

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



**LOCALIZAÇÃO DIFERENCIAL DE NADPH-  
DIAFORASE E PROTEÍNAS LIGANTES DE  
CÁLCIO NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS**

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOLOGIA PARA OBTENÇÃO DO  
MESTRADO NA ÁREA DE FISIOLOGIA

ENMA VERÓNICA PÁEZ ESPINOSA

ORIENTADOR: LUIZ ROBERTO G. BRITTO

CAMPINAS, 1995

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Enma Verónica Páez Espinosa e aprovada pela Comissão Julgadora.

18/08/95 Luiz Roberto G. Britto

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Cm 00077186.2

UNIDADE	BC		
N. CHAMADA:	T/Unicamp		
	P139L		
V.	Ex.		
PREÇO B.:	25780		
PREÇO	433/95		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	30/04/95		
N.º CPD			

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

P139L Paez Espinosa, Enma Veronica  
Localização diferencial de NADPH - diaforase e proteínas  
ligantes de cálcio no cérebro de camundongos / Enma Veronica  
Paez Espinosa. -- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador: Luiz Roberto G. Britto.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteínas de ligação ao cálcio. 2. Óxidos de nitrogênio.  
3. Reação de oxidação-redução. I. Britto, Luiz Roberto  
Giorgetti de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto  
de Biologia. III. Título.

*Ao Prof. Dr. LUIZ ROBERTO G. DE BRITTO, pela orientação;*

*Aos colegas de laboratório de Neurociências do ICB/USP pelo ótimo ambiente de trabalho, em especial a SANDRA T. BECK e LIGYA C. T. CAMPOS;*

*Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS BOSCHERO pela ajuda e incentivo;*

*A todos aqueles que colaboraram para a execução deste trabalho*

*AGRADEÇO*

## *RESUMO*

A utilização de marcadores celulares para mapeamento das regiões cerebrais tem resultado em importantes avanços no estudo da organização morfo-funcional do sistema nervoso. No presente trabalho, foram empregadas duas técnicas de marcação, a histoquímica para NADPH-diaforase, que revela neurônios que contêm óxido nítrico (NO) e a técnica imuno-histoquímica para proteínas ligantes de cálcio (CaBPs), com o propósito de se determinar a eventual co-localização neuronal dessas substâncias no cérebro de camundongos, já que ambas parecem estar envolvidas em processos fisio-patológicos semelhantes. A metodologia foi efetuada em cortes frontais do cérebro de 14 camundongos C57BL/6J previamente anestesiados e perfundidos com salina e 4% paraformaldeído. A imuno-histoquímica para as CaBPs (calbindina, parvalbumina e calretinina) foi baseada na técnica de avidina-biotina-peroxidase (ABC) e imuno-fluorescência. Em seguida, os cortes foram processados pela técnica histoquímica para NADPH-diaforase, utilizando nitrobluetetrazolium como cromógeno. Neuropeptídeo Y, cuja co-localização com NADPH-diaforase tem sido amplamente demonstrada, serviu como controle positivo, que mostrou a validade das técnicas utilizadas. Nossos resultados demonstraram, a nível de cortex, caudado-putamen, vias visuais subcorticais, amígdala e hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatório e cerebelo, sub-populações de neurônios independentes para a reação de diaforase e CaBPs. Esses resultados indicam que, apesar de as CaBPs e o NO estarem envolvidos em processos neuronais fisio-patológicos similares, eles estão presentes em diferentes sistemas neuronais nesses animais.

# SUMÁRIO

## RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Atividade de NO e NADPH-diaforase no SNC.....	2
1.1.1 Formação do NO no SNC.....	4
1.1.2 Funções do NO no SNC.....	6
1.2 A óxido nítrico sintetase: estrutura e função.....	7
1.2.1 NOS: localização no SNC.....	10
1.3 Proteínas ligantes de cálcio (CaBPs) .....	12
1.3.1 Distribuição das CaBPs no SNC.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Procedimentos cirúrgicos.....	18
3.3 Imuno-histoquímica.....	19
3.3.1 Anticorpo primário.....	19
3.3.2 Anticorpo secundário.....	20
3.4 Histoquímica para NADPH-diaforase.....	22
3.5 Osmificação e desidratação.....	23
3.5.1 Osmificação.....	23
3.5.2 Desidratação.....	24
3.6 Reagentes.....	24
3.6.1 Características dos anticorpos.....	25
4. RESULTADOS.....	25
4.1 Considerações metodológicas.....	26
4.2 Distribuição de NADPH-diaforase e CaBPs.....	28
4.3 Co-localização de NADPH-diaforase e NPY.....	43
5. DISCUSSÃO.....	46

5.1 Limitações técnicas.....	47
5.2 Células reativas no cérebro de camundongos.....	49
5.2.1 NADPH-diaforase.....	49
5.2.2 Proteínas ligantes de cálcio.....	54
5.3 Células NADPH-diaforase e CaBPs positivas: modulação da sua expressão no SNC.....	58
5.3.1 NADPH-diaforase.....	58
5.3.2 CaBPs.....	59
5.4 NADPH-diaforase e CaBPs: Localização diferencial.....	60
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ABSTRACT.....	99

# 1. INTRODUÇÃO

A distribuição celular e as funções de uma série de novas substâncias difusíveis no cérebro, particularmente do óxido nítrico (NO), vêm sendo muito estudadas nesta última década, em razão de sua aparente importância na produção de inúmeros fenômenos neurais (Moncada et al., 1989). O interesse atual e rápido desenvolvimento nas pesquisas dos múltiplos papéis que o NO desempenha no cérebro, na qualidade de mensageiro intra e intercelular, nasceu de uma série de achados. Assim, o fato de uma grande variedade de células serem capazes de realizar suas funções particulares mediante a expressão do NO como fator crítico, além de terem sido evidenciados processos oxidativos inusitados participantes na síntese de NO através da oxidação da L-arginina, e os novos aspectos da química e enzimologia celular resultantes destas observações, foram os elementos básicos que deram lugar às experiências para determinar o papel que este fator desempenha, particularmente no sistema nervoso (Marletta, 1993).

As similaridades dos efeitos químicos e farmacológicos existentes entre o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), conhecido desde 1980 como produtor, em resposta a múltiplos fatores, do relaxamento do endotélio vascular *in vivo*, assim como da inibição da agregação plaquetária, e sua posterior adesão à matriz extracelular e a fibras de colágeno (Furghott, 1984; Griffith *et al.*, 1984; Busse *et al.*, 1985; Moncada *et al.*, 1986a; 1986b; Radomski *et al.*, 1987c, 1987d), e o NO, estabelecidas através da cromatografia (Griffith *et al.*, 1984; Rubanyi *et al.*, 1985; Cocks *et al.*, 1985; Gryglewsky *et al.*, 1986a), quimioluminescência (Downes *et al.*, 1976), espectrofotometria (Kelm *et al.*, 1988) e radioimunoensaio (Palmer *et al.*, 1987), deram lugar à identificação do EDRF como NO.

São as características físico-químicas do NO que permitem a multiplicidade das suas funções. Efetivamente, o NO, um gás sob condições atmosféricas, é extremamente lábil, tem meia-vida curta e é altamente difusível, não sendo armazenado nas vesículas dos terminais nervosos, descartando assim a possibilidade de ser um neurotransmissor. O NO não atua sobre receptores de superfície (Marletta, 1993), mas diretamente sobre as enzimas intracelulares das células vizinhas, através de cujas membranas se difunde sem dificuldade, exercendo uma ampla gama de efeitos biológicos (Bredt & Snyder, 1989).

O NO é capaz de produzir vasodilatação e interagir com as prostaciclina para produzir desagregação plaquetária (Radomski *et al.*, 1988), afetando, entre outros, o sistema cardiovascular, onde atua como protetor nos processos isquêmicos e na formação de trombos (Ignarro *et al.*, 1981; Gardiner *et al.*, 1990c; Moncada *et al.*, 1991), mantendo os níveis de pressão arterial dentro dos seus limites normais (Aisaka *et al.*, 1989, 1990; Whittle *et al.*, 1989; Gardiner *et al.*, 1990c; Tolins & Raji, 1990; Tolins *et al.*, 1990; Rees *et al.*, 1990c; 1990d); o sistema imunológico, potencializando a citotoxicidade dos macrófagos ativados contra células tumorais (Hibbs *et al.*, 1987), ou produzindo uma inibição da síntese protéica no fígado, induzindo a citotoxicidade dos hepatócitos pelas células de Kupffer (Curran *et al.*, 1989).

Essas particularidades, unidas à aparente importância do papel que o óxido nítrico desempenha dentro do sistema nervoso, deram lugar a um novo campo dentro das pesquisas neurofisiológicas, levando à otimização de uma série de técnicas para a identificação da atividade metabólica do NO no cérebro.

## ***1.1 ATIVIDADE DE ÓXIDO NÍTRICO E NADPH-DIAFORASE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL***



A utilização de técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas para a identificação das características anátomo-fisiológicas e metabólicas no tecido neural tem sido de grande importância no estudo do sistema nervoso, no que faz referência à distribuição e reconstrução dos circuitos locais. Baseados nelas, diversos estudos têm demonstrado que anticorpos específicos para a óxido nítrico sintetase (NOS) produziram marcação da mesma população neuronal que a histoquímica para determinar a atividade da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-diaforase (NADPH-diaforase). As primeiras observações a respeito foram efetuadas em 1964 por Thomas & Pearse os quais, nos cortes de cérebro de mamíferos marcados com nitrobluetetrazolium (NTB), perceberam que certos neurônios adotaram uma tonalidade azul escura, produto da deposição do formazan gerado na reação tecidual, que eles denominaram de “neurônios solitários ativos”, e que, durante a década de oitenta, foram identificados como resistentes a processos histopatológicos degenerativos, como no caso das doenças de Huntington (Ferrante *et al.*, 1987; Morton *et al.*, 1993), Alzheimer (Unger & Lange, 1992), e processos isquêmicos cerebrais (Ferreiro *et al.*, 1988; Nowicky *et al.*, 1991; Uemura *et al.*, 1990).

Paradoxalmente, parece que níveis anormalmente altos de NO estão envolvidos na hipotensão associada ao choque endotóxico (Kilbourn *et al.*, 1990), mutagênese (Nguyen-Legros *et al.*, 1992), formação de N-nitrosaminas carcinogênicas e na destruição neuronal associada à toxicidade por excesso de glutamato ligado a receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Snyder & Brecht, 1992; Lipton *et al.*, 1993).

A purificação da NADPH-diaforase efetuada por Hope e colaboradores em 1981, unido à crescente evidência que a NADPH-diaforase apresenta atividade de NOS e compartilha suas propriedades (Hope *et al.*, 1991; Simmons & Murphy, 1992; Morton *et al.*, 1993), assim como a subsequente demonstração, baseada em

métodos histoquímicos e imuno-histoquímicos com anticorpos monoclonais, efetuada por Dawson et al. (1991), de que a NADPH-diaforase e a NOS possuem idêntica distribuição cerebral, evidenciaram, sem lugar a dúvidas, que as duas enzimas eram uma só.

Em 1983 Scherer-Singler e colaboradores, baseados nos mecanismos de óxido-redução, introduziram um novo método histoquímico para a visualização dos neurônios marcados com NADPH-diaforase. Utilizando como cromógeno o corante nitrobluetetrazolium (NTB), esse método permitiu, com uma única reação histoquímica, a obtenção de uma visão detalhada e nítida da estrutura e localização da NOS num material previamente fixado, num padrão anatômico similar ao observável com a técnica de Golgi (Pearse, 1985; Sandell, 1986; Kiernan, 1990; Snyder & Bredt, 1992).

As características dessa técnica de marcação neuronal são resultado das propriedades do NBT como corante e acceptor iônico (Schmidt *et al.*, 1992). Ele incorpora elétrons que normalmente são usados na oxidação da arginina para óxido nítrico, dando lugar à formação de um produto osmiofílico de coloração azulada, o formazan, transformando-o em nitrobluetetrazolium-formazan (NBTF), estável e visível à microscopia óptica e eletrônica (Kuonen et al., 1988; Snyder & Bredt, 1992; Lipton, 1993).

### ***1.1.1 FORMAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL***

Estudos feitos com isótopos radiativos no cérebro de mamíferos (Stuehr *et al.*, 1991; Tayeh & Marletta, 1989; Hibbs *et al.*, 1989), determinaram que o NO é sintetizado a partir da hidroxilação do nitrogênio presente num dos terminais

guanidino nitrogenados da L-arginina (Schmidt *et al.*, 1988a; Schmidt *et al.*, 1988b; Venturini *et al.*, 1991), seguido da oxidação específica desse nitrogênio. Ambas reações são catalisadas por uma enzima solúvel, NADPH,  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina-dependente, estimulada pela ativação dos receptores de glutamato do tipo NMDA (Marletta *et al.*, 1988; Knowles *et al.*, 1989; Palmer & Moncada, 1989; Bredt & Snyder, 1990; Moncada, Palmer & Higgs, 1991): a óxido nítrico sintetase (NOS), que induz a formação de NO e L-citrulina, com a posterior transformação do NO, caso ele reagir em solução aquosa oxigenada, em  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}_3$ , agentes oxidantes altamente reativos, capazes de causar danos teciduais e/ou proteicos, a nível das proteínas de membrana e/ou ácidos nucleicos, respectivamente (Garthwaite & Balázs, 1978; Garthwaite *et al.*, 1988; Okada, 1992).

A sua indução, e posterior liberação, podem ser inibidas pela  $\text{N}^G$ -monometil-L-arginina,  $\text{Fe}^{2+}$ , hemoglobina (à qual se liga avidamente) (Gibson & Roughton, 1957; Martin *et al.*, 1986), azul de metileno (Martin *et al.*, 1985), dithiothreitol, hidroquinona (Griffith *et al.*, 1984) e outros compostos óxido-redutores (redox) (Palmer *et al.*, 1987; Hutchinson *et al.*, 1987; Radomsky *et al.*, 1987a; 1987b); e potencializadas pelas enzimas superóxido-dismutase (SOD) (Gryglewski *et al.*, 1986a; Rubanyi *et al.*, 1986) e citocromo oxidase P-450 (citocromo C) (Moncada *et al.*, 1986), ambas inibidoras dos ânions superóxido ( $\text{O}_2$ ).

O NO formado é quimicamente idêntico com o “fator ativador da guanidil ciclase” (GAF) (Bredt & Snyder, 1989; Knowles *et al.*, 1989; Kwon *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1989a; 1989b; Schmidt *et al.*, 1992) o qual, ao ligar-se ao ferro do anel porfirínico da guanilato ciclase solúvel, produz deslocamento desse elemento, dando lugar a uma evidente mudança conformacional na molécula enzimática (Vincent & Hope, 1992), com a subsequente ativação da forma solúvel da guanilato ciclase, GTP fosforilase-liase cíclica (Knowles *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1992), enzima indutora do GMPc, nitrovasodilatador endógeno (Tayeh & Marletta, 1989).

Este mecanismo de formação de NO através da via L-arginina/NOS é considerado como um meio de transdução para a estimulação do GMPc, fator que determina as características das suas funções (East & Garthwaite, 1990,1991).

### ***1.1.2 FUNÇÕES DO ÓXIDO NÍTRICO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL***

As funções do NO incluem tanto os mecanismos que envolvem potenciação de longa duração ("long-term potentiation", LTP) (Garthwaite, 1991; Vincent & Hope, 1992; Schuman & Madison, 1994), ao serem funcionalmente ativados no hipocampo (região CA1) pelo sistema glutamato-NMDA previamente descrito, e que são dependentes da duração e frequência de um estímulo repetitivo (Bashir & Collingridge, 1992). Este é um conhecido mecanismo na produção da base celular para a aprendizagem. A estimulação conjunta de fibras trepadeiras e paralelas promovem a depressão de longa duração ("long-term depression", LTD) das células de Purkinje para as fibras paralelas (Ito, 1989), que tem sido descrita como base celular para a aprendizagem motora, e que parece também ter a participação do NO.

Há evidências recentes que o sistema de óxido nítrico/GMPc pode estar envolvido no refinamento dos circuitos neurais (sinaptogênese) durante o período embrionário (Mitrofanis, 1989; Bohme *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1991; Schuman & Madison, 1994; Shibuki & Okada, 1991; Friendlander *et al.*, 1992).

Experiências bioquímicas e imuno-histoquímicas revelam que certos neurônios capazes de liberar NO e prostaciclina apresentam um efeito citoprotetor, talvez devido a sua capacidade de produzir um aumento no nível da atividade metabólica de certos grupos celulares (Radomski *et al.*, 1988a; 1988b). A presença de NO parece estar, em algumas circunstâncias, ligada aos processos de

neurotoxicidade e dano neuronal associados a transtornos vasculares (Zarahn *et al.*, 1992; Nagafuji *et al.*, 1992; Lipton *et al.*, 1993) e liberação excessiva de glutamato (Snyder & Brecht, 1992), como no caso da hemorragia subaracnoídea (Fisher *et al.*, 1981).

Os fenômenos descritos podem ser mantidos ou intensificados mediante a adição, aos meios de cultura, de agonistas da L-arginina, tais como nitroprussiato; e consideravelmente diminuídos por certos antagonistas, como nitroarginina, N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA), L-nitroarginina (Nowicky *et al.*, 1991), Fe<sup>2+</sup> ou hemoglobina, evidenciando-se não só o papel crítico do NO na manutenção do tono vascular e integridade celular a nível cerebral, mas a sua participação nos processos de neurotoxicidade através do glutamato.

## ***1.2 A ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE: ESTRUTURA E FUNÇÃO***

Numa tentativa de elucidar as funções do NO no cérebro, a NOS de camundongos, ratos, bovinos e porcos foi submetida a clonagem molecular, estudos imunológicos e protocolos de DNA recombinante. Essas pesquisas concluíram que a NOS é um dímero, que apresenta uma série de isoformas, todas citosólicas, solúveis e dependentes da NADPH e O<sub>2</sub> como substratos para todas as reações nas quais ela intervém, que estão enquadradas em duas categorias (Schmidt *et al.*, 1992; Vorherr *et al.*, 1993; Marletta, 1993):

a) Forma constitutiva, cuja indução é regulada pelo sistema Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina, e inalterada pelos corticosteróides, dividida, segundo sua localização, em *NOS-I*, exclusivamente neural (Brecht & Snyder, 1990), e *NOS-III*, nas células endoteliais (Knowles *et al.*, 1989; Mayer *et al.*, 1988; Harald *et al.*,

1992; Marletta, 1993), pulmão (Mayer *et al.*, 1992), glândulas adrenais (Palacios *et al.*, 1989), plaquetas e neutrófilos (Radomski *et al.*, 1990c);

b) Forma indutível, dependente das citocinas, não regulada pós-transcricionalmente pelo sistema  $Ca^{2+}$ /Calmodulina, e inibida pelos corticosteróides (Förstermann *et al.*, 1991), a *NOS-II*, liberada em nanomoles por longos períodos de tempo, presente nos macrófagos (Stuehr *et al.*, 1987; Marletta *et al.*, 1988; Kwon *et al.*, 1989, 1990; McCall *et al.*, 1991a; McCall *et al.*, 1991b; Tayeh & Marletta, 1989), células de Kupffer (Billiar *et al.*, 1989), hepatócitos (Curran *et al.*, 1989) e células do músculo liso (Busse *et al.*, 1995).

A NOS neural tipo I, objeto do presente trabalho, apresenta, na sua estrutura molecular, segmentos (“motifs”) específicos com alta afinidade de ligação (1 mol/dímero) para nicotina-adenina-dinucleotídeo (NADPH), flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), flavina-mononucleotídeo (FMN) e (6R)-tetrahydro-L-biopterina ( $H_4B$ ), esta última capaz de ser reciclada às expensas da NADPH durante a síntese de NO (Mayer *et al.*, 1991). Todos eles são co-fatores do sistema  $Ca^{2+}$ /Calmodulina, regulador *in vivo* e *in vitro* da indução do óxido nítrico neuronal (Bredt & Snyder, 1990; Förstermann *et al.*, 1991), e encarregados, também, da transferência de elétrons durante as reações químicas que têm lugar para sua produção.

Um achado notável foi que a enzima citocromo P-450 redutase (citocromo C) compartilha com a NOS, quimicamente considerada uma flavoproteína (Mayer *et al.*, 1991) não possuidora de ferro heme (Bredt *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1992; Marletta, 1993), os lugares de reconhecimento de três desses co-fatores (Snyder & Bredt, 1992): NADPH, FAD e FMN. Em histoquímica, a citocromo oxidase é utilizada como catalisadora da reação em que a citocromo P-450 redutase transfere os elétrons ao oxigênio (Green & Wu, 1985; Kierman, 1991). Ressalte-se,

entretanto, que a NOS possui lugares de ligação inexistentes na molécula de citocromo C, tais como aquele destinado à calmodulina (Snyder & Brecht, 1992; Vorherr *et al.*, 1993) e fosforilação (adição de grupos fosfato a proteínas por uma família de enzimas relacionadas às proteino-quinases) (Hosey & Lazdunski, 1988; Kandel, 1991).

O mecanismo fisiológico envolvido na produção, difusão e utilização do NO dentro da neurópila tem início na liberação pré-sináptica do neurotransmissor excitatório glutamato, o qual se liga ao receptor tipo NMDA da membrana neural pós-sináptica, fazendo com que ele mude sua configuração espacial, aumentando, desta maneira, a sua afinidade ao íon cálcio. Este, por um mecanismo competitivo, tira o magnésio previamente fixado ao receptor em estado de repouso ("resting state") (Hosey & Lazdunski, 1988; Caspar Rüegg, 1992; Kandel, 1991) invertendo a sua polaridade e ativando-o, produzindo um incremento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  livre (Garthwaite, 1991; Schmidt *et al.*, 1992), seja por influxo direto desse íon através dos canais iônicos receptores de glutamato tipo NMDA (Hosey & Lazdunski, 1988; Knowles *et al.*, 1989; Caspar Rüegg, 1992; Ben-Ari *et al.*, 1992), ou por ação de um segundo mensageiro produzido pela ativação da proteína G, ligada a um receptor  $\text{Ca}^{2+}$ -específico da membrana neuronal pós-sináptica, que, ao ser estimulada, vai promover a ativação da enzima fosfolipase C, necessária para produção do inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ).

O  $\text{IP}_3$ , por sua vez, provoca a saída dos íons cálcio dos seus depósitos intracelulares, ao interagir com receptores específicos localizados nas suas membranas (Bashir & Collingridge, 1992; Caspar Rüegg, 1992; Ben-Ari *et al.*, 1992), não sendo necessária, para o efeito, a despolarização das mesmas (Somlyo *et al.*, 1981; Kandel, 1991), e aumentando significativamente a concentração intracelular de cálcio (até aproximadamente 400 mM) (Olsen *et al.*, 1976). E

interessante o fato de a guanidil ciclase ser inibida em concentrações fisiológicas de cálcio intracelular (aproximadamente 80 nM) (Ashley *et al.*, 1989).

No interior celular, o  $\text{Ca}^{2+}$  livre se liga à calmodulina da NOS, formando um complexo capaz de ativar a NOS para produzir a oxidação da L-arginina a óxido nítrico e L- citrulina (Knowles *et al.*, 1989; Gathwaite, 1991; Schmidt *et al.*, 1992).

### ***1.2.1 NOS: LOCALIZAÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL***

A NOS têm sido localizada imuno-histoquímicamente no cérebro no hipocampo dorsal e ventral, septo, amígdala, córtex entorrinal (Kuo *et al.*, 1988; Kinjo *et al.*, 1989; Vincent & Kimura, 1992), núcleo látero-dorsal tegmental, pedúnculo pontino e outras áreas (Vincent & Hope, 1992; Geula *et al.*, 1993). Em aves e lugares correlatos de mamíferos (Snyder & Bredt, 1992), aparece no telencéfalo, particularmente no neocórtex, paleocórtex, tubérculo olfatório, lobo paraolfatório, hiperestriado ventral e acessório (Brüning, 1993). Mais caudalmente, no cérebro de pombos, neurônios com diferentes intensidades de marcação se localizam na área hipotalâmica lateral, núcleo mamilar lateral, área tegmental ventral, e núcleo espiriforme medial (Brüning, 1993).

No córtex cerebral, e no estriado em ratos, macacos e seres humanos, a atividade de NADPH-diaforase tem sido associada a neurônios que contêm somatostatina e neuropeptídeo Y (Kuonen *et al.*, 1988; Cobcroft *et al.*, 1989), acreditando-se que esta enzima esteja associada a um ou vários neurotransmissores. Têm sido observada, por exemplo, forte evidência que a NOS, através da formação de NO, desempenha um papel fundamental no controle da liberação de dopamina no estriado de rato (Graybiel *et al.*, 1984; Zhu & Luo, 1992). Na formação reticular pontina do mesmo animal, entretanto, neurônios NADPH-diaforase positivos contêm



colina-acetil-transferase, substância P, bombesina e fator libertador de corticotropina (Cobcroft et al., 1989) o que fala a favor da relação dessa enzima com mais de um neurotransmissor.

Diversos estudos demonstram que a via L-arginina/NO está presente na retina de aves e mamíferos. Esse é o caso da retina de bovinos, em que a atividade da NOS está, ao menos parcialmente, contida nos segmentos externos dos fotorreceptores, onde esta via intervém de maneira direta na fototransdução, atuando sobre a guanilato ciclase, estimulando-a (Venturini et al., 1991). Parece ainda que a NOS exerce importante papel na relação do sistema visual de camundongos, no colículo superior, com o sistema auditivo, no que faz referência a integração visual-motora (Wallace & Fredens, 1989).

Outras observações feitas em mamíferos confirmam não só a distribuição de NADPH-diaforase na retina, particularmente na camada nuclear interna, em células amácrinas (Sandell, 1985; Sagar, 1986; Vaney & Young, 1988; Mitrofanis et al., 1992), ganglionares (Wässle et al., 1987; Yamamoto et al., 1993), como também sua relação com outros neurotransmissores. A NADPH-diaphorase co-localiza com ácido gama-amino-butírico (GABA) em células amácrinas das retinas de rato e gato (Cobcroft et al., 1989), com substância P em células ganglionares da retina de aves e mamíferos (Bredt et al., 1990), ou neuropeptídeo Y no estriado de gatos e núcleo acumbens e regiões ventromediais do caudado e putamen de mamíferos em geral (Kowall et al., 1987), compartimentos histoquímicos caracterizados por possuir um alto conteúdo de acetilcolinesterase (AChE) (Graybiel et al., 1981; Graybiel, 1983; Vincent et al., 1983a; 1983b; 1983c).

A co-localização dos neurotransmissores e neuropeptídeos com a NOS, assim como a interessante estrutura molecular desta enzima, cujos segmentos de ligação específicos, concordam plenamente com a sua característica de  $Ca^{2+}$ /Calmodulina-

dependente, despertou o nosso interesse na provável interação dos diferentes sistemas tamponantes de cálcio, através das proteínas ligantes de cálcio (CaBPs) e a NOS, além de sua transcendência na fisiologia neuronal.

### ***1.3 PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO***

As CaBPs, como o NO, têm sido objeto de um grande estudo, devido a sua capacidade reguladora das múltiplas funções do íon cálcio. Elas tem se mostrado, pela sua elevada solubilidade no citosol neuronal e os seus processos, excelentes marcadores para uma variedade de estudos anátomo-funcionais no cérebro, através da utilização de anticorpos específicos, assim como tamponantes, transportadoras de cálcio e reguladoras de vários sistemas enzimáticos (Baimbridge *et al.*, 1992), desempenhando, portanto, um importante papel protetor em diversas populações neuronais (Heizmann & Braun, 1992; Baimbridge *et al.*, 1992).

O cálcio é caracterizado por possuir menor densidade de carga e energia de hidratação em relação a outros íons de carga e peso molecular similares (Williams, 1992; Kandel, 1991), o que facilita seu movimento através dos seus segmentos específicos de ligação protéicos e faz desse elemento ótimo para cumprir suas funções de mensageiro intracelular (Caspar Rüegg, 1992). Estas funções incluem desde a motilidade e secreção celular, até a modulação da síntese de DNA (Branden & Tooze, 1991; Caspar Rüegg, 1992). Nas células do sistema nervoso, íons cálcio ativam e regulam um grande número de processos, incluindo o transporte axonal rápido de substâncias, síntese e liberação de certos neurotransmissores, e excitabilidade das membranas. É de interesse ressaltar que os íons cálcio, atuando na região hipocampal CA1, parecem ser capazes de colaborar, como o próprio NO, na indução da potenciação de longa duração, além de outros mecanismos de armazenamento da memória (Heizman & Braun, 1992).

O fato, demonstrado mediante técnicas imuno-histoquímicas, que uma alteração na expressão das CaBPs, vem acompanhada de profundas alterações na

homeostasia dos íons cálcio no interior dos neurônios, influenciando, como o NO, em uma série de estados patológicos (Iacopino & Christakos, 1990; Heizmann & Braun, 1992; Geula *et al.*, 1993), justificam o interesse gerado no estudo dessas proteínas, como reguladoras de vários sistemas enzimáticos no cérebro.

As CaBPs pertencem, em sua grande maioria, e dada a sua estrutura molecular, à família das “EF-hand” (Branden & Tooze, 1991; Palmiter & Zubay, 1993), capazes de ligar íons cálcio seletivamente e com alta afinidade. Estas, segundo as suas funções, têm sido classificadas em dois grupos: as proteínas disparadoras (“trigger”), e as CaBPs tamponantes (“buffer”) (Putney Jr, 1990; Baimbridge *et al.*, 1992).

As proteínas disparadoras são aquelas que, ao ligar-se ao cálcio, produzem um complexo ativo, dando lugar a uma alteração na sua estrutura molecular, capaz de modular a atividade de várias enzimas e canais iônicos (Branden & Tooze, 1991; Putney Jr, 1990; Caspar Rüegg, 1992; Baimbridge & Rogers, 1992). Dentre elas, a mais representativa no sistema nervoso central, a calmodulina, modulador cálcio-dependente das proteíno-quinases, (Baimbridge & Rogers, 1992) é capaz também de ativar as enzimas NOS I e III (Bredt & Snyder, 1990; Bredt *et al.*, 1991), as quais exibem um segmento (“motif”) de ligação específico para ela (Branden & Tooze, 1991; Vorherr *et al.*, 1993; Baimbridge *et al.*, 1992).

As outras proteínas ligantes de cálcio, como parvalbumina, calbindina e calretinina, são as proteínas tamponantes, cujo papel é manter as concentrações intracelulares de cálcio em equilíbrio, evitando desta maneira a neurotoxicidade produzida pelo excesso de íons cálcio dentro da célula, confirmando sua função de neuroprotetoras.

Anticorpos contra essas proteínas tem-se mostrado valiosos marcadores de diversas sub-populações neuronais para estudos anatômico-fisiológicos em modelos experimentais de diferentes animais durante e após o período de desenvolvimento

(Hosey & Landunzki, 1988; Blankenfeld *et al.*, 1992; Baimbridge *et al.*, 1992; Heizmann & Braun, 1992).

O fato de essas proteínas terem sido encontradas em proporção significativa na retina e outras estruturas visuais do sistema nervoso central reforçam a idéia da sua relevância na organização dos sistemas sensoriais (Celio, 1990; Baimbridge *et al.*, 1992; Andressen *et al.*, 1993).

### ***1.3.1 DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.***

O mais completo mapeamento das proteínas ligantes de cálcio parvalbumina, calbindina e calretinina foi realizado em ratos (Celio, 1990; Baimbridge *et al.*, 1992). Elas foram detectadas em diferentes grupos neuronais, apresentando uma co-localização parcial. Apesar de a distribuição das CaBPs apresentar ligeira variação nas diferentes espécies, aspectos fundamentais da sua distribuição tem-se mantido, especialmente em vertebrados (Pasteels *et al.*, 1990).

Na retina, calbindina e parvalbumina têm sido associadas com o neurotransmissor inibitório GABA (Celio, 1990) cada uma em populações específicas no sistema visual. Assim, em pombos, há ocorrência de GABA e calbindina no córtex visual (DeFelipe *et al.*, 1989b; Van Brederode *et al.*, 1990) e no colículo superior (Mize *et al.*, 1991), co-localizando-se parcialmente a distribuição de neurônios GABA-positivos com os neurônios parvalbumina e calbindina positivos (Domenici *et al.*, 1988).

No caso dos mamíferos, o colículo superior de gatos e ratos apresenta três camadas contendo células calbindina-positivas e uma densa banda de células parvalbumina-positivas na camada superficial cinzenta e na parte superior da camada óptica (Celio, 1990; Mize *et al.*, 1991). No colículo superior de gatos, o padrão de distribuição de calbindina e parvalbumina em neurônios imuno-reativos para anticorpos contra calbindina e parvalbumina é quase complementar (Mize *et al.*,

1991, Mize & Luo, 1992; Tigges & Tigges, 1991, 1993; Britto *et al.*, 1994), atingindo também a neurópila (Celio, 1990; Mize *et al.*, 1991, 1992a).

Na retina de mamíferos, tanto células amácrinas como células da camada ganglionar (consideradas células amácrinas deslocadas) apresentam parvalbumina (e.g., Hamano *et al.*, 1990), mas em retina de rato ao menos parte das células marcadas por parvalbumina foram identificadas como células ganglionares (Sanna *et al.*, 1990).

No que faz referência à distribuição de calbindina na retina, ela está em maior número nas células horizontais de espécies cuja retina contém maior quantidade de bastonetes e não naquelas com dominância de cones (Hamano *et al.*, 1990; Pasteels *et al.*, 1990; Pochet *et al.*, 1991). Além disso, fotorreceptores contendo calbindina representam uma sob-população de cones, no campo amarelo da retina de pombos (Pasteels *et al.*, 1987, 1990) e por toda a área central da retina de gato (Pasteels *et al.*, 1990; Rohrenbeck *et al.*, 1987).

A distribuição de calretinina parece apresentar o mesmo padrão para as espécies estudadas (Pasteels *et al.*, 1990). Em macacos, ratos, gatos, pombos e pintos, células horizontais, amácrinas e ganglionares contendo calretinina foram observadas.

Com o objetivo de verificar a alteração na expressão de proteínas ligantes de cálcio, como calbindina e parvalbumina, várias pesquisas têm sido realizadas, avaliando, por exemplo, o padrão de imuno-reatividade a tais enzimas após lesão retiniana ou enucleação. Assim, em pombos, há uma redução muito grande da imuno-reatividade tanto da calbindina como da parvalbumina na região do tecto óptico após lesões retinianas, sugerindo a expressão das proteínas ligantes de cálcio é dependente da integridade das vias da inervação vinda da retina (Britto *et al.*, 1994). A desafereção retiniana em ratos que sobreviveram por um período de 7 dias aumenta o número de células contendo calretinina e parece eliminar quase que completamente os processos marcados pelo anticorpo contra calretinina nas camadas

óptica e superficial do colículo superior de ratos (Arai *et al.*, 1993). Essas experiências demonstraram não só a importância neuropatológica das CaBPs, mas também a distribuição dos circuitos neuronais entre as diferentes espécies estudadas.

No córtex cerebral as CaBPs estão distribuídas em um pequeno número de neurônios, entre elas as células apresentando calbindina D-28k em co-localização com GABA, nas células em duplo-bouquê do córtex somato-sensorial de macaco (DeFelipe & Jones 1989a; 1989b), ou nos neurônios colinérgicos da região basal do córtex frontal de primatas, e nos núcleos pedúnculo-pontino e tegmental látero-dorsal de ratos, macacos e seres humanos (Geula *et al.*, 1990), além de células fracamente marcadas para essa proteína, nas camadas II e III das células piramidais.

A parvalbumina está presente nas células corticais tipo candelabro e cesto (DeFelipe *et al.*, 1989; Nitsch *et al.*, 1990; Ribak *et al.*, 1990), enquanto a calretinina está presente nas células não-piramidais do hipocampo de rato (Acsády *et al.*, 1993), além das células bipolares e com dois tufo de neuritos (Baimbridge *et al.*, 1992).

A distribuição diferenciada das CaBPs, assim como as suas propriedades moleculares, dão lugar à hipótese de elas serem capazes de modular uma série de propriedades de grupos particulares de células, no que faz referência as suas propriedades metabólicas, refletidas pela atividade de citocromo oxidase, ou a sua função na excitabilidade celular, alterando a duração dos potenciais de ação, promovendo a iniciação deles, ou protegendo as células do influxo excessivo de cálcio no seu interior. Isto ressalta a importância do estudo da possível interação da NADPH-diaforase e as CaBPs para potencializar ou não esses processos celulares.

## **2. OBJETIVOS**

Os protocolos experimentais foram efetuados com a finalidade de se atingirem os seguintes objetivos:

- a) Determinação do padrão de imuno-reatividade para os anticorpos contra proteínas ligantes de cálcio (CaBPs), assim como de neuropeptídeo Y no cérebro de camundongos.
- b) Determinação do padrão de atividade da NADPH-diaforase nos mesmos cortes anteriormente descritos.
- c) Avaliação do grau de co-localização das marcações expressas em a. e b.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados neste estudo 14 camundongos pigmentados da linhagem *C57BL/6J*, de ambos os sexos, pesando aproximadamente 30 g, obtidos do Biotério do Departamento de Imunologia, ICB/USP, os quais foram mantidos com água e alimentos *ad libitum*, e em ciclo claro-escuro de 14/10 horas.

#### **3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS**

Os animais (n =14) foram anestesiados com ketamine (5mg/100g de peso corporal, i.m.) e xilazina (1mg/100g de peso, i.m.), permitindo assim a realização da toracotomia necessária prévia à perfusão. Uma vez realizado este procedimento, o sangue foi heparinizado com injeção de 5 UI de heparina sódica (0,1ml), no ventrículo esquerdo, evitando a formação de coágulos. Em seguida, os animais foram perfundidos por via trans-cardíaca com 150 ml de solução salina tamponada (cloreto de sódio a 0,9% em tampão fosfato (PB) 0,1M, pH 7,2-7,4), seguida de paraformaldeído 4% (Sigma P-6148) em PB como fixador. Os encéfalos foram imediatamente removidos da cavidade craniana e armazenados em solução de sacarose 30% em PB, onde permaneceram por um período mínimo de 24 horas a 4°C, com a finalidade de reduzir os danos resultantes do congelamento, e propiciando adequada secção e posterior marcação.

Findo o período de crioproteção, os cérebros foram congelados e seccionados a intervalos de 30 µm em micrótomo deslizante de congelação (Leitz 1208), no plano estereotáxico coronal (frontal).

Os cortes de todas as estruturas cerebrais foram recolhidos em PB, distribuídos sequencialmente em 6 compartimentos iguais e mantidos a 4°C, até



serem submetidos (após prévia lavagem à temperatura ambiente por 30 minutos com PB) a processos imuno e/ou histoquímicos.

### **3.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA**

#### **3.3.1 ANTICORPO PRIMÁRIO**

Os cortes já lavados foram transferidos para diferentes soluções de anticorpos primários monoclonais contra as proteínas ligantes de cálcio (CaBPs) calretinina (CalR), calbindina (Calb); parvalbumina (PV), assim como contra Neuropeptídeo Y (NPY). Esses anticorpos foram diluídos em Triton-X-100 a 0,3% em tampão fosfato 0,1 M, nas seguintes diluições:

**TABELA #1**

<b>ANTICORPO PARA</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>DILUIÇÃO INICIAL (estoque)</b>	<b>DILUIÇÃO FINAL</b>
<b>PROTEÍNAS LIGANTES DE Ca<sup>2+</sup></b>			
Calretinina (CalR)	camundongo	1:10	1:5.000
Calbindina D-28k (Calb)	camundongo	1:10	1:10.000
Parvalbumina (PV)	camundongo	1:10	1:10.000
<b>PEPTÍDEOS</b>			
Neuropeptídeo Y (NPY)	coelho	1:10	1:1.000

Foram obtidos resultados consistentes com diluições compreendidas entre 1:5.000 e 1:10.000 para as proteínas ligantes de cálcio, e 1:2.000 para o NPY, correspondendo à seguinte solução final:

TABELA #2

<i>ANTICORPO</i>	<i>VOLUME (μl)</i>	<i>NGS<sup>1</sup> (μl)</i>	<i>PB/Triton (μl)</i>
<b>CaBPs</b>			
CalR	2	50	948
Calb	1	50	949
PV	1	50	949
<b>PEPTIDEOS</b>			
NPY	10	50	940

<sup>1</sup> Soro normal de cabra (*Vector S-1000*)

A incubação com o anticorpo primário foi de 12-16 horas à temperatura ambiente, após a qual os cortes foram lavados novamente em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 e submetidos a processos imuno-histoquímicos segundo o método de fluorescência, ou do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC; HSU et al., 1981).

### 3.3.2 ANTICORPO SECUNDÁRIO

#### MÉTODO DE IMUNO-FLUORESCÊNCIA

Para esses experimentos, os cortes que reagiram aos anticorpos primários contra CaBPs foram incubados por duas horas à temperatura ambiente em solução contendo anticorpo secundário anti-IgG da espécie animal em que foi feito o anticorpo primário (diluição 1:50 em PB 0,1M com 0,3% Triton-X-100), o qual, para adquirir a sua característica fluorescente, foi marcado com tetrametil isotiocianato de rodamina (RITC).

O anticorpo secundário, para todos os três reagentes, teve uma concentração final de 1:50 (20 μl, diluídos em 980 μl de PB 0,1M com 0,3% Triton-X-100). Seguiu-se lavagem dos cortes (3 vezes de 10 minutos cada), em solução de PB

0,1M, pH 7,4, e montagem em lâminas com lamínulas aplicadas sobre os cortes tendo como meio uma solução de glicerol em tampão carbonato 0,1M (1:9).

O material fluorescente assim obtido foi examinado com microscópio Leitz para epifluorescência e fotografado com filme Kodak ou Fuji colorido, de 35 mm (400 ASA). Para as fotografias em preto e branco o filme foi Technical Pan (Kodak), exposto a 800 ASA. Um filtro Nikon apropriado para a observação de RITC (B<sub>2</sub>, excitação em 470-490 nm; barreira em 520 nm) foi utilizado.

### ***MÉTODO DE IMUNO-PEROXIDASE: COMPLEXO AVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASE (ABC)***

Para serem submetidos a esse procedimento, os cortes marcados com anticorpo primário contra as CaBPs e Neuropeptídeo Y foram lavados durante 30 minutos em tampão fosfato (3 vezes de 10 minutos cada) para, a seguir, serem transferidos para uma outra solução, contendo anticorpo biotilado anti-IgG (anticorpo secundário), em diluição 1:200 em Triton-X-100 a 0,3% em PB 0,1M, correspondente a 5 µl de reagente com 995 µl de PBS, e incubados por uma hora e meia à temperatura ambiente.

A seguir, foram lavados 3 vezes por 10 minutos cada, em tampão fosfato 0,1M e incubados durante uma hora à temperatura ambiente, com o complexo avidina-peroxidase (ABC Elite), preparado com 30 minutos de antecedência, para uma diluição 1:100, seguindo o seguinte protocolo:

**ABC (Elite):** 10 µl reagente "A"  
10 µl reagente "B"  
980 µl Triton -X-100 0,4% com NaCl

Findo este período, e após lavagem dos cortes durante 30 minutos (3 x 10 minutos) em PB 0,1 M, procedeu-se à realização de coloração.

### ***Reação de Diaminobenzidina (DAB)***

O tecido assim tratado foi, por último, colocado em uma solução de diaminobenzidina 0,05% em tampão fosfato 0,1M, (25 µg DAB diluídos em 100 ml 0,1M PB) com 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (100 ml de peróxido de hidrogênio 30% em 10 ml de água destilada), e incubado durante 2 a 3 minutos, sendo agitado ocasionalmente.

Esses cortes já corados foram lavados em PB 5 vezes por 10 minutos cada, para serem submetidos, a seguir, ao processo de dupla marcação, isto é, a histoquímica para NADPH-diaforase.

### ***3.4 HISTOQUÍMICA PARA NADPH-DIAFORASE***

Sendo esta uma reação de óxido-redução, na qual a diaforase é a enzima que cataliza a redução de seu substrato em presença de uma coenzima, neste caso da NADP, que também é reduzida, sua histoquímica visa a localizar os lugares de reoxidação desta coenzima, fato que manifesta-se pela cor azul-escura que eles adotam, devido a uma deposição de formazan, produto dessa re-oxidação. Para a reação são preparadas duas soluções básicas:

**Solução A:** 300 mg de ácido málico (Sigma M-0875)

50 ml de tampão tris 0,1M, pH não corrigido

Corrigir o pH para 8,0 com NaOH 5,0<sup>1</sup>

**Solução B:** 15 mg de Nitrobluetetrazolium, NTB (Sigma N-6876)

0,5 ml Dimetilsulfoxide, DMSO (Sigma D-5879)<sup>2</sup>

<sup>1</sup> O ácido málico faz papel de substrato nessa reação, que para se realizar precisa ter o pH ajustado em 8,0.

<sup>2</sup> O NTB, acceptor artificial de hidrogênio, é responsável pela formação irreversível de formazan. O DMSO é um solvente orgânico que não é substrato para desidrogenases.

As soluções A e B eram misturadas e se acrescentaram 19 mg de cloreto de magnésio ( $MnCl_2 \cdot 4HOH$ ; Sigma M-3634) como cofator que, aliás, previne a ruptura das mitocôndrias durante a incubação, 50 mg  $\beta$ -NADP (Sigma N-505), e por último 250 ml de Triton X-100 (Sigma X-100).

Os cortes lavados foram submergidos nesta solução em cubas de plástico e agitados a temperatura controlada ( $37^{\circ}C$ ) em estufa, com controle no microscópio a cada 15 minutos, até os detalhes morfológicos serem perfeitamente visíveis, momento que a reação era interrompida em solução de tampão tris 0,1M, pH 8,0<sup>1</sup>.

Os cortes assim corados e já marcados foram colocados em cubas com tampão fosfato 0,1 M, e levados a geladeira a  $4^{\circ}C$ , até os cortes, contendo as regiões anatómicas específicas que serão analisadas, serem montados, segundo a sua localização anatômica, em lâminas de vidro, e secados à temperatura ambiente em lugar seco e escuro por 48 horas. Findo este período de tempo, foram submetidos aos processos de osmificação e desidratação, com a finalidade tanto de aumentar a intensidade da marcação imuno-histoquímica, como de facilitar a montagem das lamínulas para sua posterior observação.

### **3.5 OSMIFICAÇÃO E DESIDRATAÇÃO**

#### **3.5.1 Osmificação**

Efetuada para intensificar a coloração dos cortes, foi feita mediante imersão das lâminas previamente colocadas na grade apropriada (Lab-Tek), segundo o seguinte esquema:

---

<sup>1</sup> É necessário ressaltar que a solução, por ser fotossensível por causa do NTB, foi feita imediatamente antes de ser utilizada, garantindo assim o êxito do experimento.

- a) Água destilada: 5 min.,
- b) 0,05% Tetróxido de ósmio: 15 - 20 s,
- c) Água destilada: 2 - 5 min.

### **3.5.2 Desidratação**

Imediatamente após a osmificação, se procedeu à desidratação dos cortes, seguindo, sequencialmente, o protocolo abaixo descrito:

- a) 80% álcool (EtOH) : 2 -3 min.,
- b) 90% álcool (EtOH): 2 - 3 min.,
- c) 100% EtOH ( I ) : 2 - 3 min.,
- d) 100% EtOH (II) : 2 -3 min.,
- e) Hemo-de ( I ) : 5 min.,
- f) Hemo-de (II) : 5 min.

O material processado com esse método foi montado num meio resinoso (Permount), sendo observado em microscopia de campo claro com lentes objetivas de 5X, 10X e 40X, e posteriormente fotografado com filme Technical Pan (Kodak), ASA 100, ou Kodak/Fuji (ASA 100) para cópias a cores, usando as objetivas PL fluotar 10X, 25X ou 40X.

### **3.6 REAGENTES**

Dos sedativos usados para anestesia dos animais, o ketamine (Ketalar) foi produto da Aveco Co. Inc, Iowa (USA), entretanto a xilazina era de Lloyd Laboratories, Iowa (USA). A heparina sódica da Roche, Alemanha. O

paraformaldeído 4%, anticorpos primários contra as proteínas ligantes de cálcio calmodulina, calbindina e parvalbumina, assim como os reagentes para a histoquímica para NADPH-diaforase: ácido málico, Tris-HCl, nitrobluetetrazolium (NTB), dimetilsulfoxide (DMSO), cloreto de magnésio tetra hidratado,  $\beta$ -NADP, Triton-X-100, diaminobenzidina (DAB) e tetróxido de ósmio, foram todos da Sigma Chemical Company, St. Louis (USA). O anticorpo anti-neuropeptídeo Y da Amershan, Buckinghamshire (UK), e aquele da calretinina da Chemicon. Os anticorpos biotinilados anti-IgG para todas as reações imunohistoquímicas vieram da Jackson Immunoresearch Laboratories (USA). O kit para reação de ABC (Vectastain Elite ABC kit), e o soro normal de cabra (NGS), dos laboratórios Vector (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Os anticorpos marcados com rodamina foram da Jackson Labs., e o Hemo-de da Fischer Scientific, Pittsburg, (USA).

### ***3.6.1 CARATERÍSTICAS DOS ANTICORPOS***

Todos os anticorpos utilizados têm sido extensamente caracterizados e têm sido demonstrado que eles reconhecem seus antígenos com elevado nível de especificidade. Isto tem sido confirmado por radioimunoensaio e controles de absorção (Celio *et al*, 1985; German *et al*, 1985; Levey *et al*, 1983). Além disso, os anticorpos presentes neste estudo têm sido usados em procedimentos imunohistoquímicos com excelentes resultados (Mesulam *et al*, 1983; Mesulam *et al*, 1984; Mesulam *et al*, 1988, Hamassaki & Britto, 1990; Britto *et al*, 1994).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS**

Muitas fibras e neurônios no cérebro de camundongos foram especificamente marcados com os métodos imuno e histoquímicos já descritos, não sendo observadas grandes diferenças na visualização das características morfológicas nas células dos cortes processados com cada técnica. As marcações tanto para NADPH-diaforase como para CaBPs foram claras e de fácil visualização, em especial no que diz respeito aos corpos celulares (pericário), e seus processos (dendritos). Foi possível, aliás, a observação de numerosos vasos sanguíneos diaforase-positivos os quais, por não formarem parte dos objetivos propostos, não foram analisados. Essa marcação do endotélio era esperada, em função da conhecida presença de NO na parede vascular. A imuno-histoquímica das CaBPs, como a técnica da NADPH-diaforase, produziram também detalhada marcação da neurópila, que no caso da diaforase é considerada um índice da atividade metabólica neuronal, permitindo inclusive a visualização de características tais como direção, sentido e comprimento destas fibras.

O padrão das características anatômicas dos neurônios marcados com essas duas técnicas, relativamente simples de serem aplicadas, foi menos elaborado, mas igualmente apropriado aos nossos objetivos do que aquele observado com a técnica de Golgi (Pearse, 1985), pela qual os neurônios com seus dendritos, pericários e axônios são claramente evidenciados em todos seus detalhes.

Tanto o método histoquímico quanto o imuno-histoquímico apresentaram, no presente trabalho, um alto nível de sensibilidade no que faz referência às células positivas para determinado marcador, e uma alta seletividade no que faz referência à localização anatômica das mesmas. A rodamina, marcador usado na técnica de



imuno-fluorescência, foi de grande utilidade na determinação da presença ou não de co-localização.

Com respeito à metodologia, com a finalidade de eliminar eventuais problemas na marcação histoquímica, com a subsequente dificuldade na visualização das células e/ou seus processos, foi necessário suprimir o processo de pós-fixação, normalmente utilizado para imuno-histoquímica. Melhor qualidade de marcação foi obtida realizando a técnica para NADPH-diaforase após se efetuar a imuno-peroxidase ou imuno-fluorescência.

Sendo que a barreira mais óbvia para a penetração dos anticorpos são as lipoproteínas das membranas plasmáticas, assim como a matriz do material intra e extracelular, capaz de produzir ligações cruzadas com os anticorpos, especialmente no caso da solução que os contem apresentar aldeídos na sua constituição química, ou se a concentração proteica for insuficiente (Hsu *et al.*, 1981, Kiernan, 1990), quantidades inadequadas do surfactante utilizado neste trabalho, Triton-X-100, detergente que por emulsificar os componentes lipídeos das membranas, dá lugar ao aparecimento de buracos através dos quais os anticorpos passam com mais facilidade, pode se constituir em importante fator determinante da qualidade das marcações para as CaBPs.

O tempo necessário para atingir uma intensidade de cor adequada, para ser apreciada nitidamente a co-marcação imuno e histoquímica, foi fator crítico na realização dos experimentos. O tratamento final com tetróxido de ósmio, que produz uma reação de oxidação, com intensificação da coloração marrom dos neurônios e fibras nos cortes marcados com a técnica de ABC, assim como o controle do tempo de incubação dos cortes marcados pela técnica histoquímica, visando a se obter a melhor intensidade da coloração azul escura característica, produto da deposição de formazam nos tecidos, constituíram, portanto, passos fundamentais para o êxito das experiências.

## 4.2 DISTRIBUIÇÃO DE NADPH-DIAFORASE E CaBPs: AUSÊNCIA DE CO-LOCALIZAÇÃO

A presente análise se realizou a nível de: **a)** córtex cerebral (Cx), **b)** núcleos da base (caudado-putamen), **c)** vias visuais subcorticais, especificamente colículo superior (SC), núcleo geniculado lateral dorsal (GLd) e ventral (GLv), **d)** amígdala e hipocampo, **e)** hipotálamo, **f)** bulbo olfatório e **g)** cerebelo.

Os termos *diaforase-positivo*, já utilizado para a descrição dessas células (Franca, 1993), assim como *CaBP-positivo* foram adotados para a presente descrição. Neurônios e processos fortemente marcados, como aqueles do bulbo olfatório, foram diferenciados daqueles fracamente marcados, como os do GLv. Neurônios com intensidade de marcação intermediário entre estes dois extremos foram designados moderadamente positivos.

A observação inclui, além das diferenças da localização e intensidade das marcações, algumas das características anatômicas dos neurônios, processos e fibras (neurópila) capazes de serem visualizadas com essas duas técnicas, elementos que facilitaram a determinação da sua localização e/ou eventual co-localização nos grupos específicos de cada região cerebral.

Devemos ressaltar que o objetivo principal deste trabalho foi o de caracterizar a co-localização de NADPH-diaphorase com as proteínas ligantes de cálcio, e no sua distribuição nas regiões acima mencionadas. Estas informações já estão amplamente divulgadas na literatura pertinente. Dessa forma, deixamos de apresentar dados e ilustrações referentes à distribuição global daquelas substâncias, mas apenas comentaremos brevemente sobre esse aspecto.

As Figs. 1-4 ilustram exemplos de marcações para CaBPs e NADPH-diaforase no córtex frontal do cérebro dos camundongos estudados.

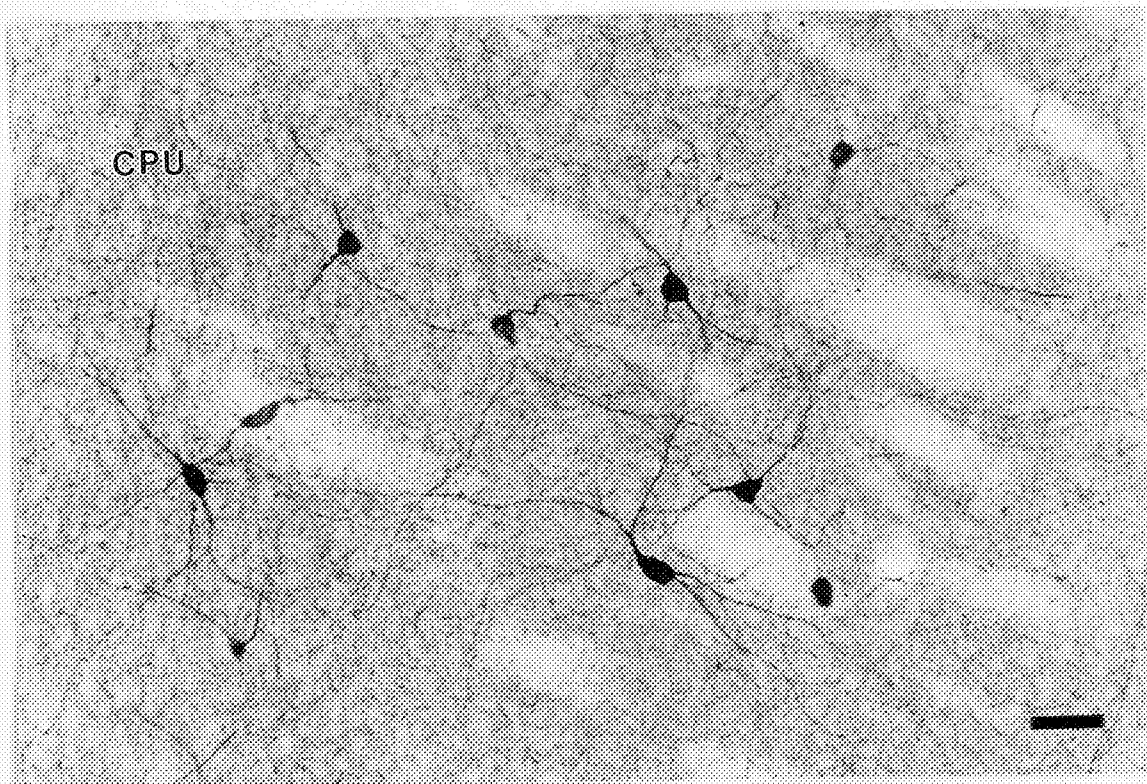


Figura 1. Fotomicrografia de uma secção frontal do cérebro de camundongo processado para NADPH-diaforase, ilustrando a marcação celular. CPU = caudado-putamen. Escala = 38  $\mu$ m.

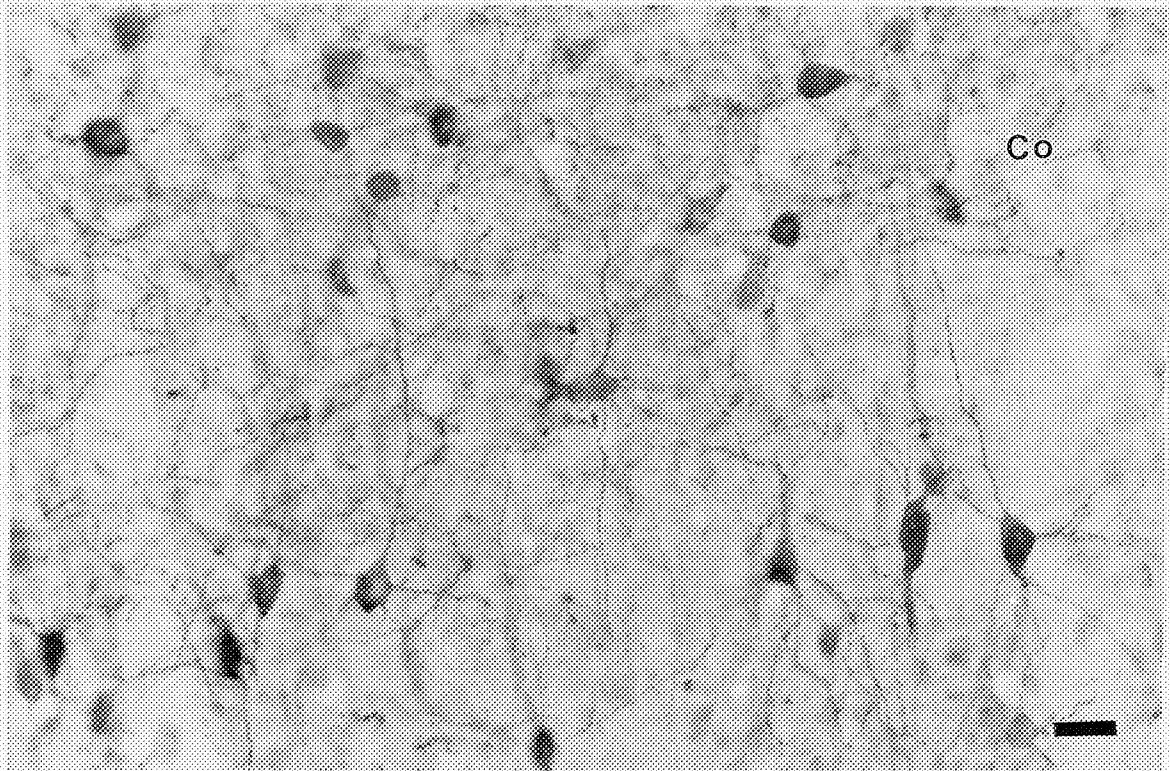


Figura 2. Fotomicrografia de uma secção frontal do cérebro de camundongo processado para calbindina D-28k, ilustrando a marcação celular. CPU= caudado-putamen. Escala =18  $\mu$ m.

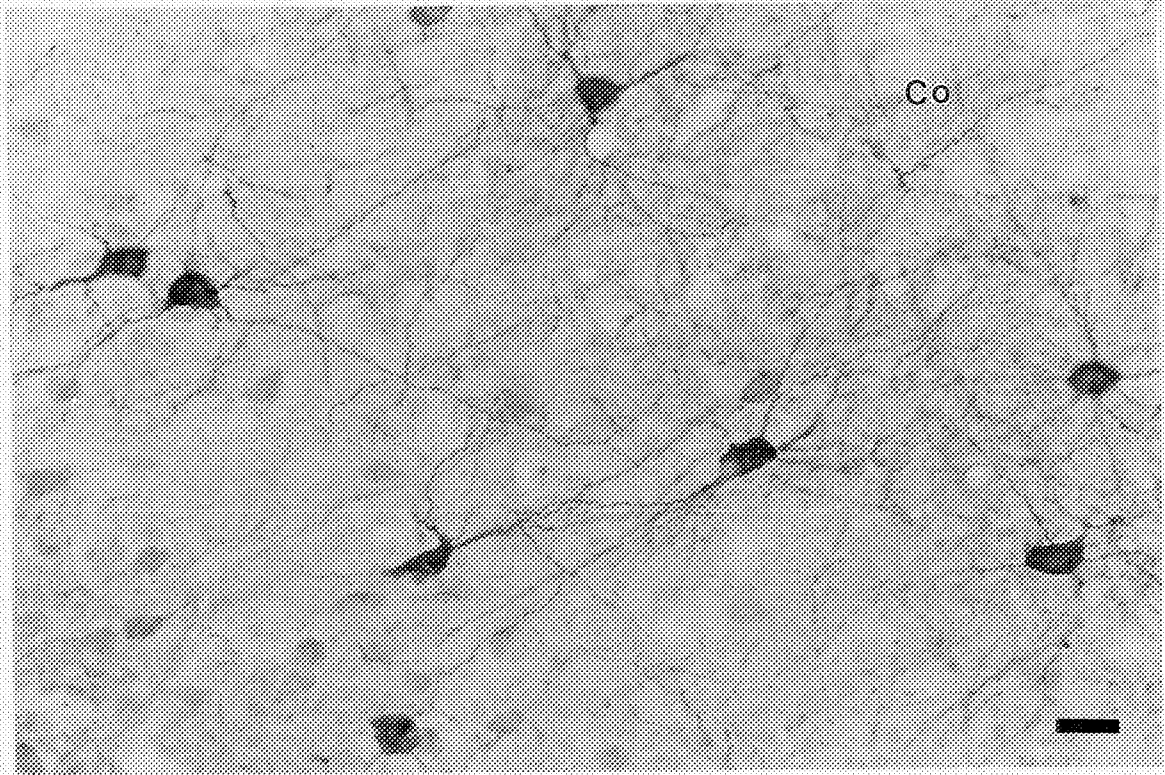


Figura 3. Fotomicrografia de uma secção frontal do cérebro de camundongo processado para parvalbumina, ilustrando a marcação neuronal nas células não piramidais do córtex. Co = córtex. Escala = 18  $\mu$ m.

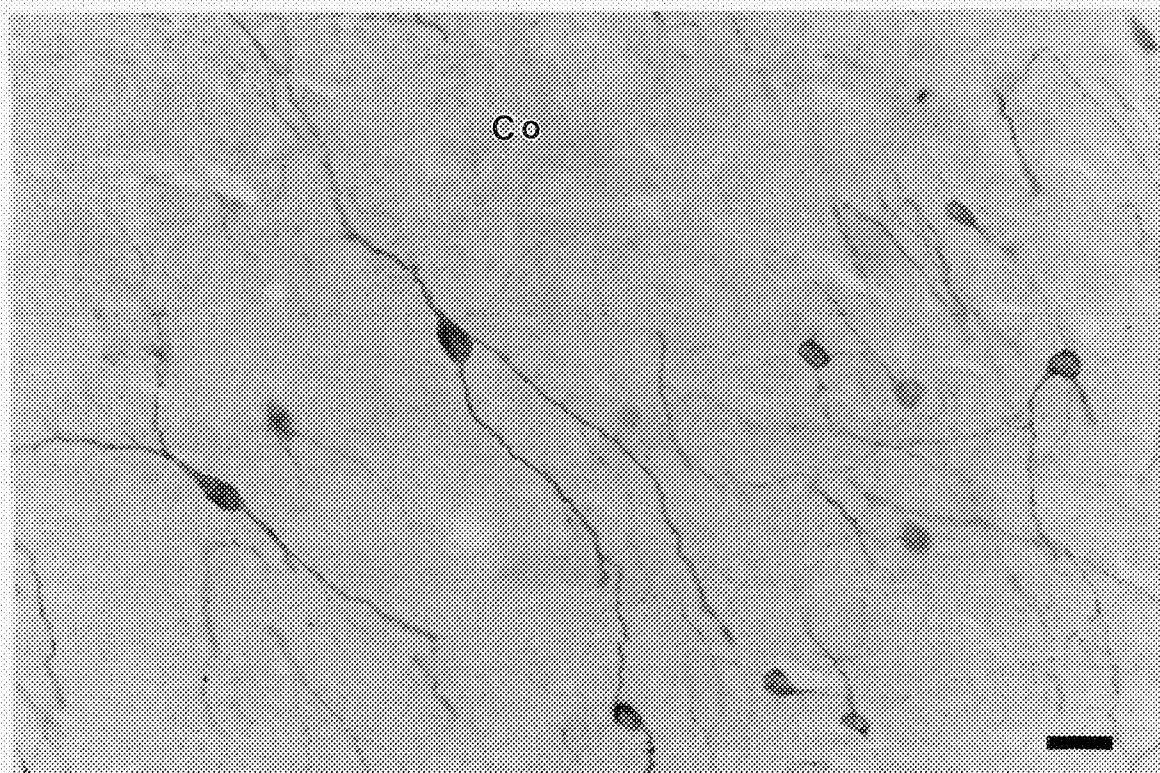


Figura 4. Fotomicrografia de uma secção frontal do cérebro de camundongo processado para calretinina, ilustrando a marcação neuronal em células não piramidais do córtex. Co = córtex. Escala = 18  $\mu$ m.

### *a) Córtex*

Tanto neurônios diaforase-positivos quanto CaBPs-positivos foram detectados no córtex dos cérebros dos camundongos testados. Neste nível, escassas células marcadas foram evidenciadas nas diferentes regiões anatomicamente diferenciadas: córtex frontal, parietal, temporal e occipital. Intensa e abundante marcação de neurópila foi observada, especialmente com a histoquímica para diaforase, dando como resultado um fino plexo de fibras entrelaçadas cuja distribuição se assemelha à imagem de uma "colméia" ("honeycomb"), e que vão se tornando mais longas conforme adentram nas regiões mais internas.

O fato característico na marcação do córtex foi a presença de células diaforase-positivas de média intensidade, nas camadas celulares mais externas, além de apresentarem-se relativamente dispersas. Neurônios Calb e PV-positivos com intensidade de marcação similar à descrita para NADPH-d também foram visualizados. Todos eles foram de tamanho médio, distribuídos em pequenos grupos neuronais, localizados principalmente nas camadas II e III do córtex e com morfologias que lembram aquelas das células não piramidais (Fig. 3,4). Neurônios CalR-positivos foram identificados no córtex entorrinal e pré-piriforme (Fig. 5).

Os experimentos de imuno-peroxidase e imuno-fluorescência evidenciaram a ausência de co-localização dos neurônios diaforase-positivos com aqueles marcados para CalR, Calb e PV. Se bem que eles se apresentaram em regiões corticais similares, tais como o córtex visual ou somato-sensorial, a inexistência de superposição dos pericários e fibras neuronais, facilmente evidenciáveis com o marcador fluorescente rodamina, determinou de maneira definitiva, a ausência de co-localização neste nível (Figs. 5,6,7).

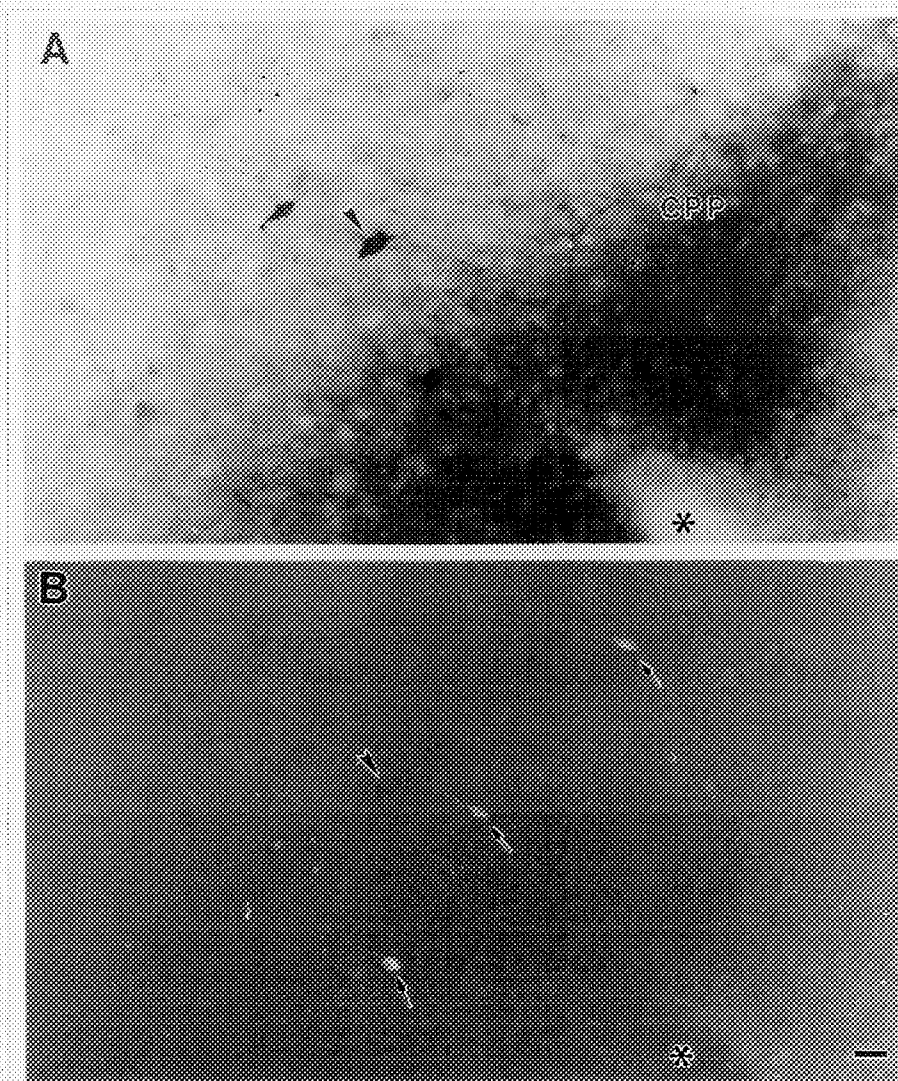


Figura 5. Corte frontal do cérebro de camundongo. A) Fotomicrofotografia de uma secção processada para NADPH-diaforase demonstrando a marcação celular (cabeça de seta). B) Fotomicrografia da mesma secção processada para calretinina pela técnica de imuno-fluorescência, ilustrando a ausência de co-localização. As setas indicam neurônios CalR-positivos. O asterisco mostra a presença de um vaso sanguíneo. CPP = córtex pre-piriforme. Escala = 25  $\mu$ m.



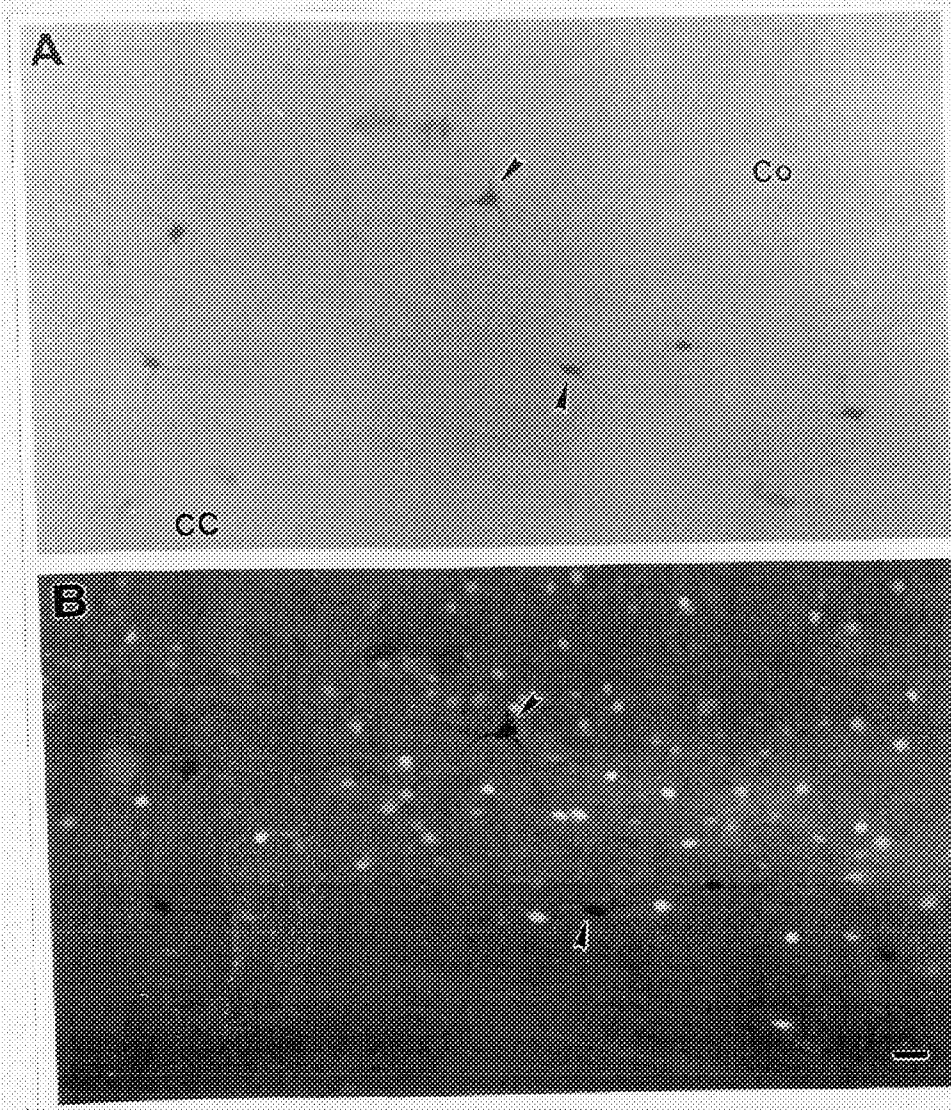


Figura 6. Corte frontal do cérebro de camundongo. A) Fotomicrografia de uma secção processada para NADPH-diaforase demonstrando a marcação celular (cabeza de seta). B) Fotomicrofotografia da mesma secção processada para calbindina D-28k pela técnica de imuno-fluorescência, ilustrando a ausência de co-localização. Co = córtex cerebral; CC = corpo caloso. Escala = 50  $\mu$ m.

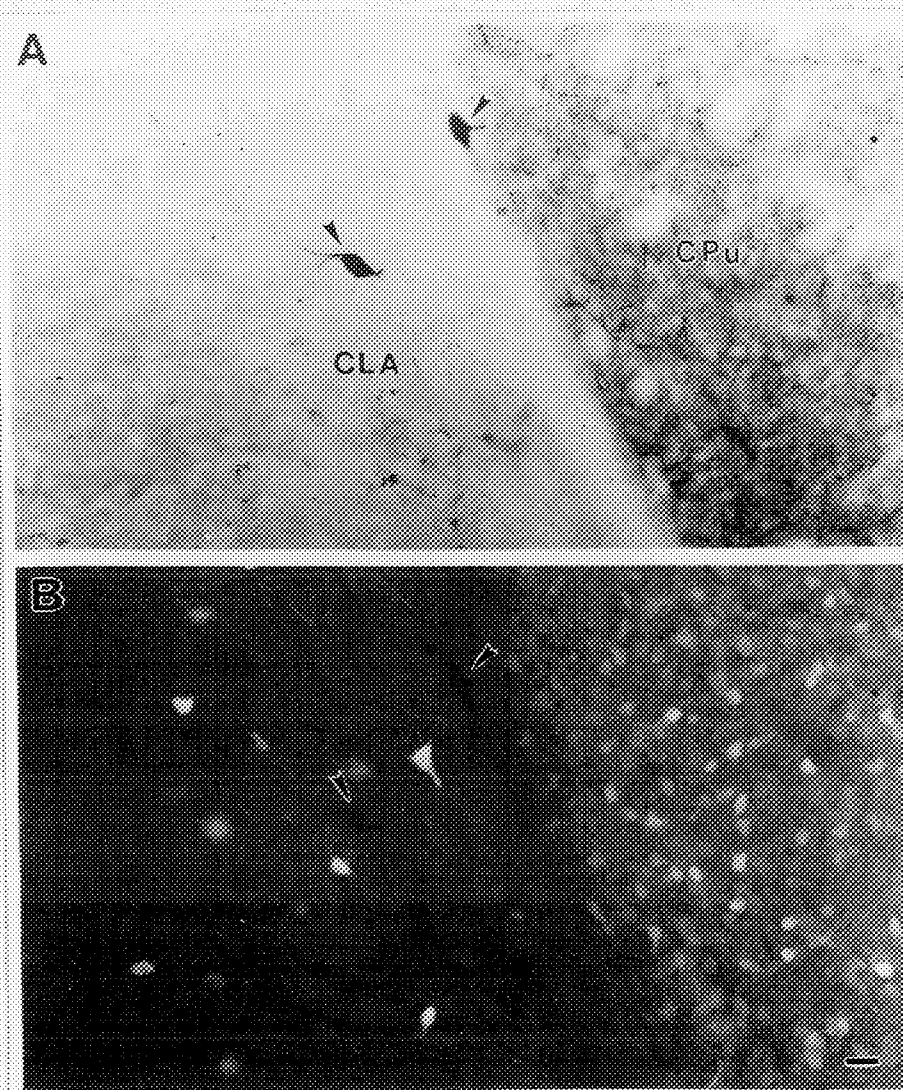


Figura 7. Corte frontal do cérebro de camundongo. A) Fotomicrografia de uma secção processada para NADPH-diaforase demonstrando a marcação celular (cabeza de seta). B) Fotomicrografia da mesma secção processada para parvalbumina pela técnica de imuno-fluorescência, ilustrando a ausência de co-localização. CPU = caudado-putamen; CLA = claustrum. Escala = 25  $\mu$ m.

*b) núcleos da base  
caudado e putamen*

Populações dispersas de neurônios diaforase-positivos intensamente marcados foram identificados no caudado. Células de tamanho médio, mostrando um alto padrão de marcação da neurópila foram identificadas. Ela atingiu tanto as células quanto as fibras de projeção, criando uma densa rede fibrosa, na qual foi possível detectar pequenos neurônios Calb e PV-positivos, cujo soma e processos se apresentaram intensamente marcados, e claramente diferenciados enquanto a sua localização, tanto com as células diaforase positivas, quanto as duas CaBPs entre si. No putamen, neurônios diaforase-positivos se distribuíram em grupos específicos nas sua região mais externa. Na porção medial deste núcleo, se evidenciou uma intensa reação imuno-histoquímica para Calb, aparentemente representando, pelas diferenças na estrutura somática neuronal das células positivas para cada marcador, duas populações neuronais diferentes. A imuno-fluorescência demonstrou a presença de neurônios PV-positivos nas regiões do claustrum adjacentes a estes dois núcleos e comprovou a ausência de co-marcação já evidenciada com a imuno e histoquímica isoladamente (Fig. 7).

No caso da co-localização usando a técnica de ABC, se evidenciou a presença de células Calb-positivas não-piramidais fusiformes e com múltiplos dendritos multidirecionados, além das células em duplo-buquê, estas últimas marcadas (mas sem co-localização), também para NADPH-diaforase. Concordando com estudos anteriores (DeFelipe & Jones, 1989a; 1989b), neurônios PV-positivos isolados foram evidenciados nas células em candelabro e cesto, enquanto nas camadas intermediárias do córtex cerebral assim como no estriado dos cortes analisados, neurônios CalR positivos em algumas células bipolares e em duplo-tufo foram observados (Figs. 8,9,10).

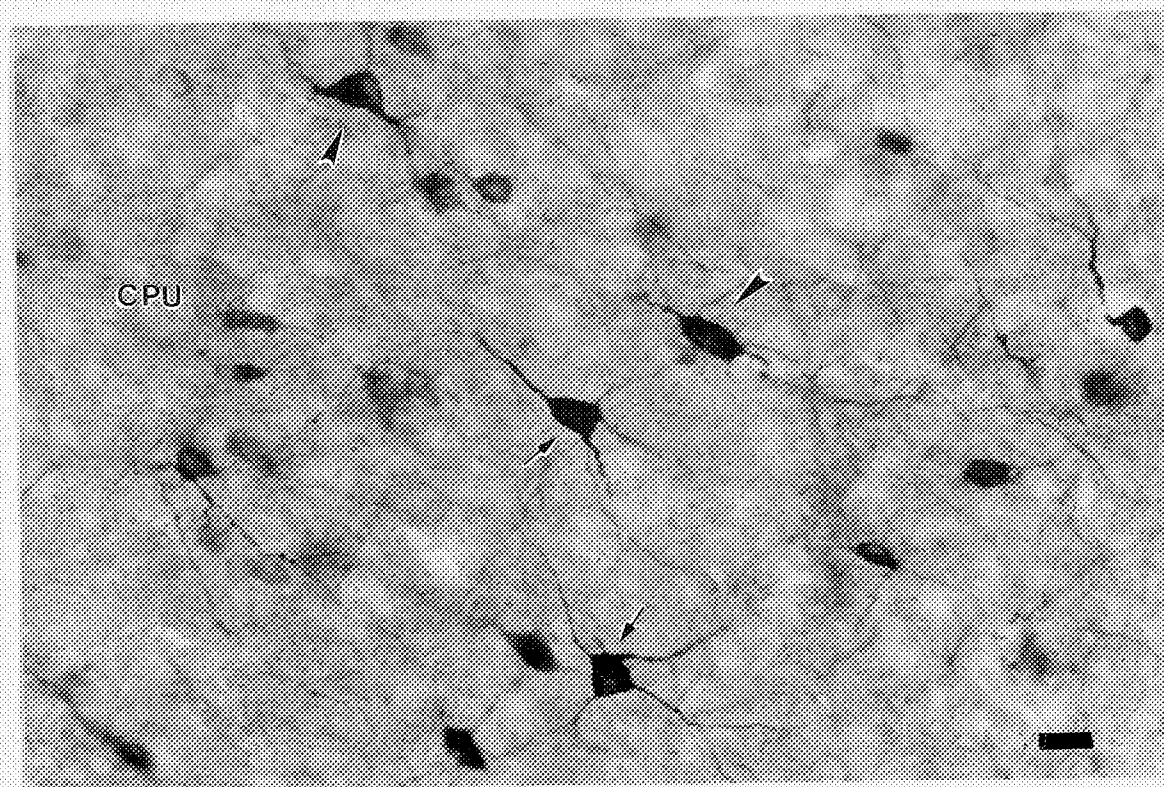


Figura 8. Corte frontal do cérebro de camundongo processado para calbindina D-28k (cabeças de setas) e NADPH-diaforase (setas) ilustrando marcação celular no caudado-putamen (CPU) e ausência de co-localização. Escala =18  $\mu$ m.

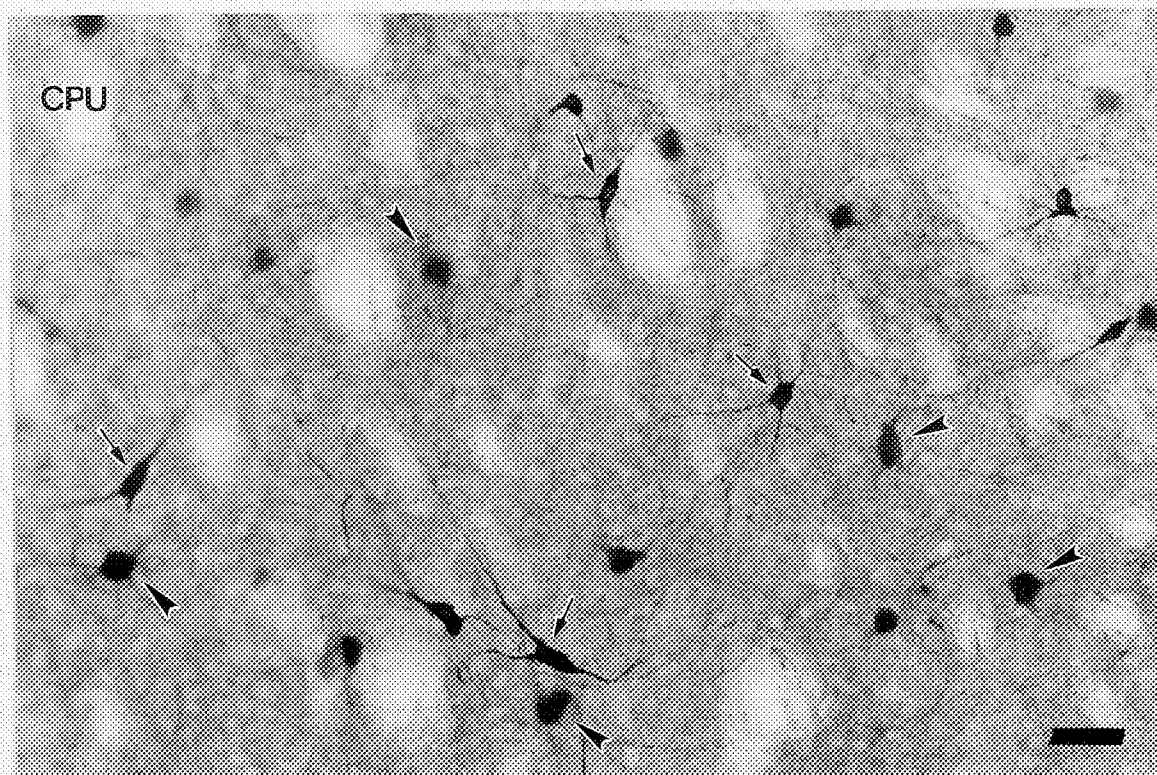


Figura 9. Corte frontal do cérebro de camundongo processado para parvalbumina (cabeças de setas) e NADPH-diaforase (seta) ilustrando marcação celular no caudado-putamen (CPU) e ausência de co-localização. Escala = 44µm.

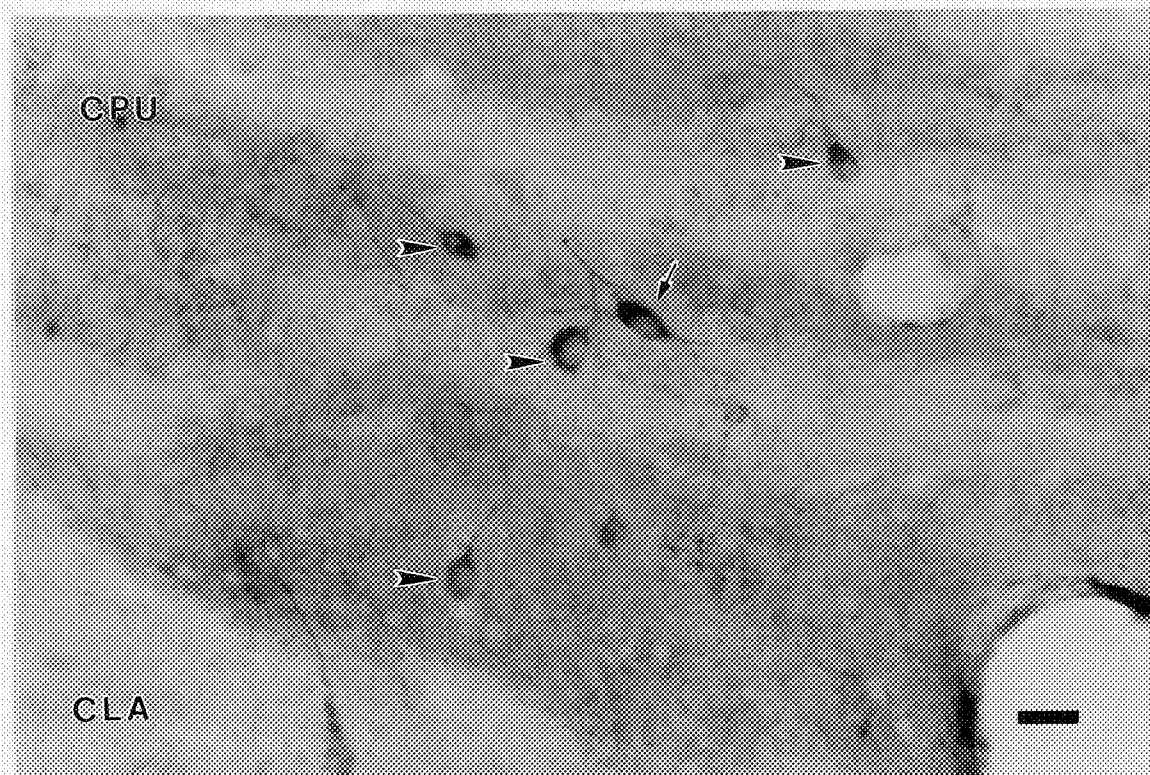


Figura 10. Corte frontal do cérebro de camundongo processado para calretinina (cabeças de setas) e NADPH-diaforase (seta) ilustrando a diferença da marcação celular no córtex (Cx) e ausência de co-localização. CPU = caudado-putamen; CLA = claustrum. Escala = 18  $\mu$ m.

### *c) Vias visuais subcorticais*

#### *Colículo Superior*

Células NADPH-diaforase positivas foram localizadas na substância cinzenta intermediária desta estrutura. Essa marcação não se apresentou homogênea, mas em bandas de intensa atividade, intercaladas com regiões de baixa atividade, manifestadas pelas notáveis variações na intensidade das marcações evidenciadas nos pericários e início dos seus processos. Foi evidenciada marcação para Calb e PV neste nível, mas não para Calr. Os grupos neuronais CaBPs-positivos foram localizados nas camadas mais externas e mediais dessa região. Diferenças no referente a intensidade e qualidade da marcação foi interpretada como causada por diferentes planos de marcação nos cortes. Não foi observada co-localização de NADPH-diaforase e CaBPs.

#### *Núcleo Geniculado Lateral, pars Dorsalis Principalis (GLd)*

Na maior parte dos cortes que apresentaram este núcleo, se observaram escassos neurônios diaforase-positivos, isolados e com seus processos marcados unicamente na sua porção inicial. A marcação dos pericários neste nível é fraca, e se limita à última e mais externa camada deste núcleo, dificultando a visualização das características morfológicas celulares. Uma débil imagem de "background" causada pela presença de neurópila aumentou ainda mais essa dificuldade.

Este núcleo caracterizou-se por apresentar células Calb e PV-positivas, estando a Calr praticamente ausente. Como no córtex, a co-localização foi nula.

#### *Núcleo Geniculado Lateral, pars Ventralis (GLv)*

O GLv não apresentou marcação para NADPH-diaforase de pericários ou processos neuronais em nenhum dos cortes analisados. Foi possível, no entanto, observar marcação positiva para diaforase na neurópila em todas as camadas, que não seguiu padrão de localização ou direção definido. Essas fibras se apresentaram

ao microscópio finas, tortuosas e de comprimento médio. Uma fraca marcação puntiforme de coloração marrom foi observada num segundo plano, dificultando ainda mais a visualização e subsequente determinação de uma possível marcação neste núcleo. Aparentemente poucas células calbindina-positivas estavam presentes, mas a ausência de co-localização foi evidente.

#### *d) Amígdala e Hipocampo*

O hipocampo mostrou, em relação à NADPH-diaforase, e em razão da morfologia que os neurônios e seus processos apresentaram, padrões similares aqueles expressos no córtex e cerebelo, isto é, estão presentes em populações de inter-neurônios e não nas células principais. No giro denteado, poucas células foram fracamente marcadas na região da camada molecular subjacente a das células granulosas.

Células PV-positivas foram marcadas nas camadas das células principais, entanto as regiões dendríticas desses neurônios expandiram-se até as camadas de células não piramidais, intercalando-se, neste nível, com fibras diaforase-positivas, diferenciando-se claramente delas.

Neurônios positivos para calretinina foram encontrados em populações dispersas de importância secundária, em termos numéricos, além do giro denteado. A amígdala se caracterizou por apresentar, em populações neuronais diferentes, intensa marcação para diaforase e para Calb, que exibiu, em zonas adjacentes a ela, um imunoprecipitado difuso, finamente granuloso e difícil de enxergar no microscópio de luz, constituindo aparentemente a neurópila. Células em cesto no giro denteado apresentaram discreta marcação para PV. Não se evidenciou co-localização nenhuma entre todos os marcadores descritos.

#### *e) hipotálamo*

Neurônios neurosecretórios magnocelulares dos núcleos supraóptico e



giro denteado apresentaram discreta marcação para PV. Não se evidenciou co-localização nenhuma entre todos os marcadores descritos.

#### *e) hipotálamo*

Neurônios neurosecretórios magnocelulares dos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo, assim como seus processos, foram intensamente marcados com a histoquímica para NADPH-diaforase. Um baixo grau de marcação com anticorpos contra CalR foi observado em populações neuronais diferentes dos mesmos núcleos, especialmente no paraventricular. Neurônios positivos para Calb e PV não co-localizados dispersos foram vistos nas regiões hipotalâmicas correspondentes ao núcleo paraventricular e a área compreendida entre esses dois núcleos.

#### *f) bulbo olfatório*

Apresentou reação diaforase e Calb-positiva em grupos diferenciados de células peri-glomerulares, a qual estendeu-se às células glomerulares adjacentes a essa região. Ambas as populações de células (diaforase e calbindina positivas) não apresentaram características morfológicas específicas, nem predominância na distribuição desses marcadores. Uma população mínima de células esporádicas fracamente marcadas para CalR em células periglomerulares também foram encontradas. As tentativas de observar co-localização neste nível produziram resultados negativos.

#### *g) cerebelo*

Neurônios diaforase-positivos intensamente marcados, tanto no soma quanto nos dendritos, apresentaram-se nas células em cesto da camada molecular e células da camada granulosa. Células Calb e PV-positivas se apresentaram dispersas entre as

utilizados na técnica de imuno-histoquímica e imuno-fluorescência frente a histoquímica para NADPH-diaforase, a co-localização deste marcador com o Neuropeptídeo Y (NPY) foi testada. É amplamente reconhecida a co-localização desse peptídeo com a NADPH-diaforase (Kowall *et al.*, 1987).

Idêntico protocolo ao descrito para os experimentos de co-localização de diaforase e CaBPs foi seguido. Os resultados foram consistentes com os obtidos em múltiplos trabalhos anteriormente descritos, nos quais a imuno-histoquímica para NPY produz marcação positiva dos neurônios e seus processos. A co-localização entre NADPH-d e NPY foi evidenciada na população neuronal de tamanho médio do estriado, no córtex cerebral, amígdala, hipocampo e vias visuais. As características da co-marcação, no referente à qualidade, quantidade e intensidade de coloração dos cortes, se revelaram particularmente adequadas para os objetivos propostos (Fig. 11).

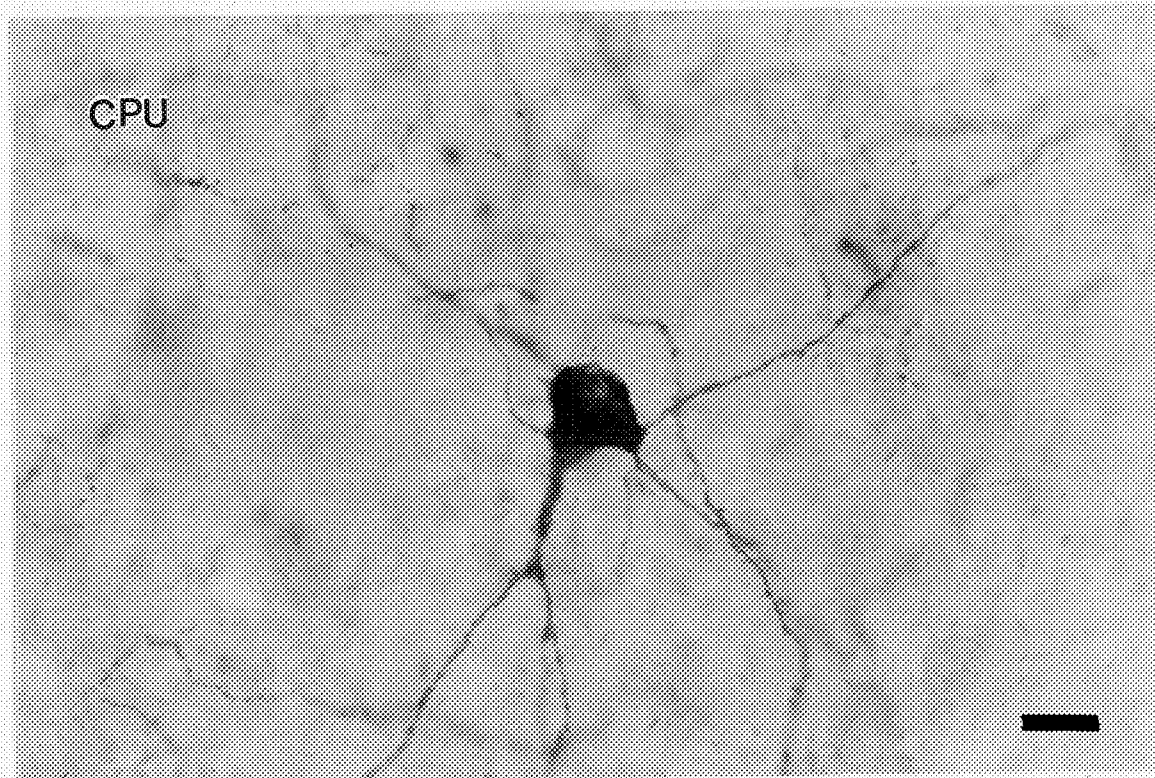


Figura 11. Fotomicrografia de corte frontal de cérebro de camundongo, ilustrando co-localização de NADPH-diaforase e neuropeptídeo Y (NPY). A célula indicada pela seta está duplamente marcada. CPU = caudado-putamen. Escala = 15  $\mu$ m.

## 5. DISCUSSÃO

Pouco se conhece sobre a influência dos fatores difusíveis intracelularmente nos processos metabólicos de populações celulares quimicamente definidas por marcadores específicos no sistema nervoso central das diferentes espécies. No presente trabalho, foram examinadas as características da distribuição imunohistoquímica das CaBPs e histoquímica da NADPH-diaforase, as duas conhecidas como mediadoras e/ou moduladoras dos processos enzimáticos intra e intercelulares, para desta maneira determinar sua eventual co-localização, e assim colaborar para esclarecer as funções que tais processos desempenham na fisiologia celular. Essa hipótese é baseada no fato que a NADPH-diaforase, já identificada como a sintetase de óxido nítrico (NOS) (Hope *et al.*, 1991) responsável pela expressão de NO, ter sido demonstrada em diversos estudos compartilhar muitas das suas propriedades com as CaBPs. Parece que a molécula de NOS apresenta na sua estrutura, sítios de ligação específicos para algumas delas. De fato, e para reforçar essa afirmação, a seqüência de bases complementar à da calmodulina tem sido amplamente caracterizada na NOS (Branden & Tooze, 1991; Snyder & Brecht, 1992; Vorherr *et al.*, 1993), sugerindo desta maneira uma importante interação desses dois sistemas enzimáticos no metabolismo celular.

Esta aparente interação toma força com o fato de ambos os marcadores apresentarem variações similares na sua expressão na presença de certas doenças neurodegenerativas, tais como Coréia de Huntington (Iacopino & Christakos, 1990; Heizmann & Braun, 1992; Geula *et al.*, 1993), Alzheimer (Kowal *et al.*, 1988; Unger & Lange, 1991), Parkinson (Ferry *et al.*, 1982; Saggi *et al.*, 1989), transtornos afetivos bipolares e estados de depressão psicótica (Morton *et al.*, 1993). Esses antecedentes, entre outros, falam a favor da existência de uma via metabólica

comum na fisiopatologia dessas doenças, envolvendo aqueles dois tipos de marcadores neuronais, provavelmente mediante seu mútuo envolvimento nos processos óxido-redutores e respiratórios intracelulares, como o ciclo de Krebs na mitocôndria, transporte de elétrons, síntese de DNA e ativação da guanilato ciclase solúvel (Bredt & Snyder, 1989).

### *5.1 LIMITAÇÕES TÉCNICAS*

A metodologia utilizada no presente trabalho não inclui a estimativa numérica da percentagem de células marcadas, distribuição ou tamanho delas. A atividade da diaforase é definida histoquimicamente pela capacidade do tecido de reduzir sais de tetrazolium na presença de dinucleotídeos redutores, neste caso o NADPH, que produz uma coloração azul característica. A expressão das CaBPs está determinada pela capacidade de interação antígeno-anticorpo, que produz um complexo marrom evidenciável nas células neuronais e seus processos.

A técnica histoquímica para NADPH-diaforase utilizada foi baseada no método descrito por Scherer-Singler e colaboradores (1983), e modificada posteriormente por Araújo e colaboradores (1992), dando lugar a um padrão de marcação às vezes quase similar aquele observado com a técnica de Golgi (Pearse, 1985; Sandell, 1986; Kiernan, 1990; Snyder & Bredt, 1992), e que se caracteriza por apresentar, com alta especificidade, grupos densos de neurônios e seus processos (neurópila), claramente definidos quanto a sua localização no cérebro dos camundongos testados, e muito provavelmente relacionado à atividade metabólica das regiões marcadas. Consistente com estudos similares, a presente marcação histoquímica demonstrou, quanto a reatividade, grandes variações na distribuição dos neurônios diaforase-positivos nas diferentes estruturas cerebrais, e dentro de cada uma delas, manifestando-se altamente seletivo enquanto às camadas celulares

atingidas por este marcador. A variabilidade entre os casos estudados entretanto, foi muito reduzida.

A maior vantagem dos métodos utilizados para a determinação da co-localização imuno-histoquímica de diferentes antígenos com a histoquímica para NADPH-diaforase em secções finas de cérebro, consiste na sua relativa simplicidade, já que o material primário é obtido de "kits" pré-testados, e sua manipulação não implica grandes dificuldades. Existem, no entanto, algumas limitações:

a) O pré-tratamento dos cortes do cérebro, referente à perfusão e ausência de pós-fixação para co-marcação com NADPH-diaforase, assim como o uso de detergentes e/ou agentes oxidantes durante a aplicação da técnica imuno-histoquímica foram pasos fundamentais já que a falta de cuidados neles pode, às vezes, produzir resultados insatisfatórios devido a uma pobre preservação do tecido, ou a uma perda do material (DeFelipe & Jones, 1992).

b) O padrão de marcação obtido depois dos procedimentos imuno e histoquímicos às vezes não se faz homogêneo, apresentando regiões com boas preservação e fixação, enquanto outras partes das mesmas secções podem estar escassamente preservadas e expressar, portanto, uma qualidade de marcação ruim (DeFelipe & Jones, 1992).

c) Os tempos de incubação tanto para imuno como para histoquímica foram fatores críticos para o êxito dos experimentos; pois é amplamente conhecido que tempos curtos ou excessivamente prolongados podem induzir erros na distribuição e intensidade de marcação nas diferentes regiões cerebrais (Morton *et al.*, 1993).

A limitada expressão dos diferentes antígenos em alguns dos cortes analisados manifestada em b), pode ter-se devido, entre outros fatores, à baixa

biodisponibilidade da proteína ligante especificamente analisada no momento, provocando uma diminuição fisiologicamente significativa na sua interação com seu antígeno respectivo, ou produzindo uma ineficiência do anticorpo no seu reconhecimento. Também pode ter acontecido do antígeno estar encoberto por outras moléculas que obstruíram o acesso dos anticorpos no antisoro primário, ou bloqueiaram o segmento correspondente de ligação do antígeno na sua molécula (Kiernan, 1990), afetando a qualidade da marcação.

Eliminando-se estes fatores, as duas técnicas, quando adequadamente aplicadas e combinadas, podem fornecer, como de fato forneceram, importantes informações sobre a morfologia e distribuição espacial dos diferentes elementos neuronais, assim como da atividade enzimática dos sistemas neurais e dos circuitos por eles estabelecidos, com a finalidade de compreender a organização desses sistemas.

## **5.2 CÉLULAS REATIVAS NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS: ANÁLISE COMPARATIVA**

### **5.2.1 NADPH-DIAFORASE**

A distribuição das células NADPH-diaforase positivas descritas no presente estudo parece ser única e diferente de outras populações neuro-quimicamente definidas por marcadores histoquímicos diferentes, sugerindo a presença de múltiplos neurônios no cérebro que empregam o NO como mediador e/ou modulador. Eles tem sido evidenciados nos grupos de projeções colinérgicas no estriado de ratos, macacos e humanos, cada uma dos quais apresenta um tipo morfológico (Ch) característico, e cujos padrões de distribuição estão altamente conservados entre mamíferos (Geula *et al.*, 1993). Assim, 20-30% dos neurônios do

núcleo septal medial (Ch1), e os núcleos das porções vertical (Ch2) e horizontal (Ch3) da banda diagonal de Broca, em rato, apresentam atividade de NADPH-diaforase, a qual é inexistente em macacos e seres humanos, incluído o núcleo basal (Ch4), núcleo tegmental pedúnculo-pontino (Ch5) e núcleo tegmental látero-dorsal (Ch6) (Mesulam *et al.*, 1964; Satoh & Fibiger, 1985; Satoh & Fibiger, 1986; Hallanger *et al.*, 1987; Hallanger & Wainer, 1988; Mesulam & Geula, 1988; Mesulam *et al.*, 1989; Geula *et al.*, 1993).

Contrastando com esses padrões espécie-específicos das projeções colinérgicas, no tronco cerebral e estriado a co-localização de NADPH-diaforase com neurônios colina-acetil-transferase positivos (Dizhorr *et al.*, 1991) é a mesma em todas as espécies mencionadas (Geula *et al.*, 1993), isto é, os grupos Ch5 e Ch6 do tronco cerebral de todos os animais estudados apresentaram atividade de NADPH-diaforase, enquanto nenhum neurônio colinérgico do estriado demonstrou tal atividade (Vincent *et al.*, 1983; Ellison *et al.*, 1987; Kowall *et al.*, 1987).

Estudos feitos no estriado de gatos (Sandell *et al.*, 1986), ratos (Vincent & Johansson, 1983), e seres humanos (Kowall *et al.*, 1987), demonstraram que, além de atividade de NADPH-diaforase, os neurônios colinérgicos e suas projeções apresentaram imuno-reatividade para somatostatina (SOM), neuropeptídeo Y (NPY) (Vincent & Johansson, 1983; Kowall *et al.*, 1987; Unger & Lange, 1992; Britto *et al.*, 1994), ou polipeptídeo pancreático de aves (APP) (Vincent & Johansson, 1983). Substância P, bombesina e fator liberador de corticotropina também co-localizam com a NADPH-diaforase (Vincent *et al.*, 1986). Neurônios dopaminérgicos contidos na substância negra de mamíferos contêm também NADPH-diaforase (Zhu & Luo, 1992).

Na retina de coelhos e ratos, a reatividade deste marcador é mais aparente nos neurônios que contêm ácido gama-amino-butírico (GABA) (Vaney & Young, 1988),



conhecido neurotransmissor inibitório. O estudo das células amácrinas NADPH-diaforase positivas durante o desenvolvimento, em coelhos (Mitrofanis, 1989; Mitrofanis *et al.*, 1992) e gatos (Wässle *et al.*, 1987; Cobcroft *et al.*, 1989), serviu para demonstrar seus diferentes subtipos, dependentes da co-localização imunohistoquímica dessa enzima com um determinado neurotransmissor e/ou neuropeptídeo.

Há células NADPH-diaforase positivas co-localizadas com células amácrinas catecolaminérgicas, colinérgicas e uma mínima proporção de células serotoninérgicas, além das células amácrinas deslocadas contidas na camada de células ganglionares na retina de gato (Wässle *et al.*, 1987), e aquelas possuidoras de imunoreatividade para NPY (Sagar, 1986; Vaney & Young, 1988). Esta classificação, baseada nas características de co-marcação de NADPH-diaforase com outras substâncias, confirma o papel fundamental dessa técnica histoquímica no que faz referência à identificação das propriedades morfo-funcionais neuronais.

A multiplicidade de neurotransmissores, peptídeos e outras substâncias associadas a NADPH-diaforase, assim como as diferenças neuro-químicas espécie-específicas expressas nos parágrafos anteriores, torna evidente não simplesmente o fato de o NO não estar correlacionado a um sistema de neurotransmissão específico, mas de apresentar-se ativo em múltiplos circuitos, explicando, desta maneira, a ampla e aparentemente anárquica distribuição desse fator, reforçando a hipótese da multiplicidade das suas funções, e indicando a necessidade de se tomar consideráveis precauções na dedução das implicações que estes estudos representam para a fisiopatologia em seres humanos.

A marcação celular, como expressado nos resultados, apresentou uma variação evidente não só na seletividade da sua distribuição nas camadas celulares das estruturas celulares NADPH-diaforase positivas, mas também quanto a sua

forma, tamanho, intensidade de coloração e variação nas características dos contatos sinápticos, tanto do soma como dos seus processos (neurópila), implicando uma importante função do NO como mensageiro intra e interneuronal nos neurônios onde está presente (Bredt *et al.*, 1990).

As particularidades anteriormente expressas se manifestaram especialmente no bulbo olfatório, cuja intensa e abundante marcação foi característica em todos os cortes analisados. Apresentou-se, em concordância com outros trabalhos, mais precoce e intensa na camada de células periglomerulares que rodeiam as células glomerulares, as que em estudos prévios têm sido identificadas como células superficiais de axônio curto (células em tufo) (Pinching & Powell, 1971). Elas se mostraram heterogeneamente distribuídas, e também imunorreativas para NPY (Vincent *et al.*, 1982; Vincent & Johansson, 1983).

O córtex cerebral, lugar onde as “células solitárias ativas” foram identificadas pela primeira vez por Thomas & Pearse (1964), apresentou menor densidade de marcação que no bulbo olfatório, evidenciando-se neurônios intensamente marcados principalmente nas camadas mais superficiais, co-localizadas com NPY, com amplas flutuações nos níveis de reatividade. Células reativas a anticorpos contra CalR, Calb e PV se localizaram no córtex distribuídas heterogeneamente nas várias áreas corticais. Esses achados não são simplesmente consistentes com outros previamente efetuados neste nível, mas confirmam a forte inter-relação existente entre elas e o NO, intensidade do metabolismo celular e, conseqüentemente, com algumas das doenças neuro-degenerativas associadas à envelhecimento, sem esquecer a importância da presença do ião cálcio na indução do NO.

Várias populações de neurônios diaforase-positivos também foram localizados no giro denteado do hipocampo e a porção horizontal da banda diagonal de Broca, apresentando elevada reatividade e idêntica seletividade a outras regiões

cerebrais descritas. A marcação evidenciada neste nível é coerente com estudos feitos em mamíferos nos períodos pré e pós-natal, cujos resultados levam a considerar uma possível relação com os processos de LTP e LTD. Reforçando estes achados está a marcação evidenciada no estriado, cuja grande variação no que faz referência a densidade, intensidade, número e morfologia de células reativas, possivelmente relacionada à presença de imunoreatividade para diferentes neurotransmissores e neuropeptídeos, entre eles o NPY e a SOM (Vincent & Johansson, 1983), confirma mais uma vez o que já é um fato claramente estabelecido: que a NADPH-diaforase funciona como marcador histoquímico seletivo para as células estriatais, expressando com elevada fidelidade a intensidade metabólica e conseqüentemente funcional das células por ela expressas. Também foram identificados no hipocampo neurônios Calb positivos fortemente marcados, cujos processos compridos e varicosos apresentaram padrões aparentemente complementares aqueles exibidos pelos processos das células diaforase positivas.

As regiões corticais e subcorticais do sistema visual manifestaram marcação para NADPH-diaforase no núcleo geniculado lateral ventral e substância cinzenta superficial do colículo superior, achado consistente com outros efetuados não somente em roedores, mas na porção fotossensitiva da glândula pineal de rãs (Sato, 1990). Neurônios Calb e PV positivos se localizaram nas regiões intermediárias do colículo superior, demonstrando, como a diaforase, sua interação com sistemas neuronais específicos, como GABA e glutamato, para produzir incremento nos níveis intracelulares de GMPc, intervindo ativamente nos mecanismos funcionais intra e inter-celulares ao atuar como um transdutor de sinais em níveis específicos das vias visuais, e provavelmente regulando o aceso das informações de outros sistemas sensoriais.

As hipóteses mencionadas até o momento parecem perder força ao se analisar as características de distribuição dos neurônios diaforase-positivos no cerebelo.

Efetivamente, este apresentou-se com um dos maiores níveis de atividade de NADPH-diaforase, particularmente nas células da camada granular, e células da glia, mas não houve evidência de marcação nas células de Purkinje, conhecidas por apresentarem elevados níveis de GMPc (Greenberg *et al.*, 1978). A discrepância entre a localização de GMPc e NOS nesta região pode ser devido a uma rápida liberação de seus lugares de produção, para então se ligar às enzimas circundantes e produzir seus múltiplos efeitos (Vincent & Kimura, 1992). Embora estes resultados pareçam contraditórios, o fato de agonistas dos receptores de glutamato tipo NMDA produzirem um estímulo da expressão de NADPH nas células granulares anteriormente descritas (Kiedrowski *et al.*, 1992) reforça a idéia de o NO, inducido pelo acoplamento  $Ca^{2+}$ /calmodulina/NOS, ter uma importante função na regulação dos processos metabólicos e funcionais neuronais.

### 5.2.2 PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO (CaBPs)

É amplamente conhecido que alterações nas propriedades morfológicas e funcionais celulares resultantes da perda da sua homeostase podem produzir, em última instância, necrose e morte celular. A manutenção dessa homeostase, portanto, está dada por uma série de processos ativos, envolvendo mecanismos de transporte e armazenamento de diversas substâncias, sendo as concentrações intra e extracelulares de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$  e  $[Ca^{2+}]_e$ , respectivamente) fator crítico dentro desses processos. De fato, a perda da relação  $[Ca^{2+}]_i/[Ca^{2+}]_e$ , com subsequente incremento e posterior manutenção dos níveis de  $Ca^{2+}$  citoplasmático, constitui mecanismo comum de citotoxicidade celular (Kaiser & Edelman, 1977). A presença das CaBPs constitui, portanto, um fator de proteção que evita incrementos excessivos desse íon, seja na sua função de tamponantes, contribuindo para a re-entrada de  $Ca^{2+}$  nas organelas intracelulares, ou na regulação do intercâmbio iônico. Sendo o sistema

$\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina mecanismo básico para a ativação da NADPH-diaforase, e sendo que essa enzima, por sua vez, regula a entrada e saída de  $\text{Ca}^{2+}$  livre através dos receptores NMDA da membrana celular, a homeostasia do meio celular dependerá do equilíbrio na interação desses sistemas, cuja presença é evidenciada pelas técnicas imuno e histoquímicas já descritas.

A distribuição das células CaBPs-positivas no cérebro de camundongos foi idêntica àquela previamente descrita em outros trabalhos, e particularmente chamativa pela abundância e especificidade na sua distribuição cerebral. Como o NO, o padrão de marcação com anticorpos contra Calb, PV e CalR no cérebro inclui corpos neuronais e neurópila, localizados em regiões claramente delimitadas, e cuja intensidade de marcação, subjetivamente estimada, apresentou uma série de variações.

#### *a) calretinina (CalR)*

As células CalR-positivas, como aquelas NADPH-diaforase-positivas, apareceram no presente estudo, abundantemente distribuídas a nível do córtex entorrinal, pre-piriforme e hipocampo, em células cuja morfologia lembra as células não-piramidais. Estudos de dupla marcação têm demonstrado que células CalR-positivas presentes no complexo da rafe inervam, como os neurônios diaforase positivos, células GABAérgicas, visíveis com microscopia eletrônica (Halasy *et al.*, 1992). Evidências recentes sugerem que células CalR-positivas possuidoras de GABA podem ser ativadas sincronizadamente (Michelson & Wong, 1991), produzindo hiperpolarização local dos dendritos através dos receptores  $\text{GABA}_B$ , ou da região somática dos neurônios, por meio dos receptores perisomáticos  $\text{GABA}_A$  (Newberry & Nicoll, 1985; Blaxter *et al.*, 1986), modulando desta maneira a expressão de serotonina (Segall, 1990). Estas propriedades tem sido associadas à

papel dessa CaBP na regulação de alguns sistemas de fosforilação (Geula *et al.*, 1993).

Este efeito é observado também na presença de Calb e/ou neuropeptídeos. Células PV-positivas não têm sido, até o momento, relacionadas a contatos sinápticos com axônios serotoninérgicos (Acsády *et al.*, 1993). Alterações no mecanismo funcional das vias serotoninérgicas têm sido relacionadas à etiologia das doenças afetivas bipolares, como transtornos maniaco-depressivos e depressão psicótica.

#### *b) calbindina D-28k (Calb) e parvalbumina (PV)*

Consistente com outros estudos, as células calbindina-positivas apresentaram, no presente trabalho, as mesmas variações espécie-específicas descritas para a NADPH-diaforase. Por exemplo, as projeções neuronais colinérgicas nos grupos Ch1 a Ch4, em estudos feitos em rato, não expressaram reatividade para calbindina, enquanto os mesmos estudos dessas regiões em macacos e seres humanos revelaram neurônios fortemente positivos. Neles os grupos Ch5-Ch6 no estriado demonstraram ser negativas para Calb, ao contrário destas células no tronco cerebral. Ao menos 50% delas revelou conter substância P (SP) ou receptores específicos para este peptídeo (Standaert *et al.*, 1986; Vincent *et al.*, 1986; Bolam *et al.*, 1986; Gerfen, 1991). No presente análise, como foi expresso em resultados, tanto as células Calb como PV-positivas se apresentaram dispersas em todas as regiões cerebrais, e foram caracterizadas, do mesmo modo que o NO, por apresentar substancial variação na imuno-reatividade de uma região cerebral a outra. Essa localização é coincidente, segundo Baimbridge e colaboradores (1992), nas células não piramidais que contêm GABA e/ou neuropeptídeos.

Essas particularidades na sua distribuição reforçam as evidências de as CaBPs estarem, como o próprio NO, co-localizadas com neurônios GABAérgicos (Pitkänen *et al.*, 1993; Pitkänen *et al.*, 1993a), sendo que a alteração nos circuitos neuronais da amígdala e hipocampo, em estudos feitos em primatas, desempenham um papel fundamental na sintomatologia de doenças como epilepsia (Corsellis & Meldrum, 1984; Gloor, 1992) ou Alzheimer (Hooper & Vogel, 1976), e caracterizadas por produzir, de forma paulatina, degeneração neuronal irreversível.

A expressão de Calb nos neurônios do hipocampo, ao contrário da NOS-I cerebral, é regulada por corticosterona. Já que os glucocorticóides são capazes de produzir incremento nos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ , e este, por sua vez produzir a ativação da NOS pelo sistema  $Ca^{2+}$ /Calmodulina e a fragmentação do DNA através da ativação das endonucleases, os dois sistemas, NOS/CaBPs podem interagir, caso essa regulação se encontre alterada, levando a degeneração e/ou morte celular (Kaiser & Edelman, 1977), produzindo as alterações de comportamento associadas às doenças neurodegenerativas já mencionadas (Heizman & Braun, 1992), e relacionando indiretamente os níveis de glucocorticóides circulantes com a expressão de NO.

As células e seus processos foram caracterizados por possuir forma e tamanho variáveis, concordando com as descrições referentes a morfologia e distribuição dos neurônios calbindina e parvalbumina positivos de trabalhos similares. A presença dessa série de características na imunorreatividade neuronal e dendrítica para as CaBPs, concordantes com aquelas da NADPH-diaforase, tomadas em conjunto com as aferências quimicamente específicas que elas recebem, indicam, como no caso do NO, que nos circuitos neuronais do cérebro de mamíferos, as CaBPs exercem um complexo controle químico, e que essas influências exibem diferenças espécie-específicas.

As CaBPs, particularmente a PV, foi evidenciada com clareza no córtex cerebral em todas as suas regiões, e no cerebelo tanto nos corpos e processos horizontalmente dirigidos das células em cesto localizadas na camada molecular, mostrando, como em outras regiões, uma localização diferencial em relação com aquela apresentada pela NOS.

### 5.3 CÉLULAS NADPH-diaforase E CaBPs POSITIVAS: MODULAÇÃO DA SUA EXPRESSÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

#### 5.3.1 NADPH-diaforase

O papel fisiológico que o NO cumpre no cérebro embrionário é desconhecido. Os limitados estudos feitos até o momento ressaltam a possibilidade de o NO estar envolvido no desenvolvimentos das redes neuronais (Gally *et al.*, 1990; Southam *et al.*, 1991). Estudos desenvolvidos em córtex cerebral, bulbo olfatório, cerebelo e retina de ratos têm demonstrado que a atividade de NOS já existe no cérebro de embriões de rato Sprague Dawley (SD) com 19 dias de idade pré-natal (Ma *et al.*, 1991), e que essa atividade reside, no início, nos corpos neuronais. A maioria dos neurônios retinianos que contêm NADPH-diaforase são presumivelmente células amácrinas (Sagar, 1980; Sandell, 1985; Wässle *et al.*, 1987; Cobcroft *et al.*, 1989), sendo detectadas como catecolaminérgicas e colinérgicas a partir do terceiro dia de vida pós-natal (P3). Nesses trabalhos os corpos neuronais foram os primeiros em serem marcados enquanto os dendritos fizeram seu aparecimento em P5, sendo somente no décimo-primeiro dia pós-parto que os dendritos apresentaram a máxima intensidade de marcação. No vigésimo-quinto dia, neurônios e dendritos diminuem seu diâmetro, comprimento e sua reatividade à histoquímica, reforçando a hipótese da perda dos contatos sinápticos



durante os primeiros dias de vida pós-natal em mamíferos, e apresentando um padrão similar aquele que terão na vida adulta. O P7, período de máximo tamanho celular e dendrítico, e de melhor marcação histoquímica, coincide com o aparecimento das primeiras sinapses das células amácrinas e bipolares, na camada plexiforme interna (Horsburgh & Sefton, 1987), e com o início da atividade elétrica (Weidman & Kuwabara, 1968).

Esses fatos, que estudados em vias visuais (retina), constituem clássico exemplo para o estudo dos sistemas sensoriais, manifestam claramente a possibilidade de o NO desempenhar um importante papel nos processos de sinaptogênese e plasticidade sináptica que, no hipocampo, iria potencializar os processos de LTP e/ou LTD já descritos (Bon *et al.*, 1992), além de modular a atividade elétrica de diversos grupos neuronais do SNC.

### 5.3.2 PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO

As proteínas ligantes de cálcio durante o período embrionário aparecem, como o NO, depois que os neurônios iniciam a diferenciação, e com frequência ao mesmo tempo em que eles começam a fazer contato uns com outros por meio dos seus dendritos, sendo capazes de desaparecer de um sistema funcional no caso de ele ser desafereado, como acontece, por exemplo, com a calbindina em vias visuais após enucleação ocular (Britto *et al.*, 1994; Blümke *et al.*, 1994). As concentrações de calbindina hipocampal em rato aumentam após aplicação de corticosterona, e sofrem um substancial decréscimo depois da indução de crises epiléticas, entretanto a parvalbumina, sob o mesmo estímulo, está incrementada, provavelmente refletindo as diferentes substâncias com as quais ela se co-localiza.

A contrário do NO, os níveis de parvalbumina e calbindina no estriado de rato não apresentam alteração nenhuma após destruição química dos aferentes dopaminérgicos da substância nigra (Baimbridge *et al.*, 1992), demonstrando que ao menos essas duas CaBPs não estão presentes nessa via e, portanto, aparentemente não cumprem papel nenhum nos circuitos neuronais associados a ela.

#### *5.4 NADPH-diaforase E CaBPs: LOCALIZAÇÃO DIFERENCIAL*

As características de distribuição das células NADPH-d e CaBPs-positivas são adequadas para dar suporte à hipótese que a interação desses fatores desempenha um importante papel na preservação celular, não simplesmente no seu aspecto morfológico, isto é, conservando intactas as estruturas intracelulares, mas também na manutenção dos processos dinâmicos que têm lugar nos diferentes circuitos neuronais que provocam, em conjunto, o funcionamento cerebral, e cuja disfunção provoca uma perda paulatina das suas potencialidades fisiológicas, através da degeneração neuronal irreversível.

As vias pelas quais esses dois sistemas (NADPH-diaforase e CaBPs) funcionam parecem ser as mesmas. Não obstante, as sucessivas incubações dos cortes cerebrais de camundongo no presente trabalho, feitas com a finalidade de tentar determinar a presença de co-localização, demonstraram a evidente seletividade das populações neuronais tanto para marcação histoquímica como para imunohistoquímica, na qual camadas celulares específicas e suas respectivas projeções (dendritos), já classificadas por seu tamanho, forma, localização e padrão de ramificação dos seus processos, e funcionalmente determinadas pelos neurotransmissores por elas expressas, apresentaram diferenças significativas quanto à localização, na qual não foi possível evidenciar co-existência entre NADPH-d e CaBPs, mas um padrão que parece ser complementar.

Diversos sistemas de neurotransmissores relacionados a NO e CaBPs estão implicados no controle de importantes funções. O sistema colinérgico, por exemplo, cujos neurônios co-localizam com NADPH-diaforase ou Calb (Geula *et al.*, 1993), regula as funções motoras extrapiramidais, sono, vigília, comportamento, motivação, aprendizagem e memória (Mesulam, 1988). Calb tem sido localizada nos neurônios dos sistemas de projeções ascendentes, especificamente no núcleo trigeminal caudal, núcleo do trato solitário e área postrema, sendo particularmente abundante em subregiões que envolvem o processamento da víscero e nocicepção, e aparentemente co-localizada com neuropeptídeos (Menétrev *et al.*, 1992). Embora as funções desses dois sistemas dentro de todas aquelas vias ainda hoje não estejam totalmente esclarecidas, é sabido que ambos os marcadores atuam como protetores neuronais na isquemia, neurotoxicidade e processos degenerativos, efeitos que variam de um grupo celular a outro (Beal *et al.*, 1986; Ellison *et al.*, 1987; Koh & Choi, 1988; Uemura *et al.*, 1990; Yamada *et al.*, 1990).

Diversos estudos cujo alvo foi quantificar as concentrações das CaBPs Calb e PV após injúria neuronal, têm demonstrado uma interessante variabilidade na expressão dessas CaBPs entre si. Assim, depois de uma crise epiléptica induzida no hipocampo, por exemplo, a PV das células GABAérgicas nas células granulosas está diminuída, entretanto a Calb não apresenta variação neste nível, ou, pelo contrário, se mostra aumentada (Heizmann & Braun, 1992; Baimbridge & Rogers, 1992).

No cérebro humano idoso, a expressão de Calb, como de NO, diminui aproximadamente em 70-80% em várias regiões, particularmente no núcleo de Meynert, em pacientes com doença de Alzheimer (Iacopino & Christakos, 1990). Efeitos similares são observados numa grande variedade de doenças neurodegenerativas associadas à idade avançada, acompanhados de incremento do  $Ca^{2+}$  intracelular, e redução da atividade da  $ATP_{ase}-Ca^{2+}/Mg^{2+}$  (Whitehouse, 1986; Martínez *et al.*, 1988). Isto evidencia que as CaBPs, como a NADPH-diaforase, são

importantes marcadores da atividade neuronal, e as alterações na sua expressão indicam alterações funcionais das populações neuronais específicas cujas vias elas integram.

Estudos comparativos da distribuição das CaBPs Calb, CalR, PV e Calm na medula espinal de rato, revelam padrões de distribuição específicos com superposição parcial em algumas áreas. Como no SNC, um claro predomínio de certo tipo de CaBP foi evidenciado em regiões como a lâmina I e células endodurais (Calb) ou porção interna das lâminas II e III (PV CalR, respectivamente), além de apresentarem substancial diminuição da sua imunoreatividade no caso de lesão (ganglionectomia). A lâmina X apresentou um padrão de distribuição da PV e CalR claramente complementar (Ren & Ruda, 1994).

Segundo este esquema, experiências feitas nas vias colinérgicas do córtex cerebral de rato evidenciaram grupos de neurônios cuja expressão de Calb e NADPH-diaforase é imuno e histo-quimicamente identificável, mas não superposta (Geula *et al.*, 1993), possuindo um padrão de distribuição diferente daquele exibido no cérebro humano. Idênticos resultados foram obtidos em experiências realizadas no bulbo olfatório de ratos, em que grupos diferenciados de células periglomerulares demonstraram ser Calb ou NADPH-diaforase positivas, sem exibir características neuronais morfológicas específicas ou sítios de distribuição predominantes para cada marcador (Arévalo *et al.*, 1993).

A CalR também tem sido objeto de estudo em sua relação com NADPH-diaforase no núcleo secretório magnocelular do hipotálamo, onde um nível mínimo de co-localização desses marcadores foi observado em núcleos fornicaais. Contudo, a ausência total de co-existência em outros núcleos e divisões hipotalâmicas, sugere que tanto a CalR quanto a NADPH-diaforase estão relacionadas a diferentes funções

compartilhadas por populações neuronais hipotalâmicas muito restringidas (Arévalo *et al.*, 1993).

Estudos recentes tentando encontrar uma possível co-existência de NADPH-diaforase com as CaBPs Calb, PV e CalR nos neurônios pontinos de rato (Dun *et al.*, 1995), assim como na asta dorsal superficial a nível do sistema nervoso periférico (Ren & Ruda, 1994) também apresentaram resultados negativos.

Conseqüentemente, e contrário as hipóteses segundo as quais neurônios contendo NO assim como aqueles positivos para as CaBPs Calb, PV e CalR deveriam estar relativamente preservados nas doenças neurodegenerativas, sendo seu nível de preservação directamente proporcional ao nível de concentração desses fatores (sendo que as experiências nesse sentido baseadas em análises immuno e histoquímicas descritas no texto parecem reforzar essas hipóteses), os resultados descritos nos parágrafos anteriores sugerem que a evidência de as proteínas ligantes de cálcio estarem em neurônios que não contêm óxido nítrico nas regiões analisadas pode ser tomado como regra para todo o sistema nervoso. De fato, estudos recentes sugerem que os verdaderos níveis e funções dessas substâncias, particularmente Calb e PV não são fielmente refletidos pelas técnicas baseadas na immuno-reatividade celular (Iacopino & Christakos, 1992; Hof & Morrison, 1991).

Baseados nesses critérios, atuais estudos em doenças neurodegenerativas sugerem que, utilizando diversos protocolos de Western blot, PCR, DNA recombinante e outros similares (Appel *et al.*, 1994), se tente caracterizar a expressão génica dos alvos específicos do cálcio intracelular (como a NOS), assim como das CaBPs e outros mensajeros intracelulares (NO, por exemplo), e seu papel na modulação do limiar para a morte neuronal, além de evidenciar se estes sistemas diferenciais são complementares ou mutuamente excludentes.

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho caracterizou propriedades das técnicas imuno e histoquímicas para NADPH-diaforase e CaBPs, as quais se mostraram consistentes com outros trabalhos realizados sobre o assunto. Os padrões de marcação obtidos, tanto no que faz referência à localização, como à intensidade da coloração e morfologia celular (pericários e processos), foram apropriados para os objetivos propostos e coincidentes com aqueles já descritos, demonstrando-se assim a validade e adequação dos experimentos realizados.

Por meio dos experimentos de marcação dupla demonstrou-se que a NADPH-diaforase e as CaBPs não apresentaram co-localização no cérebro de camundongos. Estes achados sugerem que estes dois sistemas, o da NADPH-diaforase e CaBPs, apesar de estarem envolvidos em processos neuronais fisio-patológicos similares, estão presentes em populações neurais diferentes, cuja contribuição nesses processos patológicos pode ser complementar.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACSÁDY, L., HALASY, K., FREUND, T.F. Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus-III. Their inputs from the median raphe and medial septal nuclei. Neuroscience, 52: 829-41, 1993.

AISAKA, K., GROSS, S.S., GRIFFITH, O.W., LEVI, R. N<sup>G</sup>-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure *in vivo*?. Biochem. Biophys. Res. Commun., 160: 881-6, 1989.

AISAKA, K., GROSS, S.S., STEIBERG, C., GRIFFITH, O.W., LEVI, R. N<sup>G</sup>-monomethyl -L-arginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, abbreviates acetylcholine-induced vasodilatation in the guinea-pig. In: Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System, (eds) S. Moncada and E.A. Higgs, 1990. Elsevier, Amsterdam. p. 379-84.

ALONSO, JR., ARÉVALO, R., PORTEROS, A., BRINON, J.G., LARA, J., AIJON, J. Calbindin D-28k and NADPH-diaphorase activity are localized in different populations of periglomerular cells in the rat olfactory bulb. J. Chem. Neuroanat., 6: 1-6, 1993.

ANDRESSEN, C., BLUMCKE, I., CELIO, M.R. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. Cell. Tissue Res., 217: 181-208, 1993.

- ANDRESSEN, C., BLUMCKE, I., CELIO, M.R. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. Cell. Tissue Res., 217: 181-208, 1993.
- APPEL, S.H., SMITH, R.G., ALEXIANU, M., ENGELHART, J., MOSSIER, D., COLOM, L., STEFANI, E. Neurodegenerative disease: autoimmunity involving calcium channels. Ann. NY. Acad. Sci., 747: 183-194, 1994.
- ARAI, M., MAEDA, T., ARAI, R., SASAMOTO, K., KANI, K., DEURA, S., JACOBOWITZ, D. Appearance for calbindin-immunoreactive neurons in the upper layers of the rat superior colliculus after eye enucleation. Brain Res., 613: 341-6, 1993.
- ARAÚJO, R., FARO, L., NASCIMENTO, J.L.M., OUCABÇO-DINIZ, C.W., QUARESMA, J. Neurônios da área 17 do córtex visual humano e do macaco-de cheiro revelados por histoquímica para NADPH-diaforase. In: Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental. 6., 1991. Resumos. p. 34.
- ARÉVALO, R., SÁNCHEZ, F., ALONSO, JR., RUBIO, M., AIJON, J., VÁSQUEZ, R. Infrequent cellular coexistence of NADPH-diaphorase and calretinin in the neurosecretory nuclei and adjacent areas of the rat hypothalamus. J. Chem. Neuroanat., 6: 335-41, 1993.
- ASHLEY, C.C., SIMPSON, A.W., SUPATTAPONE, S. Endothelin increases intracellular calcium levels in cultured rat cerebellar glial cells. J. Physiol., 417: 72P, 1989.



- BEAL, M.F., KOWALL, N.W., ELLISON, D.W., MAZURERK, M.F., SWARTZ, K.J., MARTIN, J.B. Replication of neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. Nature., 321: 168-71, 1986.
- BEN-ARI, Y., ANIKSZTEJN, L., BREGESTOVISKI, P. Protein Kinase C modulation of NMDA currents: an important link for LTP induction. TINS., 15: 333-9, 1992.
- BLANKFELD, G.V., VERKHRATSKY, A.N., KETTENMANN, H. Ca<sup>2+</sup> channel expression in the oligodendrocyte lineage. Eur. J. Neurosci., 4: 1035-48, 1992.
- BLAXTER, T.J., CARLEN, M.F., DAVIES, M.F., KUTJAN, P.W. Gamma-aminobutyric acid hyperpolarizes rat hippocampal pyramidal cells through a calcium-dependent potassium conductance. J. Physiol., 373: 181-194, 1986.
- BLÜMKE, I., WERUAGA, E., KASAS, S., HENDRICKSON, A.E. CELIO, M.R. Discrete reduction patterns of parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivity in the dorsal geniculate nucleus and the striate cortex of adult macaque after monocular enucleation. Vis. Neurosc., 11: 1-12, 1994.
- BÖHME, G.A., BON, C., STUTZMANN, J.M., DOBLE, A., BLANCHARD J.Ch. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. Eur. J. Pharmacol., 199: 379-81, 1991.
- BOLAM, J.P., INGHAM, C.A., IZZO, P.N., LEVEY, A.I., RYE, D.B., SMITH, A.D., WAINER, B.H. Substance P-containing terminals in synaptic contact

- BÖHME, G.A., BON, C., STUTZMANN, J.M., DOBLE, A., BLANCHARD J.Ch.  
Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. Eur. J. Pharmacol., 199: 379-81, 1991.
- BOLAM, J.P., INGHAM, C.A., IZZO, P.N., LEVEY, A.I., RYE, D.B., SMITH, A.D., WAINER, B.H. Substance P-containing terminals in synaptic contact with cholinergic neurons in the neostriatum and basal forebrain: a double immunocytochemical study in the rat. Brain. Res., 397: 279-89, 1986.
- BON, C., BÖHME, G.A., DOBLE, A., STUTZMANN, J.M., BLANCHARD, J.Ch.  
A role of nitric oxide in long term potentiation. Eur. J. Neurosc., 4: 420-4, 1992.
- BOORSMA, D.M. Conjugation methods and biotin-avidin systems. In: G.R. Bullo & P. Petrusz (eds): Immunocytochemistry., 2: 156-174, 1989.
- BRANDEN, C., TOOZE, J. Introduction to protein structure. Garland Publishing, Inc., 1991, New York, p. 11-84.
- BRAUER, K., SCHÖBER, A.L., WOLF, J.R., WINKELMANN., LUPPA, H., LUTH H.J., BOTTCHE, H. Morphology of neurons in the rat basal forebrain nuclei: comparison of NADPH-diaphorase histochemistry and immunohistochemistry of glutamic acid decarboxylase, choline acetyltransferase, somatostatin and parvalbumin. J. Hirnforsch., 32: 1-17, 1991.
- BREDT, D.S., SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86: 9030-3, 1989.

- BREDT, D.S., HWANG, P.M., GLATT, C.E., LOWENSTEIN, C., REED, R.R., SNYDER, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P<sub>450</sub> reductase. Nature, 351: 714-8, 1991.
- BREDT, D.S., SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. Neuron, 8: 3-11, 1992.
- BRITTO, L.R.G., GOBERSZTEJN, F., KARTEN, H.J., COX, K. Depletion and recovery of the calcium-binding proteins calbindin and parvalbumin in the pigeon optic tectum following retinal lesions. Brain Res., 661: 289-92, 1994.
- BRÜNING, G. Localization of NADPH-diaphorase histochemistry in the macaque striate cortex. J. Comp. Neurol., 251: 338-97, 1986.
- BRÜNING, G. Localization of NADPH-diaphorase in the brain of the chicken. J. Comp. Neurol., 334: 192-208, 1993.
- BUSSE, R., TROGISCH, G., BASSENGE, E. The role of endothelium in the control of vascular tone. Basic Res. Cardiol., 80: 475-90, 1985.
- CASPAR RÜEGG, J. Calcium in muscle contraction. Spring Verlag. 1992, pp. 239-287.
- CELIO, M.R. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. Neuroscience., 35: 373-475, 1990.

CELIO, M.R., NORMAN A.W. Nucleus basalis Meynert neurons contain the vitamin D-induced calcium-binding protein (Calbindin D-28k). Anat. Embryol., 173: 143-8, 1985.

CHUN, J.J.M., SHATZ, C.J. Interstitial cells of the adult neocortical white matter are the remnant of the early generated subplate neuron population. J. Comp. Neurol., 282: 555-69, 1989.

COBCROFT, M., VACCARO, T., MITROFANIS, J. The distribution of NADPH-diaphorase neurons in the retinae of the rat, guinea pig and rabbit. Neurosci. Lett. Suppl., 34: 572, 1989.

COBCROFT, M., VACCARO, T., MITROFANIS, J. Distinct patterns of distribution among NADPH-diaphorase neurons of the guinea pig retina. Neurosc. Lett., 103: 1-7, 1989.

COCKS, T.M., ANGUS, J.A., CAMPBELL, J.H., CAMPBELL, G.R. Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture. J. Cell. Physiol., 123: 310-20, 1985.

CURRAN, R.D., BILLIAR, T.R., STUEHR, D.J., HOFMANN, K., SIMMONS, R.L. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products from Kupffer cells. J. Exp. Med., 170: 1769-74, 1989.

DaCOSTA, T.C. Análise comparativa da atividade da enzima NADPH-diaphorase no córtex estriado de roedores e primatas da Amazônia, Belém, 1994. Centro de Ciências Biológicas. Univ. Federal do Pará.

- DaCOSTA, ET., PICANÇO-DINIZ, C.W., SILVA, A.L.C. Marcadores celulares (*Villa villosa*, NADPH-diaforase) na área 17 do córtex visual de *Dasyprocta agouti*. In: Reunião da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 8., 1993. Resumos. p.29.
- DAWSON, T.M., BREDT, D.S., FOTUHI, M., HWANG, P. M., SNYDER S.H. Nitric Oxide Synthase and neuronal NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 7797-7801, 1991.
- DAWSON, V.L., DAWSON, T.M., LONDON, E.D., BREDT, D.S., SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 6368-71, 1991.
- DeFELIPE, J., HENDRY, S.H., HASHIKAWA, T., MOLINARI, M., JONES, E.G. Microcolumnar estrutura of monkey cerebral cortex revealed by immunocytochemical studies of double bouquet cells axons. Neuroscience., 37: 655-73, 1989a.
- DeFELIPE, J., HENDRY, S.H., JONES, E.G. Synapses of double bouquet cells in monkey cerebral cortex visualized by calbindin immunoreactivity. Brain Res., 503: 49-54, 1989b.
- DeFELIPE, J., JONES, E.G. High-resolution light and electron microscopic immunocytochemistry of colocalized gaba and calbindin D-28k in somata and double bouquet cell axons of monkey somatosensory cortex. Eur. J. Neurosci., 4: 46-60, 1992.

- DIZHARR, A.M., RAY, S., KUMAR, S., NIEMI, G., SPENCER, M., BROLLEY, D., WALSH, K.A., PHILIPOX, P.P., HURLEY, J.B., STRYER, L. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. Science, 251: 915-18, 1991.
- DOMENICI, L., WALDVOGEL, H.S., MATUTE, C., STREIT, P. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the pigeon brain. Neurosci., 25: 931-950, 1988.
- DOWNES, M.J., EDWARDS, M.W., ELSEY, T.S., WALTERS, C.L. Determination of a non-volatile nitrosamine by using denitrosation and a chemiluminescence analyser. Analyst, 101: 746-8, 1976.
- DUN, N.J., DUN, S.L., HWANG, L.L., FORSTERMANN, U. Infrequent co-existence of nitric oxide synthase and parvalbumin, calbindin and calretinin immunoreactivity in rat pontine neurons. Neurosci. Lett., 191: 165-8, 1995.
- EAST, S.J., GARTHWAITE, J. Nanomolar N<sup>G</sup>-nitroarginine inhibits NMDA-induced cyclic GMP formation in rat cerebellum. Eur. J. Pharmacol., 184: 311-13, 1990.
- EAST, S.J., GARTHWAITE, J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. Neurosci. Lett., 123: 17-9, 1991.
- ELLISON, D.W., KOWALL, N.W., MARTIN, J.B. Subset of neurons characterized by the presence on NADPH-diaphorase in human substantia innominata. J. Comp. Neurol., 260: 233-45, 1987.

- FERRANTE, R.J., KOWALL, N.W., BEAL, M.F., RICHARDSON, E.P. Jr., BIRD, E.D., MARTIN, J.B. Seletive sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. Science, 230: 561-63, 1985.
- FERRANTE, R.J., KOWALL, N.W., BEAL, M.F., MARTIN, J.B., BIRD, E.D., RICHARDSON, E.P. Morfologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. J. Neuropat. Exp. Neurol., 46: 12-27, 1987.
- FERRANTE, R.J., KOWALL, N.W., CIPOLLONI, P.B., STOREY, E., BEAL, M.F. Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. Experimental Neurol., 119: 46-71, 1993.
- FISHER, C.M., KISTLER, J.P., DAVIS, J.M. The correlation of cerebral vasospasm and the amount of subarachnoid blood detected by coomputerized cranial tomography after aneurysm rupture. In: Cerebral Artery Spasm, (eds) R.H. Wilkins, 1981, Williams and Wilkins, Baltimore, 397-408.
- FÖRSTERMANN, U., SCHMIDT, H.H.H.W., POLLOCK, J.S., SHENG, H., MITCHELL, J.A., WARNER, T.D., NAKAME, M., MURAD, F. Isoforms of Nitric Oxide Synthase. Biochem. Pharmacol., 42: 1849-57, 1991.
- FRANCA, J.G. NADPH-diaphorase no córtex visual do o macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*): Atividade histoquímica nas Áreas 17 e 18. Tese de Mestrado. Rio de Janeiro, UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho; Univ. Federal do Pará, Museu Paraense Emilio Goeldi, 1993.

- FRIEDE R.L., FLEMING, L.M. A mapping of oxidative enzymes in the human brain. J. Neurochem., 9: 179-98, 1962.
- FRIEDLANDER, M.J., MONTAGUE, P.R., HESTER, F., MARCHASE, R.B. Role of nitric oxide in NMDA-receptor mediated release of neurotransmitter in visual cortex. Soc. Neurosci. Abstr., 18 (Part 1): p. 210, 1992.
- FURGHGOTT, R.F. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. Annu. Rev. Pharmacol Toxicol., 24: 175-97, 1984.
- GALLY, J.A., MONTAGUE, G.N., REEK, G.N., EDELMAN, G.M. 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. U.S.A., 87: 3547-51, 1990.
- GARDINER, S.M., COMPTON, A.M., BENNET, T., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. Persistent haemodynamic changes following prolonged infusions of N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) in conscious rats. In: Nitric Oxide from L-arginine: A Bioregulatory System. (eds) S. Moncada and E.A. Higgs, 1990c, Elsevier, Amsterdam, p. 489-91.
- GARTHWAITE, J & BALÁZS, R. Supersensitivity to the cyclic GMP response to glutamate during cerebellar maturation. Nature, 275: 328-9, 1978.
- GARTHWAITE, J., CHARLES, S.L., CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. Nature, 336: 386-8, 1988.



GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the system nervous. TINS., 14: 60-7, 1991.

GERFEN, C.R. Substance P (neurokinin-I) receptor mRNA is selectively expressed in cholinergic neurons in the striatum and basal forebrain. Brain Res., 556: 165-70, 1991.

GERMAN, D.C., BRUCE, G., HERSH, L.B. Immunohistochemical staining of cholinergic neurons in the human brain using a polyclonal antibody to human choline acetyltransferase. Neurosci. Lett., 61: 1-5, 1985.

GEULA, C., TOKUNO, H., HERSH, L.B. Immunohistochemical staining of cholinergic neurons in the human brain using a polyclonal antibody to human choline acetyltransferase. Neurosci. Lett., 61: 1-5, 1990.

GEULA, C., SCHATZ, C.R., MESULAM, M.M. Differential localization of NADPH-diaphorase and Calbindin D-28k within the cholinergic neurons of the basal forebrain, striatum and brainstem in the rat, monkey, baboon and human. Neuroscience., 54: 461-76, 1993.

GIBSON, Q.H., ROUGHTON, F.J.W. The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin. J. Physiol., 136: 507-526, 1957.

GLOOR, P. Role of amigdala in temporal lobe epilepsy. In J. Aggleton (ed): The Amigdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction. New York, 1992, Wiley-Liss, p. 505-38.

- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 4<sup>th</sup> ed. MacMillan, New York, 1970, p.
- GRAYBIEL, A.M., RAGSDALE, C.W.Jr., YONEOKA, E.S., ELDE, R.P. An immunohistochemical study of enkephalins and other neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that the opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with the striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining. Neuroscience, 6: 377-97, 1981.
- GRAYBIEL, A.M., RAGSDALE, C.W.JR. Biochemical anatomy of the striatum. In EMSON, P.C. ed. Chem. Neuroanat., New York: Raven Press, 1983. p. 427-504.
- GRAYBIEL, A.M. Correspondence between the dopamine islands and striosomes of the mammalian striatum. Neuroscience, 13: 1157-87, 1984.
- GREENBERG, L.H., TROYER, E., FERRENDELLI, J.A., WEISS, B. Enzymatic regulation of the concentration of cyclic GMP in mouse brain. Neuropharmacology, 17: 737-45, 1978.
- GRIFFITH, T.M., EDWARDS, D.H., LEWIS, M.J., NEWBY, A.C., HENDERSON, A.H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. Nature, 308: 645-7, 1984.
- GRYGLEWSKI, R.J., MONCADA, S., PALMER, R.M.J. Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. Br. J. Pharmacol., 87: 685-94, 1986a.

- HALASY, K., MIETTINEN, R., SZABAT, E. FREUND, T.F. GABAergic interneurons are the major postsynaptic targets of median raphe afferents in the rat dentate gyrus. Eur. J. Neurosci., 4: 144-53, 1992.
- HALLANGER, A.E., LEVEY, A.I., LEE, H.J., RYE, D.B., WAINER, B.H. The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. J. Comp. Neurol., 262: 105-24, 1987.
- HALLANGER, A.E., WAINER, B.H. Ascending projections from the pedunculo pontine tegmental nucleus and adjacent mesopontine tegmentum in the rat. J. Comp. Neurol., 274: 483-515.
- HAMANO, K., KIYAMA, H., EMSON, P.C., MAWABE, K., NAKAUCHI, M., TOHYAMA, M. Localization of two calcium binding proteins, calbindin (28 kD) and parvalbumin (12 kD) in the vertebrate retina. J. Comp. Neurol., 302: 417-424, 1990.
- HAMASSAKI-BRITTO, D.E., BRZOZOWSKA-PRECHTL, A., KARTEN, H.J., LINDSTROM, J. AND KEYSER, K.T. Gaba-like immunoreactive cells containing nicotine acetylcholine receptors in the chick retina. J. Comp. Neurol., 313: 394-408, 1991.
- HAMASSAKI, D.E., BRITTO, L.R.G. Thalamic origin of neuropeptide Y innervation of the accessory optic nucleus of the pigeon (*Columbia Livia*). Vis. Neurosci., 5: 249-59, 1990.
- HEIZMAN, C.W., BRAUN, K. Changes in Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in human degenerative disorders. TINS, 15: 259-64, 1992.

HIBBS, J.B. JR., VAURIN, Z., TARINTOR, R.R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. J. Immunol., 138: 550-65, 1987.

HIBBS, J.B.J., TAINTOR, R.R., VAVRIN, Z., GARNGER, D.L., DRAPIER, J.C., AMBER, I.J., LANCASTER, J.R. Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. In: MONCADA, S. & HIGGS, E.A. Nitric oxide from L-Arginine. A bioregulatory system. Amsterdam, Elsevier Sciences Publishers, 1989. p. 189-223.

HOF, P.R. & MORRISON, J.H. Neocortical neuronal subpopulations labeled by a monoclonal antibody to calbindin exhibit differential vulnerability in Alzheimer's disease. Exp. Neurol., 111: 293-301, 1991.

HOOPER, M.W., VOGEL, F.S. The limbic system in Alzheimer's disease. Am. J. Pathol., 85: 1-20, 1976.

HOPE, B.T., MICHAEL, G.J., KNIGGE, K.M., VINCENT, S.R. Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A., 88: 2811-14, 1991.

HORSBURGH, G.M., SEFTON, A.J. Cellular degeneration and synaptogenesis in the developing retina of the rat. J. Comp. Neurol., 263: 553-66, 1987.

HOSEY, M.M., LAZDUNSKI, M. Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. J. Membrane Biol., 104: 81-105, 1988.

HSU, SM., RAINER, L. FARNGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. J. Histochem. Cytochem., 29: 577-80, 1981.

IACOPINO, A.M., CHRISTAKOS, S. Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A., 87: 4078-82, 1990.

IACOPINO, A.M., CHRISTAKOS, S., GERMAN, D., SONSALLA, P.K., ALTAR, C.A. Calbindin D<sub>28k</sub>-containing neurons in animal models of neurodegeneration: possible protection from excitotoxicity. Mol. Brain Res., 13: 251-261, 1992.

IGNARRO, L.J., LIPPTON, H., EDWARDS, J.C., BARICOS, W.H., HYMAN, A.L., KADOWITZ, P.J., GRUETTER, C.A. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. J. Pharmacol. Exp. Ther., 218: 739-49, 1981.

IGNARRO, L.J., BYRNS, R.E., WOOD, K.S. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor its similarity to nitric oxide radical. In: VANHOUTE, P.M. ed. Vasodilatation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium. New York Press, 1988, New York, p. 427-36.

ITO, M. Long-term depression. Annu. Rev. Neurosci., 12: 85-102, 1989.

- KAISER, N. & EDELMAN, I.S. Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74: 638-642, 1977.
- KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSELL, T.M. (eds) Principles of Neural Science. 3<sup>th</sup> Elsevier Science Publishers B.V., New York, 1991.
- KELM, M., SCHRADER, J. Nitric oxide release from the isolated guinea-pig heart. Eur. J. Pharmacol., 155: 313-16, 1988.
- KIEDROWSKI, L., COSTA, E., WROBLEWSKI, J.T. Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. J. Neurohistochem., 58: 335-41, 1992.
- KIEDROWSKI, L., COSTA, E., WROBLEWSKI, J.T. In vitro interaction between cerebellar astrocytes and granule cells: a putative role for nitric oxide. Neurosci. Lett., 135: 59-61, 1992.
- KIERNAN, J.A. Histological & Histochemical methods: theory and practice. 2<sup>th</sup> ed. Pergamon Press. 1990. Oxford, England. p. 1-89; 235-366.
- KILBOURN, R.G., GROSS, S.S., JUBRAN, A., ADAMS, J., GRIFFITH, O.W., LEVI, R., LODATO, R.F. N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 3629-32, 1990.
- KINJO, N., SKINNER, R.D., POWELL, E.W. A study of NADPH-diaphorase positive septohippocampal neurons in rat. Neurosci. Res., 7: 154-58, 1989.

- KNOWLES, R.G., PALACIOS, M., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. 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. U.S.A., 86: 5159-62, 1989.
- KOH, J.Y. & CHOI, D.W. Cultured striatal neurons containing NADPH-d or acetylcholinesterase are selectively resistant to injury by NMDA receptor agonists. Brain Res., 446: 374-78, 1988.
- KOWALL, N.W., FERRANTE, R.J., BEAL, M.F., RICHARDSON JR, E.P., SOFRONIEV, M.V., CUELLO, A.C., MARTIN, J.B. Neuropeptide Y, somatostatin and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the human striatum: a combined immunocytochemical study. Neuroscience., 20: 817-28, 1987.
- KOWALL, N.W., BEAL, M.F. Cortical somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH-diaphorase neurons: Normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. Ann. Neurol., 23: 105-14, 1988.
- KUONEN, D.R., KEMP, M.C., ROBERTS, P.J. Demonstration and biochemical characterization of rat brain NADPH-dependent diaphorase. J. Neurochem., 50: 1017-25, 1988. Apud PANZICA, G.C., ARÉVALO, R., SANCHEZ, F., ALONSO, J.R., ASTE, N., VIGLIETTI-PANZICA, C., AIJÓN, J., VÁSQUEZ, R. 1994.
- KWON, N.S., NATHAN, C.F., STUERH, D.J. Reduced biopterin as a cofactor in the formation of nitrogen oxides by murine macrophages. J. Biol. Chem., 264: 20496-501, 1989.

- KOWALL, N.W., BEAL, M.F. Cortical somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH-diaphorase neurons: Normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. Ann. Neurol., 23: 105-14, 1988.
- KUONEN, D.R., KEMP, M.C., ROBERTS, P.J. Demonstration and biochemical characterization of rat brain NADPH-dependent diaphorase. J. Neurochem., 50: 1017-25, 1988. Apud PANZICA, G.C., ARÉVALO, R., SANCHEZ, F., ALONSO, J.R., ASTE, N., VIGLIETTI-PANZICA, C., AIJÓN, J., VÁSQUEZ, R. 1994.
- KWON, N.S., NATHAN, C.F., STUERH, D.J. Reduced biopterin as a cofactor in the feneration of nitrogen oxides by murine macrophages. J. Biol. Chem., 264: 20496-501, 1989.
- KWON, N.S., NATHAN, C.F., GILKER, C., GRIFFITH, O.W., MATTHEWS, F.E., STUEHR, D.J. L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase: the ureido oxygen derives from dioxygen. J. Biol. Chem., 265: 13442-5, 1990.
- LEVEY, A.I., BOLAM, J.P., RYE, D.B., HALLANGER, A.F., DEMUTH, R.M., MESULA, M.M., WAINER, B.H. A lighr and electron microscopic procedure for sequential double antigen localization using diaminobenzidine and benzidine dihydrochloride. J. Histochem. Cytochem., 34: 1449-57, 1983.
- MA, L., ISHIZAKI, Y., MORITA, I., MUROTA, S. Presence of nitric oxide synthase activity in the neurons of the rat embryonal cerebrum. Neurosci. Lett., 132: 23-5, 1991.



- MARLETTA, M.A., YOON, P.S., IYENGAR, R., LEAF, C.D., WISHNOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. Biochemistry, 27: 8706-11, 1988.
- MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: structure and mechanism. J. Biol. Chem., 268: 12231-34, 1993.
- MARTIN, W., SMITH, J.A., WHITE, D.G. The mechanisms by which haemoglobin inhibits the relaxation of rabbit aorta induced by nitrovasodilators, nitric oxide, or bovine retractor penis inhibitory factor. Br. J. Pharmacol., 89: 563-71, 1986.
- MARTÍNEZ, A., VICTORIA, J., STRUSTEGUI, J. Cytosolic free calcium levels increase with age in rat brain synaptosomes. Neurosci. Lett., 88: 336-42, 1988.
- MAYER, R.J., WALKER, J.H. Immunochemical methods in the biological sciences: enzymes and proteins. Academic Press, INC., New York, 1988. p. 126-168.
- MAYER, B., JOHN, M., HEINZEL, B., WERNER, E.R., WACHTER, H., SCHULTZ, G., BÖHME, E. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin- containing multi- functional oxido-reductase. FEBS Lett., 288: 187-91, 1991.
- MAYER, B., KLATT, P., BÖHME, E., SCHMIDT, K. Regulation of neuronal nitric oxide and cyclic GMP formation by  $Ca^{2+}$ . J. Neurochem., 59: 2024-29, 1992.

MESULAM, M.M., MUFSON, E.J., WAINER, B.H., LEVEY, A.I. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). Neuroscience., 10: 1185-1201, 1983.

MESULAM, M.M. Central cholinergic pathways: neuroanatomy and some behavioral implications. In Neurotransmitters and cortical function. (eds) M. Avoli, T.A. Reader, R.W. Dikes and P. Gloor. p. 273, 260. Plenum, New York, 1988.

MESULAM, M.M., MUFSON, E.J., LEVEY, A.I., WAINER, B.H. Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the Macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. Neuroscience., 12: 669-86, 1984.

MESULAM, M.M., GEULA, C. Nucleus basalis (Ch4) and cortical cholinergic innervation in the human brain observations based on the distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase. J. Comp. Neurol., 275: 216-40, 1988.

MESULAM, M.M., GEULA, C., BOTHWELL, M.A., HERSH, L.B. Human reticular formation cholinergic neurons of the pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei and some cytochemical comparisons to forebrain cholinergic neurons. J. Comp. Neurol., 281: 611-33, 1989.

MICHELSON, H.B., WONG, R.K.S. Excitatory synaptic responses mediated by GABA-A receptors in the hippocampus. Science, 253: 1420-22, 1991.

MITROFANIS, J. Development of NADPH-diaphorase cells in the rat's retina. Neurosci. Lett., 102: 165-72, 1989.

MITROFANIS, J., ROBINSON, S.R., ASHWELL, K. Development of catecholaminergic, indoleamine-accumulating and NADPH-diaphorase amacrine cells in rabbit retinae. J. Comp. Neurol., 319: 560-85, 1992.

MIZE, R.R., JEON, C.J., BUTLER, G.D., LUO, Q., EMSON, P.C. The calcium binding protein calbindin-D28k reveals subpopulations of projection and interneurons in the cat superior colliculus. J. Comp. Neurol., 320: 243-46, 1991.

MIZE, R.R., LUO, Q., BUTLER, G., JEON, C.J., NABORS, B. The calcium-binding proteins parvalbumin and calbindin-D28k form complementary patterns in the cat superior colliculus. J. Comp. Neurol., 320: 247-256, 1992a.

MIZE, R.R., LUO, Q. Visual deprivation fails to reduce calbindin D-28k or GABA immunoreactivity in the Rhesus monkey superior colliculus. Visual Neurosci., 9: 157-168, 1992.

MIZE, R.R., LUO, Q., TIGGES, M. Monocular enucleation reduces immunoreactivity to the calcium-binding protein calbindin 28 kD in the Rhesus monkey lateral geniculate nucleus. Vis. Neurosci., 9: 471-82, 1992.

MONCADA, S., PALMER, R.M.J., GRYGLEWSKI, R.J. Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 9164-68, 1986a.

- MIZE, R.R., LUO, Q. Visual deprivation fails to reduce calbindin D-28k or GABA immunoreactivity in the Rhesus monkey superior colliculus. Visual Neurosci., 9: 157-168, 1992.
- MIZE, R.R., LUO, Q., TIGGES, M. Monocular enucleation reduces immunoreactivity to the calcium-binding protein calbindin 28 kD in the Rhesus monkey lateral geniculate nucleus. Vis. Neurosci., 9: 471-82, 1992.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J., GRYGLEWSKI, R.J. Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 9164-68, 1986a.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. Generation of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor from endothelial cells. In Biology and Pathology of Platelet-Vessel Wall Interactions, (eds) G. Jolles, J.Y. Legrand, and A. Nurden, Academic Press, 1986b, London, p. 289-304.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. Biochem. Pharmacol., 38: 1709-15, 1989.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Rev., 43: 109-142, 1991.
- MORTON, A.J., NICHOLSON, L.F.B., FAULT, R.L.M. Compartmental loss of NADPH-diaphorase in the neuropil of the human striatum in Huntington's disease. Neuroscience., 53: 159-68, 1993.

- NOWIKY, J.P., DUVAL, D., POIGNET, H., SCATTON, B. Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. Eur. J. Pharmacol., 204: 339-40, 1991.
- OKADA, D. Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor mediated nitric oxide synthesis. J. Neurochem., 59: 1203-10, 1992.
- PALACIOS, M., KNOWLES, R.G., PALMER, R.M.J. AND MONCADA, S. Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 802-9, 1989.
- PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, 327: 524-6, 1987.
- PALMER, R.M.J., MONCADA, S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 158: 348-352, 1989.
- PASTEELS, B., PARMENTIER, M., LAWSON, E.M., VERSTAPPEN, A., POCHET, R. Calcium binding protein immunoreactivity in pigeon retina. Invest. Ophthalm. & Visual Science., 28: 658-64, 1987.
- PASTEELS, B., ROGERS, J., BLANCHIER, F., POCHET, R. Calbindin and calretinin localization in the retina from different species. Visual Neurosci., 5: 1-16, 1990.

- PEARSE, A.G.E. Histochemistry. theoretical and applied. 4<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, 1985, London, England. p. 874-928.
- PICANÇO-DINIZ, C.W., do NASCIMENTO, J.L.M., FRIEDLANDER, M.J. Histochemical evaluation of nitric oxide synthase levels in guinea pig visual cortex after L-nitroarginine administration *in vivo* and *in vitro*. Assoc.Res. Vision Ophthalmol. Visual Sci., 34: 1175, 1993a.
- PINCHING, A.J., POWELL, T.P.S. The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. J. Cell Sci., 9: 305-45, 1971.
- PITKÄNEN, A., AMARAL, D.G. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the monkey temporal lobe: the amigdaloid complex. J. Comp. Neurol., 331:14-36, 1993a.
- PITKÄNEN, A., AMARAL, D.G. Distribution of calbindin-D<sub>28k</sub> immunoreactivity in the Monkey temporal lobe: the amygdaloid complex. J. Comp. Neurol., 331: 199-224, 1993.
- POCHET, R., PASTEELS, B., SETO-OHSHIMA, A., BASTIANELLI, E., KITAJIMA, S., VAN ELDIK, L.J. Calmodulin and calbindin localization in retina from six species. J. Comp. Neurol., 14: 750-62, 1991.
- PUTNEY, J.W.Jr. Capacitative calcium entry revisited. Cell Calcium, 11: 611-624, 1990.

- RADOMSKI, M.W., PALMER R.M.J., MONCADA, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. Br. J. Pharmacol., 92: 181-7, 1987a.
- RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. Br. J. Pharmacol., 92: 639-46, 1987b.
- RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. Biochem. Biophys. Res. Commun., 148: 1482-9, 1987c.
- RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. Lancet, 2: 1057-8, 1987d.
- RADOMSKY, M.W., PALMER, R.M.J., READ, N.G., MONCADA, S. Isolation and washing of human platelets with nitric oxide. Thromb. Res., 50: 537-46, 1988.
- RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 10043-7, 1990c.
- REES, D.D., PALMER, R.M.J., SCHULZ, R., HODSON, H.F., MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. Br. J. Pharmacol., 101: 746-52, 1990c.

- REES, D.D., SCHULZ, R., HODSON, H.F., PALMER R.M.J., MONCADA, S.  
Identification of some novel inhibitors of the vascular nitric oxide synthase *in vivo* and *in vitro*. In: Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System. (eds) S.Moncada and E.A. Higgs, Elsevier, Amsterdam, 1990d, p.485-7.
- REISER, G. Endothelin and a  $Ca^{2+}$  ionophore raise cyclic GMP levels in a neuronal cell line via formation of nitric oxide. Br. J. Pharmacol., 101: 722-6, 1990.
- REN, K & RUDA, M.A. A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. Brain Res. Rev., 1995.
- ROHRENBECK, J., WÄSSLE, H., HEIZMAN, C. Immunocytochemical labeling of horizontal cells in mammalian retina using antibodies against calcium-binding proteins. Neurosci. Lett., 77: 255-60, 1987.
- RUBANYI, G.M., ROMERO, J.C., VANHOUTTE, P.M. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines. Am. J. Physiol., 249: H95-H101, 1985.
- RUBANYI, G.M., ROMERO, J.C., VANHOUTTE, P.M. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. Am. J. Physiol., 250: H1145-H1149, 1986.
- SAGAR, S.M. NADPH-diaphorase histochemistry in the rabbit retina. Brain. Res., 373: 153-8, 1986.



- SAGGU, H., COOKSEY, J. DEXTER, D., WILLS, F.R., LEES, A., JENNER, P., MARSDEN, C.D. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in Parkinsonian substantia nigra. J. Neurochem., 53: 692-97, 1989.
- SANDELL, J.H. NADPH-diaphorase cells in the mammalian inner retina. J. Comp. Neurol., 238: 466-72. 1985.
- SANDELL, J.H. NADPH-diaphorase histochemistry in the Macaque striate cortex. J. Comp. Neurol., 251: 388-97, 1986.
- SANDELL, J.H., GRAYDIEL, A.M., CHESSELET, M.F., A new enzyme marker for striatal compartmentalization: NADPH-diaphorase activity in the caudate and putamen of the cat. J. Comp. Neurol., 243, 1986.
- SANNA, P.P., KEYSER, K.T., BATTENBERG, E., BLOOM, F.E. Parvalbumin immunoreactivity in the rat retina. Neurosci. Lett., 118: 136-9, 1990.
- SANNA, P.P., KEYSER, K.T., CELIO, M.R., KARTEN, H.J., BLOOM, F.E. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the vertebrate retina. Brain Res., 600: 141-50, 1993.
- SATOH, K., FIBIGER, H.C. Distribution of central cholinergic neurons in the baboon (*Papio papio*). II. A topographic atlas correlated with catecholaminergic neurons. J. Comp. Neurol., 236: 215-33, 1985.
- SATOH, K., FIBIGER, H.C. Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: efferent and afferent connections. J. Comp. Neurol., 253: 277-302, 1986.

- SATO, T. 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: 141-46.
- SCHERER-SINGLER, U., VINCENT, S.R., KIMURA, H., McGEER, E.G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. J. Neurosci. Meth., 9: 229-34, 1983.
- SCHMIDT, H.H.H.W., SEIFERT, R., BOHME, E. Formation and release of nitric oxide from human neutrophil and HL-60 cells induced by chemotactic peptide, platelet activated factor and leukotriene B<sub>4</sub>. FEBS Lett., 244: 357-60, 1989a.
- SCHMIDT, H.H.H.W., WILKE, P., EVERS, B., BOHME, E. Enzymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol. Biochem. Biophys. Res. Commun., 165: 284-91, 1989b.
- SCHMIDT-KASTNER, R., MELLER, D., EYSEL, U.T. Immunohistochemical changes of neuronal calcium-binding proteins paralbumin and calbindin-D28k following unilateral deafferentation in the rat visual system. Experimental Neurol., 117: 230-46, 1992.
- SCHMIDT, H.H.H.W., SMITH, R.M., NAKANE, M., MURAD, F. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent NO synthase Type I: A biopteroflavoprotein with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-independent diaphorase and reductase activities. Biochemistry, 31: 3243-9, 1992.

- SCHUMAN, E.M., MADISON, D.V. Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. Science, 263: 532-6, 1994.
- SEGAL, M. Serotonin attenuates a slow inhibitory postsynaptic potential in rat hippocampal neurons. Neuroscience, 36: 631-41, 1990.
- SHIBUKI, K., OKADA, D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. Nature, 349: 326-8, 1991.
- SNYDER, S.H., BREDET, D.S. Biological roles of nitric oxide. Scientific Am., 266: 28-35. 1992.
- SOMLYO, A.V., GONZALEZ-SERRATOS, H., SHUMAN, H., McCLELLAN, G., SOMLYO, A.P. Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: an electron-probe study. J. Cell Biol., 90: 577-94, 1981.
- SOUTHAM, E., EAST, S.J., GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid receptors coupled to the nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. J. Neurochem., 56: 2072-81, 1991.
- STANDAERT, D.G., SAPER, C.B., RYE, D.B., WAINER, B.H. Colocalization of atriopeptin-like immunoreactivity with choline acetyltransferase- and substance P-like immunoreactivity in the pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei in the rat. Brain Res., 382: 163-8, 1986.

- SOUTHAM, E., EAST, S.J., GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid receptors coupled to the nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. J. Neurochem., 56: 2072-81, 1991.
- STANDAERT, D.G., SAPER, C.B., RYE, D.B., WAINER, B.H. Colocalization of atriopeptin-like immunoreactivity with choline acetyltransferase- and substance P-like immunoreactivity in the pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei in the rat. Brain Res., 382: 163-8, 1986.
- STUEHR, D.J., KWON, N.S., NATHAN, C.F., GRIFFITH, O.W., N-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. J. Biol. Chem., 266: 6259-63, 1991.
- TAYEH, M.A., MARLETTA, M.A. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. J. Biol. Chem., 264: 19654-8, 1989.
- THE PARKINSON STUDY GROUP. Effect of deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. N. Engl. J. Med., 321: 1364-71, 1981.
- THOMAS, E., PEARSE, A.G.E., The solitary active cells. Histochemical demonstration of damage resistant cells with a TPN diaphorase reaction. Acta Neuropathol., 3: 238-49, 1964.
- TIGGES, M., TIGGES, J. Parvalbumin immunoreactivity of the lateral geniculate nucleus in the adult *Rhesus* monkeys after monocular eye enucleation. Vis. Neurosci., 6: 375-82, 1991.

- TOLINS, J., PALMER, R.M.J., MONCADA, S., RAIJ, L. Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic responses. Am. J. Physiol., 258: H665-H662, 1990.
- UEBARA-KUNUGI, Y., TERAJ, K., TANIGUCHI, T., TOOYAMA, I., KIMURA, H. Time course of *In Vitro* expression of NADPH-diaphorase histochemistry. Develop. Brain Res., 59: 157-62, 1991.
- UEMURA, Y., KOWALL, N.W., BEAL, M.F. Selective sparing of NADPH-diaphorase-somatostatin-neuropeptide Y neurons in ischemic gerbil striatum. Ann. Neurol. Am. Neurol. Assoc., 27: 620-25, 1990.
- UNGER, J.W., LANGE, W. NADPH-diaphorase-positive cell populations in the human amigdala and temporal cortex: Neuroanatomy, peptidergic characteristics and aspects of aging in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol., 83: 636-46, 1992.
- VANEY, DI., YOUNG, H.M. GABA-like immunoreactivity in NADPH-diaphorase amacrine cells of the rabbit retina. Brain Res., 474: 380-5, 1988.
- VENTURINI, C.M., KNOWLES, R.G., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. Synthesis of nitric oxide in the bovine retina. Biochem. Biophys. Res. Commun., 180: 920-4, 1991.
- VINCENT, SR., JOHANSSON, O., SKIRBOLL, L., HÖKFELT, T. Coexistence of somatostatin- and avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivities in striatal neurons which are selectively stained for NADPH-diaphorase activity.

In: Regulatory Peptides: From Molecular Biology to Function (eds) E. Costa and M. Trabucchi, 1982, p. 453-62. Raven Press, New York.

VINCENT, S.R., JOHANSSON, O. 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: 264-70, 1983.

VINCENT, S.R., JOHANSSON, O., HÖKFELT, T., SKIRBOLL, L., ELDE, R.P., TERENIUS, L., KIMMEL, J., GOLDSTEIN, M. NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivity. J. Comp. Neurol., 217: 252-63, 1983a.

VINCENT, S.R., SATOH, K., ARMSTRONG, D.M., FIBIGER, H.C. NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for the cholinergic neurons of the pontine reticular formation. Neurosci. Lett., 43: 31-36, 1983b.

VINCENT, S.R., SATOH, K. ARMSTRONG, D.M. FIBIGER, H. C. Substance P in the ascending cholinergic reticular system. Nature, 306: 688-91, 1983c.

VINCENT, S.R., STAINES, W.A., FIBIGER, H. C. Histochemical demonstration of separate populations of somatostatin and cholinergic neurons in rat striatum. Neurosci. Lett., 35: 111-4, 1983.

VINCENT, S.R., SATOH, K. ARMSTRONG, D.M., PANULA, P., VALE, W., GIBIGER, H.C. Neuropeptides and NADPH-diaphorase activity in the ascending cholinergic reticular system of the rat. Neuroscience, 17: 167-82, 1986.

VINCENT, S.R., HOPE, B.T. Neurons that say NO. TINS, 15: 108-13, 1992.

VINCENT, S.R., KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. Neuroscience, 46: 755-84, 1992.

VORHERR, T., KNÖPFEL, L., HOFMANN, F., MOLLNER, S. PFEUFFER, T., CARAFOLI, E. The calmodulin binding domain of nitric oxide synthase and adenylyl cyclase. Biochemistry, 32: 6081-88, 1993.

WALLACE, M.N., FREDENS, K. Relationship of afferent inputs to the lattice of high NADPH-diaphorase activity in the mouse superior colliculus. Exp. Brain Res., 78: 435-45, 1989.

WÄSSLE, H., CHUN, M.H., MÜLLER, F. Amacrine cells in the ganglion cell layer of the cat retina. J. Comp. Neurol., 265: 391-408, 1987.

WEIDMAN, T.A., KUWABARA, T. Postnatal development of the rat retina. Arch. Ophthalmol., 79: 470-84, 1968.

WILLIAMS TEXTBOOK OF ENDOCRINOLOGY. (eds) J.D. Wilson and D.W. Foster. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1992. p. 1712.

- WOOD, P.L., EMMET, M.R., RAO, T.S., CLER, J., MICK, S., IYENGAR, S. Inhibition of nitric oxide synthase blocks N-Methyl-D-Aspartate, Quisqualate-Kainate-, Harmaline and Pentylentetrazole-dependent increases in cerebellar cyclic GMP in vivo. J. Neurochem., 55: 346-8, 1990.
- WU, W. Expression of nitric oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH-diaphorase histochemistry. Experimental Neurol., 120: 153-9, 1993.
- YAMADA, T., McGEER, P.L., BAIMBRIDGE, K.G., McGEER, E.G. Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin D-28k. Brain Res., 526: 303-7. 1989.
- YAMAMOTO, R., BREDT, D.S., SNYDER, S.H., STONE, R.A. The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. Neuroscience, 54: 189-200, 1993.
- ZARAHN, E.D., YE, X., ADES, A.M., REAGAN, L.P. FLUHARTY, S.J. Angiotensin induced cyclic GMP production is mediated by multiple receptor subtypes and nitric oxide in N1E-115 neuroblastoma cells. J. Neurochem., 58: 1960-63, 1992.
- ZHU, X.Z., LUO, L.G. Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. J. Neurochem., 59: 932-935, 1992.



## ***ABSTRACT***

Both nitric oxide (NO) and calcium binding proteins (CaBPs) seem to be involved in some neuropathological processes. In this study, we sought to investigate if NO and CaBPs are colocalized in neurons of the mouse brain. Fourteen C57BL/6J mice were deeply anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde and their brains were processed for NADPH-diaphorase histochemistry to detect NO and also subjected to immunohistochemistry with antibodies against calbindin-28kD, parvalbumin and calretinin. Both fluorescence and peroxidase methods were employed. Colocalization of neuropeptide Y (NPY) with NOS was performed as intensity of staining control. NADPH-diaphorase neurons were seen in several brain regions, which include the cerebral cortex, basal amygdala, hippocampus, olfactory bulb, cerebellum and subcortical visual pathways. CaBPs were also distributed in many brain regions, some of which contained NADPH-diaphorase. However, no double-labeled cells were seen in the mouse brain, when considering diaphorase-positivity and either one of the CaBPs tested. These data suggest that despite the fact that NO and CaBPs appear to be involved in similar neuropathologies, they are present in different neuronal populations in the mouse brain and thus might participate in different neural processes.