



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



ORIGEM DE AFERÊNCIAS MONOAMINÉRGICAS E CART-ÉRGICAS AO CIRCUITO ELEMENTAR DO REFLEXO AUDITIVO DE SOBRESSALTO

ANDRÉ VALÉRIO DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

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

BOTUCATU – SP
2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**ORIGEM DE AFERÊNCIAS MONOAMINÉRGICAS E CART-
ÉRGICAS AO CIRCUITO ELEMENTAR DO REFLEXO AUDI-
TIVO DE SOBRESSALTO**

ANDRÉ VALÉRIO DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área
de concentração *Biologia Celular Estrutural e
Funcional*.

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

BOTUCATU – SP
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, André Valério da.

Origem de aferências monoaminérgicas e CART-érgicas ao
circuito elementar do reflexo auditivo de sobressalto /
André Valério da Silva. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: José de Anchieta de Castro e Horta-Junior
Capes: 20600003

1. Serotonina. 2. Noradrenalina. 3. Neuroreguladores.
4. Reflexos. 5. Reação de alarme. 6. Circuitos neurais.

Palavras-chave: CART; Reflexo Auditivo De Sobressalto;
noradrenalina; serotonina; traçadores neuronais.

ANDRÉ VALÉRIO DA SILVA

ORIGEM DE AFERÊNCIAS MONOAMINÉRGICAS E CART-ÉRGICAS AO CIRCUITO ELEMENTAR DO REFLEXO AUDITIVO DE SOBRESSALTO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

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

Comissão examinadora:

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu

Profa. Dra. Luciana Pinato
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Filosofia e Ciências – UNESP/Marília

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR/São Paulo

Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP/Araçatuba

Profa. Dra. Mirela Barros Dias
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu

Botucatu, 25 de março de 2015

Dedicatória

À Deus ...

Dedico este trabalho em primeiro lugar à Deus que em toda sua sabedoria, sendo o maior Anatomista e Neurocientista de todos, nos deu a vida e a capacidade mental para tentarmos compreender as maravilhas do sistema nervoso. Cada vez que obtenho conhecimento sobre os assuntos mais abstratos do cérebro mais tenho a reverenciar o grande Criador.

À minha família ...

Dedico este trabalho ao meu pai Gérçom Valério da Silva, ao meu irmão Alexandre Valério da Silva e a minha sogra Sônia Ap. Fuzetti Torres. Estes que tão precocemente nos deixaram e que nos deixam imensa saudade. Estas palavras um dia não mais existirão, esta tese um dia será extinta, mas, a minha saudade e meu amor a vocês jamais se extinguirão até o dia em que poderei juntar-me a vocês no paraíso celeste.

À minha mãe Terezinha Faquim Corrêa que lutou a vida toda para fazer de mim uma pessoa honesta e preparada para as adversidades do mundo e, ao meu pai de criação, Sebastião Corrêa que se tornou um grande pai e amigo acolhedor.

À família Crivilin e a família Torres que me acolheram como um filho, obrigado pela força de todos vocês.

À minha esposa ...

Dedico este espaço para minha maravilhosa esposa e também maior incentivadora Kelly Regina Torres da Silva que está em minha vida dividindo as tristezas, alegrias, conquistas, derrotas e cada vez mais revela o quanto é a mais capaz de todas as esposas, eu não poderia ter encontrado melhor pessoa para dividir a jornada da vida.

Agradecimentos

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) cujo coordenador é o Professor Titular Marcos Roberto de Mattos Fontes.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior, por ser um grande Mestre e ensinar seus conhecimentos científicos e Anômicos com muita ética, qualidade e responsabilidade. Foi imensa a honra de poder ser seu primeiro aluno de doutorado e tenho a certeza que ao longo da vida ainda aprenderei muito dos seus ensinamentos.

Agradeço ao Prof. Titular Dr. Jackson Cioni Bittencourt do Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo (USP/SP) e ao Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti do Departamento de Ciências Básicas da Universidade Estadual Paulista câmpus de Araçatuba (UNESP) por auxiliarem este trabalho concedendo alguns dos anticorpos utilizados e as barras auriculares.

Agradeço aos professores de Anatomia do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências de Botucatu, em especial aos professores doutores Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro, Francisco Eduardo Martinez, Raquel Fantin Domeniconi, Renato Ferretti, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa, Camila Contin Diniz de Almeida Francia, Luis Francia e os técnicos Luciano Alves da Cunha e Paulo Sérgio da Silva por terem me dado a honra de aprender, estudar, ensinar e ser ensinado por vocês em todos os momentos de aulas práticas em Anatomia. Obrigado pela oportunidade de dividir com vocês todos estes momentos incluindo os momentos de descontração que foram os melhores que já tive.

Gostaria de agradecer aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu em especial a assessora administrativa Lígia Barbosa Costa por sempre me receber bem e com muita paciência e a assistente de suporte acadêmico Shelly Favorito de Carvalho que sempre se empenhou ao máximo para me ajudar com as análises no microscópio confocal.

Agradeço ao Prof. Titular Carlos Roberto Padovani do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu e ao seu aluno de pós-graduação, Prof. Sérgio Augusto Rodrigues da Faculdade de Tecnologia (FATEC) do Estado de São Paulo – Campus de Botucatu, pelo auxílio prestado nas análises estatísticas.

Agradeço a excelente equipe de pesquisa do laboratório de Neuromorfologia do Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior que sempre proporcionou discussões científicas, filosóficas e agradáveis momentos de descontração. Em especial agradeço a Nicole Orsi Barioni, Rian Stenico Beduschi e Micheli Ferreira que proporcionaram uma amizade rica em valores e uma preciosa ajuda para o desenvolvimento deste projeto científico.

Agradeço a direção do Câmpus de Três Lagoas (CPTL) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) por me dar apoio para a finalização deste trabalho e aos meus novos colegas de trabalho Adalberto, Juliano, Nelson, Julie, Alex, Danielle, Odanir, Helder e Mônica, pelo apoio e companheirismo.

Agradeço ao meu grande amigo e padrinho religioso Carlos Alexandre Haemmerle que mesmo distante sempre me dá apoio, uma palavra amiga e espiritual.

Agradeço a todos brasileiros que pagam seus impostos no qual é revertido em recursos para o financiamento de pesquisas e bolsas de pós-graduação por agências de fomento como a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2008/02771-6) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que me financiou três anos de bolsa de Doutorado.

Epígrafe

“Sou daqueles que acreditam que as questões relativas ao corpo devem ser demonstradas, antes, de maneira teológica, pois que nada existe fora de Deus. Meu ofício, o da anatomia, consiste em decifrar a obra do todo poderoso e, desse modo, adorá-lo. Vós, teólogos esclarecidos, sabeis que não só pela fé, mas também pela razão. Nem uma só palavra dentre as que haveis lido em minha obra tem outra razão que não a fé. Quero dizer-vos com isto que as sagradas escrituras não são mero papel impresso; cada vez que me é dado examinar um corpo, vejo nele a obra do altíssimo e em cada átomo daquele corpo posso ler a sagrada palavra, em minh'alma.”

Frederico Andahazi “O Anatomista”

Sumário

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS, QUADRO E TABELAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Monoaminas neuroativas.....	17
1.1.1 Os grupos noradrenérgicos.....	17
1.1.2 Os núcleos serotoninérgicos.....	18
1.2 O Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina (CART).....	22
1.3 O reflexo auditivo de sobressalto.....	23
1.4 Os neurônios da raiz coclear e o núcleo reticular caudal da ponte.....	27
2 OBJETIVOS.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Estratégia experimental.....	32
3.2 Animais de experimentação.....	32
3.3 Procedimentos experimentais.....	33
3.3.1 Experimento tipo 1 - Mapeamento das aferências aos CRN e ao PnC com especial ênfase a núcleos noradrenérgicos, serotoninérgicos e CART-érgicos.....	33
3.3.2 Procedimentos histológicos e imuno-histoquímica para FG.....	35
3.3.3 Experimento tipo 2 - Controle anterógrado das aferências identificadas ao circuito elementar do RAS: área noradrenérgica A5, núcleo dorsal da rafe e conexões recíprocas com o PnC.....	37
3.3.4 Identificação neuroquímica dos terminais na raiz coclear e núcleo reticular caudal da ponte: imuno-histoquímica para dopamina- β -hidroxilase, transcrito regulado pela cocaína e anfetamina e serotonina.....	38
3.3.5 Estudo comportamental da avaliação do reflexo auditivo de sobressalto e inibição por estímulo prévio após lesão seletiva na área noradrenérgica A5.....	38
3.3.6 Confirmação da funcionalidade da via auditiva nos animais submetidos a cirurgia estereotáxica para lesão do A5 e provas comportamentais de avaliação do RAS e PPI.....	43
3.4 Análise das preparações histológicas e documentação fotográfica.....	44
4 RESULTADOS.....	46
4.1 Distribuição de terminais axonais noradrenérgicos serotoninérgicos e CART-érgicos, na raiz coclear e núcleo reticular caudal da ponte.....	46
4.2 Mapeamento retrógrado das aferências a raiz coclear.....	50
4.3 Conexões da área noradrenérgica A5 com os CRN.....	53
4.4 Conexões do núcleo dorsal da rafe com os CRN.....	66
4.5 Conexões da área noradrenérgica A5 e do núcleo dorsal da rafe com o PnC.....	71
4.6 Conexões recíprocas entre área noradrenérgica A5 o núcleo dorsal da rafe e o PnC.....	72
4.7 Neuroquímica das eferências do A5 aos CRN, PnC e ao DR.....	77
4.8 Neuroquímica das eferências do núcleo dorsal da rafe aos CRN, ao PnC e ao A5.....	83
4.9 Avaliação comportamental do RAS e da PPI após lesão na área noradrenérgica A5.....	84
5 DISCUSSÃO.....	92
5.1 Considerações Metodológicas.....	92
5.2 Considerações Neuroanatômicas e Funcionais.....	94
6 CONCLUSÕES.....	102
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
8 APÊNDICES.....	119
APÊNDICE A - Protocolo padrão de imuno-histoquímica.....	119
APÊNDICE B - Regiões onde foram encontrados neurônios imunorreativos ao FG após injeção no A5.....	122
APÊNDICE C: Regiões onde foram encontradas fibras imunorreativas ao BDA após injeção no A5.....	125
APÊNDICE D: Resultado do Teste de normalidade e Teste t não paramétrico para os dados de densidade neuronal.....	130
APÊNDICE E: Casos experimentais de lesão no A5.....	131

RESUMO

Origem de aferências monoaminérgicas e CART-érgicas ao circuito elementar do reflexo auditivo de sobressalto. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

O reflexo auditivo de sobressalto (RAS) é uma reação motora rápida e evidente frente a um estímulo acústico intenso e inesperado. Trata-se de um reflexo acústico-motor do tronco encefálico que está presente em muitas espécies de mamíferos, incluindo o homem. Possui caráter tanto defensivo frente a uma possível agressão quanto de alerta frente a acontecimentos não esperados. Além do RAS resultar em uma resposta sobre a musculatura esquelética, possui ação sobre o sistema nervoso autônomo promovendo aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca. No rato o circuito neural elementar do RAS é constituído por: neurônios do gânglio espiral, neurônios da raiz coclear (CRN), neurônios reticuloespirais do núcleo reticular caudal da ponte (PnC) e motoneurônios da medula espinal. O RAS pode ser modulado pela habituação, sensibilização, inibição por estímulo prévio (PPI) e pela potenciação por um estímulo adverso. Estas modulações podem ocorrer mediante a influência de diversas substâncias neuroativas sobre os componentes deste circuito. Neste trabalho avaliamos a origem de aferências monoaminérgicas (serotonina e noradrenalina) e CART-érgicas para os CRN e PnC. Para isso foram utilizados 54 ratos *Wistar*, adultos fêmeas, que foram submetidos a injeções de traçadores neuronais anterógrados e retrógrados para mapeamento de vias nervosas e a identificação imuno-histoquímica de substâncias neuroativas. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (protocolo nº 17/08). Nossos resultados demonstram que o grupamento noradrenérgico A5 é uma fonte de aferências noradrenérgicas e CART-érgicas para os CRN e PnC, enquanto que o núcleo dorsal da rafe (DR) é a origem de aferências serotoninérgicas para estas regiões. Existem conexões recíprocas entre o DR, o A5 e o PnC. Além disso, verificamos que após 14 e 21 dias da lesão no A5 houve aumento da porcentagem da PPI nos intervalos de 100 e 150 milissegundos sem modificação no RAS. Nossos resultados sugerem que o A5 atua de forma direta sobre o circuito elementar do RAS como verificado pelas suas conexões e pela modulação da PPI. As conexões do A5 e do DR trazem novas perspectivas na modulação do RAS e da PPI pela noradrenalina, serotonina e CART.

Palavras-Chave: serotonina, noradrenalina, CART, Reflexo Auditivo De Sobressalto, traçadores neuronais.

ABSTRACT

Source of monoaminergic and CART-ergic afferents to the elementary circuitry of the acoustic startle reflex. Thesis (PhD) – Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu, 2015.

The acoustic startle reflex (ASR) is a rapid motor reaction elicited by a sudden intense acoustic stimulus. This is an acoustic-motor reflex of brainstem conserved across mammal's species including man. Moreover the ASR is defensive behavior against both possible aggressive and alert to unexpected events. The ASR evokes responses of skeletal muscles as well as of autonomic nervous system with elevation of blood pressure and acceleration of the heart rate. In the rat, the elementary neural circuitry of ASR is mediated by ganglion cells of the organ of Corti, the cochlear root neurons (CRN), the pontine caudal reticular nucleus (PnC) and motoneurons of the spinal cord. The ASR could be modulated by habituation, sensitization, prepulse inhibition (PPI), and fear potentiation. These modulations were mediated by the influence of neuroactive substances on components of neuronal circuitry of ASR. In this work we evaluate the origin of monoaminergic (serotonin and noradrenaline) and CART-ergic afferents to CRN and PnC. Adult Female *Wistar* rats (n=54) were submitted to injections of retrograde and anterograde neuronal tracers in track-tracing experiments and identification of neuroactive substances in brain by immunohistochemistry technique. All experimental protocols are according with Ethics Committee on Animal Use (protocol: 17/08). Our results demonstrate that noradrenergic area A5 (A5) is a source of noradrenergic and CART-ergic afferents to CRN and PnC, and dorsal raphe nucleus (DR) is origin of serotonergic afferents to these regions. There are reciprocal connections between DR, A5 and PnC. Furthermore, after 14 and 21 days of lesion in A5, the percentage of PPI increased during intervals of 100 and 150 milliseconds without modification of ASR. This data suggest that A5 have direct action on elementary circuit of ASR evidenced his connections and modulation of PPI. Moreover, A5 and DR connections bring new insights about modulation of ASR and PPI by noradrenaline, serotonin and CART.

Keywords: serotonin, noradrenaline, CART, acoustic startle reflex, neuronal tracer.

LISTA DE ABREVIATURAS

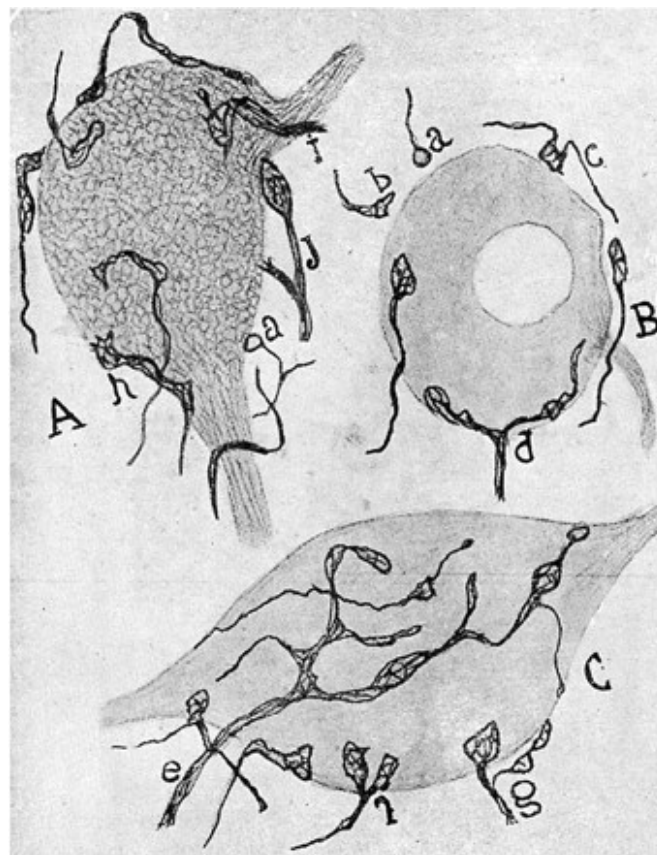
- µl - microlitro 3N – núcleo oculomotor 3PC – parte parvocelular do nervo oculomotor 4N – núcleo troclear 4V - quarto ventrículo 5-HT – serotonina/ 5-hidroxitriptamina 5HTT – transportador vesicular de serotonina 5TT – núcleo motor trigeminal, parte tensor do tímpano 6-OHDA – 6-hidroxidopamina 7L – núcleo facial, subnúcleo lateral 7n – nervo facial 7N – núcleo facial 8cn – raiz coclear do nervo vestibulococlear - A2 – grupo noradrenérgico A2 - A5 - grupo noradrenérgico A5 - ACTH - hormônio adrenocorticotrófico - AP – antero-posterior - Aq - aqueduto - BDA - dextrano amina biotinilada - Bo- complexo Botzinger - C1 – células catecolaminérgicas 1 - CALB - calbindina - CART - Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina - CC – canal central - CeM - núcleo central da amígdala - CI – colículo inferior - cic – comissura do colículo inferior - CIC - núcleo central do colículo inferior - Cli - núcleo caudal linear da rafe - cos – complexo olivar superior - CRF - fator liberador de corticotrofina - CRN - neurônios da raiz coclear - DAB – 3'-3'-diamino benzidina - dB - decibel - DBH - dopamina-β-hidroxilase - DCIC – córtex dorsal do colículo inferior - DCN – núcleo coclear dorsal - DLPAG - porção dorsolateral da área cinzenta periaquedutal - DMPAG - porção dorsomedial da área cinzenta periaquedutal - DMTg - área tegmental dorsomedial - DR - núcleo dorsal da rafe - DRD – núcleo dorsal da rafe, parte dorsal - DRL - núcleo dorsal da rafe, parte lateral - DRV - núcleo dorsal da rafe, parte ventral - DV- dorso-ventral - ECIC – córtex externo do colículo inferior - EVe – núcleo de origem dos eferentes do nervo vestibular - EW – núcleo de Edinger - Westphal - FG - Fluoro-Gold® - FG-ir – fluoro-gold imunorreativa - GABA - ácido-γ-amino butírico - Gi - núcleo reticular gigantocelular	- GiA – núcleo gigantocelular parte alfa - HRP - peroxidase da raiz forte - I.A. – interauricular - ICV – intracerebroventricular - IO – complexo olivar inferior - IRt – núcleo reticular intermédio - ISI - intervalos interestímulo - KF- núcleo Killiker-Fuse - kHz – quilohertz - LC - núcleo locus coeruleus - LDTg - núcleo tegmental laterodorsal - LHAp - área hipotalâmica lateral parte posterior - LHAt - área hipotalâmica lateral parte tuberal - LPAG – porção lateral da área cinzenta periaquedutal - LPBCr - núcleo parabraquial lateral, parte crescente - LPBD - núcleo parabraquial lateral, parte dorsal - LPBE - núcleo parabraquial lateral, parte externa - LPBV - núcleo parabraquial lateral, parte ventral - LPGi – núcleo paragigantocelular lateral - LPGiE - núcleo paragigantocelular lateral, parte externa - LRt – núcleo reticular lateral - LSO – núcleo lateral superior da oliva - LVPO – núcleo periolivar lateroventral - MdD – núcleo reticular medular, parte dorsal - MdV – núcleo reticular medular, parte ventral - ME – medula espinal - ML – médio-lateral - mlf - fascículo longitudinal medial - MnR – núcleo mediano da rafe - MNTB – núcleo medial do corpo trapeóide - Mot7- núcleo motor do nervo facial - MPB – núcleo parabraquial medial - MPBE - núcleo parabraquial medial, parte externa - ms - milissegundos - MVPO – núcleo periolivar medioventral - NaCl – cloreto de sódio - NPY – neuropeptídeo Y - NTS – núcleo do trato solitário - oc- trato olivocerebelar - ocb – feixe olivococlear - P5 – núcleo principal do nervo trigêmeo - P7 – núcleo principal motor do facial - Pa – núcleo paraventricular do hipotálamo - PAG – área cinzenta periaquedutal - PB – núcleos parabraquiais - PCRt – núcleo reticular parvocelular - PDR - núcleo dorsal da rafe posterodorsal - PHAL - lectina da planta <i>Phaseolus Vulgaris</i> leucoagglutinin
--	---

Pn – núcleo pontino
PnC - núcleo reticular caudal da ponte
PnO – núcleo reticular pontino oral
PnR – núcleo pontino da rafe
PPI - inibição por estímulo prévio
PPtg - núcleo tegmental pedunculopontino
Pr5VL – núcleo principal do trigêmeo, parte ventrolateral
py – trato piramidal
pyx- decussação piramidal
RAS – reflexo auditivo de sobressalto
RC – raiz coclear
RIP - núcleo interpósito da rafe
RMg - núcleo magno da rafe
Rob- núcleo obscuro da rafe
RPa – núcleo pálido da rafe
rs – trato rubroespinal
RtTG – núcleo reticulotegmental da ponte
RVL – núcleo rostroventrolateral
s5 – raiz sensorial do nervo trigêmeo
SC - colículo superior
scp – pedúnculo cerebelar superior
SNA – sistema nervoso autônomo
SolC – núcleo do trato solitário, parte comissural
SolM – núcleo do trato solitário, parte medial
sp5 - trato espinal do trigêmeo

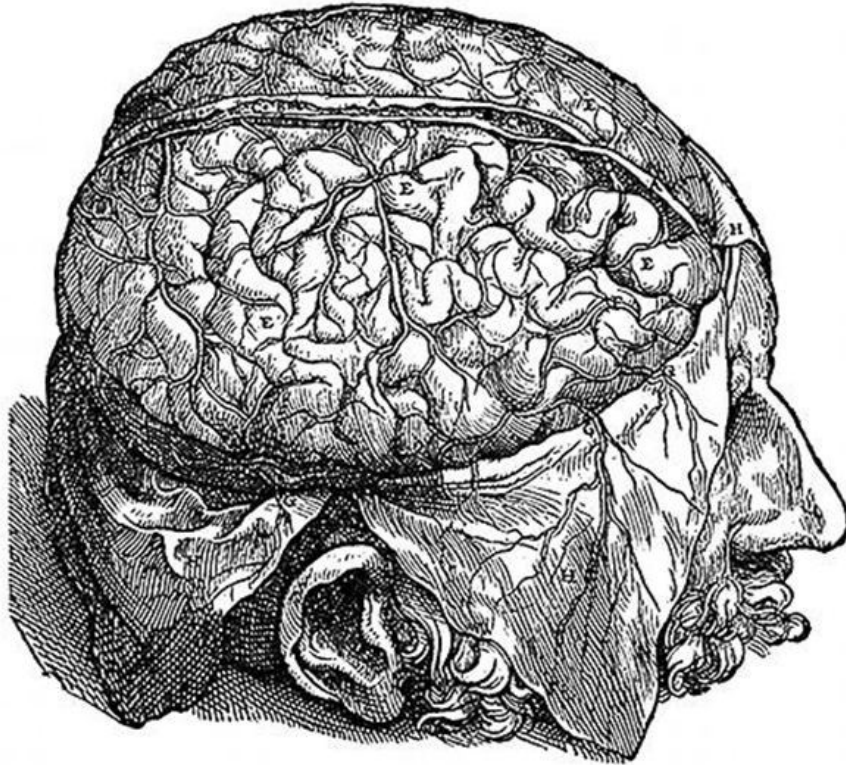
Sp5I – núcleo espinal do trigêmeo, parte interpolar
SPO - núcleo paraolivar superior
Su3 –supraoculomotor periaqueductal
Su3C – núcleo supraoculomotor
Su5 - núcleo supratrigeminal
SubC - núcleo subcerúleo
SuVe - núcleo vestibular superior
TH - tirosina hidroxilase
TPH1 - triptofano hidroxilase 1
TPH2 - triptofano hidroxilase 2
tz – corpo trapezoide
VCA – núcleo coclear ventral anterior
VCN – núcleo coclear ventral
VCP – núcleo coclear ventral posterior
VGat - transportador vesicular de GABA e glicina
VGlut1 - transportador vesicular de glutamato
VLL - núcleo ventral do lemnisco lateral
VLPAG – porção ventrolateral da área cinzenta periaqueductal
VNTB - núcleo ventral do corpo trapezóide
vsc- trato spinocerebelar ventral
WGA-HRP – aglutinina do germe de trigo conjugado com a peroxidase do rábano silvestre
ZI – zona incerta
 μ A – microampere
 μ m – micrômetro



Bulbo de camundongo ao nível da oliva inferior, método de Golgi – *Rafael Lorent de Nó*



Terminais nervosos ao redor de neurônios do núcleo coclear, impregnação de prata – *Santiago Ramón y Cajal*



De Humani Corporis Fabrica (Gravura 67) – *Andreas Vesalius*



Leonardo Da Vinci

LISTA DE FIGURAS, QUADRO E TABELAS

Figura 1 Esquema do circuito neural elementar responsável pelo reflexo auditivo de sobressalto.	26
Figura 2 Nervo vestibulococlear e Raiz coclear.	28
Figura 3 Raiz coclear do nervo vestibulo-coclear e os neurônios da raiz coclear (CRN).	28
Figura 4 Esquema das eferências dos CRN.	29
Figura 5 Comparação entre as barras auriculares para ratos e para gatos.	40
Figura 6 Desenho experimental dos experimentos de lesão do A5 e avaliação comportamental do RAS e PPI.	41
Figura 7 Foto do sistema de avaliação do sobressalto.	41
Quadro 1 Características do pré-pulo, pulso e intervalo entre os estímulos em cada um dos blocos da sessão de avaliação comportamental do RAS e da PPI.	42
Figura 8 Distribuição de terminais axonais noradrenérgicos na raiz coclear e núcleo reticular caudal da ponte.	47
Figura 9 Distribuição de terminais axonais serotoninérgicos na raiz coclear e núcleo reticular caudal da ponte.	48
Figura 10 Distribuição de terminais axonais CART-érgicos na raiz coclear e núcleo reticular caudal da ponte.	49
Figura 11 Locais de injeção de FG na raiz coclear dos casos N13, N15, N17 e N18.	51
Figura 12 Locais de injeção de FG na raiz coclear dos casos N20, N25, N30 e N32.	52
Figura 13 Aferências a Raiz Coclear provenientes da área do grupo noradrenérgico A5.	55
Figura 14 Esquemas de cortes coronais do troncoencefálico, na região do grupamento noradrenérgico A5, do caso experimental N13.	56
Figura 15 Esquemas de cortes coronais do troncoencefálico, na região do grupamento noradrenérgico A5, do caso experimental N18.	57
Figura 16 Esquemas de cortes coronais do troncoencefálico, na região do grupamento noradrenérgico A5, do caso experimental N20.	58
Figura 17 Esquemas de cortes coronais do troncoencefálico, na região do grupamento noradrenérgico A5, do caso experimental N25.	59
Figura 18 Esquemas dos locais de injeção de BDA no A5, nos casos utilizados no estudo de suas eferências.	60
Figura 19 Principais eferências do A5.	61
Figura 20 Esquemas de secções coronais do tronco encefálico, de um caso típico de injeção de BDA no A5 (N122).	63
Figura 21 Eferências do A5 à raiz coclear.	64
Figura 22 Eferências do A5 ao DR e ao PnC.	65
Figura 23 Eferências do A5 para áreas que atuam de forma indireta sobre o circuito do reflexo auditivo de sobressalto (LC e CI).	66
Figura 24 Aferências a raiz coclear provenientes do núcleo dorsal da rafe (DR).	67
Figura 25 Esquemas dos locais de injeção de BDA no DR, nos casos utilizados no estudo de suas eferências.	68
Figura 26 Esquemas de secções coronais do tronco encefálico, de um caso típico de injeção de BDA no DR (N144).	69
Figura 27 Eferências do DR à raiz coclear. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais da raiz coclear onde podem ser observadas fibras nervosas marcadas (setas) após injeção de BDA no DR.	70
Figura 28 Eferências do DR ao PnC.	71
Figura 29 Locais de injeção de FG no PnC e identificação de suas aferências provenientes do DR e do A5.	74
Figura 30 Locais de injeção de FG no DR e identificação de suas aferências provenientes do A5 e do PnC.	75
Figura 31 Locais de injeção de FG no A5 e identificação de suas aferências provenientes do PnC e do DR.	76
Figura 32 Eferências do PnC.	77
Figura 33 Eferências noradrenérgicas do A5 à raiz coclear.	79
Figura 34 Eferências noradrenérgicas e não-noradrenérgicas do A5 à raiz coclear.	80
Figura 35 Secções coronais do local de injeção de BDA no A5 (caso 274), em três níveis rostrocaudais (A-A'', B-B'' e C-C'') que apresentam somas imunorreativos ao CART e a DBH.	81

Figura 36 Secções coronais da raiz coclear após injeção de BDA no A5 (caso 274) e detecção de imunorreatividade para CART e DBH.	82
Figura 37 Secções coronais do PnC e do DR após injeção de BDA no A5 (casos 274 e N278) e detecção de imunorreatividade para CART e DBH.	83
Figura 38 Eferências serotoninérgicas do DR a raiz coclear.	85
Figura 39 Eferências serotoninérgicas do DR ao PnC e ao A5.	86
Figura 40 Resumo das conexões estudadas.	86
Tabela 1 Média (desvio padrão) e mediana (mínimo e máximo) do peso corporal dos animais (em gramas) segundo grupo e momento da avaliação.....	87
Figura 41 Citoarquitetura e imunorreatividade à DBH no A5 de animais do grupo controle e SHAM.	88
Figura 42 Avaliação histológica das lesões bilaterais no A5 com 6-OHDA.	89
Tabela 2 Mediana (mínimo e máximo) de amplitude do RAS segundo grupo e momentos.....	89
Tabela 3 Média (desvio padrão) e Mediana (mínimo e máximo) da variável % de PPI segundo grupo, momento da avaliação e ISI.....	90
Figura 43 Densidade neuronal média e desvio padrão dos somas imunorreativos a proteína Fos no DCN, nos grupos lesão e controle.	91
Figura 44 Densidade neuronal média e desvio padrão dos somas imunorreativos a proteína Fos no VCN, nos grupos lesão e controle.....	91
Figura 45 Resumo da participação do A5 e do DR na modulação do RAS por meio de sua intervenção nas vias de ISI longa.	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Monoaminas neuroativas

As monoaminas são neurotransmissores amplamente difundidos no sistema nervoso. São divididas em catecolaminas (noradrenalina e dopamina) e as indolaminas como 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT) e seus homólogos 5-metoxitriptamina, triptamina e 6-hidroxitriptamina (HENSLEY et al., 2013). As primeiras descrições sobre as monoaminas foram originadas por demonstração bioquímica da noradrenalina em tecido cardíaco e fibras nervosas (VON EULER, 1946a;1946b), e por estudos de distribuição da serotonina no plasma sanguíneo (TWAROG e PAGE, 1953; AMIN et al., 1954).

Trabalhos subsequentes descreveram detalhes anatômicos da distribuição destas substâncias neuroativas no sistema nervoso central (CARLSSON et al., 1962). O estudo clássico de DAHLSTRÖM e FUXE (1964) descreveu a distribuição de corpos celulares e terminais monoaminérgicos no sistema nervoso central. Os autores organizaram os núcleos em grupamentos celulares. Os grupos de neurônios catecolaminérgicos divididos em 13 grupos celulares (A1-A7) distribuídos do tronco encefálico e (A8-A13) no prosencéfalo, enquanto que os grupamentos de neurônios serotoninérgicos foram descritos inicialmente como nove grupos (B1-B9) ocupando principalmente a linha mediana do tronco encefálico, região denominada de rafe (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964; STEINBUSCH, 1981). Posteriormente foram descritos os feixes e as principais vias pelas quais as monoaminas trafegam pelo sistema nervoso central (BJÖRKLUND et al., 1971; UNGERSTEDT, 1971).

Com o advento de técnicas de imuno-histoquímica para a detecção das enzimas de síntese das catecolaminas como a tirosina hidroxilase (TH), que está presente tanto na biossíntese de dopamina quanto da noradrenalina, e a dopamina- β -hidroxilase (DBH), que é a responsável pela catálise da noradrenalina a partir da dopamina (HARTMAN et al., 1972; GOLDSTEIN, 1990), foi possível uma divisão entre sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos, dando uma visão pormenorizada dos grupos catecolaminérgicos e de seus respectivos terminais axônicos (JACOBOWITZ e PALKOVITS, 1974; PALKOVITS e JACOBOWITZ, 1974). Outros estudos possibilitaram uma visão anatômica e fisiológica dos sistemas que utilizam catecolaminas como neurotransmissores (MOORE e BLOOM, 1978;1979) demonstrando a importância fundamental destas substâncias no sistema nervoso central, e que a sua falta está implicada na etiologia de doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson e Alzheimer (MARIEN et al., 2004).

1.1.1 Os grupos noradrenérgicos

Dentre os grupamentos catecolaminérgicos, os grupos noradrenérgicos (A1-A7) estão tronco encefálico (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964; JACOBOWITZ e PALKOVITS, 1974;

PALKOVITS e JACOBOWITZ, 1974; FELTEN e SLADEK, 1983). O Grupo A1 ocupa a parte ventrolateral do bulbo relacionando-se caudalmente com o núcleo reticular lateral da formação reticular do bulbo e complexo olivar inferior. O Grupo A2 consiste de um pequeno grupo de neurônios pequenos situados próximo ao núcleo do trato solitário, núcleo motor dorsal do nervo vago, núcleo comissural e núcleo motor no nervo hipoglosso. O Grupo A3 consiste de um pequeno grupo de células ovais no núcleo olivar acessório dorsal. O Grupo A4 está localizado no teto do quarto ventrículo, ventralmente aos núcleos centrais do cerebelo, estendendo-se em direção ao recesso lateral do IV ventrículo. O grupo A5, é um pequeno grupo de neurônios localizados na região ventrolateral da ponte e medialmente a raiz descendente do nervo facial. O Grupo A6 está localizado nos extremos laterais do assoalho do quarto ventrículo e corresponde ao núcleo locus coeruleus (LC). Neste núcleo praticamente todas as células são noradrenérgicas, com aparência de neurônios multipolares com longos dendritos. Alguns neurônios do LC deslocam-se ventralmente em direção ao A5 e este grupo de neurônios é descrito como grupo A6sc ou núcleo subcoeruleus. O Grupo A7 situa-se ao nível caudal do colículo inferior, constituído por um pequeno grupo de células da formação reticular ventral ao pedúnculo cerebelar superior. O grupo Acg é um grupo de células encontrados em primatas, situado na substância cinzenta periaquedutal ao nível do núcleo troclear.

Entre as funções da noradrenalina conhecidas na literatura, destacamos a secreção de gonadotrofinas, hormônio-adreno-corticotrófico, hormônio do crescimento, aprendizado motor por ação em centros cerebelares, modulação da informação visual por ação direta no núcleo geniculado lateral (MOORE e BLOOM, 1978;1979), modulação da resposta de dor orofacial por ação nos núcleos trigeminais modulação da atividade cortical e talâmica, ciclo sono-vigília, indução do estresse, participação em processos cognitivos como atenção, aprendizado e memória, modulação de sistemas motores (BERRIDGE e WATERHOUSE, 2003), controle da pressão arterial, ritmo cardíaco, modulação de núcleos e vias auditivas, participação fundamental no sistema nervoso autônomo (SAWCHENKO e SWANSON, 1982; SAMUELS e SZABADI, 2008), participação nas vias relacionadas com desordens de humor como ansiedade e depressão (STONE et al., 2011), consumo de drogas (CHRISTIE et al., 1997), neurogênese (MARIEN et al., 2004) e modulação de órgãos sensoriais como a cóclea (EBERT, 1996; MULDER e ROBERTSON, 2005). A variedade de funções atribuídas a este neurotransmissor se deve a sua ampla distribuição no sistema nervoso e existência de muitos subtipos de receptores pós-sinápticos ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$) e pré-sinápticos ($\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$) (BYLUND, 1992; ZHONG e MINNEMAN, 1999; MILLAN, 2003).

1.1.2 Os núcleos serotoninérgicos

Assim como o sistema noradrenérgico, o sistema serotoninérgico é muito abrangente. O mapeamento de sua distribuição no sistema nervoso central de mamíferos foi reali-

zados por meio de técnicas histoquímicas (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964), imunohistoquímicas para 5-HT (STEINBUSCH, 1981; JACOBS et al., 1984; GEFFARD et al., 1987; TOURET et al., 1987; TORK, 1990) e para seu precursor a 5-hidroxitriptofano (GEFFARD et al., 1987; AZMITIA, 1999;2007).

Os neurônios serotoninérgicos estão restritos aos núcleos da rafe do tronco encefálico, porém seus terminais estão disseminados em muitas áreas do sistema nervoso central. Os núcleos da rafe no rato foram inicialmente descritos em nove grupos (B1-B9) em sequência caudo-rostral. (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964;1965; STEINBUSCH, 1981; JACOBS et al., 1984) e posteriormente reagrupados em 4 grupos superiores e 7 grupos inferiores no tronco encefálico de acordo com (JACOBS e AZMITIA, 1992)

Grupos serotoninérgicos superiores

Grupo B9 - Os neurônios serotoninérgicos deste grupo estão confinados em torno do lemnisco medial em sua área dorsal e em todo trajeto do lemnisco medial em sua passagem pelo mesencéfalo.

Grupo B8 - Núcleo caudal linear da rafe. O núcleo caudal linear (CLi) é o grupo mais rostral de neurônios serotoninérgicos, estende-se do nível da parte caudal do núcleo rubro até a borda anterior da decussação cerebelar superior. Está localizado entre as raízes do núcleo oculomotor e estende-se dorsalmente para face anterior do núcleo dorsal da rafe.

Grupo B7 e B6 - Núcleo dorsal da rafe. O núcleo dorsal da rafe (DR) está localizado na linha mediana do tronco encefálico ao nível da junção pontomesencefálica, dorsalmente ao núcleo mediano da rafe.

Grupo B8 e B5 - Núcleo mediano da rafe. O núcleo mediano da rafe (MnR) é um grupo celular com colunas paramedianas localizadas ventralmente ao fascículo longitudinal medial. Suas células se confundem com as do núcleo caudal linear (Grupo B8) e com células do núcleo pontino (Grupo B5).

Grupos serotoninérgicos inferiores

Grupo B1- Núcleo pálido da rafe. Os neurônios serotoninérgicos do núcleo pálido da rafe (RPa) estão localizados na parte caudal do bulbo, dorsalmente ao núcleo olivar acessório e entre a parte ventral do núcleo reticular medular do bulbo e núcleo reticular paramediano.

Grupo B4 - pequeno grupo de células também localizadas no núcleo pálido da rafe, posicionadas nas proximidades na parte lateral do núcleo vestibular medial e dorsal ao núcleo prepósito do hipoglosso sendo que alguns neurônios estão em posição mediana.

Grupo B2 - Núcleo obscuro - As células serotoninérgicas deste grupo estão confinadas no núcleo obscuro da rafe (Rob), correspondendo a toda sua extensão. Muitas delas estão localizadas na parte mais caudal do núcleo reticular paramediano. Este grupo de células

las está ao redor do núcleo olivar inferior, parte ventral do núcleo reticular medular do bulbo e decussação piramidal.

Grupo B3 - Núcleo magno da rafe - Os neurônios deste grupo estão na parte rostral do núcleo magno da rafe (RMg) e parte lateral do trato corticoespinal no núcleo paragigantocelular lateral. São visualizadas ao longo de todo corpo trapezóide, onde encontramos a maior concentração de neurônios 5-HT desta área. Os corpos celulares nesta região não estão na linha mediana, mas na parte ventrolateral do corpo trapezóide, próximo ao lemnisco medial. Rostralmente se posicionam cercados pelo trato corticoespinal, núcleo paraolivar e núcleo do corpo trapezóide.

Grupo B1/B3 - Medula ventral lateral. Neurônios na medula ventral lateral são encontrados na formação reticular do bulbo, estende-se lateralmente ao longo do corpo trapezóide, lemnisco medial e fibras piramidais sendo suas células uma fusão dos grupamentos B1 e B3. Rostralmente possuem aspecto medial ao núcleo paragigantocelular lateral (LPGi) e caudal a parte ventral do núcleo reticular intermédio (IRt). Um grupo substancial de células estende-se das raízes do nervo hipoglosso (XII) para a parte rostral do núcleo olivar inferior.

Grupo B5 - Núcleo pontino da rafe. A maior parte deste grupo está presente na parte intermédia do núcleo pontino da rafe (PnR), posicionadas dorsalmente entre o fascículo longitudinal medial. As partes rostrais e caudais deste núcleo não contêm nenhum neurônio serotoninérgico.

Área postrema: neurônios serotoninérgicos na área postrema são pequenos e compactos, estão envolvidos em circuitos de comando cardiovascular e respiratório.

Além destas regiões também foram descritas a presença da serotonina no locus coeruleus (LC), parte lateral da área cinzenta periaquedutal, tegmento lateral e núcleo interpeduncular (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964; STEINBUSCH, 1981; GEFFARD et al., 1987).

A 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina foi primeiramente demonstrada bioquimicamente em amostras de sangue (RAPPORT et al., 1948; RAPPORT, 1949), sendo um elemento do soro com forte ação sobre o tônus muscular liso das artérias provocando vasoconstrição, por este motivo chamada de “serum tonim” ou serotonina. A 5-HT é uma molécula preservada filogeneticamente estando presente em vários organismos incluindo plantas, invertebrados e vertebrados (JACOBS e AZMITIA, 1992; AZMITIA, 1999). Posteriormente, a presença da 5-HT foi detectada na urina e em órgãos de mamíferos como vasos sanguíneos, pulmões, estômago, intestinos (onde está a maior parte da serotonina no corpo humano), rins, testículos, gânglios da raiz dorsal e encéfalo (TWAROG e PAGE, 1953; AMIN et al., 1954; BERGER et al., 2009). A síntese da 5-HT ocorre pela hidroxilação do L-triptofano para L-5-hidroxitriptofano catalisado pela enzima triptofano hidroxilase, que possui duas isoformas que atuam predominantemente em órgãos periféricos (TPH1) ou exclusivamente no sistema nervoso central (TPH2) (FILIP e BADER, 2009).

A 5-HT é um neuromodulador implicado nas mais variadas funções, entre elas podemos mencionar comportamento alimentar (TAKASE e NOGUEIRA, 2008), aprendizagem e modulação da dor (TAKASE et al., 2005; ALMADA et al., 2009), paciência e impulsividade (DALLEY e ROISER, 2012; MIYAZAKI et al., 2012), ciclo sono-vigília, comportamento sexual (SGHENDO e MIFSUD, 2012), distúrbios de humor como a ansiedade e depressão e motricidade da musculatura lisa (BALE, 2006), regulação da homeostase (AZMITIA, 1999;2001;2007), plasticidade neuronal (AZMITIA, 1999; TRAKHTENBERG e GOLDBERG, 2012), proliferação celular e apoptose (AZMITIA, 2001; DE SOUZA et al., 2004; TRAKHTENBERG e GOLDBERG, 2012) e modulação da via auditiva (KLEPPER e HERBERT, 1991; EBERT e OSTWALD, 1992).

A diversidade de funções da serotonina está refletida na extensa família dos receptores serotoninérgicos (5-HT1 a 5-HT7) (FILIP e BADER, 2009). A família 5-HT1 (5-HT1A-1F) é constituída por autorreceptores que inibem a liberação de 5-HT, controlam a liberação de ácido-γ-amino butírico (GABA) e acetilcolina. A família 5-HT2 (5-HT2A-2C) é composta de receptores somatodendríticos encontrados em neurônios GABA-érgicos, glutamatérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos que promovem alterações na atividade motora. As famílias 5-HT3 (3A-3E) e 5-HT4 (4A-4C) são compostas por receptores localizados em neurônios GABAérgicos, colinérgicos e glutamatérgicos que promovem secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), prolactina e induzem comportamento motor (família 5-HT3) ou estão envolvidos na consolidação da memória (família 5-HT 4). A família 5-HT5 (5A-5B) é composta por receptores de neurônios GABA-érgicos que estão envolvidos em respostas de ansiedade. A família 5-HT6 presente em neurônios GABA-érgicos, colinérgicos e glutamatérgicos estimula a liberação de 5-HT, dopamina e GABA. A família 5-HT7 (7A-7D) está presente em neurônios GABA-érgicos e glutamatérgicos e atuam sobre o ciclo circadiano, humor, percepção de dor, cognição e termorregulação (PASCAL e JOHANNES, 2006; FILIP e BADER, 2009; CURTIN et al., 2013)

Estudos funcionais indicam que a redução da 5-HT no sistema nervoso promove alteração em estados de ansiedade levando a quadros depressivos e eventos de impulsividade, provavelmente devido ao seu papel modulatório em áreas comportamentais e de manutenção do fator liberador de corticotrofina (CRF) como amígdala, córtex pré-frontal e hipotálamo (COOLS et al., 2011; PUIG e GULLEDGE, 2011; WASELUS et al., 2011; JACOBSEN et al., 2012).

Estudos farmacológicos tem demonstrado a existência de interações entre os sistemas da 5-HT e CRF, de forma que o aumento da 5-HT induzido por inibidores da recaptação de serotonina acarreta em diminuição da liberação de CRF. Por outro lado, o aumento dos níveis de CRF causa inibição nos neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe que é um grande centro sintetizador de serotonina no sistema nervoso central (WASELUS et

al., 2011; KUBOTA et al., 2012). Além disso, a 5-HT está relacionada com vários distúrbios neurológicos como depressão, esquizofrenia, síndrome de Down, doença de Alzheimer, déficit e desordem de atenção, alcoolismo, apnéia do sono (AZMITIA, 1999; FILIP e BADER, 2009). Recentemente, também foi descrito que terminais serotoninérgicos estão em grande quantidade, porém distróficos, no córtex cerebral de encéfalos de autistas (AZMITIA et al., 2011). Assim, nota-se o importante papel da serotonina na modulação das atividades que dependem da integração sensório-motora, entre elas podemos citar o reflexo auditivo de sobressalto (RAS) e a inibição por estímulo prévio (PPI) que envolve a participação dos núcleos da rafe (DAVIS e SHEARD, 1974)

1.2 O Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina (CART)

Após a injeção de cocaína e anfetamina no estriado de ratos foi verificada a síntese de um novo peptídeo com ação psicomotora sendo este denominado de Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina (CART) (DOUGLASS et al., 1995; ELIAS et al., 2001). O CART apresenta em sua sequência de aminoácidos uma cadeia principal com duplicação de vários pares de base, sugerindo que o CART é formado por fragmentos de peptídeos menores, podendo atuar tanto como um neurotransmissor como um co-transmissor (KOYLU et al., 1998).

O mapeamento da distribuição de CART no sistema nervoso central de ratos demonstra terminais axonais e neurônios imunorreativos em alguns núcleos previamente relacionados com o RAS e a PPI, como LC (GOMEZ-NIETO et al., 2008a; HORMIGO et al., 2014b), o DR (MELONI e DAVIS, 2000; GOGOS et al., 2005), porém não foi descrita a presença de terminais axonais em núcleos da via auditiva como os cocleares e colículo inferior (CI) ou do circuito elementar do RAS.

Funcionalmente o CART tem sido implicado em efeitos ansiogênicos, hiperálgicos e na regulação autônoma (BANNON et al., 2001; ELIAS et al., 2001). A injeção de duas variantes do CART (CART 42-89, CART 49-89) no sistema nervoso central modificou o RAS e a PPI de formas diferentes (BANNON et al., 2001). Assim o CART 42-89 levou a diminuição do RAS mas não alterou significativamente a PPI, enquanto o CART 49-89 não alterou o RAS, porém aumentou a PPI. Este efeito poderia ser mediado pela presença do CART em áreas como área tegmental ventral, núcleo accumbens e pálido ventral que modulam a PPI ou estabelecem conexões com outros núcleos que o fazem, como núcleo tegmental pedunculopontino (PPTg) e o PnC (SWERDLOW et al., 1990; SWERDLOW e GEYER, 1993b). No entanto não existem informações sobre a origem e distribuição dos terminais axonais CART-érgicos nos núcleos do circuito elementar de sobressalto.

1.3 O reflexo auditivo de sobressalto

O reflexo auditivo de sobressalto (RAS) é uma reação motora rápida e intensa que implica na contração de um grande número de grupos musculares de todo o corpo em resposta a um estímulo acústico intenso e inesperado. Apresenta um componente vegetativo mediado pelo sistema nervoso autônomo que se manifesta por um aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca (LANDIS e HUNT, 1939; BAUDRIE et al., 1997; KOCH, 1999). Trata-se de um reflexo acústico-motor do tronco encefálico que está presente em muitas espécies de mamíferos, incluindo o homem. Possui tanto caráter defensivo frente a uma possível agressão como de alerta frente a acontecimentos não esperados (KEAY et al., 1988). No homem, (BROWN, 1995) descreveu o reflexo de sobressalto como uma contração generalizada da musculatura estriada esquelética, principalmente da face, pescoço e parte proximal do membro superior. No rato o reflexo de sobressalto se manifesta de maneira mais ampla, com a contração dos membros, flexão do pescoço e encurtamento do comprimento total do animal (YEOMANS e FRANKLAND, 1996; KOCH, 1999). Como resultado destas contrações musculares o animal assume uma postura defensiva que protege partes importantes do seu corpo como a parte ventral do pescoço e do ventre. Tanto no homem como em animais de experimentação os estímulos que desencadeiam mais facilmente o RAS são sons compostos por um amplo espectro de frequências (ruído branco) e de alta intensidade, normalmente acima de 80 dB SPL (GRILLON et al., 1994; PILZ e SCHNITZLER, 1996; KOCH, 1999). A latência deste reflexo é muito curta: 8 ms no rato (DAVIS et al., 1982) e de 5 a 10 ms no homem (KOCH, 1999).

Além do valor etológico dos reflexos acústico-motores para a sobrevivência do indivíduo, existe um enorme interesse nestes reflexos tanto na clínica médica como na pesquisa básica relacionada com a integração sensório-motora (HOFFMAN e ISON, 1980; WILKINS et al., 1986; VALLS-SOLÉ, 1998; SWERDLOW et al., 1999;2000). Devido seu arcabouço anatômico encontrar-se ao nível do tronco encefálico, a avaliação clínica do RAS nos permite reconhecer o estado funcional desta importante parte do encéfalo. Esta estratégia é utilizada em pediatria perinatal onde a observação dos reflexos acústico-motores juntamente com a realização de potenciais evocados são as principais ferramentas que nos permitem conhecer o estado de desenvolvimento e funcionalidade do sistema nervoso. Em otorrinolaringologia, a avaliação destes reflexos nos proporciona informação sobre a funcionalidade da porção baixa da via auditiva, até o nível da ponte e principalmente do nervo coclear. O reflexo de sobressalto constitui um modelo experimental interessante já que é um comportamento bastante simples e facilmente avaliado em provas não invasivas.

O RAS pode ser modificado quantitativamente ou qualitativamente por uma série de condições naturais ou experimentais (SWERDLOW et al., 1999; BELL et al., 2003), consideradas como modulações e que demonstram a plasticidade deste reflexo. O reflexo pode

estar diminuído por habituação ao estímulo (GONZALEZ-LIMA et al., 1989; PILZ e SCHNITZLER, 1996), por um estímulo prévio de menor intensidade (HOFFMAN e FLESHLER, 1963; BRAFF et al., 2001; FENDT et al., 2001; SWERDLOW et al., 2007) e por administração de drogas (SWERDLOW e GEYER, 1993a; BAKSHI et al., 1994; GEYER et al., 2001). Por outro lado, o reflexo pode estar aumentado em condições de potenciação por medo (DAVIS, 1990; GRILLON et al., 1991; ANISMAN et al., 2000; DAVIS, 2006; WINSLOW et al., 2007), ansiedade (KAVIANI et al., 2004; PREHN et al., 2006; GRILLON, 2008; DIAS et al., 2013), e estresse (ANDRESKI et al., 1998; KAVIANI et al., 2004; KANAI et al., 2007; STAM, 2007). Em geral as modulações mostram-se mais sensíveis do que o próprio reflexo e apresentam alterações significativas em situações em que o reflexo propriamente dito não está alterado (HOFFMAN e ISON, 1980; JUSTUS e FINN, 2007). Por esta razão as provas comportamentais envolvendo as modulações do RAS têm despertado interesse no diagnóstico clínico (WILKINS et al., 1986). Na clínica neurológica e psiquiátrica estão documentadas alterações nas respostas do RAS devido as modulações provocadas por doenças neurodegenerativas, esquizofrenia, hiperreflexia, depressão e estados de dependência de drogas como opiáceos e álcool (MANSBACH et al., 1992; BOROWSKI e KOKKINIDIS, 1994; GRILLON et al., 1994; BROWN, 1995; KOCH, 1999).

O RAS também está sujeito a manipulações farmacológicas. Os agonistas dopaminérgicos diretos, que atuam diretamente sobre os receptores dopaminérgicos simulando a ação da dopamina, como a bromocriptina aumentam a magnitude do reflexo (SWERDLOW et al., 2002), assim como os agonistas dopaminérgicos indiretos, como as anfetaminas (BELL et al., 2003) ou a cocaína, que atuam promovendo a liberação do neurotransmissor armazenado em terminais axônicos. O “ecstasy” também produz modificações na magnitude do reflexo auditivo de sobressalto, neste caso mediadas pelo sistema serotoninérgico já que esta substância promove a liberação de serotonina (VOLLENWEIDER et al., 1999; HEEKEREN et al., 2004). As “drogas de uso social” comuns em nossa sociedade como o álcool e o tabaco também exercem influência sobre o RAS. O álcool diminui a amplitude (GRILLON et al., 1994) como seria esperado por seu efeito depressor sobre o sistema nervoso central. No entanto, estudos realizados em roedores demonstraram um aumento da amplitude do reflexo, o que pode ser explicado pelo efeito bifásico do álcool que inicialmente atua como estimulante (DUDEK et al., 1991) determinando a liberação de dopamina (LEWIS e GOULD, 2003) e posteriormente atua como um depressor pela ativação do GABA. O tabaco atua através da liberação de dopamina por meio de seu componente estimulante, a nicotina, e produz uma diminuição da latência de resposta sem alteração da amplitude da mesma (HUTCHISON et al., 2000).

Uma das modulações mais interessantes do RAS é a inibição por estímulo prévio (PPI) que consiste na diminuição do reflexo quando o estímulo desencadeante é prece-

dido, em uma fração de segundo (entre 30 e 500 ms), por outro estímulo sensorial (visual, sonoro ou tátil) de baixa intensidade (KOCH, 1999). As interações neurais que suportam a existência desta modulação do reflexo de sobressalto ainda não estão totalmente esclarecidas e nenhum dos circuitos propostos permite explicar satisfatoriamente todos os fenômenos associados à inibição por estímulo prévio (FENDT et al., 2001; SWERDLOW et al., 2001). Uma das vias propostas inclui uma projeção colinérgica inibidora originada no núcleo pedunculo pontino do tegmento que atua sobre os neurônios grandes do núcleo reticular caudal da ponte (PnC) (KOCH et al., 1993; FENDT e KOCH, 1999; FENDT et al., 2001). Mais recentemente, após verificar efeitos inibitórios nos neurônios da raiz coclear (CRN) durante provas comportamentais desenhadas para desencadeamento da PPI com intervalos interestímulo pequenos, foi proposta outra via envolvendo uma projeção colinérgica do núcleo ventral do corpo trapezóide diretamente aos CRN (GOMEZ-NIETO et al., 2008b; GOMEZ-NIETO et al., 2013).

A avaliação das modulações do reflexo de sobressalto em animais de experimentação tem sido proposta como modelo equivalente para situações que podem ocorrer na espécie humana, convertendo-se em uma ferramenta para pesquisa de novos fármacos. Assim, o reflexo de sobressalto potenciado por estímulo adverso provoca em animais de experimentação um estado de temor que tem sido equiparado ao estado de ansiedade no homem (COOK et al., 1992) e pode ser utilizado para avaliar o efeito de fármacos em patologias psiquiátricas relacionadas com estados de ansiedade.

As modulações próprias do RAS e suas alterações farmacológicas estão relacionadas com estruturas do sistema nervoso central que terminam por influenciar a atividade dos núcleos do circuito elementar do reflexo (LEE et al., 1996). No rato, o circuito neural elementar do reflexo auditivo de sobressalto está constituído de quatro elementos (Figura 1): as células ganglionares do órgão de Corti, os CRN, os neurônios reticuloespinais do PnC e os motoneurônios da medula espinal (YEOMANS et al., 1993; FRANKLAND et al., 1995; LEE et al., 1996; YEOMANS e FRANKLAND, 1996; KOCH e SCHNITZLER, 1997; KOCH, 1999). Dentre estes o núcleo mais estudado é o PnC sobre o qual se conhecem as características eletrofisiológicas (LINGENHÖHL e FRIAUF, 1994), conectividade (YEOMANS e FRANKLAND, 1996) e respostas à manipulação farmacológica (EBERT e KOCH, 1992; KRASE et al., 1993; MISERENDINO e DAVIS, 1993). O PnC atua como centro integrador de aferências de diversas origens e com distintos neurotransmissores, fato que está relacionado com o grande número de modulações do RAS (KOCH, 1999).

Um aspecto interessante é a modulação do RAS por monoaminas como a serotonina e a noradrenalina (DAVIS, 1980; DAVIS et al., 1986; PAVLASEK, 1989; BAKSHI e GEYER, 1997; ANISMAN et al., 2000; FLETCHER et al., 2001; ALMADA et al., 2009; BRAUER et al., 2009; CONTI, 2012; CURTIN et al., 2013). A vasta literatura sobre este as-

sunto nos mostra que ambas possuem forte influência sobre este reflexo, tanto de forma facilitatória, quanto inibitória.

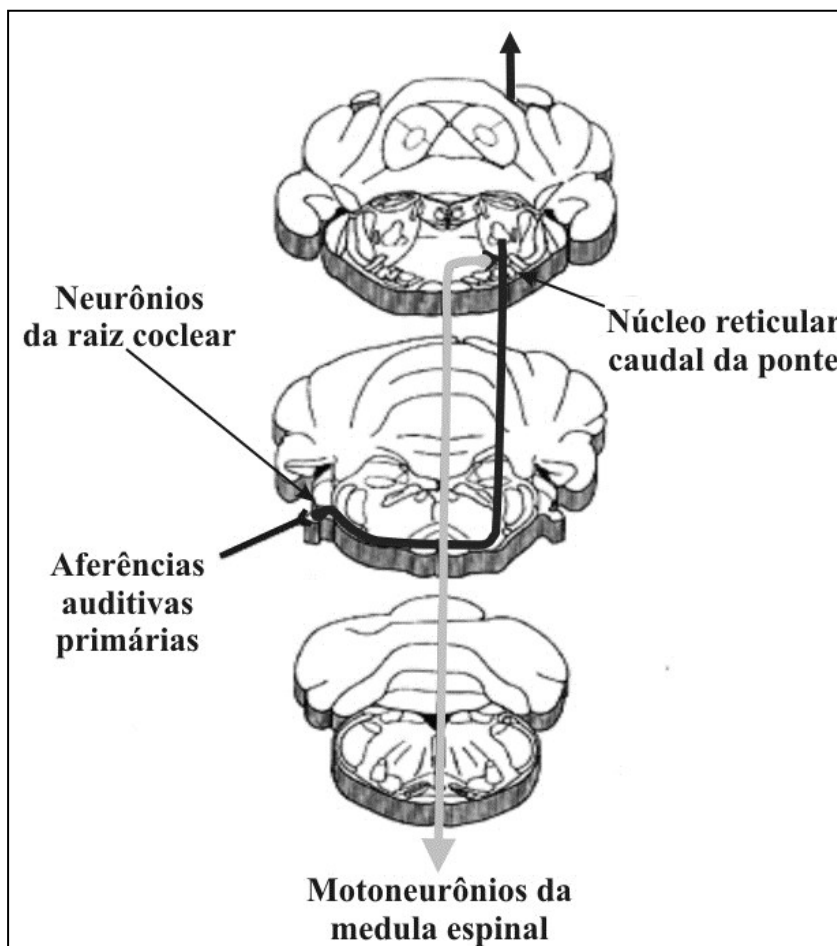


Figura 1 Esquema do circuito neural elementar responsável pelo reflexo auditivo de sobressalto. Arco aferente em cinza negro e arco eferente em cinza claro. Esquema modificado de Lee et al. (1996).

O papel da noradrenalina na modulação comportamental foi estudado em vários paradigmas, entre eles o RAS, após a lesão dos feixes noradrenérgicos dorsal e ventral (eferências do LC) embora inicialmente não fosse evidenciada nenhuma influência (VERLEYE e BERNET, 1983). Estudos fisiológicos descreveram um aumento significativo no RAS devido microinjeções de noradrenalina na formação reticular pontina, indicando que a noradrenalina possui papel potencializador sobre este reflexo (PAVLASEK, 1989). Neste contexto, estudos farmacológicos empregando a infusão de anfetamina (agonista noradrenérgico indireto) ou ioimbina (antagonista dos receptores α_2) na medula espinal (DAVIS e ASTRACHAN, 1981) e no líquido cefalorraquidiano (KEHNE e DAVIS, 1985) levam ao aumento da amplitude do RAS. Corroborando com estes resultados a administração sistêmica de clonidina, droga agonista dos receptores α_2 , diminui a amplitude do sobressalto (DAVIS et al., 1977), mesmo em animais descerebrados ou com lesões bilaterais do LC, indicando que o efeito da cloni-

dina nos terminais noradrenérgicos pré-sinápticos poderia ser mediado por outras aferências noradrenérgicas sobre os neurônios dos núcleos cocleares e do PnC (DAVIS et al., 1989).

Com relação a serotonina, como elemento modulador do RAS e da PPI, parece exercer seu papel durante as alterações de neurotransmissão (DAVIS e SHEARD, 1974; FLETCHER et al., 2001). Recentemente foi descrita a participação do receptor 5-HT_{5A} na modulação sensório-motor atuando na inibição tônica do circuito do RAS em peixes (CURTIN et al., 2013). A serotonina participa na modulação mas não é essencial para o desencadamento do reflexo, uma vez que, a lesão neonatal de áreas serotoninérgicas com 5,7-DHT não interfere na PPI quando o animal atinge a idade adulta (KOLOMANSKA et al., 2011).

Embora muitos trabalhos demonstrem que a serotonina possui papel modulador tanto do RAS quanto da PPI, nota-se que foi dada muita importância para os efeitos da serotonina mediados por estruturas prosencefálicas e não se verificou a existência de conexões entre áreas serotoninérgicas e o circuito elementar do RAS. Os dados que dispomos até o momento indicam apenas a existência de terminais axonais serotoninérgicos no PnC (STEINBUSCH, 1981) sem no entanto identificar suas origens.

1.4 Os neurônios da raiz coclear e o núcleo reticular caudal da ponte

O nervo coclear está localizado medialmente ao paraflóculo do cerebelo, juntamente ao nervo vestibular com o qual se dirige ao meato acústico interno, posicionando-se lateralmente, dorsalmente e caudalmente (ANGULO et al., 1990) para formar o nervo vestibulococlear, VIII par de nervos cranianos. A parte inicial do nervo vestibulococlear emerge do tronco encefálico na porção lateral do sulco bulbopontino, caudalmente a raiz do nervo trigêmeo, sendo formado pela união da raiz do nervo coclear e do nervo vestibular e ocupando o meato acústico interno juntamente com o nervo facial (Figura 2).

O nervo coclear é constituído pelos axônios aferentes dos neurônios do gânglio espiral (Figuras 2 e 3), os quais conduzem impulsos nervosos associados à audição procedentes do Órgão de Corti situado na cóclea (HEBEL e STROMBERG, 1976), além disso, também é constituído de fibras eferentes oriundas do complexo olivar superior: o feixe olivococlear (WARR, 1992).

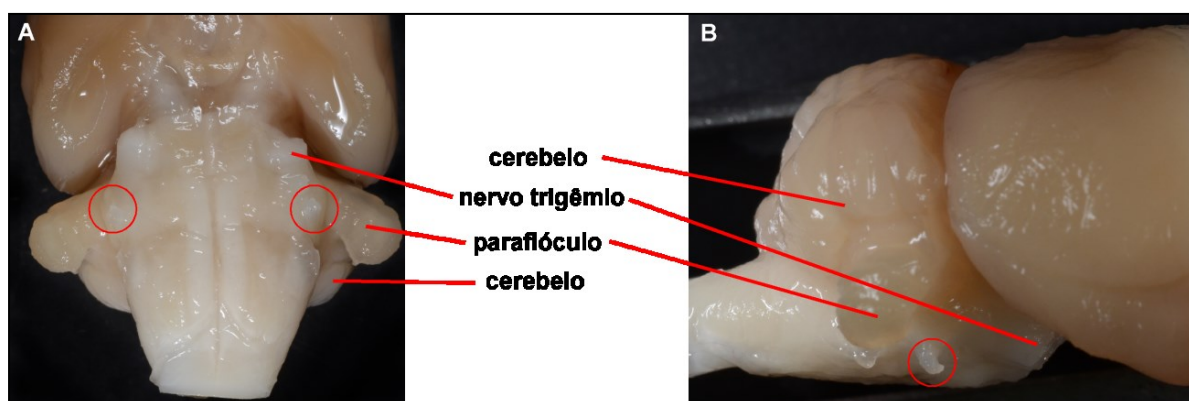


Figura 2 Nervo vestibulococlear e Raiz coclear. Em A vista ventral do tronco encefálico evidenciando o nervo vestibulococlear e raiz coclear; em B vista lateral do mesmo encéfalo em A evidenciando o nervo vestibulococlear e raiz coclear. Figura extraída de (BARIONI, 2012).

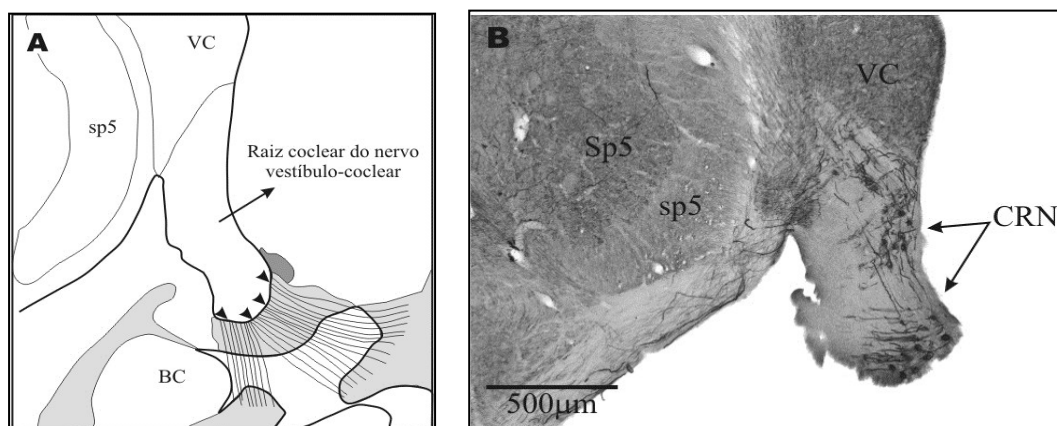


Figura 3 Raiz coclear do nervo vestibulo-coclear e os neurônios da raiz coclear (CRN). Em A, um esquema de um corte coronal do tronco encefálico e parte da espira basal da cóclea preparado com base no trabalho de Merchán et al. (1988). As cabeças de seta indicam a borda glial que delimita a raiz coclear. Em B, fotomicrografia de corte coronal da raiz coclear submetido a técnica imunohistoquímica para neurofilamentos SMI-32. Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

No rato, como em outros mamíferos, as fibras do nervo coclear terminam no complexo nuclear coclear (LORENTE DE NÓ, 1933) e assim o fazem em um padrão tonotópico (ROSS e BURKEL, 1971; MERCHÁN et al., 1988). Cada fibra bifurca em um ramo ascendente que supre o núcleo coclear ventral anterior (VCA), e um ramo descendente que supre os núcleos coclear ventral posterior (VCP) e dorsal (DCN) (HARRISON e IRVING, 1966).

A raiz coclear compreende a parte do nervo que está entre o núcleo coclear ventral e a borda de células de Schwann do VIII par (MERCHÁN et al., 1988). A raiz do nervo coclear é definida como a parte do nervo desprovida das células de Schwann. Nela está situado um grupo de aproximadamente cinquenta células (de 30 a 38 µm de diâmetro) de cada lado (Figuras 2 e 3), facilmente identificadas em secções histológicas do tronco encefálico de roedores e marsupiais (LÓPEZ et al., 1993; AITKIN, 1995), as quais constituem os

primeiros neurônios do sistema nervoso central a receber informação auditiva através de colaterais axônicos originários das fibras nervosas do nervo coclear: os neurônios da raiz coclear (CRN) (HARRISON et al., 1962; HARRISON e WARR, 1962; OSEN et al., 1991).

Cada CRN conecta-se com grande quantidade de colaterais provenientes de fibras nervosas de praticamente toda extensão do órgão de Corti (OSEN et al., 1991). Isto se deve ao padrão de ramificação dendrítica dos CRN com dendritos longos dispostos em duas direções: paralelamente e perpendicularmente às fibras aferentes cocleares primárias (MERCHÁN et al., 1988). Os dendritos perpendiculares são especialmente extensos e cruzam transversalmente praticamente toda raiz coclear. Portanto, os CRN estão sujeitos a estimulação por um amplo espectro de frequências acústicas, embora possuam o limiar de excitação mais baixo para frequências ao redor de 30 kHz (SINEX et al., 2001).

Embora sejam os primeiros neurônios a receber aferências auditivas, os CRN relacionam-se com estruturas não auditivas (LÓPEZ et al., 1999; NODAL e LÓPEZ, 2003). Os CRN conectam-se com núcleos de integração sensório-motor da formação reticular (Figura 4), especialmente com o núcleo reticular caudal da ponte (PnC) ou diretamente com o núcleo motor do nervo facial (HORTA-JUNIOR et al., 2008). Devido a sua posição e padrão de conectividade, os CRN foram relacionados funcionalmente com o circuito do reflexo auditivo de sobressalto, hipótese que foi confirmada por (LEE et al., 1996).

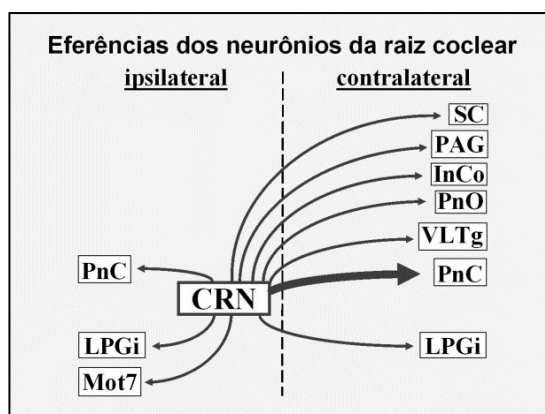


Figura 4 Esquema das aferências dos CRN. A seta mais espessa indica a projeção mais exuberante. Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

As origens das aferências aos CRN que não provenham da cóclea ainda são pouco conhecidas. Não foram investigadas com detalhes quais modulações do RAS poderiam relacionar-se com os CRN e seus aferentes diretos ou indiretos.

O estudo da ultra-estrutura da raiz coclear demonstrou que aproximadamente a metade da superfície celular dos CRN está recoberta de botões sinápticos classificados em quatro tipos (MERCHÁN et al., 1988). Os botões do tipo I são os mais numerosos, constituindo em conjunto 75% de todos botões sinápticos. Apresentam assimetria nas densidades pré e pós-sinápticas e contêm muitas vesículas circulares e elétron-lúcidas sugerindo conta-

tos sinápticos excitatórios. As características ultra-estruturais destes botões são iguais aos botões sinápticos dos aferentes primários nos núcleos cocleares que são glutamatérgicos (ZHOU et al., 2007). Isto sugeriu que os botões de tipo I se originassem de colaterais dos aferentes cocleares primários, como foi demonstrado por (OSEN et al., 1991). Os demais botões sinápticos que não se originam dos aferentes primários são menos numerosos (cerca de 25% de todos que terminam sobre os CRN) e possuem característica morfológica heterogênea com vesículas elétron-lúcidas circulares ou pleomórficas que sugerem que se originem de outras regiões com identidades neuroquímicas diferentes (MERCHÁN et al., 1988).

No núcleo coclear ventral, vizinho imediato dos CRN, foram identificadas aferências serotoninérgicas provenientes dos núcleos da rafe, mas não há menção sobre a chegada destas aferências aos CRN (KLEPPER e HERBERT, 1991). Os CRN estão em aposição com grande quantidade de botões imunorreativos para o transportador vesicular de glutamato (VGlut1) assim como com terminais imunorreativos para o transportador vesicular de GABA e glicina (VGat) (OSEN et al., 1991; GOMEZ-NIETO et al., 2008a), porém não se conhece a origem destas aferências inibitórias. Também foi descrita uma nova fonte de aferências diretas aos CRN com origem no LC e de natureza noradrenérgica (GOMEZ-NIETO et al., 2008a; HORMIGO et al., 2014b) e proveniente do VNTB de natureza colinérgica (GOMEZ-NIETO et al., 2008b).

Por outro lado, o PnC é a porção da formação reticular rombencefálica que se estende desde o pólo rostral do núcleo motor do nervo facial até o pólo rostral do núcleo motor do nervo trigêmeo, onde começa o núcleo reticular pontino oral (PnO) (NEWMAN, 1985; KOCH et al., 1992). Ventralmente está limitado pelo Complexo Olivar Superior (COS), medialmente pelo feixe predorsal, lateralmente pelo núcleo subcerúleo (SubC) que rodeia o núcleo motor do nervo trigêmeo (JONES, 1995), dorsalmente pela área tegmental dorsomedial (DMTg) e pelo fascículo longitudinal medial (mlf). A porção auditiva do PnC corresponde a metade rostral de sua parte ventro-lateral, dorsalmente ao complexo olivar superior e ventromedialmente ao núcleo motor do trigêmeo (LINGENHÖHL e FRIAUF, 1992;1994).

O PnC é o principal centro de convergência de estímulos sensoriais e elemento fundamental do circuito elementar do reflexo auditivo de sobressalto (DAVIS et al., 1982; KOCH et al., 1992; LINGENHÖHL e FRIAUF, 1994). A conexão entre os CRN e o PnC é a principal responsável pelo envio de informação auditiva ao PnC (LÓPEZ et al., 1999; NODAL, 1999; NODAL e LÓPEZ, 2003) e possui importância fundamental para existência do reflexo (LEE et al., 1996).

Muitos trabalhos sugerem que a noradrenalina exerça efeito sobre o circuito elementar do sobressalto em nível do PnC, porém, até o momento os terminais axonais noradrenérgicos no PnC não foram caracterizados hodológica e neuroquimicamente embora

se saiba que esta área recebe inervação do LC (JONES e YANG, 1985). Além disso, foram descritas aferências noradrenérgicas aos CRN que em parte são provenientes do LC (GOMEZ-NIETO et al., 2008a; HORMIGO et al., 2014b), mas devido a exuberante quantidade de terminais noradrenérgicos na raiz coclear é provável que outras fontes de aferências noradrenérgicas exerçam influência sobre o circuito elementar do RAS (DAVIS et al., 1977). Recetemente, foi descrita uma grande variedade de receptores adrenérgicos na raiz coclear ($\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$), o que sugere um importante envolvimento da noradrenalina neste nível através do desencadeamento do RAS e também de suas modulações (GOMEZ-NIETO et al., 2008a).

Desta forma, consideramos importante estudar as origens das aferências ao circuito elementar do reflexo de sobressalto que apresentem identidade neuroquímica de substâncias neuroativas que reconhecidamente participam da modulação do RAS e da PPI, como a noradrenalina, serotonina e o neuropeptídeo CART.

2 OBJETIVOS

1. Estudar a origem das aferências monoaminérgicas (serotoninérgicas e noradrenérgicas) e CART-érgicas ao circuito elementar do reflexo auditivo de sobressalto por meio de estudos de mapeamento de vias nervosas e caracterização neuroquímica por imunohistoquímica em experimentos de co-localização.
2. Estudar a influência comportamental de lesões nos núcleos identificados como aferentes ao circuito elementar do RAS avaliando o reflexo auditivo de sobressalto e a inibição por estímulo prévio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estratégia experimental

Para estudar a origem das aferências ao circuito elementar do reflexo auditivo de sobressalto, inicialmente foram realizados experimentos de mapeamento de vias nervosas, empregando traçador retrógrado nos núcleos do circuito elementar do RAS no tronco encefálico: o CRN e o PnC. A partir do mapeamento das células retrogradamente marcadas em núcleos que pudessem ter identidade neuroquímica monoaminérgica ou CART-érgica, foram realizados experimentos de controle anterógrado e de colocação dos traçadores com as substâncias neuroativas em questão através da técnica de imuno-histoquímica

Uma vez caracterizada a hodologia e neuroquímica das aferências de interesse, foram planejados experimentos de lesão neurotóxica e avaliação comportamental do RAS e da PPI com diferentes intervalos interestímulo para avaliação do envolvimento do núcleo em questão com a via curta ou longa associadas a PPI.

3.2 Animais de experimentação

Todos os experimentos propostos neste projeto requerem a utilização de animais de experimentação. Não existe método alternativo. Em todas as etapas nos preocupamos com o planejamento, preparação e execução dos experimentos para incrementar ao máximo as possibilidades de êxito, o que supõe uma redução do número de animais utilizados. Este preceito foi seguido na elaboração dos protocolos experimentais que foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (protocolo nº 17/08).

Utilizamos como modelo experimental, fêmeas de ratos albinos adultos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Wistar*, por volta de 100 dias de idade. Esta espécie é representativa dos mamíferos roedores que precisam de um ótimo funcionamento dos reflexos acústico-motores para sobrevivência em um *habitat* terrestre, principalmente

noturno, e por isso é amplamente utilizada para o estudo do reflexo auditivo de sobressalto (YEOMANS e FRANKLAND, 1996; KOCH, 1999). Os animais foram alojados em gaiolas (33x17x18cm) com livre acesso à água e ração, em biotério com temperatura controlada (21 a 23°C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7:00h). Para evitar o estresse por isolamento, em cada gaiola foram alocados dois animais.

As intervenções cirúrgicas para injeção de traçadores, neurotóxico e a eutanásia dos animais foram realizadas sob anestesia profunda. Antes de iniciar qualquer procedimento cirúrgico ou imobilização do animal, foi comprovada a ausência do reflexo córneo-palpebral e reflexo de retirada da pata traseira, como sinal de anestesia eficaz. Os anestésicos que foram utilizados são de uso comum em experimentação animal, com uma dose cuja eficácia foi constatada repetidamente em vários laboratórios de pesquisa. Foram empregados os seguintes anestésicos:

Para injeção de traçadores neurais e neurotóxicos: uma solução anestésica constituída de 5 ml de cloridrato de xilazina (Anasedan® 2%, Ceva) a 20mg/ml (concentração final = 5mg/ml), 5 ml de cloridrato de ketamina (Dopalen® 10%, Ceva) a 100mg/ml (concentração final = 25mg/ml) e 2 ml de acepromazina (Acepran® 1%, Vetnil) a 10mg/ml (concentração final = 1mg/ml), em quantidade suficiente de água bidestilada para 20ml. A solução anestésica foi ministrada por via subcutânea na dose de 0,2ml para cada 100g de peso corporal do animal.

Para o sacrifício por perfusão transcardíaca: sobredose de solução de hidrato de cloral a 10% por via intraperitoneal (aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal).

Todas as substâncias tóxicas foram manipuladas em uma capela extratora de gases. Nela foram preparados os fixadores, perfusão dos animais, reações imuno-histoquímicas com DAB e manipulação de substâncias para desidratação e montagem das lâminas para microscopia óptica.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Experimento tipo 1 - Mapeamento das aferências aos CRN e ao PnC com especial ênfase a núcleos noradrenérgicos, serotoninérgicos e CART-érgicos

Uma vez realizada a anestesia dos animais, os pêlos da região da cabeça e ao redor da orelha foram cortados. O animal foi posicionado no aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, #963) e seus olhos foram mantidos umedecidos com soro fisiológico durante todo o procedimento. A altura do apoio incisal do aparelho estereotáxico foi ajustada para 3,3mm abaixo da linha interauricular de forma que os pontos craniométricos Bregma e Lambda estivessem no mesmo nível (PAXINOS e WATSON, 2007). Foi realizada uma incisão sagital mediana de aproximadamente 3cm na cabeça do animal, desde o ponto Bregma

até a região cervical. Os tecidos que recobrem a calota craniana, inclusive o periósteo, foram divulsionados e afastados lateralmente com bastonetes de algodão expondo os ossos parietais e o osso occipital.

Para o mapeamento das aferências empregamos o traçador neuronal retrógrado Fluoro-Gold® (FG). Para a injeção de FG, foram confeccionadas micropipetas de vidro a partir de tubos capilares (capilares de vidro borossilicato, World Precision Instruments #1B150F-4) estirados verticalmente em equipamento específico (estirador de pipetas vertical, Narishige #PC-10). As coordenadas estereotáticas foram ajustadas em relação à linha interauricular com a micropipeta de vidro fixada ao manipulador de eletrodos e com auxílio de um calibrador de ângulos (David Kopf Instruments, #935). As coordenadas foram baseadas em trabalhos prévios de nosso grupo e no atlas esteretático do encéfalo do rato (NODAL e LÓPEZ, 2003; GOMEZ-NIETO et al., 2008b; HORTA-JUNIOR et al., 2008). O uso do calibrador de ângulos assegurou a máxima precisão no ajuste das coordenadas estereotáticas. Antes do início da cirurgia o posicionamento do animal foi verificado pela projeção da coordenada ântero-posterior (AP) 0,0 e médio-lateral (ML) 0,0 sobre a calota craniana, no centro do triângulo formado pela sutura lambdóide como preconizado por (PAXINOS e WATSON, 2007). As coordenadas para injeção de FG na raiz coclear foram: ântero-posterior -1,0mm; médio-lateral +4,3mm; dorsoventral +0,3mm; ângulo de +20° (ângulo caudal, para direita) e micropipetas com pontas de diâmetro interno variando entre 25 e 50µm. Desta forma a micropipeta atingiu a raiz coclear situada no interior do meato acústico interno, passando através do cerebelo. As coordenadas para o PnC foram: ântero-posterior, -0,32mm; médio-lateral, +1,2mm; dorso-ventral, -0,5mm e micropipetas com pontas de diâmetro interno de 20µm.

Com as coordenadas calibradas, foi marcado o ponto de penetração da micropipeta no crânio e em seguida realizada uma trepanação de aproximadamente 3mm de diâmetro, com um micromotor de baixa rotação equipado com broca dental esférica. Após a remoção da dura-máter, a micropipeta foi carregada com uma solução de FG a 4% dissolvido em NaCl 0,9% e introduzida no encéfalo de acordo com as coordenadas previamente mencionadas. A injeção do traçador foi realizada por iontoforese, aplicando uma corrente positiva de 3µA de maneira intermitente a cada sete segundos, durante quinze minutos. Na sequência, a micropipeta foi mantida em posição por mais dez minutos antes de iniciar sua lenta e cuidadosa remoção. Este passo é fundamental para evitar o refluxo do traçador e consequentemente a contaminação de estruturas vizinhas.

Após a remoção da micropipeta, os tecidos divulsionados foram reposicionados e a incisão fechada com grampos cirúrgicos.

Em vista das conexões recíprocas que foram encontradas ao longo do desenvolvimento deste projeto foram necessárias injeções de FG também no grupamento A5 e DR cujas coordenadas faremos a descrição a seguir:

As coordenadas para o grupo noradrenérgico A5 foram: ântero-posterior, -1,9mm; médio-lateral, +2,5mm; dorso-ventral, -0,1mm; e micropipetas com pontas de diâmetro interno variando entre 15 e 25µm.

As coordenadas para o DR foram calibradas a partir do bregma e baseadas no estudo de Gonçalves et al. (2009): ântero-posterior, -5,3mm; médio-lateral, 0,0 (seio sagital); dorso-ventral -7,3mm (a partir do topo da dura-máter) e micropipetas com pontas de diâmetro interno variando de 20µm.

3.3.2 Procedimentos histológicos e imuno-histoquímica para FG

O período de sobrevivência pós-cirúrgico foi de 10-14 dias. Passado este período os animais foram anestesiados e perfundidos por via transcardíaca com auxílio de uma bomba perfusora peristáltica ajustada a um fluxo de 30ml/min. Foram perfundidas as seguintes soluções, nesta ordem:

- Solução salina filtrada que garante uma boa lavagem do leito vascular e consequentemente a adequada fixação. Esta foi preparada através da dissolução de NaCl a 0,9% em água destilada (150ml, aproximadamente) acrescida de 1 ml de heparina sódica (Hepamax-S® - Blau, 5000U.I.) imediatamente antes da perfusão. A administração da solução salina com heparina foi realizada em temperatura ambiente durante 3 minutos e em quantidade suficiente para permitir um retorno vascular quase transparente.

- Solução fixadora filtrada (aproximadamente 1000ml por animal) composta de formaldeído a 4%, recém-preparada a partir de paraformaldeído (Sigma #P6148), glutaraldeído 0,125% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 em temperatura ambiente. Imediatamente antes da perfusão, esta solução foi filtrada e o pH ajustado.

O encéfalo foi reduzido com o auxílio de uma matriz para encéfalos (Insigth Ltda) a um bloco que se estendeu desde o núcleo do nervo hipoglosso até o hipotálamo. O bloco de tecido foi crioprottegido por imersão em uma solução de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, em agitação a 4°C durante 48h.

Posteriormente, o material foi cortado no plano coronal em secções seriadas de 30µm, obtidas em micrótomo de deslizamento (Leica SM2010R) equipado com platina congeladora (Physitemp, BFS-30MP). Os cortes foram recolhidos sequencialmente, em uma série de 10 frascos preenchidos com tampão fosfato 0,1M pH 7,4, de maneira que o intervalo entre os cortes consecutivos de cada frasco foi de 300µm.

O FG é um traçador autofluorescente que pode ser captado pelos neurônios através do transporte axonal retrógrado e acumulado no pericário (SCHMUED e FALLON, 1986). Embora o FG seja um traçador autofluorescente e não careça de tratamento para ser observado em secções do encéfalo, existem anticorpos comerciais contra FG que permitem a realização de um protocolo de imuno-histoquímica para sua detecção. Este processamento adicional justifica-se pelo aumento da sensibilidade e da estabilização da marcação retrógrada obtida, além de permitir o estudo do material no microscópio óptico convencional por tempo indeterminado (CHANG et al., 1990; NODAL e LÓPEZ, 2003).

Em todos os casos foram processados os cortes de quatro frascos da série de 10, sendo que os cortes de dois frascos foram contra-corados pelo método de Nissl para referência citoarquitetônica.

Antes de iniciar o protocolo para visualizar o FG, foram realizadas duas lavagens de quinze minutos cada, com tampão TBS-TX composto por Tris (Trisma Base, Sigma #T-6066) 0,05 M pH 7,6 com 0,85% de NaCl e 0,2% de Triton X-100 (Merck #11869). Para visualizar o FG, foram utilizados protocolos baseados no método do complexo avidina biotina peroxidase (ABC - Vectastain Standard, Vector Labs, #PK-4000). Este método utiliza a grande afinidade (constante de dissociação 10^{-15}) que a molécula de avidina apresenta pela molécula de biotina (HSU e RAINE, 1981; HSU et al., 1981b;1981a). O complexo ABC está formado por moléculas de HRP unidas à biotina e estas, às moléculas de avidina. Como a avidina não se encontra saturada pelas moléculas de biotina, o complexo ABC possui a capacidade de unir-se a outras moléculas de biotina que em nossos experimentos se encontram na cascata de anticorpos unidos ao FG.

O protocolo para visualização imuno-histoquímica do FG foi realizado empregando o tampão TBS-TX em todas as soluções, exceto na solução de reação histoquímica. Iniciou-se o protocolo pela inibição da peroxidase endógena durante vinte minutos com uma solução de água oxigenada a 3%. Em seguida, os cortes foram incubados em anticorpo anti-FG (Chemicon, #AB 153), obtido em coelho na concentração de 1:10.000, seguido por um anticorpo secundário biotinilado (Vector Labs, #BA-1000) anti-IgG de coelho produzido em cabra na concentração de 1:200, e pela incubação em complexo ABC. Finalmente, o complexo ABC foi visualizado pela reação com a água oxigenada empregando 3,3' – diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB, Sigma #D-9015) como cromógeno (HSU et al., 1981b), o qual forma um produto de reação estável de cor marrom. Esta reação foi realizada em tampão Tris 0,05 M, pH 7,6 com 0,07% de DAB e 0,003% de água oxigenada. O produto da reação é estável e elétron-denso, podendo ser observado tanto em microscopia óptica quanto eletrônica de transmissão (REINER et al., 2000; VAN HAEFTEN e WOUTERLOOD, 2000).

Após o protocolo de imuno-histoquímica, duas séries foram contra-coradas pelo método de Nissl (PAXINOS e WATSON, 2007; KADAR et al., 2009). Este protocolo consiste em realizar a desidratação dos cortes montados em lâminas por meio de banhos de álcool etílico de concentração crescente (de 50% a 100%), dissolução dos lipídeos com dois banhos de xilol, reidratação dos cortes por meio de banhos de álcool etílico de concentração decrescente (de 100% até a água destilada), coloração com violeta de cresil (Sigma #C-1791) ou tionina (Fisher #T-409), nova desidratação com alcoóis etílicos, imersão em três banhos de xilol e montagem da lamínula com Entellan® (Merck, #7961) como meio de montagem.

3.3.3 Experimento tipo 2 - Controle anterógrado das aferências identificadas ao circuito elementar do RAS: área noradrenérgica A5, núcleo dorsal da rafe e conexões recíprocas com o PnC

Para confirmar a origem das aferências identificadas nos experimentos de mapeamento retrógrado, realizamos injeções do neurotraçador anterógrado dextrano amina biotinilada (BDA). O BDA é um neurotraçador normalmente utilizado para identificar as aferências de uma determinada região, visto que é preferentemente anterógrado. O BDA utilizado possui peso molecular de 10.000 Daltons e está conjugado com biotina.

O procedimento cirúrgico foi semelhante ao já descrito para o experimento tipo 1, modificando-se o neurotraçador (BDA), as coordenadas utilizadas no aparelho estereotático e o diâmetro interno da micropipeta de vidro (15 micrômetros).

As coordenadas utilizadas para injeção de BDA no núcleo A5, DR e PnC, baseadas no atlas estereotático do encéfalo de rato (PAXINOS e WATSON, 2007), foram as mesmas descritas para injeção de FG nos experimentos de tipo 1.

O período de sobrevivência pós-cirúrgico do animal foi de aproximadamente 10 dias, e os procedimentos de perfusão transcardíaca e corte do material ocorreram da mesma forma descrita para o experimento tipo 1.

Os cortes seriados foram processados para visualização do BDA por meio da incubação com o complexo avidina biotina peroxidase e reação histoquímica com solução composta de DAB e níquel (níquel amônio sulfato, Sigma #A-1827) como cromógeno (HSU e SOBAN, 1982). Esta reação foi realizada em tampão Tris 0,05 M, pH 8,0 com 0,07% de DAB, 0,003% de água oxigenada e 0,04% de níquel.

3.3.4 Identificação neuroquímica dos terminais na raiz coclear e núcleo reticular caudal da ponte: imuno-histoquímica para dopamina- β -hidroxilase, transcrito regulado pela cocaína e anfetamina e serotonina

Estes experimentos tiveram como objetivo verificar as identidades neuroquímicas dos núcleos aferentes aos neurônios da raiz coclear e PnC. Inicialmente foi verificada a existência de terminais axonais adrenérgicos, serotoninérgicos e CART-érgicos na raiz coclear e no PnC. Para elucidar a identidade neuroquímica das aferências confirmadas nos experimentos de tipo 2, realizamos protocolos de imuno-histoquímica em experimentos de co-localização com os traçadores neuronais para marcar a substância neuroativa ou suas enzimas precursoras, assim como, proteínas que possam ser utilizadas para evidenciar o soma e os dendritos dos neurônios do CRN e do PnC. Os protocolos foram realizados utilizando séries de cortes coronais provenientes de casos de experimentos do tipo 2 empregando protocolo de imuno-histoquímica padrão de nosso laboratório descrito no (apêndice A). Neste sentido utilizamos os seguintes anticorpos primários: anti-serotonina (rabbit anti-serotonina Immunostar #20080); anti-transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) (Phoenix Pharmaceuticals Inc. #55-102, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt do Laboratório de Neuroanatomia Química, Instituto de Ciências Biomédicas III, USP-SP); anti-tirosina hidroxilase (rabbit anti-tirosina hidroxilase, Chemicon #AB152) e anti-dopamina beta hidroxilase (mouse anti-dopamina beta hidroxilase, Chemicon #MAB 308). Em alguns casos a Calbindina D-28k foi utilizada como marcador para demonstrar os neurônios da raiz coclear e do núcleo reticular caudal da ponte.

3.3.5 Estudo comportamental da avaliação do reflexo auditivo de sobressalto e inibição por estímulo prévio após lesão seletiva na área noradrenérgica A5

Uma vez que o estudo hodológico se mostrou eficaz em demonstrar a comunicação do grupo noradrenérgico A5 com núcleos pertencentes ao circuito elementar do reflexo auditivo de sobressalto e em face de não existir relatos na literatura sobre o papel deste grupamento com relação ao RAS e a PPI, nos pareceu importante realizar um estudo funcional das novas conexões descritas por meio de lesão nesta área e análise comportamental do RAS e da PPI.

Primeiramente, antes de realizar os grupos experimentais fizemos experimentos de padronização da cirurgia, concentração e volume do neurotóxico empregado. Foram testados dois neurotóxicos para lesões seletivas no A5: a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (PERESE et al., 1989; THOMAS et al., 1994; BLANDINI e ARMENTERO, 2012) e a droga imunotóxica saporina conjugada a enzima dopamina- β -hidroxilase (DBH-SAP) (TAXINI et al., 2011).

Após a etapa inicial de padronização, comprovamos ser mais eficiente e constante a lesão realizada com 6-OHDA na concentração de 3 µg/µl diluído em ácido ascórbico a 0,2 µg/µl, injetada bilateralmente com volume de 100 nanolitros durante 10 minutos. Para estes experimentos foi utilizada uma seringa de 10 µl (Hamilton 1700 series) controlada por uma bomba de microinjeção (micropump III – WPI) com ponta em aço de 60 µm de diâmetro interno. Finalizada esta etapa de padronização iniciamos os experimentos de lesão e avaliação comportamental.

Os animais destinados aos experimentos de lesão e avaliação comportamental passaram inicialmente por um período de habituação a prova, que consistiu em acondicionar os animais na caixa de sobressalto, uma vez por dia, por 5 minutos com exposição a um ruído de fundo branco de 60dB, durante três dias consecutivos. Uma vez habituados ao procedimento, os animais foram submetidos a um teste inicial de mensuração do reflexo auditivo de sobressalto (RAS) e inibição por estímulo prévio (PPI). Com base na análise desta prova inicial, verificou-se a manifestação de respostas válidas de RAS e PPI, o que era determinante para seleção do animal. Portanto somente animais que respondiam às provas comportamentais foram selecionados para este estudo. Os animais foram distribuídos em dois grupos comportamentais, sendo um grupo lesão (LESÃO/RAS+PPI) no qual foi realizada a cirurgia estereotóxica e injeção do neurotóxico (6-OHDA) nas coordenadas estereotóxicas utilizadas para injeção dos traçadores neuronais no A5 (item 3.3.1), e um grupo controle da lesão (SHAM/RAS+PPI) no qual os animais passaram pela mesma cirurgia estereotóxica, porém sem a injeção do neurotóxico. Para evitar a lesão da membrana timpânica ou até mesmo os ossículos da audição, o que prejudicaria a avaliação do RAS e da PPI, nestes experimentos os animais foram posicionados no aparelho estereotático empregando barras auriculares desenhadas para animais de porte maior como gatos e macacos (David Kopf, #951), o que eliminava a possibilidade de lesão mecânica no tímpano, o que era comprovado ao final de cada cirurgia com o exame do meato acústico externo (Figura 5, as barras nos foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP-SP).

O primeiro dia antes da lesão foi chamado de dia zero (pré-lesão), no qual os animais (8 por grupo) passaram por uma prova de sobressalto e em seguida era realizada a cirurgia para ambos os grupos (Lesão ou Sham). Os dados deste momento são interessantes para comparar o comportamento antes e depois do tratamento Posteriormente, o RAS e a PPI foram avaliados nos momentos 7, 14 e 21 dias após a lesão. No 21º dia, após a avaliação comportamental, os animais foram sacrificados por perfusão transcardíaca, e o encéfalo foi pós-fixado e processados para avaliação histológica do A5 pelas técnicas de Nissl e imuno-histoquímica para DBH e para a proteína c-Fos. O desenho experimental das provas comportamentais está ilustrado na Figura 6.



Figura 5 Comparação entre as barras auriculares para ratos e para gatos. Em A fotografia de vista lateral do crânio de rato a seta aponta o meato acústico externo. Em B barras de fixação auricular. O asterisco marca a barra para gatos utilizada nos experimentos de lesão do A5. Em C e D comparação entre o diâmetro da ponta das barras e o meato acústico externo.

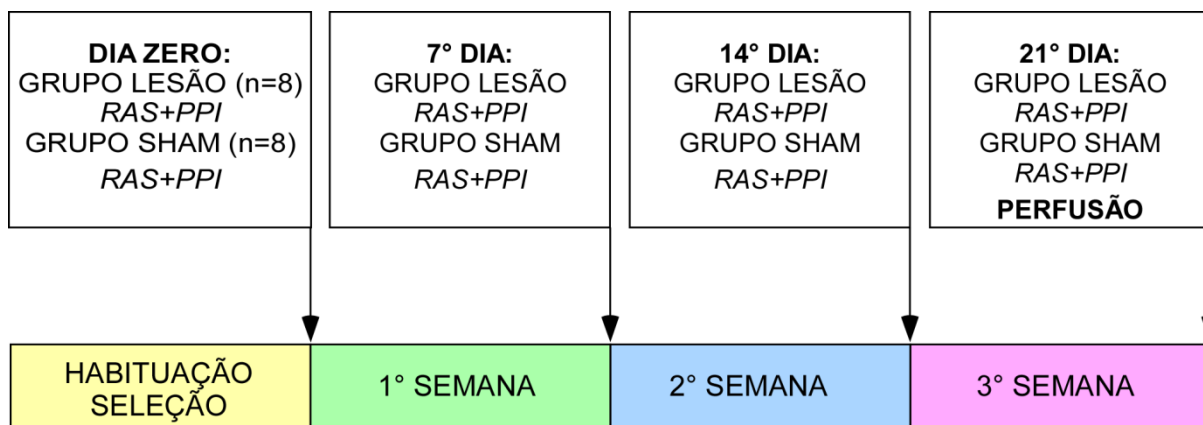


Figura 6 Desenho experimental dos experimentos de lesão do A5 e avaliação comportamental do RAS e PPI.

A mensuração do RAS e da PPI foi realizada utilizando o sistema de avaliação do sobressalto da empresa Insight (Equipamentos Científicos Ltda.) que integra dispositivos de aquisição de quantidade de movimento do animal e dispositivos para 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* que estão conectados a um computador (Figura 7). A quantificação do RAS é realizada por um sensor, localizado 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.

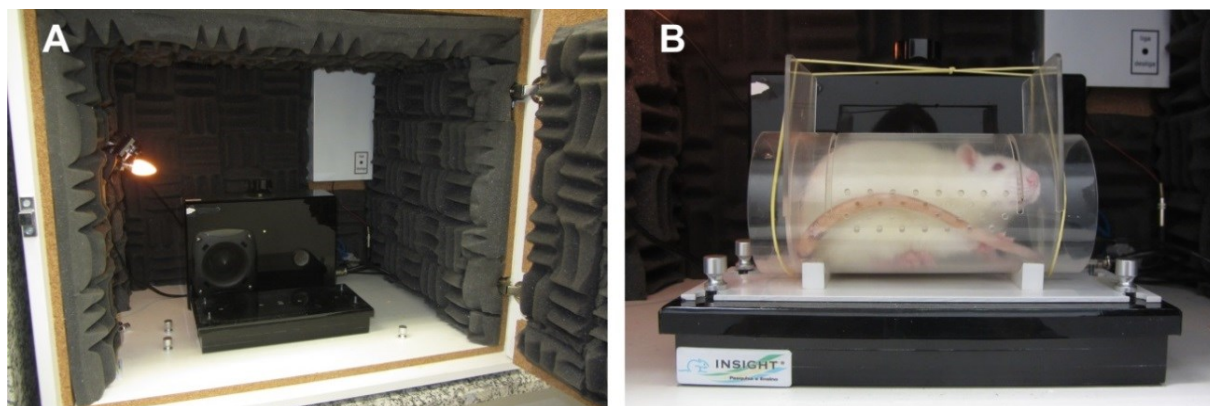


Figura 7 Foto do sistema de avaliação do sobressalto. Em A, interior da câmara de prova com isolamento acústico, na qual se observa a plataforma de captação do movimento do animal, o alto-falante responsável pela geração do ruído de fundo, pré-pulso e pulso, bem como luz ambiente e câmera de vídeo para 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 (Figura 7) são mantidas com ventilação constante, luzes acesas e os animais são monitorados através do computador por uma câmera de vídeo instalada dentro da câmara de prova.

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 sono-

ra, 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. Os estímulos acústicos do tipo ruído branco foram utilizados como desencadeadores do reflexo de sobressalto e os estímulos de tom puro de 4kHz foram utilizados como pré-pulsos, variando sua intensidade.

A avaliação do RAS/PPI consistiu de 6 tipos de apresentação de estímulos, descritos na Quadro 1. Em cada prova, foram apresentados 65 estímulos no total. 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, apresentado 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.

As cinco primeiras tentativas de estimulação isolada (Bloco Treino) eram apresentadas no início da sessão e excluídas do cálculo da média do RAS. 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 interestímulos 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-	25ms	113dB/20ms	12
Prep50+Estímulo	4kHz-	50ms	113dB/20ms	12
Prep100+Estímulo	4kHz-	100ms	113dB/20ms	12
Prep150+Estímulo	4kHz-	150ms	113dB/20ms	12

Quadro 1 Características do pré-pulso, pulso e intervalo entre os estímulos em cada um dos blocos da sessão de avaliação comportamental do RAS e da PPI.

Após as seções de avaliação comportamental os dados gerados pelo sistema foram exportados em planilhas do programa Microsoft Excel 2010. Para cada exposição ao estímulo foi construído um gráfico para visualização da curva de resposta do animal e vali-

dação dos valores informados pelo sistema. Somente foram considerados válidos os valores obtidos com respostas de sobressalto, consideraram-se respostas típicas do reflexo apenas aquelas em que a movimentação do animal após a estimulação é nitidamente maior do que a atividade locomotora registrada antes da emissão do pulso sonoro (BELL et al., 2003). As porcentagens de PPI para os 4 intervalos interestímulo (ISI 25, ISI 50, ISI 100 e ISI 150) foram calculadas em cada sessão com a seguinte fórmula: $\%PPI = [(m\acute{e}dia \text{ da amplitude de RAS} - m\acute{e}dia \text{ amplitude de RAS com pr\acute{e}-pulso) / m\acute{e}dia \text{ de amplitude de RAS}] \times 100$.

A comparação do peso, RAS e PPI considerando os grupos (Lesão e Sham), intervalos entre estímulos (ISI) e o perfil de resposta durante os momentos de avaliação foi realizada por meio da técnica da análise de variância não-paramétrica para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o respectivo teste de comparações múltiplas de Dunn, tanto para a avaliação das grupos fixando cada momento, quanto para os momentos dentro de cada grupo. A opção pelo procedimento não paramétrico foi estabelecida pela não adequação as suposições básicas do procedimento paramétrico (ZAR, 2009). A análise estatística foi realizada com a colaboração do Professor Titular Carlos Roberto Padovani e do Prof. Sérgio Augusto Rodrigues.

3.3.6 Confirmação da funcionalidade da via auditiva nos animais submetidos a cirurgia estereot xica para lesão do A5 e provas comportamentais de avaliação do RAS e PPI

A imunorreatividade a proteína Fos ou mesmo a detecção da expressão de seu RNAm é amplamente utilizada como um marcador de atividade neural (CRANER et al., 1992; LEE et al., 1992; HOFFMAN et al., 1993b; VIAU e SAWCHENKO, 2002; BAISLEY et al., 2011). Embora fossem tomadas medidas para não provocar lesão na orelha do animal, devido a introdução das barras auriculares no meato acústico interno durante a cirurgia estereot xica, verificou-se indiretamente a funcionalidade da via auditiva devido a expressão da proteína Fos nos núcleos cocleares (dorsal e ventral) de ratos que foram submetidos a protocolos de mensuração de sobressalto e PPI em duas condições experimentais (3 animais em cada condição): animais controle, sem qualquer manipulação cirúrgica; e animais do grupo Lesão, após os 21 dias de testes comportamentais.

Os animais destinados a estes experimentos, após serem submetidos a um protocolo de avaliação do RAS e PPI foram deixados em repouso, em suas jaulas de origem, por 60 minutos e sacrificados por perfusão de acordo com o protocolo preconizado por HOFFMAN et al. (1993a). O en falo foi removido, crioprottegido e cortado em 10 séries de cortes de 30 m de espessura. Duas séries de cortes (intervalo entre cortes de 150  m) foram processadas para detecção da proteína Fos por meio do protocolo de imunohistoquímica padrão (anexo A), empregando o anticorpo primário anti-Fos [Ab-5] [4-17], pro-

duzido em coelho (Calbiochem # PC38) na diluição de 1/20.000 e anticorpo secundário anti-coelho biotinilado a 1/200 (Vector, #BA-1000). Após o protocolo imuno-histoquímico, os cortes foram montados em lâminas, desidratados e cobertos com lamínula utilizando Entellan (Merck, #7961) como meio de montagem.

Para a análise destes experimentos as imagens dos núcleos cocleares, em todas as secções de duas séries de cortes de cada caso experimental, foram capturadas no microscópio óptico (Scope.A1, Carl Zeiss) equipado com câmera digital (axioCam HRc, Zeiss). Utilizando o programa PhotoShop® CS2 (version 9.0; Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) as imagens foram unidas, como um mosaico, para a confecção de imagens panorâmicas do complexo coclear de ambos lados. Em cada lado, os núcleos cocleares foram delimitados e utilizando o software IMAGE J (version 1.47, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012) a área dos núcleos e os perfis neuronais imunorreativos a proteína Fos foram contados para o cálculo da densidade neuronal. Os resultados foram agrupados em planilhas do programa EXCEL (Microsoft®) e analisados estatisticamente (teste t não pareado) com o software Graph Pad Prism 3.0 (GraphPad, Software, Inc.).

3.4 Análise das preparações histológicas e documentação fotográfica

As lâminas preparadas foram estudadas no microscópio óptico (Scope.A1 ou Axioplan2, Carl Zeiss) em campo claro. Os perfis celulares retrogradamente marcados foram mapeados a partir das preparações contra-coradas com tionina, para referência citoarquitônica, e de figuras retiradas do atlas estereotático do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2005) sendo as mesmas manipuladas no programa Canvas X (ACD Systems Inc.). A nomenclatura, as abreviaturas e os níveis interaurais (I. A.) utilizados na descrição dos resultados foram baseados no atlas estereotático do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2007). A documentação fotográfica foi realizada com câmera digital (AxioCam HRc ou AxioCam MRc, Zeiss). As imagens capturadas foram organizadas em figuras e trabalhadas com os programas Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc.), Adobe Illustrator CS2 (Adobe Systems Inc.) (plotagens e esquemas) e Canvas X (Copyright © 2005 ACD Systems of America, Inc.) (organização das imagens), sendo ajustado o brilho, contraste e balanço de cores e removendo artefatos localizados externamente aos cortes, de acordo com o preconizado por Schenk et al. (1999) e Saper (1999) para preparação de imagens digitais para publicação científica. As barras de calibração das fotomicrografias foram confeccionadas

fotografando, com os mesmos equipamentos e aumentos, uma lâmina com escala micrométrica calibrada (Leica, LeitzWetzlar) cuja menor divisão é de 100µm.

Os esquemas foram realizados a partir da visualização das lâminas de injeção de traçador anterógrado em microscópio de luz e com o auxílio das figuras do Atlas do sistema nervoso do rato (PAXINOS e WATSON, 2007) foi desenhado as fibras em esquemas do Atlas. A partir destes esquemas, foram plotados desenhos do Atlas com as fibras no programa Canvas X.

Algumas séries de cortes dos experimentos de colocalização entre traçadores neuronais e protocolos de imuno-histoquímica para detecção de substâncias neuroativas foram analisadas em microscópio confocal. Primeiramente as lâminas foram observadas usando um microscópio (Axioplan2, Carl Zeiss) equipado com epifluorescência e câmara digital (AxioCamHRc, Zeiss). Uma vez identificadas as áreas de interesse as preparações foram analisadas em um microscópio confocal (modelo TCS-SP5 AOBS Tandem Scanner, LEICA, Germany) acoplado a um microscópio óptico invertido (Leica DMI 6000CS) do 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 as linhas de excitação de comprimento de onda de 405, 458, 476, 488, 496, 514, 543, 594, 594 e 633 nm. Os fluorocromos foram detectados sequencialmente, e sempre tomamos o máximo de cuidado em utilizar fluoróforos que estejam distanciados no espectro de emissão de fluorescência evitando um resultado falso positivo de colocalização. A marcação de fundo foi controlada em tempo real através do fotomultiplicador de voltagem e ajustada para se obter o melhor compromisso entre sensibilidade e inespecificidade. Foram utilizadas objetivas Planapochromat de 20x, 40x e 63x (abertura numérica 1,30) com imersão a óleo, que possibilitaram uma resolução de até ~150nm nos eixos x, y e ~300nm no eixo -z (*pinhole* de 1 unidad *Airy*).

4 RESULTADOS

4.1 Distribuição de terminais axonais noradrenérgicos serotoninérgicos e CART-érgicos, na raiz coclear e núcleo reticular caudal da ponte

Inicialmente, verificamos em três animais a existência de terminais axonais na raiz coclear e núcleo reticular caudal da ponte (PnC), imunorreativos para enzimas precursoras de noradrenalina (tirosina-hidroxilase (TH) e dopamina- β -hidroxilase (DBH)), assim como da serotonina (5-HT) e do peptídeo transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). No caso do PnC, restringimos nossas observações a sua região ventrolateral, local onde chegam os aferentes primários dos neurônios da raiz coclear e que já foi descrita previamente como a parte do PnC envolvida no RAS (LEE et al., 1996). Nestes experimentos, além do protocolo de imuno-histoquímica para substância neuroativa em questão, empregamos anticorpos contra calbindina D-28K, proteína quelante de cálcio, presente nos CRN e neurônios do PnC, como marcador de citoarquitetura que delimita melhor os elementos pós-sinápticos do que a técnica de Nissl.

Observamos terminais axonais imunorreativos a TH e a DBH na raiz coclear e no PnC (Figura 8). Ao longo de toda raiz coclear, as fibras nervosas marcadas emitiam colaterais que formavam terminais axonais longos e varicosos em aposição com os somas e dendritos dos CRN, algumas vezes contornando-os. No PnC, os campos terminais foram mais difusos, com terminais axonais de variados tamanhos, em aposição com neurônios de vários tipos, inclusive neurônios grandes, provavelmente reticuloespinais (Figura 8).

Foram observados campos terminais imunorreativos a 5-HT na raiz coclear e no PnC (Figura 9). Na raiz coclear, os terminais axonais apresentaram aspecto varicoso, alguns de tamanho curto e outros de aspecto longo, encontrados principalmente na porção lateral da região proximal da raiz coclear, em aposição com dendritos e somas dos CRN. Os terminais axonais 5-HT na porção ventrolateral do PnC, embora não fossem abundantes, estavam presentes, com aspecto de fibras nervosas curtas e varicosas, distribuídas difusamente na região (Figura 9).

Os terminais axonais CART encontrados na raiz coclear também apresentaram varicosidades e não foram muito abundantes (Figura 10). Distribuíram-se principalmente na parte proximal da raiz coclear, próximos aos somas e aos dendritos dos CRN, enquanto outros terminais foram encontrados dispersos na região central e medial da raiz, ocupada pelos aferentes primários oriundos da cóclea. Por outro lado, no PnC, foram encontrados muitos terminais axonais de aparência varicosa, distribuídos nas proximidades dos somas dos neurônios da região ventrolateral (Figura 10).

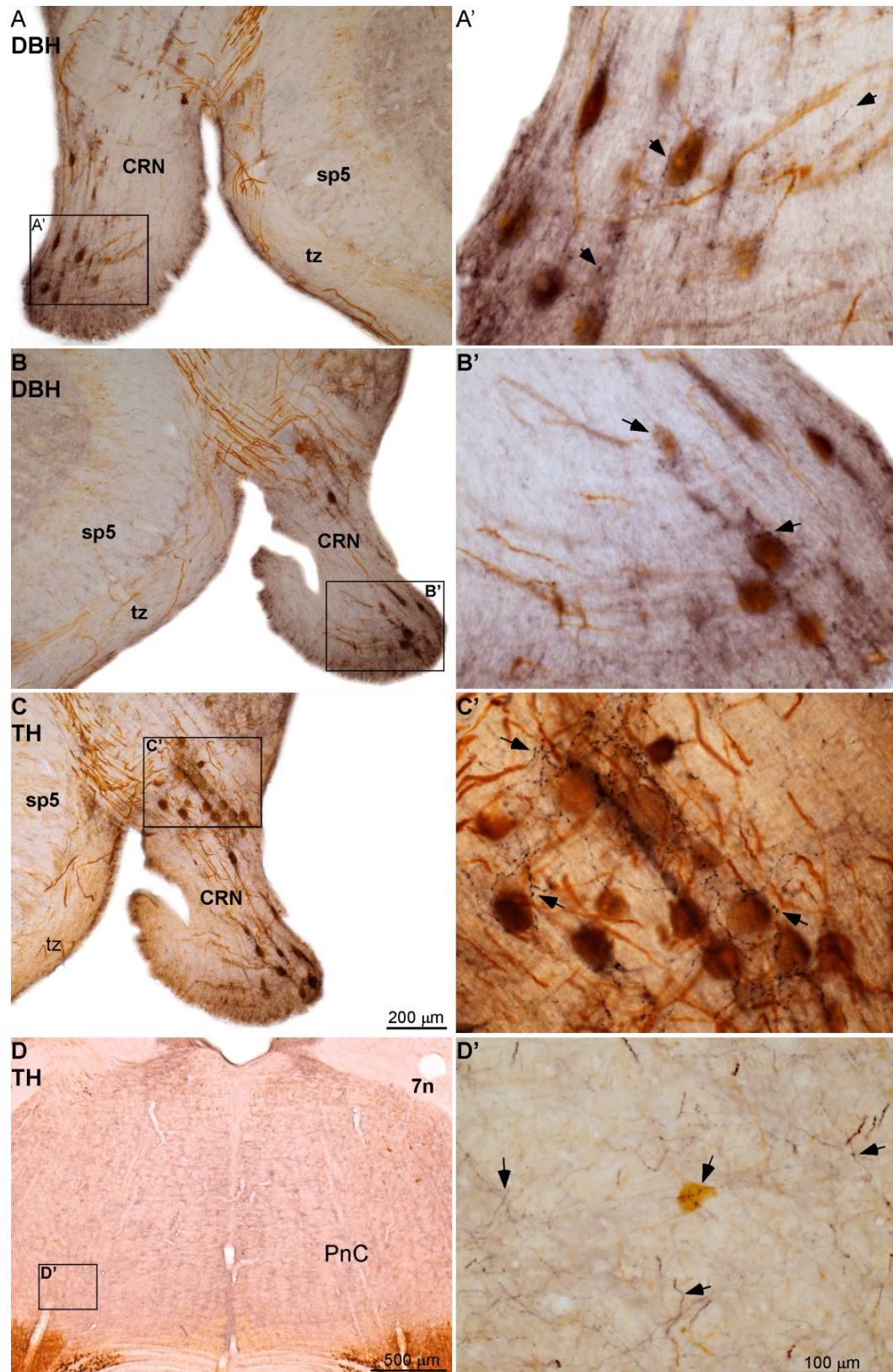


Figura 8 Distribuição de terminais axonais noradrenérgicos na raiz coclear e núcleo reticular caudal da ponte. Fotomicrografias em campo claro de seções imunorreativas a Dopamina- β -hidroxilase (DBH), Tirosina-Hidroxilase (TH) e Calbindina D-28K na raiz coclear (RC) e núcleo reticular caudal da ponte (PnC). As áreas delimitadas na coluna à esquerda foram fotografadas em maior aumento na coluna à direita. As setas indicam os terminais imunorreativos. Em A e B: terminais axonais DBH na região distal da RC. Em C e D: terminais axonais TH na região proximal da RC e na região ventrolateral do PnC. A barra de calibração em C é válida para A e B. A barra de calibração em D' é válida para A', B' e C'. Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

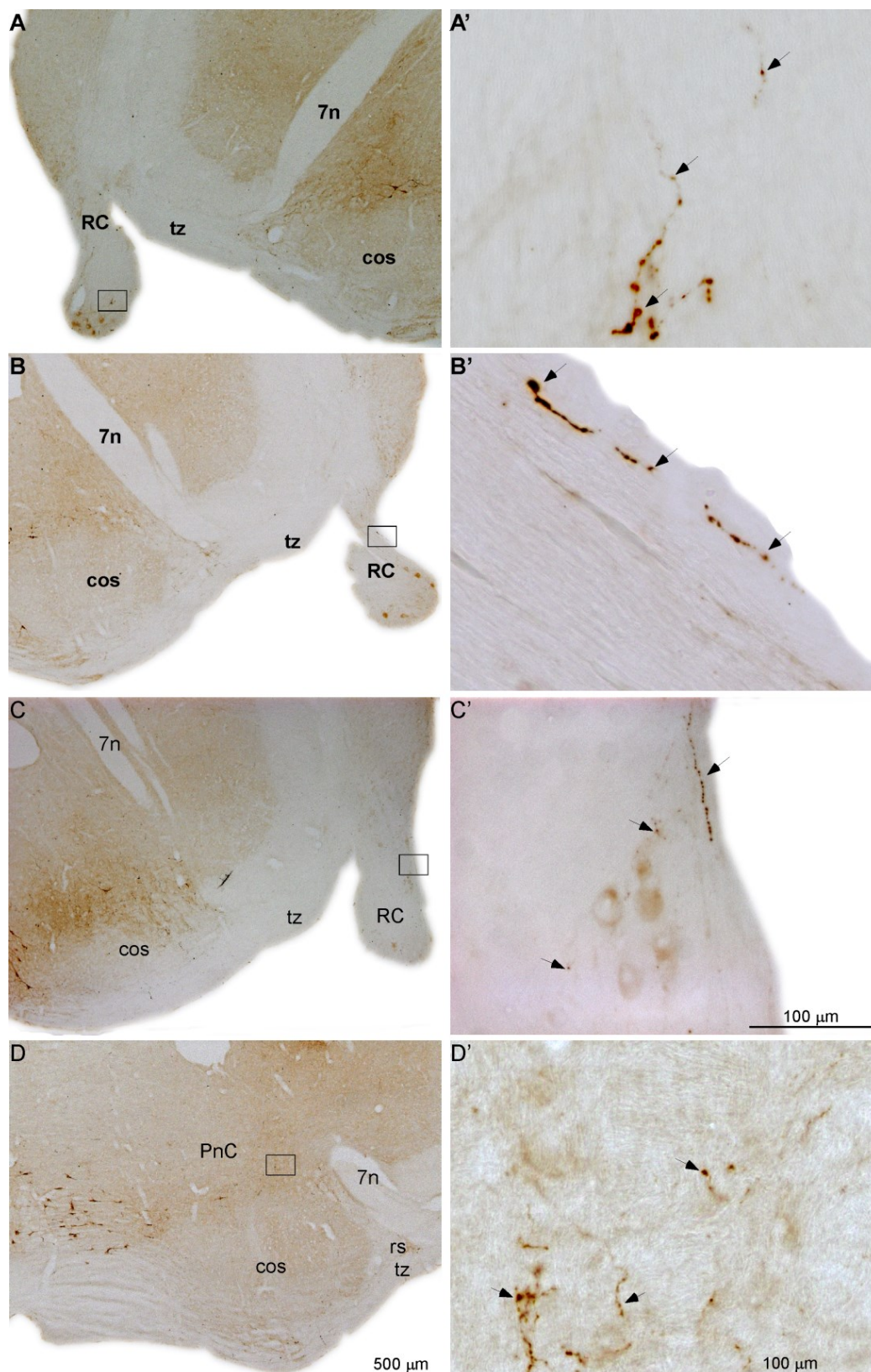


Figura 9 Distribuição de terminais axonais serotoninérgicos na raiz coclear e núcleo reticular caudal da ponte. Fotomicrografias em campo claro de secções imunorreativas a serotonina (5-HT) na raiz coclear (RC) e núcleo reticular caudal da ponte (PnC). As áreas delimitadas na coluna à esquerda foram fotografadas em maior aumento na coluna à direita. As setas indicam os terminais imunorreativos. Em A-A', B-B' e C-C': terminais axonais 5-HT nas regiões média e distal da RC. Em D e D': terminais axonais 5-HT na região ventrolateral do PnC. A barra de calibração em D é válida para A, B e C. A barra de calibração em C' é válida para A' e B'. Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

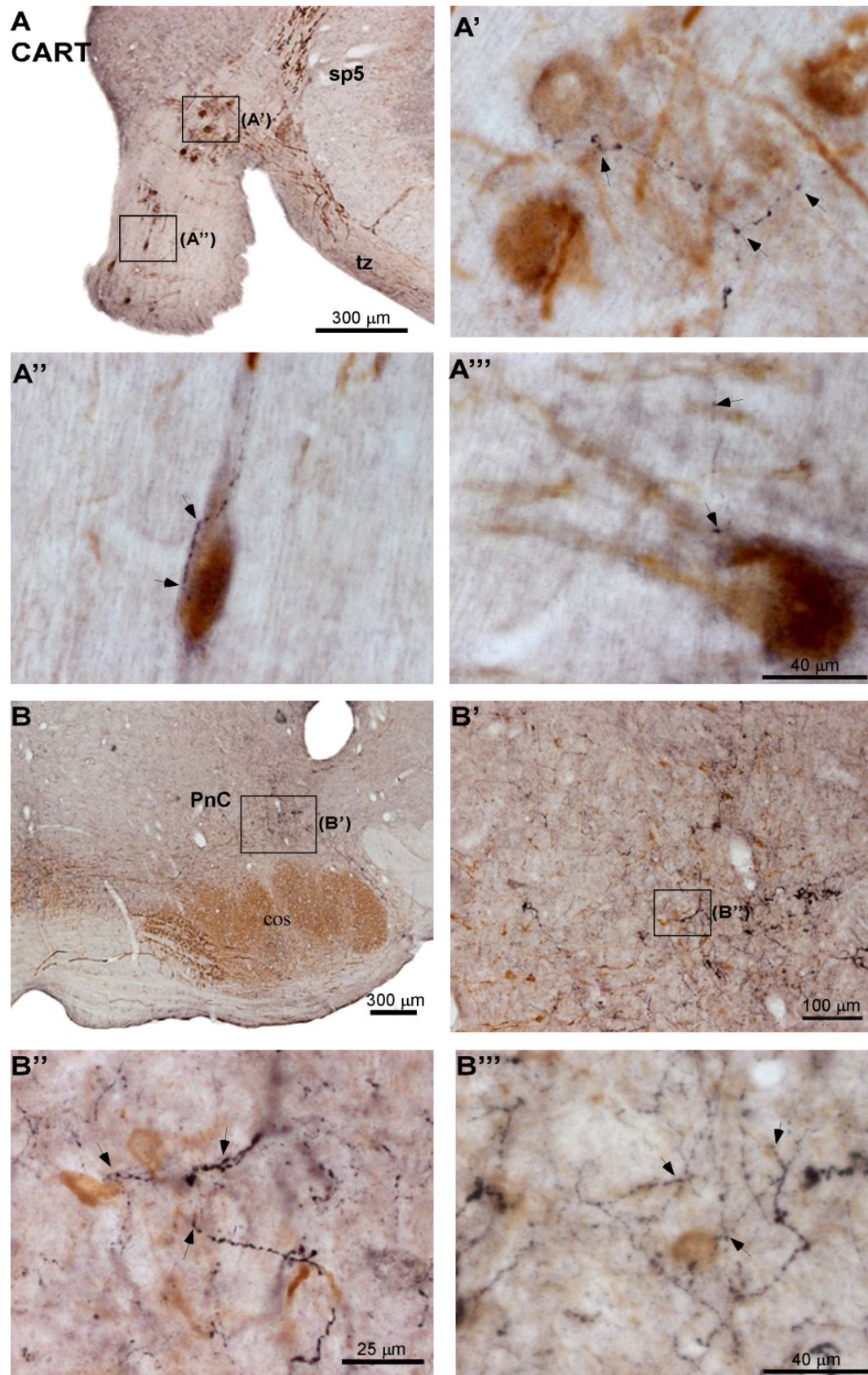


Figura 10 Distribuição de terminais axonais CART-érgicos na raiz coclear e núcleo reticular caudal da ponte. Fotomicrografias em campo claro de secções imunorreativas ao Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina (CART) e Calbindina D-28K na raiz coclear (RC) e núcleo reticular caudal da ponte (PnC). As áreas delimitadas foram fotografadas em maior aumento. As setas indicam os terminais imunorreativos. Em A (A-A'''): terminais axonais CART nas regiões proximal e distal da RC. Em B (B-B'''): terminais axonais CART na região ventrolateral do PnC. A barra de calibração em A''' é válida para A' e A''. Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

4.2 Mapeamento retrógrado das aferências a raiz coclear

Foram selecionados 8 casos de experimentos de injeção de Fluoro-Gold (FG) na raiz coclear, nos quais os locais de injeção foram considerados restritos a região ocupada pelos CRN com pouca ou nenhuma difusão no cerebelo e núcleo coclear ventral durante a abordagem estereotáxica. Os casos selecionados foram: N13, N15, N17, N18 (Figura 11), N20, N25, N30, N32 (Figura 12).

A análise da injeção de neurotraçador em cada caso demonstrou que: no caso N13 houve pequena contaminação do núcleo coclear ventral e flóculo do cerebelo; no caso N15, a injeção foi a mais restrita à raiz, sem contaminação no cerebelo e pouca contaminação nos núcleos cocleares; no caso N17, observamos contaminação nos núcleos cocleares e no cerebelo; no caso N18, verificamos que houve pouca contaminação nos núcleos cocleares e no cerebelo; no caso N20, a injeção se localizou na parte mais rostral da raiz, o traçador extravasou para o líquido e contaminou o nervo facial, além da contaminação no cerebelo; no caso N25, a injeção também se localizou mais rostralmente, houve pouca contaminação no cerebelo e difusão para o núcleo coclear ventral posterior; no caso N30, o sítio de injeção foi localizado na parte mais rostral da raiz coclear, houve contaminação no cerebelo e no núcleo coclear ventral posterior; no N32, o sítio de injeção localizou-se na parte mais medial da raiz, o traçador extravasou para o líquido e contaminou o nervo facial, além da contaminação no núcleo coclear ventral anterior e pouca contaminação no cerebelo (Figuras 11 e 12).

Após o mapeamento dos somas retrogradamente marcados com FG, os núcleos considerados provavelmente aferentes a raiz coclear com identidade neuroquímica previamente descrita na literatura como noradrenérgica, serotoninérgica ou CART-érgica foram examinados com maior detalhe. Assim encontramos como prováveis fontes de aferências noradrenérgicas o grupamento noradrenérgico A5 (ipsilateralmente) o LC (bilateralmente) e o SubC (contralateralmente). Como prováveis fontes de aferências serotoninérgicas foram encontrados o núcleo dorsal da rafe (DR) e o LPGi (bilateralmente). Como prováveis fontes de aferências CART-érgicas encontramos o A5, o DR e o a parte de projeção central do núcleo de Edinger-Westphal (EWcp). Além destes, outros núcleos foram identificados com o prováveis fontes de aferências bilaterais à raiz coclear como o LSO, VNTB, o núcleo eferente vestibular (EVe), de identidade neuroquímica provavelmente colinérgica e outros que não possuem uma identidade neuroquímica claramente definida como a formação reticular intermédia (IRt) e formação reticular parvocelular (PCRt) do bulbo. Alguns núcleos apresentaram perfis neuronais retrogradamente marcados de forma ocasional dependendo do tamanho do sítio de injeção, da contaminação de estruturas nas áreas vizinhas ou de estruturas atravessadas pela micropipeta em seu trajeto. Estas regiões não foram consideradas como prováveis origens de aferências a raiz coclear.

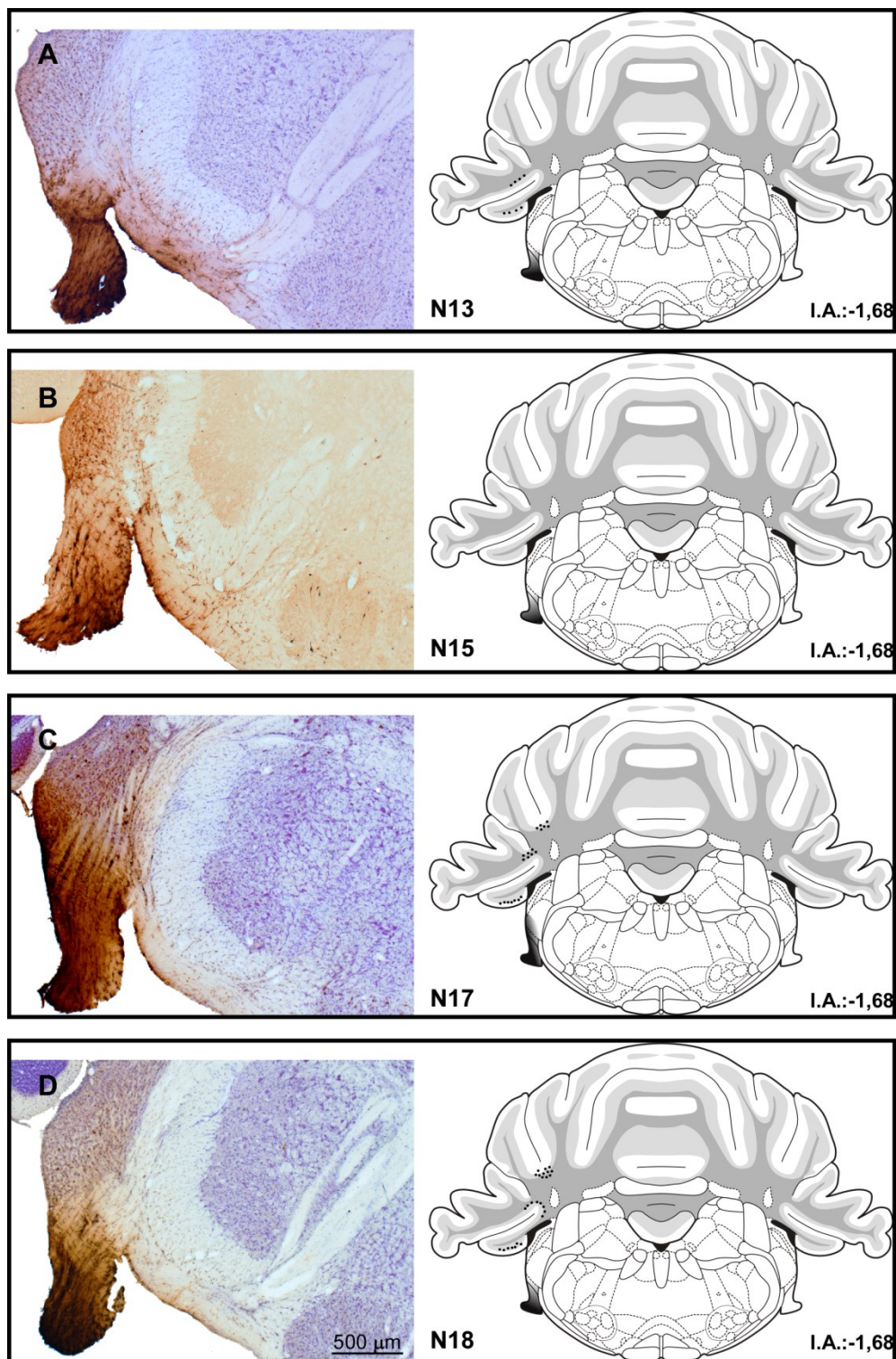


Figura 11 Locais de injeção de FG na raiz coclear dos casos N13, N15, N17 e N18. Fotomicrografias em campo claro dos locais de injeção do FG que foram utilizados no estudo das projeções aferentes a raiz coclear. Os esquemas e o nível interaural (I.A.) foram baseados nas ilustrações do Atlas do encéfalo do Rato (PAXINOS e WATSON, 2007). Nos esquemas, o centro do local de injeção de traçador está indicado em negro e o halo de difusão em cinza. A Barra de calibração na foto em D é válida para as fotos em A, B e C.

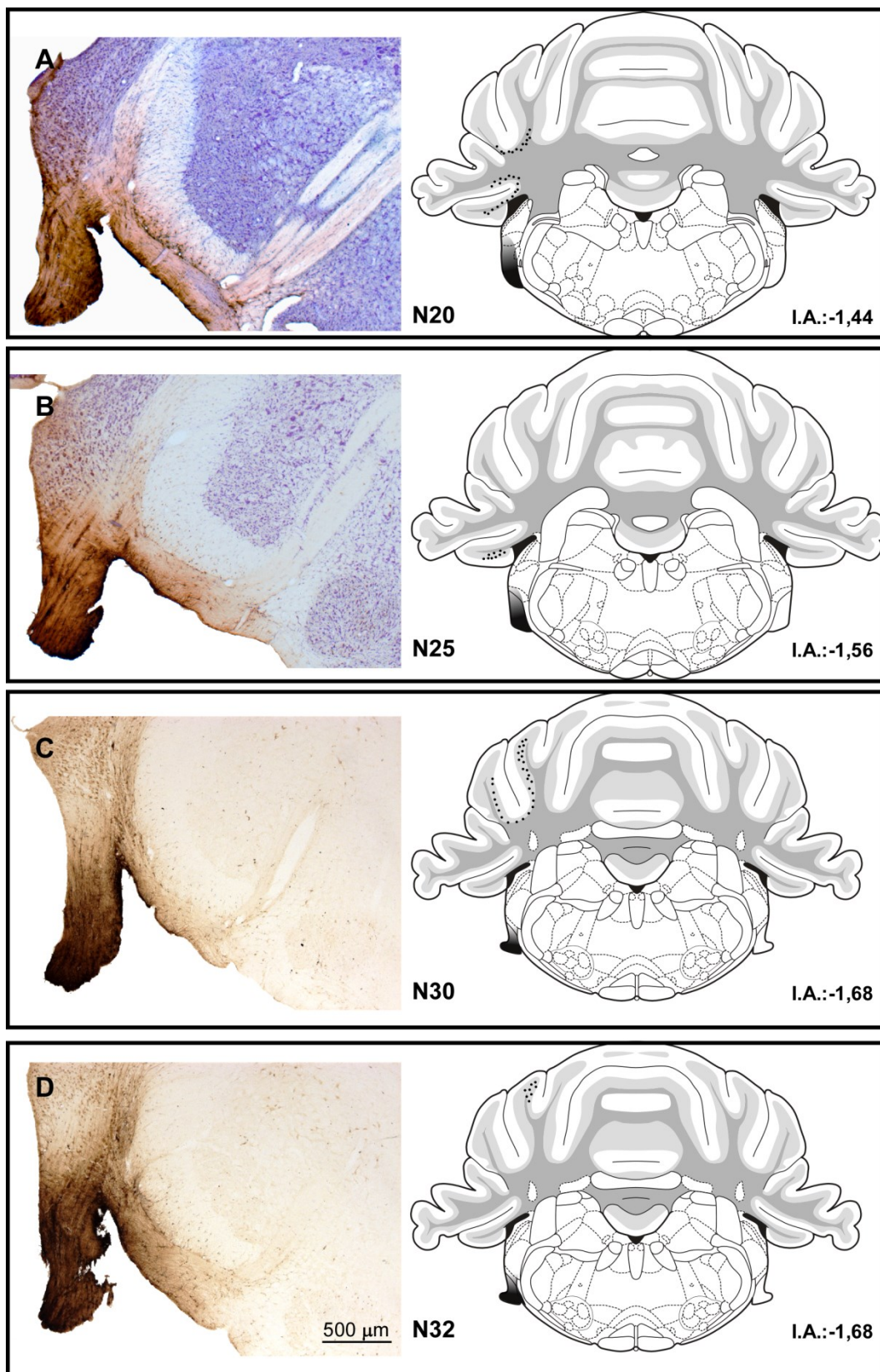


Figura 12 Locais de injeção de FG na raiz coclear dos casos N20, N25, N30 e N32. Fotomicrografias em campo claro dos locais de injeção do FG que foram utilizados no estudo das projeções aferentes a raiz coclear. Os esquemas e o nível interaural (I.A.) foram baseados nas ilustrações do Atlas do encéfalo do Rato (PAXINOS e WATSON, 2007). Nos esquemas, o centro do local de injeção de traçador está indicado em negro e o halo de difusão em cinza. A Barra de calibração na foto em D é válida para as fotos em A, B e C.

Dentre as regiões provavelmente aferentes a raiz coclear nos pareceu especialmente interessante estudar as conexões com o A5 e o DR por seu caráter inédito e e sua neuroquímica previamente descrita, que inclui noradrenalina, serotonina e CART, substâncias que modulam o RAS e a PPI, comportamentos diretamente associados a função conhecida dos CRN e região de especial interesse em nosso grupo de pesquisa.

4.3 Conexões da área noradrenérgica A5 com os CRN

Após o mapeamento detalhado dos neurônios retrogradamente marcados com FG no A5, descrito no item anterior, foram realizados experimentos de co-localização entre os somas imunorreativos a FG e somas imunorreativos a enzima dopamina- β -hidroxilase (DBH) precursora de síntese de noradrenalina, em 5 casos experimentais (N13, N15, N18, N25, N30). Os resultados destes experimentos evidenciaram somas retrogradamente marcados no A5 parcialmente entremeados com somas imunorreativos a DBH que ocuparam uma posição ligeiramente ventral. Tanto os neurônios imunorreativos ao FG como a DBH possuíam aparência de neurônios multipolares com longos dendritos orientados aleatoriamente, não havendo distinção morfológica entre eles. Foram observados alguns neurônios duplamente marcados com FG e DBH que indicaram a existência de neurônios noradrenérgicos aferentes a raiz coclear (Figura 13). No entanto, foram observados muitos neurônios retrogradamente marcados com FG não imunorreativos a DBH, sugerindo outra identidade neuroquímica e neurônios imunorreativos a DBH não marcados retrogradamente, sugerindo conexões com outras regiões.

Com base na literatura, que indica a presença de CART no A5, utilizando uma série adjacente de cortes, dos mesmos casos experimentais, foram realizados novos experimentos de co-localização, evidenciando a imunorreatividade de DBH e CART no A5. As secções adjacentes onde foi detectada a imunorreatividade para FG e DBH ou DBH e CART, foram mapeadas em conjunto, para estudo da distribuição dos neurônios aferentes a raiz coclear e de suas relações com os somas imunorreativos a DBH e CART. Este estudo não foi realizado em uma única série de cortes devido a incompatibilidade dos protocolos imuno-histoquímicos para detecção de FG e CART que utilizam anticorpos primários produzidos na mesma espécie animal (coelho) e a impossibilidade de observação da autofluorescência do FG.

Por meio do mapeamento da imunorreatividade de FG, DBH e CART no A5, foi que possível reconhecer os neurônios imunorreativos ao FG (provavelmente aferentes a raiz coclear), em quase toda a extensão do A5, sendo mais numerosos em seus terços caudal e médio, posicionados de forma entremeada e algumas vezes caudal ou dorsal em relação aos somas imunorreativos a DBH e CART (Figuras 14, 15, 16 e 17). Não foi identificado um

padrão de distribuição que segregasse os somas imunorreativos em subdivisões desta região. Foram encontrados somas com co-localização de imunorreatividade a FG e DBH, DBH e CART e sobreposição de somas imunorreativos a FG e CART, embora, não tenham sido identificadas regiões com a sobreposição dos três marcadores. A maior parte dos neurônios imunorreativos ao FG não apresentou co-localização com neurônios imunorreativos para DBH ou sobreposição com somas imunorreativos a CART, embora a maior parte dos somas imunorreativos ao CART co-localizarem com somas imunorreativos a DBH.

O mapeamento do caso N13 (Figura 14) identificou células imunorreativas ao FG distribuídas na região do A5 e em suas proximidades, desde o nível interaural (I.A.) -1.80mm até o I. A. -0,60mm com destaque a localização na parte dorsal ndos terços médio e caudal algumas vezes alcançando áreas adjacentes da formação reticular. Observamos regiões com sobreposições de FG+CART (I.A. -1.32 mm) e DBH+CART principalmente em nível rostral (I.A. -0.60)

No caso N18 (Figura 15) não foram encontrados somas imunorreativos ao FG na região mais caudal do A5 (IA:-1.80 mm).Observamos neurônios duplamente marcados FG+DBH (IA:-1.32 mm), e muitos somas DBH+CART ao longo de todo A5, mas especialmente presentes no terço caudal (I.A. -1.56mm). Neste caso foram encontradas sobreposições FG+CART.

No caso N20 (Figura 16) os somas imunorreativos ao FG formaram uma numerosa aglomeração no terço médio do A5 (IA:-1.32 mm). Foram observados neurônios duplamente marcados FG+DBH ao longo de toda região (IA:-1.56 mm, IA:-1.32 mm e -0.84 mm), neurônios duplamente marcados DBH+CART (I.A.-1.56 mm e I.A. 1,20mm) e uma sobreposição de FG+CART (I.A.-1.32mm)

No caso N25 (Figura 17), a maioria dos neurônios imunorreativos ao FG está distribuído espaçadamente e dorsalmente nos terços caudal e médio, com aglomeração na região rostral (IA:-0.60 mm). Foram observadossomas duplamente marcados FG+DBH (I.A. -0.84 mm) e somas duplamente marcados DBH-CART (I.A. -1.80mm e -0.60mm).

Para confirmar as aferências provenientes do A5 aos CRN, foram realizados experimentos de controle injetando o traçador anterógrado BDA no A5 (n=6, casos N53, N56, N122, N125, N274 e N278). Nestes casos, além do local de injeção estar localizado no A5 (Figura 18), foram observadas fibras nervosas marcadas pelo traçador anterógrado em núcleos previamente descritos como eferências do A5, confirmando o padrão de conectividade do local de injeção. Desta forma, foram observadas fibras nervosas na formação reticular caudal e rostroventrolateral do bulbo, núcleo do trato solitário, e nos núcleos parabraquiais (Figura 19).

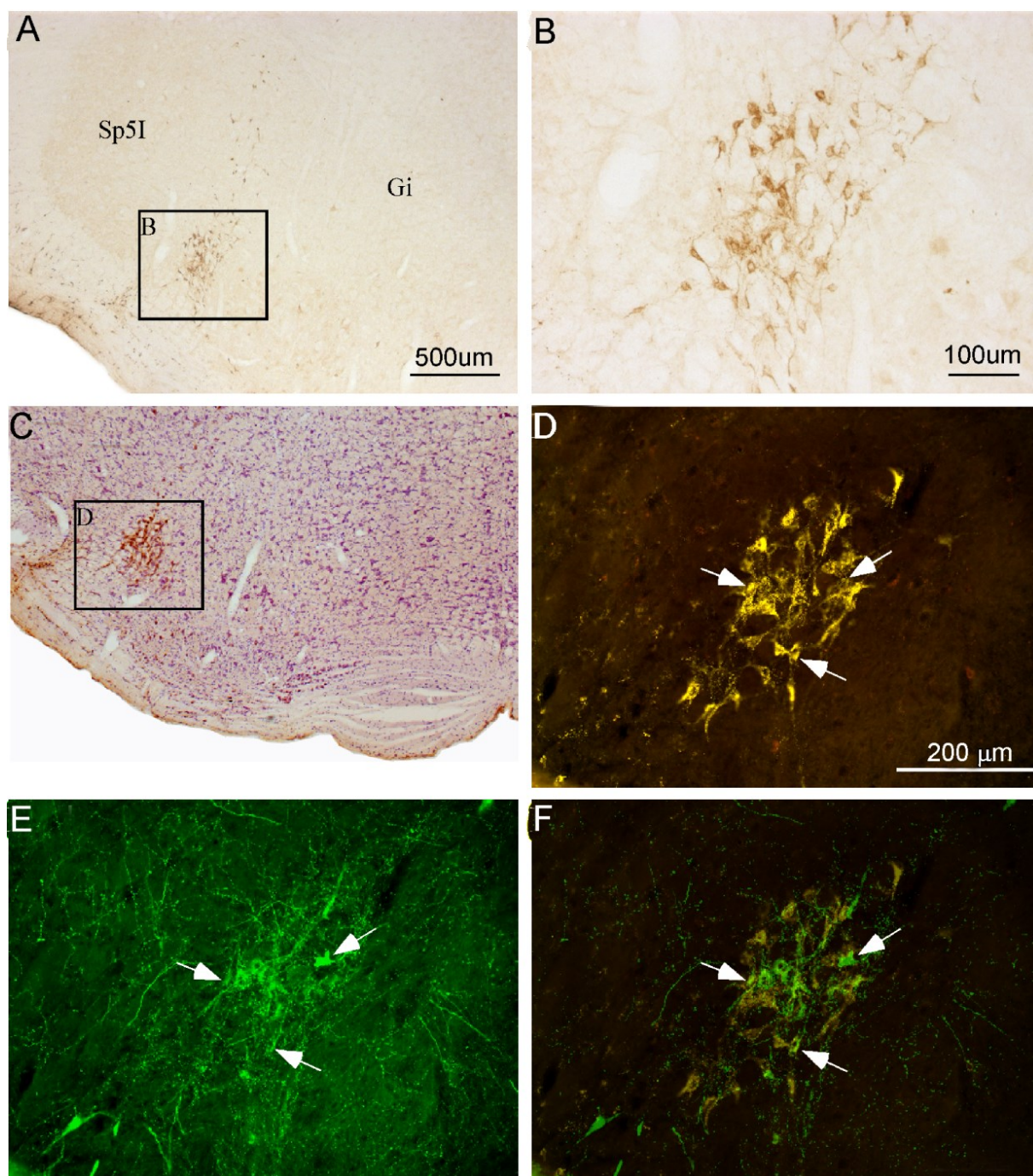


Figura 13 Aferências a Raiz Coclear provenientes da área do grupo noradrenérgico A5. Fotomicrografias em campo claro e epifluorescência dos perfis neuronais retrógadamente marcados com Fluoro-Gold na área noradrenérgica (A5) após injeção na raiz coclear (RC). De A-C: neurônios retrógrados evidenciados no A5. Em D: mesmo caso fotografado em C, observado por epifluorescência após imuno-histoquímica para o FG (Cy3-vermelho). Em E: o mesmo campo observado com filtros para detecção da imunorreatividade a DBH (Cy2-verde). Em F: sobreposição das figuras D e E. Os neurônios duplamente marcados estão evidenciados pelas setas. A barra de calibração em A é válida para C. A barra de calibração em D é válida para E e F.

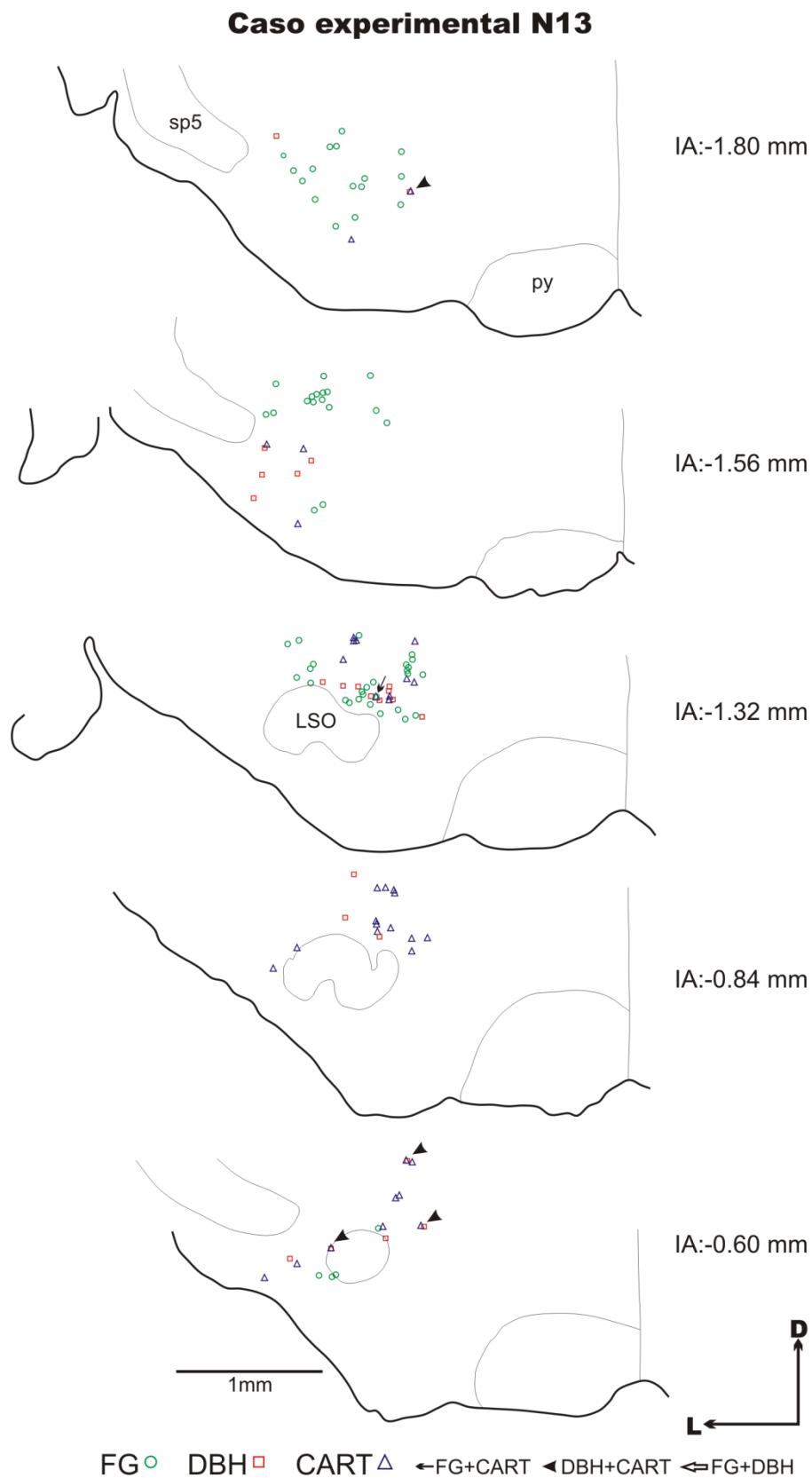


Figura 14 Esquemas de cortes coronais do troncoencefálico, na região do grupamento noradrenérgico A5, do caso experimental N13. Foram mapeados os neurônios imunorreativos ao FG (círculos verdes), DBH (quadrados vermelhos) e CART (triângulos azuis). O nível rostrocaudal aproximado com relação a linha interaural (I.A.) está indicado em milímetros. Os somas duplamente marcados estão indicados por setas de acordo com legenda na parte inferior da figura. A barra de calibração e as setas de orientação são válidas para todos os esquemas.

Caso experimental N18

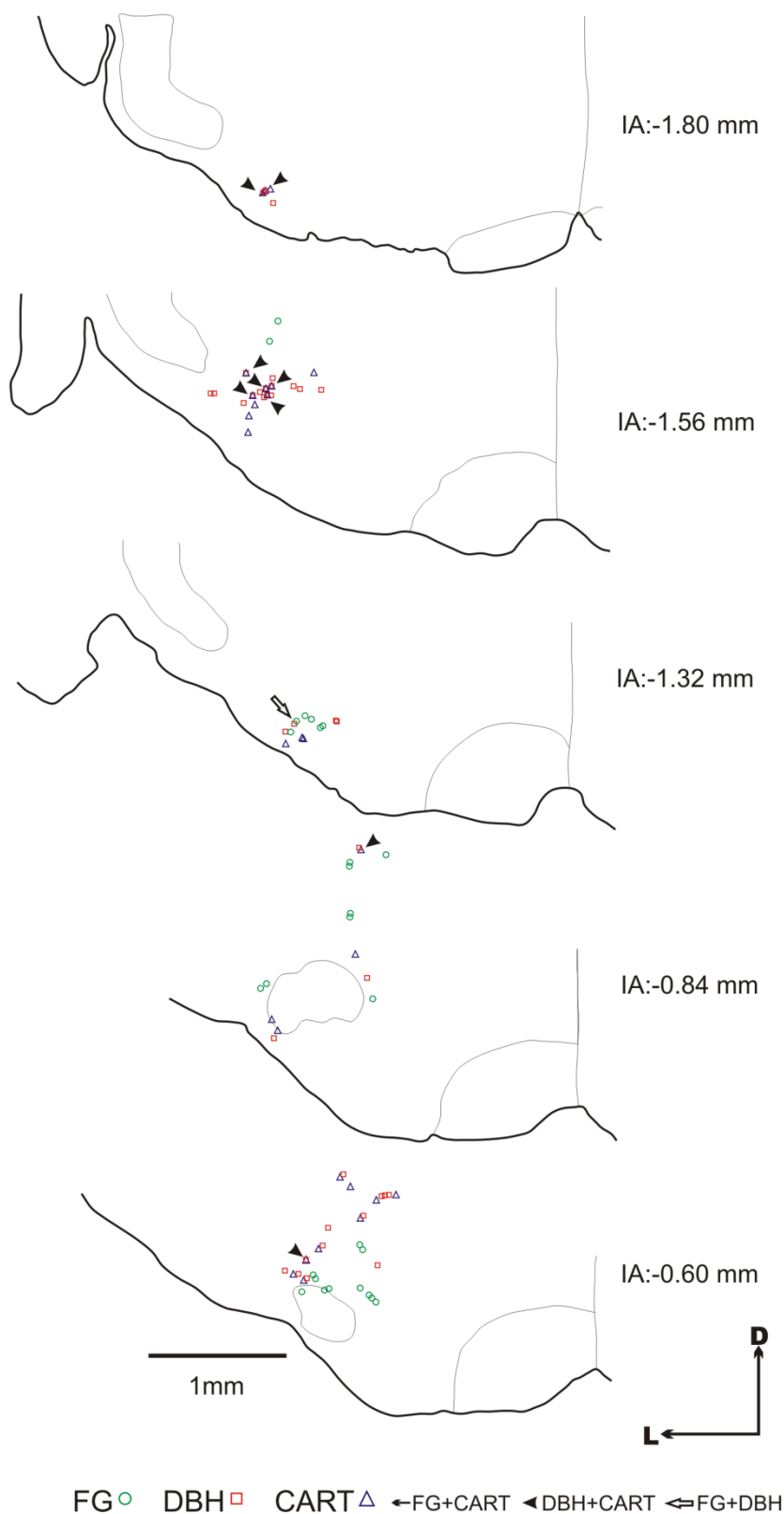


Figura 15 Esquemas de cortes coronais do troncoencefálico, na região do grupamento noradrenérgico A5, do caso experimental N18. Foram mapeados os neurônios imunorreativos ao FG (círculos verdes), DBH (quadrados vermelhos) e CART (triângulos azuis). O nível rostrocaudal aproximado com relação a linha interaural (I.A.) está indicado em milímetros. Os somas duplamente marcados estão indicados por setas de acordo com legenda na parte inferior da figura. A barra de calibração e as setas de orientação são válidas para todos os esquemas.

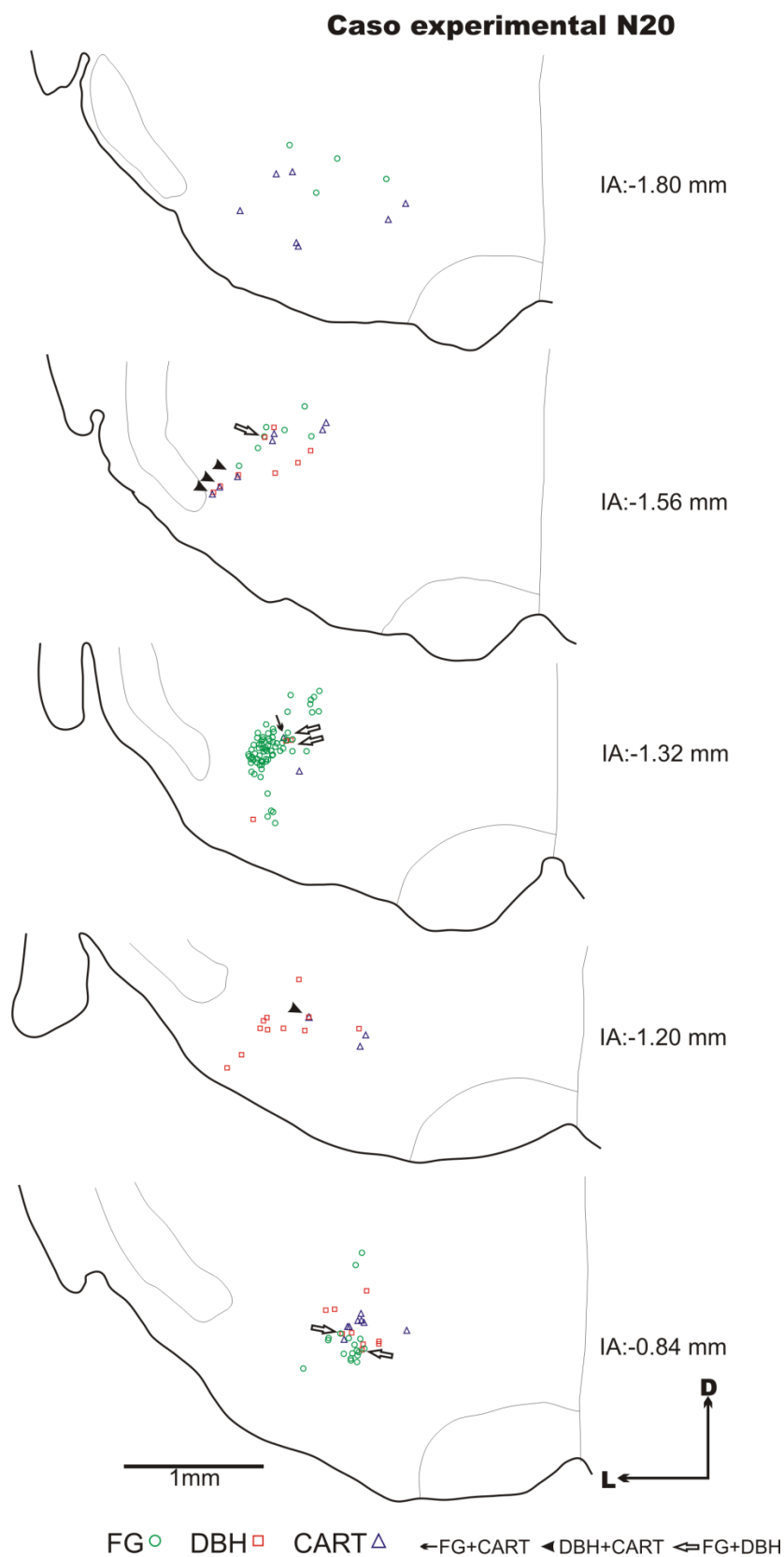


Figura 16 Esquemas de cortes coronais do troncoencefálico, na região do grupamento noradrenérgico A5, do caso experimental N20. Foram mapeados os neurônios imunorreativos ao FG (círculos verdes), DBH (quadrados vermelhos) e CART (triângulos azuis). O nível rostrocaudal aproximado com relação a linha interaural (I.A.) está indicado em milímetros. Os somas duplamente marcados estão indicados por setas de acordo com legenda na parte inferior da figura. A barra de calibração e as setas de orientação são válidas para todos os esquemas.

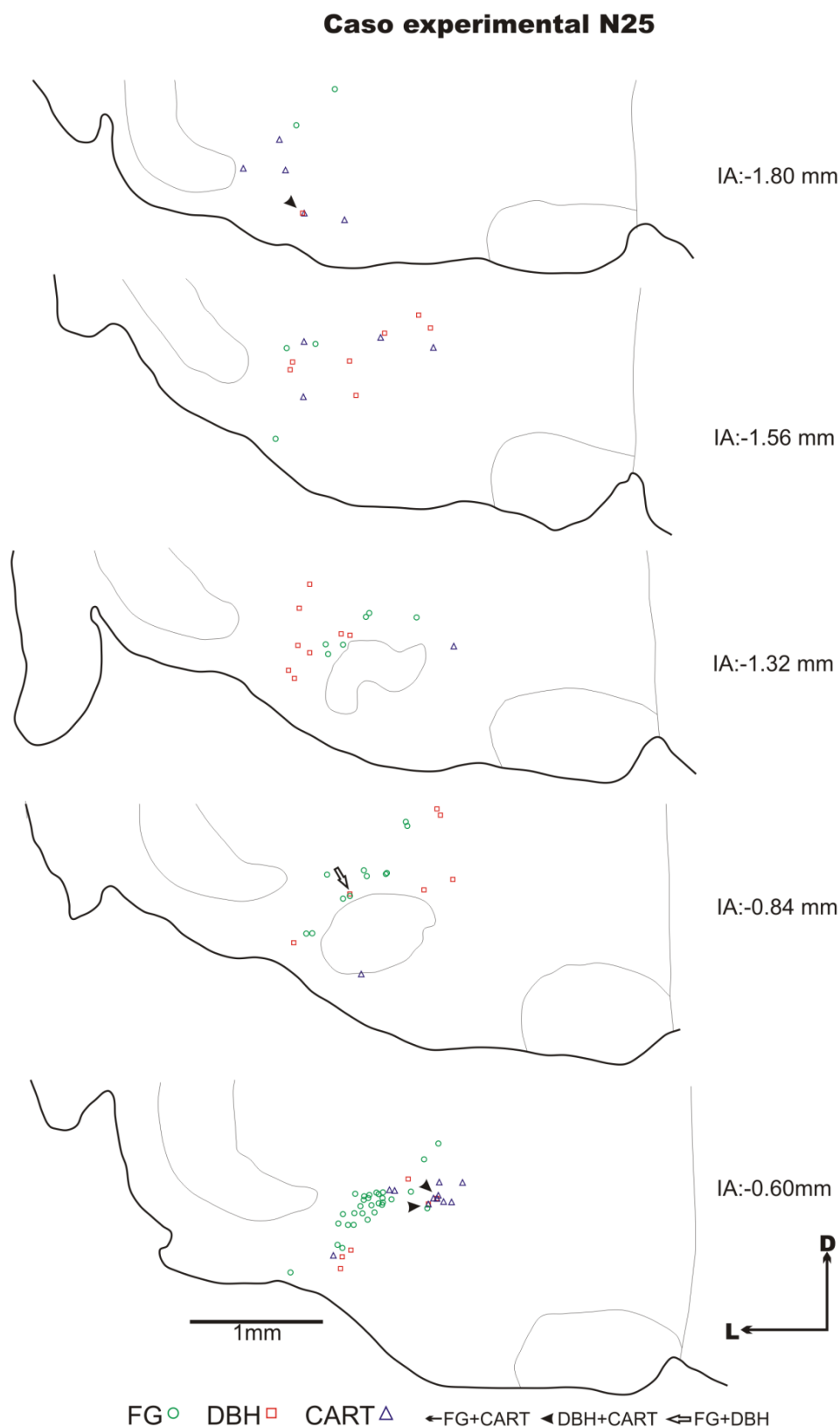


Figura 17 Esquemas de cortes coronais do troncoencefálico, na região do grupamento noradrenérgico A5, do caso experimental N25. Foram mapeados os neurônios imunorreativos ao FG (círculos verdes), DBH (quadrados vermelhos) e CART (triângulos azuis). O nível rostrocaudal aproximado com relação a linha interaural (I.A.) está indicado em milímetros. Os somas duplamente marcados estão indicados por setas de acordo com legenda na parte inferior da figura. A barra de calibração e as setas de orientação são válidas para todos os esquemas.

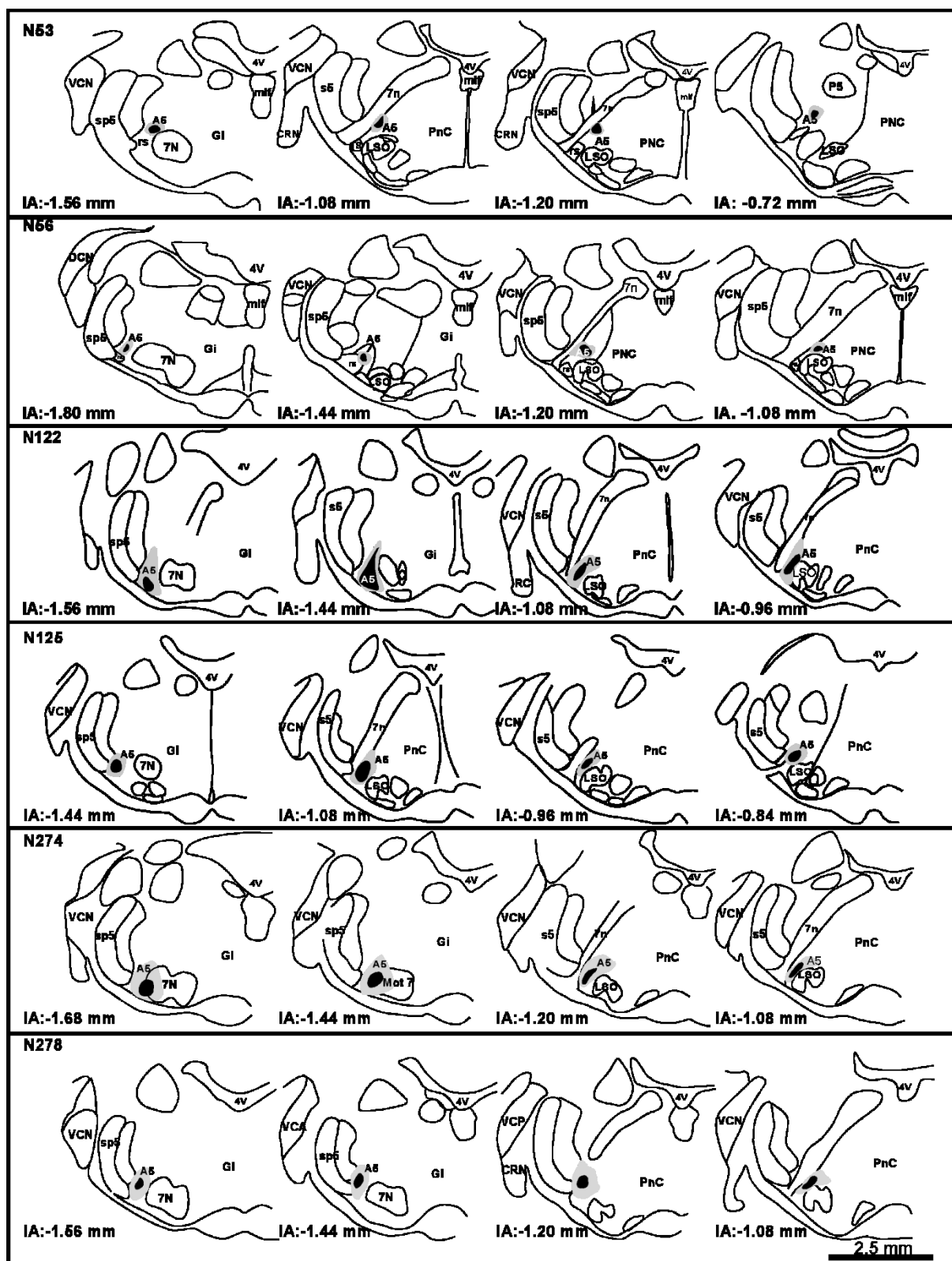


Figura 18 Esquemas dos locais de injeção de BDA no A5, nos casos utilizados no estudo de suas eferências. Os esquemas foram preparados por meio de tubo de desenho acoplado ao microscópio. Para cada caso experimental, os esquemas estão dispostos horizontalmente, de caudal para rostral. O centro do local de injeção de traçador está indicado em negro e o halo de difusão em cinza. O nível interaural (I. A.) está indicado em cada esquema segundo o atlas estereotático do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2007) A barra de calibração é válida para todos os esquemas. Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

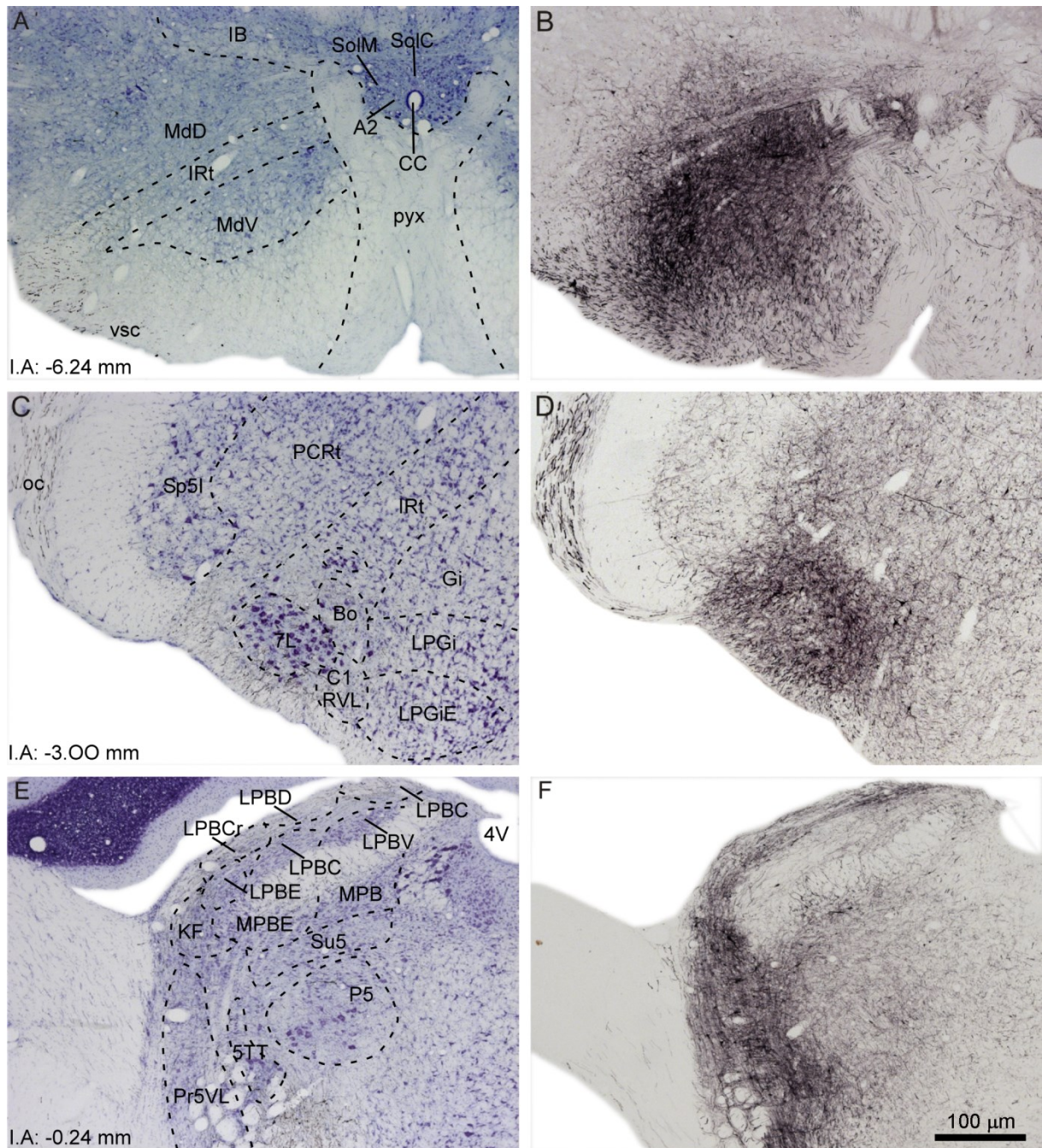


Figura 19 Principais eferências do A5. Fotomicrografias em campo claro de cortes coronais do tronco encefálico corados pela técnica de Nissl para evidenciar a citoarquitetura (A, C, E) e a secção correspondente evidenciando as fibras nervosas marcadas com BDA, após injeção no A5 (caso N122). As fibras marcadas foram evidenciadas na formação reticular caudal do bulbo (A e B), na formação reticular rostroventrolateral do bulbo (C e D) e nos núcleos parabraquiais (E e F). Os limites citoarquitetônicos e o I.A foram baseados no atlas estereotático do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2007). Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

Devido a proximidade do A5 com a raiz descendente do nervo facial e com o trato rubroespinal (rs), mesmo nos casos selecionados para estudo, sempre houve contaminação de fibras de passagem destes feixes de fibras nervosas pelo local de injeção de BDA, o que não prejudicou o controle anterógrado das conexões do A5 com os núcleos do circuito elementar do RAS.

As fibras nervosas eferentes do A5, partem do local de injeção de BDA em direção a raiz coclear ipsilateral por duas vias principais: uma via ventral e outra dorsal.

A via ventral passa pelo corpo trapezóide (tz) acompanhando a superfície ventrolateral da ponte e avançam em direção aos núcleos cocleares onde foram uma densa rede de terminais axonais, distribuídos por todo seu eixo rostro-caudal, abrangendo todos os núcleos deste complexo. Algumas destas fibras nervosas curvam-se em direção ventral e penetram na raiz coclear (RC) onde constituem campos terminais, tanto na parte proximal quanto na distal, formando nichos de terminais axonais ao redor dos CRN (Figuras 20 e 21).

A via dorsal está constituída por fibras nervosas que seguem dorsalmente ao A5, contornando os núcleos trigeminais, e seguem trajetória semelhante ao feixe olivococlear (ocb) em direção a RC. (Figuras 20 e 21). Foram observadas fibras nervosas com terminais axonais marcados com traçador anterógrado BDA, na raiz coclear e núcleos cocleares, em todos os casos em que as injeções no A5 foram consideradas de boa qualidade.

Nestes experimentos também foram observadas fibras nervosas marcadas formando campos terminais na parte ventrolateral do PnC. As fibras nervosas que encontramos no PnC foram numerosas e distribuídas de forma difusa, algumas calibrosas, partiram do trato rubroespinal e se assemelharam a fibras de passagem. Outras fibras delgadas, formaram densos terminais axonais ao redor dos pequenos e grandes neurônios do PnC. Os campos terminais observados se distribuíram em todo eixo rostro-caudal da formação reticular pontina, chegando até o nível do núcleo reticular pontino oral (PnO) rostralmente, e no núcleo gigantocelular caudalmente (Figuras 22). Em todos os casos foram encontrados terminais axonais bilateralmente no PnC.

Além destas projeções foram observadas fibras nervosas marcadas com BDA no DR. Estas fibras se distribuíram por todo complexo nuclear que forma o DR (Figuras 22) e outros núcleos relacionados indiretamente com as vias do RAS e da PPI como o LC e o colículo inferior (CI) (Figura 23). O mapeamento completo da distribuição das fibras nervosas marcadas com BDA após a injeção no A5 foi organizado em forma de tabela e encontra-se no apêndice B.

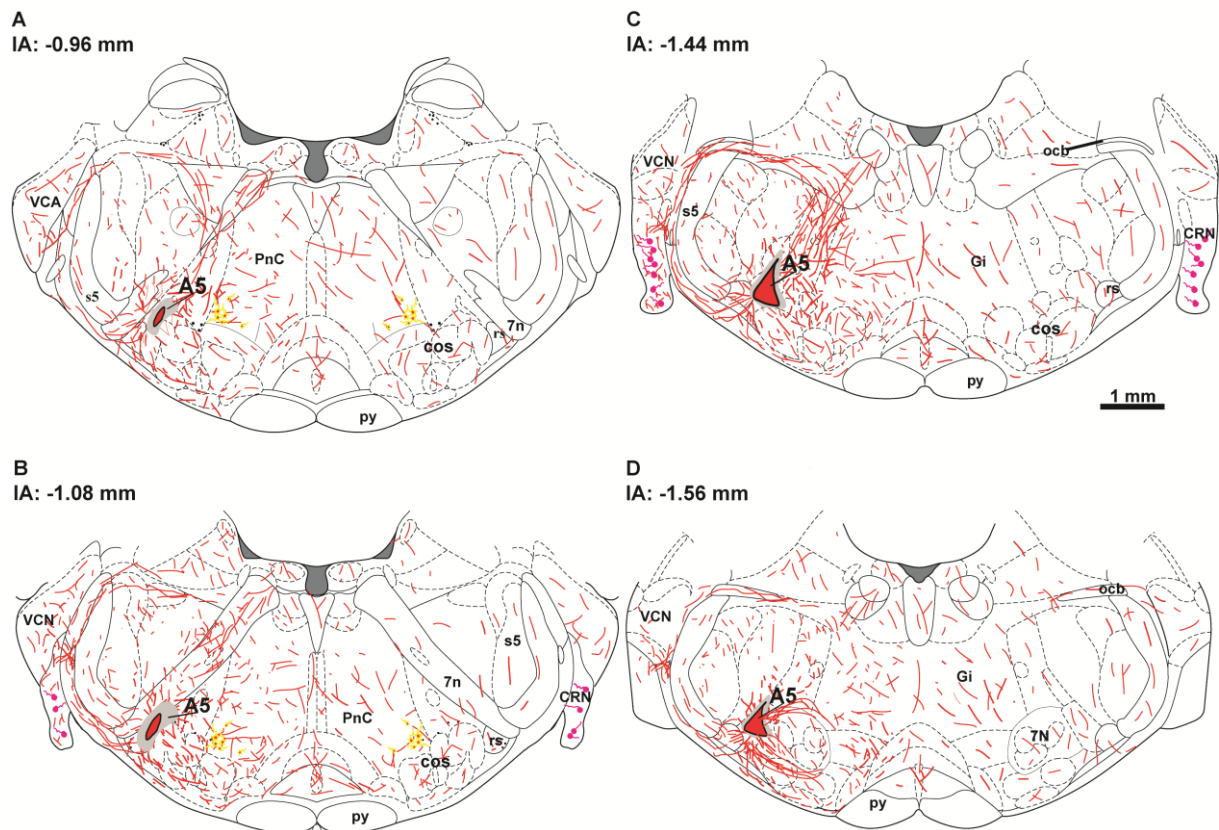


Figura 20 Esquemas de seções coronais do tronco encefálico, de um caso típico de injeção de BDA no A5 (N122). As linhas vermelhas representam a trajetória das fibras nervosas marcadas, que partem do A5 em direção a raiz coclear e ao PnC. A barra de calibração é válida para todos os esquemas, que estão dispostos de rostral para caudal (A a D). Os esquemas foram preparados por meio de tubo de desenho acoplado ao microscópio. Os limites citoarquitetônicos e o I.A foram baseados no atlas estereotático do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2007). Abreviaturas: vide lista de Abreviaturas.

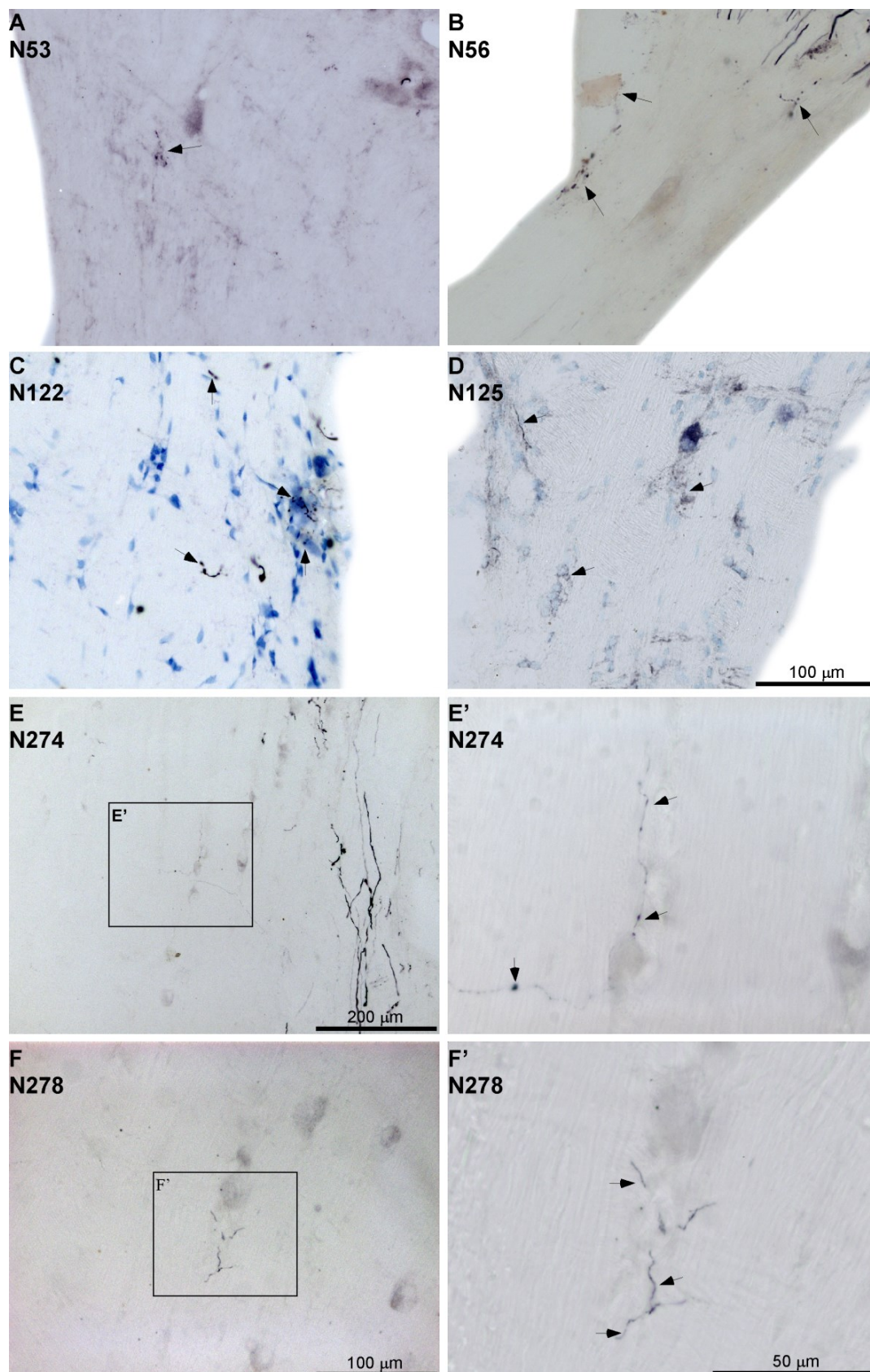


Figura 21 Eferências do A5 à raiz coclear. Fotomicrografias em campo claro de seções coronais da raiz coclear onde podem ser observadas fibras nervosas marcadas (setas) após injeção de BDA no A5. Em A: caso N53. Em B: caso N56. Em C: caso N122. Em D: caso N125. Em E e E': caso 274. Em F e F': caso N278. As áreas delimitadas foram fotografadas em maior aumento. A barra de calibração em D é válida para A, B e C. A barra de calibração em F' é válida para E'.

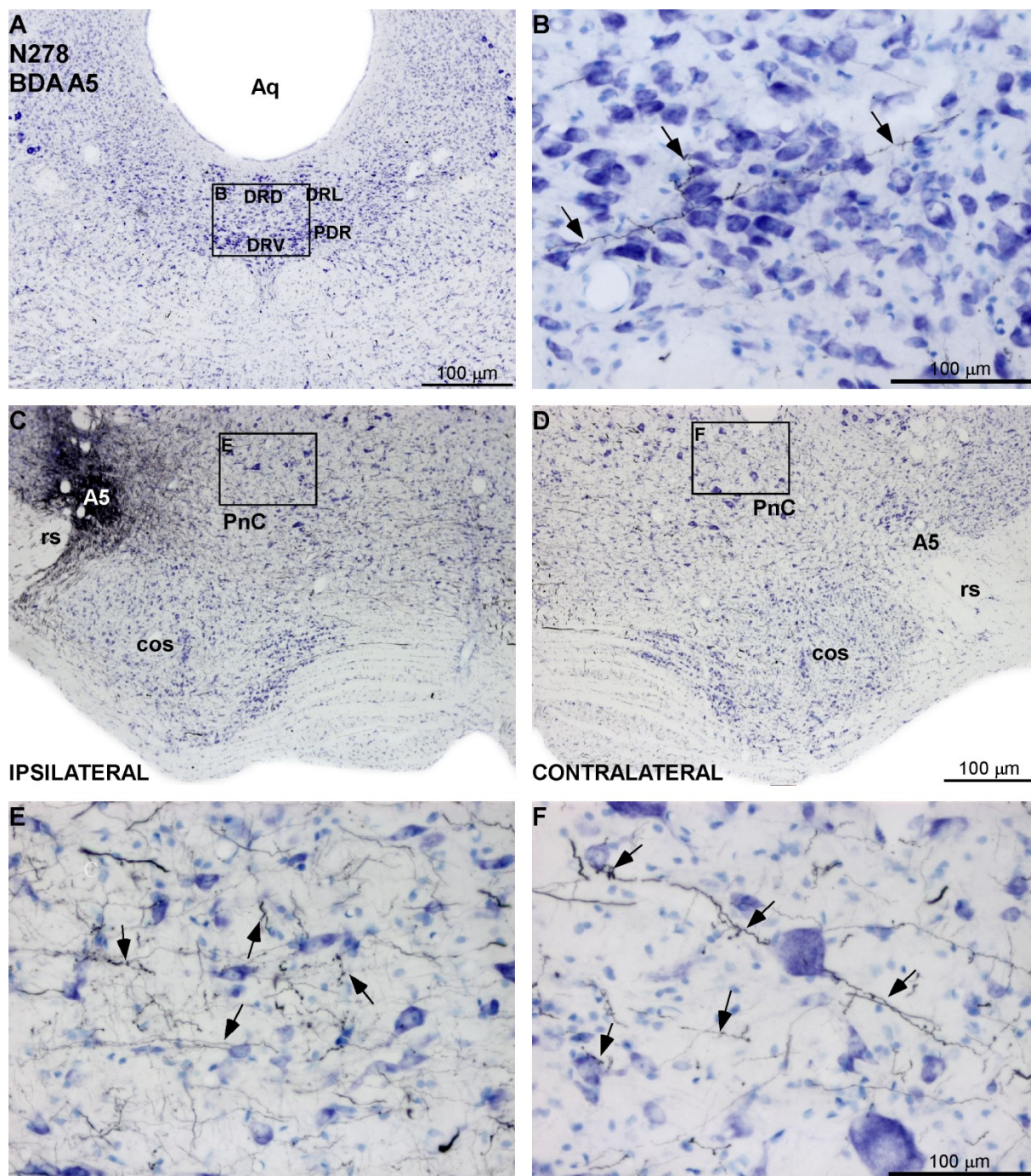


Figura 22 Eferências do A5 ao DR e ao PnC. Fotomicrografias em campo claro de cortes coronais do tronco encefálico corados pela técnica de Nissl no caso N278, onde podem ser observadas fibras nervosas marcadas (setas) no DR (A e B) e no PnC (C e F) após injeção de BDA no A5. Em B: em destaque, grande fibra com varicosidades atravessando o DR. Foram observados terminais axonais no PnC no lado ipsilateral (C e E) e no lado contralateral (D e F) a injeção de traçador. As áreas delimitadas foram fotografadas em maior aumento. A barra de calibração em D é válida para C. A barra de calibração em F é válida para E.

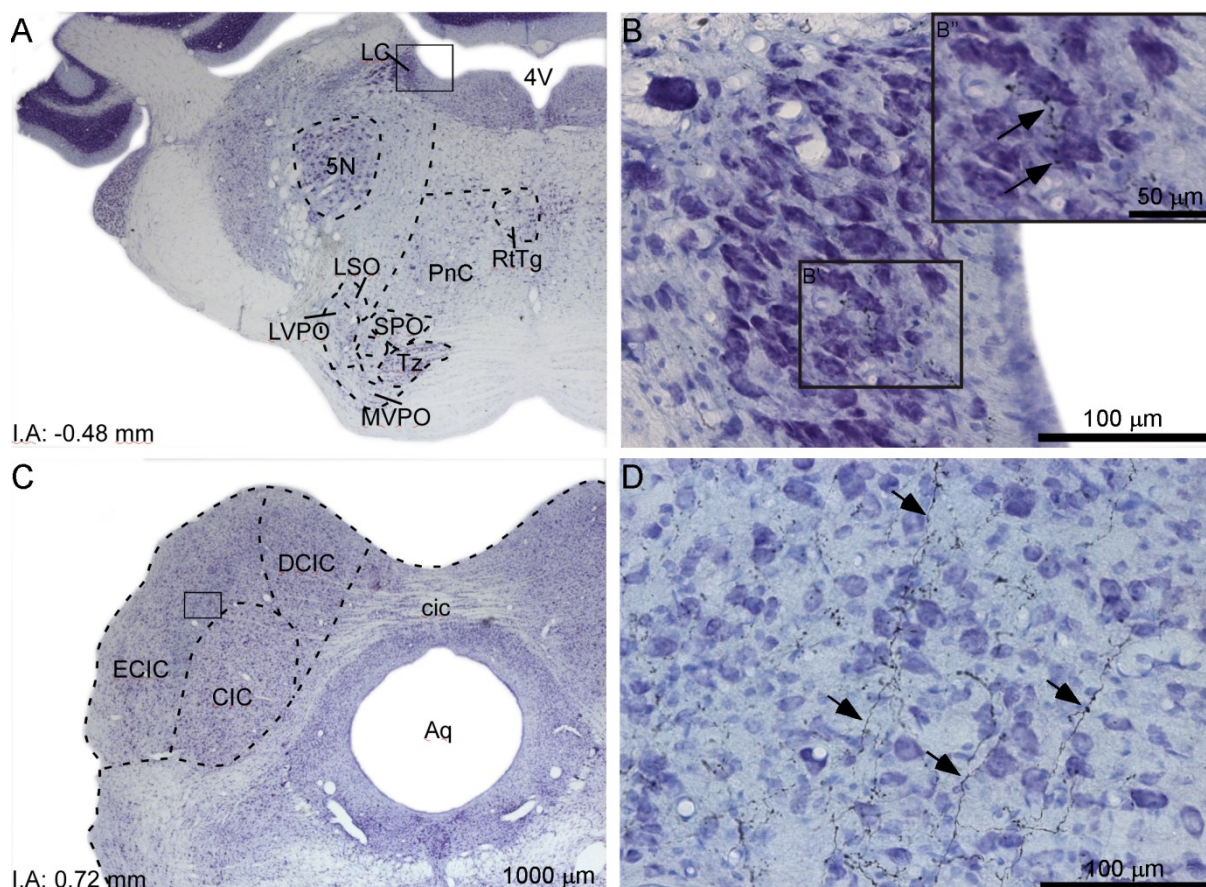


Figura 23 Eferências do A5 para áreas que atuam de forma indireta sobre o circuito do reflexo auditivo de sobressalto (LC e CI). Fotomicrografias em campo claro de cortes coronais do tronco encefálico corados pela técnica de Nissl onde podem ser observadas fibras nervosas marcadas (setas) no LC (A, B, B' e B'') e no CI (C e D), após injeção de BDA no A5. As áreas delimitadas foram fotografadas em maior aumento. A barra de calibração em C é válida para A. Os limites citoarquitetônicos e o I.A foram baseados no atlas estereotático do cérebro do rato (PAXINOS e WATSON, 2007). Abreviaturas: vide lista de Abreviaturas.

4.4 Conexões do núcleo dorsal da rafe com os CRN

Com respeito a origem dos terminais serotoninérgicos encontrados na raiz coclear, realizamos um estudo pormenorizado dos casos de injeção de traçador neuronal retrógrado nesta área, em busca de núcleos serotoninérgicos que apresentassem células imunorreativas ao FG. Como resultado, encontramos somas marcados retrogradamente no núcleo dorsal da rafe (DR), em seu terço médio no eixo ântero-posterior, que se distribuíram nas subdivisões lateral (DRL), central e dorsal (DRD) (Figura 24).

Para confirmar as aferências do DR à raiz coclear, realizamos experimentos de controle anterógrado, por meio de injeção de BDA nas subdivisões do DR que apresentaram os somas retrogradamente marcados. Desta forma, os locais de injeção de BDA atingiram a subdivisão dorsal do DR (DRD, casos N144 e N163), as subdivisões dorsal e ventral (DRD e DRV, caso N147) e as subdivisões lateral e posterodorsal (DRL e PDR, casos N126 e N140) (Figura 25).

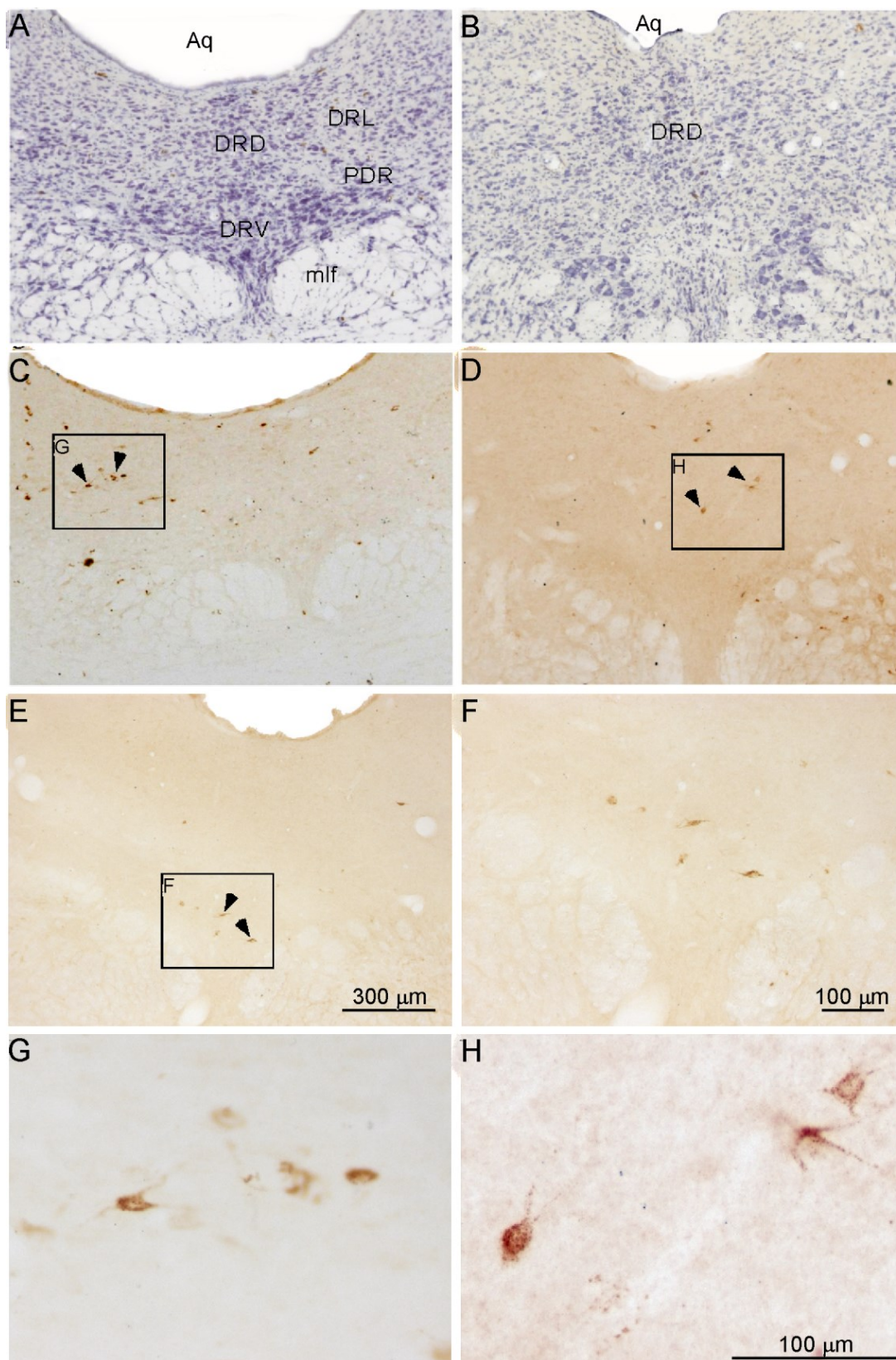


Figura 24 Aferências a raiz coclear provenientes do núcleo dorsal da rafe (DR). Em A e B: subdivisões citoarquitetônicas do DR evidenciadas em cortes corados pela técnica de Nissl. De C a H: Fotomicrografias em campo claro dos perfis neuronais retrogradamente marcados no DR, nos casos N17 e N30, após injeção de FG na raiz coclear (RC). Os somas marcados em C, D e E, estão indicados pelas cabeças de seta. As áreas delimitadas foram fotografadas em maior aumento. A barra de calibração em E vale para A, B, C e D. A barra de calibração em H vale para G. Abreviaturas: vide lista de Abreviaturas.

Os locais de injeção se distribuíram ao longo do eixo ântero-posterior do DR desde o nível I. A. 0.84mm até nível 1.92mm (Figura 25).

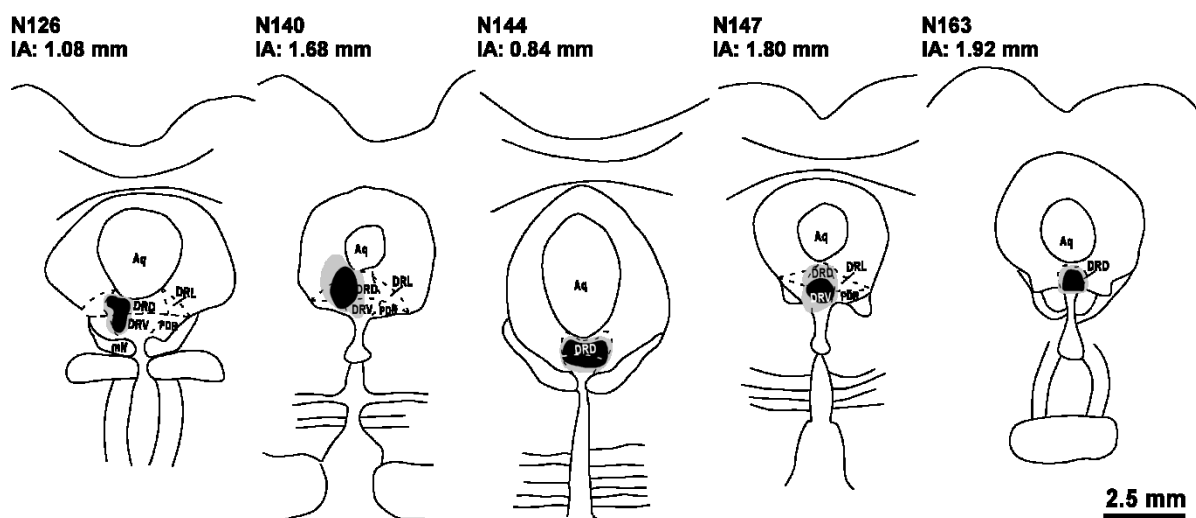


Figura 25 Esquemas dos locais de injeção de BDA no DR, nos casos utilizados no estudo de suas eferências. Os esquemas foram preparados por meio de tubo de desenho acoplado ao microscópio. O centro do local de injeção de traçador está indicado em negro e o halo de difusão em cinza. O nível interaural (I. A.) está indicado em cada esquema segundo o atlas estereotático do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2007). A barra de calibração é válida para todos os esquemas. Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

As fibras nervosas eferentes do DR, marcadas com traçador anterógrado após a injeção de BDA na subdivisão dorsal do DR (Figura 26), seguem várias direções a partir do local de injeção. Algumas ascendem em direção aos colículos, outras seguem transversalmente pelos núcleos laterais do mesencéfalo, outras seguem contornando lateralmente o pedúnculo cerebelar superior (scp) e após curto trajeto se distribuem pela formação reticular mesencefálica e núcleos da rafe, enquanto outras seguem contornando a borda inferior do aqueduto mesencefálico (Aq) e do quarto ventrículo. Estas fibras, em especial, são as que vão em direção a raiz coclear. Ao nível I.A. 0.24 mm, as fibras que estão na base do Aq (transição com assoalho do quarto ventrículo) contornam o pedúnculo cerebelar superior e dirigem-se lateralmente. Ao nível I.A -0.96 mm, já na ponte, este feixe de fibras nervosas está próximo ao quarto ventrículo (4V) e neste nível destacam-se muitas fibras que se dirigem lateralmente em direção aos núcleos vestibulares e cocleares. Desta forma muitas fibras nervosas chegam ao núcleos cocleares onde formam campos terminais.

Ao nível do I.A -1.92 mm nota-se que as fibras penetram na raiz coclear (RC) bilateralmente, e formam terminais axonais em aposição aos CRN e em suas proximidades (Figura 27). Em todos os casos analisados, foi possível confirmar a presença de fibras nervosas marcadas com BDA, formando campos terminais na raiz coclear. As fibras nervosas provenientes do DR na raiz coclear apresentaram aspecto longo com varicosidades, que se assemelhavam às fibras imunorreativas para serotonina. Foram observados terminais axonais na metade lateral da raiz coclear, em seus terços médio e proximal. Foram observados

terminais axonais em aposição com somas dos CRN e em suas proximidades, talvez em contato com fibras de passagem, dendritos ou axônios dos CRN (Figura 27). Não foram observadas fibras nervosas marcadas com BDA no corpo trapezóide (tz), o que indica que as fibras nervosas provenientes do DR dirigem-se a raiz coclear dorsalmente, com trajeto paralelo ao feixe olivococlear, sem passar pelo tz.

Também foram observadas muitas fibras nervosas distribuindo-se bilateralmente na formação reticular pontina, e em especial, na região ventrolateral do PnC (Figura 28) e na região do grupamento noradrenérgico A5. No PnC, os terminais axonais são curtos, varicosos, se distribuem de forma difusa e estão em aposição com somas de neurônios do PnC. Estas fibras trafegam por toda formação reticular desde o núcleo reticular pontino oral (PnO) até núcleo gigantocelular (Gi) (Figura 26).

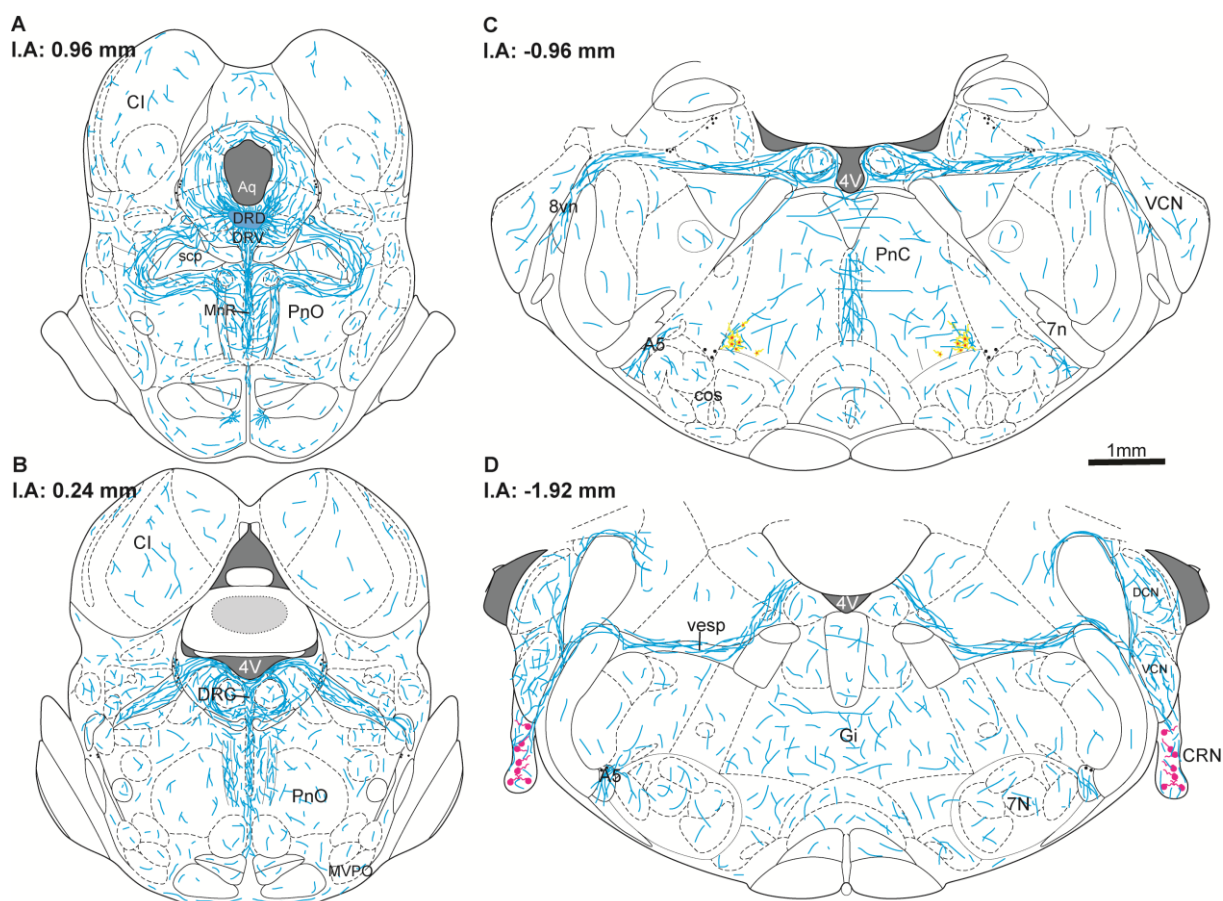


Figura 26 Esquemas de seções coronais do tronco encefálico, de um caso típico de injeção de BDA no DR (N144). As linhas azuis representam a trajetória das fibras nervosas marcadas que partem do DR em direção a raiz coclear e ao PnC. A barra de calibração é válida para todos os esquemas, que estão dispostos de rostral para caudal (A a D). Os esquemas foram preparados por meio de tubo de desenho acoplado ao microscópio. Os limites citoarquitetônicos e o I.A foram baseados no atlas estereotático do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2007). Abreviaturas: vide lista de Abreviaturas.

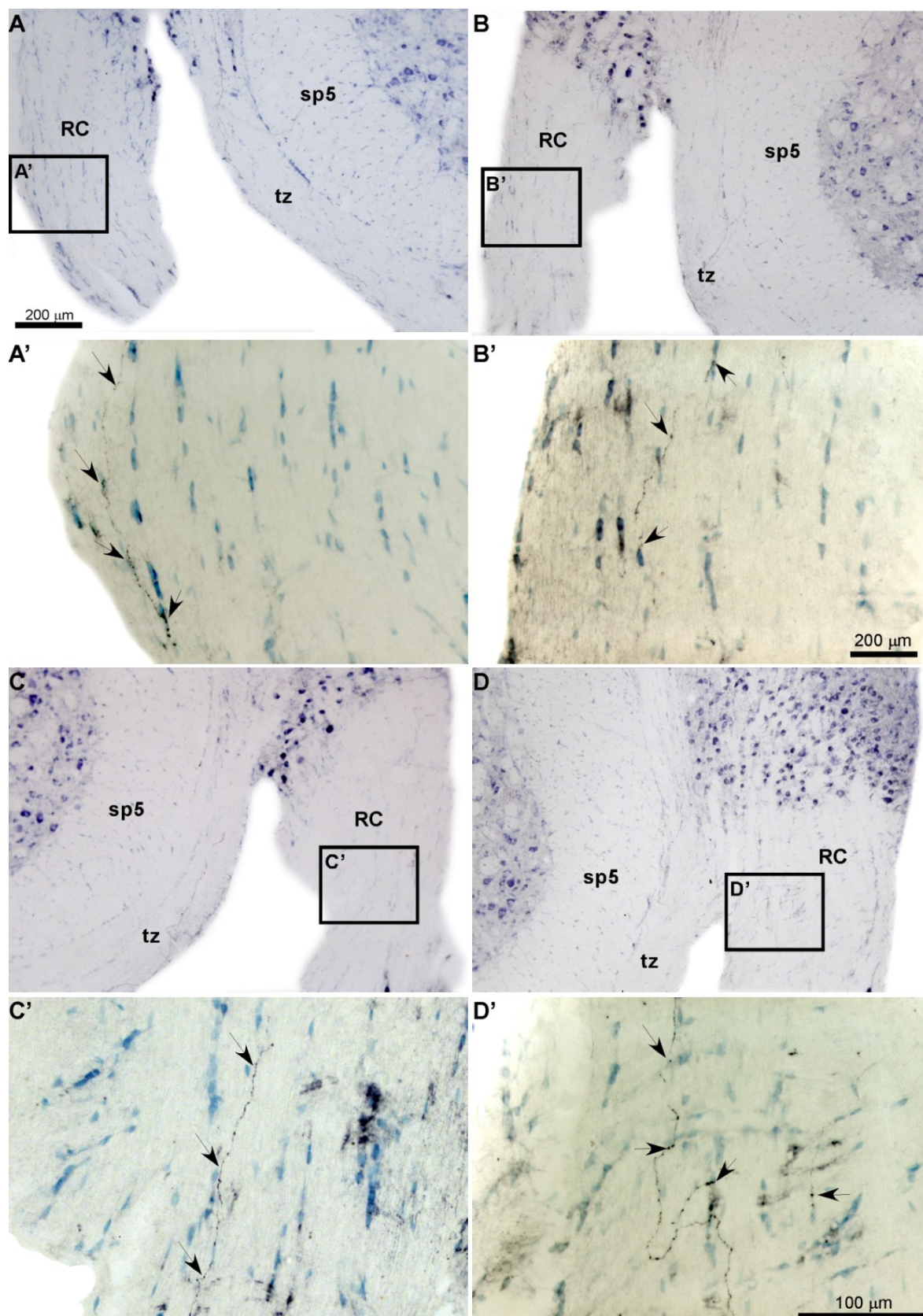


Figura 27 Eferências do DR à raiz coclear. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais da raiz coclear onde podem ser observadas fibras nervosas marcadas (setas) após injeção de BDA no DR. Em A e B: secções da raiz coclear do lado esquerdo. Em C e D: secções da raiz coclear do lado direito. Em A', B', C' e D': Imagens em maior aumento das áreas delimitadas em A, B, C e D, respectivamente. A barra de calibração em D' é válida para A', B' e C'. A barra de calibração em D é válida para A, B e C. Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

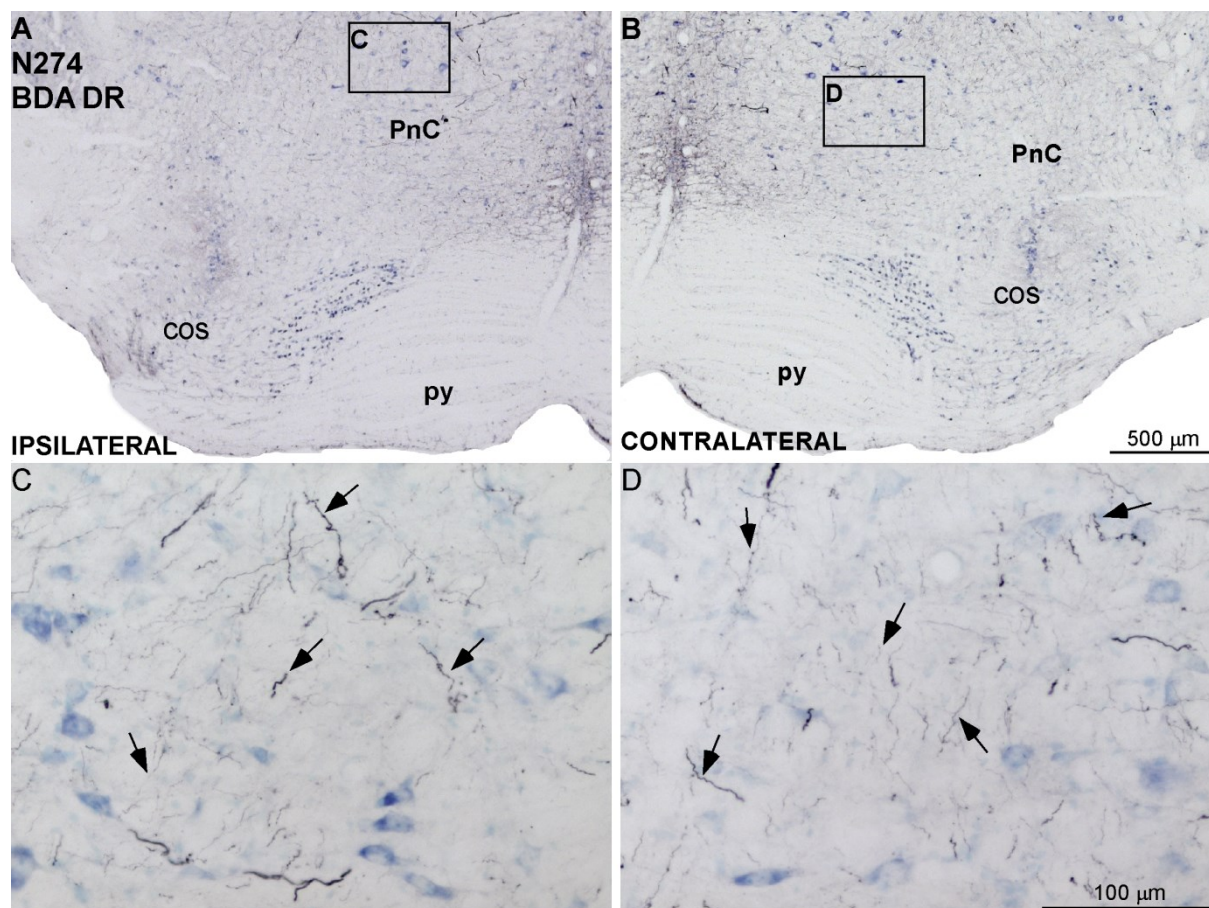


Figura 28 Eferências do DR ao PnC. Fotomicrografias em campo claro de seções coronais do PnC onde podem ser observadas fibras nervosas marcadas (setas) após injeção de BDA no DR. Em A e B: seções do PnC do lado ipsilateral (A) e contralateral (B) em relação ao local de injeção do traçador. Em C e D: imagens capturadas em maior aumento das áreas delimitadas em A e B, respectivamente. A barra de calibração em B é válida para A. A barra de calibração em D é válida para C. Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

4.5 Conexões da área noradrenérgica A5 e do núcleo dorsal da rafe com o PnC

O mapeamento anterógrado das eferências do A5 e do DR, além de confirmar as conexões com os CRN, postuladas a partir das injeções de FG na raiz coclear, indicaram que estas regiões conectam-se com a parte ventrolateral do PnC (Figuras 20 e 26). Devido a esta região ser um centro fundamental para o desencadeamento do RAS e ter sido indicada como a principal área de integração de aferências modulatórias para este reflexo, julgamos importante confirmar as conexões do PnC com o A5 e com o DR. Com esta finalidade, foram realizados experimentos de controle retrógrado, a partir de injeções de FG na parte ventrolateral do PnC, para confirmação das aferências com origem no A5 e no DR.

Para o estudo das conexões do PnC com o A5 e com o DR, foram utilizados dois casos (N254 e N378) em que os locais de injeção de FG restringiram-se a parte ventrolateral do PnC (Figura 29).

Os neurônios retrogradamente marcados encontrados no DR distribuíram-se principalmente nas subdivisões dorsal (DRD) e lateral (DRL), com perfis neuronais que apresentaram forma pequena e arredondada (Figura 28 D e F).

Os poucos neurônios retrogradamente marcados encontrados no A5 apresentaram perfis neuronais de forma pequena e estrelada, cujo aspecto é muito característico dos neurônios desta região, distribuídos principalmente no terço médio do A5 no eixo rostrocaudal (Figura 29 C e E).

Desta forma as conexões da parte ventrolateral do PnC com o A5 e com o DR foram confirmadas com experimentos de mapeamento de vias nervosas em ambos sentidos: anterógrado (Figuras 20 e 26) e retrógrado (Figura 29).

4.6 Conexões recíprocas entre área noradrenérgica A5 o núcleo dorsal da rafe e o PnC

Além dos resultados descritos previamente para os CRN e para o PnC, o mapeamento anterógrado das eferências do A5 e do DR, indicaram conexões entre estes dois núcleos sugerindo a existência de conexões recíprocas entre eles (Figuras 20 e 26). Para confirmar a existência destas conexões, foram realizados experimentos de controle retrógrado, nos quais foram realizadas injeções de FG no DR e no A5.

Foram realizados dois experimentos de controle retrógrado das aferências do DR (casos N380 e N382, Figura 30). No caso N380, o local de injeção de FG ocupou a parte central do DR, em seu terço médio no eixo rostrocaudal, abrangendo as subdivisões DRD e DRV, com halo de difusão do traçador para as subdivisões posterodorsal (PDR) e DRL do DR, além da porção ventral da substância cinzenta periaquedutal (PAG). No caso N382, a injeção de FG atingiu a porção lateral do DR, abrangendo as subdivisões DRD e PDR, com halo de difusão do traçador abrangendo as subdivisões DRV e PDR, além de uma pequena porção ventral da PAG.

Os resultados do mapeamento retrógrado após a injeção de FG no DR, indicam a presença de perfis neuronais no A5, de ambos lados, distribuídos no terço médio e caudal, com morfologia estrelada, bem definida e típica dos neurônios desta região (Figura 30).

Além da confirmação das aferências ao DR provenientes do A5, estes experimentos permitiram verificar a existência de somas retrogradamente marcados no PnC, sugerindo a existência de aferências ao DR provenientes do PnC. No PnC, os neurônios retrogradamente marcados após a injeção de FG no DR distribuíram-se em quase toda sua extensão. Especialmente interessante para os circuitos que suportam o RAS e suas modulações, foi a observação de somas na região ventrolateral, de ambos lados, com morfologia variada e tamanhos pequenos e médios (Figura 30).

Foram realizados quatro casos experimentais para o mapeamento retrógrado das aferências ao A5 (N92; N94; N98; N99). Em todos os casos o local de injeção de FG atingiu o A5 (Figura 31) e difundiu para áreas imediatamente adjacentes como: o núcleo lateral superior da oliva (LSO, nos casos N92 e N94), o córtex cerebelar por contaminação no trajeto da micropipeta (caso N98) e o nervo facial (caso N99). O estudo da distribuição dos somas retrógradamente marcados permitiu definir regiões similares em todos os casos, que acreditamos constituírem aferências consistentes ao A5, e regiões cuja presença de somas variou dependendo da captação de FG em áreas adjacentes. Os resultados completos do estudo das aferências ao A5 foram organizados e agrupados no apêndice C

Foram encontrados perfis neuronais retrogradamente marcados no DR, em toda sua extensão de forma consistente (Figura 31). Os somas retrogradamente marcados após a injeção de FG no DR distribuíram-se principalmente na subdivisão dorsal (DRD).

Além da confirmação das aferências ao A5 provenientes do DR, estes experimentos permitiram verificar a existência de somas retrogradamente marcados no PnC, sugerindo a existência de aferências ao A5 provenientes do PnC. Diferentemente do que ocorreu após a injeção de FG no DR, após a injeção de FG no A5 não foram encontrados somas retrogradamente marcados em toda extensão do PnC contudo, embora não muito numerosos, foram observados perfis neuronais retrogradamente marcados de tamanho pequeno na porção ventrolateral do PnC, no lado ipsilateral e contralateral ao local de injeção, mostrando uma provável conexão bilateral do PnC com o A5 (Figura 31).

Foram observadas fontes de aferências ao A5 relacionadas com processamento de informação auditiva (o que está diretamente associado ao RAS e suas modulações), provenientes dos núcleos cocleares, do CI, do LC e no núcleo reticular paragigantocelular lateral (LPGi).

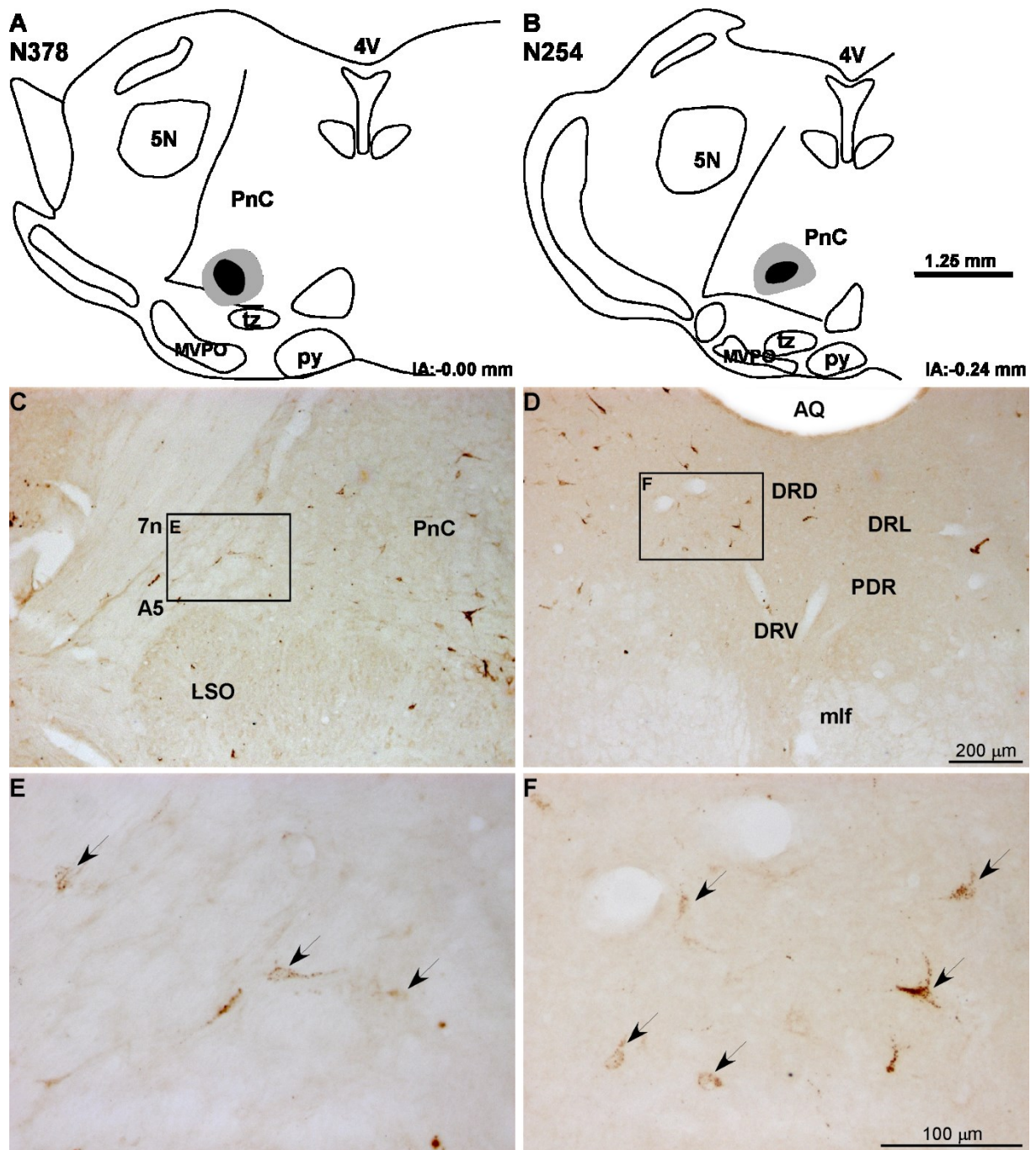


Figura 29 Locais de injeção de FG no PnC e identificação de suas aferências provenientes do DR e do A5. Em A e B: esquemas dos locais de injeção de FG no PnC. O centro do local de injeção de traçador está indicado em negro e o halo de difusão em cinza. De C a F: fotomicrografias em campo claro dos perfis neuronais retrogradamente marcados após injeção de FG no PnC. Os somas marcados estão indicados pelas setas no A5 (C e E) e núcleo dorsal da rafe DR e suas subdivisões (D e F). As áreas delimitadas foram fotografadas em maior aumento. As barras de calibração em B, D e F valem para A, C e E, respectivamente. .Abreviaturas: vide lista de Abreviaturas.

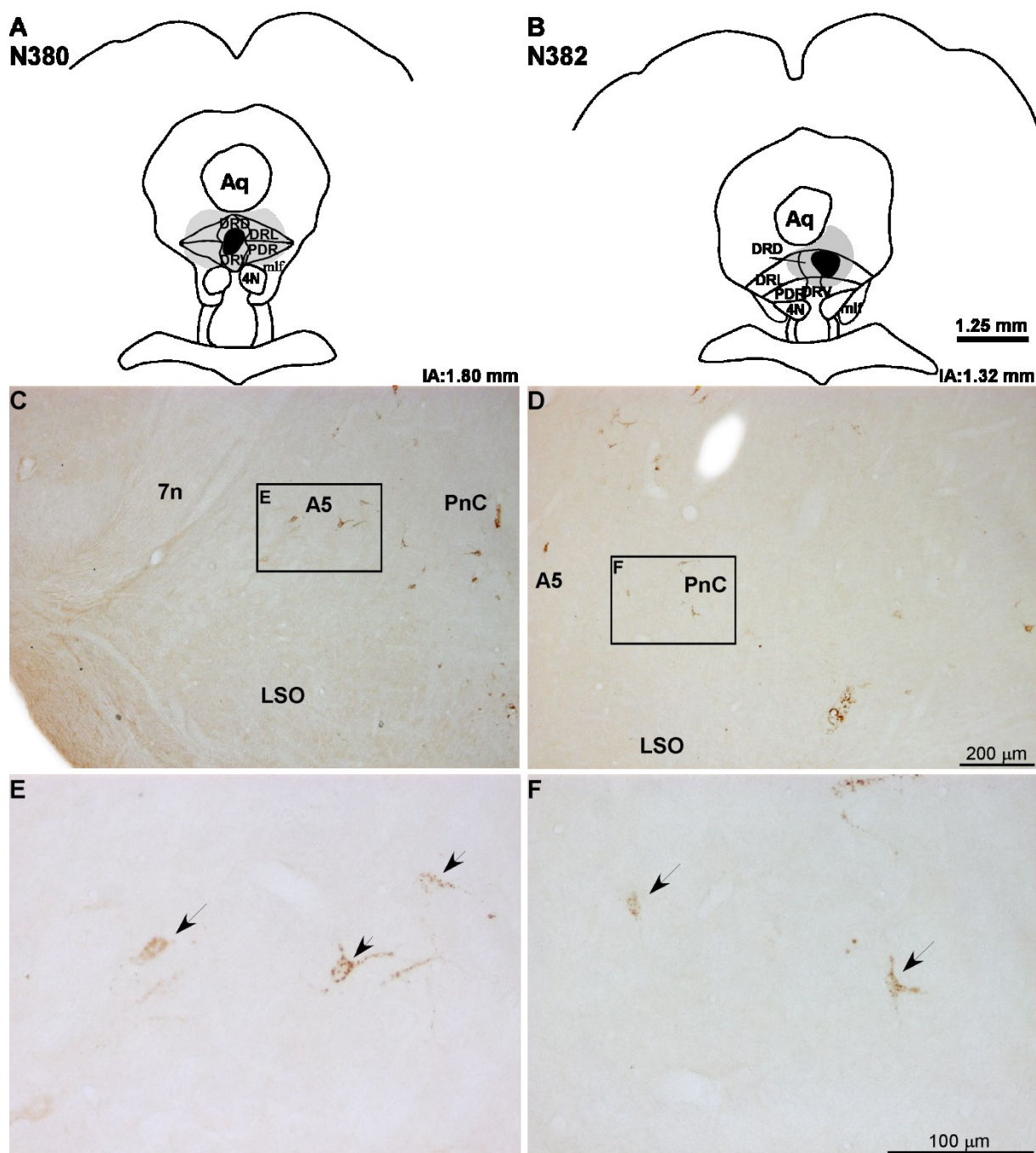


Figura 30 Locais de injeção de FG no DR e identificação de suas aferências provenientes do A5 e do PnC. Em A e B: esquemas dos locais de injeção de FG no DR. O centro do local de injeção de traçador está indicado em negro e o halo de difusão em cinza. De C a F: fotomicrografias em campo claro dos perfis neuronais retrogradamente marcados após injeção de FG no DR. Os somas marcados estão indicados pelas setas no A5 (C e E) e no PnC (D e F). As áreas delimitadas foram fotografadas em maior aumento. As barras de calibração em B, D e F valem para A, C e E, respectivamente. .Abreviaturas: vide lista de Abreviaturas.

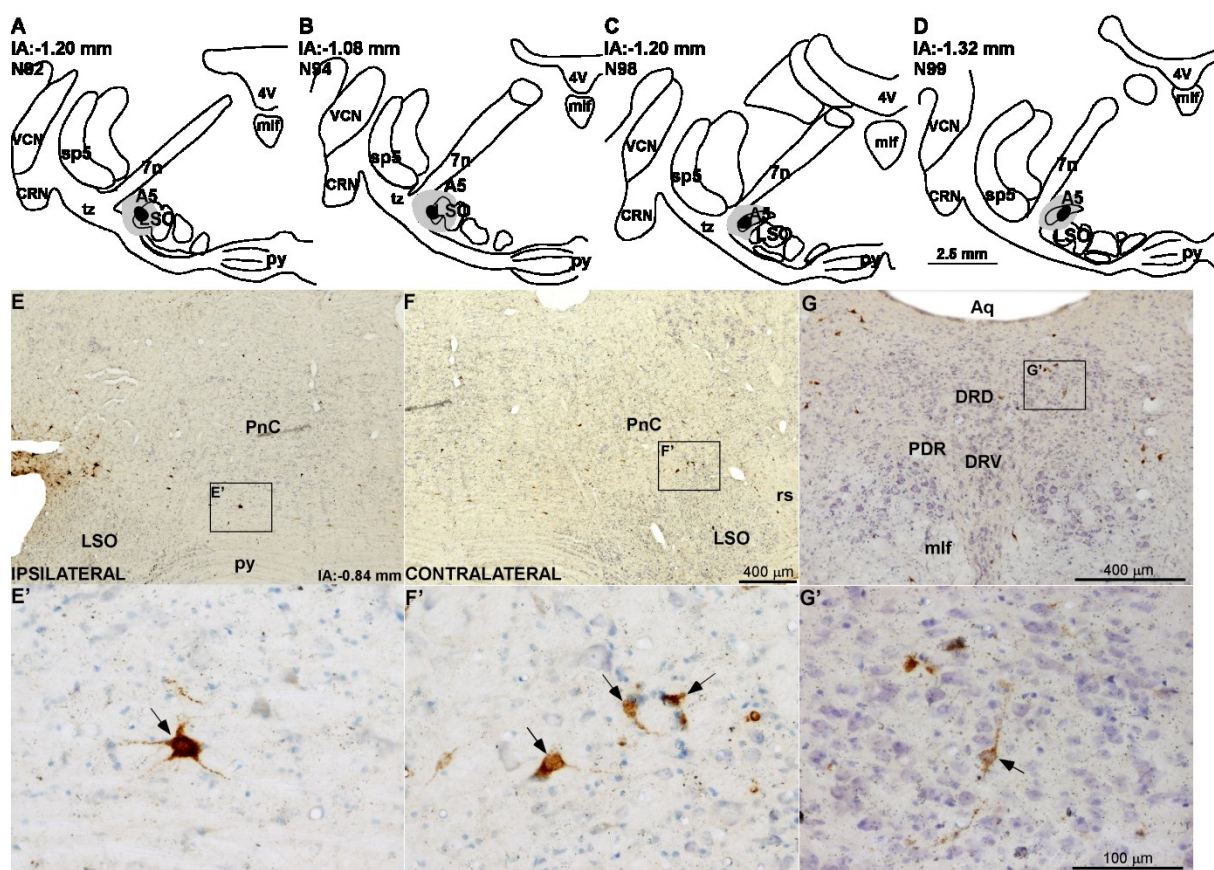


Figura 31 Locais de injeção de FG no A5 e identificação de suas aferências provenientes do PnC e do DR. De A a D: esquemas dos locais de injeção de FG no A5. O centro do local de injeção de traçador está indicado em negro e o halo de difusão em cinza. De E a G: fotomicrografias em campo claro dos perfis neuronais retrogradamente marcados após injeção de FG no A5. Os somas marcados estão indicados pelas setas no PnC (E, E', F e F') e no DR (G e G'). As áreas delimitadas foram fotografadas em maior aumento. As barras de calibração em D valem para todos os esquemas. A barra de calibração em F vale para E. A barra de calibração em G' vale para E' e F'. Abreviaturas: vide lista de Abreviaturas.

Devido a observação de prováveis eferências da parte ventrolateral do PnC ao A5 e ao DR, indicadas pelo mapeamento de somas retrogradamente marcados no PnC após a injeção de FG no A5 e no DR, foi necessária a confirmação destas conexões por meio de experimentos de controle anterógrado. Estes experimentos foram realizados com a injeção de BDA na parte ventrolateral do PnC.

Foram utilizados três casos experimentais (Figura 32) para o mapeamento anterógrado das eferências do PnC (N8, N9 e N10). Em todos os casos os locais de injeção de BDA atingiram a parte ventrolateral do PnC. No caso N8 foi observado uma pequena contaminação no LC devido a passagem da pipeta, enquanto nos outros casos (N9 e N10) observamos injeções bem localizadas com pouca contaminação de estruturas adjacentes. Em todos os casos, o traçador se disseminou pela formação reticular em sentido rostral e caudal. Foram observados terminais axonais marcados com BDA no A5, de aspecto varicoso, distribuídos de ambos os lados em toda sua extensão. De forma semelhante, no DR foram observados terminais axonais marcados com BDA de aspecto varicoso (Figura 32).

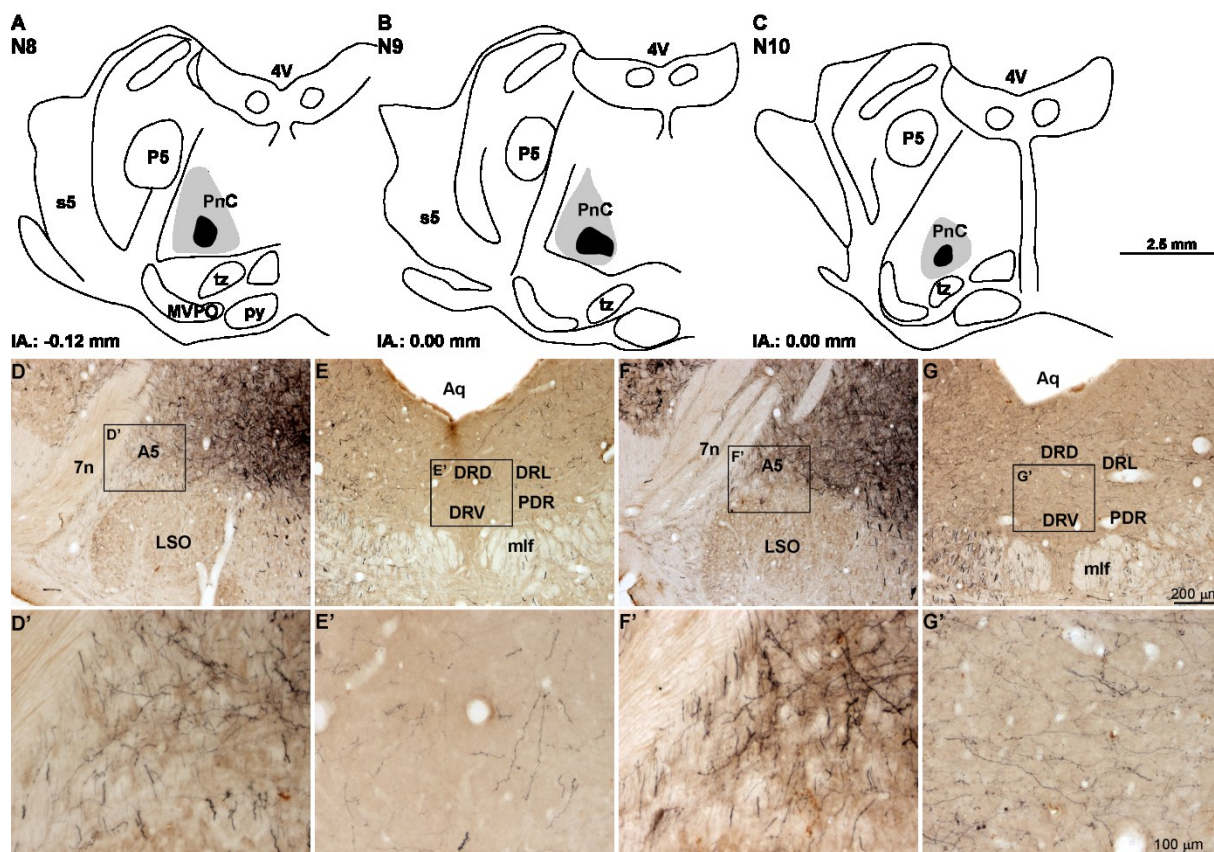


Figura 32 Eferências do PnC: A-C plotagem dos locais de injeção dos três casos utilizados no estudo das eferências do PnC. Fotomicrografias em campo claro das fibras imunorreativas ao BDA no A5 e DR; de D-E' caso N8 fibras no A5 e DR observadas em maior aumento; de F-G' caso N9 evidenciando fibras no A5 e DR em maior aumento. As esquematizações e I.A foram baseadas no Atlas do Sistema Nervoso do Rato de Paxinos & Watson., 2007. Abreviaturas: vide lista de Abreviaturas.

4.7 Neuroquímica das eferências do A5 aos CRN, PnC e ao DR

Devido a diversidade neuroquímica do A5, evidenciada nos experimentos de co-localização em somas retrogradamente marcados após a injeção de FG na raiz coclear e detecção de imunoreatividade à DHB e ao CART (Figuras 13 a 17), foram necessários experimentos de co-localização analisados com microscópio confocal, para confirmação da identidade neuroquímica das eferências do A5. Com esta finalidade realizamos experimentos de co-localização, em séries de cortes previamente reservadas, dos experimentos de mapeamento de eferências do A5 com injeção de traçador neuronal anterógrado BDA (Figura 18). Desta forma, foram verificadas as relações entre fibras nervosas eferentes do A5 marcadas com BDA e a imunoreatividade a DBH e CART, nos CRN, no PnC e no DR (casos N122 e N274). No caso N274, em algumas séries de cortes, também foi detectada a imunoreatividade à proteína Calbindina D-28k como marcador de citoarquitetura para os CRN e neurônios do PnC.

Na raiz coclear foram observados terminais axonais marcados com BDA que apresentaram co-localização com a imunoreatividade a DBH, demonstrando a identidade neuroquímica noradrenérgica das eferências do A5 à raiz coclear (Figuras 33 e 34). Os ter-

minais axonais noradrenérgicos provenientes do A5 distribuíram-se nos terços dorsal e médio da raiz coclear, em aposição aos somas dos CRN ou em suas proximidades (Figuras 33 e 34). No entanto, também foram observados muitos terminais axonais imunorreativos a DBH que não apresentaram marcação com BDA, sugerindo a existência de outras fontes de aferências noradrenérgicas à raiz coclear (Figura 34). Também foram observadas fibras nervosas marcadas com BDA que não foram imunorreativas a DBH, sugerindo que as aferências provenientes do A5 possuísem identidade neuroquímica não noradrenérgica.

Um fato interessante foi a observação de terminais axonais imunorreativos a DBH que estavam em aposição com terminais marcados com BDA que por sua vez estavam em aposição com os somas e dendritos dos CRN (Figura 34).

Em algumas séries de cortes, foi detectada adicionalmente a imunorreatividade ao CART em detrimento da calbindina, (caso N274, BDA+DBH+CART). Neste caso o local de injeção do traçador ocupou por toda extensão rostrocaudal do A5 e difundiu-se entre somas imunorreativos a DBH e ao CART nos terços caudal e médio do A5 (Figura 35). Não foram observadas co-localizações entre o local de injeção e somas imunorreativos no terço rostral do A5. Nos cortes histológicos da raiz coclear foram observados terminais axonais marcados com BDA que co-localizaram com a imunorreatividade para as duas características neuroquímicas estudadas, CART e DBH (Figura 36). Estes terminais axonais foram observados na raiz coclear e em algumas ocasiões estavam em relação de proximidade aos CRN (cuja silueta pode ser observada difusamente na marcação inespecífica de fundo). É importante salientar que não foram observados terminais axonais duplamente marcados com BDA e imunorreatividade ao CART. Por outro lado, foram observados terminais axonais marcados com BDA que não apresentaram imunorreatividade a DBH ou CART (Figura 36), o que sugeriu a existência de outra identidade neuroquímica para as aferências provenientes do A5, ainda não definida.

A análise da parte ventrolateral do PnC e do DR neste mesmo tipo de experimento evidenciou terminais axonais marcados com BDA distribuídos de forma difusa que apresentavam co-localização com a imunorreatividade para DBH (Figura 37, caso N274). No PnC, também foram observados terminais axonais marcados com o BDA e imunorreativos para DBH e CART (Figura 37, caso N278). Diferentemente do que foi observado na raiz coclear, no PnC foram observados terminais axonais marcados com BDA e somente imunorreativos ao CART (Figura 37). Tanto no PnC como no DR foram observados terminais axonais marcados com BDA porém sem imunorreatividade para DBH ou CART.

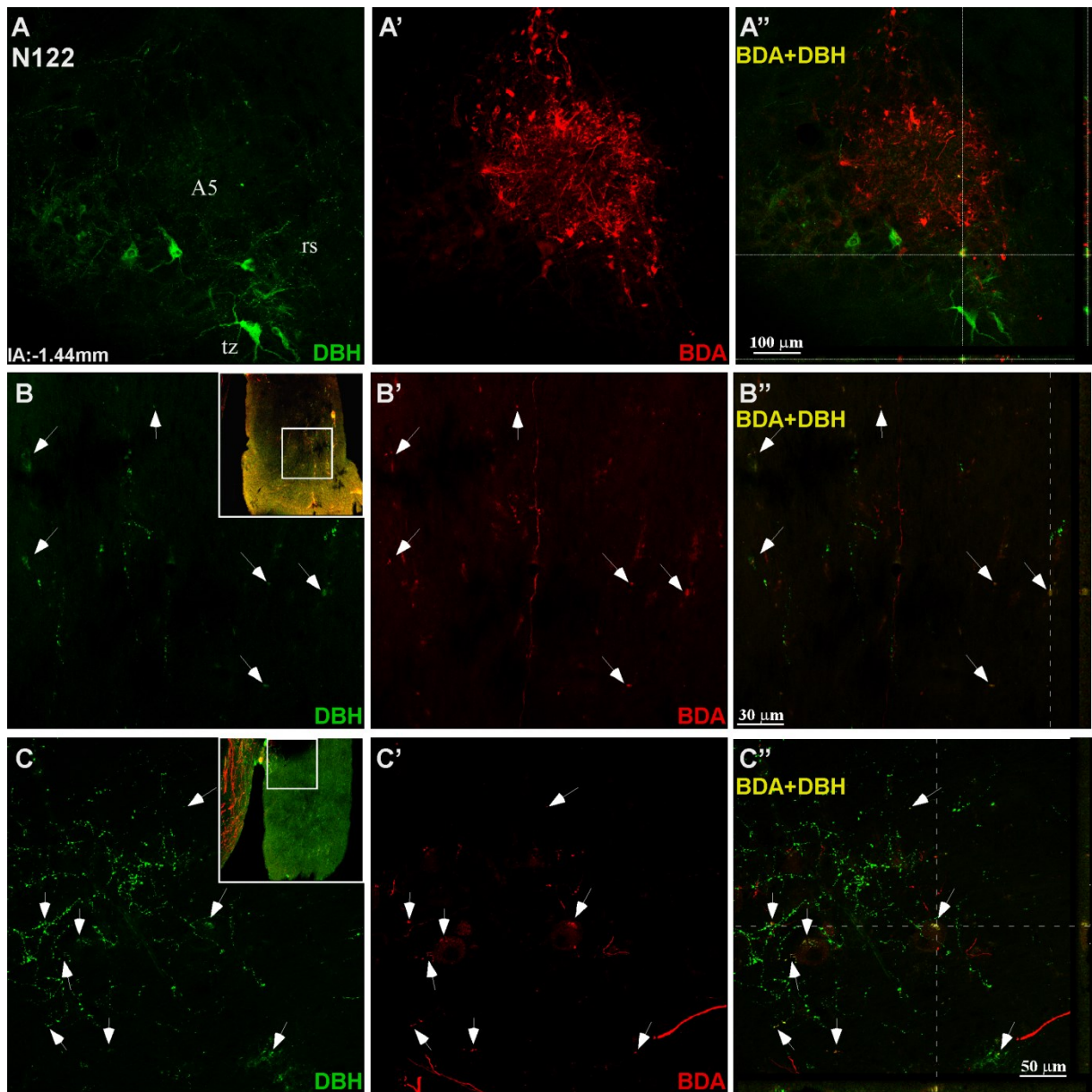


Figura 33 Eferências noradrenérgicas do A5 à raiz coclear. Imagens capturadas com microscópio confocal, de secções coronais do local de injeção de BDA no A5 (A-A'') e da raiz coclear (B-B'' e C-C''). De A a A'': local de injeção de BDA no A5, evidenciando a imunorreatividade a DBH (A, Cy2-verde), o BDA (A', Cy3-vermelho) e a sobreposição das imagens anteriores com projeção ortogonal no eixo Z (A'', BDA+DBH - amarelo) que confirma a co-localização em somas do A5. De B a B'' e de C a C'': fibras nervosas na raiz coclear marcadas com DBH (B e C), BDA (B' e C') e a sobreposição das imagens com projeção ortogonal no eixo Z (B'' e C''). As áreas delimitadas na raiz coclear, no detalhe em B e C, indicam a área de captura das imagens. As fibras nervosas duplamente marcadas estão indicadas pelas setas. As barras de calibração em A'', B'' e C'', são válidas para as respectivas sequências de imagens.

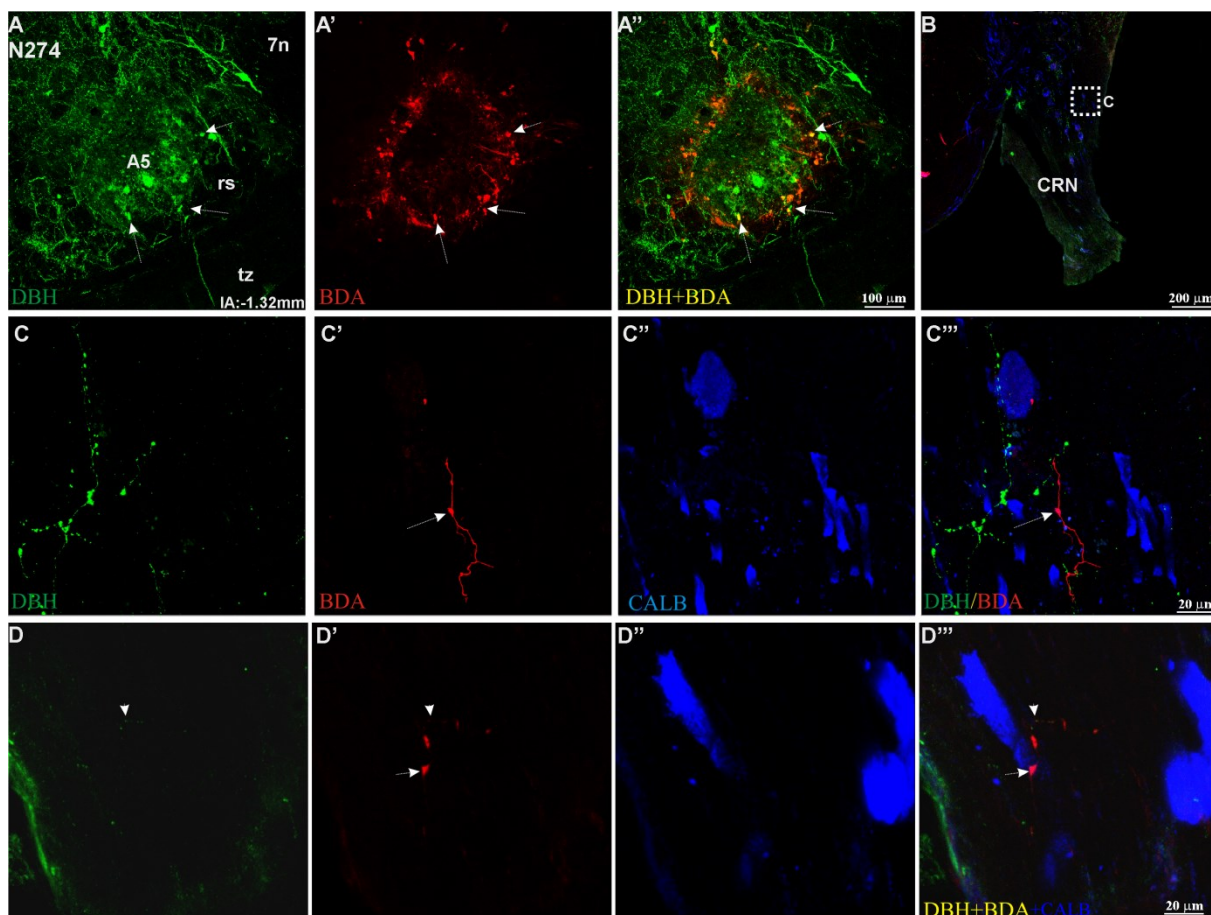


Figura 34 Eferências noradrenérgicas e não-noradrenérgicas do A5 à raiz coclear. Imagens capturadas com microscópio confocal de secções coronais do local de injeção de BDA no A5 (A-A'') e da raiz coclear (de B a D'''). De A a A'': local de injeção de BDA no A5, evidenciando a imunorreatividade a DBH (A, Cy2-verde), o BDA (A', Cy3-vermelho) e a sobreposição das imagens anteriores (A'', BDA+DBH - amarelo) que confirma a colocalização em somas do A5. Em B, imagem da raiz coclear com a área de captura de C a C''' delimitada. De C a C''' e de D a D''': fibras nervosas na raiz coclear marcadas com DBH (C e D), BDA (C' e D'), imunorreatividade para Calbindina (C'' e D'', Alexa 647 – azul) e a sobreposição das imagens (C''' e D'''). As fibras nervosas duplamente marcadas estão indicadas pelas cabeças de setas e as marcadas apenas por BDA estão indicadas pelas setas. As barras de calibração em A'', C''' e D''', são válidas para as respectivas sequências de imagens.

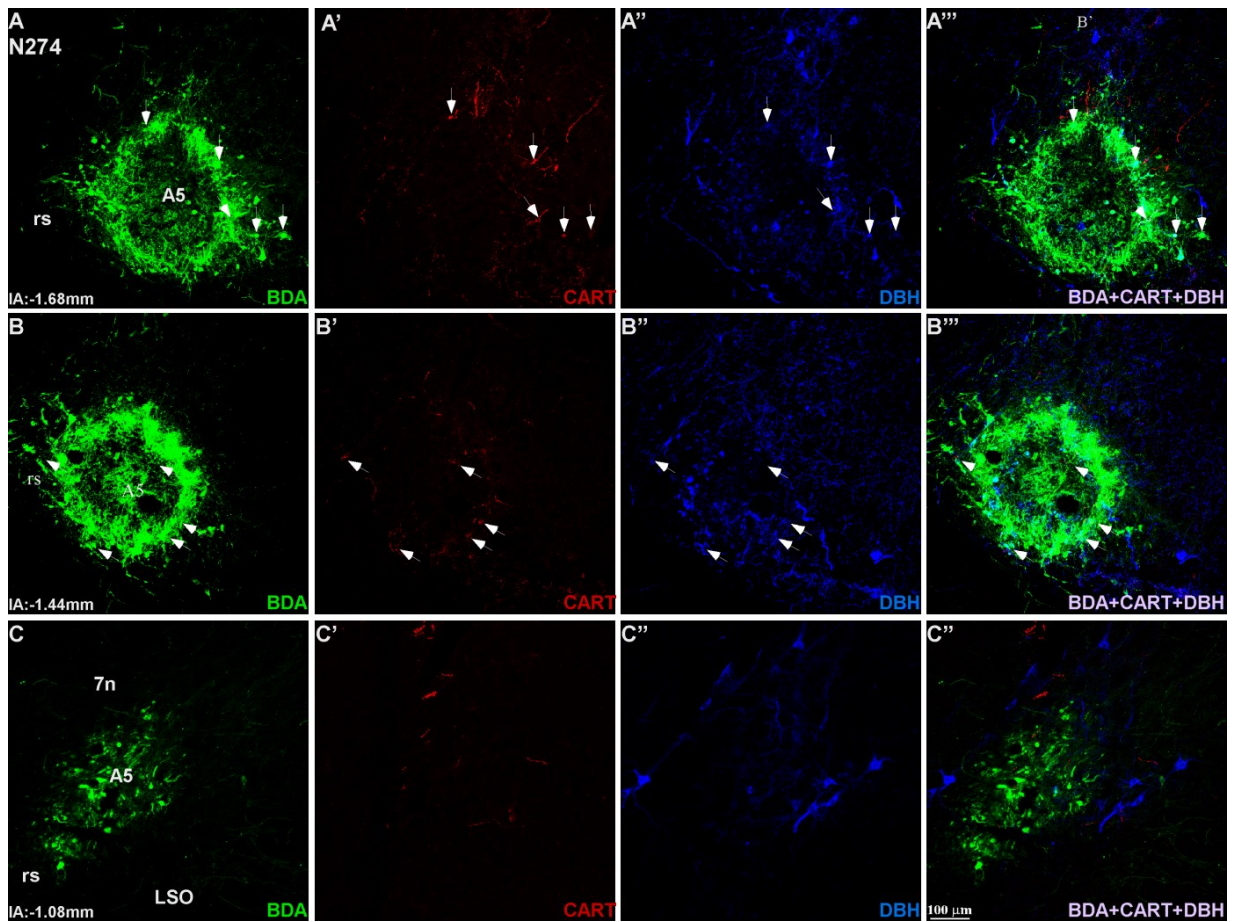


Figura 35 Secções coronais do local de injeção de BDA no A5 (caso 274), em três níveis rostrocaudais (A-A''', B-B''' e C-C''') que apresentam somas imunorreativos ao CART e a DBH. Imagens capturadas com microscópio confocal evidenciando a injeção de BDA (A, B e C, Cy2-verde), a imunorreatividade a CART (A', B' e C', Cy3-vermelho), a imunorreatividade para DBH (A'', B'' e C'', Alexa 647 – azul) e a sobreposição das imagens anteriores (A''', B''' e C''', BDA+CART+DBH - branco) que confirma a co-localização em somas (setas) no nível caudal e médio do A5. A barra de calibração em C''' é válida para todas as imagens. Os níveis I.A foram baseados no atlas estereotático do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2007).

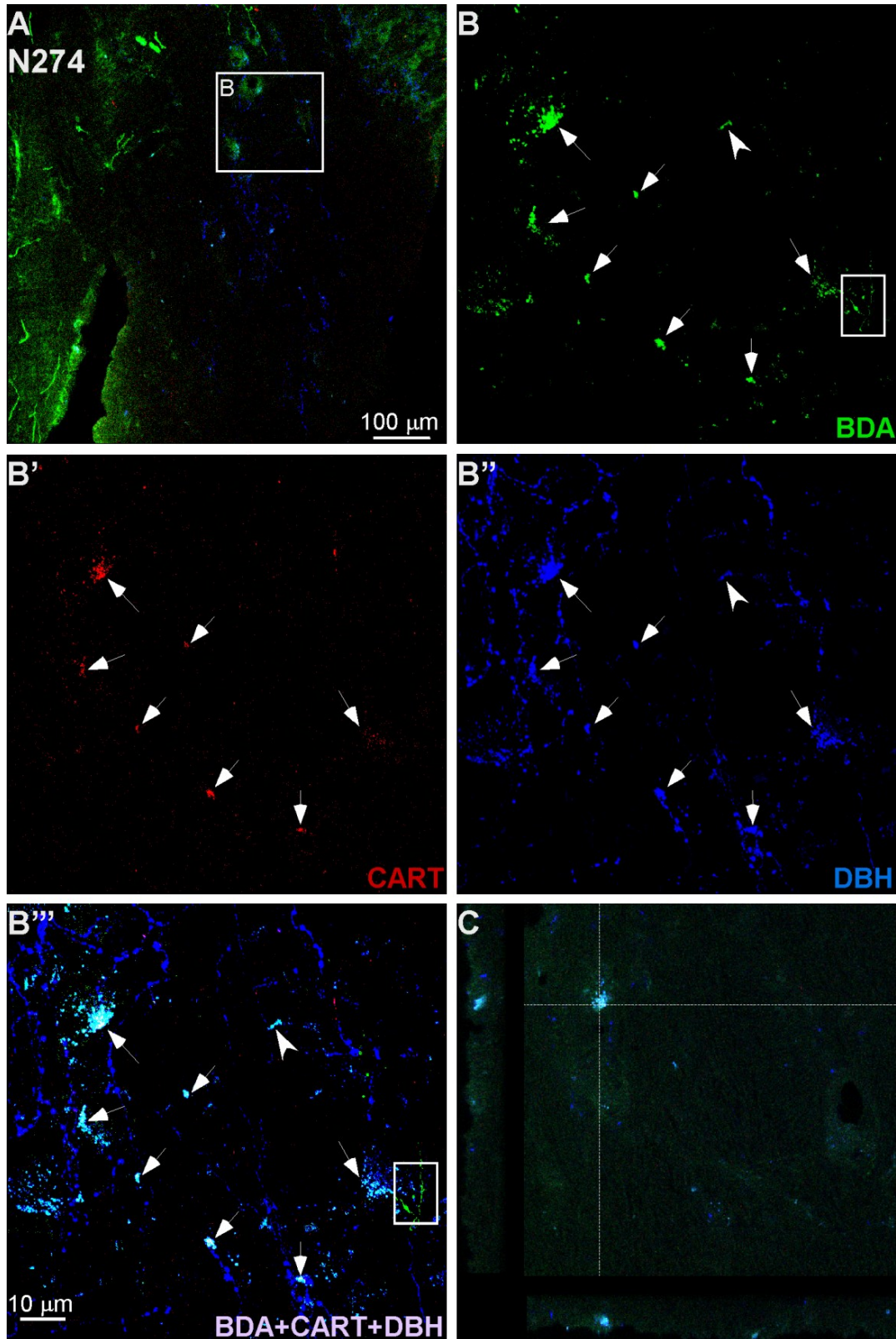


Figura 36 Secções coronais da raiz coclear após injeção de BDA no A5 (caso 274) e detecção de imunorreatividade para CART e DBH. Em A: imagem da raiz coclear com a área de captura de B a C delimitada. De B a B''': Imagens capturadas com microscópio confocal evidenciando as fibras nervosas marcadas com BDA (B, Cy2-verde), a imunorreatividade para CART (B', Cy3-vermelho), a imunorreatividade para DBH (B'', Alexa 647 – azul) e a sobreposição das imagens anteriores (B''', BDA+CART+DBH - branco) que confirma a tripla co-localização em fibras nervosas (setas) ou a co-localização entre o BDA e a DBH (cabeça de seta). Pode ser observada ainda uma fibra BDA (B''', delimitada pelo retângulo) sem co-localização com CART ou DBH. Em C: projecção ortogonal do ponto de co-localização confirmando a sobreposição no eixo Z. A barra de calibração em B''' é válida para B, B', B'' e C.

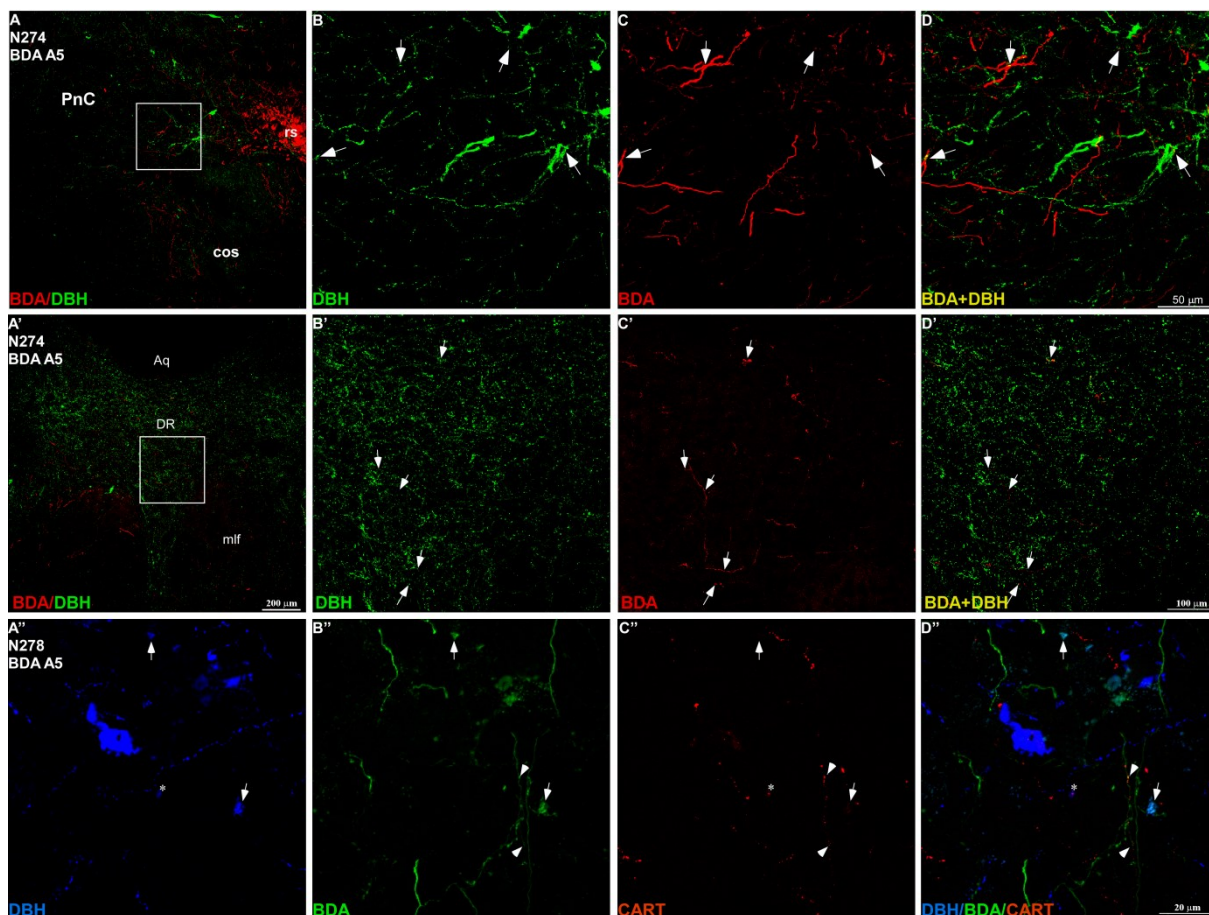


Figura 37 Secções coronais do PnC e do DR após injeção de BDA no A5 (casos 274 e N278) e detecção de imunoreatividade para CART e DBH. De A a D e de A' a D' imagens capturadas na parte ventrolateral do PnC. De A' a D' imagens capturadas no DR. Imagens capturadas com microscópio confocal evidenciando as fibras nervosas marcadas com BDA (em C e C' Cy3-vermelho ou em B'' Cy2-verde), a imunoreatividade para CART (C'', Cy3-vermelho), a imunoreatividade para DBH (em B e B' Cy2-verde ou em A'' Alexa 647 – azul) e a sobreposição das imagens anteriores (D e D' BDA+DBH–amarelo ou D'' DBH+BDA+CART–branco). A co-localização completa em terminias axonais está indicada por setas e a co-localização parcial está indicada por cabeças de setas. Em A: imagem em menor aumento do PnC com a área de captura de B a D delimitada. Em A': imagem em menor aumento do DR com a área de captura de B' a D' delimitada. A barra de calibração em A' é válida para A. As barras de calibração em D e D' são válidas para B, C e B',C', respectivamente. A barra de calibração em D'' é válida para A'', B'' e C''. Abreviaturas: vide lista de Abreviaturas.

4.8 Neuroquímica das eferências do núcleo dorsal da rafe aos CRN, ao PnC e ao A5

No intuito de averiguar a característica neuroquímica dos terminais axonais oriundos do DR que se distribuem na raiz coclear em aposição aos CRN, na parte ventrolateral do PnC e no A5, foram realizados experimentos de co-localização. Nestes experimentos empregamos séries de cortes previamente reservadas de experimentos de mapeamento das eferências do DR, em que o traçador anterógrado BDA foi injetado no DR e realizamos a detecção de imunoreatividade a serotonina. Desta forma, foram verificadas as relações entre fibras nervosas eferentes do DR marcadas com BDA e a imunoreatividade a serotonina nos CRN, no PNC e no DR.

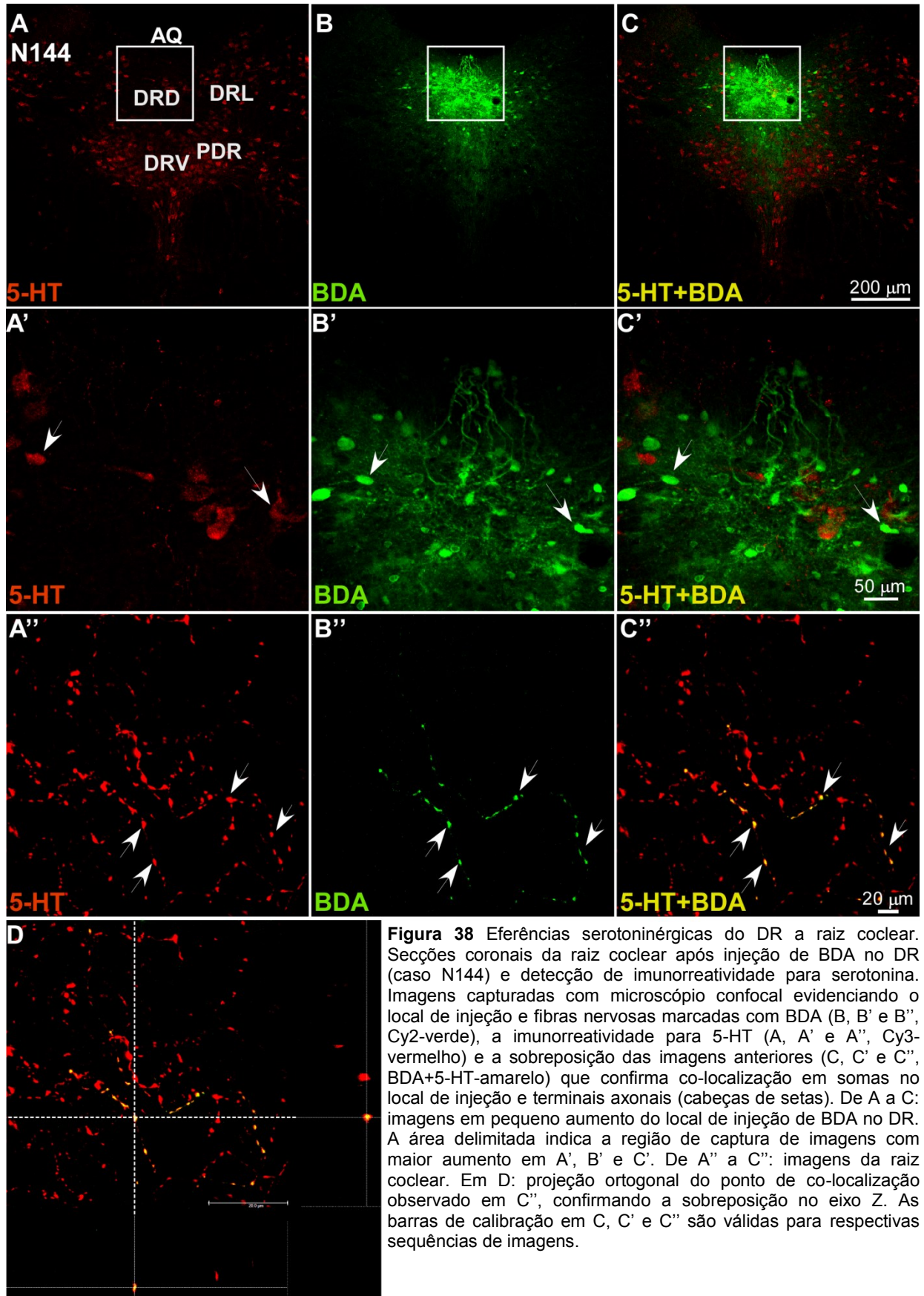
As injeções de BDA no DR foram realizadas na subdivisão dorsal, na mesma localização onde foram observados somas imunorreativos a serotonina (Figura 38). Na raiz coclear, em aposição com os CRN, foram observados terminais axonais marcados com BDA que co-localizaram a imunorreatividade para serotonina bilateralmente (Figura 38). No entanto, também foram observados terminais axonais serotoninérgicos não marcados com BDA, o que indica a existência de outras prováveis fontes de aferências serotoninérgicas aos CRN que não sejam provenientes do DR (Figura 38). Na parte ventrolateral do PnC, foram observadas numerosas fibras nervosas imunorreativas a serotonina e distribuídas de forma difusa, muitas delas com aspecto de fibras de passagem. Além disso, foram observados terminais axonais marcados com DBA que co-localizaram a imunorreatividade a serotonina bilateralmente (Figura 39). No A5, também foram observados terminais axonais marcados com BDA formando uma densa rede. Alguns destes terminais axonais apresentaram co-localização com a imunorreatividade a serotonina (Figura 39).

Em conjunto, os resultados hodológicos e neuroquímicos deste projeto confirmam que os CRN recebem projeções noradrenérgicas e CART-érgicas ipsilaterais do A5 e serotoninérgicas bilaterais do DR. O A5 e o DR se projetam para a parte ventrolateral do PnC com suas características neuroquímicas próprias, ambos bilateralmente, e recebem projeções reciprocamente do PnC (Figura 40).

4.9 Avaliação comportamental do RAS e da PPI após lesão na área noradrenérgica A5

Entre os núcleos aferentes ao circuito do RAS, identificados nos experimentos hodológicos e neuroquímicos deste trabalho, não foram encontrados dados na literatura sobre a influência do grupamento noradrenérgico A5 no desencadeamento do RAS ou de quaisquer de suas modulações. Desta forma nos pareceu interessante realizar experimentos de lesão desta região e análise comportamental do RAS e da PPI no intuito de desvendar aspectos funcionais relacionados as conexões do A5 com os CRN e PnC.

Para realizar este experimento, após a habituação e seleção de animais que respondiam adequadamente às provas comportamentais de avaliação do RAS/PPI, foram constituídos dois grupos experimentais (Lesão e Sham) com oito animais em cada um. Os dados comportamentais foram validados pela observação da região do A5 em ambos os grupos em comparação com um grupo controle constituído por três animais sem qualquer manipulação experimental. Para esta análise utilizamos a técnica de Nissl para observação da citoarquitetura e a detecção de imunorreatividade a DBH como marcador dos neurônios noradrenérgicos desta área (Figura 41).



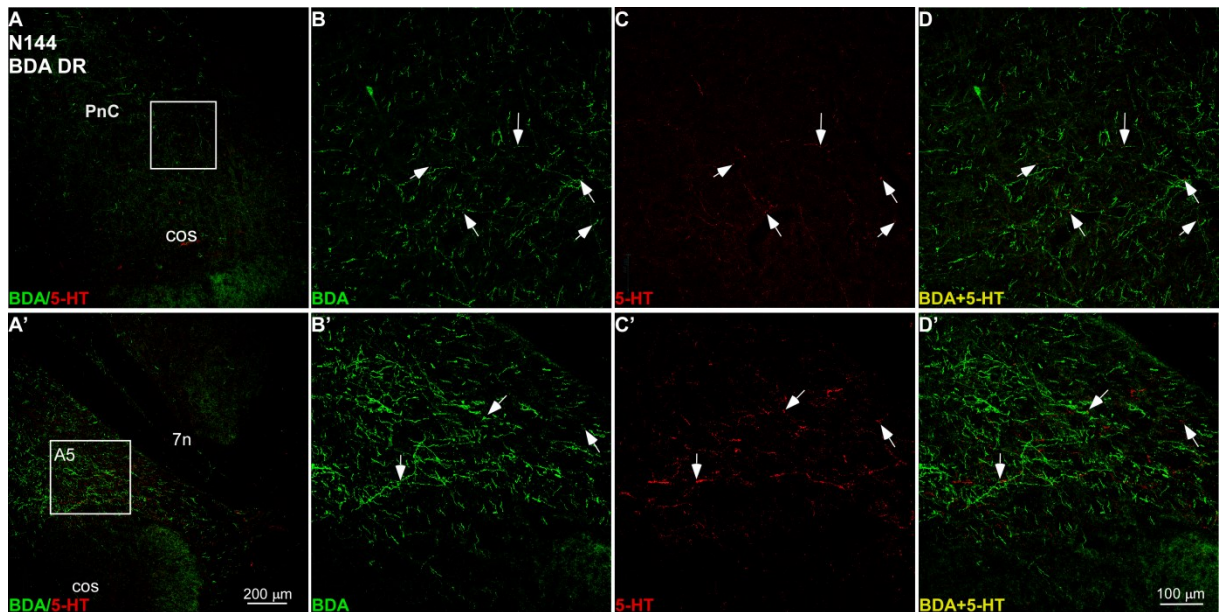


Figura 39 Eferências serotoninérgicas do DR ao PnC e ao A5. Secções coronais do PnC (de A a D) e do A5 (de A' a D') após injeção de BDA no DR (caso N144) e detecção de imunoreatividade para serotonina. Imagens capturadas com microscópio confocal evidenciando fibras nervosas marcadas com BDA (B, B', Cy2-verde), a imunoreatividade para 5-HT (C, C', Cy3-vermelho) e a sobreposição das imagens anteriores (D, D', BDA+5-HT-amarelo) que confirma co-localização em terminais axonais (setas). Em A e A': imagens em pequeno aumento do PnC e do A5, respectivamente. A área delimitada foi capturada em maior aumento nas sequências de B a D e B' a D'. Foram observadas (não indicado) fibras do DR marcadas com BDA que não são imunorreativas a 5-HT e fibras imunorreativas a 5-HT que não estão marcadas com BDA. A barra de calibração em A' é válida para A. A barra de calibração em D' é válida para B, C, D, B' e C'. Abreviaturas: vide lista de Abreviaturas.

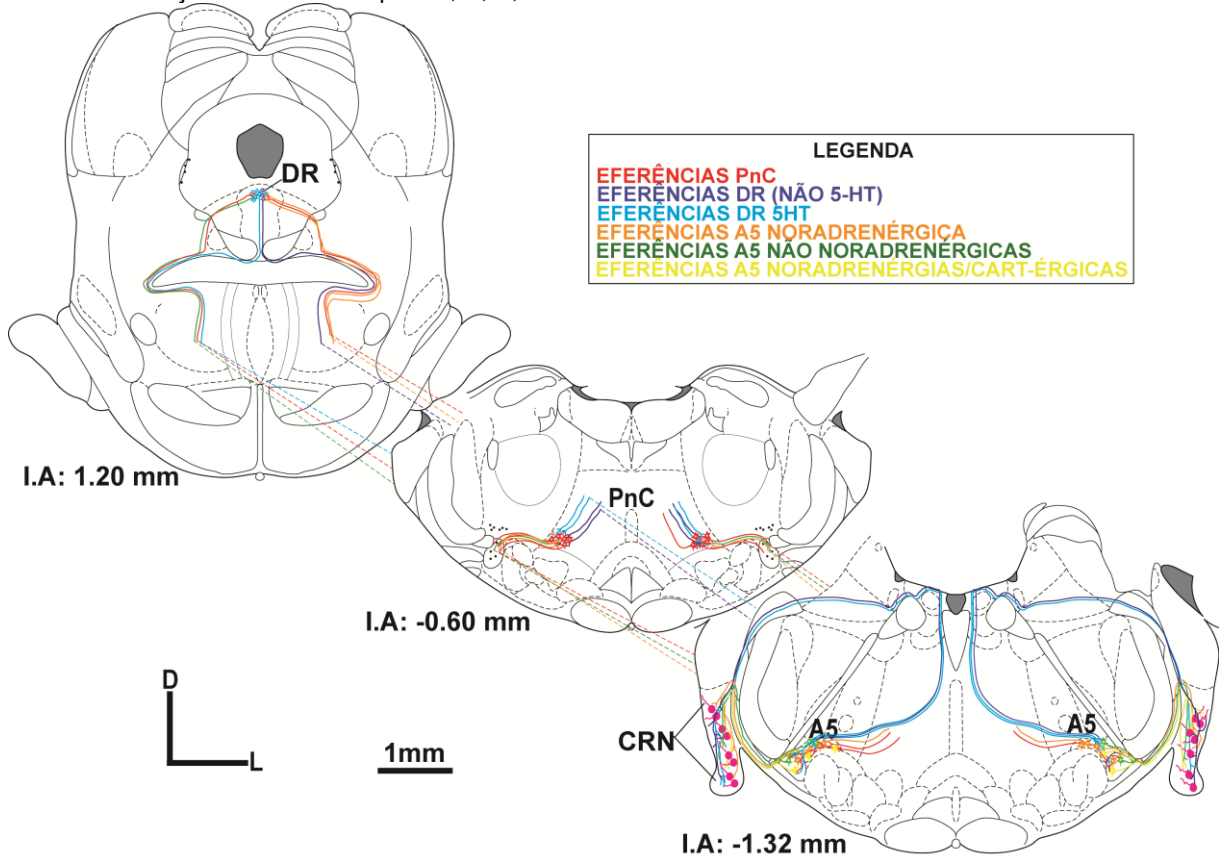


Figura 40 Resumo das conexões estudadas. Os esquemas níveis I.A. foram baseados no atlas estereotático do cérebro do rato (PAXINOS e WATSON, 2007). Abreviaturas: vide lista de Abreviaturas.

Os casos experimentais do grupo SHAM foram considerados válidos quando a falsa lesão não provocou alterações na citoarquitetura da região do A5 (Figura 41). Os casos do grupo lesão foram considerados válidos quando foi observado bilateralmente uma nítida alteração da citoarquitetura no A5, com formação de gliose em resposta a injeção do neurotóxico (6-OHDA) e drástica diminuição do número de neurônios noradrenérgicos (Figura 42).

A análise detalhada dos casos do grupo lesão revelou que nos casos N255, N266, N377 e N379 as injeções atingiram o terço médio do A5 no eixo rostro-caudal, com diminuição dos neurônios imunorreativos ao DBH e gliose local. Nos casos N264, N265 e N385 a injeção do neurotóxico atingiu o terço caudal do A5 que difundiu alcançando níveis rostrais, o que foi evidenciado pela diminuição dos neurônios imunorreativos ao DBH. A fotodocumentação completa de todos os casos experimentais do grupo lesão pode ser analisada no apêndice E.

Apesar do caso N374 apresentar lesões bilaterais no A5 semelhantes aos demais casos do grupo, a análise estatística dos dados comportamentais produzidos por este caso experimental indicou que a amplitude média do RAS apresentou uma grande variação sobretudo no 21º dia após a lesão, o que o posicionou fora do intervalo de confiança de 95% estabelecido para o grupo experimental. Por este motivo, os dados comportamentais deste caso experimental foram excluídos da análise estatística.

Os dados obtidos com os experimentos de avaliação comportamental revelaram que o peso corporal dos animais entre os grupos experimentais não diferiu, quando foram comparados os resultados obtidos em um mesmo momento (idade). Nos dois grupos houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal entre os momentos de avaliação, quando comparamos o momento pré-lesão e 21 dias pós lesão. Isto está de acordo com a curva de crescimento normal dos animais que determina o aumento do peso corporal com a idade. Desta forma a análise dos dados permite afirmar que o processo de crescimento do peso corporal permaneceu inalterado em ambos os grupos (Tabela 1).

Grupo	Momento da avaliação				Valor p*
	Pré	7 dias	14 dias	21 dias	
Lesão	223,6 (12,8) 220,5(205-240) ^A	225,8 (11,9) 224,5(205-240) ^A	229,5 (11,4) 231,5(205-241) ^{AB}	235,6 (12,9) 236,5(208-252) ^B	<0,001
Sham	234,6 (30,1) 230,5 (200-276) ^A	239,0 (28,9) 233,5 (201-286) ^{AB}	242,8 (34,2) 239,5 (200-289) ^{AB}	247,3 (34,1) 245,0(205-290) ^B	
Valor p*	0,721	0,442	0,505	0,574	0,006

Tabela 1 Média (desvio padrão) e mediana (mínimo e máximo) do peso corporal dos animais (em gramas) segundo grupo e momento da avaliação. A comparação dos grupos e dos momentos foi realizada por meio das medianas (teste não paramétrico).

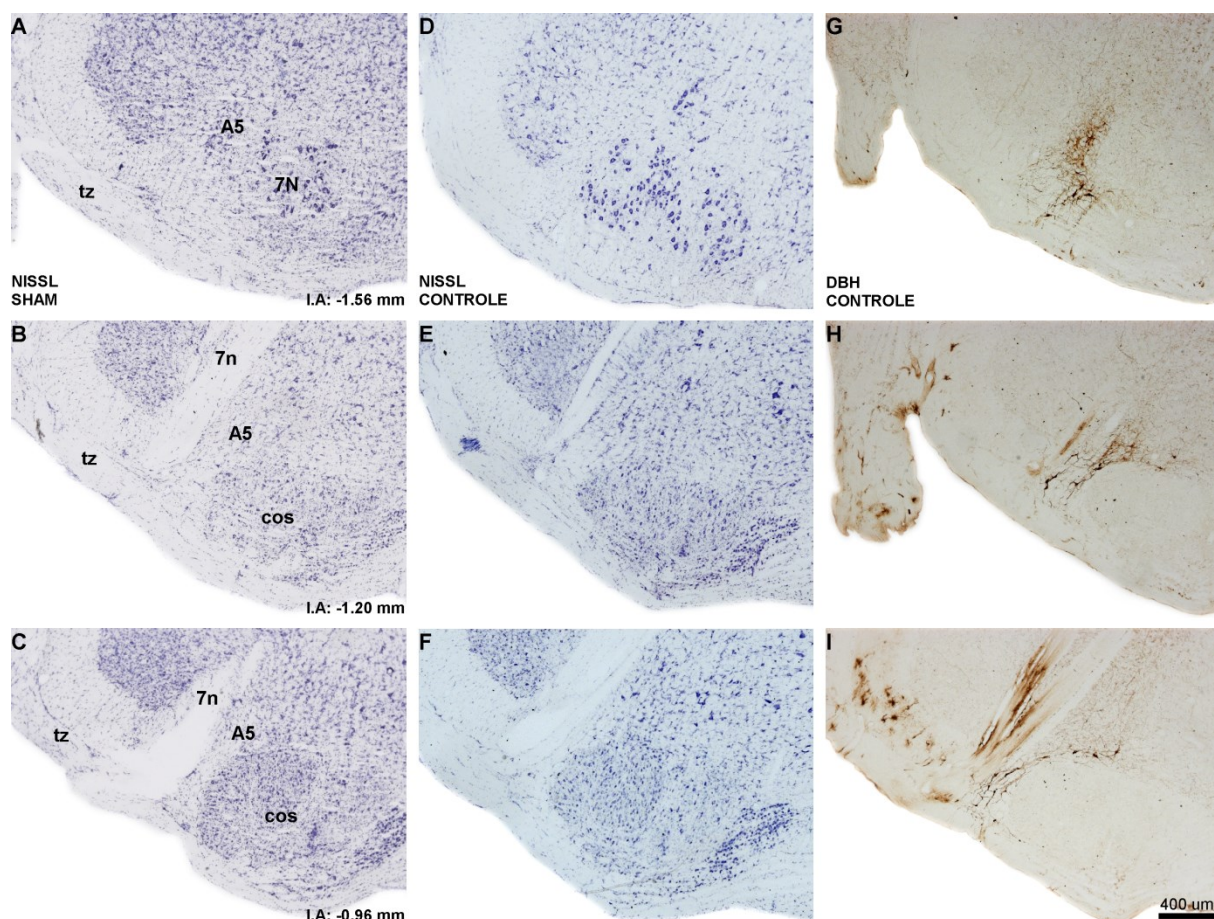


Figura 41 Citoarquitetura e imunorreatividade à DBH no A5 de animais do grupo controle e SHAM. Fotomicrografias em campo claro de cortes coronais do tronco encefálico na região do A5, em três níveis rostrocaudais. De A a C: cortes corados pelo método de Nissl para observação da citoarquitetura compatível com a normalidade de um caso experimental do grupo SHAM. De D a F: cortes corados pelo método de Nissl de um caso experimental do grupo controle. De G a I: cortes submetidos ao protocolo imuno-histoquímico para detecção da imunorreatividade a DBH na região do A5 em um caso experimental do grupo controle. O nível interaural (I.A.) foi baseado nas ilustrações do Atlas do encéfalo do Rato (PAXINOS e WATSON, 2007). A Barra de calibração em I é válida para todas as imagens. Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

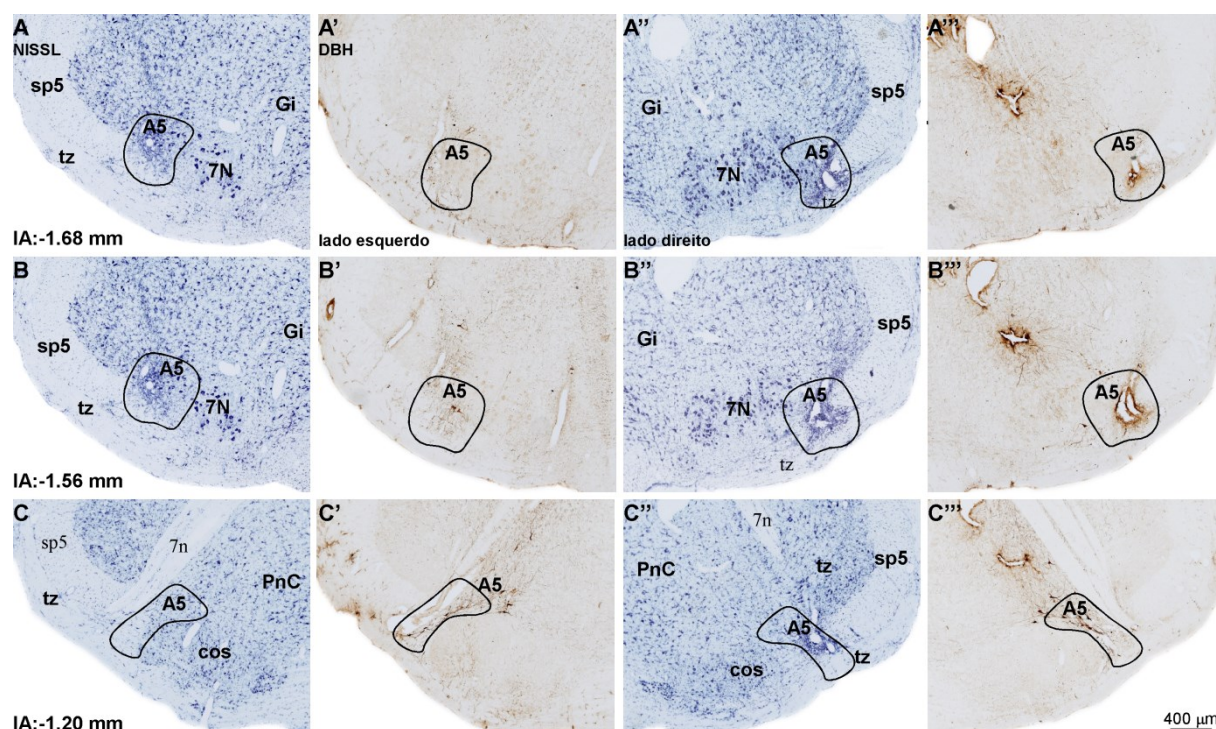


Figura 42 Avaliação histológica das lesões bilaterais no A5 com 6-OHDA. Fotomicrografias em campo claro de cortes coronais do tronco encefálico na região do A5 (circundado pela linha contínua), em três níveis rostrocaudais (A-A'', B-B'' e C-C''), de ambos lados do caso N264. De A a C e de A'' a C'': cortes corados pelo método de Nissl. Pode-se observar a intensa gliose no local de injeção de neurotóxico. De A' a C' e de A''' a C''': corte adjacente submetido a protocolo para detecção de imunorreatividade a DBH. Pode-se observar a ausência de somas imunorreativos a DBH, confirmando a lesão bilateral do A5. O nível interaural (I.A.) foi baseado nas ilustrações do Atlas do encéfalo do Rato (PAXINOS e WATSON, 2007). A Barra de calibração em C''' é válida para todas as imagens. Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

Com relação aos resultados de avaliação comportamental do RAS, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo lesão e grupo sham em nenhum momento do estudo, nem diferenças entre os momentos de um mesmo grupo, embora fosse verificado o aumento da amplitude de sobressalto (sem significância estatística) com a progressão do tempo pós-lesão, chegando a 21 dias onde há a maior diferença entre os momentos do grupo lesão e entre os grupos sham e lesão (Tabela 2).

Grupo	Momento da avaliação				Valor p
	Pré	7 dias	14 dias	21 dias	
Lesão	757,6 (416,1-1562,7)	715,1 (233,9-1267,1)	827,2 (384,9-1533,2)	830,8 (636,8-1473,1)	0,290
Sham	787,1 (215,0-968,7)	584 (99,0-1495,4)	683,4 (148,1-1699,3)	701,5 (117,2-1510,4)	0,825
Valor p	0,721	0,959	0,798	0,279	

Tabela 2 Mediana (mínimo e máximo) de amplitude do RAS segundo grupo e momentos.

Com relação as porcentagens de PPI nos diferentes intervalos estímulo (ISI), a análise dos dados indicou que não há diferenças entre os grupos sham e lesão quando comparados os mesmos momentos e ISIs, assim como não houve diferenças entre

as porcentagens de PPI de diferentes ISIs em um mesmo momento e grupo. No entanto, no grupo Lesão, diferentemente do que ocorre no grupo Sham, a lesão com o passar do tempo provoca aumento da porcentagem da PPI em ISIs longos como 100 e 150ms, levando a diferença estatisticamente significativa entre os momentos pré-lesão e momentos 14 e 21 dias pós-lesão (Tabela 3).

Grupo	ISI	Momento da avaliação			
		Pré-lesão	7 dias pós-lesão	14 dias pós-lesão	21 dias pós-lesão
Lesão	25	54,5 (22,8)	66,8(12,6)	65,8(20,8)	72,7(17,7)
		47,4 (27,2-91,9) ^{aA_α}	66,7 (48,4-85,4) ^{aA_α}	68,6 (28,7-91,0) ^{aA_α}	77,3(38,9-90,0) ^{aA_α}
	50	50,9 (18,1)	58,5(17,4)	62,9(17,9)	68,0(17,2)
		56,3 (19,0-72,1) ^{aA_α}	61,3 (37,9-84,3) ^{aA_α}	68,14(28,5-79,8) ^{aA_α}	73,7(41,7-86,7) ^{aA_α}
	100	43,2(21,7)	53,4(15,5)	60,1(18,1)	61,7(15,2)
		42,0 (14,0-72,7) ^{aA_α}	56,1 (31,7-73,3) ^{aAB_α}	65,6(22,6-75,8) ^{aB_α}	67,9(39,7-77,7) ^{aB_α}
	150	41,2(11,7)	50,6(13,9)	44,5(9,9)	57,4(20,9)
		40,8 (23,3-60,1) ^{aA_α}	50,9 (27,5-71,3) ^{aAB_α}	48,3(30,7-55,5) ^{aAB_α}	62,9(16,9-80,0) ^{aB_α}
	25	70,3(22,9)	66,7(22,8)	61,0(24,2)	75,0(23,1)
		78,2 (30,5-95,2) ^{aA_α}	72,3 (32,8-94,4) ^{aA_α}	59,7 (18,1-93,5) ^{aA_α}	86,5 (33,6-94,1) ^{aA_α}
Sham	50	63,0(24,8)	69,3(19,9)	66,6(20,2)	75,6(19,0)
		63,9 (23,1-94,6) ^{aA_α}	76,4 (32,6-89,2) ^{aA_α}	73,3 (25,6-85,2) ^{aA_α}	80,2 (31,6-92,4) ^{aA_α}
	100	65,2(19,5)	60,9(21,4)	67,1(22,0)	71,5(17,4)
		67,2 (30,4-89,0) ^{aA_α}	62,6 (25,3-90,4) ^{aA_α}	72,1 (16,2-87,4) ^{aA_α}	80,5 (34,4-82,4) ^{aA_α}
	150	56,3(19,7)	54,5(23,5)	53,6(22,2)	60,2(19,0)
		53,3 (21,2-79,9) ^{aA_α}	60,9 (9,0-77,2) ^{aA_α}	63,4 (3,8-70,1) ^{aA_α}	64,4 (19,4-81,4) ^{aA_α}

Tabela 3 Média (desvio padrão) e Mediana (mínimo e máximo) da variável % de PPI segundo grupo, momento da avaliação e ISI. Duas medianas seguidas de letras minúsculas distintas diferem quanto os respectivos grupos, fixado o momento e ISI ($p < 0,05$). Duas medianas seguidas de letras maiúsculas distintas diferem quanto os respectivos momentos, fixado o grupo e ISI ($p < 0,05$). Duas medianas seguidas de letras gregas distintas diferem quanto os respectivos ISI, fixado o grupo e momento ($p < 0,05$).

A análise da densidade dos neurônios imunorreativos a proteína Fos nos núcleos cocleares e suas subdivisões dorsal e ventral (respectivamente DCN e VCN) indicou que no grupo lesão, o DCN apresentou densidade neuronal média de $4,414 \times 10^{-8}$ neurônios/ μ^2 ($\pm 0,4209$) e o VCN apresentou densidade neuronal média de $2,734 \times 10^{-8}$ neurônios/ μ^2 ($\pm 0,3937$). No grupo controle, o DCN apresentou densidade neuronal média de $4,957 \times 10^{-8}$ neurônios/ μ^2 ($\pm 0,3864$) e o VCN apresentou densidade neuronal média de $1,923 \times 10^{-8}$ neurônios/ μ^2 ($\pm 0,3994$). Após verificar que os dados possuem distribuição normal, foi realizado um teste t não pareado para comparação das médias de densidade neuronal do DCN e do VCN entre os grupos controle e lesão (Figuras 43 e 44), o que indicou ausência de diferenças estatisticamente significativas (valor de $P < 0,05$, Apêndice D).

Este resultado indica que o grupo submetido a cirurgia estereotóxica e lesão da região do A5, quando comparado a um grupo que não passou por nenhum tratamento (controle), não apresentou diferença estatística na funcionalidade nos primeiros núcleos da via auditiva detectada pela densidade neuronal de células imunorreativas a proteína Fos. Este resultado sugere que a fixação do animal ao aparelho estereotático nos animais lesão, não afetou sua capacidade auditiva.

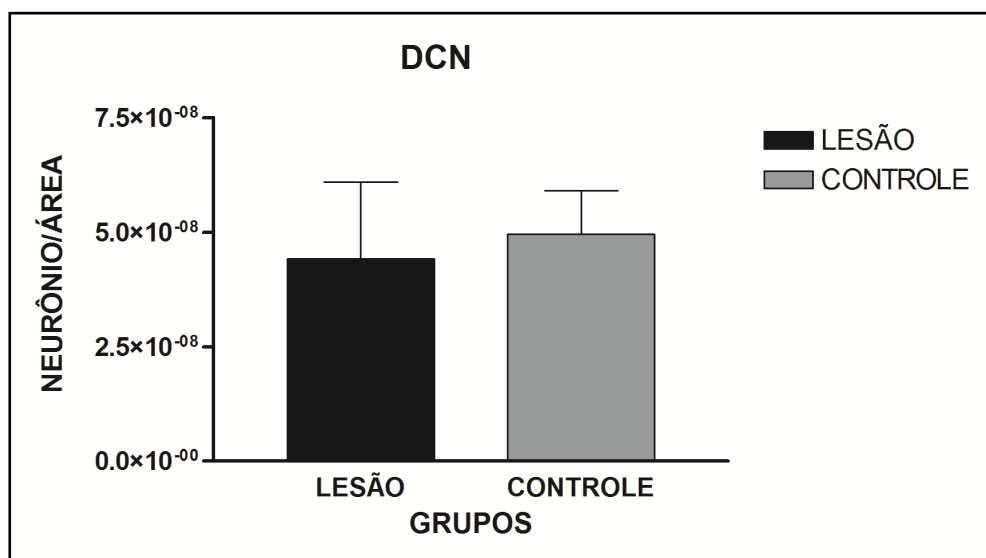


Figura 43 Densidade neuronal média e desvio padrão dos somas imunorreativos a proteína Fos no DCN, nos grupos lesão e controle. Os valores estão expressos em neurônios/ μ^2 .

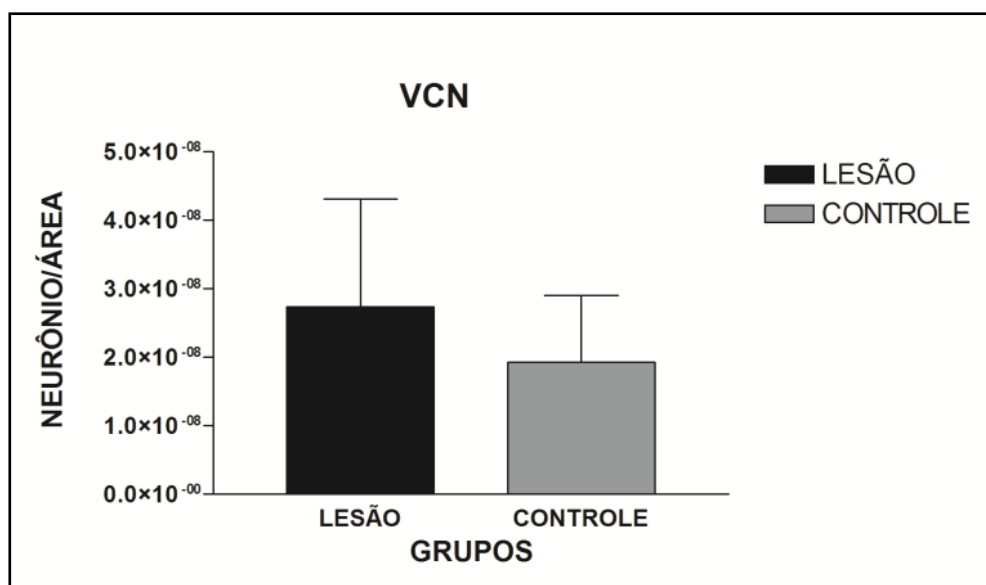


Figura 44 Densidade neuronal média e desvio padrão dos somas imunorreativos a proteína Fos no VCN, nos grupos lesão e controle. Os valores estão expressos em neurônios/ μ^2 .

5 DISCUSSÃO

5.1 Considerações Metodológicas

Em nosso estudo sobre o mapeamento das conexões do circuito elementar do reflexo auditivo de sobressalto utilizamos protocolos para traçadores neuronais (anterógrados e retrógrados), técnica muno-histoquímica para identificar a neuroquímica dos núcleos aferentes a este circuito bem como lesão desses núcleos com neurotóxico para comprovar a sua participação no RAS e na PPI.

O traçador retrógrado utilizado em todos os experimentos de conexão aferente foi o Fluoro-Gold (FG). Autores como (SCHMUED e FALLON, 1986) descreveram as principais características deste traçador: (1) intensa autofluorescência, (2) extenso carregamento por dendritos, (3) alta resistência de sua fluorescência, (4) baixa captação por fibras de passagem intactas, (5) não gera marcação inespecífica, (6) encontrado comercialmente na forma consistente e pura, (7) alta permanência de marcação por longos períodos de experimento e (8) compatibilidade com outras técnicas de imuno-histoquímica. Especula-se, ainda, que o FG talvez não seja captado por fibras de passagem intactas visto à baixa afinidade de seus componentes por fibras mielinizadas (WESSENDORF, 1991). A injeção de FG pode ocorrer de duas formas: por pressão ou iontoforese. Neste estudo o FG foi injetado por iontoforese, o que resulta em um o sítio de injeção que pode ser alterado por dois fatores: o tempo de injeção e a voltagem utilizada. A análise do local de injeção de FG através da microscopia com luz ultravioleta (banda de 340 a 380 nm) permite visualizar uma pequena esfera com intensa luz fluorescente, sendo o sítio da injeção muito pequeno e circundado por um halo brilhante que é captado tanto por neurônios quanto por células da glia (SCHMUED et al., 1989; SCHMUED e HEIMER, 1990). Apesar do FG produzir um halo de difusão admite-se que apenas o sítio de injeção, ou seja, o local onde houve depósito do traçador é capaz de ser captado. Ainda quando comparado com outros traçadores o FG se apresenta como o mais estável (NOVIKOVA et al., 1997).

Nossos resultados de injeção de FG nos neurônios da raiz coclear (CRN), área noradrenérgica A5, núcleo reticular caudal da ponte (PnC) e núcleo dorsal da rafe (DR) demonstraram que todos os casos injetados atingiram a área de interesse, porém, não podemos deixar de destacar que sítios vizinhos poderiam ter sido contaminados pelo halo produzido pelo FG em especial o A5 e CRN que são áreas localizadas em regiões com abundância de feixes nervosos ao redor. Para sanar possíveis dúvidas quanto a contaminação do sítio de injeção foi realizada uma análise comparativa de acordo com cada caso para distinguir os resultados reais dos falsos positivos. No caso da injeção de FG no A5 (Apêndice C) verificamos que as áreas próximas como o núcleo do nervo facial (7N), núcleo lateral superior (LSO)

e trato rubro espinal (rs) foram contaminados pelo halo do FG. Com respeito aos casos de injeção no A5 com contaminação do LSO foram encontrados células FG-ir no córtex externo do colículo inferior (ECIC), núcleo coclear ventral (VCN), núcleo ventral do lemnisco lateral (VLL) e núcleo do corpo trapezóide (Tz), lembrando que todas estas áreas estão envolvidas com a via auditiva e se projetam para o LSO (HARRISON e IRVING, 1966; SPANGLER et al., 1987; SAINT MARIE e BAKER, 1990; LOFTUS et al., 2004; MALMIERCA e MERCHÁN, 2004), porém o núcleo coclear dorsal (DCN) apareceu marcado em casos com contaminação e não contaminados o que sugere uma real projeção deste núcleo ao A5. Por outro lado, embora tenham sido encontrados somas retrogradamente marcados no núcleo rubro e no núcleo motor do nervo facial de forma consistente sabe-se que este resultado se deve à difusão do traçador para o rs e para a raiz descendente do nervo facial que estão nas adjacências do A5. Nos casos de injeção no CRN e A5 que demonstraram contaminação, verificamos células retrogradamente marcadas em núcleos pré-cerebelares como núcleo pontino (Pn), núcleo reticular tegmental da ponte (RtTg), complexo olivar inferior (IO), núcleo reticular lateral (LRt) e em todos núcleos pré-cerebelares que se projetam fortemente para o córtex cerebelar (LEGG et al., 1989; SCHWARZ e THIER, 1996; RUIGROK, 2004) o que difere dos casos sem contaminação do córtex cerebelar.

Os traçadores anterógrados são utilizados como marcadores de vias neurais a mais de três décadas, sendo um dos mais antigos o Germe Aglutinado do Trigo conjugado com a peroxidase do rábano silvestre (WGA-HRP), que é visualizado por meio de uma reação com tetrametilbenzidina. Outro traçador anterógrado muito utilizado em ratos é a lectina da planta *Phaseolus Vulgaris* leucoagglutinin (PHAL) que apresenta boa difusão no tecido sendo pouco captado por fibras de passagem (GERFEN e SAWCHENKO, 1984; BRANDT e APKARIAN, 1992). Neste mesmo caminho surgiram as biotinas, as quais até o momento não possuem seu mecanismo de ação bem esclarecido. Estas podem ser conjugadas com elementos fluorescentes, como a tetrametilrodamina, resultando em um traçador anterógrado autofluorescente. Entretanto, devido seu curto tempo de fluorescência as análises longas são dificultadas quanto se utiliza este tipo de traçador (SCHMUED e HEIMER, 1990; BRANDT e APKARIAN, 1992). O BDA (amino dextrana biotinilada) faz parte do grupo de traçadores anterógrados biotinilados que podem ser visualizados através da reação com diaminobenzidina (DAB), resultando em uma sensível e permanente marcação que revela a fina morfologia de terminais anterógrados. Muitos autores estudaram a eficácia do BDA como um traçador anterógrado (BRANDT e APKARIAN, 1992; VEENMAN et al., 1992) e comprovaram eficácia equivalente do BDA com o PHAL (DOLLEMAN-VAN DER WEEL et al., 1994; NOVIKOV, 2001). Apesar do BDA ser um ótimo traçador todos os autores concordam com uma única desvantagem: capacidade de marcar neurônios retrogradamente. Este fato ocorre pois o BDA pode ser absorvido por fibras de passagem lesionadas durante a injeção (iontoforese ou

pressão) porém não sendo captado por fibras de passagem intactas (VEENMAN et al., 1992). Essa característica do BDA faz com que alguns grupos de pesquisa também o utilizem para mapeamento retrógrado (REINER et al., 2000; GOMEZ-NIETO et al., 2013). Em nosso trabalho utilizamos o BDA como um traçador anterógrado para comprovar algumas conexões após os experimentos com traçador retrógrado FG.

Com respeito aos experimentos de lesão seletiva, cabe aqui algumas considerações sobre a 6-hidroxidopamina (6-OHDA). A 6-OHDA é uma monoamina citotóxica que possui afinidade a neurônios e axônios catecolaminérgicos sendo muito utilizada em estudos que analisam sintomas unilaterais ou bilaterais de doenças neurodegenerativas como o Parkinson (PERESE et al., 1989; LANNES et al., 1991; THOMAS et al., 1994), em estudos de déficits de atenção (CROSS et al., 1978), déficits de memória por lesão seletiva no hipocampo (FORNEY e KLEMM, 1983) e estudos sobre o controle da pressão arterial por centros catecolaminérgicos (KAWAHARA et al., 1999). A 6-OHDA ainda pode ser utilizada de forma sistêmica incapacitando a medula adrenal e assim diminuindo a ação da noradrenalina periférica (KEHNE e DAVIS, 1985). Estudos de lesão do LC de ratos com 6-OHDA foram realizados para mensurar as funções deste núcleo na memória (KOSTOWSKI, 1985) e no RAS (ADAMS e GEYER, 1981). Outros estudos também utilizaram a 6-OHDA para lesionar a área noradrenérgica A5 de coelho (WOODRUFF et al., 1986a) e outras áreas noradrenérgicas como a C1/A1 (GRANATA et al., 1986) demonstrando um amplo espectro de utilização da 6-OHDA para lesão de centros catecolaminérgicos e noradrenérgicos.

5.2 Considerações Neuroanatômicas e Funcionais

O núcleo dorsal da rafe (DR), localizado na linha mediana do tronco encefálico, é um dos grandes sítios serotoninérgicos do sistema nervoso central sendo a serotonina (5-HT) um neuromodulador implicado em diversas funções sensoriais, motoras e endócrinas (JACOBS e AZMITIA, 1992; AZMITIA, 1999;2007; DALLEY e ROISER, 2012; MIYAZAKI et al., 2012; SGHENDO e MIFSUD, 2012; TRAKHTENBERG e GOLDBERG, 2012).

O DR apresenta amplas conexões com o sistema nervoso central enviando eferências para áreas corticais, subcorticais, núcleos diencefálicos, regiões do tronco encefálico e outros núcleos da rafe como o mediano e magno da rafe (VERTES, 1991). Além disso, o DR recebe aferências de muitas áreas corticais e subcorticais (amígdala, núcleos da base, região septal e estria terminal) e regiões diencefálicas (área préptica, área hipotalâmica anterior, epítalamo e subtalamo)(PEYRON et al., 1998; ABRAMS et al., 2004; GONÇALVES et al., 2009). Com relação a áreas noradrenérgicas do tronco encefálico o DR estabelece comunicação eferente com o A5 e o LC (PEYRON et al., 1996; SAMUELS e SZABADI, 2008). Com respeito a conexão eferente entre o DR e o A5 foi comprovado em nossos resul-

tados de injeção de traçador anterógrado e retrógrado e não havia sido descrito na literatura em ratos. Devido ao padrão de conectividade do DR ter sido bem estudado, não fizemos um mapeamento de todas as eferências e aferências, focamos nossos resultados nas nossas áreas de interesse. Além da vasta conexão com o sistema nervoso, o DR também é implicado em manifestações de desordens psiquiátricas, especialmente ansiedade e depressão. Trabalhos anatômicos e eletrofisiológicos revelam que cerca de metade dos neurônios do DR são serotoninérgicos e a outra metade apresenta características neuroquímicas como dopamina, óxido nítrico, GABA, glutamato e vários neuropeptídeos como o CART (VASUDEVA et al., 2011). É verificado que a parte não serotoninérgica do DR está envolvida na resposta ao estresse (PEYRON et al., 1996; PEYRON et al., 1998; VASUDEVA et al., 2011). Com relação ao papel da porção serotoninérgica é verificado a diminuição da PPI em experimentos que provocaram a diminuição da neurotransmissão serotoninérgica através da infusão intraperitoneal de agonistas do autorreceptor 5HT1a como a 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetraline (8-OH-DPAT), 5-methoxy dimethyltryptamina (5-MeO-DMT), buspirona, gepirona e ipsapirona (RIGDON e WEATHERSPOON, 1992) ou com infusão de 8-OH-DPAT diretamente nos núcleos mediano da rafe (MnR) e dorsal da rafe (DR) (SIPES e GEYER, 1995). Um efeito semelhante na diminuição da PPI também foi observado com a infusão do neurotóxico 5,7-dihydroxytryptamina (5,7-DHT) nos núcleos DR e MnR (FLETCHER et al., 2001; KUSLJIC et al., 2003) ou somente no DR (GOGOS et al., 2005). As lesões seletivas no MnR diminuem a PPI enquanto as lesões no DR estão relacionadas com diminuição da PPI apenas nos pré-pulsos de grande intensidade levando ao aumento da amplitude do RAS (KUSLJIC et al., 2003), o que sugere a existência de diferenças funcionais de acordo o destino das projeções serotoninérgicas (MAMOUNAS et al., 1991). Isso é justificado pois lesão de fibras serotoninérgicas na amígdala basolateral resultam em aumento dos receptores de glutamato gerando uma potencialização do RAS pelo medo (TRAN et al., 2013), o mesmo aumento dos receptores de glutamato poderia ocorrer se houvesse lesão em fibras serotoninérgicas do DR nos núcleos do RAS (KUSLJIC et al., 2003). Outro aspecto interessante do papel da serotonina é que em quadros de lesão neonatal de áreas serotoninérgicas não há alteração na PPI, tornando evidente que a serotonina participa da modulação do RAS e da PPI porém não demonstra ser é um elemento essencial para o seu desencadeamento (KOLOMANSKA et al., 2011).

Nossos resultados hodológicos comprovam os resultados funcionais da participação do DR na via do RAS uma vez que verificamos terminais imunorreativos a 5-HT colocalizado com fibras anterógradas do DR no CRN e PnC, além disso confirmamos que o PnC se projeta para o DR por meio de injeção de traçador anterógrado no PnC, este resultado também não havia sido descrito na literatura e retrógrado no DR. Porém, alguns terminais do DR não possuíam colocalização com 5-HT sugerindo uma possível participação de ou-

tros neuromediadores localizados no DR como o CART (KOYLU et al., 1998). Da mesma forma encontramos terminais serotoninérgicos não colocalizados com fibras BDA vinda do DR sugerindo a participação de outras áreas serotoninérgicas no circuito do RAS.

Entre outras áreas serotoninérgicas destacamos o núcleo paragigantocelular lateral (LPGi) (JACOBS e AZMITIA, 1992) que apresentou algumas células retrogradamente em nossos resultados de aferência para o CRN. Este núcleo mantém conexão com áreas prosencefálicas como córtex infra-límbico (ISHIKAWA et al., 2001) e áreas auditivas como núcleos cocleares (KANDLER e HERBERT, 1991; BELLINTANI-GUARDIA et al., 1996), cólículo inferior (VAN BOCKSTAELE et al., 1989) além de núcleos que influenciam diretamente o CRN como o Locus Coeruleus e A5 (GUYENET e YOUNG, 1987; VAN BOCKSTAELE et al., 1989; VAN BOCKSTAELE et al., 1993). Ainda é destacado que o LPGi recebe informação do CRN (LÓPEZ et al., 1999) o que sugere a possibilidade desta região estar envolvida com o circuito elementar do RAS e PPI (estudos em nosso laboratório estão sendo conduzidos a fim de demonstrar este resultado).

O RAS em sua etiologia apresenta um componente ligado ao sistema nervoso autônomo (SNA) representado pelo aumento da pressão arterial e dos batimentos cardíacos, este efeito pode ocorrer uma vez que o reflexo estimula muitas vias de ação simpática e parassimpática (BAUDRIE et al., 1997). Fatores genéticos também podem contribuir para a modulação da resposta autônoma frente o sobressalto, como por exemplo ratos normotensos como o Fischer 344 (F344) e Wistar Kyoto (WKY) exibem diminuição da pressão arterial e batimentos cardíacos frente ao reflexo quando comparado com outras cepas (BAUDRIE et al., 2001). O mesmo ocorre quando é utilizado o fármaco benzodiazepínico inverso, FG 7142, que melhora a resposta cardiovascular de animais em testes de sobressalto, além de diminuir a PPI e aumentar a latência do sobressalto em comparação com controle (BERNTSON et al., 1997).

Durante o RAS ocorre ativação de áreas noradrenérgicas localizadas no bulbo ventrolateral que estariam proporcionando este reflexo autônomo (BAUDRIE et al., 1997). A área noradrenérgica A5 é formada por um pequeno grupo de neurônios que estão localizados na medula ventrolateral da ponte medialmente a raiz descendente do nervo facial, imediatamente dorsal ao rs e dorsolateralmente ao núcleo lateral superior da oliva (LSO), ao nível dos seus terços médio e caudal (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964). As células acompanham o trajeto do rs até a altura da raiz do nervo trigêmeo, região descrita como junção ponto-mesencefálica (UNGERSTEDT, 1971). O A5 em ratos possui extensão rostro-caudal de aproximadamente 1,9mm (JACOBOWITZ e PALKOVITS, 1974). Por se tratar de uma área da formação reticular, seus limites citoarquitetônicos estão mal definidos em secções histológicas coradas pela técnica de Nissl porém sua extensão e área de abrangência podem ser melhor evidenciadas com protocolos imuno-histoquímicos para as enzimas precursoras de

seu principal elemento neuroquímico, a noradrenalina. Durante muitos anos o A5 foi implicada como uma área responsável pela modulação do SNA através do controle dos batimentos cardíacos e controle da pressão arterial tanto em ratos (LOEWY et al., 1979a; BYRUM et al., 1984), quanto em coelhos (WOODRUFF et al., 1986a). A primeira descrição das prováveis conexões do A5 no sistema nervoso central foi realizada por meio de experimentos de lesão eletrolítica, nos quais foi constatada uma diminuição da noradrenalina em áreas proencefálicas e telencefálicas (SPECIALE et al., 1978). Posteriormente foram realizados vários estudos hodológicos nesta área, relacionando-a com a coluna de células intermediolateral da medula espinal e formação reticular rostroventrolateral do bulbo, o que sugeriu uma ação moduladora sobre o sistema nervoso autônomo (LOEWY et al., 1979b; WESTLUND et al., 1983; BYRUM et al., 1984; CLARK e PROUDFIT, 1993; BRUINSTROOP et al., 2012). Sua hodologia foi também estudada em coelho com traçadores como o WGA-HRP (WOODRUFF et al., 1986b), identificando aferências provenientes das áreas noradrenérgicas A1, A2 e A6 (LC), núcleos serotoninérgicos como o dorsal da rafe (DR) e regiões associadas ao sistema nervoso autônomo (núcleos parabraquiais, núcleo do trato solitário, núcleo motor do vago, núcleo paraventricular do hipotálamo, região perifornical), área hipotalâmica lateral e núcleos associados a vias sensitivas (núcleos vestibulares, cocleares, oliva superior e núcleos trigeminais). Utilizando a mesma metodologia, porém em ratos, as aferências do A5 foram descritas para regiões do tronco encefálico, hipotálamo, tálamo, subtálamo e núcleos amigdalóides (BYRUM e GUYENET, 1987). Posteriormente outras aferências foram confirmadas na formação reticular rostroventrolateral do bulbo (TAVARES et al., 1997; COBOS et al., 2003; SUN e PANNETON, 2005), núcleos cocleares (KLEPPER e HERBERT, 1991), área cinzenta periaquedutal (BAJIC e PROUDFIT, 1999; BAJIC et al., 2012), complexo olivar superior (MULDERS e ROBERTSON, 2001), área tegmental ventral (MEJIAS-APONTE et al., 2009), núcleo paraventricular do hipotálamo (STRACK et al., 1989; HOSOYA et al., 1990; GEERLING et al., 2010) e núcleos amigdalóides (WALLACE et al., 1992).

Nossos resultados hodológicos referente as projeções anterógradas do A5 corroboram com a literatura. Desta forma, encontramos fibras marcadas com BDA no núcleo rostral ventrolateral (RVL), núcleos parabraquiais (PB) e núcleo do trato solitário (NTS) que estão funcionalmente implicados no controle autônomo (CLARK e PROUDFIT, 1993; SUN e PANNETON, 2005; CARRIVE e GORISSEN, 2008; TAXINI et al., 2011). Observamos também fibras marcadas na formação reticular pontina como no núcleo medular dorsal (MdD) implicado na analgesia (LEITE-ALMEIDA et al., 2006), na substância cinzenta periaquedutal em especial suas divisões ventrolateral (VLPAG) e lateral (LPAG) e no núcleo de Killiker-Fuse (KF). Estes resultados também corroboram com descrições hodológicas que descreveram de forma sistemática as aferências e eferências do A5 (BYRUM e GUYENET, 1987).

Além da participação nas funções autonômicas tem sido constatado que o A5 participa ativamente em vias de resposta ao medo (PEZZONE et al., 1992; CARRIVE e GORISSEN, 2008; VIANNA e CARRIVE, 2010) (VIANNA e CARRIVE, 2010) devido sua comunicação com hipotálamo (HOSOYA et al., 1990) e amígdala (USUNOFF et al., 2006), além de participar na nocicepção (CLARK e PROUDFIT, 1993; BAJIC e PROUDFIT, 1999; BAJIC et al., 2012) e no sono do tipo REM (FENIK et al., 2012). Estes dados sugerem a possibilidade de outras funções não-autonômicas para o A5. Em nossos resultados é nítido que hodologicamente o A5 se projeta para os CRN e o PnC com características neuroquímicas próprias como noradrenalina e CART, assim como o PnC se projeta para o A5 e destacamos que esta reciprocidade com o PnC ainda não havia sido descrita na literatura. Com respeito a aferências de núcleos auditivos como DCN e CI (Apêndice B), nossos resultados ainda são iniciais e não existe na literatura algo que colabore com estes dados hodológicos. Até o momento podemos descrever que estes resultados do A5 colaboram com estudos anteriores que já relatavam a participação de áreas noradrenérgicas, especificamente o Locus Coeruleus, no circuito do RAS (GOMEZ-NIETO et al., 2008a; HORMIGO et al., 2014a).

A noradrenalina é um neurotransmissor implicado nas mais variadas funções como endócrinas (MOORE e BLOOM, 1978;1979), ativação do prosencéfalo (SAWCHENKO e SWANSON, 1982; EBERT, 1996; BERRIDGE e WATERHOUSE, 2003; SAMUELS e SZABADI, 2008), vias relacionadas ao humor e suas patologias (STONE et al., 2011), consumo de drogas (CHRISTIE et al., 1997) e neurogênese (MARIEN et al., 2004). A noradrenalina também participa de vias sensoriais, (MULDERS e ROBERTSON, 2005) descreveram que após sua injeção ICV em porquinho-da-índia houve efeito excitatório sobre a cóclea, demonstrando *in vivo* a forma indireta na qual a noradrenalina modula estímulos auditivos. Em nossos resultados observamos que além de fibras oriundas do A5 para o CRN e PnC (Apêndice C) há também fibras do A5 nos núcleos do complexo olivar superior (cos) (LSO, VNTB, MNTB, TZ). Isso sugere uma outra fonte de modulação, possivelmente noradrenérgica ou peptidérgica do A5 sobre o cos. Uma vez da existência de terminais noradrenérgicos no cos e nos núcleos cocleares, fica evidente que este neurotransmissor está envolvido com modulações do RAS e da PPI. Estudos verificaram que a deficiência de noradrenalina resulta em alterações comportamentais incluindo o RAS (VERLEYE e BERNET, 1983). Outros trabalhos observaram que após aplicação de noradrenalina em regiões da estria terminal e da amígdala e canalizando o comportamento do animal através de paradigmas de medo e RAS resultou no aumento do RAS que só foi amenizado com inibidores da noradrenalina (FENDT et al., 1994; SCHWEIMER et al., 2005; KANAI et al., 2007). Os autores indicam que a comunicação entre estria terminal, amígdala e PnC seria o responsável por este comportamento, corroborando com outros trabalhos que destacam esta via como moduladora do sobressalto (KOCH e SCHNITZLER, 1997; KOCH, 1999). Além disso a

existência de terminais noradrenérgicos e a presença dos receptores $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ foi verificada em outros territórios do RAS como o CRN (LÓPEZ et al., 1999; GOMEZ-NIETO et al., 2008a) colaboram com a participação da noradrenalina como moduladora do RAS e PPI.

Com relação ao CART os trabalhos sobre o mapeamento e distribuição desse neuropeptídeo no sistema nervoso central relatam sua presença em terminais e neurônios do LC, DR e A5 (KOYLU et al., 1998), porém não é descrita a presença de CART em núcleos auditivos como os cocleares e colículo inferior (CI). Em nossos resultados encontramos a presença de terminais imunorreativos ao CART tanto nos núcleos cocleares quanto na raiz coclear. Nesta última região as fibras estão dispostas na parte proximal e distal em adjacência aos somas ou aos dendritos dos CRN. Alguns terminais foram encontrados muito próximos aos aferentes primários oriundos da cóclea. Resultados idênticos foram encontrados no PnC no qual os terminais estão de forma difusa e próximos aos neurônios da formação reticular. Vale a pena mencionar que em outros trabalhos é descrito que o CART está colocalizado em quase 90% com neurônios noradrenérgicos do A5 (BURMAN et al., 2004). Nossos resultados de imuno-histoquímica comprovaram a existência de colocalização de neurônios CART com DBH no A5, assim como neurônios retrogradamente marcados, após injeção de FG no CRN, apresentaram colocalização com CART (FG+ CART) ou DBH (FG+DBH), apesar disto não conseguimos encontrar células triplamente marcadas (FG+DBH+CART). Em nossa metodologia para mapear estes neurônios nós utilizamos imagens do mesmo caso, porém de séries diferentes, uma das séries com imuno-histoquímica fluorescente para DBH e FG, e outra com imuno-histoquímica fluorescente para CART e autofluorescência do FG, após as fotos as imagens foram sobrepostas, desta forma não havia possibilidade de termos os três elementos em um único corte, com isso, perdendo assim algumas células que poderiam estar triplamente marcadas, outro fato é própria autofluorescência do FG que não nos favoreceu, porém nossos resultados de BDA no A5 mostram que o local de injeção atingiu células tanto DBH quanto CART e fibras BDA triplamente marcadas no CRN e PnC.

Com respeito as implicações funcionais descritas sobre este peptídeo, podemos relatar que o CART tem sido implicado em efeitos ansiogênicos, hiperálgicos e regulação autônoma (BANNON et al., 2001; ELIAS et al., 2001). Em estudos com injeção de duas variantes do CART no sistema nervoso central (CART 42-89, CART 49-89) constatou-se que após 30 minutos da infusão do CART 42-89 houve diminuição do RAS em doses progressivas (0,1mg e 0,5mg) mas não alterou significativamente a PPI, enquanto que o CART 49-89 não alterou o sobressalto, porém aumentou a PPI (BANNON et al., 2001). Os autores discutem a possibilidade do CART inibir o RAS e aumentar a PPI por estar presente em áreas que modulam a PPI como área tegmental ventral, núcleo accumbens e pálido ventral (SWERDLOW

et al., 1990; SWERDLOW e GEYER, 1993b). Em nossos resultados verificamos uma possível modulação direta do CART oriunda do A5 sobre o CRN e o PnC uma vez que encontramos terminais BDA que estão marcados com o CART e o DBH. Além disso no PnC também visualizamos fibras BDA oriundas do A5 imunorreativas ao CART.

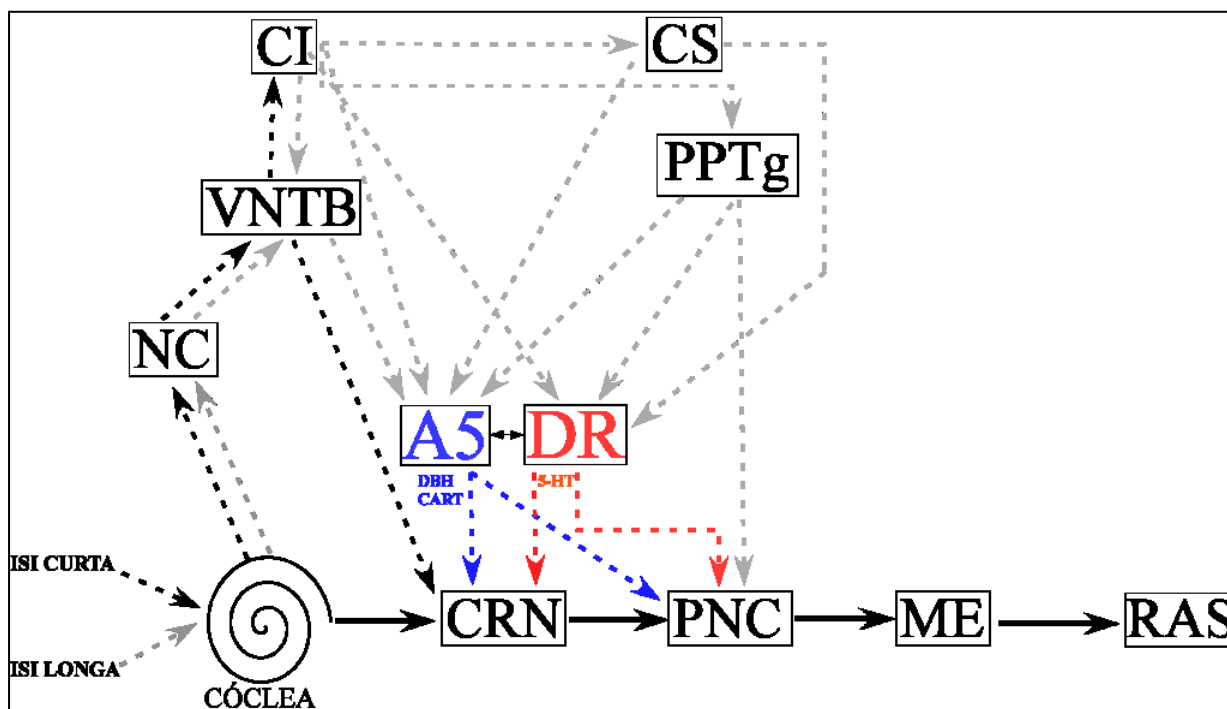


Figura 45 Resumo da participação do A5 e do DR na modulação do RAS por meio de sua intervenção nas vias de ISI longa. Abreviaturas: vide lista de abreviaturas.

Em nossos resultados hodológicos do A5 observamos que esta área possivelmente recebe informação de núcleos que participam da modulação do RAS e da PPI (PPTg, CI, DCN, DR, PnC e VNTB). A PPI é caracterizada pela diminuição da amplitude do RAS quando o estímulo sonoro desencadeante é precedido por um estímulo de menor intensidade. A PPI apresenta duas vias auditivas principais, que segundo GOMEZ-NIETO et al. (2013) são uma via neural curta para intervalos entre estímulos curtos (isi-curta, ex: 25 e 50 milissegundos) no qual após o estímulo auditivo ativa o CRN através dos aferentes cocleares que por sua vez estimulam os neurônios do PnC e os motoneurônios da medula espinal. Ao mesmo tempo a informação auditiva estimula os núcleos cocleares que passam essa informação ao núcleo ventral do corpo trapezoidal (VNTB) e colículo inferior (CI) que retorna esta informação ao VNTB que por meio de ação colinérgica inibe os CRN (GOMEZ-NIETO et al., 2008b). A via auditiva longa ocorre nos intervalos entre estímulos longos (isi-longos, ex: 100 e 150 milissegundos) na qual o CI é estimulado pelos cocleares que por sua vez estimula tanto o colículo superior quanto o núcleo colinérgico pedunculo pontino (PPTg). Esta via promove inibição do PnC e assim modula o sobressalto e é chamada de via longa pois possui uma cadeia maior de núcleos para ocorrer (FENDT et al., 2001). Para compreender o

papel funcional do A5 no RAS e na PPI realizamos lesão do A5 e verificamos em provas comportamentais que houve aumento da PPI e consequentemente diminuição RAS após o 14º dia de lesão do A5, porém somente na via longa (isi longa de 100 e 150 milissegundos). Estes resultados nos sugerem que a queda da noradrenalina ou do CART oriunda do A5 deixou de inibir alguma via que estaria modulando a PPI, tanto sobre os CRN quanto no PnC. Além disso, como verificado em nossos resultados hodológicos temos que o A5 se projeta para CRN, PnC e DR, assim como o DR para o CRN, A5 e PnC, e o PnC para o A5 e DR. Podemos ainda citar que o A5 provavelmente recebe projeção, além do DR e PnC, do CI, PPTg e VNTB, núcleos que como vimos estão ligados diretamente com os circuitos neurais da PPI. Isso reforça o possível papel do A5 sobre uma via mais longa da PPI (figura 54).

Outro elemento que faz parte do circuito do RAS é a medula espinal (ME). A ME é um centro integrador de funções sensoriais e motoras. Sua participação no RAS aparece no final da via para desencadear a informação motora oriunda do PnC, ativando os motoneurônios do corno ventral (LEE et al., 1996; KOCH, 1999). Terminais monoaminérgicos estão presentes no corno ventral de vários níveis da ME (DAHLSTRÖM e FUXE, 1965). Especificamente a noradrenalina foi relatada em ratos (WESTLUND et al., 1983; MOUCHET et al., 1992) e em macacos (WESTLUND et al., 1984). A serotonina também foi alvo de estudos, estando a distribuição de seus terminais no corno ventral de ratos (WHITE, 1985; JACOBS e AZMITIA, 1992), juntamente com outros elementos neuroquímicos como a substância P (WESSENDORF e ELDE, 1987). Estudos hodológicos demonstraram que o corno ventral da ME recebe informação direta de áreas noradrenérgicas como o Locus Coeruleus (LC) e A5 (NYGREN e OLSON, 1977; FRITSCHY et al., 1987; BRUINSTROOP et al., 2012) e de centros serotoninérgicos como o núcleo dorsal da rafe (DR) (ALLEN e CECETTO, 1994) demonstrando que o corno ventral da ME possa participar das integrações motoras que desencadeiam o RAS.

6 CONCLUSÕES

Nosso trabalho permite concluir que:

- 1) Os CRN e a parte ventrolateral do PnC recebem aferências noradrenérgicas e CART-érgicas do A5 e aferências serotoninérgicas do DR.
- 2) Existem conexões recíprocas entre o PnC, o DR e o A5.
- 3) A lesão bilateral do A5 provoca aumento da porcentagem da PPI desencadeada com ISIs longos, indicando que este núcleo pode participar na modulação do RAS.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, J. K.; JOHNSON, P. L.; HOLLIS, J. H.; LOWRY, C. A. Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1018, p. 46-57, 2004.
- ADAMS, L. M.; GEYER, M. A. Effects of 6-hydroxydopamine lesions of locus coeruleus on startle in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 73, p. 394-398, 1981.
- AITKIN, L. The auditory neurobiology of marsupials: A review. **Hear Res**, v. 82, p. 257-66, 1995.
- ALLEN, G. V.; CECETTO, D. F. Serotonergic and nonserotonergic neurons in the medullary raphe system have axon collateral projections to autonomic and somatic cell groups in the medulla and spinal cord. **J Comp Neurol**, v. 350, p. 357-66, 1994.
- ALMADA, R. C.; BORELLI, K. G.; ALBRECHET-SOUSA, L.; BRANDAO, M. L. Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus-dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. **Behav Brain Res**, v. 203, p. 279-87, 2009.
- AMIN, A. H.; CRAWFORD, T. B.; GADDUM, J. H. The distribution of substance p and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. **J Physiol**, v. 126, p. 596-618, 1954.
- ANDRESKI, P.; CHILCOAT, H.; BRESLAU, N. Post-traumatic stress disorder and somatization symptoms: A prospective study. **Psychiatry Research**, v. 79, p. 131-138, 1998.
- ANGULO, A.; MERCHAN, J. A.; MERCHAN, M. A. Morphology of the rat cochlear primary afferents during prenatal development: A cajal's reduced silver and rapid golgi study. **J Anat**, v. 168, p. 241-55, 1990.
- ANISMAN, H.; KELLY, O.; HAYLEY, S.; BOROWSKI, T.; MERALI, Z.; MCINTYRE, D. C. Acoustic startle and fear-potentiated startle in rats selectively bred for fast and slow kindling rates: Relation to monoamine activity. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 4405-4416, 2000.
- AZMITIA, E. C. Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 33S-45S, 1999.
- AZMITIA, E. C. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain Res Bull**, v. 56, p. 413-24, 2001.
- AZMITIA, E. C. Serotonin and brain: Evolution, neuroplasticity, and homeostasis. **Int Rev Neurobiol**, v. 77, p. 31-56, 2007.
- AZMITIA, E. C.; SINGH, J. S.; HOU, X. P.; WEGIEL, J. Dystrophic serotonin axons in postmortem brains from young autism patients. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 294, p. 1653-62, 2011.
- BAISLEY, S. K.; CLONINGER, C. L.; BAKSHI, V. P. Fos expression following regimens of predator stress versus footshock that differentially affect prepulse inhibition in rats. **Physiol Behav**, v. 104, p. 796-803, 2011.
- BAJIC, D.; PROUDFIT, H. K. Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. **J Comp Neurol**, v. 405, p. 359-79, 1999.
- BAJIC, D.; VAN BOCKSTAELE, E. J.; PROUDFIT, H. K. Ultrastructural analysis of rat ventrolateral periaqueductal gray projections to the a5 cell group. **Neuroscience**, v. 224, p. 145-59, 2012.
- 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.

- BAKSHI, V. P.; SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A. Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of the startle response. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 271, p. 787-794, 1994.
- BALE, T. L. Stress sensitivity and the development of affective disorders. **Horm Behav**, v. 50, p. 529-33, 2006.
- BANNON, A. W.;SEDA, J.;CARMOUCHE, M.;FRANCIS, J. M.;JAROSINSKI, M. A.;DOUGLASS, J. 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.
- BARIONI, N. O. **Estudo hodológico das aferências ao primeiro núcleo do circuito neural do reflexo auditivo de sobressalto :Núcleo da raiz coclear.** (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/Botucatu, Botucatu-SP, 2012. 75 p.
- BAUDRIE, V.;LAUDE, D.;CHAOULOFF, F.;ELGHOZI, J. L. Genetic influences on cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 28, p. 1096-9, 2001.
- BAUDRIE, V.;TULEN, J. H.;BLANC, J.;ELGHOZI, J. L. 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.;RODD, Z. A.;HSU, C. C.;LUMENG, L.;MURPHY, J. M.;MCBRIDE, W. J. 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.
- BELLINTANI-GUARDIA, B.; SCHWEIZER, M.; HERBERT, H. Analysis of projections from the cochlear nucleus to the lateral paragigantocellular reticular nucleus in the rat. **Cell Tissue Res**, v. 283, p. 493-505, 1996.
- BERGER, M.; GRAY, J. A.; ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. **Annu Rev Med**, v. 60, p. 355-66, 2009.
- BERNTSON, G. G.; HART, S.; SARTER, M. The cardiovascular startle response: Anxiety and the benzodiazepine receptor complex. **Psychophysiology**, v. 34, p. 348-57, 1997.
- BERRIDGE, C. W.; WATERHOUSE, B. D. The locus coeruleus-noradrenergic system: Modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 42, p. 33-84, 2003.
- BJÖRKLUND, A.; FALCK, B.; STENEVI, U. Classification of monoamine neurones in the rat mesencephalon: Distribution of a new monoamine neurone system. **Brain Res**, v. 32, p. 269-85, 1971.
- BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T. Animal models of parkinson's disease. **FEBS J**, v. 279, p. 1156-66, 2012.
- 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.
- BRANDT, H. M.; APKARIAN, A. V. Biotin-dextran: A sensitive anterograde tracer for neuroanatomic studies in rat and monkey. **J Neurosci Methods**, v. 45, p. 35-40, 1992.
- BRAUER, D.;STROBEL, A.;HENSCH, T.;DIERS, K.;LESCH, K. P.;BROCKE, B. Genetic variation of serotonin receptor function affects prepulse inhibition of the startle. **J Neural Transm**, v. 116, p. 607-13, 2009.
- BROWN, P. Physiology of startle phenomena. **Adv Neurol**, v. 67, p. 273-87, 1995.

- BRUINSTROOP, E.;CANO, G.;VANDERHORST, V. G.;CAVALCANTE, J. C.;WIRTH, J.;SENA-ESTEVES, M.;SAPER, C. B. Spinal projections of the a5, a6 (locus coeruleus), and a7 noradrenergic cell groups in rats. **J Comp Neurol**, v. 520, p. 1985-2001, 2012.
- BURMAN, K. J.;SARTOR, D. M.;VERBERNE, A. J.;LLEWELLYN-SMITH, I. J. 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.
- BYRUM, C. E.; STORNETTA, R.; GUYENET, P. G. Electrophysiological properties of spinally-projecting a5 noradrenergic neurons. **Brain Res**, v. 303, p. 15-29, 1984.
- CARLSSON, A.; FALCK, B.; HILLARP, N. A. Cellular localization of brain monoamines. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 56, p. 1-28, 1962.
- CARRIVE, P.; GORISSEN, M. Premotor sympathetic neurons of conditioned fear in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 28, p. 428-46, 2008.
- CHANG, H. T.;KUO, H.;WHITTAKER, J. A.;COOPER, N. G. Light and electron microscopic analysis of projection neurons retrogradely labeled with fluoro-gold: Notes on the application of antibodies to fluoro-gold. **J Neurosci Methods**, v. 35, p. 31-7, 1990.
- CHRISTIE, M. J.;WILLIAMS, J. T.;OSBORNE, P. B.;BELLCHAMBERS, C. E. Where is the locus in opioid withdrawal? **Trends Pharmacol Sci**, v. 18, p. 134-40, 1997.
- CLARK, F. M.; PROUDFIT, H. K. The projections of noradrenergic neurons in the a5 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat: Anatomical evidence that a5 neurons modulate nociception. **Brain Res**, v. 616, p. 200-10, 1993.
- COBOS, A.;LIMA, D.;ALMEIDA, A.;TAVARES, I. Brain afferents to the lateral caudal ventrolateral medulla: A retrograde and anterograde tracing study in the rat. **Neuroscience**, v. 120, p. 485-98, 2003.
- CONTI, L. H. Interactions between corticotropin-releasing factor and the serotonin 1a receptor system on acoustic startle amplitude and prepulse inhibition of the startle response in two rat strains. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 256-63, 2012.
- COOK, E. W., 3RD;DAVIS, T. L.;HAWK, L. W.;SPENCE, E. L.;GAUTIER, C. H. Fearfulness and startle potentiation during aversive visual stimuli. **Psychophysiology**, v. 29, p. 633-45, 1992.
- COOLS, R.; NAKAMURA, K.; DAW, N. D. Serotonin and dopamine: Unifying affective, activational, and decision functions. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 98-113, 2011.
- CRANER, S. L.;HOFFMAN, G. E.;LUND, J. S.;HUMPHREY, A. L.;LUND, R. D. Cfos labeling in rat superior colliculus: Activation by normal retinal pathways and pathways from intracranial retinal transplants. **Exp Neurol**, v. 117, p. 219-29, 1992.
- CROSS, A. J.;CROW, T. J.;KILLPACK, W. S.;LONGDEN, A.;OWEN, F.;RILEY, G. J. The activities of brain dopamine-beta-hydroxylase and catechol-o-methyl transferase in schizophrenics and controls. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 59, p. 117-21, 1978.
- CURTIN, P. C.;MEDAN, V.;NEUMEISTER, H.;BRONSON, D. R.;PREUSS, T. The 5-HT_{5a} receptor regulates excitability in the auditory startle circuit: Functional implications for sensorimotor gating. **J Neurosci**, v. 33, p. 10011-20, 2013.

- DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. p. SUPPL 232:1-55, 1964.
- DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. Ii. Experimentally induced changes in the intraneuronal amine levels of bulbospinal neuron systems. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. p. SUPPL 247:1-36, 1965.
- DALLEY, J. W.; ROISER, J. P. Dopamine, serotonin and impulsivity. **Neuroscience**, v. 215, p. 42-58, 2012.
- DAVIS, M. Neurochemical modulation of sensory-motor reactivity: Acoustic and tactile startle reflexes. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 4, p. 241-63, 1980.
- DAVIS, M. Animal models of anxiety based on classical conditioning: The conditioned emotional response (cer) and the fear-potentiated startle effect. **Pharmacol Ther**, v. 47, p. 147-65, 1990.
- DAVIS, M. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. **American Psychologist**, v. 61, p. 741-756, 2006.
- DAVIS, M.; ASTRACHAN, D. I. Spinal modulation of acoustic startle: Opposite effects of clonidine and d-amphetamine. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 75, p. 219-25, 1981.
- DAVIS, M.; CEDARBAUM, J. M.; AGHAJANIAN, G. K.; GENDELMAN, D. S. 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.; COMMISSARIS, R. L.; CASSELLA, J. V.; YANG, S.; DEMBER, L.; HARTY, T. P. Differential effects of dopamine agonists on acoustically and electrically elicited startle responses: Comparison to effects of strychnine. **Brain Res**, v. 371, p. 58-69, 1986.
- DAVIS, M.; COMMISSARIS, R. L.; YANG, S.; WAGNER, K. R.; KEHNE, J. H.; CASSELLA, J. V.; BOULIS, N. M. 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.; GENDELMAN, D. S.; TISCHLER, M. D.; GENDELMAN, P. M. A primary acoustic startle circuit: Lesion and stimulation studies. **J Neurosci**, v. 2, p. 791-805, 1982.
- DAVIS, M.; SHEARD, M. H. Habituation and sensitization of the rat startle response: Effects of raphe lesions. **Physiol Behav**, v. 12, p. 425-31, 1974.
- DE SOUZA, S. L.; NOGUEIRA, M. I.; DE JESUS DEIRO, T. C.; DE CASTRO, F. M.; DA SILVA, C. M.; DA SILVA, M. C.; DE LIRA, L. O.; AZMITIA, E. C.; DE CASTRO, R. M. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. **Physiol Behav**, v. 82, p. 375-9, 2004.
- DIAS, B. G.; BANERJEE, S. B.; GOODMAN, J. V.; RESSLER, K. J. Towards new approaches to disorders of fear and anxiety. **Curr Opin Neurobiol**, v. 23, p. 346-52, 2013.
- DOLLEMAN-VAN DER WEEL, M. J.; WOUTERLOOD, F. G.; WITTER, M. P. Multiple anterograde tracing, combining phaseolus vulgaris leucoagglutinin with rhodamine- and biotin-conjugated dextran amine. **J Neurosci Methods**, v. 51, p. 9-21, 1994.
- DOUGLASS, J.; MCKINZIE, A. A.; COUCEYRO, P. Pcr differential display identifies a rat brain mrna that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. **J Neurosci**, v. 15, p. 2471-81, 1995.
- DUDEK, B. C.; PHILLIPS, T. J.; HAHN, M. E. Genetic analyses of the biphasic nature of the alcohol dose-response curve. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 15, p. 262-9, 1991.

- EBERT, U. Noradrenalin enhances the activity of cochlear nucleus neurons in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 8, p. 1306-14, 1996.
- EBERT, U.; KOCH, M. Glutamate receptors mediate acoustic input to the reticular brain stem. **Neuroreport**, v. 3, p. 429-32, 1992.
- EBERT, U.; OSTWALD, J. Serotonin modulates auditory information processing in the cochlear nucleus of the rat. **Neurosci Lett**, v. 145, p. 51-4, 1992.
- ELIAS, C. F.; LEE, C. E.; KELLY, J. F.; AHIMA, R. S.; KUCHAR, M.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Characterization of cart neurons in the rat and human hypothalamus. **J Comp Neurol**, v. 432, p. 1-19, 2001.
- FELTEN, D. L.; SLADEK, J. R., JR. Monoamine distribution in primate brain v. Monoaminergic nuclei: Anatomy, pathways and local organization. **Brain Res Bull**, v. 10, p. 171-284, 1983.
- FENDT, M.; KOCH, M. Cholinergic modulation of the acoustic startle response in the caudal pontine reticular nucleus of the rat. **Eur J Pharmacol**, v. 370, p. 101-7, 1999.
- FENDT, M.; KOCH, M.; SCHNITZLER, H. U. Amygdaloid noradrenaline is involved in the sensitization of the acoustic startle response in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 48, p. 307-14, 1994.
- 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.
- FENIK, V. B.; MARCHENKO, V.; DAVIES, R. O.; KUBIN, L. Inhibition of $\alpha 5$ neurons facilitates the occurrence of rem sleep-like episodes in urethane-anesthetized rats: A new role for noradrenergic $\alpha 5$ neurons? **Front Neurol**, v. 3, p. 119, 2012.
- FILIP, M.; BADER, M. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. **Pharmacol Rep**, v. 61, p. 761-77, 2009.
- FLETCHER, P. J.; SELHI, Z. F.; AZAMPANAH, A.; SILLS, T. L. Reduced brain serotonin activity disrupts prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. Effects of 5,7-dihydroxytryptamine and p-chlorophenylalanine. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 399-409, 2001.
- FORNEY, E.; KLEMM, W. R. Unit activity indicators of a catecholamine role in expression of morphine effects. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 7, p. 73-82, 1983.
- FRANKLAND, P. W.; SCOTT, B. W.; YEOMANS, J. S. Axons and synapses mediating electrically evoked startle: Collision tests and latency analysis. **Brain Res**, v. 670, p. 97-111, 1995.
- FRITSCHY, J. M.; LYONS, W. E.; MULLEN, C. A.; KOSOFISKY, B. E.; MOLLIVER, M. E.; GRZANNA, R. Distribution of locus coeruleus axons in the rat spinal cord: A combined anterograde transport and immunohistochemical study. **Brain Res**, v. 437, p. 176-80, 1987.
- GEERLING, J. C.; SHIN, J. W.; CHIMENTI, P. C.; LOEWY, A. D. Paraventricular hypothalamic nucleus: Axonal projections to the brainstem. **J Comp Neurol**, v. 518, p. 1460-99, 2010.
- GEFFARD, M.; TOURET, M.; KITAHAMA, K. First characterization of 5-hydroxytryptophan in rat brain by using specific antibodies. **Brain Res**, v. 426, p. 191-6, 1987.
- GERFEN, C. R.; SAWCHENKO, P. E. An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: Immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, phaseolus vulgaris leucoagglutinin (pha-l). **Brain Res**, v. 290, p. 219-38, 1984.
- GEYER, M. A.; KREBS-THOMSON, K.; BRAFF, D. L.; SWERDLOW, N. R. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits

- in schizophrenia: A decade in review. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 156, p. 117-154, 2001.
- GOGOS, A.; KUSLJIC, S.; VAN DEN BUUSE, M. 8-oh-dpat-induced effects on prepulse inhibition: Pre- vs. Post-synaptic 5-ht1a receptor activation. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, p. 664-72, 2005.
- GOLDSTEIN, M. Studies on catecholamine-synthesizing enzymes. **Neurochem Int**, v. 17, p. 291-5, 1990.
- GOMEZ-NIETO, R.; HORTA-JUNIOR, J. A.; CASTELLANO, O.; HERRERO-TURRION, M. J.; RUBIO, M. E.; LOPEZ, D. E. 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.
- GOMEZ-NIETO, R.; SINEX, D. G.; JD, C. H.-J.; CASTELLANO, O.; HERRERO-TURRION, J. M.; LOPEZ, D. E. A fast cholinergic modulation of the primary acoustic startle circuit in rats. **Brain Struct Funct**, v. p. 2013.
- GONÇALVES, L.; NOGUEIRA, M. I.; SHAMMAH-LAGNADO, S. J.; METZGER, M. Prefrontal afferents to the dorsal raphe nucleus in the rat. **Brain Res Bull**, v. 78, p. 240-7, 2009.
- 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.
- GRANATA, A. R.; NUMAO, Y.; KUMADA, M.; REIS, D. J. A1 noradrenergic neurons tonically inhibit sympathoexcitatory neurons of c1 area in rat brainstem. **Brain Res**, v. 377, p. 127-46, 1986.
- GRILLON, C. Models and mechanisms of anxiety: Evidence from startle studies. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 199, p. 421-37, 2008.
- GRILLON, C.; AMELI, R.; WOODS, S. W.; MERIKANGAS, K.; DAVIS, M. Fear-potentiated startle in humans: Effects of anticipatory anxiety on the acoustic blink reflex. **Psychophysiology**, v. 28, p. 588-95, 1991.
- 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.
- GUYENET, P. G.; YOUNG, B. S. Projections of nucleus paragigantocellularis lateralis to locus coeruleus and other structures in rat. **Brain Res**, v. 406, p. 171-84, 1987.
- HARRISON, J.; WARR, W.; IRVING, R. Second order neurons in the acoustic nerve. **Journal of Comparative Neurology**, v. 138, p. 893-895, 1962.
- HARRISON, J. M.; IRVING, R. Ascending connections of the anterior ventral cochlear nucleus in the rat. **J Comp Neurol**, v. 126, p. 51-63, 1966.
- HARRISON, J. M.; WARR, W. B. A study of the cochlear nuclei and ascending auditory pathways of the medulla. **J Comp Neurol**, v. 119, p. 341-79, 1962.
- HARTMAN, B. K.; ZIDE, D.; UDENFRIEND, S. The use of dopamine -hydroxylase as a marker for the central noradrenergic nervous system in rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 69, p. 2722-6, 1972.
- HEBEL, R.; STROMBERG, M. W. **Anatomy of the laboratory rat**. Baltimore: Williams & Wilkins Co. 1976. 173 p.
- HEEKEREN, K.; DAUMANN, J.; GEYER, M. A.; GOUZOUKIS-MAYFRANK, E. Plasticity of the acoustic startle reflex in currently abstinent ecstasy (mdma) users. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 173, p. 418-24, 2004.

- HENSLER, J. G.;ARTIGAS, F.;BORTOLOZZI, A.;DAWS, L. C.;DE DEURWAERDERE, P.;MILAN, L.;NAVAILLES, S.;KOEK, W. Catecholamine/serotonin interactions: Systems thinking for brain function and disease. **Adv Pharmacol**, v. 68, p. 167-97, 2013.
- HOFFMAN, G. E.;LEE, W. S.;SMITH, M. S.;ABBUD, R.;ROBERTS, M. M.;ROBINSON, A. G.;VERBALIS, J. G. C-fos and fos-related antigens as markers for neuronal activity: Perspectives from neuroendocrine systems. **NIDA Res Monogr**, v. 125, p. 117-33, 1993a.
- HOFFMAN, G. E.; SMITH, M. S.; VERBALIS, J. G. C-fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. **Front Neuroendocrinol**, v. 14, p. 173-213, 1993b.
- HOFFMAN, H. S.; FLESHLER, M. Startle reaction: Modification by background acoustic stimulation. **Science**, v. 141, p. 928-930, 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.
- HORMIGO, S.;GOMEZ-NIETO, R.;CASTELLANO, O.;HERRERO-TURRION, M. J.;LOPEZ, D. E.;DE ANCHIETA DE CASTRO, E. H.-J. J. The noradrenergic projection from the locus coeruleus to the cochlear root neurons in rats. **Brain Struct Funct**, v. p. 2014a.
- HORMIGO, S.;GOMEZ-NIETO, R.;CASTELLANO, O.;HERRERO-TURRION, M. J.;LOPEZ, D. E.;HORTA-JUNIOR, J. A. C. The noradrenergic projection from the locus coeruleus to the cochlear root neurons in rats. **Brain Struct Funct**, v. p. 2014b.
- HORTA-JUNIOR, J. A. C.;LOPEZ, D. E.;ALVAREZ-MORUJO, A. J.;BITTENCOURT, J. C. 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.
- HOSOYA, Y.;SUGIURA, Y.;ITO, R.;KOHNO, K. Descending projections from the hypothalamic paraventricular nucleus to the a5 area, including the superior salivatory nucleus, in the rat. **Exp Brain Res**, v. 82, p. 513-8, 1990.
- HSU, S. M.; RAINE, L. Protein a, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 29, p. 1349-53, 1981.
- HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am J Clin Pathol**, v. 75, p. 734-8, 1981a.
- 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, 1981b.
- HSU, S. M.; SOBAN, E. Color modification of diaminobenzidine (dab) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 30, p. 1079-82, 1982.
- HUTCHISON, K. E.; NIAURA, R.; SWIFT, R. The effects of smoking high nicotine cigarettes on prepulse inhibition, startle latency, and subjective responses. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 150, p. 244-52, 2000.
- ISHIKAWA, A.; ISHIDA, Y.; NAKAMURA, S. Neurons in the lateral paragigantocellular nucleus projecting to the infralimbic cortex in rats: Electrical activity and response to changes in blood pressure. **Neurosci Lett**, v. 311, p. 57-60, 2001.
- JACOBOWITZ, D. M.; PALKOVITS, M. Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. I. Forebrain (telencephalon, diencephalon). **J Comp Neurol**, v. 157, p. 13-28, 1974.

- JACOBS, B. L.; AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiol Rev**, v. 72, p. 165-229, 1992.
- JACOBS, B. L.; GANNON, P. J.; AZMITIA, E. C. Atlas of serotonergic cell bodies in the cat brainstem: An immunocytochemical analysis. **Brain Res Bull**, v. 13, p. 1-31, 1984.
- JACOBSEN, J. P.; MEDVEDEV, I. O.; CARON, M. G. The 5-HT deficiency theory of depression: Perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2arg439his knockin mouse. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, p. 2444-59, 2012.
- JONES, B. E. Reticular formation: Cytoarchitecture, transmitters, and projections. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The rat nervous system**. San Diego: Academic Press, 1995. Reticular formation: Cytoarchitecture, transmitters, and projections, p.155-255
- JONES, B. E.; YANG, T. Z. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. **J Comp Neurol**, v. 242, p. 56-92, 1985.
- JUSTUS, A. N.; FINN, P. R. Startle modulation in non-incarcerated men and women with psychopathic traits. **Personality and Individual Differences**, v. 43, p. 2057-2071, 2007.
- KADAR, A.; WITTMANN, G.; LIPOSITS, Z.; FEKETE, C. Improved method for combination of immunocytochemistry and nissl staining. **J Neurosci Methods**, v. 184, p. 115-8, 2009.
- KANAI, S.; ASAKURA, M.; NAKANO, M.; TANAKA, D.; HISHINUMA, T.; MISONOO, A.; OSADA, K. The long-lasting sensitization to footshock after chronic variable stress on the acoustic startle reflex. **Japanese Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 27, p. 13-18, 2007.
- KANDLER, K.; HERBERT, H. Auditory projections from the cochlear nucleus to pontine and mesencephalic reticular nuclei in the rat. **Brain Res**, v. 562, p. 230-42, 1991.
- KAVIANI, H.; GRAY, J. A.; CHECKLEY, S. A.; RAVEN, P. W.; WILSON, G. D.; KUMARI, V. Affective modulation of the startle response in depression: Influence of the severity of depression, anhedonia, and anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 83, p. 21-31, 2004.
- KAWAHARA, Y.; KAWAHARA, H.; WESTERINK, B. H. Comparison of effects of hypotension and handling stress on the release of noradrenaline and dopamine in the locus coeruleus and medial prefrontal cortex of the rat. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 360, p. 42-9, 1999.
- KEAY, K. A.; REDGRAVE, P.; DEAN, P. Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus. **Brain Res Bull**, v. 20, p. 13-26, 1988.
- KEHNE, J. H.; DAVIS, M. Central noradrenergic involvement in yohimbine excitation of acoustic startle: Effects of dsp4 and 6-ohda. **Brain Res**, v. 330, p. 31-41, 1985.
- KLEPPER, A.; HERBERT, H. Distribution and origin of noradrenergic and serotonergic fibers in the cochlear nucleus and inferior colliculus of the rat. **Brain Res**, v. 557, p. 190-201, 1991.
- KOCH, M. The neurobiology of startle. **Prog Neurobiol**, v. 59, p. 107-28, 1999.
- KOCH, M.; KUNGEL, M.; HERBERT, H. Cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus are involved in the mediation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. **Exp Brain Res**, v. 97, p. 71-82, 1993.
- KOCH, M.; LINGENHÖHL, K.; PILZ, P. K. Loss of the acoustic startle response following neurotoxic lesions of the caudal pontine reticular formation: Possible role of giant neurons. **Neuroscience**, v. 49, p. 617-25, 1992.
- KOCH, M.; SCHNITZLER, H. U. The acoustic startle response in rats--circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. **Behav Brain Res**, v. 89, p. 35-49, 1997.

- KOLOMANSKA, P.; WYSZOGRODZKA, E.; ROK-BUJKO, P.; KRZASCIK, P.; KOSTOWSKI, W.; ZANIEWSKA, M.; FILIP, M.; STEFANSKI, R. Neonatal serotonin (5-HT) depletion does not disrupt prepulse inhibition of the startle response in rats. **Pharmacol Rep**, v. 63, p. 1077-84, 2011.
- KOSTOWSKI, W. Possible relationship of the locus coeruleus--hippocampal noradrenergic neurons to depression and mode of action of antidepressant drugs. **Pol J Pharmacol Pharm**, v. 37, p. 727-43, 1985.
- KOYLU, E. O.; COUCEYRO, P. R.; LAMBERT, P. D.; KUCHAR, M. J. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. **J Comp Neurol**, v. 391, p. 115-32, 1998.
- KRASE, W.; KOCH, M.; SCHNITZLER, H. U. Glutamate antagonists in the reticular formation reduce the acoustic startle response. **Neuroreport**, v. 4, p. 13-6, 1993.
- KUBOTA, N.; AMEMIYA, S.; MOTOKI, C.; OTSUKA, T.; NISHIJIMA, T.; KITA, I. Corticotropin-releasing factor antagonist reduces activation of noradrenalin and serotonin neurons in the locus coeruleus and dorsal raphe in the arousal response accompanied by yawning behavior in rats. **Neurosci Res**, v. 72, p. 316-23, 2012.
- KUSLJIC, S.; COPOLOV, D. L.; VAN DEN BUUSE, M. Differential role of serotonergic projections arising from the dorsal and median raphe nuclei in locomotor hyperactivity and prepulse inhibition. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 2138-47, 2003.
- LANDIS, C.; HUNT, W. A. **The startle pattern**. New York: Ferrar & Rinehart. 1939
- LANNES, B.; VERGNES, M.; MARESCAUX, C.; DEPAULIS, A.; MICHELETTI, G.; WARTER, J. M.; KEMPF, E. Lesions of noradrenergic neurons in rats with spontaneous generalized non-convulsive epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 9, p. 79-85, 1991.
- LEE, W. S.; SMITH, M. S.; HOFFMAN, G. E. Cfos activity identifies recruitment of luteinizing hormone-releasing hormone neurons during the ascending phase of the proestrous luteinizing hormone surge. **J Neuroendocrinol**, v. 4, p. 161-6, 1992.
- LEE, Y.; LÓPEZ, D. E.; MELONI, E. G.; DAVIS, M. 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.
- LEGG, C. R.; MERCIER, B.; GLICKSTEIN, M. Corticopontine projection in the rat: The distribution of labelled cortical cells after large injections of horseradish peroxidase in the pontine nuclei. **J Comp Neurol**, v. 286, p. 427-41, 1989.
- LEITE-ALMEIDA, H.; VALLE-FERNANDES, A.; ALMEIDA, A. Brain projections from the medullary dorsal reticular nucleus: An anterograde and retrograde tracing study in the rat. **Neuroscience**, v. 140, p. 577-95, 2006.
- LEWIS, M. C.; GOULD, T. J. Nicotine and ethanol enhancements of acoustic startle reflex are mediated in part by dopamine in c57bl/6j mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 76, p. 179-86, 2003.
- LINGENHÖHL, K.; FRIAUF, E. Giant neurons in the caudal pontine reticular formation receive short latency acoustic input: An intracellular recording and hrp-study in the rat. **J Comp Neurol**, v. 325, p. 473-92, 1992.
- LINGENHÖHL, 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.
- LOEWY, A. D.; GREGORIE, E. M.; MCKELLAR, S.; BAKER, R. P. Electrophysiological evidence that the a5 catecholamine cell group is a vasomotor center. **Brain Res**, v. 178, p. 196-200, 1979a.
- LOEWY, A. D.; MCKELLAR, S.; SAPER, C. B. Direct projections from the a5 catecholamine cell group to the intermediolateral cell column. **Brain Res**, v. 174, p. 309-14, 1979b.

- LOFTUS, W. C.;BISHOP, D. C.;SAINT MARIE, R. L.;OLIVER, D. L. Organization of binaural excitatory and inhibitory inputs to the inferior colliculus from the superior olive. **J Comp Neurol**, v. 472, p. 330-44, 2004.
- LÓPEZ, D. E.;MERCHÁN, M. A.;BAJO, V. M.;SALDANA, E. The cochlear root neurons in the rat, mouse and gerbil. In: MERCHÁN, M. A. (Ed.). **The mammalian cochlear nuclei: Organization and function**. New York: Plenum Press, 1993. The cochlear root neurons in the rat, mouse and gerbil, p.291-301
- LÓPEZ, D. E.;SALDANA, E.;NODAL, F. R.;MERCHÁN, M. A.;WARR, W. B. Projections of cochlear root neurons, sentinels of the rat auditory pathway. **J Comp Neurol**, v. 415, p. 160-74, 1999.
- LORENTE DE NÓ, R. Anatomy of the eighth nerve. The central projection of the nerve endings of the internal ear. **Laryngoscope**, v. 43, p. 1-38, 1933.
- MALMIERCA, M. S.; MERCHÁN, M. Auditory system. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The rat nervous system**: Academic Press, 2004. Auditory system, p.997-1081
- MAMOUNAS, L. A.;MULLEN, C. A.;O'HEARN, E.;MOLLIVER, M. E. Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: Morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives. **J Comp Neurol**, v. 314, p. 558-86, 1991.
- 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.
- MARIEN, M. R.; COLPAERT, F. C.; ROSENQUIST, A. C. Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: A theory. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 45, p. 38-78, 2004.
- MEJIAS-APONTE, C. A.; DROUIN, C.; ASTON-JONES, G. Adrenergic and noradrenergic innervation of the midbrain ventral tegmental area and retrorubral field: Prominent inputs from medullary homeostatic centers. **J Neurosci**, v. 29, p. 3613-26, 2009.
- MELONI, E. G.; DAVIS, M. Synergistic enhancement of the acoustic startle reflex by dopamine D1 and 5-HT1A agonists and corresponding changes in c-fos expression in the dorsal raphe of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 151, p. 359-67, 2000.
- MERCHÁN, M. A.;COLLIA, F.;LÓPEZ, D. E.;SALDANA, E. Morphology of cochlear root neurons in the rat. **J Neurocytol**, v. 17, p. 711-25, 1988.
- MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog Neurobiol**, v. 70, p. 83-244, 2003.
- 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.
- MIYAZAKI, K.; MIYAZAKI, K. W.; DOYA, K. The role of serotonin in the regulation of patience and impulsivity. **Mol Neurobiol**, v. 45, p. 213-24, 2012.
- MOORE, R. Y.; BLOOM, F. E. Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology of the dopamine systems. **Annu Rev Neurosci**, v. 1, p. 129-69, 1978.
- MOORE, R. Y.; BLOOM, F. E. Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. **Annu Rev Neurosci**, v. 2, p. 113-68, 1979.
- MOUCHET, P.; MANIER, M.; FEUERSTEIN, C. Immunohistochemical study of the catecholaminergic innervation of the spinal cord of the rat using specific antibodies against dopamine and noradrenaline. **J Chem Neuroanat**, v. 5, p. 427-40, 1992.
- MULDERS, W. H.; ROBERTSON, D. Origin of the noradrenergic innervation of the superior olivary complex in the rat. **J Chem Neuroanat**, v. 21, p. 313-22, 2001.
- MULDERS, W. H.; ROBERTSON, D. Noradrenergic modulation of brainstem nuclei alters cochlear neural output. **Hearing Research**, v. 204, p. 147-155, 2005.

- NEWMAN, D. B. Distinguishing rat brainstem reticulospinal nuclei by their neuronal morphology. Ii. Pontine and mesencephalic nuclei. **J Hirnforsch**, v. 26, p. 385-418, 1985.
- NODAL, F. R. **El sustrato anatómico de los reflejos auditivos en la rata**. (Tese de Doutorado). Departamento de Biología Celular y Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, 1999. 181 p.
- NODAL, F. R.; LÓPEZ, D. E. Direct input from cochlear root neurons to pontine reticulospinal neurons in albino rat. **J Comp Neurol**, v. 460, p. 80-93, 2003.
- NOVIKOV, L. N. Labeling of central projections of primary afferents in adult rats: A comparison between biotinylated dextran amine, neurobiotin and phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. **J Neurosci Methods**, v. 112, p. 145-54, 2001.
- NOVIKOVA, L.; NOVIKOV, L.; KELLERTH, J. O. Persistent neuronal labeling by retrograde fluorescent tracers: A comparison between fast blue, fluoro-gold and various dextran conjugates. **J Neurosci Methods**, v. 74, p. 9-15., 1997.
- NYGREN, L. G.; OLSON, L. A new major projection from locus coeruleus: The main source of noradrenergic nerve terminals in the ventral and dorsal columns of the spinal cord. **Brain Res**, v. 132, p. 85-93, 1977.
- LOSEN, K. K.; LÓPEZ, D. E.; SLYNGSTAD, T. A.; OTTERSEN, O. P.; STORM-MATHISEN, J. Gaba-like and glycine-like immunoreactivities of the cochlear root nucleus in rat. **J Neurocytol**, v. 20, p. 17-25, 1991.
- PALKOVITS, M.; JACOBOWITZ, D. M. Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. Ii. Hindbrain (mesencephalon, rhombencephalon). **J Comp Neurol**, v. 157, p. 29-42, 1974.
- PASCAL, C.; JOHANNES, A. V. H. Serotonin 5-HT₃ receptors in the central nervous system. **Cell and Tissue Research**, v. 326, p. 573-581, 2006.
- PAVLASEK, J. The startle reaction to an acoustic stimulus in the rat: The effect of noradrenaline administered by microinjection into the pontomedullary reticular formation. **Physiologia Bohemoslovaca**, v. 38, p. 81-91, 1989.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates: The new coronal set - 161 diagrams**. San Diego: Academic Press. 2005
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Elsevier. 2007
- PERESE, D. A.; ULMAN, J.; VIOLA, J.; EWING, S. E.; BANKIEWICZ, K. S. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. **Brain Res**, v. 494, p. 285-93, 1989.
- PEYRON, C.; LUPPI, P. H.; FORT, P.; RAMPON, C.; JOUVET, M. Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. **J Comp Neurol**, v. 364, p. 402-413, 1996.
- PEYRON, C.; PETIT, J. M.; RAMPON, C.; JOUVET, M.; LUPPI, P. H. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. **Neuroscience**, v. 82, p. 443-68, 1998.
- PEZZONE, M. A.; LEE, W. S.; HOFFMAN, G. E.; RABIN, B. S. Induction of c-fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. **Brain Res**, v. 597, p. 41-50, 1992.
- 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.
- PREHN, A.; OHRT, A.; SOJKA, B.; FERSTL, R.; PAUSE, B. M. Chemosensory anxiety signals augment the startle reflex in humans. **Neuroscience Letters**, v. 394, p. 127-130, 2006.

- PUIG, M. V.; GULLEDGE, A. T. Serotonin and prefrontal cortex function: Neurons, networks, and circuits. **Mol Neurobiol**, v. 44, p. 449-64, 2011.
- RAPPORT, M. M. Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. **J Biol Chem**, v. 180, p. 961-9, 1949.
- RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A.; PAGE, I. H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. **J Biol Chem**, v. 176, p. 1243-51, 1948.
- REINER, A.; VEENMAN, C. L.; MEDINA, L.; JIAO, Y.; DEL MAR, N.; HONIG, M. G. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. **J Neurosci Methods**, v. 103, p. 23-37, 2000.
- RIGDON, G. C.; WEATHERSPOON, J. K. 5-hydroxytryptamine 1a receptor agonists block prepulse inhibition of acoustic startle reflex. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 263, p. 486-93, 1992.
- ROSS, M. D.; BURKEL, W. Electron microscopic observations of the nucleus, glial dome, and meninges of the rat acoustic nerve. **Am J Anat**, v. 130, p. 73-91, 1971.
- RUIGROK, T. J. H. Precerebellar nuclei end red nucleus. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The rat nervous system**. Estados Unidos da América: Elsevier, v.3°, 2004. Precerebellar nuclei end red nucleus, p.167-204
- SAINT MARIE, R. L.; BAKER, R. A. Neurotransmitter-specific uptake and retrograde transport of [3h]glycine from the inferior colliculus by ipsilateral projections of the superior olivary complex and nuclei of the lateral lemniscus. **Brain Res**, v. 524, p. 244-53, 1990.
- SAMUELS, E. R.; SZABADI, E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: Its roles in the regulation of arousal and autonomic function part ii: Physiological and pharmacological manipulations and pathological alterations of locus coeruleus activity in humans. **Curr Neuropharmacol**, v. 6, p. 254-85, 2008.
- SAPER, C. B. Image is everything. **J Comp Neurol**, v. 412, p. 381-2, 1999.
- SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. **Brain Res**, v. 257, p. 275-325, 1982.
- SCHENK, M. P.; MANNING, R. J.; PAALMAN, M. H. Going digital: Image preparation for biomedical publishing. **Anat Rec**, v. 257, p. 128-36, 1999.
- SCHMUED, L. C.; FALLON, J. H. Fluoro-gold: A new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. **Brain Res**, v. 377, p. 147-54., 1986.
- SCHMUED, L. C.; HEIMER, L. Iontophoretic injection of fluoro-gold and other fluorescent tracers. **J Histochem Cytochem**, v. 38, p. 721-3, 1990.
- SCHMUED, L. C.; KYRIAKIDIS, K.; FALLON, J. H.; RIBAK, C. E. Neurons containing retrogradely transported fluoro-gold exhibit a variety of lysosomal profiles: A combined brightfield, fluorescence, and electron microscopic study. **J Neurocytol**, v. 18, p. 333-43, 1989.
- SCHWARZ, C.; THIER, P. Comparison of projection neurons in the pontine nuclei and the nucleus reticularis tegmenti pontis of the rat. **J Comp Neurol**, v. 376, p. 403-19, 1996.
- SCHWEIMER, J.; FENDT, M.; SCHNITZLER, H. U. Effects of clonidine injections into the bed nucleus of the stria terminalis on fear and anxiety behavior in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 117-124, 2005.
- SGHENDO, L.; MIFSUD, J. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: Using fluoxetine as a model. **J Pharm Pharmacol**, v. 64, p. 317-25, 2012.
- SINEX, D. G.; LÓPEZ, D. E.; WARR, W. B. Electrophysiological responses of cochlear root neurons. **Hear Res**, v. 158, p. 28-38, 2001.

- SIPES, T. A.; GEYER, M. A. 8-oh-dpat disruption of prepulse inhibition in rats: Reversal with (+)way 100,135 and localization of site of action. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 117, p. 41-8, 1995.
- SPANGLER, K. M.;CANT, N. B.;HENKEL, C. K.;FARLEY, G. R.;WARR, W. B. Descending projections from the superior olivary complex to the cochlear nucleus of the cat. **J Comp Neurol**, v. 259, p. 452-65, 1987.
- SPECIALE, S. G.;CROWLEY, W. R.;O'DONOHUE, T. L.;JACOBOWITZ, D. M. Forebrain catecholamine projections of the a5 cell group. **Brain Res**, v. 154, p. 128-33, 1978.
- STAM, R. Ptsd and stress sensitisation: A tale of brain and body. Part 1: Human studies. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 31, p. 530-557, 2007.
- STEINBUSCH, H. W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. **Neuroscience**, v. 6, p. 557-618, 1981.
- STONE, E. A.;LIN, Y.;SARFRAZ, Y.;QUARTERMAIN, D. The role of the central noradrenergic system in behavioral inhibition. **Brain Res Rev**, v. 67, p. 193-208, 2011.
- STRACK, A. M.;SAWYER, W. B.;HUGHES, J. H.;PLATT, K. B.;LOEWY, A. D. A general pattern of cns innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. **Brain Res**, v. 491, p. 156-62, 1989.
- SUN, W.; PANNETON, W. M. Defining projections from the caudal pressor area of the caudal ventrolateral medulla. **J Comp Neurol**, v. 482, p. 273-93, 2005.
- SWERDLOW, N. R.;BLUMENTHAL, T. D.;SUTHERLAND, A. N.;WEBER, E.;TALLEDO, J. A. Effects of prepulse intensity, duration, and bandwidth on perceived intensity of startling acoustic stimuli. **Biol Psychol**, v. 74, p. 389-95, 2007.
- SWERDLOW, N. R.; BRAFF, D. L.; GEYER, M. A. Gabaergic projection from nucleus accumbens to ventral pallidum mediates dopamine-induced sensorimotor gating deficits of acoustic startle in rats. **Brain Res**, v. 532, p. 146-50, 1990.
- SWERDLOW, N. R.; BRAFF, D. L.; GEYER, M. A. Cross-species studies of sensorimotor gating of the startle reflex. **Ann N Y Acad Sci**, v. 877, p. 202-16, 1999.
- 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.;EASTVOLD, A.;KARBAN, B.;PLOUM, Y.;STEPHANY, N.;GEYER, M. A.;CADENHEAD, K.;AUERBACH, P. P. Dopamine agonist effects on startle and sensorimotor gating in normal male subjects: Time course studies. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 161, p. 189-201, 2002.
- SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A. Clozapine and haloperidol in an animal model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 44, p. 741-744, 1993a.
- SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A. Prepulse inhibition of acoustic startle in rats after lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus. **Behav Neurosci**, v. 107, p. 104-17, 1993b.
- 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.
- TAKASE, L. F.; NOGUEIRA, M. I. Patterns of fos activation in rat raphe nuclei during feeding behavior. **Brain Res**, v. 1200, p. 10-8, 2008.
- TAKASE, L. F.;NOGUEIRA, M. I.;BLAND, S. T.;BARATTA, M.;WATKINS, L. R.;MAIER, S. F.;FORNAL, C. A.;JACOBS, B. L. Effect of number of tailshocks on learned helplessness and activation of serotonergic and noradrenergic neurons in the rat. **Behav Brain Res**, v. 162, p. 299-306, 2005.

- TAVARES, I.; LIMA, D.; COIMBRA, A. The pontine $\alpha 5$ noradrenergic cells which project to the spinal cord dorsal horn are reciprocally connected with the caudal ventrolateral medulla in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 9, p. 2452-61, 1997.
- TAXINI, C. L.; TAKAKURA, A. C.; GARGAGLIONI, L. H.; MOREIRA, T. S. Control of the central chemoreflex by $\alpha 5$ noradrenergic neurons in rats. **Neuroscience**, v. 199, p. 177-86, 2011.
- THOMAS, J.; WANG, J.; TAKUBO, H.; SHENG, J.; DE JESUS, S.; BANKIEWICZ, K. S. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model: Further biochemical and behavioral characterization. **Exp Neurol**, v. 126, p. 159-67, 1994.
- TORK, I. Anatomy of the serotonergic system. **Ann N Y Acad Sci**, v. 600, p. 9-34; discussion 34-5, 1990.
- TOURET, M.; KITAHAMA, K.; GEFFARD, M.; JOUVET, M. 5-hydroxytryptophan (5-HTP)-immunoreactive neurons in the rat brain tissue. **Neurosci Lett**, v. 80, p. 263-7, 1987.
- TRAKHTENBERG, E. F.; GOLDBERG, J. L. The role of serotonin in axon and dendrite growth. **Int Rev Neurobiol**, v. 106, p. 105-26, 2012.
- TRAN, L.; LASHER, B. K.; YOUNG, K. A.; KEELE, N. B. Depletion of serotonin in the basolateral amygdala elevates glutamate receptors and facilitates fear-potentiated startle. **Transl Psychiatry**, v. 3, p. e298, 2013.
- TWAROG, B. M.; PAGE, I. H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. **Am J Physiol**, v. 175, p. 157-61, 1953.
- UNGERSTEDT, U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 367, p. 1-48, 1971.
- USUNOFF, K. G.; ITZEV, D. E.; ROLFS, A.; SCHMITT, O.; WREE, A. Brain stem afferent connections of the amygdala in the rat with special references to a projection from the parabrachial nucleus: A fluorescent retrograde tracing study. **Anat Embryol (Berl)**, v. 211, p. 475-96, 2006.
- VALLS-SOLÉ, J. Acoustic and somatosensory prepulse modulation of the blink reflex and the startle reaction. In: (Ed.). **Brainstem reflexes and functions**. Madrid: Litofinter, S.A., 1998. Acoustic and somatosensory prepulse modulation of the blink reflex and the startle reaction., p. 119-131
- VAN BOCKSTAELE, E. J.; AKAOKA, H.; ASTON-JONES, G. Brainstem afferents to the rostral (juxtafacial) nucleus paragigantocellularis: Integration of exteroceptive and interoceptive sensory inputs in the ventral tegmentum. **Brain Res**, v. 603, p. 1-18, 1993.
- VAN BOCKSTAELE, E. J.; PIERIBONE, V. A.; ASTON-JONES, G. Diverse afferents converge on the nucleus paragigantocellularis in the rat ventrolateral medulla: Retrograde and anterograde tracing studies. **J Comp Neurol**, v. 290, p. 561-84, 1989.
- VAN HAEFTEN, T.; WOUTERLOOT, F. G. Neuroanatomical tracing at high resolution. **J Neurosci Methods**, v. 103, p. 107-16, 2000.
- VASUDEVA, R. K.; LIN, R. C.; SIMPSON, K. L.; WATERHOUSE, B. D. Functional organization of the dorsal raphe efferent system with special consideration of nitrergic cell groups. **J Chem Neuroanat**, v. 41, p. 281-93, 2011.
- VEENMAN, C. L.; REINER, A.; HONIG, M. G. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. **J Neurosci Methods**, v. 41, p. 239-54, 1992.
- VERLEYE, M.; BERNET, F. Behavioral effects of lesions of the central noradrenergic bundles in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 19, p. 407-14, 1983.
- VERTES, R. P. A phase I analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **J Comp Neurol**, v. 313, p. 643-68, 1991.

- VIANNA, D. M.; CARRIVE, P. Cardiovascular and behavioural responses to conditioned fear and restraint are not affected by retrograde lesions of a5 and c1 bulbospinal neurons. **Neuroscience**, v. 166, p. 1210-8, 2010.
- VIAU, V.; SAWCHENKO, P. E. Hypophysiotropic neurons of the paraventricular nucleus respond in spatially, temporally, and phenotypically differentiated manners to acute vs. Repeated restraint stress: Rapid publication. **J Comp Neurol**, v. 445, p. 293-307, 2002.
- VOLLENWEIDER, F. X.; REMENSBERGER, S.; HELL, D.; GEYER, M. A. Opposite effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (mdma) on sensorimotor gating in rats versus healthy humans. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 143, p. 365-72, 1999.
- VON EULER, U. S. The presence of a sympathomimetic substance in extracts of mammalian heart. **J Physiol**, v. 105, p. 38-44, 1946a.
- VON EULER, U. S. Sympathin in adrenergic nerve fibres. **J Physiol**, v. 105, p. 26, 1946b.
- WALLACE, D. M.; MAGNUSON, D. J.; GRAY, T. S. Organization of amygdaloid projections to brainstem dopaminergic, noradrenergic, and adrenergic cell groups in the rat. **Brain Res Bull**, v. 28, p. 447-54, 1992.
- WARR, W. B. Organization of olivocochlear efferent systems in mammals. In: WEBSTER, D. B.; POPPER, A. N.; FAY, R. R. (Ed.). **The mammalian auditory pathway: Neuroanatomy**. New York: Springer-Verlag, 1992. Organization of olivocochlear efferent systems in mammals, p.410-48
- WASELUS, M.; VALENTINO, R. J.; VAN BOCKSTAELE, E. J. Collateralized dorsal raphe nucleus projections: A mechanism for the integration of diverse functions during stress. **J Chem Neuroanat**, v. 41, p. 266-80, 2011.
- WESSENDORF, M. W. Fluoro-gold: Composition, and mechanism of uptake. **Brain Res**, v. 553, p. 135-48, 1991.
- WESSENDORF, M. W.; ELDE, R. The coexistence of serotonin- and substance p-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat as shown by immunofluorescent double labeling. **J Neurosci**, v. 7, p. 2352-63, 1987.
- WESTLUND, K. N.; BOWKER, R. M.; ZIEGLER, M. G.; COULTER, J. D. Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. **Brain Res**, v. 263, p. 15-31, 1983.
- WESTLUND, K. N.; BOWKER, R. M.; ZIEGLER, M. G.; COULTER, J. D. Origins and terminations of descending noradrenergic projections to the spinal cord of monkey. **Brain Res**, v. 292, p. 1-16, 1984.
- WHITE, S. R. Serotonin and co-localized peptides: Effects on spinal motoneuron excitability. **Peptides**, v. 6 Suppl 2, p. 123-7, 1985.
- 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. 389-395, 2007.
- WOODRUFF, M. L.; BAISDEN, R. H.; WHITTINGTON, D. L. Effects of electrical stimulation of the pontine a5 cell group on blood pressure and heart rate in the rabbit. **Brain Res**, v. 379, p. 10-23, 1986a.
- WOODRUFF, M. L.; BAISDEN, R. H.; WHITTINGTON, D. L.; KELLY, J. E. Inputs to the pontine a5 noradrenergic cell group: A horseradish peroxidase study. **Exp Neurol**, v. 94, p. 782-7, 1986b.
- YEOMANS, J. S.; FRANKLAND, P. W. The acoustic startle reflex: Neurons and connections. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 21, p. 301-14, 1996.

- YEOMANS, J. S.; HEMPEL, C. M.; CHAPMAN, C. A. Axons and synapses mediating startle-like responses evoked by electrical stimulation of the reticular formation in rats: Symmetric and asymmetric collision effects. **Brain Res**, v. 617, p. 309-19, 1993.
- ZHONG, H.; MINNEMAN, K. P. Alpha1-adrenoceptor subtypes. **Eur J Pharmacol**, v. 375, p. 261-76, 1999.
- ZHOU, J.; NANNAPANENI, N.; SHORE, S. Vesicular 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.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A - Protocolo padrão de imuno-histoquímica

1º Dia

Antes de iniciar a imuno verificar:

Data: _____ Horário do início: _____ Horário previsto para término: _____

Potinhos a serem utilizados: _____

Material necessário: pincéis, redinhas, becker para descarte de soluções e para dosar tampões, suporte para potinhos, agitador orbital, tampões, inibição de peroxidase, anticorpos (primário e secundário), soluções de bloqueio e reação histoquímica. (repassar todo o protocolo antes de iniciar!!)

- PB (tampão fosfato) 0,1 M pH 7,42 X 10 min. em agitação.

PB se prepara a partir da solução estoque 0,4M. Diluir 1 parte de PB 0,4M em 3 partes de H₂O destilada.

A solução estoque se prepara:

Tampão fosfato 0,4 M pH 7,4

- Na₂HPO₄ (M= 141,96 Merck 1.06586.0500).....45,12 g

- NaH₂PO₄ · H₂O (M= 137,99 Merck 1.06346.0500)11,04g

- H₂O destilada.....1000 ml

Ajustar o pH com solução de HCl a 3M até pH 7,4

*Em 800ml de água, adicionar os sais aos poucos em agitador e então completar até 1000ml.

- Inibição da peroxidase endógena1 X 20 min. em agitação.

A solução de inibição da peroxidase endógena se prepara adicionando 9 partes de PB 0,1M pH 7,4 e uma parte de H₂O₂ 33% (P.A.). Incubar 3 ml por potinho.

- PB (tampão fosfato) 0,1 M pH 7,45 X 5 min. em agitação.

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,603 X 10 min. em agitação.

TBS-Tx se prepara diluindo 1 parte da solução estoque 10X em 9 partes de H₂O destilada ou:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121,1).....6,06 gr

- NaCl.....8,85 gr

- Triton X-100 (Merck - 1.08603.1000 C₃₄H₆₂O₁₁ PM 646,37) à 20%....25 ml

- H₂O dest.....q.s.p. 1000 ml

*Ajustar o pH com solução de HCl 3M até 7,60

- Bloqueio de marcação inespecífica.....1 X 40 min. em agitação.

Incubar em solução de soro normal da espécie onde foi produzido o anticorpo secundário ou em soro fetal bovino inativado. Preparar a solução a 2% em TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar 1 ml por potinho.

- Anticorpo primário24 horas à 4 °C em agitação.

* Dopamina beta-hidroxilase – anti-DBH, feito em camundongo (Chemicon® #Mab308), 1:10000

* Tirosina hidroxilase - anti-TH, feito em coelho (Chemicon® #Ab152), 1:5000

- * Serotonina - anti-5HT, feito em coelho (Immunostar® #20080), 1:20000
- * CART - anti-CART, feito em coelho (Phoenix Pharmaceuticals Inc.® #55-102), 1:10000
- * Calbindina – anti-CbD28k, feito em coelho (Swant® #CB38a), 1:5000
- * Fos, anti-c-fos, feito em coelho (Calbiochem® #PC38), 1:15000
- * Fluorogold, anti-FG, feito em coelho (Chemicon® #AB153), 1:10000

2º Dia

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação.

- Anticorpo secundário a concentração de 1/200.....120 min. temp. ambiente em agitação.

Imunoperoxidase:

- * Anti-camundongo, feito em cabra (Vector® #BA-1000), 1:200
- * Anti-coelho, feito em cabra, (Vector® #BA-9200) 1:200

Imunofluorescência

- * Anti-camundongo Alexa 647, feito em cabra (Jackson Immunoresearch® #115605146), 1:200
- * Anti-camundongo Cy2, feito em cabra (Jackson Immunoresearch® #115225003), 1:200
- * Anti-coelho Alexa 647, feito em cabra (Jackson Immunoresearch® #111605144), 1:200
- * Anti-coelho Cy3, feito em cabra (Jackson Immunoresearch® #111165003), 1:200
- * Streptavidina conjugada com Cy2, (Jackson Immunoresearch® #016220084), 1:200
- * Streptavidina conjugada com Cy3, (Jackson Immunoresearch® #016160084), 1:200

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação

No caso de emprego de anticorpos fluorescentes a próxima etapa é a montagem dos cortes e cobertura de lâmina com meio de montagem a base de glicerol e N-propylgaleato e armazenar as lâminas em geladeira envolvidas com papel alumínio.

No caso de emprego de anticorpos biotinilados seguir o protocolo com a incubação em ABC.

- Incubação em ABC 1/200 (Vector - Vectastain Standart Kit PK4000... 120 min. à temp. amb. ou uma noite à 4 °C, em agitação.

Solução de incubação ABC Kit para 4 ml (4 potinhos, Incubar 1 ml por potinho):

- 4 ml TBS-Tx 0,05 M pH 7,6 + 20µl solução A (laranja)
- Agitar bem
- Adicionar 20µl solução B (marrom)
- Agitar bem e esperar 30 minutos para que o complexo se forme e possa ser usado.

*Importante: recuperar o complexo ABC usado por somente uma vez. Marcar e guardar em geladeira para ser utilizado mais uma vez.

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....2 X 10 min. em agitação.

- Tris-HCl 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação.

Tris-HCl se prepara:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 12.....6,06 gr
- H₂O dest.q.s.p. 1000 ml

Ajustar o pH com solução de HCl até 7,6

- Revelação com DAB-Níquel.....em baixa agitação e controle visual em microscópio.

Preparar as soluções imediatamente antes de usar e protege-las da luz, pois o DAB é fotos-sensível. Sempre usar luvas de nitrilo e realizar o procedimento em capela, pois o DAB é carcinogênico.

Solução de revelação DAB-Níquel (até 8 potinhos):

-12,5 ml Tris-HCl 0,05 M pH 8.00

-Adicionar 0,05 gr. (50 mgr.) de Níquel amônio sulfato (PM 395,00 $\text{Ni}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

-Agitar bem (dissolver em ultra-som) e filtrar. *atenção: umidificar papel de filtro com H_2O dest.

-Adicionar uma alíquota de 200 μl de solução de DAB a 1% em H_2O dest (pegar no freezer)

-Adicionar 2,5 μl de água oxigenada P.A. imediatamente antes de incubar (H_2O_2 a 30% PM= 34,01 Merck 108597, pegar na geladeira).

Obs: Deixar um pouco em geladeira para baixar a temperatura, assim tendo um maior controle sobre a reação. Não colocar o níquel em contato com instrumentos metálicos nem papel alumínio, pois é um metal pesado. Tudo que entrar em contato com DAB, deve ser deixado na capela em um Becker com 50ml de hipoclorido de sódio comercial, para precipitação do DAB. Eliminar a solução no dia seguinte em local adequado (frasco de coleta de resíduos azul). DAB = Sigma D - 9015 PM 360,1

- Tris-HCl 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação.

- Montagem dos cortes

Montar os cortes em lâminas, organizando-os em uma placa de Petri com gelatina (Merck 1.04078.0500, para material processado com DAB= Gelatina 0,4

Para preparar a gelatina 0,4% diluir 50 ml da solução estoque 4X, congelada nos tubos fal-con, em 150 ml de H_2O dest. Para gelatina a 0,1% diluir 50 ml da solução estoque em 750 ml de H_2O dest. Obs: a gelatina diluída e em boas condições de uso pode ser identificada e armazenada em freezer.

Pode-se preparar também da seguinte forma:

- gelatina.....0,8g(0,4%) ou 0,2g(0,1%)

- Tris-HCl 0,05Mq.s.p. 200 ml

Ajustar o pH até 7,60, filtrar após a montagem de cada potinho e guardar em freezer para utilização posterior, caso a solução ainda esteja límpida e transparente

- Cobertura com lamínula

Para material com DAB, cobrir adicionando um fio de Permont junto a borda inferior da la-mínula e deitando a lâmina sobre a lamínula com cuidado para expulsar o ar e evitar a for-mação de bolhas. Checar a montagem contra uma superfície escura.

APÊNDICE B - Regiões encefálicas onde foram encontrados neurônios imunorreativos ao FG após injeção no A5.

CASOS ESTUDADOS	N98		N99		N92/N94	
Local de depósito do traçador	A5+ córtexcerebelar		A5 + 7N		A5+LSO	
Hemisfério	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contra-lateral
Região	TELENCEFALO					
Núcleo						
Núcleo central medial da amígdala	+	-	++	-	+	-
Região	DIENCEFALO					
Núcleo	HIPOTÁLAMO					
Área hipotalâmica lateral posterior	+	-	++	+	+	-
Área hipotalâmica lateral tuberal	+	-	++	-	++	-
Área pré-óptica lateral	+	-	++	-	+	+
Área pré-óptica medial	-	-	-	-	+	-
Núcleo hipotalâmico posterior	+	-	+	-	+	+
Núcleo paraventricular magnocelular lateral	++	+	++	+	++	-
Núcleo paraventricular magnocelular medial	+	-	+	-	++	+
Núcleo paraventricular parvocelular medial	+	+	+	+	++	+
Núcleo paraventricular ventral	++	+	++	+	++	+
Núcleo perifornical	++	-	++	-	++	-
Núcleo	SUBTÁLAMO					
Zona incerta rostral	+	-	++	-	+	-
Núcleo	TÁLAMO					
Núcleo geniculado lateral dorsal	+++	-	-	-	-	-
Região	TRONCO ENCEFÁLICO					
Núcleo	MESENCEFALO					
Área pré-cuneiforme	-	-	-	-	++	-
Campo retrorubral	-	-	-	-	+	++
Comissura do colículo inferior*	-	-	-	-	-	+
Córtex dorsal do colículo inferior	-	-	-	-	-	+++
Córtex externo do colículo inferior	++	-	-	++	-	++
Formação reticular mesencefálica	+	-	++	+	++	+
Formação reticular parte ístmico	-	-	+	+	++	+
Núcleo caudal linear da rafe*	-	-	-	+	-	-
Núcleo central do colículo inferior	-	-	+	-	++	++
Núcleo cuneiforme, parte intermédio	+	-	+	-	+	-
Núcleo cuneiforme, parte ventral*	-	+	-	+	-	+
Núcleo da rafe posterodorsal	-	-	+	-	+	+
Núcleo de Darkschewitsch	-	-	+	-	-	-
Núcleo de Edinger-Westphal*	-	+	-	+	++	-
Núcleo do trato acústico central	-	-	+	-	++	-
Núcleo dorsal da rafe*	-	+	-	+	-	+
Núcleo dorsal da rafe, parte dorsal*	-	+	-	+	-	+
Núcleo dorsal da rafe, parte lateral	+	-	+	-	+	+
Núcleo dorsal da rafe, parte ventral*	-	+	-	+	-	+
Núcleo medial acessório do nervo oculomotor	-	-	+	-	-	-
Núcleo parabraquial lateral externo	-	-	++	-	++	-
Núcleo parabraquial lateral interno	-	-	++	-	++	-
Núcleo paralemniscal medial	-	-	+	-	++	-
Núcleo pararubral	-	-	-	-	-	+++
Núcleo pontino	++++	++	-	-	-	-
Núcleo reticular pontino, parte oral	+	+	+	+	+	+
Núcleo retrorubral	-	-	-	-	+	+
Núcleo rostral linear da rafe*	-	-	-	+	-	-
Núcleo rubro magnocelular	-	++++	-	++++	-	++++
Núcleo rubro parvocelular	-	++++	-	++++	-	++++
Núcleo tegmental laterodorsal	-	-	+	-	-	-
Núcleo tegmental laterodorsal parte ventral	-	-	+	-	-	-
Núcleo tegmental pedunculo pontino	+	-	+	+	+	-
Núcleo ventral do lemnisco lateral	-	-	-	-	+++	++

Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral	-	-	-	-	+	+
Substância cinzenta periaquedutal dorsomedial*	-		+		++	
Substância cinzenta periaquedutal lateral	+	-	+++	+	++++	++
Substância cinzenta periaquedutal supraoculomotora	-	-	+	++	+	++
Substância cinzenta periaquedutal ventrolateral	++	-	+++	+	++++	+++
Substância negra dorsal camada compacta	-	-	-	+	-	++
Núcleo	PONTE					
Área tegmental dorsomedial	-	-	-	-	+	++
Células noradrenérgicas A7	-	-	++	+	++	-
locus coeruleus	++	-	++	+	++	+
Núcleo reticular caudal da ponte	-	-	++	++	++	++
Núcleo coclear camada de células granulares	-	-	++	-	++++	-
Núcleo coclear dorsal	+	-	+	-	++++	-
Núcleo de Barrington's	-	-	-	-	+	-
Núcleo do corpo trapezoide	+	-	+	-	+++	+
Núcleo do trato acústico central	-	-	-	-	++	++
Núcleo do trato solitário rostralateral	-	-	-	-	+	-
Núcleo motor do nervo facial	++	-	++++	-	++++	-
Núcleo interpósito da rafe*	+		++		+	
Núcleo Kölliker-fuse	++	-	+++	-	+++	+
Núcleo lateral superior da oliva	+	-	+++	-	+++	-
Núcleo magno da rafe*	-		++		++	
Núcleo palido da rafe*	+		+		++	
Núcleo parabraquial lateral	+	-	++	-	++	+
Núcleo parabraquial lateral crescente	+	-	+++	-	+	+
Núcleo parabraquial lateral dorsal	+	-	++	-	+	+
Núcleo parabraquial lateral parte externa	-	-	-	-	++	-
Núcleo parabraquial lateral parte interna	-	-	++	-	++	-
Núcleo parabraquial lateral, parte central	-	-	-	-	++	+
Núcleo parabraquial medial	-	-	+++	-	+++	+
Núcleo parabraquial medial externo	-	-	++	-	++	-
Núcleo parabraquial ventral	-	-	-	-	++	-
Núcleo paragigantocelular dorsal	-	-	-	-	+	+
Núcleo paragigantocelular lateral	-	-	+	-	++	-
Núcleo paragigantocelular parte alfa	++	-	+	-	++	-
Núcleo paragigantocelular parte externa	-	-	-	-	++	-
Núcleo paraolivar superior	-	-	++	-	++	-
Núcleo pontino reticulotegmental	++++	++++	-	-	-	-
Núcleo reticular gigantocelular	+	-	++	-	++++	-
Núcleo reticular gigantocelular parte alfa*	+		++		++	
Núcleo reticular intermédio parte alfa	+	-	+	-	++	-
Núcleo reticular parvocelular parte alfa	+	+	++	++	++	++
Núcleo reticular pontino parte ventral*	+		+		++	
Núcleo salivatório superior	-	-	++	++	++	++
Núcleo subcelureus parte ventral	+	-	++	+++	+	-
Núcleo subceruleus, parte dorsal	-	-	-	-	++	-
Núcleo supratrigeminal	+	-	+++	-	+++	-
Núcleo trigeminal espinal parte oral	+	-	+	-	++	-
Núcleo trigeminal mesencefálico	+	-	+	-	+	-
Núcleo trigeminal motor, porção tensora do tímpano	+	-	+	-	+++	-
Núcleo trigeminal sensorial principal dorsomedial	+	-	-	-	-	-
Núcleo trigeminal sensorial principal ventrolateral	+	-	+	++	++++	+++
Núcleo ventral do corpo trapezoide	-	-	-	-	+++	++
Núcleo vestibular espinal	++	-	+	-	++	-
Núcleo vestibular medial magnocelular	+	-	+	-	+++	++
Núcleo vestibular medial parvocelular	+	+	-	-	-	-
Núcleo X	+	-	+	-	++	+
Núcleo Y	++	-	+	-	+	-
Região periolivar dorsal	+	-	++	-	+	-

Zona peritrigeminal	-	-	+++	-	-	-
Núcleo	BULBO					
Área postrema*	++		+++		++++	
Área subpostrema	+	-	-	-	++	-
Células adrenérgicas A1	+	-	++	-	++	-
Complexo Botzinger	+	-	+++	-	++	+
Complexo pré-Botzinger	+	-	++	-	-	-
Núcleo ambiguus parte compacta	+	-	++	-	+	-
Núcleo ambiguus parte livre	+	-	++	-	++	-
Núcleo ambiguus parte subcompacto	-	-	-	-	++	+
Núcleo cuneiforme	++	-	-	-	-	-
Núcleo cuneiforme externo	++	-	-	-	-	-
Núcleo de roller	+	+	+	-	+	-
Núcleo do trato solitário comissural	+++	+	+++	-	+++	+
Núcleo do trato solitário dorsolateral	+	-	++	-	++	-
Núcleo do trato solitário dorsomedial	+	-	++	-	++	-
Núcleo do trato solitário gelatinoso	+	-	+++	-	+++	+
Núcleo do trato solitário medial	++	+	+++	++	+++	+
Núcleo do trato solitário parte central	+	-	++	-	++	-
Núcleo do trato solitário parte intersticial	+	-	+	-	+	-
Núcleo do trato solitário ventral	+	-	+++	+	+++	-
Núcleo do trato solitário ventrolateral	+	+	+++	+	+++	+
Núcleo dorsal do nervo vago	++	+	+	-	-	+
Núcleo linear	++++	++++	-	-	-	-
Núcleo obscuro da rafe*		+		+		++
Complexo olivar inferior	-	+++	-	-	-	-
Núcleo páldio da rafe*		-		-		+
Núcleo paragigantocelular lateral	++	++	+++	+	+++	++
Núcleo paragigantocelular lateral parte externo	-	-	-	-	++++	+
Núcleo pré-positos	++	-	-	-	-	-
Núcleo respiratório rostral ventral	+	-	++	+	+	++
Núcleo reticular gigantocelular	+++	+++	+++	+++	+++	++
Núcleo reticular gigantocelular ventral	-	++	+	+	+	++
Núcleo reticular intermediário	+	-	++++	+	++++	+++
Núcleo reticular lateral	++++	+	-	-	-	-
Núcleo reticular lateral subtrigeminal	+++	+++	+	-	++	-
Núcleo reticular medular dorsal	++	+	+++	+	++++	+++
Núcleo reticular medular ventral	++	+	+++	+	++	+++
Núcleo reticular parvocelular	++	-	+++	+	-	-
Núcleo reticular rostroventrolateral	-	-	-	-	+++	-
Núcleo retroambiguus	-	-	-	-	++	+
Núcleo trigeminal espinal caudal	++	-	+	-	+	-
Núcleo trigeminal espinal dorsomedial	+++	-	+	-	+	-
Núcleo trigeminal espinal interpolar	+++	-	+++	-	+++	+
Núcleo trigeminal espinal oral	+	-	+	-	+	-
Núcleo vestibular espinal	++	-	-	-	-	-
Núcleo vestibular medial	+	-	-	-	-	-
Núcleo X	+	-	+	-	+	-
Região da matrix medular	+	+	-	+	+	+
Zona de transição solitário-trigeminal	+	-	+	-	+++	-

Legenda:

Quantidade de somas
pouca (+).
moderada (++)
muita (+++),
elevada (++++).

Provável significado

Prováveis aferências ao A5
Prováveis aferências ao LSO
Prováveis aferências ao córtex cerebelar
Núcleos encontrados somente no caso N99
Núcleos encontrados nos casos N99/ 92 e 94

APÊNDICE C: Regiões encefálicas onde foram encontrados fibras imunorreativas ao BDA após injeção no A5.

REGIÃO	BULBO	
HEMISFÉRIO	Ipsilateral	Contralateral
Núcleo		
Células noradrenérgicas A1	+++	+
Células noradrenérgicas C1	+++	+
Células noradrenérgicas A2	+++	+++
Complexo Botzinger	+++	+
Complexo pré-Botzinger	+++	++
Grupo respiratório rostral ventral	+++	++
Núcleo ambíguo lateral	+++	+
Núcleo ambíguo parte compacto	++	++
Núcleo ambíguo subcompacto	+++	++
Núcleo basal interno	+	+
Núcleo cervical central	+	+
Núcleo cuneiforme	+	-
Núcleo cuneiforme externo	+	+
Núcleo de roller	+	-
Núcleo do nervo acessório	+	+
Núcleo do nervo hipoglosso	++	++
Núcleo do nervo vago	+++	+++
Núcleo do trato solitário central	+++	+++
Núcleo do trato solitário comissural	+++	
Núcleo do trato solitário dorsolateral	+++	+++
Núcleo do trato solitário gelatinoso	+++	++
Núcleo do trato solitário intermédio	++	++
Núcleo do trato solitário intersticial	++	++
Núcleo do trato solitário lateral	+++	++
Núcleo do trato solitário medial	+++	++
Núcleo do trato solitário rostrolateral	++	+
Núcleo do trato solitário ventral	+++	+++
Núcleo do trato solitário ventrolateral	+++	+++
Núcleo grácil	+	-
Núcleo intermédio da medula	++	++
Núcleo mediano acessório da medula	+	
Núcleo medular reticular dorsal	+++	+
Núcleo medular reticular ventral	+++	+
Núcleo obscuro da rafe	++	
Núcleo olivar inferior	+	+
Núcleo pávido da rafe	+	
Núcleo paragigantocelular lateral	++	+
Núcleo parasolitário	+	-
Núcleo prépositos magnocelular	+++	+++
Núcleo reticular caudoventrolateral	+++	++
Núcleo reticular gigantocelular	+++	+++
Núcleo reticular gigantocelular ventral	++	+
Núcleo reticular intermédio	+++	+
Núcleo reticular lateral	+++	-
Núcleo reticular lateral parvocelular	++	-
Núcleo reticular lateral subtrigeminal	++	+
Núcleo reticular paramediano	+	+
Núcleo reticular parvocelular	+++	+
Núcleo reticular rostroventrolateral	+++	+
Núcleo retroambíguo	+++	+
Núcleo trigeminal espinal caudal	++	-
Núcleo trigeminal espinal dorsomedial	++	+
Núcleo trigeminal espinal interpolar	+	+
Núcleo vestibular espinal	++	-
Núcleo vestibular medial magnocelular	+++	+
Núcleo vestibular medial parvocelular	+++	++

Núcleo X	++	+
Núcleo Z	+++	++
Região matrix	++	+
Tranção trigeminal-solitário	+	+
REGIÃO	PONTE	
HEMISFÉRIO	Ipsilateral	contralateral
Núcleo		
Área tegmental dorsomedial	+++	++
Células noradrenérgicas A5	-	+
Células noradrenérgicas A7	+++	+
Complexo nuclear do nervo facial*	+++	++
locus coeruleus	++	+
Núcleo cinzento alfa central	-	-
Núcleo coclear camada de células granulares	++	+
Núcleo coclear dorsal fusiforme	++	+
Núcleo coclear dorsal molecular	++	-
Núcleo coclear dorsal profundo	+++	+
Núcleo coclear ventral anterior	++	+
Núcleo coclear ventral capsular	++	-
Núcleo coclear ventral posterior	++	+
Núcleo coclear ventral posterior, octopus	++	+
Núcleo da raiz coclear	+	-
Núcleo de Barrington's	++	+
Núcleo de Killiker-fuse	+++	++
Núcleo do corpo trapezóide	+++	+
Núcleo do nervo abducente	++	-
Núcleo do trato acústico central	++	+
Núcleo dorsal da rafe caudal	+	
Núcleo interpósito da rafe	+	
Núcleo lateral superior da oliva	+++	-
Núcleo magno da rafe	+++	
Núcleo medial superior da oliva	+++	-
Núcleo pálido da rafe	+	
Núcleo parabraquial lateral	+	-
Núcleo parabraquial lateral central	++	+
Núcleo parabraquial lateral crescente	+++	+
Núcleo parabraquial lateral dorsal	+++	+
Núcleo parabraquial lateral externo	++	+
Núcleo parabraquial lateral interno	+++	+++
Núcleo parabraquial lateral ventral	++	+
Núcleo parabraquial medial	++	+
Núcleo parabraquial medial externo	++	+
Núcleo paragigantocelular dorsal	+++	+
Núcleo paraolivar superior	+++	-
Núcleo pontino da rafe	+	+
Núcleo prepositos	-	-
Núcleo reticular caudal da ponte	++	++
Núcleo reticular gigantocelular alfa	+++	
Núcleo reticular intermédio	+++	+
Núcleo reticular intermedio alfa	+++	+
Núcleo reticular paragigantocelular alfa	++	+
Núcleo reticular paragigantocelular externa	++	+
Núcleo reticular parte oral	+++	++
Núcleo reticular parvocelular alfa	+++	+
Núcleo reticular ventral	++	
Núcleo reticulotegmental da ponte	++	++
Núcleo reticulotegmental lateral da ponte	+	+
Núcleo subcoeruleus parte alfa	++	+
Núcleo subcoeruleus parte dorsal	++	+
Núcleo subcoeruleus parte ventral	+++	+
Núcleo supragenua	+	+
Núcleo supratrigeminal	++	+
Núcleo tegmental dorsal central	+	+
Núcleo tegmental laterodorsal	++	+

Núcleo tegmental laterodorsal ventral	++	+
Núcleo tegmental posterodorsal	+	+
Núcleo trigeminal espinal oral	++	-
Núcleo trigeminal motor	+++	+
Núcleo trigeminal motor tensor do tímpano	+++	+
Núcleo trigeminal sensorial principal dorsomedial	+++	-
Núcleo trigeminal sensorial principal ventrolateral	+++	+
Núcleo ventral do corpo trapezóide	++	+
Núcleo ventral do lemnisco lateral	+++	+
Núcleo vestibular lateral	++	++
Núcleo vestibular superior	++	+
Núcleo X	++	+
Núcleo Y	-	-
Região periolivar dorsal	+++	+
Zona peritrigeminal	+++	+
REGIÃO	MESENCÉFALO	
HEMISFÉRIO	Ipsilateral	contralateral
Núcleo		
Área cinzenta periaquedutal dorsomedial	+	
Área cinzenta periaquedutal supracolomotora	+	+
Área cinzenta periaquedutal ventrolateral	+++	++
Área cinzenta periaquedutal lateral	+++	++
Área cinzenta periaquedutal dorsolateral	+	+
Área noradrenérgica A7	++	-
Área tegmental ventral	+++	+
Camada braca intermédia do colículo superior	+	-
Camada branca profunda do colículo superior	+	
Camada cinza intermédia do colículo superior	+	+
Camada cinza profunda do colículo superior	+	
Campo retrorubral	+++	++
Córtex dorsal do colículo inferior	+	-
Córtex externo do colículo inferior	+	-
Formação reticular istímica	+++	+++
Formação reticular mesencefálica	++	+++
Formação reticular p1	++	++
Núcleo caudal linear da rafe	+	
Núcleo central do colículo inferior	++	+
Núcleo cuneiformedorsal	+	+
Núcleo cuneiforme intermédio	++	+
Núcleo cuneiforme ventral	++	+
Núcleo da rafe posterodorsal	+	+++
Núcleo de Darkschewitsch	-	+
Núcleo de Edinger-Westphal	+	
Núcleo do braço do colículo inferior	+	-
Núcleo do trato acústico central	++	+
Núcleo dorsal da rafe parte caudal	++	
Núcleo dorsal da rafe parte dorsal	++	
Núcleo dorsal da rafe parte lateral	+	++
Núcleo dorsal da rafe parte ventral	+	
Núcleo dorsal do lemnisco lateral	+++	++
Núcleo interfascicular	+	
Núcleo intermédio do lemnisco lateral	+++	+
Núcleo interpeduncular sub apical	+	+
Núcleo interpeduncular dorsolateral	+	+
Núcleo intersticial de Cajal	++	++
Núcleo intersticial de Cajal, shell	+	+
Núcleo mediano da rafe	++	
Núcleo mesencefálico profundo	-	-
Núcleo oculomotor	+	++
Núcleo oculomotor medial acessório	-	+
Núcleo oculomotor parvocelular	+	+++
Núcleo paralemniscal medial	+++	+
Núcleo paramediano da rafe	+	+
Núcleo paranigral da área tegmental ventral	+	+

Núcleo parabrual	+	+
Núcleo pedunculopontino	++	+
Núcleo perilemniscal parte ventral	+	-
Núcleo periolivar medioventral	+	+
Núcleo peripeduncular	+	+
Núcleo pigmentado parabraquial	+++	++
Núcleo pontino	+	+
Núcleo pré-cuneiforme	++	+
Núcleo retrorubral	+++	++
Núcleo rostral linear da rafe	+++	
Núcleo rubro magnocelular*	+	+++
Núcleo rubro parvocelular*	-	++
Núcleo subbraquial	-	+
Núcleo supraoculomotor	+	+++
Núcleo supraoculomotor cap	+	++
Núcleo tegmental dorsal pericentral	+	+
Núcleo tegmental microcelular	+	+
Núcleo tegmental subpeduncular	+	+
Núcleo tegmental ventral	++	-
Núcleo triangular do lemnisco lateral	++	+
Núcleo trigeminal mesencefálico	+	+
Núcleo troclear	+	++
Núcleo ventral do lemnisco lateral	+++	++
Substância negra parte reticular	+	+
Substância negra compacta	+	+
Substância negra compacta dorsal	+	+
Substância negra lateral	+	-
REGIÃO	CEREBELO	
HEMISFÉRIO	Ipsilateral	contralateral
Núcleo		
1s lobulo cerebelar (lingula)	+	
Núcleo interposito anterior	++	+
Núcleo interposito dormomedial	++	+
Núcleo interposito dorsolateral	+	-
Núcleo lateral (denteado)	++	-
Núcleo lateral (denteado) parvocelular	+	-
Núcleo medial (fastigial)	++	+
Núcleo medial, protuberância dorsolateral	-	-
Núcleo vestibulocerebelar	++	+
REGIÃO	DIENCÉFALO TÁLAMO	
HEMISFÉRIO	Ipsilateral	contralateral
Núcleo		
Núcleo centralmedial	++	
Núcleo centrolateral	+	+
Núcleo geniculado medial, parte medial	+	+
Núcleo geniculado medial, parte ventral	+	-
Núcleo interanteromedial	++	
Núcleo intralaminar	+	++
Núcleo paraventricular do tálamo, anterior	+	-
Núcleo paraventricular do tálamo, posterior	++	
Núcleo reuniens	++	
REGIÃO	DIENCÉFALO SUBTÁLAMO	
HEMISFÉRIO	Ipsilateral	contralateral
Núcleo		
Zona incerta dorsal	++	+
Zona incerta ventral	++	+
REGIÃO	DIENCÉFALO HIPOTÁLAMO	
HEMISFÉRIO	Ipsilateral	contralateral
Núcleo		
Área hipotalâmica anterior, parte central	+	-
Área hipotalâmica lateral, parte tuberal	+++	++

Área hipotalâmica posterior, parte dorsal	+	
Área pré-óptica lateral	+	+
Eminência mediana, lâmina interna	+	
Núcleo dorsomedial do hipotálamo	+	-
Núcleo perifornical	+	+
REGIÃO	TELENCÉFALO	
	COMPLEXO AMIGDALÓIDE	
HEMISFÉRIO	ipsi	cont
Núcleo		
Área amigdalóide anterior	-	+
Córtex piriforme	+	-
Núcleo basomedial anterior	+	-
Núcleo medial anterodorsal	+	-
Núcleo medial anteroventral	+	-
Núcleo medial posterodorsal	++	-
REGIÃO	TELENCÉFALO	
	STRIATUM	
HEMISFÉRIO	ipsilateral	contralateral
Núcleo		
Caudado putamen	+	+
Pálido ventral	+++	+
REGIÃO	TELENCÉFALO	
	BANDA DIAGONAL	
HEMISFÉRIO	ipsilateral	contralateral
Núcleo horizontal da banda diagonal	++	+
Núcleo vertical da banda diagonal	++	+
REGIÃO	TELENCÉFALO	
	ESTRIA TERMINAL	
HEMISFÉRIO	ipsilateral	contralateral
Núcleo da divisão lateral, intermédia	+	+
Núcleo da divisão lateral, ventral	++	+

Legenda:

Quantidade de fibras nervosas marcadas

+ = pouca densidade

++ = moderada densidade

+++ = alta densidade

APÊNDICE D: Resultado do Teste de normalidade e Teste t não paramétrico para os dados de densidade neuronal.

TESTE DE NORMALIDADE VCN	Lesão	Controle
Distancia KS	0,1431	0,2157
Valor de P	P > 0.10	P > 0.10
Passou no teste de Normalidade (*=0.05)?	Yes	Yes
resumo do valor de P	ns	ns

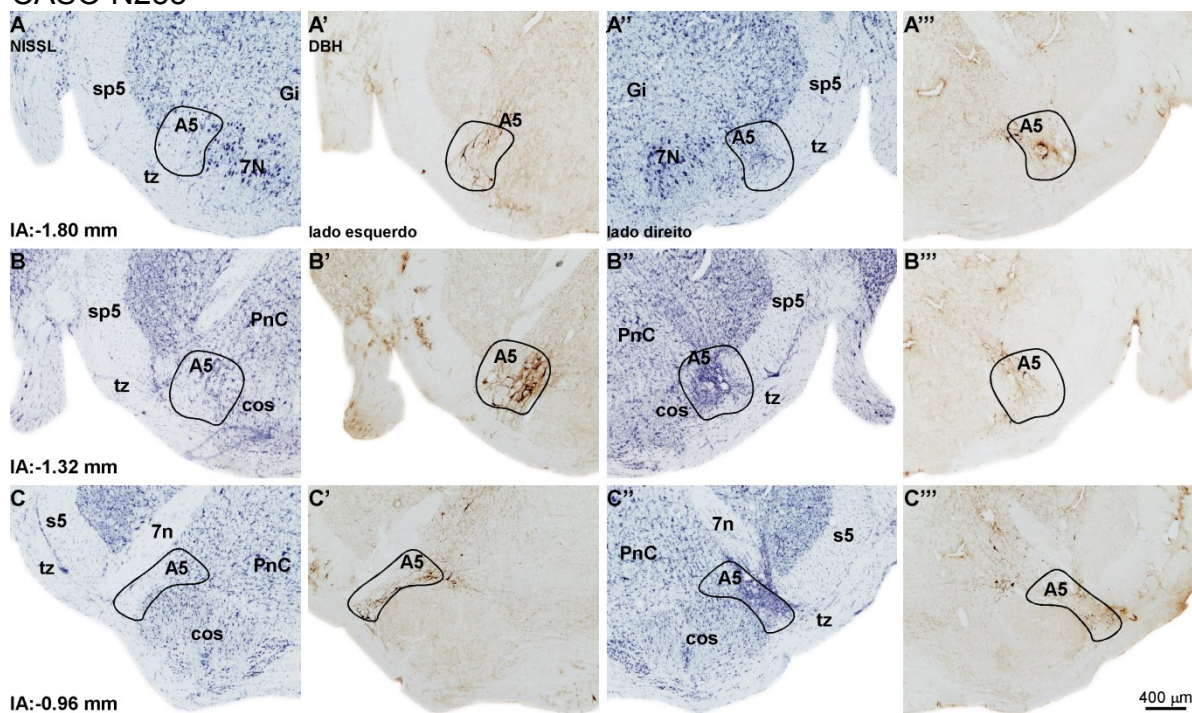
Parâmetro VCN LESÃO N=14 X CONTROLE N=6	Valor
teste t não pareado	
valor de P	0,2563
As médias são significamente diferentes? (P < 0.05)	Não
Uma ou Duas caudas o valor de P?	Duas caudas
t, df	t=1.169 df=20
Quão grande é a diferença?	
Média ± SEM da coluna A	0.00000002734 ± 0.000000003937 N=14
Média ± SEM da coluna B	0.00000001923 ± 0.000000003994 N=6
Diferença entre as médias	0.000000008104 ± 0.000000006935
95% intervalo de confiança	-0.00000002257 to 0.000000006363
Raiz quadrada	0,06391
test F para comparar as variâncias	
F,DFn, Dfd	2.591, 15, 5
valor de P	0,1493
resumo do valor de P	ns
As variâncias são significativamente diferentes?	Não

TESTE DE NORMALIDADE DCN	Lesão	Controle
Distancia KS	0,2862	0,2767
Valor de P	P > 0.10	P > 0.10
Passou no teste de Normalidade (*=0.05)?	Yes	Yes
resumo do valor de P	ns	ns

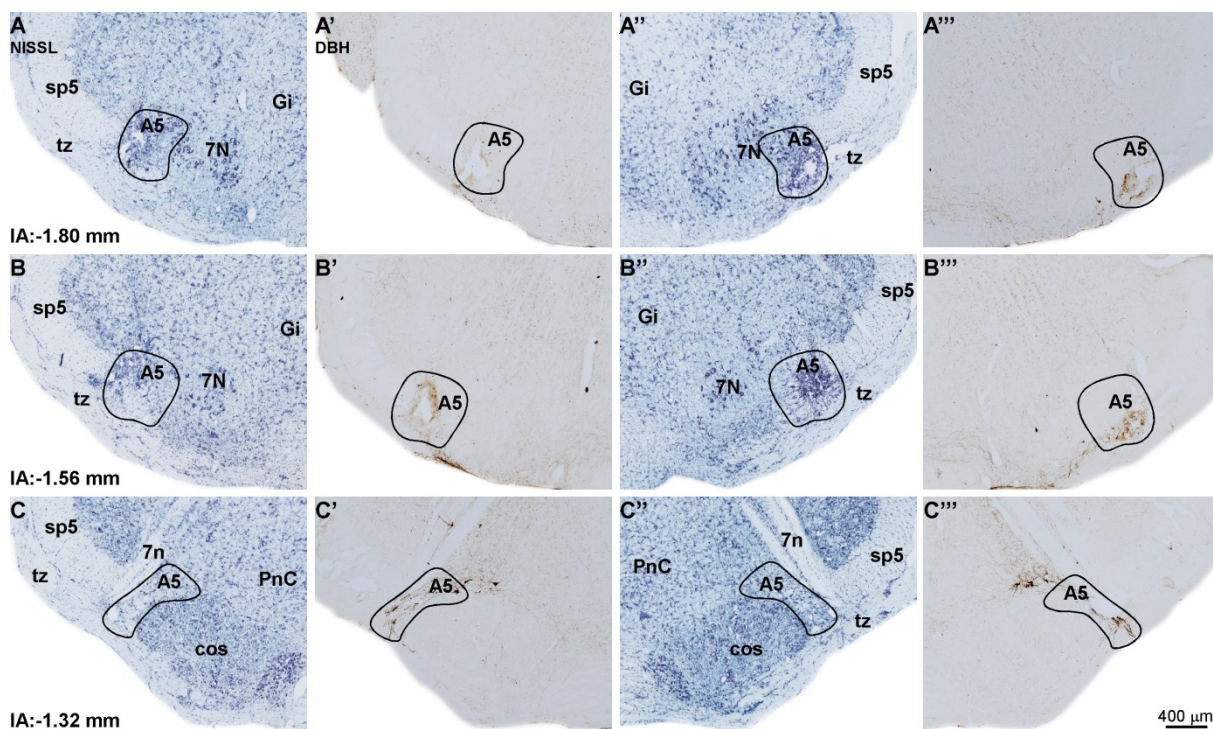
Parâmetro DCN LESÃO N=16 X CONTROLE N=6	Valor
teste t não pareado	
valor de P	0,468
As médias são significamente diferentes? (P < 0.05)	Não
Uma ou Duas caudas o valor de P?	Duas caudas
t, df	t=0.7398 df=20
Quão grande é a diferença?	
Média ± SEM da coluna A	0.00000004414 ± 0.000000004209 N=14
Média ± SEM da coluna B	0.00000004957 ± 0.000000003864 N=6
Diferença entre as médias	-0.000000005429 ± 0.000000007339
95% intervalo de confiança	-0.00000000988 to 0.00000002074
Raiz quadrada	0,02663
test F para comparar as variâncias	
F,DFn, Dfd	3.165, 15, 5
valor de P	0,1043
resumo do valor de P	ns
As variâncias são significativamente diferentes?	Não

APÊNDICE E: Casos experimentais de lesão no A5

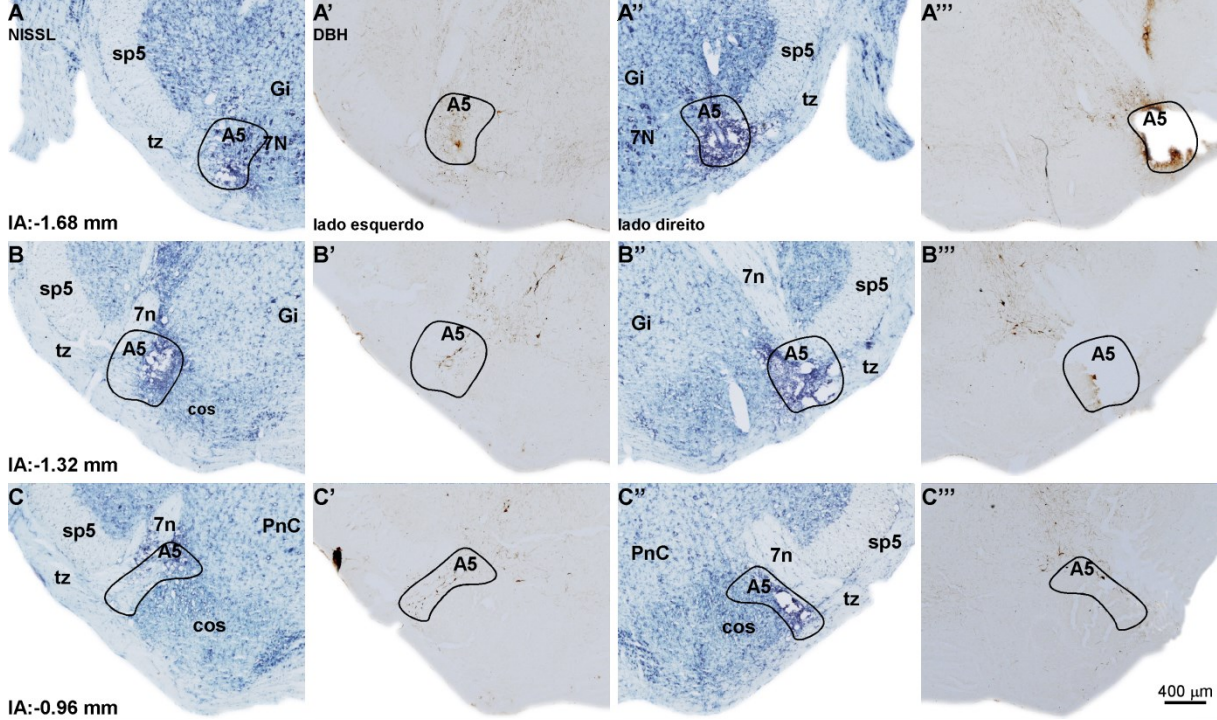
CASO N255



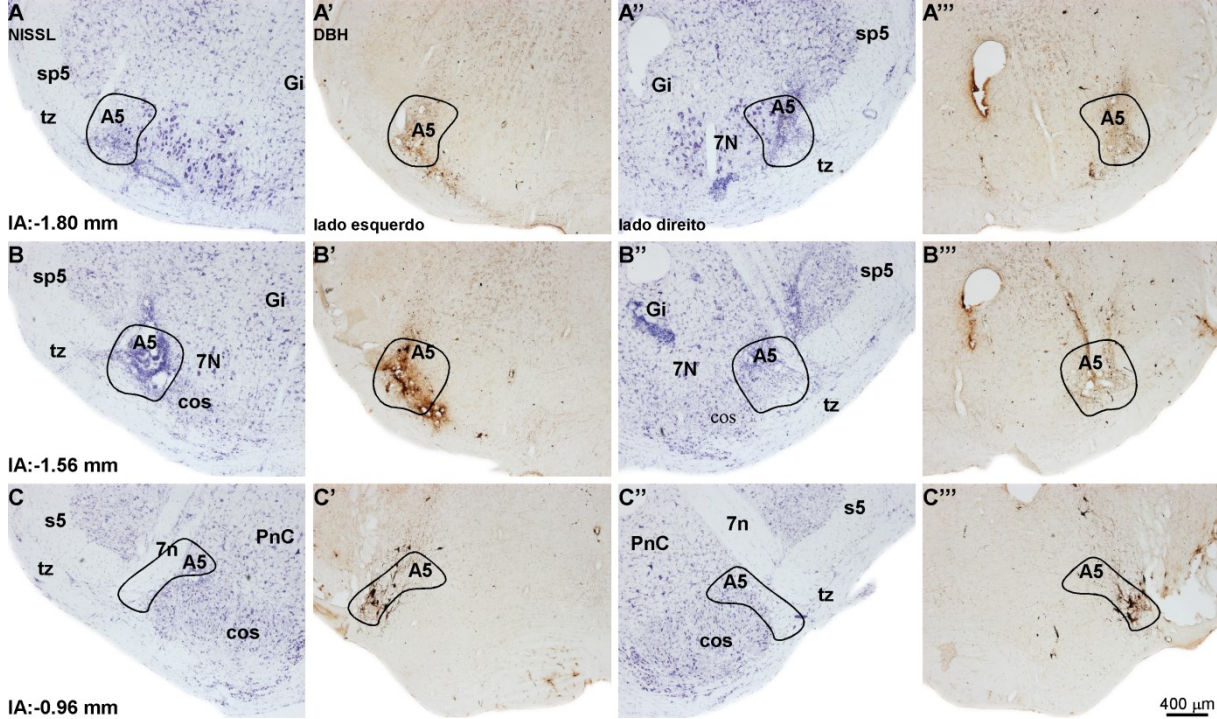
CASO N 265



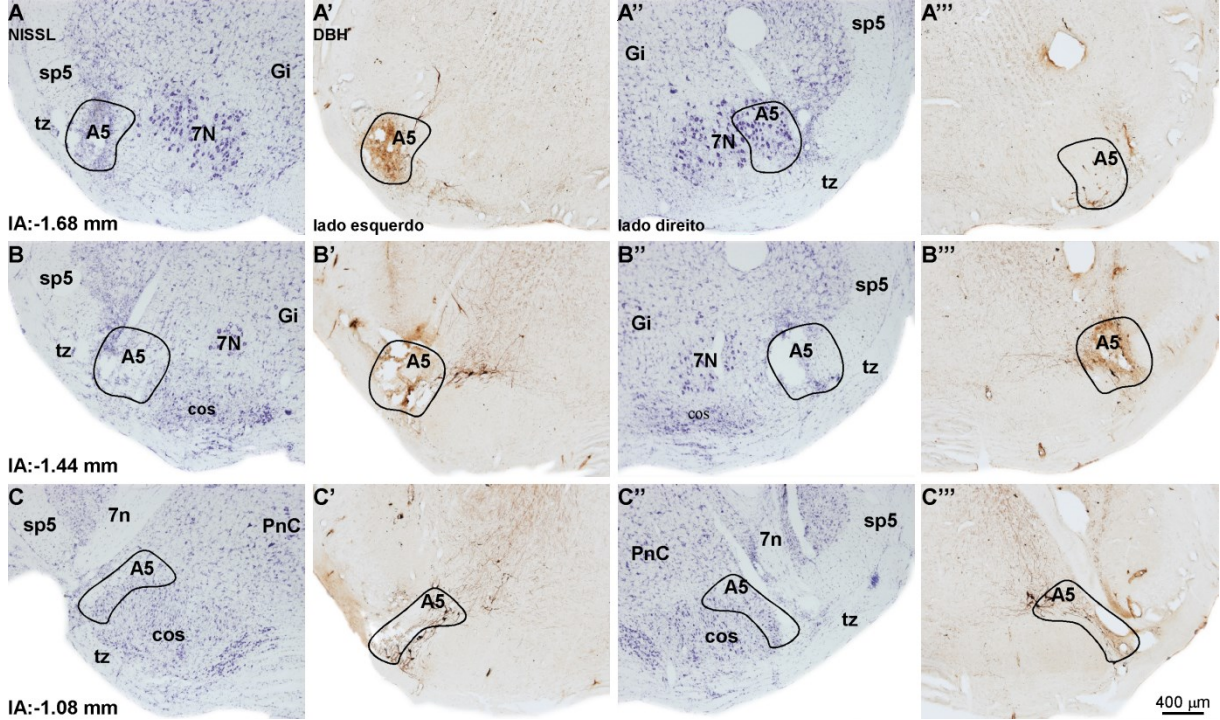
CASO N266



CASO N377



CASO N379



CASO N385

