

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**ESTUDO HODOLÓGICO E NEUROQUÍMICO DAS AFERÊNCIAS DA
REGIÃO NORADRENÉRGICA A5 AOS NEURÔNIOS DA RAIZ COCLEAR**

Marina Galleazzo Martins

Monografia apresentada ao
Instituto de Biociências de
Botucatu - UNESP, para obtenção
do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

BOTUCATU

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**ESTUDO HODOLÓGICO E NEUROQUÍMICO DAS AFERÊNCIAS DA
REGIÃO NORADRENÉRGICA A5 AOS NEURÔNIOS DA RAIZ COCLEAR**

Marina Galleazzo Martins

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Monografia apresentada ao
Instituto de Biociências de
Botucatu - UNESP, para obtenção
do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

BOTUCATU

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Martins, Marina Galleazzo.

Estudo hodológico e neuroquímico das aferências da região noradrenérgica
A5 aos neurônios da raiz coclear / Marina Galleazzo Martins. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Capes: 20604009

1. Ciclo estral. 2. Traçadores neuronais. 3. Inibição por estímulo prévio.
4. Imunohistoquímica. 5. Ratos Wistar. 6. Tronco encefálico.

Palavras-chave: Ciclo estral; Imunohistoquímica; Inibição por estímulo prévio;
Rato; Traçadores neuronais.

DEDICATÓRIA

Ao vô Lilo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, e mentor, Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior, que me ensinou das técnicas da bancada à Anatomia, da docência às lições de vida.

À Prof^a. Dr^a. Camila Contin Diniz de Almeida Francia, sempre solícita em nos auxiliar no desbravamento de novos caminhos e experimentos, e por emitir o parecer desse trabalho.

Aos meus pais, Henrique e Telma, que me ensinaram, desde pequena, o gosto pelos livros, pelas novas descobertas, pelo desejo de sempre crescer e aprender. Aqueles que apoiaram os finais de semana de experimentos, aguentaram os longos meses longe de casa e receberam-me de braços abertos sempre.

À irmã de alma que Botucatu me deu, Larissa, que fez esses quatro anos se tornarem mais alegres, divertidos, cheios de gordices, risadas e inesquecíveis. À Carla, pelo apoio, força e carinho nos momentos mais difíceis e, principalmente, nos melhores.

Ao Encontro Nacional de Biomedicina, pelos ensinamentos, desafios, aprendizados e presentes. Aos amigos que encontrei pelo caminho, que se tornaram especiais e essenciais ao longo dessa jornada: André, Amanda, Bianca, Bruno, Cristiane, Juliana, Lucas e Mayara.

Aos meus pedacinhos que deixei para trás quando me mudei, mas que levo todos os dias no meu coração e pensamento, Monique, Taiane e Thais, sem vocês, o caminho teria sido infinitamente mais difícil. Obrigada por apoiarem a maior mudança da minha vida.

Aos meus companheiros de laboratório, de café, de conversas e experimentos, André, Nicole e Rian.

Aos professores do Departamento de Anatomia que compartilharam comigo um pouco de sua experiência: Prof^a. Dr^a. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro, Prof^a. Dr^a. Raquel Fantin Domeniconi e Prof. Dr. Renato Ferreti.

Ao Prof. Titular Carlos Roberto Padovani pela colaboração no planejamento e análise estatística dos dados experimentais.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia e do Centro de Microscopia Eletrônica pela atenção e disposição.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro.

“Pas a pas, se va luènh.”

Provérbio occitano

RESUMO

Os neurônios da raiz coclear (CRN) localizam-se na parte coclear do nervo vestibulo-coclear e são os primeiros neurônios do sistema nervoso central a receberem a informação auditiva proveniente da cóclea, conectando-se com centros de integração sensoriomotora do tronco encefálico. Funcionalmente, os CRN estão envolvidos na via neural do reflexo auditivo de sobressalto (RAS) juntamente com os neurônios do gânglio espiral, o núcleo reticular caudal da ponte e os motoneurônios da medula espinal. No entanto, as aferências recebidas por eles são pouco conhecidas e ignoram-se suas funções no RAS e em uma de suas modulações, a inibição por estímulo prévio (PPI). As alterações na reação reflexa de sobressalto e em suas diferentes modulações possuem valor diagnóstico na clínica médica de enfermidades neurodegenerativas e psiquiátricas, como Parkinson e esquizofrenia. A origem e identidade neuroquímica das aferências aos CRN têm sido estudadas recentemente, porém nenhum estudo avaliou seu papel funcional. Entre elas, destaca-se a região noradrenérgica A5 que, em experimentos prévios, mostrou-se como grande fonte de aferências aos CRN. A confirmação dessas aferências e sua caracterização neuroquímica são o primeiro objetivo deste trabalho. Por outro lado, para avaliar o RAS e a PPI em animais de experimentação, é necessária a padronização de um protocolo adequado devido à ausência de dados na literatura que relacionem a eficiência das provas com os tipos de estímulos acústicos utilizados. Assim, o segundo objetivo desse trabalho é a padronização de um protocolo para mensuração do RAS e PPI frente a estímulos acústicos de diferentes frequências e intensidades. Os resultados provenientes desse estudo serão fundamentais para avaliação do RAS e da PPI antes e após a lesão seletiva da região noradrenérgica A5.

ABSTRACT

The coclear root neurons (CRN) are in the coclear portion of the vestibulococlear nerve and they are the first neurons in the central nervous system to receive auditory information from the coclea. They are conected with sensorimotor gating centers in the brainstem and take part in the pathway of the acoustic startle reflex (ASR), which is formed by spiral ganglion neurons, the reticular pontine caudal nucleus and the spinal cord motoneurons. However, the inputs to CRN are unknown and their roles in the ASR and its modulations as the prepulse inhibition (PPI) are ignored. The changes in the ASR and in PPI, can be used as diagnostic methods in neurodegenerative and psychiatric disorders, such as Parkinson and squizophrenia. The sources and neurochemical carachteristics of the afferents to CRN have been studied, but none has evalueted its funtional aspects. Between those sources of afferents, previus studies had identified the area of the noradrenergic group A5. The confirmation of this input source and its neurochemical identity are the first goal of this work. On the other hand, to evaluate the ASR and PPI in animal models, it is indispensable the standardization of a suitable protocol since there are not enough data that correlationate the efficiency of the measurements with the characteristics of stimuli used. Hence, the second goal of this work is to standardize a protocol for ASR and PPI measurement. The results provided will be essential for future experiments on the avaliation of selective lesions in the noradrenergic A5 group.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema da resposta reflexa do sobressalto acústico no rato.	12
Figura 2. Esquema do circuito neural elementar responsável pelo desencadeamento do reflexo auditivo de sobressalto no rato.	13
Figura 3. Esquema da inibição por estímulo prévio (PPI).	15
Figura 4. Esquema e fotomicrografia da raiz coclear.	16
Figura 5. Esquema das aferências aos CRN.	17
Figura 6. Mapeamento de neurônios retrogradamente marcados após a injeção de traçador retrógrado na raiz coclear.	19
Figura 7. Fotomicrografias do grupamento noradrenérgico A5 após injeção de Fluoro-Gold® (FG) nos CRN.	21
Figura 8. Foto do sistema de avaliação do sobressalto.	29
Figura 9. Audiograma do rato albino.	30
Figura 10. Fotomicrografias dos sítios de injeção de BDA e RD no grupamento A5.	37
Figura 11. Sítio de injeção de BDA no grupamento A5 no caso N122/2012.	38
Figura 12. Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal do grupamento A5 após injeção de BDA (N122/2012).	39
Figura 13. Fibras oriundas do grupamento A5 nos CRN.	40
Figura 14. Fotomicrografias da raiz coclear em microscopia confocal (N122/2012).	41
Figura 15. Fotomicrografia de fibras noradrenérgicas oriundas do grupamento A5 na raiz coclear (N122/2012).	42
Figura 16. Curvas de calibração dos estímulos acústicos nas duas câmaras de prova. ...	43
Figura 17. Gráfico da amplitude do sobressalto obtida nas sete sessões de mensuração configuradas, ao longo dos 14 dias de experimento.	44
Figura 18. Gráfico da porcentagem de respostas de sobressalto após a estimulação com o pré-pulso isoladamente.	45
Figura 19. Gráfico da porcentagem média de inibição do sobressalto provocada pelos dezoito pré-pulsos testados.	46
Figura 20. Gráfico da porcentagem de respostas válidas para as estimulações do pré-pulso seguido do pulso.	46
Figura 21. Gráficos da padronização dos pré-pulsos de 2kHz-85dB (1) e 4kHz-70dB (2) em 15 casos experimentais.	47
Figura 22. Fotomicrografias das fases do ciclo estral.	48

Figura 23. Gráfico da amplitude média do RAS ao longo dos 10 momentos de mensuração do reflexo.....	50
Figura 24. Gráfico da amplitude média do RAS nas diferentes fases do ciclo estral e suas transições.....	51
Figura 25. Gráfico da PPI média frente às diferentes fases do ciclo estral e suas transições.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das sessões configuradas (A-G) para padronização do protocolo de PPI com diferentes pré-pulsos.....	31
Tabela 2. Configuração de uma sessão típica utilizada para padronização do protocolo de PPI.....	31
Tabela 3. Características do pré-pulo, pulso e intervalo entre os estímulos em cada um dos blocos da sessão de PREPISI.....	34
Tabela 4. Intensidade e potência dos pré-pulsos utilizados na padronização do protocolo de mensuração da inibição por estímulo prévio.....	44
Tabela 5. Fases do ciclo estral estadiadas para cada um dos animais nos dias de mensuração do RAS e da PPI.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ A – micro-ampère	MVeMC – parte magnocelular do núcleo vestibular medial
μ m – micrômetro	MVPO – núcleo periolivar ventromedial
8cn – parte coclear do nervo vestibulo-coclear	NTS – núcleo do trato solitário
8vn – parte vestibular do nervo vestibulo-coclear	RAS – reflexo auditivo de sobressalto
A5 – grupamento noradrenérgico A5	RD - dextrano-tetrametilrodamina
BDA – dextrano amino biotinilado	P – proestro
Bo – complexo Bozinger	P-E – transição proestro-estro
CRN – neurônios da raiz coclear	PAG – substância cinzenta periaquedutal
Cu – núcleo cuneiforme	PCRt – núcleo reticular parvicelular
D - diestro	PnC – núcleo reticular caudal da ponte
DAB - 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto	PnO – núcleo reticular oral da ponte
dB – Decibel	PPI – inibição por estímulo prévio
DC – núcleo coclear dorsal	PPTg – núcleo pedunculopontino tegmental
DR – núcleo dorsal da rafe	RVL – núcleo rostroventrolateral
E – estro	s – segundo
E-M – transição estro-metaestro	SC – colículo superior
Eve – núcleo eferente vestibular	Sp5I – parte interpolar do núcleo espinal do trigêmeo
FG - Fluoro-Gold [®]	SPL – <i>sound pressure level</i> (nível de pressão de som)
GABA – ácido γ -aminobutírico	SpVe – núcleo vestibular espinal
I.A. – nível interaural	SuVe – núcleo vestibular superior
InCo – núcleo intercolicular	VCA – núcleo coclear ventral anterior
IRt – núcleo reticular intermédio	VCP – núcleo coclear ventral posterior
LC - <i>locus caeruleus</i>	VGat – transportador vesicular de GABA e glicina
LPAG – substância cinzenta periaquedutal lateral	VGlut1 – transportador vesicular de glutamato 1
LPGi – núcleo paragigantocelular lateral	VLPAG – substância cinzenta periaquedutal ventrolateral
LSO – núcleo olivar superior lateral	VLtG – área tegmental ventrolateral
LVPO – núcleo periolivar ventrolateral	VNTB – núcleo ventral do corpo trapezóide
M – metaestro	
M-D – metaestro-diestro	
min – minuto	
mm - milímetro	
Mot7 – núcleo motor do nervo facial	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Reflexo auditivo de sobressalto	12
1.1.1 Inibição por estímulo prévio	14
1.2 Neurônios da raiz coclear.....	15
1.3 Grupamento noradrenérgico A5	20
2 OBJETIVOS	22
3 DESENHO EXPERIMENTAL	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Animais de experimentação e seu manuseio	24
4.2 Procedimentos experimentais	25
4.2.1 Injeção de traçador anterógrado na região noradrenérgica A5	25
4.2.2 Identificação neuroquímica das aferências da região noradrenérgica A5 aos CRN	28
4.2.3 Padronização do protocolo de mensuração do RAS e PPI.....	29
4.2.4 Coleta e análise de lavados vaginais.....	32
4.2.5 Correlação entre o reflexo auditivo de sobressalto e o ciclo estral.....	33
4.3 Análise das preparações histológicas e fotodocumentação	34
5 RESULTADOS	36
5.1 Injeção de traçador anterógrado na região noradrenérgica A5	36
5.2 Identificação neuroquímica das aferências da região noradrenérgica A5 aos CRN	38
5.3 Padronização do protocolo de mensuração do RAS e PPI.....	42
5.4 Coleta e análise de lavados vaginais.....	47
5.5 Correlação entre o reflexo auditivo de sobressalto e o ciclo estral.....	49
6 DISCUSSÃO	52
6.1 Aferências do grupamento noradrenérgico A5 aos CRN	52
6.2 Protocolo de mensuração do RAS e da PPI.....	53
6.3 Correlação do ciclo estral com o reflexo auditivo de sobressalto e a inibição por estímulo prévio.....	54
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICE 1.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Reflexo auditivo de sobressalto

O reflexo auditivo de sobressalto (RAS) é uma reação motora rápida e intensa que resulta na contração da musculatura estriada esquelética da face e do corpo frente a um estímulo sonoro inesperado e de alta intensidade (KOCH, 1999). Esse reflexo se manifesta amplamente, com o encurtamento do comprimento total do animal, e aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, mediadas pelo sistema nervoso autônomo (BAUDRIE et al., 1997; KOCH, 1999). As contrações musculares generalizadas permitem ao animal a manutenção de uma postura defensiva, protegendo partes vitais do corpo, como face, pescoço e abdome (Figura 1).

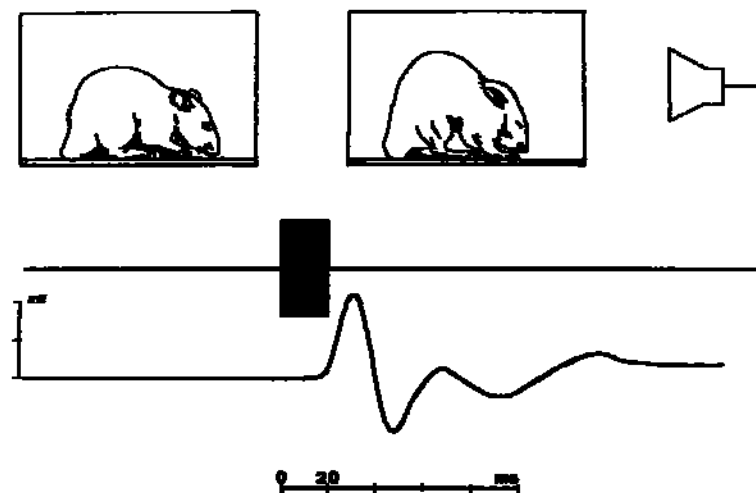


Figura 1. Esquema da resposta reflexa do sobressalto acústico no rato. Ao ser estimulado com um som inesperado e de alta intensidade, o animal contrai a musculatura da face, pescoço e do corpo afim de manter uma postura defensiva. Extraído de Koch, 1999.

O RAS é um reflexo acústico-motor do tronco encefálico, que está presente em diversas espécies de mamíferos, inclusive o homem. Ele possui um caráter defensivo frente a uma provável agressão ou de alerta perante acontecimentos inesperados. No homem, o sobressalto é descrito como uma contração generalizada dos músculos da face, pescoço e parte proximal do membro superior.

No rato, O circuito elementar do RAS é constituído pelos neurônios do gânglio espiral, os neurônios da raiz coclear (CRN), o núcleo reticular caudal da ponte (PnC) e os motoneurônios da medula espinal (KOCH, 1999; LEE et al., 1996) (Figura 2).

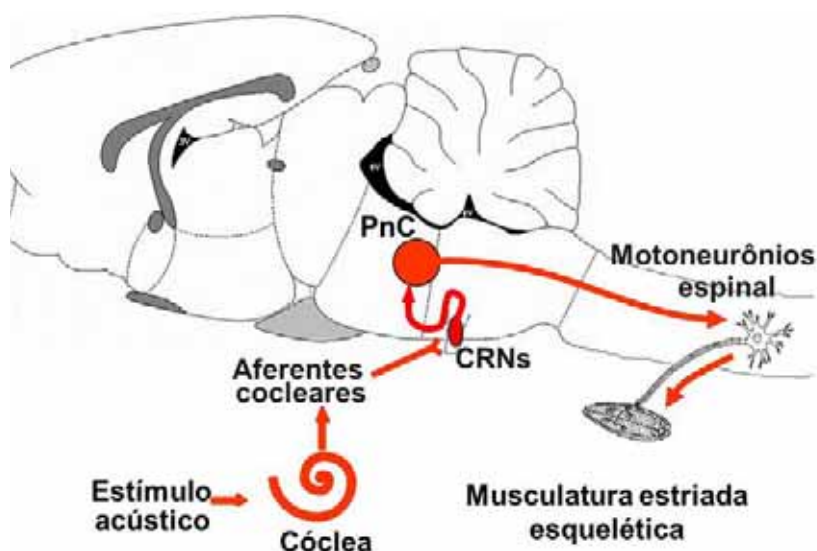


Figura 2. Esquema do circuito neural elementar responsável pelo desencadeamento do reflexo auditivo de sobressalto no rato.

Medidas eletromiográficas mostraram que a latência do RAS está entre 5 e 10ms no homem (KOCH, 1999) e apenas 8ms no rato (DAVIS et al., 1982; ISON et al., 1973). Essa curta latência condiz com o calibre dos axônios dos neurônios da raiz coclear, entre 5 e 7 μ m, que permite uma transmissão neural rápida, essencial ao desencadeamento do reflexo (SINEX et al., 2001). Estímulos acústicos compostos por um amplo espectro de frequências, denominados de ruído branco, acima de 80dB SPL¹ são os principais desencadeadores do RAS (KOCH, 1999; PILZ et al., 1987).

Além do valor etológico dos reflexos acústico-motores para a sobrevivência do indivíduo, a integração sensório-motora é de grande interesse para a pesquisa básica e clínica (HOFFMAN e ISON, 1980; WILKINS et al., 1986). O estado funcional do tronco encefálico pode ser avaliado pelo reflexo de sobressalto. Em pediatria, a análise dos reflexos acústico-motores é uma ferramenta importante para se conhecer o estado de desenvolvimento e funcionalidade do sistema nervoso do recém-nascido. Já em otorrinolaringologia, essa avaliação fornece informações a respeito da parte baixa da via auditiva até o nível pontino, e, principalmente, do componente coclear do nervo vestibulo-coclear.

O RAS pode ser modificado qualitativamente e quantitativamente por diversas condições naturais ou experimentais (BELL et al., 2003; SWERDLOW et al., 2000), chamadas de modulações e que revelam a sua plasticidade. O sobressalto pode ser diminuído devido à habituação ao estímulo (GONZALEZ-LIMA et al., 1989; PILZ e

¹ *Sound pressure level* - escala logarítmica de nível de pressão de som, cuja referência é a pressão de 0,0002dinas/cm², que equivale ao som audível de menor intensidade na frequência de 1000Hz.

SCHNITZLER, 1996), por um estímulo prévio de menor intensidade (BRAFF et al., 2001; FENDT et al., 2001; HOFFMAN e FLESHLER, 1963), e pela administração de substâncias químicas (SWERDLOW e GEYER, 1993). Em contrapartida, o reflexo pode ser exacerbado em condições de potenciação por medo (ANISMAN et al., 2000; DAVIS, 2006; WINSLOW et al., 2007), e ansiedade (KAVIANI et al., 2004).

Comumente, as modulações do sobressalto são mais sensíveis a alterações do que o próprio reflexo (HOFFMAN e ISON, 1980). Sendo assim, as provas comportamentais envolvendo as modulações do RAS têm despertado interesse no diagnóstico clínico (WILKINS et al., 1986). Na clínica neurológica e psiquiátrica, registram-se alterações nas respostas às modulações provocadas por esquizofrenia (BRAFF et al., 2001), depressão (GRILLON et al., 2005; KAVIANI et al., 2004), doença de Huntington (SWERDLOW et al., 1995), transtorno do estresse pós-traumático (GRILLON et al., 1996), transtorno do pânico (LUDEWIG et al., 2002), e estados de dependência de drogas, como opiáceos (BOROWSKI e KOKKINIDIS, 1994; MANSBACH et al., 1992) e álcool (GRILLON et al., 1994). O RAS constitui um bom modelo experimental por ser um comportamento mensurável sem a utilização de provas invasivas e modificar-se frente a diversas condições.

As modulações do RAS e suas modificações farmacológicas relacionam-se com estruturas do sistema nervoso central que atuam sobre o circuito neural do reflexo. Acredita-se que grande parte das modulações do reflexo se relacionem ao PnC (KOCH, 1999), que atuaria com centro integrador de aferências ao circuito do RAS. O PnC é o núcleo mais estudado até o momento, e suas características eletrofisiológicas (LINGENHOHL e FRIAUF, 1994), de conectividade (NODAL e LOPEZ, 2003; SHAMMAH-LAGNADO et al., 1987; YEOMANS et al., 2006) e respostas frente a manipulações farmacológicas já são conhecidas (KUNGEL et al., 1994; MISERENDINO e DAVIS, 1993).

Além do PnC, os neurônios da raiz coclear também integram o circuito do RAS e poderiam participar de algumas modulações do reflexo. Entretanto, as aferências aos CRN não oriundas da cóclea ainda são pouco estudadas.

1.1.1 Inibição por estímulo prévio

Entre as principais modulações do RAS, está a inibição por estímulo prévio (PPI), que se caracteriza pela diminuição, ou completa abolição do reflexo quando o estímulo sonoro desencadeante é precedido por um estímulo sensorial (sonoro, visual ou

tátil) de baixa intensidade (Figura 3). Os circuitos neurais que suportam a existência dessa modulação ainda não foram totalmente esclarecidos, mas a projeção colinérgica inibitória do núcleo pedunculopontino tegmental (PPTg) ao PnC (FENDT et al., 2001) é uma das vias propostas. Diferentes resultados na literatura são contraditórios, ou parciais, sendo que nenhum dos circuitos propostos explica adequadamente todos os fenômenos associados à PPI (FENDT et al., 2001; SWERDLOW et al., 2001).

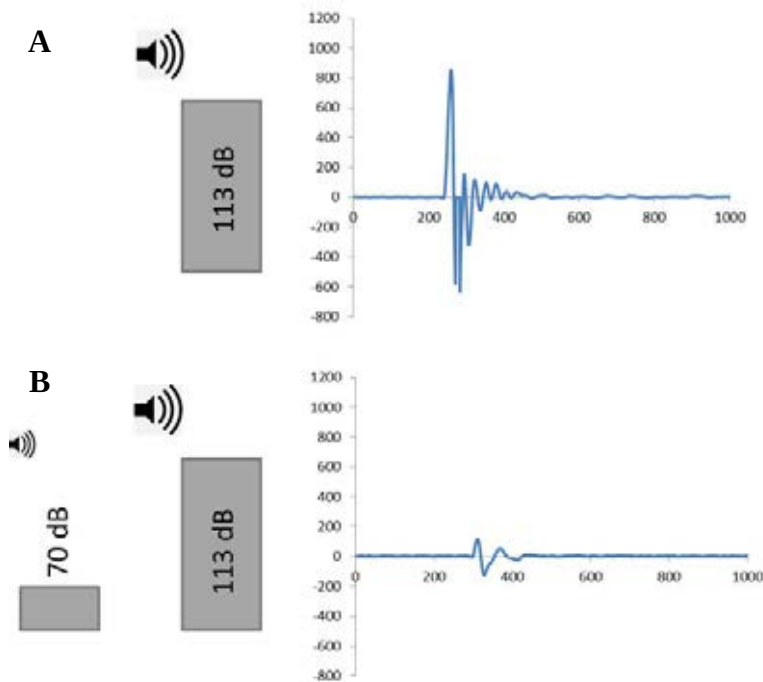


Figura 3. Esquema da inibição por estímulo prévio (PPI). Em A, ao se apresentar um estímulo sonoro de alta intensidade (113 dB), o animal apresenta uma resposta de sobressalto com grande amplitude. Em B, quando o estímulo sonoro desencadeante é precedido por um estímulo de menor intensidade (70 dB), a amplitude do reflexo diminui.

A mensuração do sobressalto e da PPI é feita rotineiramente em modelos experimentais, mas os valores da inibição podem variar de 25% (VAN DEN BUUSE e EIKELIS, 2001) à abolição do reflexo (REIJMERS e PEETERS, 1994), dependendo dos parâmetros utilizados no pré-pulso, sexo e idade do modelo experimental e momento do ciclo circadiano. Portanto, é fundamental a padronização do protocolo de mensuração previamente, antes de se iniciarem quaisquer experimentos e manipulações nos animais de experimentação.

1.2 Neurônios da raiz coclear

Os CRN formam um grupo de, aproximadamente, cinquenta células com diâmetro de 34µm em média, que se localizam periféricamente aos núcleos cocleares (AITKIN, 1995; LÓPEZ et al., 1993), na transição bulbo-pontina. A maioria dos CRN se

localiza na parte ântero-lateral da raiz do nervo vestibulo-coclear (Figura 4A). Eles são os primeiros neurônios a receberem as aferências auditivas do órgão de Corti no sistema nervoso central (HARRISON et al., 1962; OSEN et al., 1991).

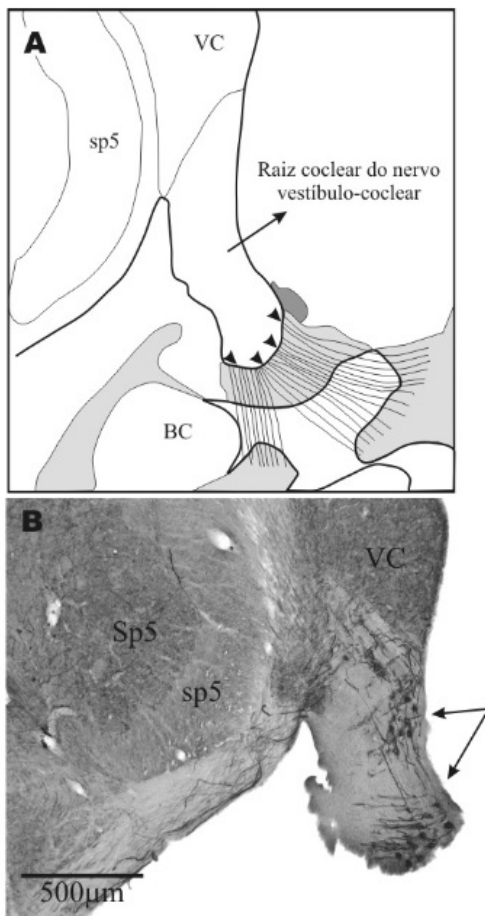


Figura 4. Esquema e fotomicrografia da raiz coclear. Em A, esquema da raiz coclear do nervo vestibulo-coclear em corte coronal e parte da espira basal da cóclea. As cabeças de setas indicam a borda glial que delimita a raiz coclear. Em B, fotomicrografia de corte coronal do tronco encefálico destacando-se a raiz coclear e os CRN (setas). Os corpos neuronais foram evidenciados utilizando a técnica de imuno-histoquímica para neurofilamentos SMI-32.

Os CRN possuem dendritos dispostos paralelamente e perpendicularmente às fibras aferentes cocleares primárias (MERCHAN et al., 1988; OSEN et al., 1991). Os dendritos perpendiculares são extensos e cruzam toda a extensão da raiz coclear no eixo látero-lateral (Figura 4B). Devido a esse padrão de ramificação dendrítica, cada neurônio recebe aferências de uma grande quantidade de colaterais provenientes de fibras de praticamente todo o órgão de Corti. Portanto, os CRN são estimulados por um amplo espectro de frequências acústicas, com menor limiar de resposta para altas frequências, próximas a 30kHz (SINEX et al., 2001).

Os CRN emitem eferências para diversos núcleos de integração sensório-motora presentes na formação reticular (LOPEZ et al., 1999), como o núcleo paragiantocelular lateral (LPGi), regiões paralemniscas rostral e medial, o núcleo reticular oral da ponte (PnO), a área tegmental ventrolateral (VLTg) e, majoritariamente, o núcleo reticular

caudal da ponte contralateral (Figura 5). Além disso, a raiz coclear inerva diretamente o núcleo motor do nervo facial (Mot7) ipsilateral (HORTA-JUNIOR et al., 2008).

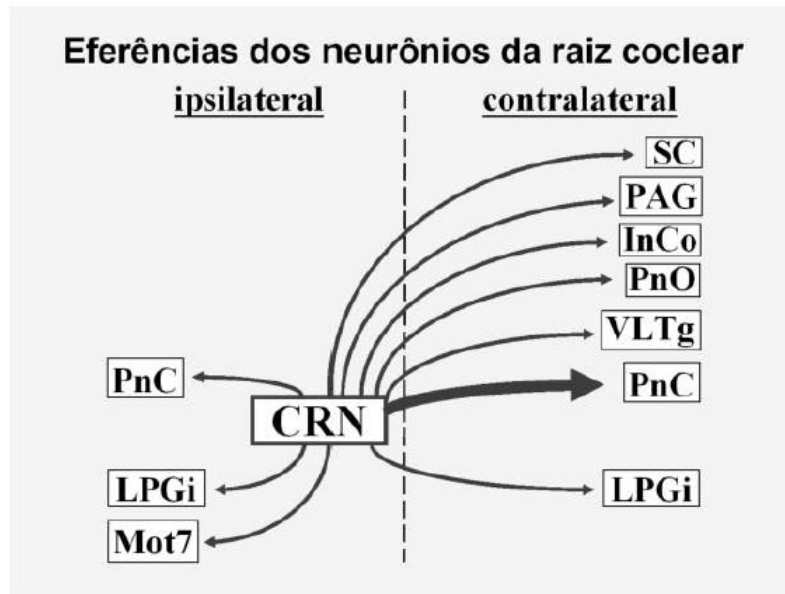


Figura 5. Esquema das aferências aos CRN. A seta mais espessa indica a projeção mais exuberante. Para as abreviaturas, veja a lista de abreviaturas.

Devido à sua localização e padrão de conectividade, os CRN ocupam uma posição privilegiada para participar de processos de integração sensório-motora (Figura 2). Com relação a sua função, os CRN foram identificados como componentes da via essencial para o desencadeamento do RAS (LEE et al., 1996).

O estudo ultra-estrutural da raiz coclear mostrou que aproximadamente metade da superfície celular dos neurônios é recoberta por botões sinápticos classificados em quatro difentes tipos (MERCHAN et al., 1988). Os botões do tipo I constituem 75% de todos os botões sinápticos, com assimetria nas densidades pré e pós-sinápticas e grande quantidade de vesículas circulares e eletronlúcidas, sugerindo uma sinapse excitatória. Dessa forma, sugeriu-se que os botões do tipo I se originassem de colaterais dos aferentes cocleares primários, fato demonstrado por Osen et al. (1991). As características ultraestruturais dos botões de tipo I se assemelham aos botões sinápticos glutamatérgicos dos aferentes primários aos núcleos cocleares (ZHOU et al., 2007).

O restante dos botões sinápticos não se origina dos aferentes primários e possuem características morfológicas heterogêneas, com vesículas eletronlúcidas circulares ou pleomórficas, que provavelmente se originam em outras regiões e possuem diferentes identidades neuroquímicas (MERCHAN et al., 1988).

A existência de aferências aos CRN com outros neurotransmissores, como dopamina ou serotonina, ainda não foi investigada. Terminais axônicos serotoninérgicos

provenientes do núcleo dorsal da rafe chegaram a ser descritos no núcleo coclear ventral, nas imediações da raiz colear, e estudos recentes em nosso grupo indicam a existência de projeções do núcleo dorsal da rafe para os CRN.

Igualmente, Gómez-Nieto et al. (2008b) descreveram uma fonte de aferências colinérgica, oriunda do núcleo ventral do corpo trapezóide (VNTB). Mesmo sem provas comportamentais a respeito dos aspectos funcionais dessa conexão, postula-se que ela seja uma via importante na inibição por estímulo prévio do RAS, através da conexão indireta entre os CRN e o colículo inferior, centro fundamental dessa modulação (FENDT et al., 2001; YEOMANS et al., 2006).

Os CRN estão em justaposição a uma grande quantidade de botões imunorreativos ao transportador vesicular de glutamato 1 (VGlut1) e terminais imunorreativos ao transportador de GABA e glicina (VGat) (GOMEZ-NIETO et al., 2008a; OSEN et al., 1991). Uma provável aferência noradrenérgica aos CRN seria o *locus caeruleus*, mas ainda é necessário se confirmar seu papel no reflexo de sobressalto (GÓMEZ-NIETO et al., 2008).

Embora os CRN sejam os primeiros neurônios do circuito elementar do RAS, fundamentais para o seu desencadeamento, desconhecem-se as origens de suas aferências, suas identidades neuroquímicas e sua influência em provas comportamentais de mensuração do reflexo. Experimentos recentes em nosso grupo de pesquisa buscaram identificar a fonte dessas aferências a partir da injeção de um neurotraçador retrógrado na raiz coclear.

As principais fontes de aferências encontradas nesses experimentos são o núcleo olivar superior lateral (LSO), o núcleo ventral do corpo trapezóide (VNTB), o *locus caeruleus* (LC), o núcleo dorsal da rafe (DR) e a região do grupamento noradrenérgico A5 (Figura 6).

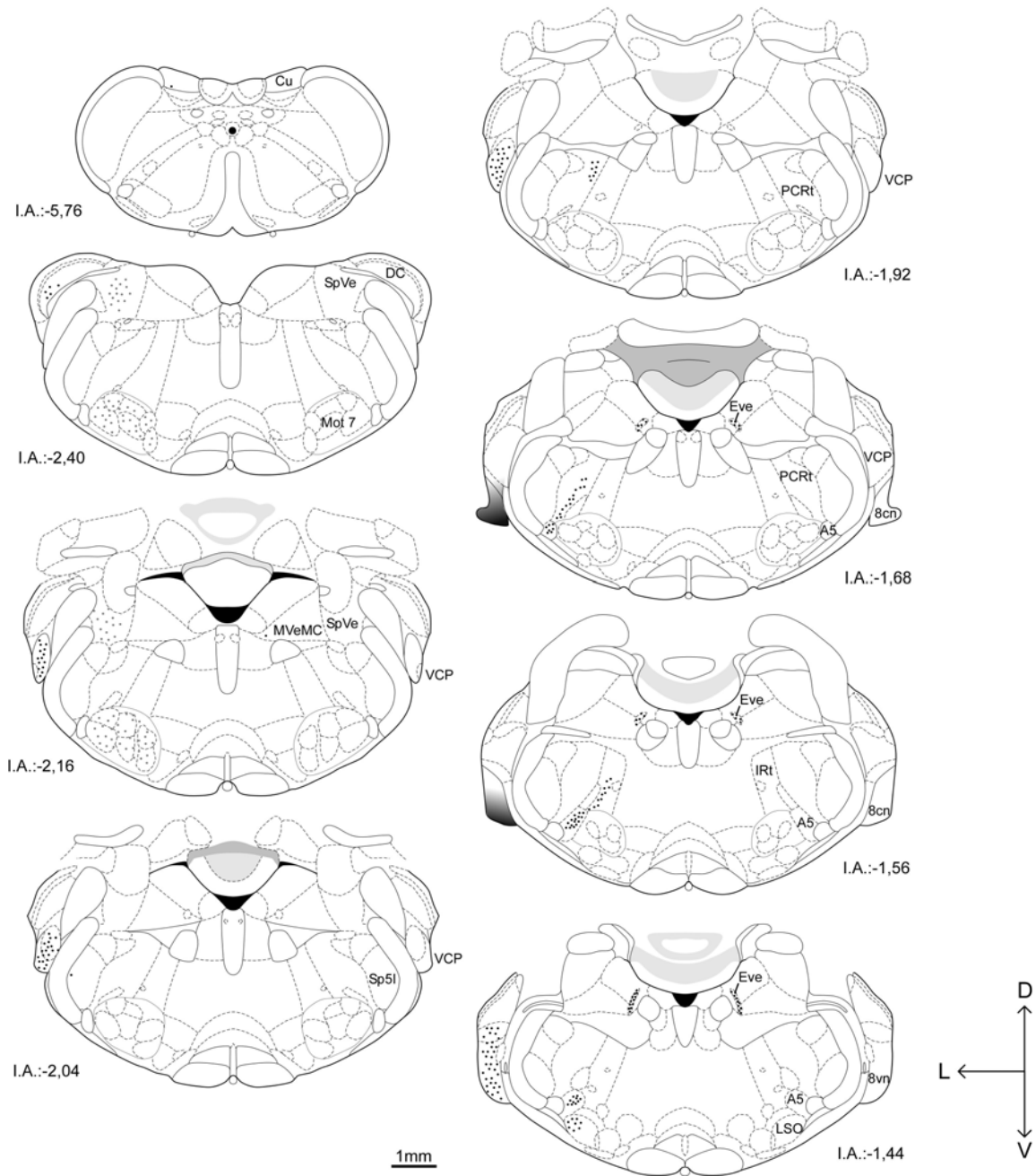


Figura 6. Mapeamento de neurônios retrogradamente marcados após a injeção de traçador retrógrado na raiz coclear. Os esquemas representam cortes coronais do tronco encefálico, dispostos de caudal para rostral segundo o nível interaural (I.A.). Os neurônios marcados estão representados pelos círculos negros. As setas de orientação e a barra de calibração são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, veja a lista de abreviaturas.

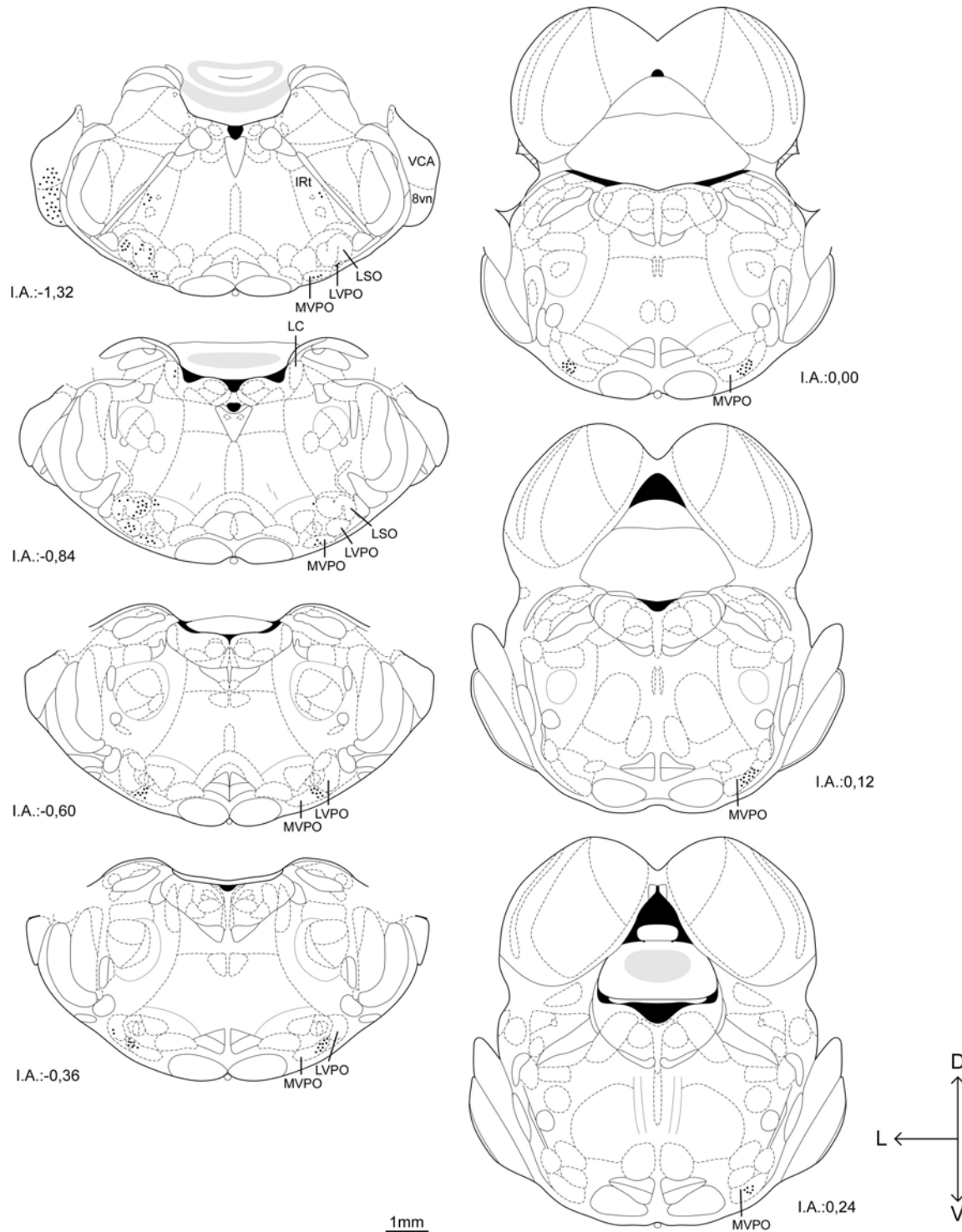


Figura 6 (continuação). Mapeamento de neurônios retrogradamente marcados após a injeção de traçador retrógrado na raiz coclear. Os esquemas representam cortes coronais do tronco encefálico, dispostos de caudal para rostral segundo o nível interaural (I.A.). Os neurônios marcados estão representados pelos círculos negros. As setas de orientação e a barra de calibração são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, veja a lista de abreviaturas.

1.3 Grupamento noradrenérgico A5

O grupamento noradrenérgico A5 ocupa a parte caudal de uma coluna de neurônios noradrenérgicos que se estende da região rostral do núcleo motor do nervo facial à junção ponto-mesencefálica, na região ventrolateral do tronco encefálico. Ele é

conhecido por enviar eferências, majoritariamente, para estruturas espinais e do tronco encefálico. O grupamento A5 projeta-se para a coluna intermediolateral dos segmentos medulares tóraco-lombrares e para núcleos autonômicos centrais (BYRUM e GUYENET, 1987). Os neurônios do A5 também poderiam ser um relê entre a parte caudal do bulbo ventrolateral e a medula, exercendo efeitos no controle da pressão sanguínea e na função respiratória (KOSHIYA e GUYENET, 1994).

A figura 7 mostra os neurônios do grupamento A5 retrogradamente marcados por neurotraçador injetado na raiz coclear, indicando que essa região poderia ser uma provável aferência aos CRN.

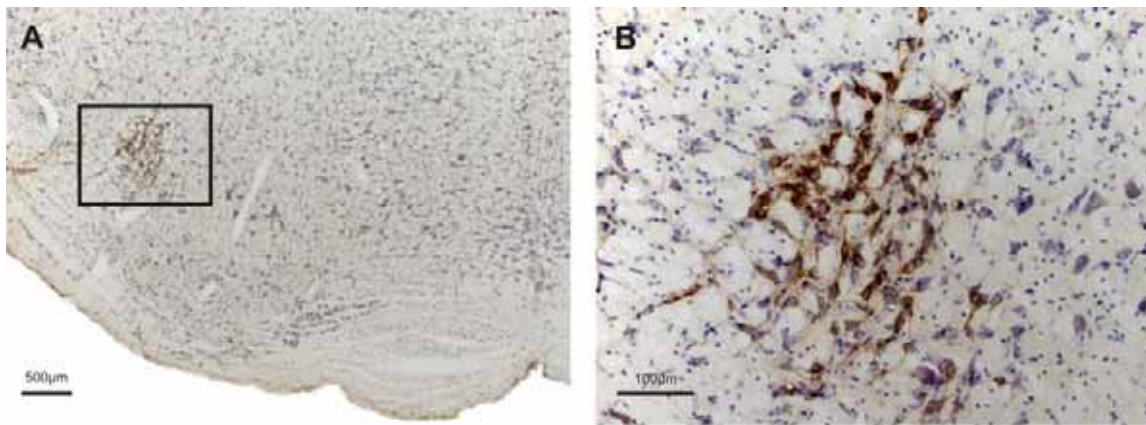


Figura 7. Fotomicrografias do grupamento noradrenérgico A5 após injeção de Fluoro-Gold® (FG) nos CRN. Em A, região do grupamento A5 e sua localização no tronco encefálico, junto a parte caudal do complexo olivar superior. A área demarcada indica a região fotografada em B. Em B, fotomicrografia do A5 na região demarcada em A, evidenciando a captação de FG, em marrom, pelos somas do grupamento.

Diante da necessidade patente de confirmar a origem das aferências provenientes da região noradrenérgica A5 aos CRN, nunca mencionada anteriormente na literatura internacional, assim como, caracterizar sua identidade neuroquímica e influência na neurobiologia do RAS e de suas modulações, realizamos esse trabalho científico.

2 OBJETIVOS

- I.** Confirmar a origem das aferências do grupamento A5 aos neurônios da raiz coclear e sua identidade neuroquímica;
- II.** Padronizar um protocolo de mensuração do reflexo auditivo de sobressalto e de sua inibição por estímulo prévio para estudos futuros de lesão seletiva do A5 e verificação de sua influência na neurobiologia desse reflexo.

3 DESENHO EXPERIMENTAL

Para confirmar a existência de aferências do grupamento noradrenérgico A5 aos neurônios da raiz coclear, foram realizados experimentos de injeção de traçador neuronal anterógrado na região do A5, seguidos de experimentos de co-localização de neurotransmissores e suas enzimas precursoras, para a caracterização neuroquímica dessas aferências.

A padronização do protocolo de mensuração do reflexo auditivo de sobressalto e de sua inibição por estímulo prévio foi executada com a realização de provas comportamentais de avaliação do reflexo e sua modulação em um grupo de animais de experimentação, seguidas da determinação da fase ideal do ciclo estral na qual as fêmeas de ratos *Wistar* seriam submetidas nas futuras mensurações a serem realizadas em experimentos de lesão seletiva dos núcleos aferentes aos CRN, para estudo de sua influência na neurobiologia desse reflexo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação e seu manuseio

Todos os experimentos realizados necessitaram da utilização de animais de experimentação, não existindo métodos alternativos. Assim, tomou-se o maior cuidado possível no planejamento, preparo e execução dos experimentos a fim de se aumentar ao máximo as possibilidades de êxito, o que pressupõe uma redução no número de animais utilizados. Esse preceito foi seguido na elaboração dos protocolos experimentais, aprovados pela Comissão de Ética no Uso dos Animais de Instituto de Biociências (Protocolo N°. 17/08).

O rato albino adulto, fêmea, (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, foi utilizado como modelo experimental. Os animais foram obtidos no Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo. Essa espécie é representativa dos mamíferos roedores, que apresentam um ótimo funcionamento dos reflexos acústico-motores para a sobrevivência em um habitat terrestre, predominantemente noturno, e amplamente utilizada no estudo do reflexo de sobressalto (KOCH, 1999; YEOMANS e FRANKLAND, 1995). O estudo com fêmeas é mais vantajoso porque elas possuem uma curva de crescimento mais lento, atingindo um tamanho estável por um período de tempo maior, o que facilita os procedimentos de cirurgia estereotáxica e causa menor influência na mensuração do RAS e da PPI (BELL et al., 2003).

Os animais foram alojados em gaiolas (41x34x17cm) com livre acesso à ração e água, em biotério com temperatura controlada (20 a 25°C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acessas às 07h). Em cada gaiola, alocaram-se dois animais antes dos procedimentos cirúrgicos, para evitar o estresse por isolamento. No momento dos experimentos, os animais pesavam entre 250g e 300g e tinham entre 114 e 151 dias de idade.

As intervenções cirúrgicas para a injeção dos traçadores e a eutanásia dos animais foram realizadas sob anestesia profunda. Antes do início de quaisquer procedimentos, comprovou-se a ausência dos reflexos palpebral e de retirada dos membros e diminuição do tônus muscular no pescoço como prova de anestesia eficaz. Foram utilizados anestésicos de uso comum na experimentação animal, cuja eficácia foi constatada em experimentos prévios e em diversos laboratórios de pesquisa (DAMY et al., 2010). Foram utilizados os seguintes fármacos:

- Solução anestésica para cirurgia de injeção de neurotraçador: Xilasin[®] (xilazina 2%, 0,5mg/ml), Dopalen[®] (ketamina 10%, 25mg/ml) e Acepran[®] (acepromazina 1%,

1mg/ml), diluídos em água purificada, na dose de 2ml/kg de peso corporal, e administrados por via subcutânea.

- Analgésico: Paracetamol[®], na dose de 80mg/kg por via oral, administrado após a cirurgia.

- Solução anestésica para eutanásia por perfusão transcardíaca: Hidrato de cloral 10%, na dose de 400mg/kg, administrado por via intraperitoneal.

4.2 Procedimentos experimentais

Em todas as atividades experimentais, as substâncias tóxicas foram manipuladas em capela extratora de gases, nas quais se prepararam as soluções fixadoras, realizam-se as perfusões dos animais, as reações de imuno-histoquímica, os procedimentos de desidratação e montagem de lâminas para microscopia óptica.

4.2.1 Injeção de traçador anterógrado na região noradrenérgica A5

Resultados prévios de nosso grupo indicaram que o grupamento noradrenérgico A5 seria uma provável fonte de aferências aos CRN. Para confirmar essa aferência, realizaram-se experimentos de injeção de neurotraçador anterógrado na raiz coclear, com abordagem estereotáxica.

O dextrano amino biotilado (BDA, Molecular Probes #D-1956, PM 10.000) foi utilizado como traçador, a uma concentração de 5%, em água destilada. Esse traçador anterógrado é captado pelos corpos celulares e dendritos dos neurônios e transportado, pelos axônios, até suas terminações, nas quais se acumula. Em alguns experimentos, foi utilizado um traçador com as mesmas características do BDA, porém conjugado a uma molécula fluorescente, o dextrano-tetrametilrodamina (RD).

Para o procedimento de injeção, sob anestesia profunda, foi realizada uma craniotomia para acesso de uma micropipeta de vidro (10-60µm de diâmetro interno) preenchida com BDA ou RD nas seguintes coordenadas estereotáxicas: 1,6mm caudal à linha interaural, no eixo ântero-posterior; 2,3mm à esquerda, no eixo laterolateral; e 0,2mm inferior à linha interaural, no eixo dorsoventral. As coordenadas foram estabelecidas com o auxílio do atlas estereotáxico do cérebro do rato (PAXINOS e WATSON, 1998). O traçador foi injetado por iontoforese, com uma corrente positiva de 3,0µA, em pulsos intermitentes de 7s (ligado/desligado), durante 10min. Após a injeção, a micropipeta foi mantida em repouso por mais 10min para evitar a deposição do traçador no trajeto da micropipeta durante sua retirada.

Após a cirurgia, os animais passaram por um período de recuperação de 7 a 20 dias, e foram eutanasiados por perfusão transcardíaca, com uma bomba peristáltica ajustada para o fluxo de 30ml/min. Para lavagem do leito vascular empregou-se 150ml de soro Ringer livre de cálcio (NaCl 0,85%, KCl 0,025%, NaHCO₃ 0,02%, pH 6,9), com adição de 0,3ml de heparina, seguida de 1000ml de solução fixadora composta por paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,125%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4.

Ao término da perfusão, o animal permaneceu em repouso por aproximadamente uma hora, para se aprimorar a fixação. Posteriormente, o encéfalo foi exposto por craniotomia e foi retirada a dura-máter, com extremo cuidado para preservar a raiz do nervo vestibulo-coclear, unida ao tronco encefálico. Para tanto, o osso temporal foi tracionado lateralmente até o rompimento do VIII par de nervos cranianos ao nível do meato acústico interno.

O encéfalo foi reduzido a um bloco que se estendeu do núcleo do nervo hipoglosso ao hipotálamo, com o auxílio de uma matriz para encéfalos (Insight Ltda.). O bloco foi crioprotégido em solução de sacarose 30%, em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, durante 48h a 4°C, sob agitação. Foram feitas secções seriadas de 30µm, no plano coronal, em micrótomo de deslizamento (Leica SM2010R), equipado com platina congeladora (Physiotemp Inc.). Os cortes foram recolhidos sequencialmente, em um conjunto de dez frascos: os frascos 01, 02, 06 e 07 foram preenchidos com tampão fosfato 0,1M pH 7,4 para reações imuno-histoquímicas com e sem contracoloração pelo método de Nissl, enquanto o restante foi preenchido com solução anticongelante (tampão fosfato de sódio 0,4M 6,25%, NaCl 0,25%, sacarose 15%, etilenoglicol 35%, em solução aquosa), para armazenamento em freezer -20°C.

Para a reação imuno-histoquímica, utilizou-se o processamento em cortes flutuantes. Inicialmente, os cortes foram lavados em tampão fosfato de sódio 0,1M para retirada da sacarose infiltrada no tecido. Para visualização do BDA, empregou-se o método do complexo avidina-biotina-peroxidase (HSU et al., 1981), que baseia-se na grande afinidade que a molécula de avidina tem pela molécula de biotina (constante de dissociação 10⁻¹⁵). Antes da incubação, realizou-se a inibição da peroxidase endógena, com uma solução de água oxigenada P.A. a 10%, durante 20min sob agitação, visando à eliminação de marcação de fundo inespecífica que poderia se formar devido à peroxidase tecidual. Os cortes foram cuidadosamente lavados com tampão TBS-Tx, composto por Tris (Trisma Base, Sigma #T-6066) 0,05M, pH 7,6, com NaCl 0,85% e Triton X-100 0,5% (Merck #11869), e, em seguida foram incubados em complexo ABC (ABC,

Vectastain Standard[®], Vector Labs, #PK-4000), preparado no mesmo tampão, por duas horas à temperatura ambiente.

Para a visualização do RD duas séries destes casos experimentais foram utilizadas para evidencição do RD por meio de um protocolo de imuno-histoquímica, o que torna a marcação mais sensível e possibilita sua observação por microscopia óptica convencional. Para tanto, os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-tetrametilrodamina, obtido em coelho, a concentração de 1/12000, durante à noite em geladeira. Após lavagens cuidadosas com tampão TBS-Tx, foram incubados novamente em solução de anticorpo secundário anti-coelho biotinilado (obtido em cabra, Vector Labs BA-1000) 1/250, durante duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se a incubação com o complexo ABC à semelhança do procedimento descrito anteriormente.

Para visualização dos traçadores, a peroxidase unida ao complexo ABC foi evidenciada mediante a ação da água oxigenada, usando-se como cromógeno o 3,3'-diaminobenzidina tetrahydrocloro (DAB), reforçado com níquel amônio sulfato PM 395,0 (DAB-Ni), que gera um produto de reação estável na cor negra. Para o procedimento, os cortes foram incubados em uma solução de tampão Tris 0,05M, pH 8,0, DAB 0,07% e água oxigenada 0,003%, com controle visual e microscópico. A reação foi interrompida quando se evidenciou a marcação, com lavagens de tampão Tris 0,05M, pH 8,0.

Para observar mais nitidamente a justaposição dos terminais axônicos marcados anterogradamente com os CRN em alguns casos, foi realizada uma técnica imuno-histoquímica para calbindina D-28K (proteína abundante nos CRN) que permite a marcação nítida do soma e dos dendritos desses neurônios. Nesses casos, o traçador neural foi visualizado primeiramente utilizando DAB-Ni como cromógeno e em seguida evidenciou-se a calbindina D-28K seguindo o mesmo protocolo padrão de imuno-histoquímica (já descrito para a RD), incubando-se os cortes em anticorpo primário anti-calbindina D28K (obtido em coelho [Swant CB38] 1/20.000 ou em camundongo [Swant MAB300] 1/10.000), seguido de anticorpo secundário biotinilado, 1/200, dirigido contra a espécie do animal na qual foi produzido o anticorpo primário (anti-coelho, BA-1000 Vector Labs, ou anti-camundongo, BA-9000 Vector Labs). A calbindina foi detectada com ABC, empregando DAB sem níquel como cromógeno o que produz uma marcação de cor marrom.

Após as reações imuno-histoquímicas, os cortes foram transferidos para uma solução de gelatina 0,4%, em tampão Tris 0,05M, e montados em lâminas de vidro sequencialmente de caudal para rostral. Duas séries de cada caso experimental foram contracoradas com tionina, pelo método de Nissl, para referência citoarquitetônica. Nesse método, realiza-se a desidratação dos cortes em alcóois de concentrações crescentes (etanol 50% a 100%), dissolução de lipídios em banhos de xilol, reidratação por meio de alcóois em concentração decrescente (etanol 100% a 50%), coloração com tionina (Fisher #T-409), nova desidratação e diafanização com xilol. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínula utilizando Permont[®] (Fisher Scientific) como meio de montagem.

4.2.2 Identificação neuroquímica das aferências da região noradrenérgica A5 aos CRN

A identificação neuroquímica das aferências do grupamento noradrenérgico A5 foi realizada em séries de cortes obtidos nos casos experimentais onde a injeção de BDA estava localizada no A5, através da identificação e co-localização da enzima dopamina β -hidroxilase (DBH), que participa da via de biossíntese das catecolaminas, em fibras marcadas com BDA ou RD na raiz coclear. A co-localização foi analisada através de microscopia confocal (detalhes no item 4.3), na qual se utilizaram diferentes fluoróforos para a marcação de fibras noradrenérgicas (CY2) e de fibras que captaram e transportaram o traçador injetado no grupamento A5 (CY3).

O procedimento para observação da co-localização DBH-BDA foi iniciado com lavagens dos cortes e bloqueio de marcação inespecífica. A seguir, foi feita a incubação dos cortes em anticorpo primário anti-DBH, obtido em camundongo (Chemicon, MAB308), a 1/3000 durante uma noite em geladeira. Após lavagens cuidadosas em tampão TBS-Tx, realizou-se a incubação simultânea com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à partícula fluorescente CY2 (Jackson ImmunoResearch, #115225003), a 1/200 para evidênciação da DBH, e streptavidina conjugada à molécula CY3 (Jackson ImmunoResearch #016160084), a 1/200 para evidênciação do BDA, durante duas horas à temperatura ambiente.

Os cortes foram lavados em tampão Tris-HCl e montados de maneira sequencial, de caudal para rostral, em lâminas de vidro. As lâminas foram cobertas com meio de montagem específico para fluorescência (Fluoromont, Sigma) e mantidas em geladeira até o momento da análise e fotodocumentação.

4.2.3 Padronização do protocolo de mensuração do RAS e PPI

Para o estudo da influência das aferências do grupamento noradrenérgico A5 aos CRN no reflexo auditivo de sobressalto e sua inibição por estímulo prévio, será necessária a mensuração desses comportamentos antes e após a lesão seletiva dessa região. Então, inicialmente, realizaram-se procedimentos de calibração do sistema de mensuração do RAS e padronização de protocolos para essa mensuração.

O sistema de avaliação do sobressalto da empresa Insight (Equipamentos Científicos Ltda.) integra a parte de aquisição do movimento do animal e a geração dos estímulos sonoros. O sistema é constituído por duas câmaras de prova com isolamento acústico, nas quais há uma plataforma de medição, localizada a 9cm dos alto-falantes e um sistema gerador de estímulos sonoros controlados por *software*, conectados a um computador (Figura 8). A quantificação do RAS é realizada por uma balança sensível, localizada abaixo da gaiola de prova, que registra a variação de peso do animal durante e após a estimulação acústica, visto que a resposta pode ser caracterizada por um movimento balístico.

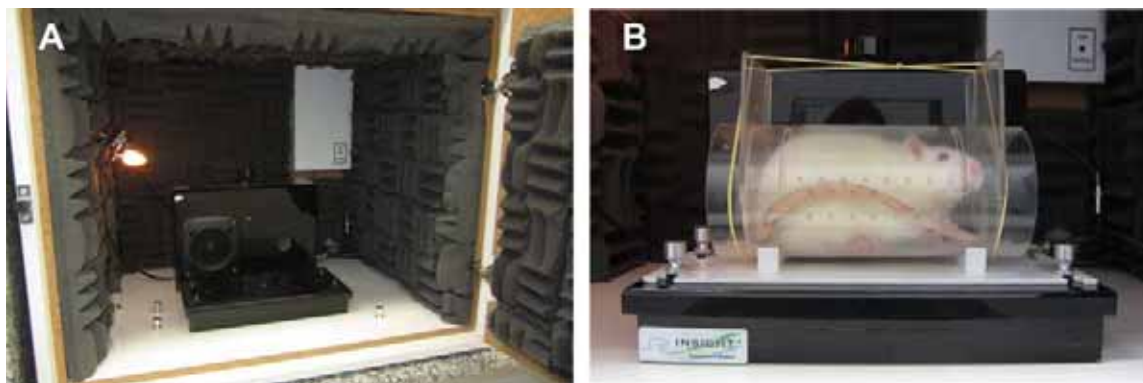


Figura 8. Foto do sistema de avaliação do sobressalto. Em A, interior da câmara de prova com isolamento acústico, na qual se observa a plataforma de captação do movimento do animal, o alto-falante responsável pela geração do ruído de fundo, pré-pulso e pulso, bem como luz ambiente e câmera de vídeo para acompanhamento de toda a sessão via computador. Em B, animal posicionado na gaiola de prova do reflexo, fixada à plataforma de medição.

As avaliações do RAS e da PPI são realizadas em sessões que duram cerca de 40min. Durante toda sessão, as câmaras são mantidas com ventilação constante e com as luzes acesas, e os animais são monitorados, através do computador, por uma câmera de vídeo instalada dentro da câmara de prova (Figura 8).

Para aferição das intensidades de ruído de fundo e dos estímulos acústicos utilizados nas sessões, foi utilizado um decibelímetro digital (medidor de nível de pressão sonora, modelo DEC-460, Instrutherm Ltda., calibração interna 94,0dB) colocado sobre a plataforma de medição, na mesma posição na qual é afixada a gaiola de

prova,. Para aferição do ruído de fundo, o decibelímetro foi usado nas configurações *Speed SLOW* e *dB low*, enquanto que para aferição dos estímulos acústicos (pré-pulsos e pulsos), as configurações foram *Speed FAST* e *dB hi*, seguindo as especificações do fabricante.

Foram construídas curvas de calibração do ruído de fundo e dos estímulos acústicos de dois tipos: ruído branco e tons puros. Os tons puros foram calibrados nas frequências de 2kHz, 4kHz e 18kHz, que representam estímulos de baixas, médias e altas frequências, respectivamente, e compreendem grande parte do espectro auditivo do rato (Figura 9). Os estímulos acústicos foram utilizados como desencadeadores do reflexo de sobressalto e como pré-pulsos, variando-se unicamente sua intensidade.

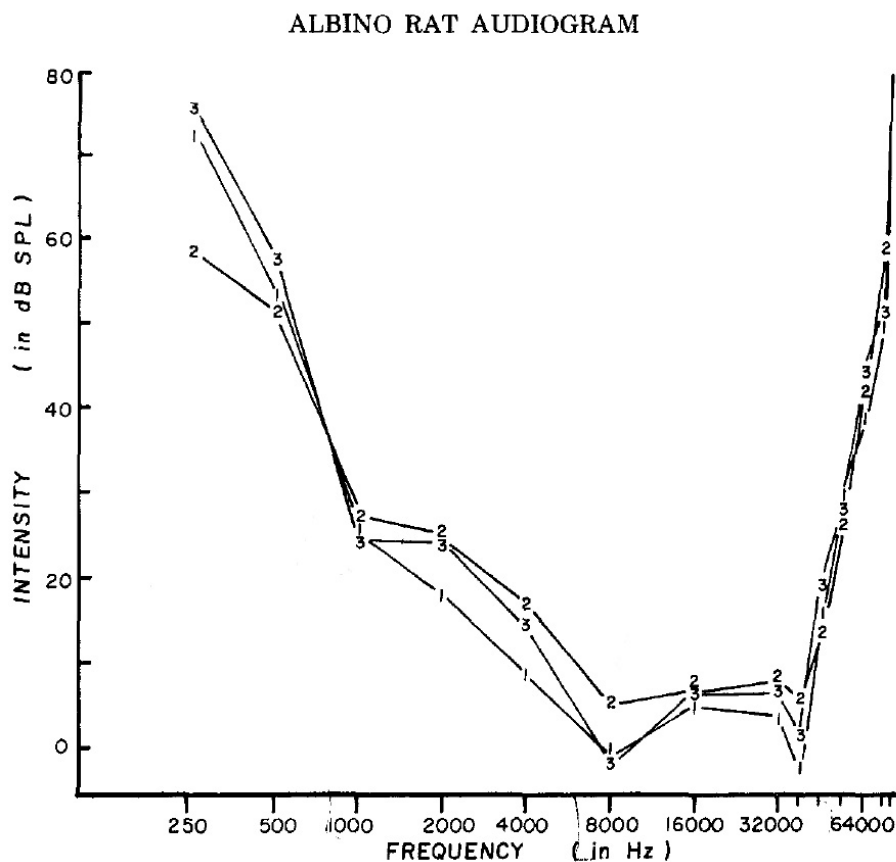


Figura 9. Audiograma do rato albino. As frequências de 2kHz, 4kHz e 18kHz estão entre as com menor limiar de audição para o rato. Extraído de Kelly e Masterton (1977).

Em seguida, iniciou-se a padronização de um protocolo que permitisse a obtenção de dados de PPI condizentes com os encontrados na literatura em experimentos prévios (KINKEAD et al., 2008; KOCH, 1998; LEHMANN et al., 1999; LI et al., 1998; REIJMERS e PEETERS, 1994; VAN DEN BUUSE e EIKELIS, 2001). Foram planejadas sete sessões de mensuração (A-G) que diferiam, essencialmente, nas características do pré-pulso apresentado antes do pulso no paradigma da PPI (Tabela 1).

Em todos os protocolos, o pulso utilizado foi um estímulo de ruído branco, com 113dB e 20ms de duração (ver *Resultados da calibração do sistema de mensuração*), sendo precedido em 50ms pelo pré-pulso, no caso da avaliação da PPI.

Sessão	Pré-pulso X	Pré-pulso Y	Pré-pulso Z
A	RB-75dB	RB-80dB	RB-85dB
B	RB-80dB	RB-85dB	RB-90dB
C	2kHz-80dB	2kHz-85dB	2kHz-90dB
D	4kHz-65dB	4kHz-70dB	4kHz-75dB
E	4kHz-80dB	4kHz-85dB	4kHz-90dB
F	18kHz-65dB	18kHz-70dB	18kHz-75dB
G	18kHz-80dB	18kHz-85dB	18kHz-90dB

Tabela 1. Características das sessões configuradas (A-G) para padronização do protocolo de PPI com diferentes pré-pulsos. RB, ruído branco.

Cada sessão foi composta por oito diferentes blocos de apresentação de estímulos (Tabela 2): bloco treino (eliminado no cálculo da amplitude média devido à habituação inicial em cada sessão (PILZ e SCHNITZLER, 1996)); bloco estímulo sozinho; bloco pré-pulso “X”+estímulo; bloco pré-pulso “Y”+estímulo; bloco pré-pulso “Z”+estímulo; bloco pré-pulso “X”; bloco pré-pulso “Y” e bloco pré-pulso “Z”. Todos os blocos, com exceção do bloco treino, foram semi-randomizados pelo método do quadrado latino.

Os cinco minutos iniciais da prova corresponderam ao período de habituação do animal à condição experimental, que possuía o ruído de fundo de 60dB ligado, assim como durante toda a sessão. O ruído de fundo constante durante toda a sessão é importante para normalizar o ruído ambiente na câmara de prova. O intervalo entre as tentativas foi de $30s \pm 10$, determinado randomicamente pelo programa do equipamento.

Blocos	Pré-pulso	Pulso	Repetições
Treino	-	113dB/20ms	05
Estímulo sozinho	-	113dB/20ms	10
Pré-pulso “X”+estímulo	X	113dB/20ms	10
Pré-pulso “Y”+estímulo	Y	113dB/20ms	10
Pré-pulso “Z”+estímulo	Z	113dB/20ms	10
Pré-pulso “X”	X	-	05
Pré-pulso “Y”	Y	-	05
Pré-pulso “Z”	Z	-	05

Tabela 2. Configuração de uma sessão típica utilizada para padronização do protocolo de PPI.

Para evitar as variações que poderiam ocorrer devido ao ciclo circadiano, todos os experimentos comportamentais foram realizados de manhã (ANISMAN et al., 2000), entre 7h e 9h. Além disso, os animais foram manipulados nos três dias anteriores ao

início das provas e colocados na câmara de isolamento durante 5min para minimizar a influência do estresse causado por um novo ambiente nas respostas do RAS (VALSAMIS e SCHMID). Ainda, a mesma pessoa era responsável pela realização de todas as provas comportamentais nos animais, com o intuito de habituar o animal ao manipulador, reduzindo influências externas nos procedimentos.

A análise dos dados e sua estatística descritiva, referentes às mensurações do RAS e PPI, foram realizadas no programa Microsoft Excel 2010. Consideraram-se respostas válidas do reflexo apenas aquelas em que a movimentação do animal antes da emissão do pulso sonoro não era superior a 25% da amplitude máxima obtida na tentativa (BELL et al., 2003).

4.2.4 Coleta e análise de lavados vaginais

O procedimento de padronização dos protocolos envolveu também a determinação da fase do ciclo estral ideal para a mensuração do sobressalto e da PPI nas fêmeas, uma vez que já foi demonstrado que a PPI é sexualmente dimórfica no homem (SWERDLOW et al., 1997), mas que essa determinação não existe para o modelo experimental utilizado. Para tanto, realizou-se o pareamento da fase do ciclo estral com as mensurações de RAS e PPI para determinar se haveria influência do ciclo sobre o comportamento e qual o melhor momento para todas as sessões de mensurações.

O lavado vaginal foi coletado com o auxílio de uma ponteira de 200µl contendo solução fisiológica NaCl 0,9%, que foi dispensada e sugada no vestíbulo da vagina para a obtenção das células epiteliais descamadas. As lâminas contendo as gotas de lavado vaginal foram secadas em estufa desligada durante 12h. A seguir, foram imersas em álcool 100% para fixação do material e deixadas para secar por mais 12h.

Após esse período, iniciou-se a coloração do material. Foi realizada uma hidratação com concentrações decrescentes de álcool (etanol 100% a 70%), água destilada, coloração com solução de hematoxilina de Harris (CAS 517-28-2), lavagens em água destilada e água corrente, desidratação em álcool (etanol 70% a 100%), coloração com solução de Orange-G (álcool 99,5%, Orange-G a 5% [Sigma #O-1625], ácido fosfotúngico [Sigma #P-4006], em solução aquosa), passagem em álcool 100%, coloração com eosina amarela 0,25% (CAS 17372-87-1), nova passagem em álcool 100% e diafanização em xilol. Ao término da bateria, as lâminas foram cobertas com lamínula e Permunt[®].

4.2.5 Correlação entre o reflexo auditivo de sobressalto e o ciclo estral

Inicialmente, todos os animais foram submetidos a uma triagem para averiguar se eles apresentavam respostas satisfatórias de RAS e PPI para seguirem nos demais experimentos comportamentais somente animais que respondiam adequadamente à estimulação acústica. Esse procedimento consistia de duas provas: prova basal e PREPISI.

Ao chegarem ao biotério, os animais passaram por um período de aclimação ao novo ambiente, entre 10 a 15 dias. Em seguida, foram submetidos a três dias de habituação, ou seja, eram colocados na gaiola de prova, dentro da câmara de prova, e mantidos durante 5min com o ruído de fundo (ruído branco, 60dB) ligado.

No quarto dia, os animais eram submetidos a uma prova basal que possibilitava a identificação daqueles que, inerentemente, não apresentavam o reflexo. Eles eram submetidos a 22 estímulos sonoros isolados (ruído branco) em ordem crescente de intensidade. Os cinco primeiros estímulos eram de 75dB e foram utilizados para habituação do animal; sendo, os posteriores, estímulos de 75dB, 79dB, 84dB, 87dB, 89dB, 91dB, 93dB, 95dB, 97dB, 99dB, 101dB, 103dB, 105dB, 107dB, 109dB, 111dB e 113dB. Durante todo o procedimento, o ruído de fundo mantinha-se constante em 60dB.

No último dia, foi mensurado o RAS e a PPI. Essa prova consistiu de 6 tipos de apresentação de estímulos, descritos na tabela 3. Em cada prova, foram apresentados 65 estímulos no total. As cinco primeiras tentativas de estimulação isolada (Bloco Treino) eram apresentadas no início da sessão e excluídas do cálculo da média do RAS. De acordo com os resultados obtidos na *Padronização da mensuração do RAS e da PPI*, os blocos de estímulos consistiram de um pulso de ruído branco, 113dB, 20ms de duração (Bloco Estímulo sozinho), e esse mesmo estímulo precedido, com intervalos diferentes, por um pré-pulso em tom puro (4kHz) de 70dB e 20ms de duração (Blocos Prep25+Estímulo, Prep50+Estímulo, Prep100+Estímulo e Prep150+Estímulo). A apresentação dos blocos foi realizada da forma semi-randômica, pelo método de quadrado latino.

Blocos	Pré-pulso	Intervalo	Pulso	Repetições
Treino	-	-	113dB/20ms	05
Estímulo sozinho	-	-	113dB/20ms	12
Prep25+Estímulo	4kHz-70dB/20ms	25ms	113dB/20ms	12
Prep50+Estímulo	4kHz-70dB/20ms	50ms	113dB/20ms	12
Prep100+Estímulo	4kHz-70dB/20ms	100ms	113dB/20ms	12
Prep150+Estímulo	4kHz-70dB/20ms	150ms	113dB/20ms	12

Tabela 3. Características do pré-pulso, pulso e intervalo entre os estímulos em cada um dos blocos da sessão de PREPISI.

Foi delineado, então, um procedimento experimental para se estudar a correlação entre o reflexo auditivo de sobressalto e a PPI e o ciclo estral. Vinte fêmeas que apresentavam respostas satisfatórias de RAS e PPI foram acompanhadas durante um período de 20 dias. A cada 48h, os animais eram submetidos a uma prova de mensuração do RAS e PPI e tinham seu lavado vaginal coletado todos os dias, para estadiamento do ciclo estral.

Embora a fase do ciclo fosse pareada somente com a resposta de RAS e PPI do mesmo dia, o acompanhamento diário foi determinante para diagnóstico mais preciso das fases e transições do ciclo estral, observando se os animais ciclaram ao longo do período estudado.

Os dados de mensuração do RAS e PPI nos experimentos para correlação entre o RAS/PPI e o ciclo estral foram analisados pela técnica de análise de variância seguida de pós-teste de Tukey, com testes de paramétricos.

4.3 Análise das preparações histológicas e fotodocumentação

As lâminas de encéfalo preparadas foram estudadas em microscópio óptico (Axioplan2, Carl Zeiss) em campo claro nos casos de injeção de BDA ou RD no grupamento noradrenérgico A5. A documentação fotográfica foi realizada com câmara digital (axioCam HRc, Zeiss). Os casos processados com marcadores fluorescentes, para a identificação neuroquímica das aferências aos CRN, foram analisados, primeiramente, em microscópio óptico equipado com epifluorescência.

Uma vez identificadas, as áreas de interesse foram analisadas em um microscópio confocal (modelo TCS-SP5 AOBS Tandem Scanner, LEICA), acoplado a um microscópio óptico invertido (LEICA DMI 60000CS), no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (Projeto FAPESP EMU

2009/54141-9). O microscópio confocal está equipado com lasers diodo, Hélio-Neon e Argônio, possibilitando linhas de excitação de comprimento de onda de 405, 458, 476, 488, 49, 514, 543, 594 e 633nm. Os fluorocromos CY2 e CY3 foram detectados utilizando as linhas de excitação de 488nm e 543nm. A marcação de fundo foi controlada em tempo real através do fotomultiplicador de voltagem e ajustada para a obtenção da melhor relação entre sensibilidade e inespecificidade. Foram utilizadas objetivas Planapochromat de 20x, 40x e 63x (abertura numérica = 1,30) com imersão em óleo, que possibilitaram resolução de até 200nm nos eixos x e y e 400nm no eixo z (*pinhole* de 1 unidade *Airy*).

As imagens capturadas foram organizadas em figuras e trabalhadas com os programas Adobe Photoshop CS2 e CorelDraw X3, ajustando-se brilho, contraste e balanço de cores, bem como removendo-se artefatos localizados externamente aos cortes, de acordo com o preconizado por Schenk et al. (1999) e Saper (1999) para a preparação de imagens digitais para publicação científica.

As barras de calibração das fotomicrografias foram confeccionadas fotografando-se, com os mesmos equipamentos e aumentos, uma lâmina de escala micrométrica calibrada (Leica, Leitz Wetzlar), cuja menor divisão corresponde a 100µm. A nomenclatura e as abreviaturas utilizadas na descrição dos resultados foram baseadas no atlas estereotáxico do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 1998).

5 RESULTADOS

5.1 Injeção de traçador anterógrado na região noradrenérgica A5

Inicialmente, realizaram-se dois casos experimentais para se estabelecer as coordenadas esterotáxicas do grupamento noradrenérgico A5, por meio de lesões eletrolíticas, seguidos de 26 casos de injeção de BDA no A5 e mais 12 casos de injeção de rodamina.

Nos casos N37/2010, N38/2010, N40/2010, N42/2011, N50/2011, N54/2011, N65/2011, N67/2012, N69/2012 e N70/2012, não houve depósito do neurotraçador ou não foi possível definir o sítio de injeção, devido a problemas no procedimento cirúrgico. Em quatro casos (N35/2010, N41/2010, N44/2011 e N57/2011), o sítio de injeção foi muito restrito ou com intensa difusão que não foi possível localizá-lo precisamente.

No caso N118/2012, o sítio de injeção localizou-se no cerebelo. No caso N82/2012, o traçador depositou-se no núcleo vestibular superior (SuVe). Os casos N43/2011, N48/2011, N49/2011 e N102/2012 localizaram-se no núcleo olivar superior lateral (LSO). Nos casos N36/2010 e N73/2011, o nervo facial foi atingido. O pólo rostral do núcleo motor do nervo facial (Mot7) foi atingido em dois casos (N46/2011 e N55/2011) e seu súbnúcleo lateral em um caso (N62/2011).

O sítio de injeção localizou-se na região do grupamento noradrenérgico A5 nos casos N53/2011, N56/2011, N58/2011, N71/2012, N72/2012, N75/2012, N76/2012, N78/2012 e N122/2012 (Figuras 10 e 11). Nesses casos, observamos fibras marcadas com o traçador anterógrado na raiz coclear e núcleos cocleares. Como controle dessas injeções, foram observadas também outras áreas descritas na literatura como campos de eferência do A5. Assim, encontramos fibras no núcleo rostroventrolateral (RVL), núcleo do trato solitário (NTS), complexo bozinger (Bo), núcleos parabraquiais, substância cinzenta periaquedutal lateral (LPAG) e ventrolateral (VLPAG).

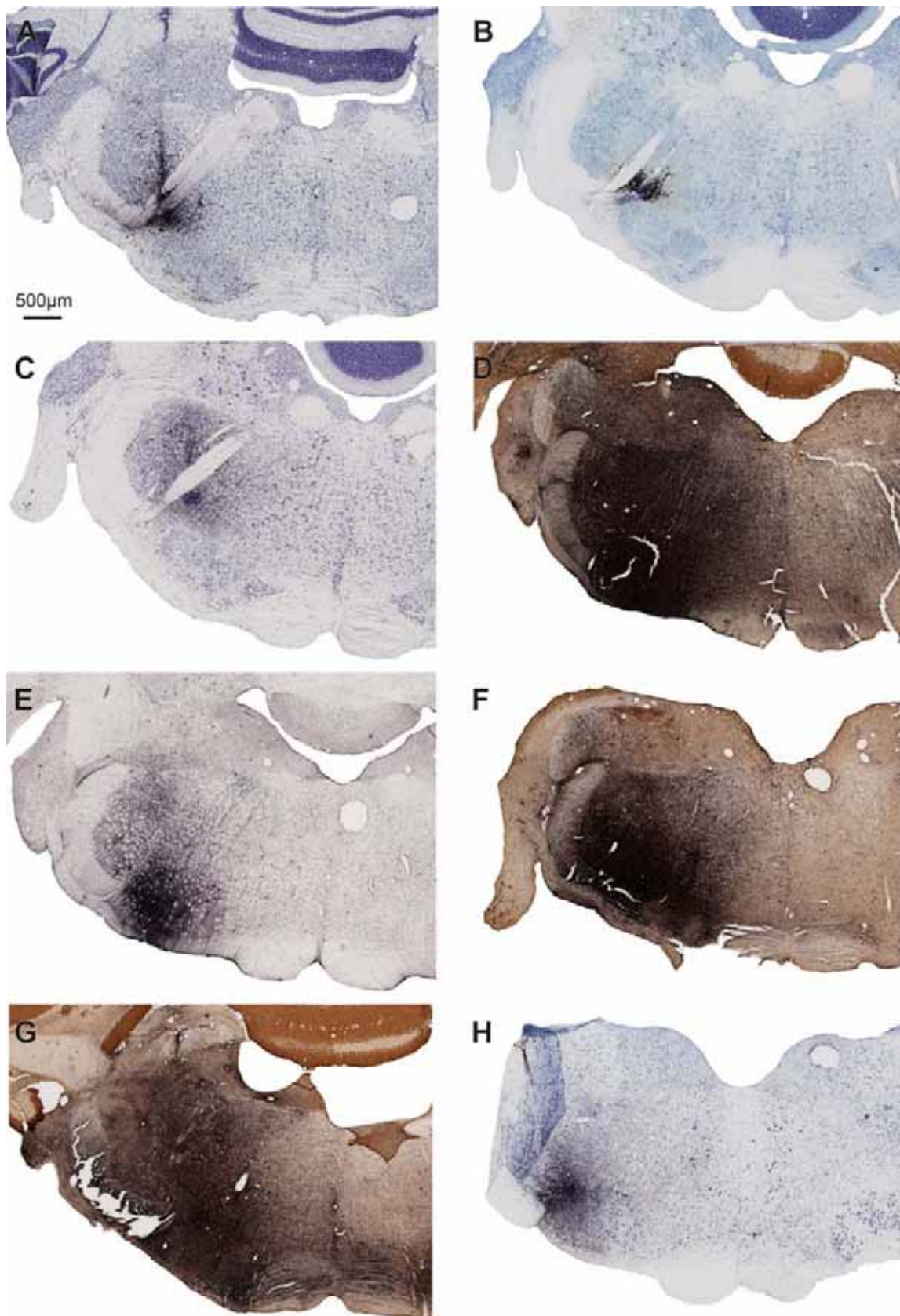


Figura 10. Fotomicrografias dos sítios de injeção de BDA e RD no grupamento A5. Cortes coronais do tronco encefálico no nível do centro das zonas de injeção nos casos: N53/2011 (A), N56/2011 (B), N58/2011 (C), N71/2012 (D), N72/2012 (E), N75/2012 (F), N76/2012 (G), N78/2012 (H). A barra de calibração é válida para todos os cortes.

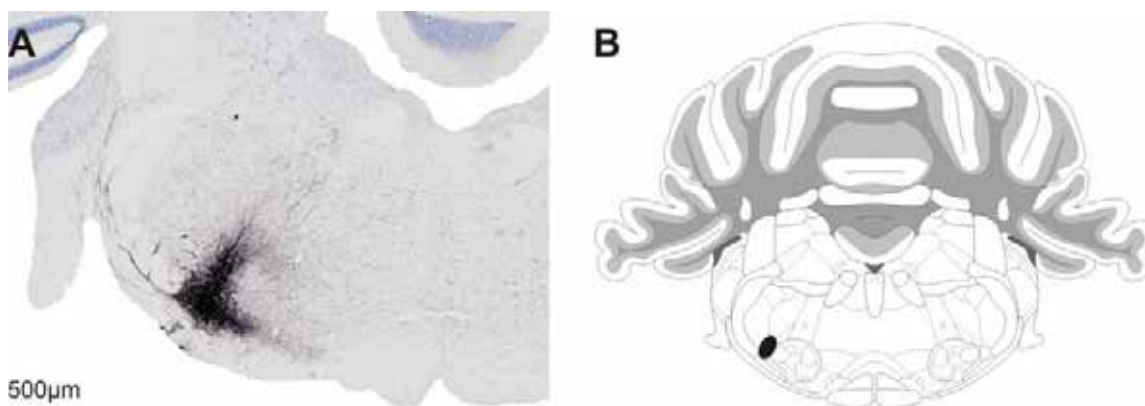


Figura 11. Sítio de injeção de BDA no grupamento A5 no caso N122/2012. Em A, fotomicrografia do sítio de injeção de BDA, localizado na região do grupamento A5. Em B, esquema do tronco encefálico do rato (nível interaural = -1,68mm) com representação do local de injeção.

O estudo da raiz coclear nesses casos possibilitou a visualização de fibras nervosas marcadas, que captaram o BDA no grupamento A5, e enviam aferências aos neurônios da raiz coclear (Figura 13). Para visualizarmos de forma mais evidente a relação entre as fibras oriundas do A5 e os neurônios da raiz coclear foram feitos estudos com dupla marcação nos quais revelamos o traçador (RD e BDA) e depois os neurônios da raiz coclear com protocolo de imuno-histoquímica para calbindina D28K. Como resultado, foram observadas fibras nervosas e terminações axonais sobre e ao redor do soma e dos dendritos dos neurônios da raiz coclear (Figura 13). Além da raiz coclear, encontramos fibras em outros núcleos relacionados indiretamente com a via do RAS como o LPGi, *locus caeruleus*, PnC e colículo inferior. Em todos os casos, a projeção do A5 em direção à raiz coclear é ipsilateral e os axônios dos neurônios do A5 alcançam a raiz através do corpo trapezóide. As fibras marcadas anterogradamente na raiz coclear situam-se lateralmente e possuem muitas varicosidades em passagem.

5.2 Identificação neuroquímica das aferências da região noradrenérgica A5 aos CRN

A análise em microscopia confocal do caso experimental N122/2013 revelou a presença de fibras oriundas do grupamento A5, preenchidas por BDA (marcador CY3 – vermelho); fibras noradrenérgicas, imuno-reativas à enzima DBH (marcador CY2 – verde); e fibras oriundas do A5 que são noradrenérgicas (Figura 14). As fibras que apresentam co-localização foram analisadas em imagens de projeção ortogonal nas quais se constatou que as fibras preenchidas com BDA e imuno-reativas à DBH encontravam-se no mesmo plano focal e, portanto, co-localizavam ambas as substâncias (Figura 15).

Entretanto, é possível observar que existe uma grande quantidade de fibras noradrenérgicas na raiz coclear que não são aferências do grupamento A5; assim como existem fibras aferentes do A5 que não expressam a enzima dopamina β -hidroxilase e cuja identidade neuroquímica é desconhecida até o momento.

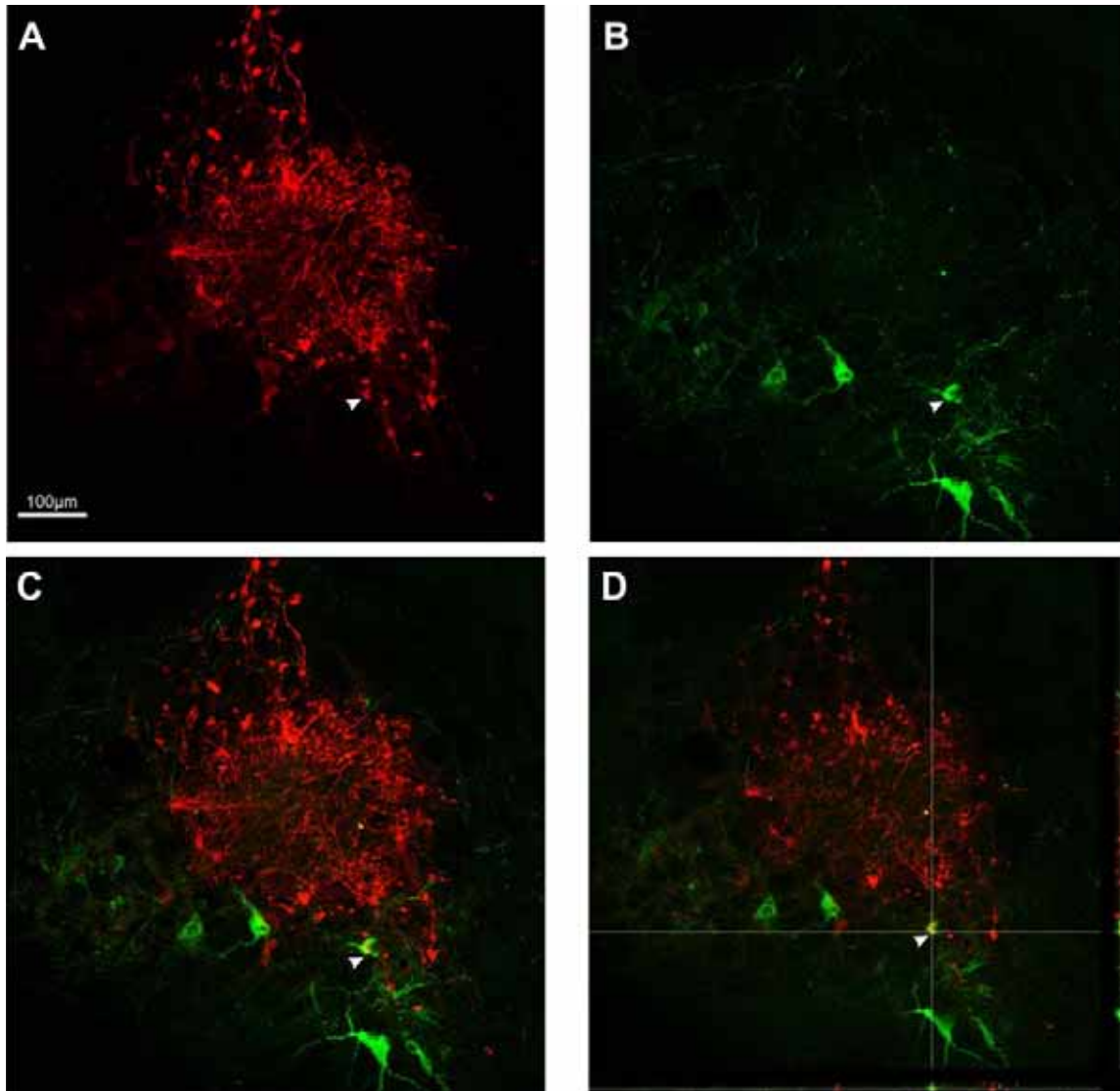


Figura 12. Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal do grupamento A5 após injeção de BDA (N122/2012). Em A, sítio de injeção de BDA marcado com o fluoróforo CY3. A cabeça de seta indica um neurônio que captou BDA e, concomitantemente, é noradrenérgico. Em B, imuno-histoquímica para a enzima DBH, marcada com o fluoróforo CY2. Em C, sobreposição das imagens A e B demonstrando que o neurônio indicado foi duplamente marcado. Em D, projeção ortogonal da imagem de máxima projeção, destacando que a co-localização acontece no mesmo plano focal. A barra de calibração em A é válida para todas as fotos.

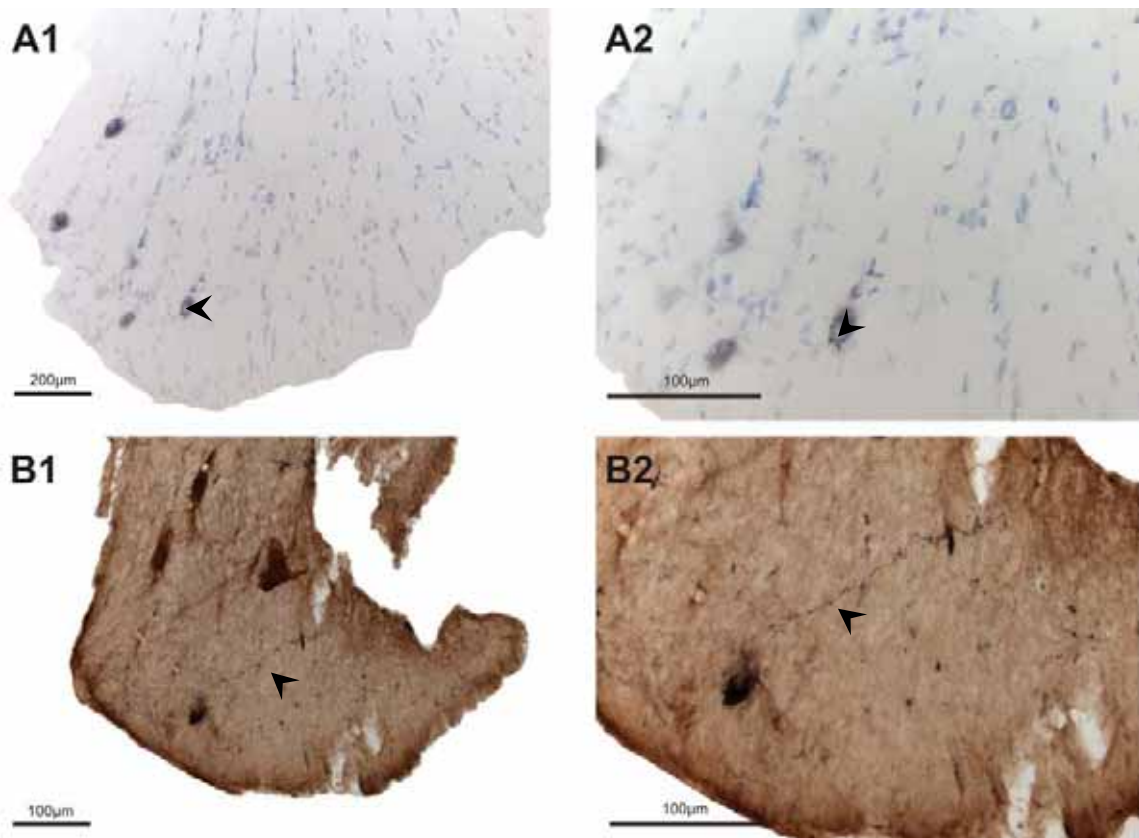


Figura 13. Fibras oriundas do grupamento A5 nos CRN. Em A1 e A2, raiz coclear ipsilateral ao sítio de injeção de BDA no A5 na qual se observam fibras (cabeça de seta) ao redor dos neurônios da raiz coclear contracolorados pelo método de Nissl. Em B1 e B2, fibra aferente aos CRN (cabeça de seta) destacada após a injeção de rodamina do grupamento A5 ipsilateral ao redor dos neurônios da raiz coclear marcados com calbindina D28K.

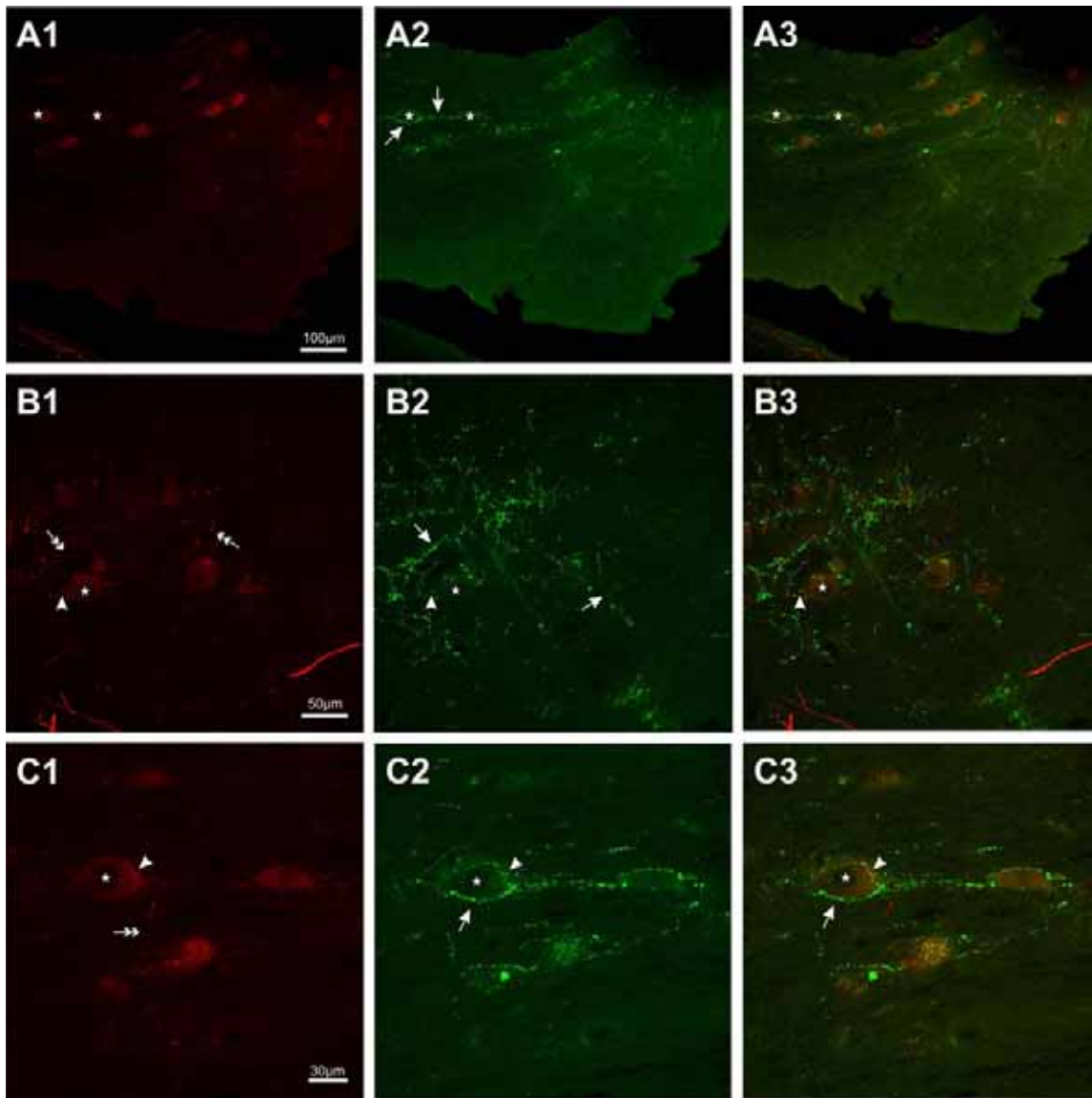


Figura 14. Fotomicrografias da raiz coclear em microscopia confocal (N122/2012). As imagens 1, 2 e 3 correspondem, respectivamente, à imuno-histoquímica para DBH (CY3), BDA (CY2) e a sobreposição das duas imagens, para se identificar regiões de co-localização. As cabeças de seta indicam as fibras noradrenérgicas oriundas do A5. As setas simples indicam projeções noradrenérgicas que não provêm do grupamento A5. As setas duplas indicam projeções provenientes do A5 que não são noradrenérgicas. Os asteriscos marcam neurônios da raiz coclear. As barras de calibração na coluna 1 são válidas para todas as imagens da mesma série nas colunas 2 e 3.

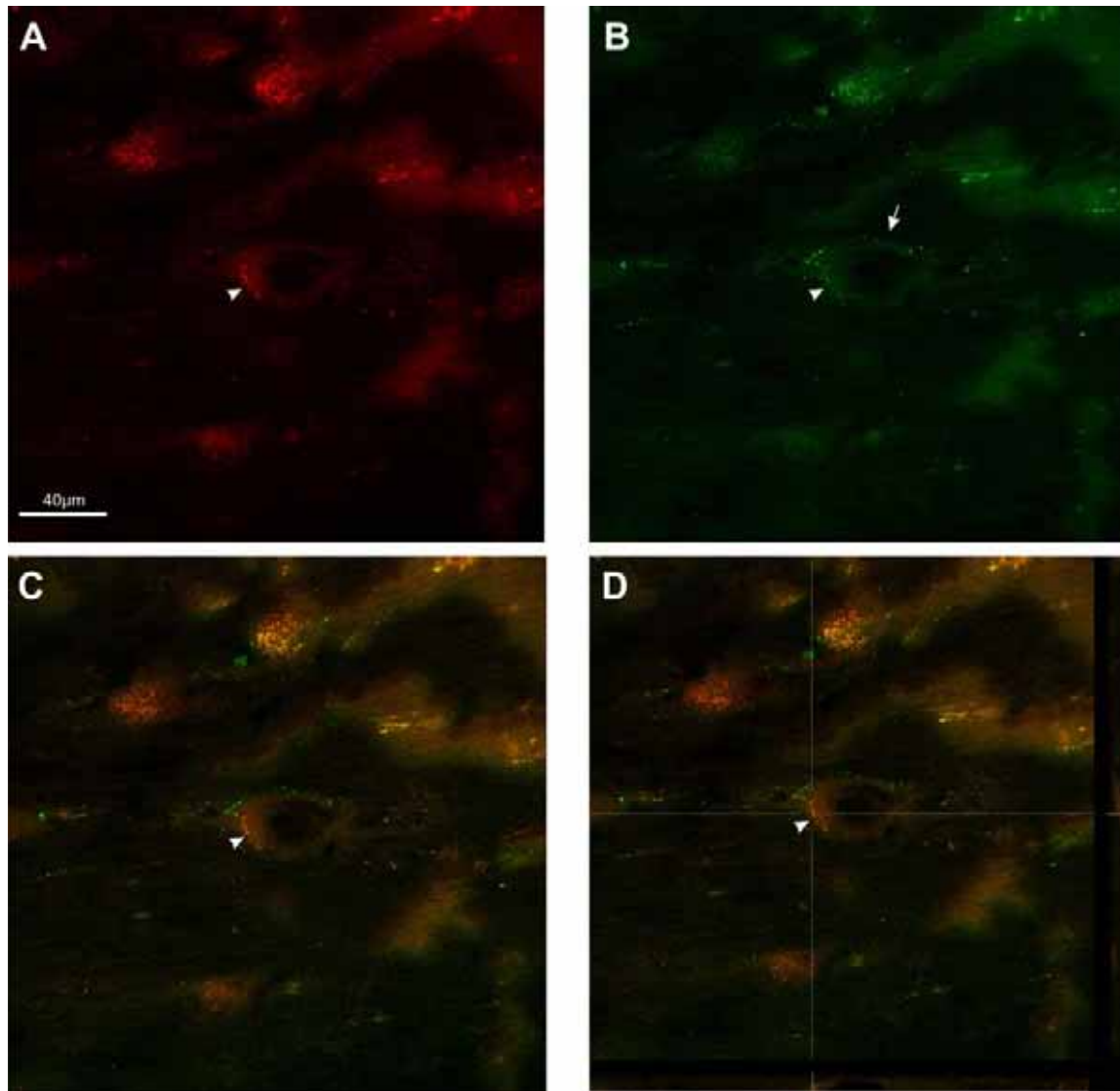


Figura 15. Fotomicrografia de fibras noradrenérgicas oriundas do grupamento A5 na raiz coclear (N122/2012). A cabeça de seta indica a fibra duplamente marcada com BDA e DBH. Em A, revelação das fibras que captaram BDA no grupamento A5 (CY3). Em B, imuno-histoquímica para a enzima precursora DBH (CY2). A seta simples indica projeções noradrenérgicas aos CRN que não são provenientes do A5. Em C, sobreposição das imagens A e B, mostrando uma fibra imunorreativa ao BDA e à DBH. Em D, projeção ortogonal da fibra indicada, mostrando que as duas marcações estão presentes no mesmo plano focal. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

5.3 Padronização do protocolo de mensuração do RAS e PPI

Os níveis de pressão sonora dB-SPL capazes de serem gerados pelos alto-falantes do sistema de mensuração do sobressalto foram medidos em diferentes potências afim de se obter uma curva de calibração para cada caixa (Figura 16), nos diferentes tipos de estímulos: ruído de fundo e pulso ou pré-pulso (ruído branco ou tom puro de alta intensidade). Seguindo a literatura (CASTELLANO et al., 2009; KINKEAD et al., 2008; KOCH, 1998; LEHMANN et al., 1999; LI et al., 1998; REIJMERS e PEETERS, 1994; VAN DEN BUUSE e EIKELIS, 2001), calibramos os parâmetros da sessão de

mensuração do RAS e PPI: intensidade do ruído de fundo em 60dB (potência = 15,29%) e pulso desencadeante do sobressalto em ruído branco com 113dB (potência = 100%). Para os 19 tipos de pré-pulso estudados (tabela 1) foram adotadas as calibrações indicadas na tabela 4.

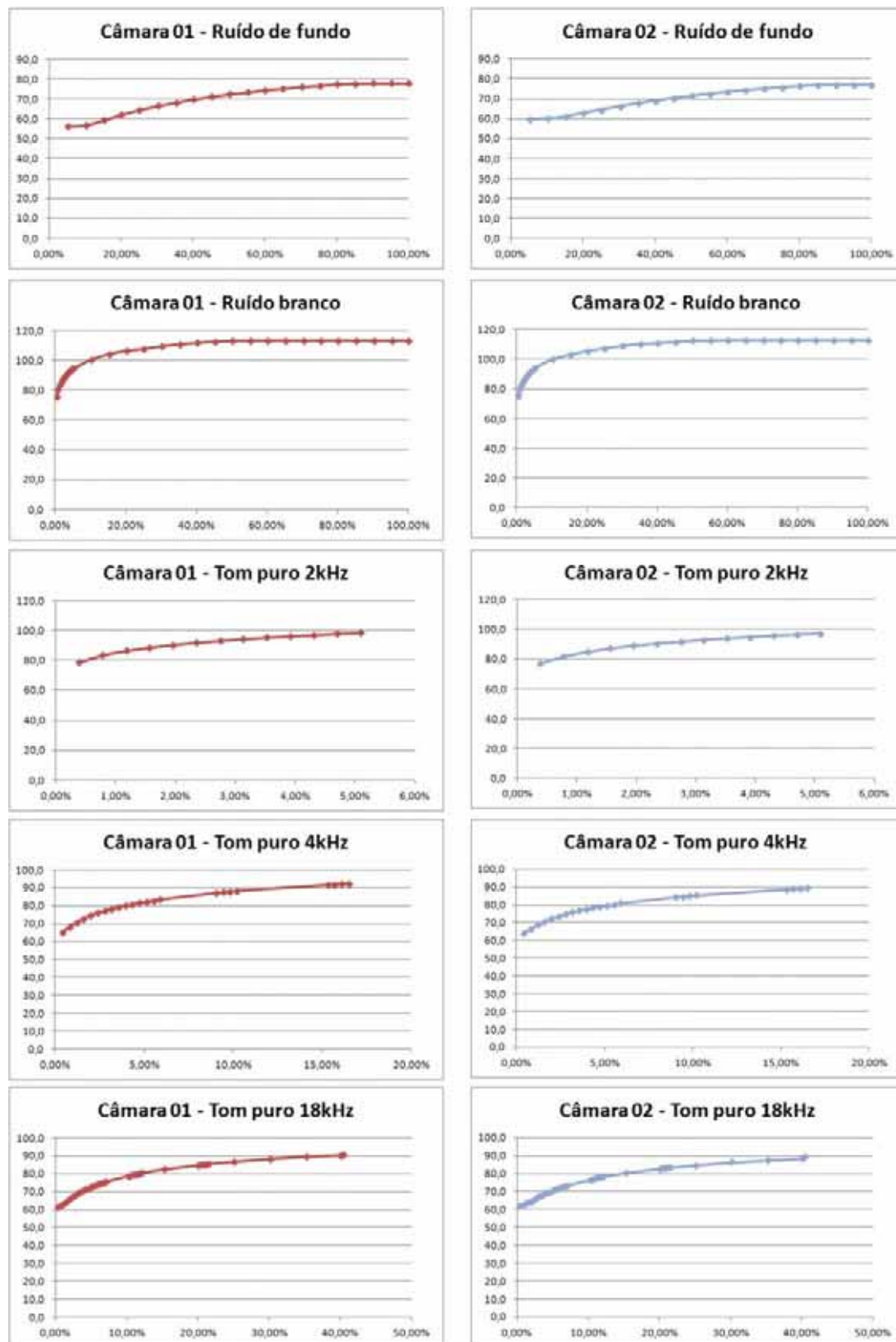


Figura 16. Curvas de calibração dos estímulos acústicos nas duas câmaras de prova.

A seguir, os diferentes tipos de pré-pulso foram analisados quanto à sua capacidade de inibirem a resposta de sobressalto. Quatro fêmeas (102-141 dias) foram submetidas aos diferentes protocolos experimentais, sendo que, em todas as tentativas com o pulso isolado, os animais apresentam respostas claras de sobressalto, com amplitude média de 1458,27g. Ao longo das mensurações, que aconteceram em um período de 14 dias, não foi observada habituação do reflexo (Figura 17).

Característica do pré-pulso	Intensidade do estímulo	Potência calibrada no aparelho
Ruído branco	75dB	0,39%
	80dB	0,78%
	85dB	1,57%
	90dB	3,14%
Tom puro – 2kHz	80dB	0,78%
	85dB	1,18%
	90dB	1,96%
Tom puro – 4kHz	65dB	0,39%
	70dB	1,18%
	75dB	2,35%
	80dB	4,31%
	85dB	9,02%
	90dB	15,29%
Tom puro – 18kHz	65dB	1,96%
	70dB	3,92%
	75dB	7,06%
	80dB	12,16%
	85dB	25,10%
	90dB	40,39%

Tabela 4. Intensidade e potência dos pré-pulsos utilizados na padronização do protocolo de mensuração da inibição por estímulo prévio.

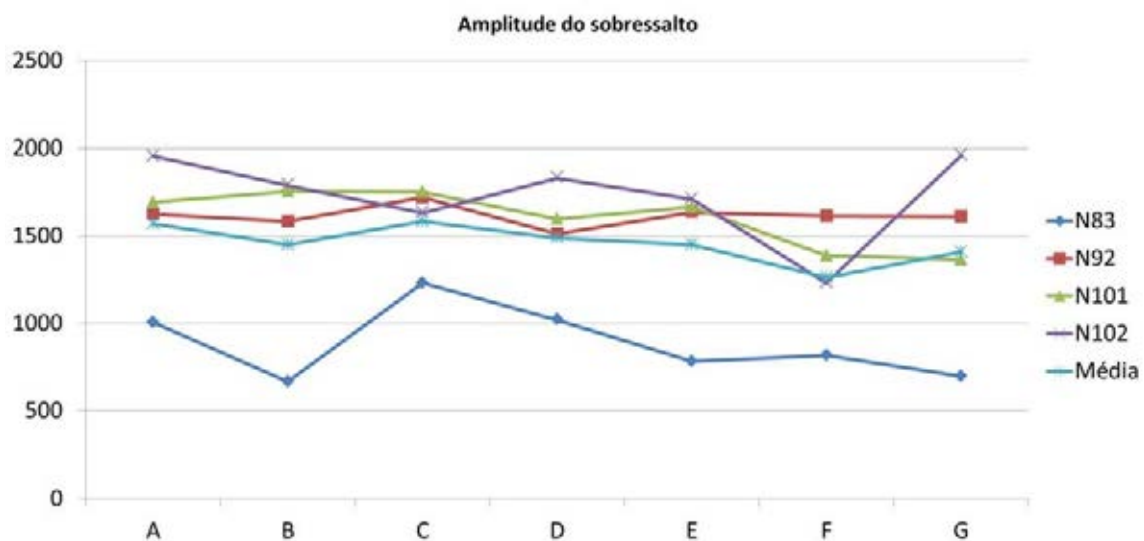


Figura 17. Gráfico da amplitude do sobressalto obtida nas sete sessões de mensuração configuradas, ao longo dos 14 dias de experimento. Observa-se que nenhum dos quatro animais sofreu habituação do reflexo após as repetidas provas de RAS e PPI.

A validade das respostas (detalhes no item 4.2.3) e o desencadeamento do reflexo apenas com a estimulação do pré-pulso foi essencial na determinação dos melhores protocolos para o estudo da PPI. Os pré-pulsos de 2kHz-85dB, 4kHz-70dB, RB-75dB, RB-80dB, RB-85dB e RB-90dB foram os únicos que não desencadearam sobressalto quando apresentados isoladamente (Figura 18). Dentre eles, os pré-pulsos de ruído branco foram excluídos de análises futuras porque exibiram baixíssima PPI, de 1,93% a 6,90%, em média (Figura 19), chegando a valores negativos em alguns animais, exemplificando uma facilitação do sobressalto pelo pré-pulso.

Os pré-pulsos de 2kHz-85dB e 4kHz-70dB, quando apresentados 50ms antes do pulso, foram capazes de gerar uma inibição do reflexo de 43,62% e 41,11%, respectivamente, assim como um índice elevado de respostas válidas (72,5% e 87,5%) (Figura 20).

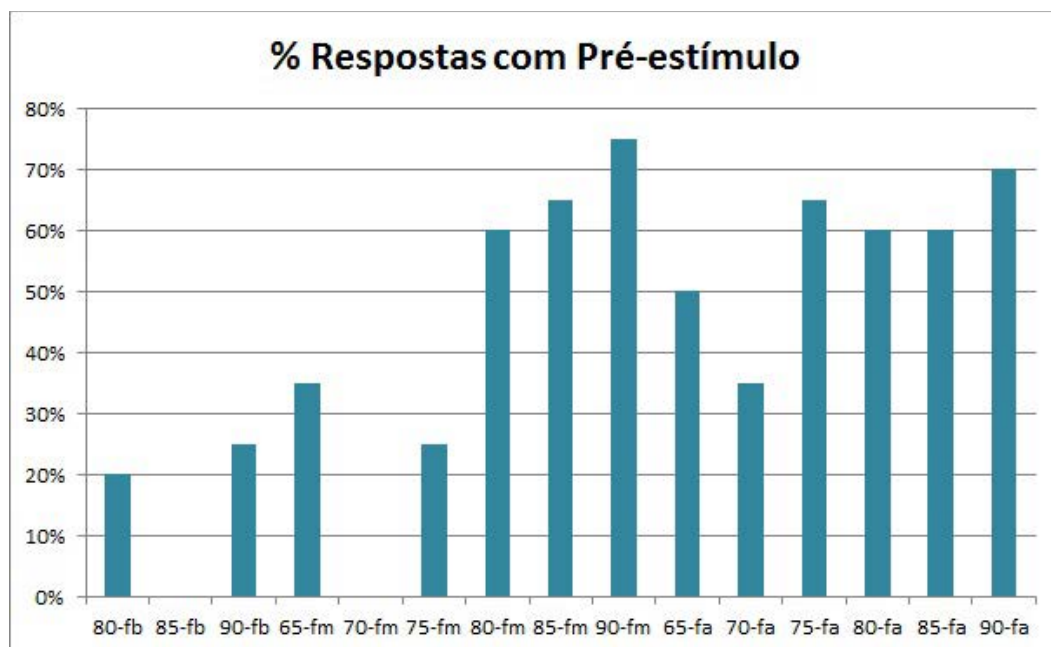


Figura 18. Gráfico da porcentagem de respostas de sobressalto após a estimulação com o pré-pulso isoladamente. Os dados de pré-pulsos com ruído branco foram excluído porque, embora não apresentassem respostas com o pré-pulso, eles não apresentaram PPI correspondente à descrita na literatura para animais controles (Figura 19).

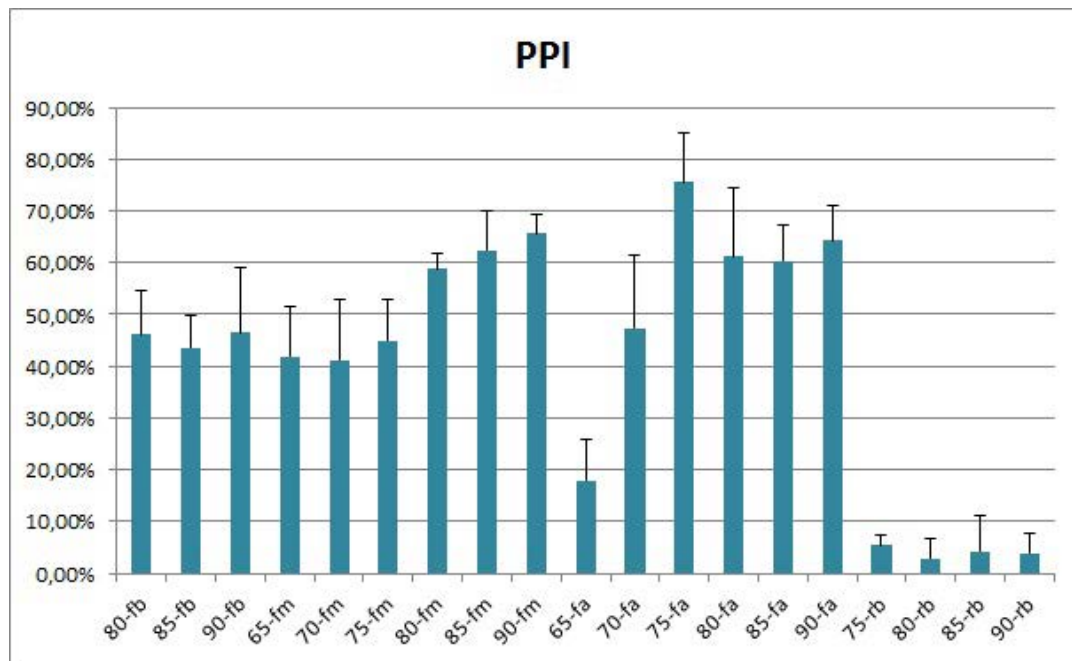


Figura 19. Gráfico da porcentagem média de inibição do sobressalto provocada pelos dezoito pré-pulsos testados. Nota-se que os pré-pulsos em ruído branco apresentaram uma baixa inibição. As barras de erro indicam o erro padrão da média.

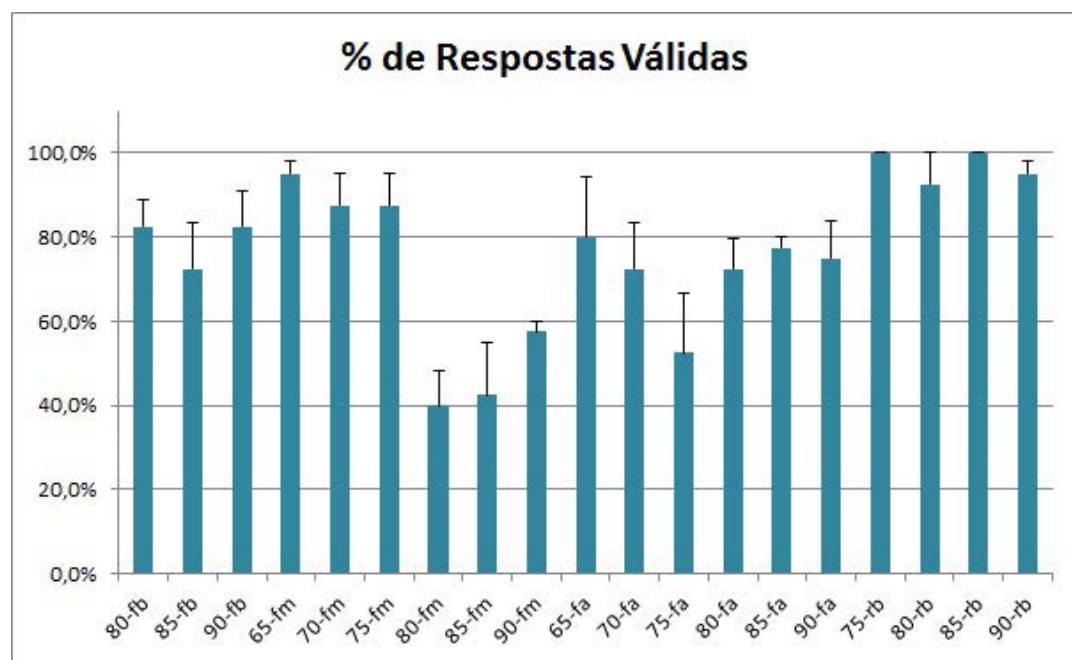


Figura 20. Gráfico da porcentagem de respostas válidas para as estimulações do pré-pulso seguido do pulso. As barras de erro indicam o erro padrão da média.

A partir desses resultados, foram realizadas provas de mensuração do RAS e da PPI com os pré-pulsos de 2kHz-85db e 4kHz-70dB com um maior número de animais (n=14), para se aumentar a validade dos resultados obtidos, refinando-se as diferenças entre os dois estímulos e possibilitando a escolha de um deles como o ideal para nosso modelo experimental. Dentre os 14 animais, três (N93/2012, N94/2012 e N95/2012) foram retirados das análises pois apresentaram baixas amplitudes de sobressalto quando

comparados aos outros animais, influenciando negtivamente a média do grupo e a posterior análises dos protocolos.

Os resultados globais (n=15) sofreram algumas variações, principalmente devido à grande variação intraespecífica, que suscita respostas de amplitude variáveis entre os animais (Figura 21). Esses resultados mostram uma inibição de 35,55% e 33,16% com os pré-estímulos de 2kHz-dB e 4kHz-70dB, respectivamente, mas um aumento das respostas válidas, 84,0% e 90,0%.

A análise estatística através do teste t de Student revelou que não existe diferença entre a inibição provocada pelos dois pré-pulsos ($p>0,05$). Entretanto, nota-se uma tendência do pré-pulso de 4kHz-70dB desencadear menos quantidade de respostas de sobressalto quando apresentado isoladamente (3,0%), se comparado ao pré-pulso se 2kHz-85dB (8,0%).



Figura 21. Gráficos da padronização dos pré-pulsos de 2kHz-85dB (1) e 4kHz-70dB (2) em 15 casos experimentais. Em nenhuma das variáveis estudadas houve diferença significativa entre os dois estímulos. As barras correspondem ao erro padrão da média.

5.4 Coleta e análise de lavados vaginais

A coleta de lavados vaginais permitiu o estadiamento das fases do ciclo estral e suas respectivas transições nos animais de experimentação que foram submetidos à mensuração do RAS e da PPI. Assim, foi possível a identificação de sete estágios do ciclo estral com base nas características do lavado em cada fase (WESTWOOD, 2008) : proestro(P), com predominância de células nucleadas; transição proestro-estro (P-E); estro (E), no qual são encontradas, majoritariamente, células queratinizadas; transição estro-metaestro (E-M); metaestro (M), com distribuição igualitária de células queratinizadas, células nucleadas e leucócitos polimorfonucleares; transição metaestro-diestro (M-D); e diestro (D), com predominância de leucócitos polimorfonucleares (Figura 22).

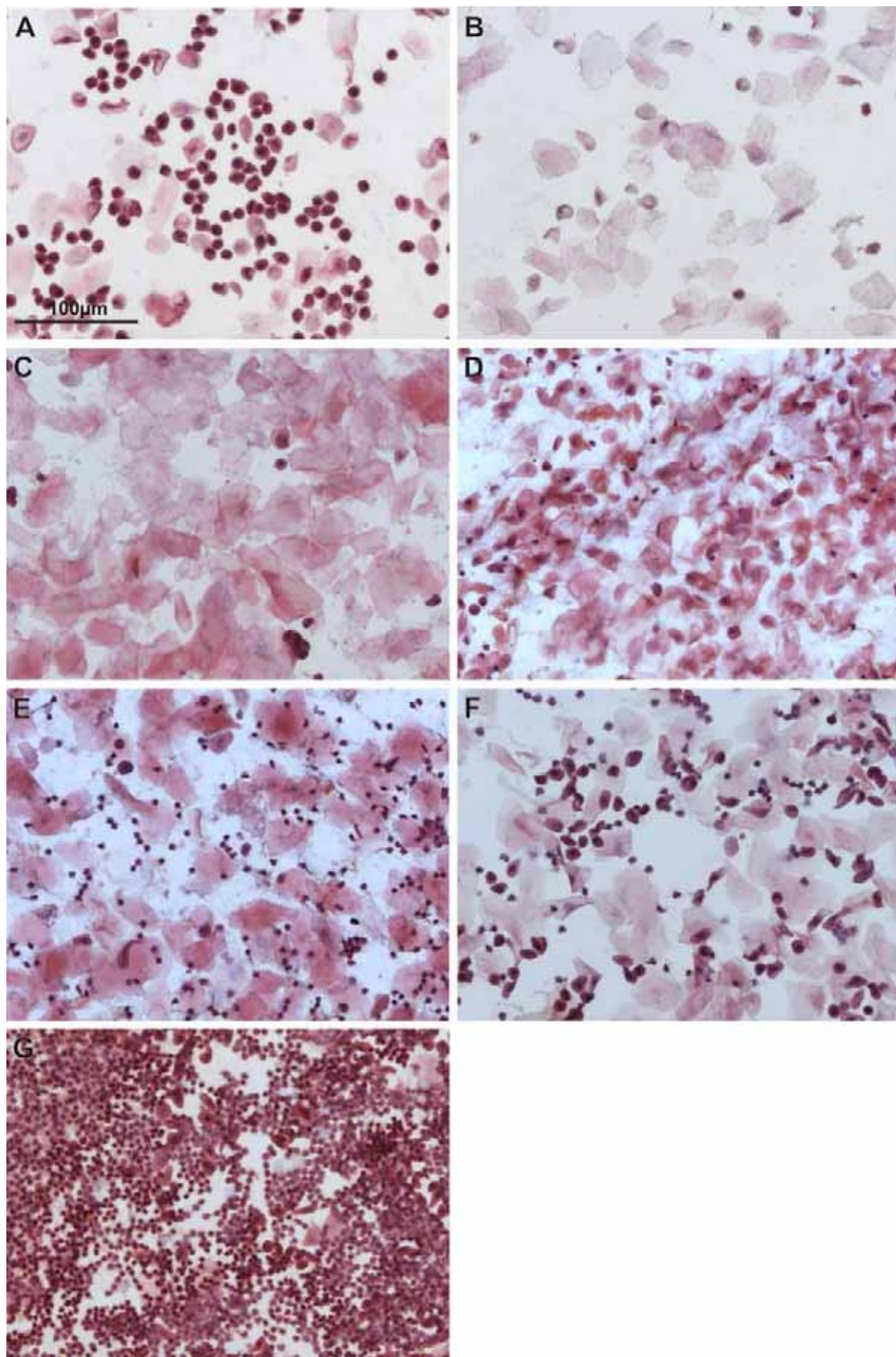


Figura 22. Fotomicrografias das fases do ciclo estral. Em A, representação do proestro. Em B, transição entre proestro e estro. Em C, estro. Em D, transição entre estro e metaestro. Em E, representação do metaestro. Em F, transição entre metaestro e diestro. Em G, diestro. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

5.5 Correlação entre o reflexo auditivo de sobressalto e o ciclo estral

Foram realizadas as provas basais e de PREPISI que permitiram a seleção dos animais de experimentação que formaram o grupo de estudo da possível influência do ciclo estral no sobressalto e em sua inibição por estímulo prévio. Foram selecionados os casos N135/2013, N136/2013, N137/2013, N140/2013, N141/2013, N142/2013, N144/2013, N146/2013, N147/2013, N148/2013, N150/2013, N151/2013, N152/2013, N153/2013, N155/2013, N156/2013, N159/2013, N160/2013, N161/2013 e N162/2013 (n=20), que foram submetidos a 10 provas de mensuração do RAS e PPI com a sessão PREPISI e 20 coletas de lavado vaginal.

As fases do ciclo estral estadiadas são apresentadas na tabela 5, sendo que cada momento corresponde a um dos dez momentos de observação do RAS/PPI. Devido à mensuração repetida do RAS e PPI, inicialmente, foi analisado se os animais não sofriam habituação ao longo do tempo, ou seja, se a amplitude do RAS diminuía após vários dias de prova (Figura 23). A comparação das amplitudes médias de RAS em cada momento da mensuração pela técnica de ANOVA demonstrou que os animais não sofreram habituação ($p>0,05$) com o passar do tempo, indicando que testes consecutivos durante 20 dias, a cada 48 horas, podem ser realizados sem o comprometimento do reflexo.

A seguir, comparou-se a média do RAS, bem como da PPI nas diferentes fases do ciclo estral (Figuras 24 e 25). Vale ressaltar que a quantidade de respostas em cada uma das fases não foi a mesma, mas testes estatísticos paramétricos puderam ser realizados. A quantidade de respostas em cada fase distribuiu-se da seguinte maneira: proestro = 5; proestro-estro = 33; estro = 47; estro-metaestro = 3; metaestro = 12; metaestro-diestro = 11; diestro = 89.

Houve diferença significativa ($p<0,05$) apenas na resposta de sobressalto entre as fases de proestro e estro. No proestro, a média do RAS ($451,23\pm185,424$ S.E.M.) foi menor do que durante o estro ($953,168\pm303,595$ S.E.M.).

Animal	Momentos de observação									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N135	M	D	P-E	D	E	D	M	D	M	D
N136	P-E	D	E	D	E	D	E	D	E	D
N137	M-D	E	D	E-M	D	E	D	D	E	D
N140	E	D	E	M-D	P-E	D	E	D	P-E	D
N141	P-E	D	P-E	M-D	E	M	D	D	P-E	M-D
N142	M-D	P-E	D	E	D	P-E	D	P-E	D	P-E
N144	E	D	M	D	E	D	E	D	P-E	D
N146	P-E	D	P-E	D	P-E	D	P	D	P-E	M-D
N147	D	M	D	E	P-E	E-M	D	E	D	E
N148	D	M-D	E	M-D	P-E	D	D	M	M	D
N150	P-E	D	P-E	D	P-E	D	D	D	D	D
N151	M	D	E	D	M	M-D	M	D	M	D
N152	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
N153	P-E	E	D	E	D	P-E	D	E	P-E	P-E
N155	E	D	P	D	P	D	P-E	D	P	D
N156	D	E	D	E	D	E	D	E	D	P-E
N159	D	E	D	E	D	E	M-D	E	D	E
N160	D	D	P-E	P-E	M-D	P	D	P-E	D	P-E
N161	D	E	D	E	D	E	D	E-M	D	E
N162	E	P-E	E	D	P-E	D	E	D	E	D

Tabela 5. Fases do ciclo estral estadiadas para cada um dos animais nos dias de mensuração do RAS e da PPI. Para as abreviaturas, veja a lista de abreviaturas.

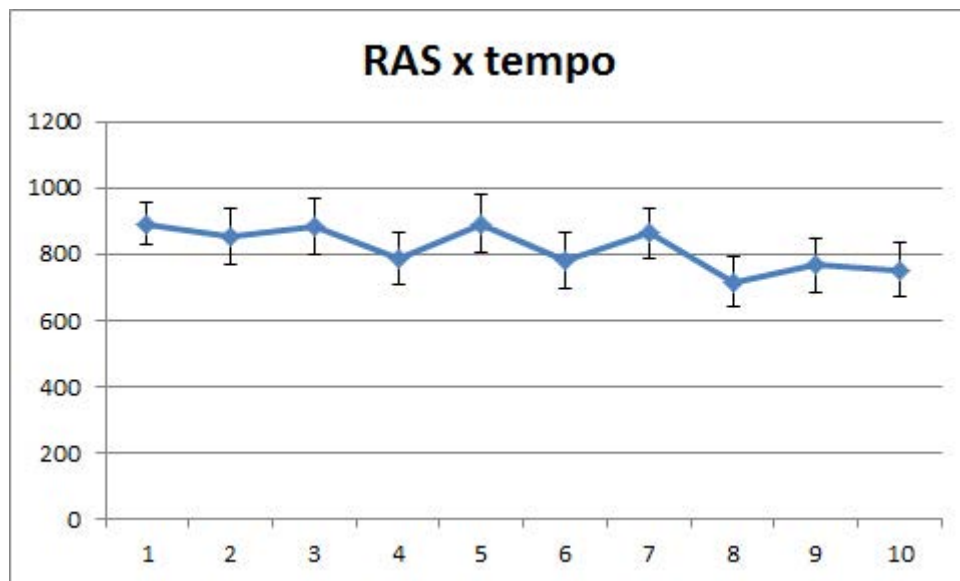


Figura 23. Gráfico da amplitude média do RAS ao longo dos 10 momentos de mensuração do reflexo. É possível observar que os animais não sofreram habituação do sobressalto durante o protocolo experimental. As barras de erro indicam o erro padrão da média.

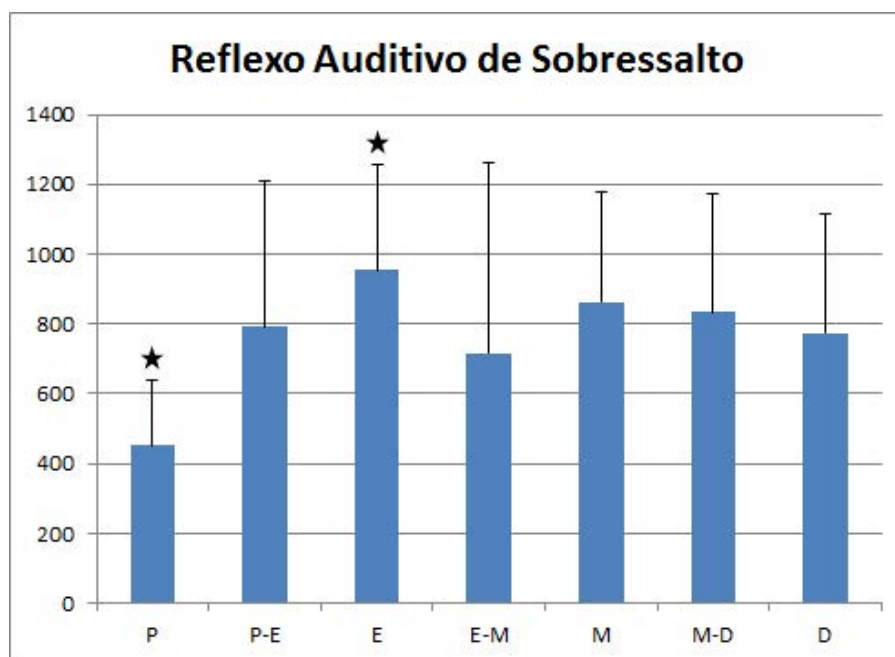


Figura 24. Gráfico da amplitude média do RAS nas diferentes fases do ciclo estral e suas transições. A amplitude do sobressalto durante a fase de proestro é menor ($p < 0,05$) do que durante a fase de estro. As barras de erro indicam o erro padrão da média. Para as abreviaturas, veja a lista de abreviaturas.

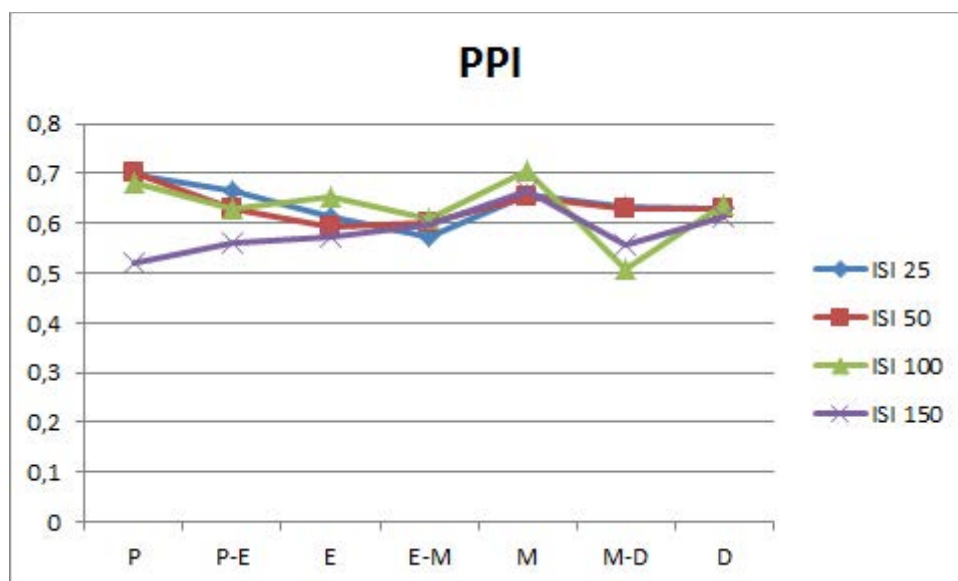


Figura 25. Gráfico da PPI média frente às diferentes fases do ciclo estral e suas transições. Não existe diferença significativa entre as fases do ciclo estral e a porcentagem de inibição do sobressalto. Para as abreviaturas, veja a lista de abreviaturas.

6 DISCUSSÃO

6.1 Aferências do grupamento noradrenérgico A5 aos CRN

Identificamos e caracterizamos neuroquimicamente as aferências aos neurônios da raiz coclear provenientes do grupamento noradrenérgico A5, confirmando os resultados obtidos após a injeção de neurotraçador retrógrado na raiz coclear.

A influência da noradrenalina no RAS foi verificada previamente pela administração sistêmica de agonistas (SAITOH et al., 1986) e antagonistas de receptores adrenérgicos (BAKSHI e GEYER, 1997; DAVIS et al., 1977). A noradrenalina atua por meio de receptores do sistema nervoso central (ASTRACHAN et al., 1983) sem a participação de receptores periféricos (ALSENE et al., 2006). Os aspectos funcionais das aferências noradrenérgicas do RAS e PPI ainda não são bem conhecidos e podem variar na dependência do tipo de receptores com os quais elas estejam relacionadas (BYLUND, 1992; CARASSO et al., 1998; DAVIS et al., 1989; KABLE et al., 2000; SALLINEN et al., 1998; STEVENS et al., 1994). Além disso, existem evidências de que a noradrenalina poderia estimular receptores de forma parácrina (VIZI et al., 2004).

Estudos prévios sugerem que a noradrenalina possua papel modulatório no reflexo de sobressalto por aumentar a sensibilidade do processamento acústico ou diminuir o limiar de seu desencadeamento. Drogas que aumentam a disponibilidade desse neurotransmissor aumentam a resposta reflexa. (DAVIS, 1980). Além disso, sabe-se que agonistas de receptores noradrenérgicos $\alpha 1$ e β diminuem a inibição do reflexo de sobressalto quando infundidos em centros controladores da PPI (ALSENE et al.).

Essa conexão poderia também indicar uma modulação do RAS por centros ativadores do sistema nervoso autônomo, que participam da resposta de sobressalto desencadeada por um estímulo acústico. O grupamento A5 poderia apresentar um papel importante na regulação do reflexo pelo sistema autônomo, visto que esse grupo envia aferências à parte lateral do bulbo ventrolateral caudal, região que integra funções cardiovasculares, atividade motora e respostas nociceptivas (COBOS et al., 2003). Assim, o A5 possuiria uma função análoga à do *locus caeruleus* – maior fonte de noradrenalina no encéfalo do rato (GOMEZ-NIETO et al., 2008a) – que inerva vastas áreas encefálicas ligadas à integração sensoriomotora.

Essas duas regiões noradrenérgicas poderiam, então, serem as duas partes de um único sistema funcional, que influenciaria diferentes regiões do encéfalo (BYRUM e GUYENET, 1987), atuando de maneira complementar nos CRN, uma vez que existem conexões recíprocas entre essas duas áreas. Para elucidar o papel das aferências

noradrenérgicas provenientes do A5, seria interessante mensurar o RAS e a PPI em experimentos de lesão seletiva imunotóxica para neurônios noradrenérgicos (MARQUES-LOPES et al., 2010; TAXINI et al., 2011) empregando o anticorpo anti-dopamina β -hidroxilase conjugado com a saporina (DBH-SAP).

No caso de lesões no grupamento A5, seria importante a abordagem imunotóxica seletiva pois nossos resultados indicam que existem mais aferências oriundas do A5 para os CRN do que as fibras que co-localizam com a enzima dopamina β -hidroxilase, sugerindo que alguns neurônios desse grupo possuam uma outra identidade neuroquímica. Koylu et al. (1998) descreveu células imunorreativas ao transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) no grupamento A5, assim como a co-localização de neurônios noradrenérgicos com CART (BURMAN et al., 2004; KOYLU et al., 1999). O CART é um neuropeptídeo envolvido em diversos processos fisiológicos, incluindo respostas ao estresse (KOYLU et al., 2006) e regulação autônoma (KOYLU et al., 1998).

O CART poderia estar envolvido nas respostas cardiovasculares mediadas pelo grupamento A5 (BURMAN et al., 2004; DUN et al., 2007), pois já foram descritos neurônios imunorreativos ao CART na área adrenérgica C1 que enviam projeções diretas para a coluna intermediolateral da medula espinal (DUN et al., 2002), um possível trajeto para ativação do sistema nervoso simpático.

A infusão do peptídeo 42-89 do CART no terceiro ventrículo de camundongos diminui a amplitude do sobressalto, sem alterar a PPI desses animais; já a infusão do peptídeo 49-89 não provocou alterações na resposta do reflexo, mas aumentou a inibição por estímulo prévio (BANNON et al., 2001). Apesar de a variação na PPI poder ser explicada pela existência de neurônios imunorreativos ao CART em áreas relacionadas a essa modulação, como a área tegmental ventral, núcleo accumbens e o pálido ventral (KOYLU et al., 1998), a diminuição do reflexo basal não é satisfatoriamente explicada.

Além do peptídeo CART, foi descrita a presença de células imunorreativas ao neuropeptídeo Y dispersas entre os neurônios do grupamento A5, sem, entretanto, expressarem a enzima tirosina hidroxilase (EVERITT et al., 1984). Entretanto, o papel funcional desse neuropeptídeo na região do A5 ainda é desconhecido.

6.2 Protocolo de mensuração do RAS e da PPI

Apesar de estudos prévios indicarem que a porcentagem de inibição por estímulo prévio do sobressalto seja fracamente dependente da característica do pré-pulso (FENDT

et al., 2001), nossos resultados mostram que os animais apresentam uma inibição muito mais significativa com a utilização de tons puros (2kHz e 4kHz) na estimulação prévia do que com ruído branco, que muitas vezes gerou inibições irrisórias ou facilitação do reflexo (Figura 19).

A escassez de informações na literatura referentes às características do pré-pulso nos levaram a um estudo mais aprofundado a seu respeito. Percebemos que é fundamental a análise das variáveis de ausência de respostas com o pré-pulso isolado e porcentagem de respostas válidas, em conjunto com a PPI, para a definição de um pré-pulso que atenda ao paradigma da inibição por estímulo prévio (FENDT et al., 2001).

O protocolo com o pré-pulso de 4kHz-70dB foi o melhor quando analisamos todas essas variáveis, e sua menor intensidade garante que menos animais apresentem o reflexo de sobressalto com sua estimulação isolada, assim como diminui a probabilidade de habituação com o estímulo prévio e, conseqüentemente, de um aumento na PPI dependente dessa habituação (REIJMERS e PEETERS, 1994).

Apesar da grande diversidade de protocolos para mensuração da PPI, existe uma tendência estabelecida de que curtos pré-pulsos com ruído branco seriam os mais eficientes para a inibição do sobressalto, principalmente no homem (BRAFF et al., 2001; WYNN et al., 2000). Entretanto, demonstrou-se nesse e em estudos prévios que pré-pulsos com tons puros também são capazes de gerar elevadas inibições do reflexo tanto no rato (HOFFMAN e SEARLE, 1968) quanto no homem (BLUMENTHAL, 1997; HSIEH et al., 2006).

A hipótese de que a PPI seja resultado de um apredizado do animal foi estudada por Reijmers & Peeters (1994). Entretanto, esse fenômeno descrito por eles estaria mais relacionado a habituação do sobressalto quando mensurado sem um estímulo prévio, o que poderia alterar as razões entre as amplitudes do RAS com ou sem pré-pulso, visto que o aumento na PPI só é observado após as dez primeiras tentativas da prova. A inibição do reflexo é observada logo a partir da primeira exposição do animal ao teste (KOCH, 1999), indicando que é uma modulação inata e que não resulta de um mecanismo adquirido com o aprendizado.

6.3 Correlação do ciclo estral com o reflexo auditivo de sobressalto e a inibição por estímulo prévio

Nossos resultados mostram que a amplitude do sobressalto foi menor durante a fase de proestro na qual existe o pico de liberação hormonal, se comparada ao estro; sem

que as porcentagens de PPI sofressem qualquer alteração ao longo das diferentes fases do ciclo estral.

Uma limitação encontrada durante a análise dos dados foi a discrepância entre a quantidade de respostas em cada uma das fases. Esse fato era esperado e está de acordo com as diferentes propabilidades de estadiamento das fases do ciclo estral se nos basearmos em sua duração: proestro, 12 a 14 horas; estro, 25 a 27 horas; metaestro, 6 a 8 horas e diestro, 55 a 57 horas (WESTWOOD, 2008).

Após essas análises, quatro fêmeas que compunham o grupo experimental foram acompanhadas durante mais 20 dias. Essa proposta visou a um estudo longitudinal da correlação entre o ciclo estral e o sobressalto, bem como a análise das variações em um mesmo animal. A comparação intr-sujeito é mais vantajosa que a comparação entre sujeitos porque reduz a quantidade de animais (WINSLOW et al., 2007), uma prática eticamente aceitável.

Entretanto, essa análise longitudinal não foi adequada porque a quantidade de observações em cada uma das fases do ciclo foi pequena, o que não permite que sejam realizados testes estatísticos paramétricos, enfraquecendo os resultados obtidos. Para que as fases fossem observadas em quantidades adequadas, o reflexo teria que ser medido nos animais durante um período de tempo muito longo, o que acarretaria habituação do RAS, prejudicando a comparação entre o início do experimento e seu término.

O RAS e a PPI estão alterados em distúrbios neuropsiquiátricos, que apresentam diferenças de sintomas entre mulheres e homens, provavelmente por influência do estrógeno (KOCH, 1998). Em mulheres, os sintomas da esquizofrenia costumam surgir 1,5 a 4,5 anos depois do que comumente ocorre em homens.

Fêmeas são geralmente excluídas, ou classificadas em um único grupo, nos estudos de mensuração de RAS e PPI (ADAMS et al., 2008), devido às possíveis variações que o ciclo estral poderia causar nesses comportamentos. Estudos que buscaram descrever o reflexo de sobressalto e a PPI em fêmeas apontam que não existe variação do reflexo basal, mas que a inibição por estímulo prévio pode ser alterada ao longo do ciclo estral (ADAMS et al., 2008; KINKEAD et al., 2008; KOCH, 1998). Em machos orquidectomizados, foi demonstrado que o tratamento com estradiol diminui a amplitude do sobressalto, quando comparado a ratos controles ou sem reposição hormonal (TURVIN et al., 2007), mas a PPI não sofre qualquer influência da ausência ou não de hormônios como o estradiol, testosterona e 5 α -diidrotestosterona.

A habituação intra-sessão do reflexo auditivo de sobressalto é maior em camundongos fêmeas ovariectomizadas que receberam tratamento de reposição com 17β -estradiol do que aquelas que tratadas com placebo (CHARITIDI et al.). Apesar desses resultados indicarem que não existe variação da resposta do RAS ao longo do ciclo estral, essa maior habituação frente a elevadas concentrações de estradiol indicaria que o hormônio atua no circuito elementar do reflexo, proporcionando essa habituação rápida, como a que ocorre dentro de uma mesma sessão de mensuração.

No entanto, a via pela qual os hormônios sexuais, como o estrógeno, influenciariam os núcleos mediadores do reflexo de sobressalto é desconhecida. Estudos de distribuição de receptores de estrógeno α e β no sistema nervoso central do rato (SHUGHRUE et al., 1997) não demonstram a existência desses receptores no circuito elementar do reflexo de sobressalto, mas novos estudos precisam ser realizados para se compreender o mecanismo de ação desses hormônios.

7 CONCLUSÃO

Os neurônios da raiz coclear recebem aferências do grupamento A5, classicamente conhecido por ser uma fonte de noradrenalina no encéfalo do rato, que são tanto noradrenérgicas quanto de uma identidade neuroquímica ainda desconhecida. Essa aferência pode estar relacionada à ativação do sistema nervoso autônomo desencadeada pelo reflexo acústico de sobressalto, mas a comprovação funcional dessa inervação deverá ser caracterizada por meio de lesões seletivas no grupamento A5 e sua influência no sobressalto realizando mensurações de RAS e PPI nos animais lesionados.

Ademais, os experimentos de mensuração do sobressalto mostram que um pré-pulso de 4kHz com intensidade de 70dB é o mais eficiente para a inibição do reflexo, assim como existe variação no sobressalto basal de fêmeas ao longo do ciclo estral. A maior amplitude de sobressalto é encontrada na fase de estro.. A influência dos hormônios sexuais no comportamento de sobressalto precisa ser estudada, principalmente no que diz respeito ao mecanismo e vias pelos quais esses hormônios atuam nos centros mediadores do reflexo.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, A. L. et al. Effects of estrous stage and time of day on prepulse inhibition in female rats. **J Neurosci Methods**, v. 173, p. 295-8, 2008.
- AITKIN, L. The auditory neurobiology of marsupials: A review. **Hear Res**, v. 82, p. 257-66, 1995.
- ALSENE, K. M. et al. Disruption of prepulse inhibition after stimulation of central but not peripheral alpha-1 adrenergic receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, p. 2150-61, 2006.
- ALSENE, K. M. et al. Discrete forebrain neuronal networks supporting noradrenergic regulation of sensorimotor gating. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 1003-14,
- ANISMAN, H. et al. Acoustic startle and fear-potentiated startle in rats selectively bred for fast and slow kindling rates: Relation to monoamine activity. **Eur J Neurosci**, v. 12, p. 4405-16, 2000.
- ASTRACHAN, D. I.; GALLAGER, D. W.; DAVIS, M. Behavior and binding: Desensitization to alpha 1-adrenergic stimulation of acoustic startle is associated with a decrease in alpha 1-adrenoceptor binding sites. **Brain Res**, v. 276, p. 183-7, 1983.
- BAKSHI, V. P.; GEYER, M. A. Phencyclidine-induced deficits in prepulse inhibition of startle are blocked by prazosin, an alpha-1 noradrenergic antagonist. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 283, p. 666-74, 1997.
- BANNON, A. W. et al. Multiple behavioral effects of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (cart) peptides in mice: Cart 42-89 and cart 49-89 differ in potency and activity. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 299, p. 1021-6, 2001.
- BAUDRIE, V. et al. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. **J Auton Pharmacol**, v. 17, p. 303-9, 1997.
- BELL, R. L. et al. Amphetamine-modified acoustic startle responding and prepulse inhibition in adult and adolescent alcohol-preferring and -nonpreferring rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, p. 163-71, 2003.
- BLUMENTHAL, T. D. Prepulse inhibition decreases as startle reactivity habituates. **Psychophysiology**, v. 34, p. 446-50, 1997.

- BOROWSKI, T. B.; KOKKINIDIS, L. Cocaine preexposure sensitizes conditioned fear in a potentiated acoustic startle paradigm. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, p. 935-42, 1994.
- BRAFF, D. L.; GEYER, M. A.; SWERDLOW, N. R. Human studies of prepulse inhibition of startle: Normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 156, p. 234-58, 2001.
- BURMAN, K. J. et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in catecholamine and noncatecholamine presympathetic vasomotor neurons of rat rostral ventrolateral medulla. **J Comp Neurol**, v. 476, p. 19-31, 2004.
- BYLUND, D. B. Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. **Faseb J**, v. 6, p. 832-9, 1992.
- BYRUM, C. E.; GUYENET, P. G. Afferent and efferent connections of the a5 noradrenergic cell group in the rat. **J Comp Neurol**, v. 261, p. 529-42, 1987.
- CARASSO, B. S.; BAKSHI, V. P.; GEYER, M. A. Disruption in prepulse inhibition after alpha-1 adrenoceptor stimulation in rats. **Neuropharmacology**, v. 37, p. 401-4, 1998.
- CASTELLANO, O. et al. Chronic administration of risperidone to healthy rats: A behavioural and morphological study. **Behav Brain Res**, v. 205, p. 488-98, 2009.
- CHARITIDI, K.; MELTSE, I.; CANLON, B. Estradiol treatment and hormonal fluctuations during the estrous cycle modulate the expression of estrogen receptors in the auditory system and the prepulse inhibition of acoustic startle response. **Endocrinology**, v. 153, p. 4412-21,
- COBOS, A. et al. Brain afferents to the lateral caudal ventrolateral medulla: A retrograde and anterograde tracing study in the rat. **Neuroscience**, v. 120, p. 485-98, 2003.
- DAMY, S. B. et al. [fundamental aspects on animal research as applied to experimental surgery]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, p. 103-11, 2010.
- DAVIS, M. Neurochemical modulation of sensory-motor reactivity: Acoustic and tactile startle reflexes. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 4, p. 241-63, 1980.
- DAVIS, M. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. **Am Psychol**, v. 61, p. 741-56, 2006.
- DAVIS, M. et al. Effects of clonidine on habituation and sensitization of acoustic startle in normal, decerebrate and locus coeruleus lesioned rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 51, p. 243-253, 1977.

- DAVIS, M. et al. Spinal vs. Supraspinal sites of action of the alpha 2-adrenergic agonists clonidine and st-91 on the acoustic startle reflex. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 33, p. 233-40, 1989.
- DAVIS, M. et al. A primary acoustic startle circuit: Lesion and stimulation studies. **J Neurosci**, v. 2, p. 791-805, 1982.
- DUN, S. L. et al. Expression and activity of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide(1-39) in the rat. **Regul Pept**, v. 140, p. 47-54, 2007.
- DUN, S. L. et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide-immunoreactivity in adrenergic c1 neurons projecting to the intermediolateral cell column of the rat. **J Chem Neuroanat**, v. 23, p. 123-32, 2002.
- EVERITT, B. J. et al. Differential co-existence of neuropeptide y (npy)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat. **Neuroscience**, v. 11, p. 443-62, 1984.
- FENDT, M.; LI, L.; YEOMANS, J. S. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 156, p. 216-24, 2001.
- GOMEZ-NIETO, R. et al. Neurochemistry of the afferents to the rat cochlear root nucleus: Possible synaptic modulation of the acoustic startle. **Neuroscience**, v. 154, p. 51-64, 2008a.
- GOMEZ-NIETO, R.; RUBIO, M. E.; LOPEZ, D. E. Cholinergic input from the ventral nucleus of the trapezoid body to cochlear root neurons in rats. **J Comp Neurol**, v. 506, p. 452-68, 2008b.
- GONZALEZ-LIMA, F.; FINKENSTADT, T.; EWERT, J. P. Neural substrates for long-term habituation of the acoustic startle reflex in rats: A 2-deoxyglucose study. **Neurosci Lett**, v. 96, p. 151-6, 1989.
- GRILLON, C. et al. Baseline startle amplitude and prepulse inhibition in vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. **Psychiatry Res**, v. 64, p. 169-78, 1996.
- GRILLON, C.; SINHA, R.; O'MALLEY, S. S. Effects of ethanol on the acoustic startle reflex in humans. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 114, p. 167-71, 1994.
- GRILLON, C. et al. Families at high and low risk for depression: A three-generation startle study. **Biol Psychiatry**, v. 57, p. 953-60, 2005.
- HARRISON, J. M.; WARR, W. B.; IRVING, R. E. Second order neurons in the acoustic nerve. **Science**, v. 138, p. 893-5, 1962.

- HOFFMAN, H. S.; FLESHLER, M. Startle reaction: Modification by background acoustic stimulation. **Science**, v. 141, p. 928-30, 1963.
- HOFFMAN, H. S.; ISON, J. R. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychol Rev**, v. 87, p. 175-89, 1980.
- HOFFMAN, H. S.; SEARLE, J. L. Acoustic and temporal factors in the evocation of startle. **J Acoust Soc Am**, v. 43, p. 269-82, 1968.
- HORTA-JUNIOR, J. A. C. et al. Direct and indirect connections between cochlear root neurons and facial motor neurons: Pathways underlying the acoustic pinna reflex in the albino rat. **J Comp Neurol**, v. 507, p. 1763-79, 2008.
- HSIEH, M. H.; SWERDLOW, N. R.; BRAFF, D. L. Effects of background and prepulse characteristics on prepulse inhibition and facilitation: Implications for neuropsychiatric research. **Biol Psychiatry**, v. 59, p. 555-9, 2006.
- HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. **Am J Clin Pathol**, v. 75, p. 816-21, 1981.
- ISON, J. R.; MCADAM, D. W.; HAMMOND, G. R. Latency and amplitude changes in the acoustic startle reflex of the rat produced by variation in auditory prestimulation. **Physiol Behav**, v. 10, p. 1035-9, 1973.
- KABLE, J. W.; MURRIN, L. C.; BYLUND, D. B. In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of alpha(2)-adrenergic receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 293, p. 1-7, 2000.
- KAVIANI, H. et al. Affective modulation of the startle response in depression: Influence of the severity of depression, anhedonia, and anxiety. **J Affect Disord**, v. 83, p. 21-31, 2004.
- KELLY, J. B.; MASTERTON, B. Auditory sensitivity of the albino rat. **J Comp Physiol Psychol**, v. 91, p. 930-6, 1977.
- KINKEAD, B. et al. Endogenous neurotensin is involved in estrous cycle related alterations in prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, p. 178-87, 2008.
- KOCH, M. Sensorimotor gating changes across the estrous cycle in female rats. **Physiol Behav**, v. 64, p. 625-8, 1998.
- KOCH, M. The neurobiology of startle. **Prog Neurobiol**, v. 59, p. 107-28, 1999.

- KOSHIYA, N.; GUYENET, P. G. A5 noradrenergic neurons and the carotid sympathetic chemoreflex. **Am J Physiol**, v. 267, p. R519-26, 1994.
- KOYLU, E. O. et al. Cocaine and amphetamine regulated transcript (cart) and the stress response. **Peptides**, v. 27, p. 1956-69, 2006.
- KOYLU, E. O. et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. **J Comp Neurol**, v. 391, p. 115-32, 1998.
- KOYLU, E. O. et al. Cart peptides colocalize with tyrosine hydroxylase neurons in rat locus coeruleus. **Synapse**, v. 31, p. 309-11, 1999.
- KUNGEL, M. et al. Substance p and other putative transmitters modulate the activity of reticular pontine neurons: An electrophysiological and immunohistochemical study. **Brain Res**, v. 643, p. 29-39, 1994.
- LEE, Y. et al. A primary acoustic startle pathway: Obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. **J Neurosci**, v. 16, p. 3775-89, 1996.
- LEHMANN, J.; PRYCE, C. R.; FELDON, J. Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in wistar rats. **Behav Brain Res**, v. 104, p. 113-7, 1999.
- LI, L. et al. Prepulse inhibition following lesions of the inferior colliculus: Prepulse intensity functions. **Physiol Behav**, v. 65, p. 133-9, 1998.
- LINGENHOHL, K.; FRIAUF, E. Giant neurons in the rat reticular formation: A sensorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit? **J Neurosci**, v. 14, p. 1176-94, 1994.
- LÓPEZ, D. E. et al. The cochlear root neurons in the rat, mouse and gerbil. In: MERCHÁN, M. A. The mammalian cochlear nuclei: Organization and function. **New York: Plenum Press**, 1993. 291-301.
- LOPEZ, D. E. et al. Projections of cochlear root neurons, sentinels of the rat auditory pathway. **J Comp Neurol**, v. 415, p. 160-74, 1999.
- LUDEWIG, S. et al. Prepulse inhibition deficits in patients with panic disorder. **Depress Anxiety**, v. 15, p. 55-60, 2002.
- MANSBACH, R. S.; GOLD, L. H.; HARRIS, L. S. The acoustic startle response as a measure of behavioral dependence in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 108, p. 40-6, 1992.

- MARQUES-LOPES, J. et al. The hyperalgesic effects induced by the injection of angiotensin ii into the caudal ventrolateral medulla are mediated by the pontine a5 noradrenergic cell group. **Brain Res**, v. 1325, p. 41-52, 2010.
- MERCHAN, M. A. et al. Morphology of cochlear root neurons in the rat. **J Neurocytol**, v. 17, p. 711-25, 1988.
- MISERENDINO, M. J.; DAVIS, M. Nmda and non-nmda antagonists infused into the nucleus reticularis pontis caudalis depress the acoustic startle reflex. **Brain Res**, v. 623, p. 215-22, 1993.
- NODAL, F. R.; LOPEZ, D. E. Direct input from cochlear root neurons to pontine reticulospinal neurons in albino rat. **J Comp Neurol**, v. 460, p. 80-93, 2003.
- OSEN, K. K. et al. Gaba-like and glycine-like immunoreactivities of the cochlear root nucleus in rat. **J Neurocytol**, v. 20, p. 17-25, 1991.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **San Diego: Academic Press**, 1998.
- PILZ, P. K.; SCHNITZLER, H. U. Habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats: Amplitude, threshold, and latency measures. **Neurobiol Learn Mem**, v. 66, p. 67-79, 1996.
- PILZ, P. K.; SCHNITZLER, H. U.; MENNE, D. Acoustic startle threshold of the albino rat (*rattus norvegicus*). **J Comp Psychol**, v. 101, p. 67-72, 1987.
- REIJMERS, L. G.; PEETERS, B. W. Effects of acoustic prepulses on the startle reflex in rats: A parametric analysis. **Brain Res**, v. 667, p. 144-50, 1994.
- SAITOH, K.; SHAW, S.; TILSON, H. A. Noradrenergic influence on the prepulse inhibition of acoustic startle. **Toxicol Lett**, v. 34, p. 209-16, 1986.
- SALLINEN, J. et al. Adrenergic alpha2c-receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice. **J Neurosci**, v. 18, p. 3035-42, 1998.
- SAPER, C. B. Image is everything. **J Comp Neurol**, v. 412, p. 381-2, 1999.
- SCHENK, M. P.; MANNING, R. J.; PAALMAN, M. H. Going digital: Image preparation for biomedical publishing. **Anat Rec**, v. 257, p. 128-36, 1999.
- SHAMMAH-LAGNADO, S. J. et al. Afferent connections of the nuclei reticularis pontis oralis and caudalis: A horseradish peroxidase study in the rat. **Neuroscience**, v. 20, p. 961-89, 1987.
- SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. **J Comp Neurol**, v. 388, p. 507-25, 1997.

- SINEX, D. G.; LOPEZ, D. E.; WARR, W. B. Electrophysiological responses of cochlear root neurons. **Hear Res**, v. 158, p. 28-38, 2001.
- STEVENS, D. R.; MCCARLEY, R. W.; GREENE, R. W. The mechanism of noradrenergic alpha 1 excitatory modulation of pontine reticular formation neurons. **J Neurosci**, v. 14, p. 6481-7, 1994.
- SWERDLOW, N. R.; BRAFF, D. L.; GEYER, M. A. Animal models of deficient sensorimotor gating: What we know, what we think we know, and what we hope to know soon. **Behav Pharmacol**, v. 11, p. 185-204, 2000.
- SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A. Clozapine and haloperidol in an animal model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 44, p. 741-4, 1993.
- SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A.; BRAFF, D. L. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: Current knowledge and future challenges. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 156, p. 194-215, 2001.
- SWERDLOW, N. R.; HARTMAN, P. L.; AUERBACH, P. P. Changes in sensorimotor inhibition across the menstrual cycle: Implications for neuropsychiatric disorders. **Biol Psychiatry**, v. 41, p. 452-60, 1997.
- SWERDLOW, N. R. et al. Impaired prepulse inhibition of acoustic and tactile startle response in patients with huntington's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 58, p. 192-200, 1995.
- TAXINI, C. L. et al. Control of the central chemoreflex by a5 noradrenergic neurons in rats. **Neuroscience**, v. 199, p. 177-86, 2011.
- TURVIN, J. C.; MESSER, W. S., JR.; KRITZER, M. F. On again, off again effects of gonadectomy on the acoustic startle reflex in adult male rats. **Physiol Behav**, v. 90, p. 473-82, 2007.
- VALSAMIS, B.; SCHMID, S. Habituation and prepulse inhibition of acoustic startle in rodents. **J Vis Exp**, v. p. e3446,
- VAN DEN BUUSE, M.; EIKELIS, N. Estrogen increases prepulse inhibition of acoustic startle in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 425, p. 33-41, 2001.
- VIZI, E. S.; KISS, J. P.; LENDVAI, B. Nonsynaptic communication in the central nervous system. **Neurochem Int**, v. 45, p. 443-51, 2004.
- WESTWOOD, F. R. The female rat reproductive cycle: A practical histological guide to staging. **Toxicol Pathol**, v. 36, p. 375-84, 2008.

- WILKINS, D. E.; HALLETT, M.; WESS, M. M. Audiogenic startle reflex of man and its relationship to startle syndromes. A review. **Brain**, v. 109 (Pt 3), p. 561-73, 1986.
- WINSLOW, J. T.; NOBLE, P. L.; DAVIS, M. Modulation of fear-potentiated startle and vocalizations in juvenile rhesus monkeys by morphine, diazepam, and buspirone. **Biol Psychiatry**, v. 61, p. 389-95, 2007.
- WYNN, J. K.; DAWSON, M. E.; SCHELL, A. M. Discrete and continuous prepulses have differential effects on startle prepulse inhibition and skin conductance orienting. **Psychophysiology**, v. 37, p. 224-30, 2000.
- YEOMANS, J. S.; FRANKLAND, P. W. The acoustic startle reflex: Neurons and connections. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 21, p. 301-14, 1995.
- YEOMANS, J. S. et al. Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rat. **Neuroscience**, v. 142, p. 921-9, 2006.
- ZHOU, J.; NANNAPANENI, N.; SHORE, S. Vessicular glutamate transporters 1 and 2 are differentially associated with auditory nerve and spinal trigeminal inputs to the cochlear nucleus. **J Comp Neurol**, v. 500, p. 777-87, 2007.

APÊNDICE 1

Vídeo em pdf do procedimento de mensuração do RAS.

Sistema de
mensuração do
reflexo auditivo de
sobressalto

