oxidase. *Brain Res.* 646: 1-12.
- GABOURY, J; WOODMAN, R. C; GRANGER, D. N; REINHARDT, P; KUBES, P. (1993). Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am. J. Physiol.* 265: H862-H867.
- GAFFNEY, E. S. , HUTCHISON, J. H. , JENKIS, F. A. & MEEKER, L. J. (1987). Modern turtle origins; The oldest know Cryptodire. *Science* 237: 289-291.
- GAIDAENKO, G. V. (1978). Efferent connections of the dorsal cortex in tortoises. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 13: 268-270.
- GALLY, J. A; MONTAGNE, P. R; REEKE, G. N. & EDELMAN, G. M. (1990). The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3547-3551.
- GARTHWAITE, J; CHARLES, S. L. & CHESS-WILLIAMS, R. (1988). Endothelium- derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385-388.
- GARTHWAITE, J. & BOULTON, C. L. (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 683-706.
- GHOSH, S. K. & GUHA, S. R. (1978). Studies on brain maturation and growth. IV. Glycogen. *J. Anim. Morphol. Physiol.* 25: 214-219.
- GOBEL, S; FALLS, W. M; BENNETT, G. J; ABDELMOUMENE, M; HAYASHI, H; HUMPHREY, E. (1980). An EM analysis of the synaptic connections of horsehadish peroxidase -filled stalked cells and islet cells in the substantia gelatinosa of adult cat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 194: 781-807.
- GODLEWSKI, H. G. (1963). Are active and inactive phosphorylases histochemically distinguishable. *J. Histochem. Cytochem.* 11: 108-112.
- GOLDBERG, B; WADE, O. R; JONES, JR. , H. W. (1952). Polysaccharide synthesis in frozen tissue sections as a histochemical method for phosphorylase. *J. Nat. Cancer Inst.* 13: 543-557.

- GOLDBERGER, M. E; PAIGE, E; CROUL, S. & LEVITT, P. (1993). Partial deafferentation of cat spinal neurons results in permanent changes in cell surface molecular expression and metabolic activity. *Exp. Neurol.* 123: 74-80.
- GONZÁLEZ, M. F; SHARP, F. R. & SAGAR, S. M. (1987). Axotomy increases NADPH-diaphorase staining in rat vagal motor neurons. *Brain Res. Bull.* 18: 417-427.
- GONZÁLEZ-LIMA, F. & JONES, D. (1994). Quantitative mapping of cytochrome oxidase activity in the central auditory system of the gerbil: a study with calibrated activity standards and metal-intensified histochemistry. *Brain Res.* 660: 34-49.
- GORIN, P. D. & JOHNSON, E. M. Jr. (1980). Effects of long-term nerve growth factor deprivation on the nervous system of the adult rat: An experimental autoimmune approach. *Brain Res.* 198: 27-42.
- GRAHAM, R. C. & KARNOVSKY, M. J. (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney in ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 291-302.
- GREEN, S. J; NACY, C. A; MELTZER, M. S. (1991). Cytokine-induced synthesis of nitro-gen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. *J. Leukocyte Biol.* 50: 93-102.
- GREGORY, P. T. (1982). Reptilian hibernation. In: Gans, C. *Biology of the Reptilia*. In: Gans, C. *Biology of Reptilia*. New York, Academic Press. 13: pp. 53-153.
- GRIBKOFF, V. K. & LUM-RAGAN, J. T. (1992). Evidence for nitric oxide synthase inhibitor-sensitive and insensitive hippocampal synaptic potentiation. *J. Neurophysiol.* 68: 639-642.
- GROSS, P. M; SPOSITO, N. M; PETTERSEN, S. E. & FENSTERMACHER, J. D. (1986). Differences in function and structure of the capillary endothelium in gray matter, white matter and a circumventricular organ of rat brain. *Blood Vessels* 23: 261-270.
- GROZDANOVIC, Z; BRÜNING, G. & BAUMGARTEN, H. G. (1994). Nitric oxide- A novel autonomic neurotransmitter. *Acta Anat.* 150: 16-24.

- GRZIMEK, B. (1975). Grzimerk's Animal Life Encyclopedia. New York: Van Nostrand Reinhold Company. 6, 589p.
- GUEVARA-GUZMAN, R; EMSON, P. C; KENDRICK, K. M. (1994). Modulation of *in vivo* striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J. Neurochem.* 62: 807-810.
- HALÁSZ, N; NOWYCKY, M; HÖKFELT, T; SHEPHERD, G; MARKEY, K. & GOLDSTEIN, M. (1982). Dopaminergic periglomerular cells in the turtle olfactory bulb. *Brain Res. Bull.* 9: 383-389.
- HALEY, J. E; WILCOX, G. L. & CHAPMAN, P. F. (1992). The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 8: 211-216.
- HALEY, J. E; MALEN, P. L. & CHAPMAN, P. F. (1993). Nitric oxide synthase inhibitors block long-term potentiation induced by weak but not strong tetanic stimulation at physiological brain temperature in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett.* 160: 85-88.
- HALL, W. C. & EBNER, F. F. (1970). Thalamotelencephalic projections in the turtle (*Pseudemys scripta*). *J. Comp. Neurol.* 140: 101-122.
- HALL, W. C. (1972). Visual pathways to the telencephalon in reptiles and mammals. *Brain, Behav. Evol.* 5: 95-113.
- HALL, J. A; FOSTER, R. E; EBNER, F. F. & HALL, W. C. (1977). Visual cortex in a reptile, the turtle (*Pseudemys scripta* and *chrysemys picta*). *Brain Res.* 130: 197-216.
- HANBAUER, J; WINK, D; OSAWA, Y; EDELMAN, G. M. & GALLY, J. A. (1992). Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [<sup>3</sup>H]-dopamine from striatal slices. *Neuroreport* 3: 409-412.
- HARLEY, C. A. & BIELAJEW, C. H. (1992). A comparison of glycogen phosphorylase a and cytochrome oxidase histochemical staining in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 322: 377-389.
- HAVTON, L. & KELLERTH, J.-O. (1987). Regeneration by supernumerary axons with synaptic terminals in spinal motoneurons of cats. *Nature* 325: 711-714.

- HAYES, A. G. & TYERS, M. B. (1979). Effects of intrathecal and intracerebroventricular injections of substance P on nociception in the rat and mouse. *Br. J. Pharmacol.* 66: 488p.
- HEMS, D. A. & WHITTON, P. (1980). Control of hepatic glycogenolysis. *Physiol. Rev.* 60: 1-50.
- HENRY, J. L. (1976). Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Res.* 114: 439-451.
- HENTALL, I. D. & FIELDS, H. L. (1983). Actions of opiates, substance P, and serotonin on the excitability of primary afferent terminals and observations on interneuronal activity in the neonatal rat's dorsal horn *in vitro*. *Neuroscience* 9: 521-528.
- HERDEGEN, T; BRECHT, S; MAYER, B; LEAH, J. & KUMMER, W. (1993). Long-lasting expression of JUN and KROX transcription factors and nitric oxide synthase in intrinsic neurons of the rat brain. *J. Neurosci.* 13: 4130-4145.
- HERGUETA, S; LEMIRE, M; PIEAU, C; WARD, R. & REPÉRANT, J. (1993). The embryological development of primary visual centers in the turtle *Emys orbicularis*. *J. Anat.* 183: 367-404.
- HESS, D. T; PATTERSON, S. I; SMITH, D. S. & SKENE, J. H. (1993). Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature* 366: 562-565.
- HEVNER, R. F. & WONG-RILEY, M. T. T. (1989). Brain cytochrome oxidase: purification, antibody production, and immunohistochemical /histochemical correlations in the CNS. *J. Neurosci.* 9: 3884-3898.
- HEVNER, R. F; DUFF, R. S. & WONG-RILEY, M. T. T. (1992). Coordination of ATP production and consumption in brain: parallel regulation of cytochrome oxidase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Neurosci. Lett.* 138: 188-192.
- HEVNER, R. F; LIU, S. & WONG-RILEY, M. T. T. (1993). An optimized method for determining cytochrome oxidase activity in brain tissue homogenates. *J. Neurosci. Meth.* 50: 309-319.
- HEVNER, R. F; LIU, S. & WONG-RILEY, M. T. T. (1995). A metabolic map of cytochrome oxidase in the rat brain: histochemical, densitometric and biochemical studies. *Neuroscience* 65: 313-342.

- HIBBS, J. B; VAVRIN, Z; TAINTOR, R. (1987). L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* 138: 550-558.
- HIMES, B. T. & TESSLER, A. (1989). Death of some dorsal root ganglion neurons and plasticity of others following sciatic nerve section in adult and neonatal rats. *J. Comp. Neurol.* 284: 215-230.
- HIRSCH, D. B; STEINER, J. P; DAWSON, T. M; MAMMEN, A. & HAYEK, E. (1993). Neurotransmitter release regulated by nitric oxide in PC-12 cells and brain synaptosomes. *Curr. Biol.* 3: 749-754.
- HOCHACHKA, P. W. & SOMERO, G. N. (1984). *Biochemical Adaptation*. New Jersey: Princeton Univ. Press, XX + 537p.
- HOFMANN, P. N. & CLEVELAND, D. W. (1988). Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: Induction of a specific beta tubulin isotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4530-4533.
- HÖKFELT, T; KELLERT, J. O; NILSSON, G. & PERNOW, B. (1975). Substance P: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science* 190: 889-890.
- HOLMQVIST, B. I; ÖSTHOLM, T; ALM, P. & EKSTRÖM, P. (1994). Nitric oxide synthase in the brain of a teleost. *Neurosci Lett.* 171: 205-208.
- HOPE, B. T; MICHAEL, G. J; KNIGGE, K. M. & VINCENT, S. R. (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2811-2814.
- HORI, S. H. (1964). Cytological phosphorylase locations in rat liver and muscle as shown by a lead precipitation method. *Stain Technol.* 39: 275-278.
- HORI, S. H. (1966a). Effect of EDTA on histochemical demonstration of phosphorylase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 501-508.
- HORI, S. H. (1966b). Fine-structure locations of  $\alpha$ -glucon phosphorylase, as shown by lead precipitation and electron microscopy. *Stain Technol.* 41: 91-95.

- HORTON, J. C. & HUBEL, D. H. (1981). Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primary visual cortex of macaque monkey. *Nature* 292: 767-764.
- HOVDA, D. A; CHUGANI, H. T; VILLABLANCA, J. R; BADIE, B. SUTTON, R. L. (1992). Maturation of cerebral oxidative metabolism in the cat: a cytochrome oxidase histochemistry study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12: 1039-1048.
- HUISMAN, A. M; KUIPERS, H. G. J. M; CONDÉ, F. & KEIZER, K. (1983). Collaterals of rubrospinal neurons to the cerebellum in rat. A retrograde fluorescent double labeling study. *Brain Res.* 264: 181-196.
- HUNT, S. P. (1983). Cytochemistry of the spinal cord. In: Emson, P. C. (ed). *Chemical neuroanatomy*. New York, Raven Press. p. 53-84.
- IBRAHIM, M. Z. M; PASCOL, E. & KHAYAT, M. Y. N. (1973). Histochemical evidence for phosphorylase, branching enzyme and glycogen synthetase activities in rat brain. *J. Neurol. Sci.* 19: 117-131.
- IBRAHIM, M. Z. M. (1975). Glycogen and its related enzymes of metabolism in the central nervous system. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 52: 01-85.
- INAGAKI, S; SENBA, E; SHIOSAKA, S; TAKAGI, H; KAWAI, Y; TAKATSUKI, K; SAKANAKA, M; MATSUZAKI, T. & TOHYAMA, M. (1981). Regional distribution of substance P - like immunoreactivity in the frog brain and spinal cord: Immunohistochemical analysis. *J. Comp. Neurol.* 201: 243-254.
- INQUE, N; MATSUKADO, Y; GOTO, S. & MIYAMOTO, E. (1988). Localization of glycogen synthetase in brain. *J. Neurochem.* 50: 400-405.
- ITO, M. (1989). Long-term depression. *Annu. Rev. Neurosci.* 12: 85-102.
- ITO, M. & KARACHOT, L. (1990). Messengers mediating long-term desensitization in cerebellar Purkinje cells. *Neuroreport* 1: 129-132.
- IZUMI, Y. & ZORUMSKI, C. F. (1993). Nitric oxide and long-term synaptic depression in the rat hippocampus. *Neuroreport* 4: 1131-1134.

- JACKSON, D. C. & SILVERBLATT, H. (1974). Respiration and acid-base status of turtles following experimental dives. *Am. J. Physiol.* 226: 903-909.
- JACKSON, D. C. & HEISLER, N. (1983). Intracellular and extracellular acid-base and electrolyte status of submerged anoxic turtles at 3°C. *Resp. Physiol.* 53: 187-201.
- JESSEL, T. M. & IVERSEN, L. L. (1977). Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature* 268: 549-551.
- JESSEL, T. M.; IVERSEN, L. L. & CUELLO, A. C. (1978). Capsaicin-induced depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurones. *Brain Res.* 168: 247-259.
- JESSEL, T.; TSUNOO, A.; KAMAZAWA, I. & OTSUKA, M. (1979). Substance P: depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurones. *Brain Res.* 168: 247-259.
- JIA, V.-S.; WANG, X.-A.; JU, G. (1994). Nitric oxide synthase expression in vagal complex following vagotomy in the rat. *Neuroreport* 5: 793-796.
- JOHLIN, J. M. & MORELAND, F. B. (1933). Studies of the blood picture of the turtle after complete anoxia. *J. Biol. Chem.* 103: 107-114.
- JONES, E. G. (1990). The role of afferent activity in the maintenance of primate neocortical function. *J. Exp. Biol.* 153: 155-176.
- KAGEYAMA, G. H. & WONG-RILEY, M. T. T. (1982). Histochemical localization of cytochrome oxidase in the hippocampus : correlation with specific neuronal types and afferent pathways. *Neuroscience* 7: 2337-2361.
- KAGEYAMA, G. H. & WONG-RILEY, M. (1986). The localization of cytochrome oxidase in the LGN and striate cortex of postnatal kittens. *J. Comp. Neurol.* 243: 182-194.
- KALB, R. G. & AGOSTINI, J. (1993). Molecular evidence for nitric oxide -mediated motor neurons development. *Neuroscience* 57: 1-8.

- KALIMO, H; REHNCRONA, S. & SODERFELT, B. (1981a). The role of lactic acidosis in ischemic nerve cell injury. *Acta Neuropathol.* 7: 135-140.
- KALIMO, H; REHNCRONA, S; SODERFELT, B; OLSSON, V; SIESJO, B. K. (1981b). Brain lactic acidosis and ischemic cell damage. II. Histopathology. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1: 313-327.
- KARANTH, S; LYSON, K; McCANN, S. M. (1993). Role of nitric oxide in interleukin 2-induced corticotropin-releasing factor release from incubated hypothalami. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3383-3387.
- KATO, M. (1992). Involvement of nitric oxide in growth hormone (GH)-releasing hormone-induced GH secretion in rat pituitary cells. *Endocrinology* 131: 2133-2138.
- KELLY, D. A. & STOREY, K. B. (1988). Organ-specific control of glycolysis in anoxic turtles. *Am. J. Physiol.* 255: R774-779.
- KING, L. J; PASSONNEAU, J. V. & VENSON, V. (1967). Effects of convulsants on energy reserves in the cerebral cortex. *J. Neurochem.* 14: 599-611.
- KISH, S. J; BERGERON, C; RAJPUT, A; DOZIC, S; MASTROGIACOMO, F; CHANG, L.-J; WILSON, J. M; DISTEFANO, L. M. & NOBREGA, J. N. (1992). Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 59: 776-779.
- KITTO, K. F; HALEY, J. E; WILCOX, G. L. (1992). Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. *Neurosci Lett.* 148: 1-5.
- KLEIN, B; KUSCHINSKY, W; SCHRÖCK, H. & VETTERLEIN, F. (1986). Interdependency of local capillary density, blood flow, and metabolism in rat brains. *Am. J. Physiol.* 251: H1333-H1340.
- KLEIN, C. M; GUILLAMONDEGUI, O; KRENEK, C. D; LA FORTE, R. A. & COGGESHALL, R.E. (1991). Do neuropeptides in the dorsal horn change if the dorsal root ganglion cell death normally accompanies peripheral nerve transection is prevented? *Brain Res.* 552: 273-282.

- KNOWLES, R. G; PALACIOS, M; PALMER, R. M. J. & MONCADA, S. (1988). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5159-5162.
- KNYIHAR, E. & CSILLIK, B. (1976). Effect of peripheral axotomy on the fine structure of the Rolando substance. *Exp. Brain Res.* 26: 73-87.
- KOH, J-Y; PETERS, S. & CHOI, D. W. (1986). Neurons containing NADPH-diaphorase are selective resistant to quinolinate toxicity. *Science* 234: 73-76.
- KOHLE, S. J. & VANNUCCI, R. C. (1977). Glycogen metabolism in fetal and postnatal rat brain: influence of birth. *J. Neurochem.* 28: 441-443.
- KOWALL, N. W; FERRANTE, R. J; BEAL, M. F; RICHARDSON, E. P. JR, SOFRANIEV, M. V; CUELLO, A. C; MARTIN, J. B. (1987). Neuropeptide Y, somatostatin and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the human striatum: a combined immunocytochemical and enzyme histochemical study. *Neuroscience* 20: 817-828.
- KOWALL, N. W. & BEAL, M. F. (1988). Cortical somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH diaphorase neurons: normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 23: 105-114.
- KRNJEVIC, K. (1977). Effects of substance P on central neurons in cats. In: von Euler, U. S. & Pernow, B. (eds) *Substance P*. Raven Press, New York, p 217-230.
- KRUKOFF, T. L; CIRIELLO, J. & CALARESU, F. R. (1983). Metabolic alterations in the hypothalamus of the Brattleboro rat demonstrated with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res.* 280: 160-164.
- KÜNZLE, H. (1983). Supraspinal cell populations projecting to the cerebellar cortex in the turtle (*Pseudemys scripta elegans*). *Exp. Brain Res.* 49: 1-12.
- KUSUMA, A; ten DONKELAAR, H. J. & NIEUWENHUYNS, R. (1979). Intrinsic organization of the spinal cord. In: GANS, C. *Biology of the Reptilia*. New York, Academic Press. 10, cap. 2, p. 59-109.

- LACHICA, E. A; CONDO, G. J. & CASAGRANDE, V. A. (1987). Development of cytochrome oxidase staining in the retina and lateral geniculate nucleus: a possible correlate of ON- and OFF-center channel maturation. *Dev. Brain Res.* 34: 298-302.
- LaMOTTE, C. C; KAPADIA, S. E; KOCAL, C. M. (1989). Deafferentation-induced expansion of saphenous terminal field labelling in the adult rat dorsal horn following pronase injection of the sciatic nerve. *J. Comp. Neurol.* 288: 311-325.
- LaMOTTE, R. H; THALHAMMUR, J. G. & ROBINSON, C. J. (1983). Peripheral neural correlates of magnitude of cutaneous pain and hyperalgesia: a comparison of neural events in monkey with sensory judgements in human. *J. Neurophysiol.* 50: 1-26.
- LANDOWNE, D. & RITCHIE, J. M. (1971). On the control of glycogenolysis in mammalian nervous tissue by calcium. *J. Physiol.* 212: 503-517.
- LAVALLEY, A-L. & HO, R. H. (1983). Substance P, somatostatin and methionine enkephalin immunoreactive elements in the spinal cord of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *J. Comp. Neurol.* 213: 406-413.
- LAZZERI, L. (1977). *Fases Fundamentais da Técnica Cirúrgica*. São Paulo: J. M. Varela Livros, 190 p.
- LEAH, J. D; SANDKUHLER, J; HERDEGEN, T; MURASHOV, A. & ZIMMERMANN, M. (1992). Potentiated expression of Fos protein in rat spinal cord following bilateral noxious cutaneous stimulation. *Neuroscience* 48: 525-532.
- LECLERC, N; DORÉ, L; PARENT, A. & HAWKES, R. (1990). The compartmentalization of the monkey and rat cerebellar cortex: zebrin I and cytochrome oxidase. *Brain Res.* 506: 70-78.
- LEHRER, G. M. (1973). The tissue culture as a model for the biochemistry of brain development. *Prog. Brain Res.* 40; 219-230.
- LEMBECK, F. (1953). Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter impulse. Mitteilung. Das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* 219: 197-213.

- LEONG, S. F. & CLARK, J. B. (1984). Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem. J.* 128: 131-138.
- LEWIN, G. R. & MENDEL, L. M. (1993). Nerve growth factor and nociception. *TINS* 16: 353-359.
- LIEBERMAN, A. R. (1971). The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol.* 14: 49-124.
- LIEBERMAN, A. R. (1974). Some factors affecting retrograde neuronal responses to axonal lesions. In: Bellairs, R; Gray, E. G. *Essays on the nervous system*. Clarendon, Oxford. pp. 71-105.
- LINDEN, D. J; DICKINSON, M. H; SMEYNE, M. & CONNOR, J. A. (1991). A long term depression of AMPA currents in cultured cerebellar Purkinje neurons. *Neuron* 7: 81-89.
- LINDEN, D. J. (1994). Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* 12: 457-472.
- LIPTON, S. A; CHOI, Y-B; PAN, Z.-H; LEI, S. Z; CHEN, H-S. V; SUCHER, N. J; LOSCALZO, J; SINGEL, D. J. & STAMLER, J. S. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. *Nature* 364: 625-632.
- LJUNGDAHL, A; HÖKFELT, T. & NILSSON, G. (1978). Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. 1. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* 3: 861-943.
- LOHMAN, A. H. M. & MENTINK, G. M. (1972). Some cortical connections of tegu lizard (*Tupinambis teguixin*). *Brain Res.* 45: 325-344.
- LOHMAN, A. H. M. & van WOERDEN-VERKLEY, I. (1978). Ascending connections to the forebrain in the tegu lizard. *J. Comp. Neurol.* 182: 555-594.
- LÓPEZ-GARCÍA, C; TINEO, P; CARRAL, J. del. (1984). Increase of the neuron number in some cerebral cortical areas of a lizard (*Podarcis hispanica*) during postnatal periods of life. *J. Hirnforsch.* 25: 255-259.

- LÓPEZ-GARCÍA, C; MOLOWNY, A; RODRIGUEZ-SERNA, R; GARCIA-VERDUGO, J; MARTINEZ-GUIJARRO, F. J. (1988). Postnatal development of neurons in the telencephalic cortex of lizards. In: Schwerdtfeger, W. K. & Smeets, W. J. A. J. (eds). *The Forebrain of Reptiles*. Basel: Karger, pp. 122-130.
- 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.
- LOWRY, O; PASSONNEAU, J. V; HASSELBERGER, F. X. & SCHULZ, D. W. (1964). Effect of ischaemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.* 239: 18-31.
- LOWRY, O. H. (1975). Energy metabolism in brain and its control. In: INGVAR, D. H. & LASSEN, N. A. *Brain work Alfred Benzon Symposium VIII*. New York, Academic Press, pp. 48-64.
- LU, G.-W; HOFFERT, M. J. & MILETIC, V. (1993). Spontaneous activity of cat spinal ganglion neurons in vivo. *Brain Res. Bull.* 31: 523-530.
- LUEBKE, J. I; WEIDER, J. M; McCARLEY, R. W. & GREENE, R. W. (1992). Distribution of NADPH diaphorase positive somata in the brainstem of the monitor lizard *Varamus exanthematicus*. *Neurosci Lett*. 148: 129-132.
- LUI, S. Y. & WONG-RILEY, M. (1990). Quantitative light-microscopic and electron-microscopic analysis of cytochrome oxidase distribution in neurons of the lateral geniculate nucleus of the adult monkey. *Visual Neurosci*. 4: 269-287.
- LUTHMAN, J; FERNÁNDEZ, A; RADMILOVICH, M. & TRUJILLO-CENÓZ, O. (1991). Immunohistochemical studies on the spinal dorsal horn of the turtle *Chrysemys d'orbigny*. *Tissue Cell* 23:515-523..
- LUTZ, P. L; MCMAHON, P; ROSENTHAL, M. & SICK, T. J. (1984). Relationships between aerobic and anaerobic energy production in turtle brain *in situ*. *Am. J. Physiol.* 247: R740-744.
- LUTZ, P. L; ROSENTHAL, M. & SICK, T. J. (1985). Living without oxygen: turtle brain as a model of anaerobic metabolism. *Mol. Physiol.* 8: 411-425.

- LUTZ, P. L. (1992). Mechanisms for anoxic survival in the vertebrate brain. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 601-618.
- MA, P. M. (1993). Tanycytes in the sunfish brain: NADPH-diaphorase histochemistry and regional distribution. *J. Comp. Neurol.* 336: 77-95.
- MACHADO, S. C. (1977). Mobilização dos ácidos graxos livres em *Chrysemys d'orbigni* (Reptilia, Chelonia). Porto Alegre: UFRGS, 1977. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Concentração Fisiologia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MAGISTRETTI, P. J; SORG, O. & MARTIN, J. L. (1993). Regulation of glycogen metabolism in astrocytes: physiological, pharmacological, and pathological aspects. In: Murphy, S. *Astrocytes: Pharmacology and Functions*. San Diego, Academic, pp. 243-265.
- MALCON, C; ACHAVAL, M; KOMLOS, F; PARTATA, W. A; SAUERSSIG, M; RAMIRÉZ, G; SOUZA, D. Guanine nucleotides protect against excitotoxic quinolinic acid-induced striatal lesions in rat. *Neurosc. Lett.* (submetido).
- MANZONI, O; PREZEAU, L; MARIN, P; DESHAGER, S; BOCKAERT, J. & FAGNI, L. (1992). Nitric oxide -induced blockade of NMDA receptors. *Neuron* 8: 653-662.
- MAO, J; PRICE, D. D; COGHILL, R. C; MAYER, D. J. & HAYES, R. L. (1992). Spatial patterns of spinal cord [14c]-2-deoxyglucose metabolic activity in a rat model of painful peripheral mononeuropathy. *Pain* 50: 89-100.
- MARMO, F; BALSANO, G. & CASTALDO, L. (1976). Histochemical observations on some enzymes connected with glycogen metabolism in the development of the rhombencephalon in the chick embryo. II Chair of Histology and Embryology Faculty of Science, 159-165.
- MATSUMOTO, T; NAKANE, M; POLLOCK, J. S; KUK, J. E. & FORSTERMANN, U. (1993a). A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. *Neurosci. Lett.* 155: 61-64.
- MATSUMOTO, T; POLLOCK, J. S; NAKANE, M. & FÖRSTERMANN, U. (1993b). Developmental changes of

cytosolic and particulate nitric oxide synthase in rat brain. *Dev. Brain Res.* 73: 199-203.

MARQUES, C. S. F. (1994). Contribuição ao estudo da ontogênese das estruturas paliais e sub-paliais na tartaruga *Emys orbicularis*. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas: Neuroanatomia-UFRGS, Porto Alegre, RS.

MARTINI, R. & SCHACHNER, M. (1988). Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L-1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J. Cell. Biol.* 106: 1735-1746.

MCDOUGAL JR., D. B; HOLOWACH, J; HOWE, M. C; JONES, E. M. & THOMAS, C. A. (1968). The effects of anoxia upon energy sources and selected metabolic intermediates in the brains of fish, frog and turtle. *J. Neurochem.* 15: 577-588.

McGREGOR, G. P; GIBSON, S. J; SABATE, I. M; BLANK, M. A; CHRISTOFIDES, N. D; WALL, P. D; POLAK, J. M; BLOOM, S. R. (1984). Effects of peripheral nerve section and nerve crush on spinal cord neuropeptides in the rat: increased VIP and PHI in the dorsal horn. *Neuroscience* 13: 207-216.

McILWAIN, H. (1955). *Biochemistry and the central nervous system*, p.179, London.

McNEILL, D. L; CARLTON, S. M; COGGESHALL, R. E. & HULSEBOSCH, C. E. (1990). Denervation-induced intraspinal synaptogenesis of calcitonin gene-related peptide containing primary afferent terminals. *J. Comp. Neurol.* 296: 263-268.

MEDINA, J. M. (1988). Homeostasis energética perinatal. Adaptación metabólica a la vida extrauterina. In: Herrera, E. *Bioquímica Perinatal. Aspectos Básicos y Patológicos*. Cap. X, Madrid, Editorial Ceura-Madrid. p. 199-226.

MEDINA, L; SMEETS, W. J. A. J; HOOGLAND, P. V. & PUELLES, L. (1993). Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of the lizard *Gallotia galloti*. *J. Comp. Neurol.* 331: 261-285.

MELLER, S. T; DYKSTRA, C. & GEBHART, G. F. (1992a). Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-D-aspartate-produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. *Eur. J. Pharmacol.* 214: 93-96.

- MELLER, S. T; PECHMAN, P. S; GEBHART, G. F. & MAVES, T. J. (1992b). Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in rat model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience* 50: 7-10.
- MESULAM, M.-M; GEULA, C; BATHWELL, M. A. & HERSH, L. B. (1989). Human reticular formation: cholinergic neurons of the pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei and some cytochemical comparisons to forebrain cholinergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 281: 611-633.
- MICEVYCH, P. E; STROVINK, A; YAKSH, T. & GO, V. L. W. (1986). Immunocytochemical studies of substance P and cholecystokinin octapeptide recovery in dorsal horn following unilateral lumbosacral ganglionectomy. *Somatosens. Res.* 3: 239-260.
- MILLER, F. D; TETZLAFF, W; BISBY, M. A; FAWCETT, J. W; MILNER, R. J. (1989). Rapid induction of the major embryonic alpha-tubulin mRNA, T alpha-1, during nerve regenerating in adult rats. *J. Neurosci.* 9: 1452-1463.
- MILLER, R. J. (1991). The control of neuronal  $Ca^{2+}$  homeostasis. *Prog. Neurobiol.* 37: 255-285.
- MIZUKAWA, K; VINCENT, S. R; McGEER, P. L; McGEER, E. G. (1989). Distribution of reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate diaphorase-positive cells and fibers in the cat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 279: 281-311.
- MJAATVEDT, A. E. & WONG-RILEY, M. T. T. (1988). Relationship between synaptogenesis and cytochrome oxidase activity in Purkinje cells of the developing rat cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 277:155-182.
- MOLANDER, C; KINNMAN, E. & ALDSKOGIUS, H. (1988). Expansion of spinal cord primary sensory afferent projection following combined sciatic nerve resection and saphenous nerve crush: A horseradish peroxidase study in the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 276: 436-441.
- MONCADA, S; PALMER, R. M. J. & HIGGS, E. A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- MONCADA, C; LEKIEFFRE, D; ARVIN, B. & MELDRUM, B. (1992). Effect of NO synthase inhibition or NMDA-and

- ischaemia- induced hippocampal lesions. *Neuroreport* 3: 530-532.
- MONTAGUE, P. R; GANCAYCO, C. D; GANCAYCO, C. D; WINN, M. J; MARCHASE, R. B. & FRIEDLANDER, M. J. (1994). Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 263: 973-977.
- MORADIAN, G. P. & RUSTIONI, A. (1977). Transglionic degeneration in the dorsal horn and dorsal column nuclei of the adult rats. *Anat. Rec.* 187: 660-661.
- MORRIS, R; SOUTHAM, E; BRAID, D. J. & GARTHWAITE, J. (1992). Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglion neurones and their satellite cells. *Neurosci Lett.* 137: 29-32.
- MUFSON, E. J; DESAN, P. H; MESULAM, M. M; WAINER, B. H. & LEVEY, A. I. (1984). Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the forebrain of the red-eared pond turtle (*Pseudemys scripta elegans*). *Brain Res.* 323: 103-108.
- MUÑOZ, M; MUNOZ, A; MARIN, O; ALONSO, J. R; ARÉVALO, R; PORTEROS, A. & GONZALEZ, A. (1996). Topographical distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the frog, *Rana perezii*. *J. Comp. Neurol.* 367: 54-69.
- MURAKAMI, D. M. & FULLER, C. A. (1988). The postnatal development of oxidative metabolism in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience* 24: 977-986.
- MURRAY, R. K; GRANNER, D. K; MAYES, P. A. & RODWELL, V. W. (1990). Harper: Bioquímica. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo. 6ª ed. 705p.
- NAGAFUJI, T; MATSUI, T; KOIDE, T. & ARSANO, T. (1992). Blockade of nitric oxide formation by N-omega-L-arginine mitigates ischemic brain edema and subsequent cerebral infarction in rats. *Neurosci. Lett.* 147: 159-162.
- NAHORSKI, S. R. & ROGERS, K. J. (1974). The incorporation of glucose into brain glycogen and the activities of cerebral glycogen phosphorylase and synthetase: some effects of amphetamine. *J. Neurochem.* 23: 579-587.
- NARANJO, J. R; MELLSTRÖN, B; ACHAVAL, M; LUCAS, J.L; DEL RÍO, J. & SASSONE-CORSI, P. (1991). Co-induction of

- jun B and c-fos in a subset of neurons in the spinal cord. *Oncogene* 6: 223-227.
- NELSON, C. & SILVERSTEIN, F. S. (1994). Acute disruption of cytochrome oxidase activity in brain in a perinatal rat stroke model. *Pediatr. Res.* 36: 12-19.
- NIEUWENHUYS, R. (1964). Comparative anatomy of the spinal cord. In: Eccles, J. C. & Schadé, J. P. (eds). *Organization of the spinal cord*. New York, Elsevier Publishing Company. V. 11, p. 1-57.
- NILSSON, G. E; ALFARO, A. A. & LUTZ, P. L. (1990). Changes in turtle brain neurotransmitters and related substances during anoxia. *Am. J. Physiol.* 259: R376-R384.
- NILSSON, G. E. & LUTZ, P. L. (1991). Release of inhibitory neurotransmitters in response to anoxia in turtle brain. *Am. J. Physiol.* 261: R32-R37.
- NISHIKAWA, T; KIRSCH, J. R; KOEHLER, R. C; BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. (1993). Effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral blood flow and injury volume during focal ischemia in cats. *Stroke* 24: 1717-1724.
- NISHIMURA, H; ROSENBLUM, W. I; NELSON, G. H. & BOYTON, S. (1991). Agents that modify EDRF formation after antiplatelet properties of brain arteriolar endothelium *in vivo*. *Am. J. Physiol.* 261: H15-H21.
- NORTHCUTT, R. G. (1970). The telencephalon of the western painted turtle (*Chrysemys picta bellii*) III. *Biol. Monog; Number* 43.
- NOWICKI, J. P; DUVAL, D; POIGNET, H. & SCATTON, B. (1991). Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur. J. Pharmac.* 204: 339-340.
- O'DELL, T. J; HAWKINS, R. D; KANDEL, E. R. & ARANCIO, O. (1991). Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11285-11289.
- OKADA, D. (1992). Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. *J. Neurochem.* 59: 1203-1210.

- OTTO, D; UNSICKER, K. & GROTHE, C. (1987). Pharmacological effects of nerve growth factor and fibroblast growth factor applied to the transected sciatic nerve on neuron death in adult rat dorsal root ganglia. *Neurosci. Lett.* 83: 156-161.
- PANNESE, E; VENTURA, R; BIANCHI, R. (1975). Quantitative relationships between nerve and satellite cells in spinal ganglia : An electron microscopical study. II. Reptiles. *J. Comp. Neurol.* 160: 463-476.
- PANZICA, G. C; ARÉVALO, R; SANCHEZ, F; ALONSO, J. R; ASTE, N; VIGLIETTI-PANZICA, C; AIJÓN, J. & VÁSQUEZ, R. (1994). Topographical distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the brain of the japonese quail. *J. Comp. Neurol.* 342: 97-114.
- PARENT, A. & POITRAS, D. (1974). The origin and distribution of catecholaminergic axon terminals in the cerebral cortex of the turtle (*Chrysemys picta*). *Brain Res.* 78: 345-358.
- PARENT, A. (1979). Monoaminergic systems of the brain. In: GANS, C. *Biology of the Reptilia*. New York, Academic Press, 10, p. 287-358.
- PARTATA, W. A. (1992). Glicogênio no sistema nervoso central da tartaruga *Chrysemys dorbigni* (Chelonia, Emydidae): variações em distintas condições experimentais e distribuição nas diferentes áreas encefálicas. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia - UFRGS, Porto Alegre-RS.
- PARTATA, W. A. & MARQUES, M. (1994). Effects of fasting and seasonal variations in brain glycogen disposition in the turtle (*Chrysemys dorbigni*). *Comp. Biochem. Physiol.* 107A: 727-730.
- PARTATA, W. A. & ACHAVAL-ELENA, M. (1995). Glycogen distribution in the central nervous system of the turtle *Chrysemys dorbigni*. *Rev. Bras. Ciên. Morfol.* 12: 3-9.
- PASQUALOTTO, B. A. & VINCENT, S. R. (1991). Galanin and NADPH-diaphorase coexistence in cholinergic neurons of the rat basal forebrain. *Brain Res.* 551: 78-86.
- PASQUALOTTO, B. A; HOPE, B. T. & VINCENT, S. R. (1991). Citrulline in the rat brain: immunohistochemistry and coexistence with NADPH-diaphorase. *Neurosci. Lett.* 128: 155-160.

- PEARSE, A. G. E. (1968). The history of histochemistry. In. Pearse, A. G. E. *Histochemistry Theoretical and Applied*. V.1, p. 1-12.
- PEARSON, R. & PEARSON, L. (1976). *The vertebrate brain*. Academic Press, 897p.
- PELLIGRINO, D. A. (1993). Saying NO to cerebral ischemia. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 5: 221-231.
- PERSSON, J. K. E; ALDSKOGIUS, H; ARVIDSSON, J. & HOLMBERG, A. (1991). Ultrastructural changes in the gracile nucleus of the rat after sciatic nerve transection. *Anat. Embryol.* 184: 591-604.
- PERSSON, J. K. E; HONGPAISON, J. & MOLANDER, C. (1993). c-Fos expression in gracilothalamic tract neurons after electrical stimulation of the injured sciatic nerve in the adult rat. *Somatosens. Motor Res.* 10: 475-483.
- PEUNOVA, N. & ENIKOLOPOV, G. (1995). Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375: 68-73.
- PFEIFFER, B; BUSE, E; MEYERMANN, R. R; ROCHA, M. J. A. & HAMPRECHT, B. (1993). Glycogen phosphorylase activity and immunoreactivity during pre- and postnatal development of rat brain. *Histochemistry* 100: 265-270.
- PIERCEY, M. F; DOBRY, P. J. K; SCHROEDER, L. A; EINSPAHR, F. J. (1981a). Behavioral evidence that substance P may be a spinal cord sensory neurotransmitter. *Brain Res.* 210: 407-412..
- PIERCEY, M. F; SCHROEDER, L. A; FOLKERS, K; XU, J. C; HORIG, J. (1981b). Sensory and motor functions of spinal cord substance P. *Science* 214: 1361-1363.
- PITKÄNEN, A. & AMARAL, D. G. (1991). Distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) cells and fibers in the monkey amygdaloid complex. *J. Comp. Neurol.* 313: 326-348.
- PLISETSKAYA, E. (1968). Brain and heart glycogen content in some vertebrates and effect of insulin. *Endocrinal Exp.* 2: 251-262.
- POGUN, S. K; BAUMANN, M. H; KUHAR, M. J. (1994). Nitric oxide inhibits [<sup>3</sup>H] dopamine uptake. *Brain Res.* 641: 83-91.

- POLISTINA, D. C; MURRAY, M. & GOLDBERGER, M. E. (1990). Plasticity of dorsal root and descending serotonergic projections after partial deafferentation of the adult rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 299: 349-363.
- PORRO, C. A; CAVAZZUTI, M; GALETTI, A; SASSATELLI, L; BARBIER, G. C. (1991a). Functional activity of the rat spinal cord during formalin-induced noxious stimulation. *Neuroscience* 41: 655-665.
- PORRO, C. A; CAVAZZUTI, M; GALETTI, A; SASSATELLI, L; (1991b). Functional activity mapping of the rat brainstem during formalin-induced noxious stimulation. *Neuroscience* 41: 667-680.
- POUGH, F. H; HEISER, J. B. & McFARLAND, W. N. (1989). Turtles. In: *Vertebrate life*. New York, Macmillan Publishing Company, p.418-443.
- POWER, A. S. & REINER, A. (1980). A stereotaxic atlas of the forebrain and the midbrain of the eastern painted turtle (*Chrysemys picta picta*). *J. Hirnforsch.* 21: 125-159.
- PRAST, H. & PHILIPPU, A. (1992). Nitric oxide releases acetylcholine in the basal forebrain. *Eur. J. Pharmacol.* 216: 139-140.
- RADMILOVICH, M; FERNÁNDEZ, A. & TRUJILLO-CENÓZ, O. Localization of NADPH-diaphorase containing neurons in the spinal dorsal horn and spinal sensory ganglia of the turtle *Chrysemys dorsibigni*. *Exp. Brain Res.* (*in press*).
- RAPATZ, G. L. & MUSACCHIA, X. J. (1957). Metabolism of *Chrysemys picta* during fasting and during cold torpor. *Am. J. Physiol.* 188: 456-460.
- RAUSSEL, E; CUSICK, C. G; TAUB, E. & JONES, E. G. (1992). Chronic deafferentation in monkeys differentially affects nociceptive and nonnociceptive pathways distinguished by specific calcium-binding proteins and down-regulates gamma-aminobutyric acid type A receptors at thalamic levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 568-580.
- REINER, A. & POWER, A. S. (1978). Intensity and pattern discrimination in turtles following lesions of nucleus rotundus. *J. Comp. Physiol. Psych.* 92: 1156-1168.

- REINER, A. & POWER, A. S. (1980). The effects of extensive forebrain lesions on visual discriminative performance in turtles (*Chrysemys picta picta*). *Brain Res.* 192: 327-338.
- REINER, A. & POWER, A. S. (1983). The effects of lesions on telencephalic visual structures on visual discriminative performance in turtles (*Chrysemys picta picta*). *J. Comp. Neurol.* 218: 01-24.
- REINER, A; KRAUSE, J. E; KEYSER, K. T; ELDRED, W. ,E; McKELVY, J. F. (1984). The distribution of substance P in turtle nervous system: A radioimmunoessay and immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 226: 50-75.
- REINER, A. (1987). The distribution of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of turtles. *J. Comp. Neurol.* 259: 65-91.
- REINER, P. B. & VINCENT, S. R. (1987). Topographic relations of cholinergic neurons in the feline pontomesencephalic tegmentum: an immunohistochemical study. *Brain Res. Bull.* 19: 705-714.
- REISER, G. (1990a). Mechanisms of stimulation of cyclic-GMP level in a neuronal cell line mediated by serotonin (5-HT<sub>3</sub>) receptors. Involvement of nitric oxide arachidonic acid metabolism and cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *Eur. J. Biochem.* 189: 547-552.
- REISER, G. (1990b). Endothelin and a Ca<sup>2+</sup> ionophore raise cyclic GMP levels in a neuronal cell line via formation of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 101: 722-726.
- REGIDOR, J. & POCH, L. (1988). Histochemical analysis of the lizard cortex: an acetylcholinesterase, cytochrome oxidase and NADPH-diaphorase study. In: Schwedtfeger, W. K. & Smeets, W. J. A. J. (eds.). *The Forebrain of Reptiles*. Basel: Karger, pp. 77-84.
- REGIDOR, J; MONTESDEOCA, J; RAMIREZ-GONZALEZ, J. A; HERNANDEZ-URQUIA, C. M. & DIVAC, I. (1993). Bilateral induction of NADPH-diaphorase activity in neocortical and hippocampal neurons by unilateral injury. *Brain Res.* 631: 171-174.
- REHNCRONA, S; ROSEN, I. & SIESJO, B. K. (1981). Brain lactic acidosis and ischemic cell damage. I. Biochemistry and neurophysiology. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1: 297-311.

- REPÉRANT, J; WARD, R; HERGUETA, S. & MICELI, D. (1993). A short history of the history of the brain. *Rev. It. Neuropsychol.* 111-127.
- RÉTHELYI, M. (1984). Synaptic connectivity in the spinal dorsal horn. In: Davidoff, R. A. *Handbook of the Spinal Cord. V. 2-3 (Anatomy and Physiology)*. New York, Marcel Dekker, p. 137-198.
- RETTORI, V; BELOVA, N; DEES, W. L; NYBERG, C. L; GIMERO, M. & McCANN, S. M. (1993). Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10130-10134.
- RETTORI, V; KAMAT, A. & McCANN, S. M. (1994). Nitric oxide mediates the stimulation of luteinizing-hormone releasing hormone release induced by glutamic acid *in vitro*. *Brain Res. Bull.* 33: 501-503.
- RISLING, M; ALDSKOGIUS, H; HILDEBRAND, C. & REMAHL, S. (1983). Effects of sciatic nerve resection on L7 spinal roots and dorsal root ganglia in the adult cats. *Exp. Neurol.* 82: 568-580.
- RISS, W; HALPERN, M. & SCALIA, F. (1969). The quest for clues to forebrain evolution- The study of Reptiles. *Brain Behav.* 2: 1-50.
- RIVIER, C. & SHEN, G. H. (1994). In the rat, endogenous nitric oxide modulates the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-1 $\beta$  vasopressin and oxytocin. *J. Neurosci* 14: 1985-1993.
- ROBIN, E. D. , VESTER, J. W. , MURDOUGH, H. V. & MILLEN, J. E. (1964). Prolonged anaerobiosis in a vertebrate : anaerobic metabolism in the freshwater turtle. *J. Cell. Comp. Physiol.* 63: 287-297.
- ROBIN, E. D; LEWISTON, N; NEWMAN, A; SIMON, L. M. & THEODORE, J. (1979). Bioenergetic pattern of turtle brain and resistance to profound loss of mitochondrial ATP generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3922-3926.
- ROBINSON, F. R; HOUK, J. C. & GIBSON, A. R. (1987). Limb specific connections of the cat magnocellular red nucleus. *J. Comp. Neurol.* 207: 255-273.

- ROGISTER, B; DELREE, P; LEPRINCE, P; MARTIN, D; SADZOT, B; MALGRANGE, B; MURRAUT, C; ROGO, J. M; LEVEBVRE, P. P; OCTAVE, J-N. SCHOENEN, J; MOONEN, G. (1993). Transforming growth factor B as a neuroglial signal during peripheral nervous system response to injury. *J. Neurosci. Res.* 34: 32-43.
- ROMER, A. S. & PARSONS, T. S. (1985). *Anatomia Comparada dos Vertebrados*. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo LTDA, 559p.
- RUAN, R.-S; LEONG, S.-K. & YEOH, K.-H. (1994). Expression of NADPH-diaphorase activity in the facial motoneurons after compression of the facial nerve in albino rat. *Brain Res.* 652: 350-352.
- RUAN, R.-S; LEONG, S.-K. & YEOH, K.-H. (1995). The role of nitric oxide in facial motoneuronal death. *Brain Res.* 698: 163-168.
- RUBANYI, G. M; HO, E. H; CANTOR, E. H; LUMMA, W. C; PARKER BOTELHO, L. F. (1991). Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 1392-1396.
- RUIGROK, T. J. H; CROWE, A. & ten DONKELAAR, H. J. (1985). Dendrite distribution of identified motoneurons in the lumbar spinal cord of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J. Comp. Neurol.* 238: 275-285.
- SAGAR, S. M. (1990). NADPH-diaphorase reactive neurons of the rabbit retina: differential sensitivity to excitotoxins and unusual morphologic features. *J. Comp. Neurol.* 300: 309-319.
- SANDELL, J. H. (1984). NADPH diaphorase in the rat brain, macaque striate cortex and mammalian retina. *Neurosci. Abstr.* 10: 441.
- SANDELL, J. H. (1985). NADPH diaphorase cells in the mammalian inner retina. *J. Comp. Neurol.* 243: 446-472.
- SANDELL, J. H. (1986). NADPH diaphorase histochemistry in the macaque striate cortex. *J. Comp. Neurol.* 251: 388-397.
- SANTOS, E. A. , LAITANO, S. Y. T. , GENOFRE, G. C. (1990). Diving physiology of *Chrysemys dorsibigni* Dum & Bibr. , 1835 (Reptilia: Chelonia). *Comp. Biochem. Physiol.* 95A: 229-236.

- SAPER, C. B; LOEWY, A. D; SWANSON, L. W. & COWAN, W. M. (1976) Direct hypothalamus-autonomic connections. *Brain Res.* 117: 305-312.
- SARRAFIZADEH, R. & HOUK, J. C. (1994). Anatomical organization of the limb premotor network in the turtle (*Chrysemys picta*) revealed by *in vitro* transport of biocytin and neurobiotin. *J. Comp. Neurol.* 344: 137-159.
- SATO, T. (1990a). NADPH-diaphorase positive amacrine cells in the retinae of the frog (*Rana esculenta*) and pigeon (*Columbia livia*). *Arch. Histol. Cytol.* 53: 63-69.
- SATO, T. (1990b). Histochemical demonstration of NADPH-diaphorase activity in the pineal organ of the frog (*Rana esculenta*), but not in the pineal organ of the rat. *Arch. Histol. Cytol.* 53: 141-146.
- SCAPIN, S. & DI GIUSEPPE, G. (1994). Seasonal variations of glycogen synthase and phosphorylase activities in the liver of the frog *Rana esculenta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B: 189-195.
- SCHÖBER, A. K; BRAUER, K. & LUPPA, H. (1989). Alternate coexistence of NADPH-diaphorase with choline acetyltransferase or somatostatin in the rat neostriatum and basal forebrain. *Acta Histochem. Cytochem.* 22: 669-674.
- SCHÖBER, A; MALZ, C. R; MEYER, D. L. (1993). Enzyme histochemical demonstration of nitric oxide synthase in the diencephalon of the rainbow trout (*Oncorhynchus mickiss*). *Neurosci. Lett.* 151: 67-70.
- SCHÖBER, A; MALZ, C. R; SCHÖBER, W. & MEYER, D. L. (1994). NADPH-diaphorase in the central nervous system of the larval lamprey (*Lampræta planeri*). *J. Comp. Neurol.* 345: 94-104.
- SCHÖENEN, J; BUDO, C. & PONCELET, G. (1968). Effet de la section du sciatique sur l'activité de l'isoenzyme fluororesistant de la phosphatase acide dans la moelle épinière du rat. *C. R. Soc. Biol.* 12: 2035-2037.
- SCHUMAN, E. M. & MADISON, D. V. (1991). A requirement for the intercellular messenger nitric oxide is required for long-term potentiation. *Science* 254: 1503-1506.

- SCOTT, J. W; MSDONALD, J. K. & PEMBERTON, J. L. (1987). Short-axons cells of the rat olfactory bulb display NADPH-diaphorase activity, neuropeptide Y-like immunoreactivity and somatostatin-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 260: 378-391.
- SEIDEL, M. E. & SMITH, H. M. (1986). *Chrysemys, Pseudemys, Trachemys* (Eestudines: Emydidae): Did agassiz have it right. *Herpetologica* 42: 243-248.
- SELIGMAN, A. M; KARNOVSKY, M. J; WASSERKRUG, H. L. & HANKER, J. S. (1968). Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J. Cell Biol.* 38: 1-14.
- SEYMOUR, R. S. (1982). Physiological adaptations to aquatic life. In Gans, C. *Biology of the Reptilia*. London/ New York: Academic Press 13, cap. 01, p. 01-51.
- SHAW, C; PRUSKY, G. & CYNADER, M. (1988). Surgical undercutting prevents receptor redistribution in developing kitten visual cortex. *Visual Neurosci.* 1: 205-210.
- SHENG, H. Z; FIELDS, R. D. & NELSON, P. G. (1993). Specific regulation of immediate early genes by patterned neuronal activity. *J. Neurosci. Res.* 35: 459-467.
- SHEPHERD, G. M. (1994). *Neurobiology*. New York: Oxford Univ. Press, 760p.
- SHIMIZU, N. & OKADA, M. (1957). Histochemical distribution of phosphorilase in rodent brain from newborn to adults. *J. Histochem. Cytochem.* 5: 459-471.
- SHIMIZU, N. & ABE, T. (1966). Histochemical studies of the brain with reference to glucose metabolism. *Prog. Brain Res.* 21A: 197-216.
- SICK, T. J; LUTZ, P. L; LAMANNA, J. C. & ROSENTHAL, M. (1982). Comparative aspects of brain oxygen delivery and mitochondrial oxygen utilization in the turtle and rat. *J. Appl. Physiol. (Resp. Environ. Exercise Physiol.)* 53: 1354-1359.
- SILVA, R. S. M. (1986). Efeito do estado nutricional e da insulina sobre o metabolismo da tartaruga *Phrymops hylarii* (Chelonia, Chelidae). Ribeirão Preto: USP, 1986. Tese (Doutorado)-

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

- SIMS, K. L.; KAUFFMAN, F. C.; JOHNSON, E. C. & PICKEL, V. M. (1974). Cytochemical localization of brain nicotinamide dinucleotide phosphate (oxidized)-dependent dehydrogenase. Qualitative and quantitative distributions. *J. Histochem. Cytochem.* 22: 7-19.
- SMEETS, W. J. A. J.; JONKER, A. J.; HOOGLAND, P. V. (1987). Distribution of dopamine in the forebrain and midbrain of the red-eared turtle, *Pseudemys scripta elegans*, reinvestigated using antibodies against dopamine. *Brain Behav. Evol.* 30: 121-142.
- SOBREVIELA, T. & MUFSON, E. J. (1995). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase/nitric oxide synthase profiles in the human hippocampal formation and peripheral cortex. *J. Comp. Neurol.* 358: 440-464.
- SOKOLOFF, L. (1992). Imaging techniques in studies of neural functions. In: Gonzalez-Lima, F.; Finkenstaed, T. & Scheich, H. (eds.). *Advances in Metabolic Mapping Techniques for Brain Imaging of Behavioral and Learning Functions NATO ASI Series D, V. 68*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 1-31.
- SOLODKIN, A.; TRAUB, R. J. & GEBHART, G. F. (1992). Unilateral hindpaw inflammation produces a bilateral increase in NADPH-diaphorase histochemical staining in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience* 51: 495-499.
- SORKIN, L. S. (1993). NMDA evokes an L-NAME-sensitive spinal release of glutamate and citrulline. *Neuroreport* 4: 479-482.
- SOUTHAM, E. & GARTHWAITE, J. (1991). Climbing fibers as a source of nitric oxide in the cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 3: 379-382.
- SOUTHAM, E.; EAST, S. J. & GARTHWAITE, J. (1991). Excitatory amino acid receptors coupled to nitric oxide: cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. *J. Neurochem.* 56: 2072-2081.
- SPECTOR, R. G. (1965). The developing nervous system. In: Adams, C. W. M. *Neurohistochemistry*. New York, Elsevier Publishing Company, pp. 239-252.

- STERNBERGER, L. A. (1979). *Immunocytochemistry*. Chichester, Wiley & Sons. 338 p.
- SVORAD, D. (1958). Changes in the topographic distribution of glycogen in the brain during animal hypnosis. *Nature* 181: 775-776.
- SVORAD, D. (1959). The relation of tranquilizers to some cerebral inhibitory states in topical distribution of brain glycogen. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 121: 71-77.
- SWANSON, L. W. & McKELLAR, (1979). The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *J. Comp. Neurol.* 188: 87-106.
- SWANSON, L. W. & HARTMAN, B. K. (1980). Biochemical specificity in central pathways related to peripheral and intracerebral homeostatic function. *Neurosc. Lett.* 16: 55-60.
- SWANSON, L. W; MOGENSEN, G. J; GERFEN, C. R. & ROBINSON, P. (1984). Evidence for a projection from the lateral preoptic area and substantia innominata to the "mesencephalic locomotor region" in the rat. *Brain Res.* 295: 161-178.
- SWANSON, L. W; SAWCHENKO, P. E. & LIND, R. W. (1986). Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons : implications for the stress response. *Brain Res.* 68: 169-190.
- TAI, T.-C; TOMPA, J; NOBREGA, J. N. & ADAMSON, S. L. (1995). Changes in regional cytochrome oxidase activity in the fetal, newborn and adult ovine brainstem. *Dev. Brain Res.* 86: 7-15.
- TAKAHASHI, T. & OTSUKA, M. (1975). Regional distribution of substance P in the spinal cord and nerve roots of the cat and the effect of dorsal root section. *Brain Res.* 87: 1-11.
- TAKEMURA, M; WAKISAKA, S; IWASE, K; YABUTA, N. H; NAKAGAWA, S; CHEN, K; BAE, Y. C; YOSHIDA, A. & SHIGENAGA, Y. (1996). NADPH-diaphorase in the developing rat: Lower brainstem and cervical spinal cord, with special reference to the trigemino-solitary complex. *J. Comp. Neurol.* 365: 511-525.

- TAKEUCHI, T. & KURIAKI, H. (1955). Histochemical detection of phosphorylase in animal tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 3: 153-160.
- ten DONKELAAR, H. J. & NIEUWENHUYS, R. (1979). The brainstem. In: GANS, C. *Biology of the Reptilia*. New York, Academic Press, 10, cap. 7, p. 133-200.
- ten DONKELAAR, H. J. & DE BOER-VAN HUIZEN, R. (1981). Basal ganglia projections to the brain stem in the lizard *Varamus exanthematicus* as demonstrated by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience* 6: 1567-1590.
- ten DONKELAAR, H. J. (1982). Organization of descending pathways to the spinal cord of amphibians and reptiles. In: Kuypers, H. G. J. M. & Martin, G. F. (eds). *Progress in Brain Research*, vol. 57: Descending pathways to the spinal cord. Amsterdam, Elsevier, pp. 25-67.
- TESSLER, A; GLAZER, E; ARTYMYSHYN, R; MURRAY, M. & GOLDBERGER, M. E. (1980). Recovery of substance P in the spinal cord after unilateral lumbosacral deafferentation. *Brain Res.* 191: 459-470.
- TESSLER, A; HIMES, B. T; ARTYMYSHYN, R; MURRAY, M. & GOLDBERGER, M. E. (1981). Spinal neurons mediate return of substance P following deafferentation of cat spinal cord. *Brain Res.* 230: 263-281.
- TESSLER, A.; HIMES, B. T; SOPER, K; MURRAY, M; GOLDBERGER, M. E. & REICHLIN, S. (1984). Recovery of substance P but not somatostatin in the cat spinal cord after unilateral lumbosacral dorsal rhizotomy: A quantitative study. *Brain Res.* 305: 95-102.
- TESSLER, A; HIMES, B. T; KRIEGER, N. R; MURRAY, M. & GOLDBERGER, M. E. (1985). Sciatic nerve transection produces death of dorsal root ganglion cells and reversible loss of substance P in spinal cord. *Brain Res.* 332: 209-218.
- THOMAS, E. & PEARSE, A. G. E. (1961). The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. *Histochemie* 2: 266-282.
- THOMAS, E. & PEARSE, A. G. E. (1964). The solitary active cells: histochemical demonstration of damage-resistant nerve cells with a TPN-diaphorase reaction. *Acta Neuropath.* 3: 238-249.

- TÓTH, P; CSANK, G. & LÁZÁR, G. (1985). Morphology of the cells of origin of descending pathways to the spinal cord in *Rana esculenta*. A tracing study using cobaltic-lysine complex. *J. Hirnforsch.* 26: 365-383.
- TRAUB, R. J; SOLODKIN, A. & GEBHART, G. F. (1994). NADPH-diaphorase histochemistry provides evidence for a bilateral, somatotopically, inappropriate response to unilateral hindpaw inflammation in the rat. *Brain Res.* 647: 113-123.
- TRIFILETTI, R. R. (1992). Neuroprotective effects of Ng-nitro-L-arginine in focal stroke in the 7-day-old rat. *Eur. J. Pharmacol.* 218: 197-198.
- TRUJILLO-CENÓZ, O; FERNÁNDEZ, A. & RADMILOVICH, M. (1990). Fine structure and synaptic connections of the spinal dorsal root terminals in the turtle *Chrysemys d'orbigny*. *Tissue Cell* 22: 811-826.
- TSACOPOULOS, M. & MAGISTRETTI, P. J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* 16: 877-885.
- TUOR, U. I; KURPITA, G. & SIMONE, C. (1994). Correlation of local changes in cerebral blood flow, capillary density, and cytochrome oxidase during development. *J. Comp. Neurol.* 342: 439-448.
- UEMURA, Y; KOWALL, N. W. & BEALL, M. F. (1990). Selective sparing of NADPH-diaphorase -somatostatin-neuropeptide Y neurons in ischemic gerbil striatum. *Ann. Neurol.* 27: 620-625.
- ULINSKI, P. S. (1978). Organization of dorsal ventricular ridge in snakes. *J. Comp. Neurol.* 178: 411-450.
- ULTSCH, G. R. & JACKSON, D. C. (1982). Long-term submergence at 3°C of the turtle *Chrysemys picta bellii*, in normoxic and severely hypoxic water. *J. Exp. Biol.* 96: 11-28.
- ULTSCH, G. R. (1985). The viability of neartic freshwater turtles submerged in anoxia and normoxia at 3 and 10°C. *Comp. Biochem. Physiol.* 81A: 607-611.
- ULTSCH, G. R; HANLEY, R. W. & BAUMAN, T. R. (1985). Responses to anoxia during simulated hibernation in northern and southern painted turtles. *Ecology* 66: 388-395.

- UNTERBERG, A. W; ANDERSEN, B. J; CLARKE, G. D. & MARMAROU, A. (1988). Cerebral energy metabolism following fluid-percussion brain injury in cats. *J. Neurosurg.* 68: 594-600.
- VALTSCHANOFF, J. G; WEINBERG, R. J. & RUSTIONI, A. (1992). NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J. Comp. Neurol.* 321: 209-222.
- VALTSCHANOFF, J. G; WEINBERG, R. J; KHARAZIA, V. N; NAKANE, M. & SCHMIDT, H. H. H. W. (1993). Neurons in rat hippocampus that synthesize nitric oxide. *J. Comp. Neurol.* 331: 111-121.
- VANDESANDE, F; DIERICKX, K; DEMEY, J. (1977). The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic fibers of the external region of the median eminence of the rat hypothalamus. *Cell. Tiss. Res.* 180: 443-452.
- VANEY, D. I. & YOUNG, H. M. (1988). Gaba-like immunoreactivity in NADPH-diaphorase amacrine cells of the rabbit retina. *Brain Res.* 474: 380-385.
- VANHATALO, S. & SOINILA, S. (1994). NADPH-diaphorase activity and its colocalization with transmitters and neuropeptides in the postganglionic neurons of the rat superior cervical ganglion. *Brain Res.* 652: 107-112.
- VELLUTI, J. C; RUSSO, R. E; SIMINI, F; GARCIA-AUSTT, E. (1991). Electroencephalogram *in vitro* and cortical transmembrane potentials in the turtle *Chrysemys d'orbigni*. *Brain Behav. Evol.* 38: 7-19.
- VERGE, V. M. K; XU, Z; XU, X.-J. & WIESENFELD-HALLIN, Z. (1992). Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: *In situ* hybridization and functional studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11617-11621.
- VIGÉ, X; CARREAU, A; SCATTON, B; NOWICKI, J. P. (1993). Antagonism by NG-nitro-L-arginine of L-glutamate-induced neurotoxicity in cultured neonatal rat cortical neurons. Prolonged application enhances neuroprotective efficacy. *Neuroscience* 55: 893-910.
- VILLALBA, R. M; RODRIGO, J; ALVAREZ, F. J; ACHAVAL, M. AND MARTINEZ- MURILLO, R. (1989). Localization of C-PON immunoreactivity in the rat main olfactory bulb. Demonstration

- that the population of neurons containing endogenous C-PON display NADPH-diaphorase activity. *Neuroscience* 33: 373-382.
- VILLANI, L; GUARNIERI, T. & ZIRANI, I. (1994). Choline acetyltransferase and NADPH-diaphorase localization in the goldfish habenulo-interpeduncular system. *Neurosci. Lett.* 173: 67-70.
- VINCENT, S. R; JOHANSSON, O; HÖKFELT, T; SKIRBOLL, L; ELDE, R. P; TERENIUS, L; KIMMEL, J. & GOLDSTEIN, M. (1983). NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin-and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *J. Comp. Neurol.* 217: 252-263.
- VINCENT, S. R. & JOHANSSON, O. (1983). Striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)- like immunoreactivities and NADPH-diaphorase activity: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 217: 264-270.
- VINCENT, S. R; SATOH, K; ARMSTRONG, D. M; PANULA, P; VALE, W. & FIBIGER, H. C. (1986). Neuropeptides and NADPH-diaphorase activity in the ascending cholinergic reticular system of the rat. *Neuroscience* 17: 167-182.
- VINCENT, S. R. & KIMURA, H. (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46: 755-784.
- VIZZARD, M. A; ERDMAN, S. L; & DE GROAT, W. C. (1993). Localization of NADPH diaphorase in pelvic afferent and efferent pathways of the rat. *Neurosci Lett.* 152: 72-76.
- VIZZARD, M. A; ERDMAN, S. L; ERICKSON, V. L; STEWART, R. J; ROPPOLO, J. R. & DE GROAT, W. C. (1994). Localization of NADPH diaphorase in the lumbosacral spinal cord and dorsal root ganglia of the cat. *J. Comp. Neurol.* 339: 62-75.
- VOLCHAN, E. & FRANCA, J. G. (1994). Distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons in the opossum neocortex. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27: 2431-2435.
- von HEULER, U. S. & GADDUM, J. H. (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.* 72: 74-87.

- WALLACE, M. N. (1983). Organization of the mouse cerebral cortex: A histochemical study using glycogen phosphorylase. *Brain Res.* 267: 201-216.
- WALLHÄUSSER-FRANKE, E; COLLINS, C. E. & DEVOOGD, T. J. (1995). Developmental changes in the distribution of NADPH diaphorase containing neurons in telencephalic nuclei of the zebra finch song system. *J. Comp. Neurol.* 356: 345-354.
- WANG, S. D; GOLDBERGER, M. E. & MURRAY, M. (1991). Plasticity of spinal systems after unilateral lumbosacral dorsal rhizotomy in the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 304: 555-568.
- WARD, S. M; SHUTTLEWORTH, C. W. R. & KENYON, J. L. (1994). Dorsal root ganglion neurons of embryonic chicks contain nitric oxide synthase and respond to nitric oxide. *Brain Res.* 648: 249-258.
- WARE, S. K. (1993). Cardiac responses of the turtle (*Trachemys scripta elegans*) to voluntary diving and to forced submersion. *Comp. Biochem. Physiol.* 105A: 751-755.
- WATANABE, H. & PASSONNEAU, J. V. (1973). Factors affecting the turnover of cerebral glycogen and limit desestrin *in vivo*. *J. Neurochem.* 20: 1543-1554.
- WEILER, R. (1985). Mesencephalic pathway to the retina exhibits enkephalin-like immunoreactivity. *Neurosci. Lett.* 55: 11-16.
- WENDLAND, B; SCHWEIZER, F. E; RYAN, T. A; NAKANE, M; MURAD, F. (1994). Existence of nitric oxide synthase in rat hippocampal pyramidal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2151-2155.
- WETTS, R; PHELPS, P. E. & VAUGHN, J. E. (1995). Transient and continuous expression of NADPH diaphorase in different neuronal populations of developing rat spinal cord. *Dev. Dyn.* 202: 215-228.
- WHITE, D. M; LEAH, J. D. & ZIMMERMANN, M. (1989). The localization and release of substance P and calcitonin gene-related peptide at nerve fibre endings in rat cutaneous nerve neuroma. *Brain Res.* 503: 198-204.
- WIKSTRÖM, M; KRAB, K. & SARASTE, M. (1981). *Cytochrome oxidase: A synthesis.* New York: Academic Press.

- WILLIAMS, J. H; LI, Y.-G; NAYAK, A; ERRINGTON, M. L; MURPHY, K. P. S. J; BLISS, T. V. P. (1993). The suppression of long-term potentiation in rat hippocampus by inhibitors of nitric oxide synthase is temperature and age dependent. *Neuron* 11: 877-884.
- WILLIAMS, C. V; NORDQUIST, D. & MCLEON, S. C. (1994). Correlation of nitric oxide synthase expression with changing patterns of axonal projections in the developing visual system. *J. Neurosci.* 14: 1746-1755.
- WILLIS, W. D. (1985). *The pain system- The neural basis of nociceptive transmission in the mammalian nervous system.* Basel ; New York, Karger. p. 78-144.
- WILSON, A. M. & KRIEGSTEIN, A. R. (1991). Turtle cortical neurons survive glutamate exposures that are lethal to mammalian neurons. *Brain Res.* 540: 297-301.
- WINK, D. A HANBAUER, I; KRISHNA, M. C; De GRAFF, W; GAMSON, J. & MITCHELL, J. B. (1993). Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9813-9817.
- WONG, S. D; GOLDBERGER, M. E. & MURRAY, M. (1991). Plasticity of spinal systems after unilateral lumbosacral dorsal rhizotomy in the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 304: 555-568.
- WONG-RILEY, M. (1979). Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res.* 171: 11-28.
- WONG-RILEY, M. T. T. & WELT, C. (1980). Histochemical changes in cytochrome oxidase of cortical barrels after vibrissal removal in neonatal and adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2333-2337.
- WONG-RILEY, M. T. T. & RILEY, D. (1983). The effect of impulse blockage on cytochrome oxidase activity in the cat visual system. *Brain Res.* 261: 185-193.
- WONG-RILEY, M. T. T; KAGEYAMA, G; HOPPE, D; CHENG, T; TRUSK, T; KABOORD, W. & HILTGEN, G. (1987). A comparative study of cytochrome oxidase activity in ion transporting cells of a variety of mammalian tissues. *Anat. Rec.* 218: 151A.

- WONG-RILEY, M. T. T; TRIPATHI, S. C; TRUSK, T. C. & HOPPE, D. A. (1989). Effect of retinal impulse blockage on cytochrome oxidase-rich zones in the macaque striate cortex: I. Quantitative electron-microscopy (EM) analysis of neurons. *Vis. Neurosci.* 2: 483-497.
- WONG-RILEY, M. T. T. (1989). Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *TINS* 12: 94-101.
- WONG-RILEY, M. T. T; TRUSK, T. C; KABOORD, W. & HUANG, Z. (1994). Effect of retinal impulse blockage on cytochrome oxidase-poor interpuffs in the macaque striate cortex: Quantitative EM analysis of neurons. *J. Neurocytol.* 23: 533-553.
- WOOLF, C. J; CHONG, M. S. & AINSWORTH, A. (1984). Axotomy increases glycogen phosphorylase activity in motoneurons. *Neuroscience* 12: 1261-1269.
- WOOLF, C. J; CHONG, M. S. & RASHDI, T. A. (1985). Mapping increased glycogen phosphorylase activity in the dorsal root ganglia and in the spinal cord following peripheral stimuli. *J. Comp. Neurol.* 234: 60-76.
- WOOLF, C. J. (1987). Excitatory amino acids increase glycogen phosphorylase activity in the rat spinal cord. *Neurosc. Lett.* 73: 209-214.
- WRIGHT, D. M. & ROBERTS, M. H. T. (1978). Supersensitivity to a substance P analogue following dorsal root section. *Life Sci.* 22: 19-24.
- WU, W. (1992). Neuronal NADPH diaphorase are related to survival and regeneration after severe neuronal damage. *Soc. Neurosci. Abstr.* 18: 860.
- WU, W. (1993). Expression of nitric-oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. *Exp. Neurol.* 120: 153-159.
- XIA, Y; JIANG, C. & HADDAD, G. G. (1992). Oxidative and glycolytic pathways in rat (newborn and adult) and turtle brain: role during anoxia. *Am. J. Physiol.* 262: R595-R603.

- YAN, X. X; GAREY, L. J. & JEN, L. S. (1994). Development of NADPH-diaphorase activity in the rat neocortex. *Dev. Brain Res.* 79: 29-38.
- YIP, H. K; KEITH, M. R; LAMPE, P. A. & JONHSON, E. M. (1984). The effects of nerve growth factor and its antiserum on the postnatal development and survival after injury of sensory neurons in the rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* 4: 2986-2992.
- YU, W. H. A. (1994). Nitric oxide synthase in motor neurons after axotomy. *J.Histochem. Cytochem.* 42: 451-457.
- ZHANG, X; VERGE, V; WIESENFELD-HALLIN, Z; JU, G; BREDT, D; SNYDER, S. H. & HÖKFELT, T. (1993). Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J. Comp. Neurol.* 335: 563-575.
- ZHANG, J. & SNYDER, S. H. (1995). Nitric oxide in the nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 213-233.
- ZHANG, X; AMAN, K. & HÖKFELT, T. (1995a). Secretory pathways of neuropeptides in rat lumbar dorsal root ganglion neurons and effects of peripheral axotomy. *J. Comp. Neurol.* 351: 1-20.
- ZHANG, X; BEAN, A. J; WIESENFELD-HALLIN, Z; XU, X-J. & HÖKFELT, T. (1995b). Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the rat spinal cord-III. Effects of peripheral axotomy with special reference to galanin. *Neuroscience* 64: 893-915.
- ZHANG, X; BEAN, A. J; WIESENFELD-HALLIN, Z; XU, X-J. & HÖKFELT, T. (1995c). Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the rat spinal cord-IV. Effects of peripheral axotomy with special reference to neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide/ peptide histidine isoleucine. *Neuroscience* 64: 917-941.
- ZHUO, M; SMALL, S. A; KANDEL, E. R; MAWKINS, R. D. (1993). Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in the hippocampus. *Science* 260: 1946-1950.
- ZIMMERMANN, M. (1991). Central nervous mechanisms modulating pain-related information: do they become deficient after lesions

of the peripheral or central nervous system? In: Casey, K. L. (ed.), *Pain and Central nervous system disease: The central pain syndromes*, pp. 183-199.

**ABSTRACT**

The present work demonstrated based in histochemical techniques the distribution of glycogen phosphorylase, cytochrome oxidase and NADPH-diaphorase in the central nervous system (CNS) of adult specimens of the turtle *Trachemys dorbigni* and young specimens of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. It was also investigated the distribution of cytochrome oxidase and NADPH-diaphorase in the brain and in the cervical and lumbar spinal cord of adult specimens of *Trachemys dorbigni* after sectioning of the sciatic nerve. Immunoreactivity pattern of substance P (SP) in the spinal cord was demonstrated following the sciatic denervation. The effects of 90-day fasting on the distribution of the afore mentioned enzymes in the CNS of adult *Trachemys dorbigni* was also investigated.

The enzymes under investigation showed a similar distribution in the CNS of adult *Trachemys dorbigni*. This distribution was identical in the medulla oblonga, in which they were detected in the nucleus reticular, nucleus raphe, locus coeruleus, nucleus vestibular, nucleus cochlear and in the V, VI, VII, X and XII cranial nerve nuclei. In the telencephalon, glycogen phosphorylase appeared in the granular and afferent fiber layers of the olfactory bulb, in the three layers of the cortex, in the dorsal ventricular ridge (DVR), in the striatum, in the primordium hippocampi, in the amygdala, in the olfactory tubercle and in the nucleus of diagonal band of Broca. Cytochrome oxidase was equally identified in all of these regions, except for the nucleus of diagonal band of Broca. NADPH-diaphorase occurred in the glomeruli and in the internal granular layer of the olfactory bulb, DVR, striatum, in some pyramidal cells of the cortex, in the pyriform cortex, in the nucleus accumbens and nucleus anterior commissure, in the septum, globus pallidus and olfactory tubercle. In the diencephalon, glycogen phosphorylase was detected in the rotundus, reuniens and geniculate nuclei, periventricular and ventral hypothalamus and median eminence. Cytochrome oxidase was found in the rotundus, geniculate, habenular and entopeduncular nuclei, and in the lateral and periventricular hypothalamus. NADPH-diaphorase was observed in the same hypothalamic areas, besides the preoptic area and paraventricular, suprammilar, suprapeduncular and entopeduncular nuclei. In the mesencephalon, glycogen phosphorilase was demonstrated in the optic tectum, in

the oculomotor, trochlear and mesencephalic trigeminal nuclei, torus semicircularis (TSC), red and isthmus nuclei, substantia nigra (SN), in the interpeduncular nucleus and nucleus posterior commissure. Cytochrome oxidase was detected in these regions, except for the interpeduncular nucleus, also appearing in the nucleus of the medial longitudinal fasciculus and in the basal optic root. NADPH-diaphorase was detected in the optic tectum, TSC, ventral tegmental area, deep nuclei of the mesencephalon, in the SN and in the red nucleus. In the cerebellum, glycogen phosphorylase, NADPH-diaphorase and cytochrome oxidase were identified in granular and molecular layers. Cytochrome oxidase was also observed in Purkinje cells. The deep cerebellar nuclei showed reactivity to all three enzymes investigated. In the cervical spinal cord, glycogen phosphorylase and cytochrome oxidase activities occurred in motoneurons and dorsal commissural neurons. Cytochrome oxidase was equally detected in the lateral column of the dorsal horn, marginal nucleus and in neurons scattered in the lateral funiculus. NADPH-activity was detected in areas Ia, Ib, II and III, in the lateral column and in the commissure of the dorsal horn. Glial cells showed positive reaction to all histochemical procedures.

The young specimens of the turtle *Pseudemys scripta elegans* presented similar enzymatic distribution as adult *Trachemys dorbigni*. Some differences, however, were observed: cortical molecular and plexiform layers did not display glycogen phosphorylase activity but show intense cytochrome oxidase reaction, and NADPH-diaphorase was more widespread, occurring in a greater number of pyramidal neurons, in the molecular layer, in cell bodies of the fasciculi longitudinalis and in white matter of the spinal cord, as well as in the ventral horn motoneurons of the spinal cord.

Sectioning of the sciatic nerve in the adult turtle did not alter the pattern of cytochrome oxidase distribution, but increased NADPH-diaphorase reaction in small and large cells of the dorsal root ganglion and in the dorsal horn of the lumbar spinal cord. This surplus was reduced after 30 days of axotomy in the small cells of the dorsal root ganglion, while in the dorsal horn the activity remained high at 90 days.

Moreover, there was NADPH-diaphorase expression in motoneurons of the ventral horn of the lumbar spinal cord, in the ipsilateral side of the sectioning. It was also found additional activity in glial and endothelial cells of the neuroaxis; appearance of enzymatic activity in the thalamus dorsomedial nucleus, mesencephalic trigeminal nucleus and in the isthmus nucleus; and finally presence of NADPH-diaphorase granular reaction in some neurons of the medial and inferior reticular nuclei and in those of inferior and superior raphe were also found. In intact adult turtles SP was detected in fibers of the area Ia of the spinal cord. Sometimes they could reach to area III. Some fibers could traverse the median line. Other fibers reached the ventral horn, where they surrounded the soma of negative motoneurons. SP was also detected in the lateral and anterior funiculi and in the soma of neurons of the dorsal horn lateral column. Sectioning of the sciatic nerve caused a decrease in the number of SP-immunoreactive fibers as early as 7 days and recovering of their initial number was observed at 90 days following axotomy.

Ninety-day fasting did not bring about any alterations in the distribution pattern of glycogen phosphorylase, cytochrome oxidase and NADPH-diaphorase in the CNS of adult *Trachemys dorbigni*.

In conclusion, the enzymes studied here are similarly distributed in the CNS of adult *Trachemys dorbigni* and young *Pseudemys scripta elegans*, except for the fact that NADPH-diaphorase expression is greater in the brain of *Pseudemys*. Sectioning of the peripheral nerve altered the neurochemical profile of the lumbar spinal cord of the turtle *Trachemys*. Ninety-day fasting, on the contrary, did not bring about any modification in the activity of the enzymes afore mentioned. These results suggest the need for a more detailed functional approach to the turtle nervous tissue, not only for a better understanding of it but also for the elucidation of speculative issues in mammals, considering that chelonians undoubtedly occupy a strategic position in the phylogeny of vertebrates.