



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU



Michelle de Souza Ferreira

**ESTUDO DO EFEITO DE LESÕES SELETIVAS NO GRUPAMENTO NORADRENÉRGICO A5 NO
REFLEXO AUDITIVO DE SOBRESSALTO E NA INIBIÇÃO POR ESTÍMULO PRÉVIO**

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

**BOTUCATU
2014**



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



Michelle de Souza Ferreira

**ESTUDO DO EFEITO DE LESÕES SELETIVAS NO GRUPAMENTO NORADRENÉRGICO A5 NO
REFLEXO AUDITIVO DE SOBRESSALTO E NA INIBIÇÃO POR ESTÍMULO PRÉVIO**

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

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

BOTUCATU
2014

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

Ferreira, Michelle de Souza.

Estudo do efeito de lesões seletivas no grupamento noradrenérgico A5 no reflexo auditivo de sobressalto e na inibição por estímulo prévio / Michelle de Souza Ferreira. - Botucatu, 2014

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas - Bacharelado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José de Anchieta de Castro e Horta Junior
Capes: 20604009

1. Noradrenalina. 2. Neuroreguladores. 3. Neurônios. 4. Reflexos. 5. Tronco encefálico. 6. *Locus Coeruleus*.

Palavras-chave: CART; grupamento noradrenérgico A5; PPI; neuropeptídeo Y; reflexo auditivo de sobressalto.

DEDICATÓRIA

À minha mãe Elisabete, ao meu avô de coração Kurt e ao meu tio Otávio (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Elisabete e José, as minhas tias Marta, Florice, Leonor, Herculana e Beatriz por sempre acreditarem em mim e o quão longe eu poderia ir, pelo apoio a mim sempre dado, de todas as formas, pelo incentivo a sempre continuar firme e nunca desistir de meus sonhos.

Ao meu avô de coração Kurt pelas conversas inspiradoras e sábias que sempre me motivaram a buscar mais e mais conhecimento.

Ao meu namorado Paulo, pela paciência, pelo amor, pela companhia que foram de grande importância para mim durante todo o meu trabalho.

As minhas companheiras e amigas de casa e faculdade Gabriela, Mariana e Tamiris, pela compreensão, pelas risadas e os grandes momentos juntas. Por terem sido a minha família durante a faculdade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior que me ensinou e me orientou com dedicação e paciência, enriquecendo o meu conhecimento científico.

Aos meus companheiros do Laboratório de Neuromorfologia do Departamento de Anatomia IBB - UNESP, André, Carla, Marina, Nicole e Rian que me ensinaram, me socorreram sempre quando precisei, além de tudo, compartilhei risadas e bons momentos.

Ao Departamento de Anatomia, onde realizei a minha iniciação científica, além dos funcionários deste aos quais sempre se disponibilizaram a me ajudar quando solicitado.

Aos meus professores, os quais foram a base de todo o meu aprendizado, sendo de muita importância em toda a minha trajetória.

“Ninguém sabe aquilo que é capaz de fazer antes de ter tentado.”

Públio Siro

RESUMO

Os neurônios da raiz coclear são os primeiros neurônios do sistema nervoso central a receber a informação auditiva proveniente da cóclea e conectam-se com centros de integração sensoriomotora do tronco encefálico, especialmente com o núcleo reticular caudal da ponte. Funcionalmente os neurônios da raiz coclear estão envolvidos no circuito elementar do reflexo auditivo de sobressalto (RAS) juntamente com as células ganglionares do órgão de Corti, o núcleo reticular caudal da ponte e os motoneurônios da medula espinal. O RAS apresenta uma série de modulações como a habituação, a sensibilização, a inibição por estímulo prévio e a potenciação por um estímulo adverso. As alterações na reação reflexa de sobressalto em suas diferentes modulações possuem valor diagnóstico na clínica médica de enfermidades neurodegenerativas e psiquiátricas como Parkinson e esquizofrenia. As modulações do RAS ocorrem mediante a influência de diversos núcleos sobre os componentes do circuito elementar deste reflexo. O núcleo menos estudado do circuito neural do RAS é o núcleo da raiz coclear. O padrão de conectividade eferente dos neurônios da raiz coclear é bem conhecido porém pouco se conhece sobre as origens de suas aferências e a identidade neuroquímica das mesmas. Estudos prévios demonstraram que o soma e os dendritos dos neurônios da raiz coclear estão cobertos por botões sinápticos de quatro tipos sugerindo que existam diversas origens para estes terminais axônicos, com características neuroquímicas próprias. Experimentos recentes em nosso grupo de pesquisa identificaram aferências aos CRN provenientes de duas importantes regiões noradrenérgicas do tronco encefálico: a região do grupamento noradrenérgico A5 (A5) e o *locus coeruleus* (LC). Contudo para o grupamento A5 não existem estudos comportamentais a respeito de aspectos funcionais desta conexão. Além disso, buscando averiguar a participação de neuropeptídeos na modulação do RAS, encontramos na literatura relatos sobre a co-existência de noradrenalina com o neuropeptídeo transcrito e regulado pela cocaína e anfetamina (CART) e neuropeptídeo Y (NPY) no tronco encefálico de roedores. Por este motivo neste trabalho estudamos o envolvimento da região noradrenérgica A5 com o circuito neural do RAS, especialmente com neurônios da raiz coclear, utilizando técnicas de citoarquitetura, imunohistoquímica e avaliação as alterações comportamentais do RAS após a lesão seletiva do grupamento noradrenérgico A5, além da distribuição de NPY no tronco encefálico e CART na região noradrenérgica A5, de ratos Wistar fêmeas, adultas. Os resultados indicam que nos casos de lesão da região A5 não há diferenças entre os grupos Sham e Lesão quando comparados nos mesmos momentos e intervalos interestímulos. No grupo Lesão diferentemente do que ocorre no grupo Sham a lesão da região A5, com o passar do tempo, provoca aumento da PPI nos intervalos entre estímulos longos, de 100 e 150ms. A região do A5, LC, PnC e DR recebem aferências NPY-érgicas. Dentre estes núcleos também foram identificados somas imunorreativos no LC e no DR. O CART foi encontrado em grande quantidade de fibras nervosas e alguns somas na região do A5, estando co-localizado com neurônios noradrenérgicos e aferentes a raiz coclear. Desta forma, confirma-se a participação do NPY e do CART na identidade neuroquímica de núcleos relacionados com o circuito do RAS e suas modulações.

Palavras-chave: neuropeptídeo Y; CART ; reflexo auditivo de sobressalto; PPI e grupamento noradrenérgico A5

ABSTRACT

The cochlear root neurons are the first neurons of the central nervous system to receive auditory information from the cochlea and connect with sensorimotor integration centers of the brainstem, in particular the reticular pontine caudal nucleus. Functionally, the cochlear root neurons are involved in elementary circuit of the acoustic startle reflex, which is composed by the ganglion cells of the organ of Corti, the reticular pontine caudal nucleus and the motor neurons of the spinal cord. The acoustic startle reflex presents a series of modulations such as habituation, sensitization, prepulse inhibition and potentiation by an adverse stimulus. Changes in reflex reaction and in its different modulations have diagnostic value in the clinic of neurodegenerative and psychiatric diseases such as Parkinson's and schizophrenia. The modulations of the acoustic startle reflex occur by the influence over nuclei of the elementary circuit of this reflex. The nucleus least studied in the startle reflex neural circuit is the cochlear root nucleus. The pattern of efferent connectivity of the cochlear root neurons is well known but little is known about the origins of their afferent and the neurochemical identity of that. Previous studies have demonstrated that dendrites and soma of the neurons of the cochlear root synaptic buttons are covered by the four types suggesting that there are several sources for these axon terminals, with its own neurochemical characteristics. Recent experiments in our research group identified afferents to CRN from two important noradrenergic regions of the brainstem: the noradrenergic group A5 (A5) and the *locus coeruleus* (LC). However for the A5 grouping there are no behavioral studies on functional aspects of this connection. Furthermore, in order to determine the involvement of neuropeptide modulation of the RAS, there are reports in the literature on co-existence with the transcript of noradrenaline and neuropeptide regulated by cocaine and amphetamine (CART) and neuropeptide Y (NPY) in the brainstem of rodents. Therefore in this work we study the involvement of noradrenergic region A5 with the neural circuit of the acoustic startle reflex, especially with cochlear root neurons using cytoarchitecture techniques, immunohistochemistry and review the behavioral changes of the auditory startle reflex after selective damage to the noradrenergic group A5, besides the NPY distribution in the brain stem and CART in the noradrenergic region A5 of female Wistar adult rats. The results indicate that the A5 lesions show no differences between the lesion and sham groups when comparing the same inter stimulus intervals. In contrast to what occurs in Sham group, the session in the region A5, over time, causes PPI increase in long inter stimulus intervals, such 100 and 150ms. The region of the A5, LC, PnC and DR receive NPY-ergic afferents. Among these nuclei immunoreactive somas were also identified in LC and DR. The CART was found in lot of nerve fibers and some somas in the A5 region and were co-localized with noradrenergic afferents to cochlear root neurons. Thus, it is confirmed the participation of NPY and CART in the neurochemical identity of nuclei related to the RAS circuit and its modulations.

Keywords: neuropeptide Y; CART ;acoustic startle reflex; PPI e noradrenergic group A5

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
INTRODUÇÃO	10
OBJETIVO	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
<i>Animais de experimentação e seu manuseio</i>	16
<i>Procedimentos experimentais</i>	17
<i>Estudo comportamental da avaliação do reflexo auditivo de sobressalto e inibição por estímulo prévio após lesão seletiva na área noradrenérgica A5</i>	17
<i>Identificação neuroquímica das aferências à raiz coclear</i>	19
<i>Mapeamento dos neurônios do A5 aferentes aos CRN (FG) e neuroquimicamente identificados (DBH e CART)</i>	20
Distribuição de NPY no tronco encefálico.....	20
<i>Análise das preparações histológicas e fotodocumentação</i>	21
RESULTADOS	21
<i>Estudo comportamental da avaliação do reflexo auditivo de sobressalto e inibição por estímulo prévio após lesão seletiva na área noradrenérgica A5</i>	21
Distribuição de NPY no tronco encefálico.....	23
<i>Mapeamento dos neurônios do A5 aferentes aos CRN (FG) e neuroquimicamente identificados (DBH e CART)</i>	24
DISCUSSÃO.....	31
BIBLIOGRAFIA	32
Apêndices.....	36
Apêndice A – Protocolo imunoistoquímica para fluorescência.....	37
Apêndice B – Protocolo imunohistoquímica NPY	39
Apêndice C – Protocolo para mensuração do reflexo acústico de sobressalto.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

5n – nervo trigêmeo	FG – Fluoro-Gold®
7n – nervo facial	g7 – joelho do nervo facial
µm – micrometro	GABA – ácido γ-aminobutírico
A5 – grupo noradrenérgico A5	GAD65 – descarboxilase do ácido glutâmico isoforma de 65K Daltons
ABC – complexo avidina biotina peroxidase	GAD67 – descarboxilase do ácido glutâmico isoforma de 67K Daltons
asc7 – núcleo facial acessório	Gi – núcleo reticular gigante celular
BC – espira basal da cóclea	GiA – parte alfa do núcleo reticular gigantocelular
BDA – dextrano biotilado	Hz - Hertz
BSA – albumina de soro bovino	icp – pedúnculo cerebelar inferior
C1 – células adrenérgicas C1	kHz – quilohertz
CART - transcrito regulado pela cocaína e anfetamina	LC – locus coeruleus
CG – substância cinzenta central	LPB – núcleo parabraquial lateral
CI – colículo inferior	LPGi – núcleo paragigantocelular lateral
Chat – colina acetiltransferase	LSO – núcleo olivar superior lateral
cm – centímetros	mA – miliampère
CPu – núcleo estriado	mcp – pedúnculo cerebelar médio
CRN – neurônios da raiz coclear do nervo vestibulo-coclear	MCH – hormônio concentrador de melanina
DAB – 3,3' diaminobenzidina tetrahydroclereto	Me5 – núcleo mesencefálico do nervo trigêmeo
DAT – transportador de dopamina	ml – lemnisco medial
dB – Decibel	mlf – fascículo longitudinal medial
DBH – dopamina β-hidroxilase	MNTB – núcleo medial do corpo trapezóide
DC – núcleo coclear dorsal	Mot5 – núcleo motor do nervo trigêmeo
DR – núcleo dorsal da rafe	Mot7 – núcleo motor do nervo facial
EVe – núcleo eferente vestibular	ms – milissegundo
FA – frequência alta	MSO – oliva superior medial
FB – frequência baixa	MVe – núcleo vestibular medial
FM – frequência baixa	NA – noradrenalina

NaCl – cloreto de sódio	Sp5C – núcleo trigemial espinal, parte caudal
NPY – neuropeptídeo Y	sp5 – trato espinal do nervo trigêmeo
PAG – substância cinzenta periaquedutal	SPL – <i>sound pressure level</i> (nível de pressão de som)
PnC – núcleo reticular caudal da ponte	SPTg – núcleo tegmental subpeduncular
PnO – núcleo reticular oral da ponte	Sol – núcleo do trato solitário
PPI – inibição por estímulo prévio	SpVe – núcleo vestibular espinal
Pr – núcleo prepósito	SubCV – núcleo subceruleus, parte ventral
py – trato piramidal	SuVe – núcleo vestibular superior
RAS – reflexo auditivo de sobressalto	TBS-Tx – tampão Tris salino com Triton-X 100
RB – ruído branco	TH – tirosina hidroxilase
RC – raiz coclear	tz – corpo trapezoide
RMg – núcleo magno da rafe	VC – núcleo coclear ventral
RPa – núcleo pálido da rafe	VCA – núcleo coclear ventral anterior
RrTgL – núcleo reticulotegmental da ponte, parte lateral	VCP – núcleo coclear ventral posterior
SC – colículo superior	VGat – transportador vesicular de GABA e glicina
SMI-32 – anticorpo contra neurofilamento H	VGlut1 – transportador vesicular de glutamato
SubP – área subpostrema	VLtG – área tegmental ventrolateral
Sol – núcleo do trato solitário	VNTB – núcleo ventral do corpo trapezóide
Sp5 – núcleo do trato espinal do nervo trigêmeo	

INTRODUÇÃO

Os neurônios da raiz coclear (CRN) situam-se periféricamente aos núcleos cocleares (López et al., 1993; Aitkin, 1995; 1996), formando um grupo de aproximadamente cinquenta células (entre 30 e 38µm de diâmetro), em cada antímero do tronco encefálico (Figura 1). São os primeiros neurônios a receberem as aferências auditivas do órgão de Corti (Osen et al., 1991) e são identificados com facilidade em secções histológicas do tronco encefálico em roedores e marsupiais (López et al., 1993; Aitkin, 1995).

Os CRN formam o primeiro grupo de neurônios a receberem aposições dos aferentes cocleares primários no sistema nervoso central (Harrison et al., 1962). Possuem dendritos dispostos em duas direções: paralelamente e perpendicularmente às fibras aferentes cocleares primárias (Merchán et al., 1988). Esses dendritos perpendiculares são especialmente extensos e cruzam praticamente toda a extensão da raiz coclear na direção transversal e, por seu padrão de ramificação dendrítica, cada CRN se conecta com uma grande quantidade de colaterais provenientes de fibras nervosas de quase todo o órgão de Corti (Osen et al., 1991). Assim, os CRN são estimulados por um amplo espectro de frequências acústicas, embora o menor limiar de excitação seja para frequências ao redor de 30kHz (Sinex et al., 2001).

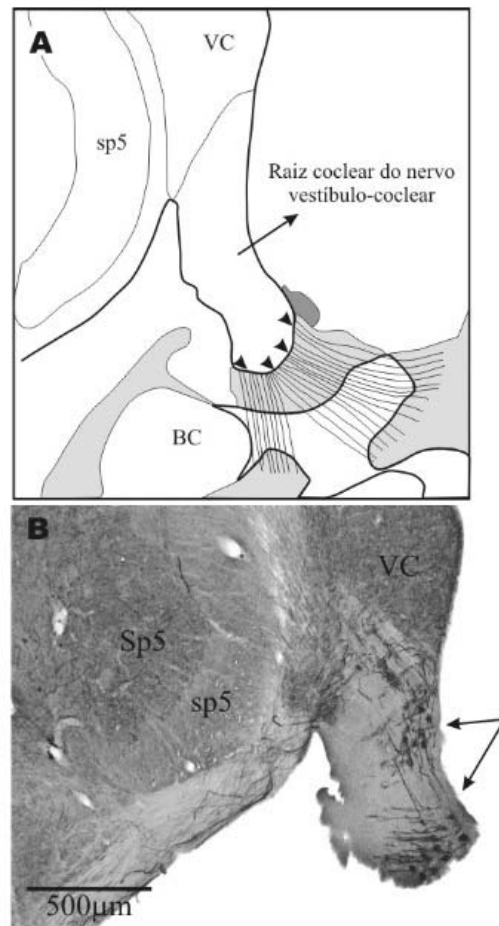


Figura 1. Esquema e fotomicrografia da raiz coclear. Em A, esquema da raiz coclear do nervo vestibulo-coclear em corte coronal e parte da espira basal. As pontas de setas indicam a borda glial que delimita a raiz coclear. Em B, fotomicrografia de corte coronal do tronco encefálico após protocolo de imuno-histoquímica para neurofilamentos SMI-32, evidenciando a raiz coclear e os neurônios da raiz coclear (CRN, setas). Fonte: HORTA-JÚNIOR, J. A. C.; LÓPEZ, D. E.; BITTENCOURT, J. C. Conexão monossináptica entre os neurônios da raiz coclear do nervo vestibulo-coclear e os motoneurônios auriculares do núcleo motor do nervo facial. Salamanca, 2008. 129 p.

Os CRN conectam-se com núcleos de integração sensório-motora da formação reticular (López et al., 1999), especialmente com o núcleo reticular caudal da ponte (PnC), ou diretamente com o núcleo motor no nervo facial (Horta-Júnior et al., 2008). Por sua posição e padrão de conectividade (Figura 2), os CRN foram relacionados funcionalmente com o circuito do reflexo auditivo de sobressalto (RAS, Figura 3), hipótese confirmada por Lee et al. (1996). No rato, o circuito neural elementar do RAS é constituído pelas células ganglionares do órgão de Corti, os CRN, os neurônios do PnC e os motoneurônios da medula espinal (Lee et al., 1996; Koch, 1999).

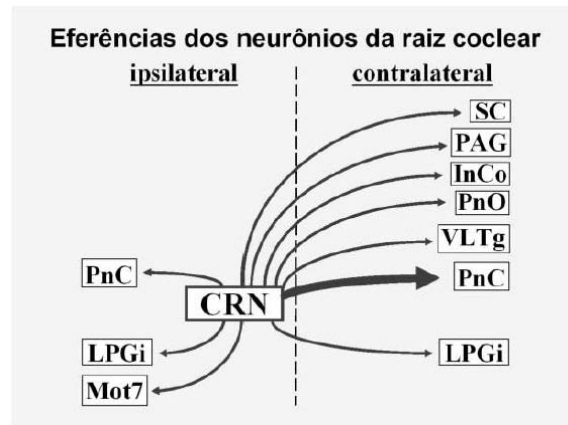


Figura 2. Esquema das eferências dos CRN. A seta mais espessa indica a projeção mais exuberante. Para as abreviaturas, veja a lista de abreviaturas. Fonte: material didático elaborado no grupo de pesquisa neurociências: imunohistoquímica, citoarquitetura e conectividade de centros neurais em primatas e roedores.

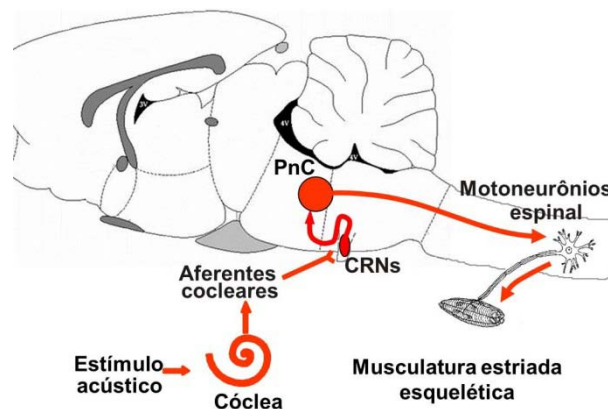


Figura 3. Esquema do circuito neural elementar responsável pelo desencadeamento do reflexo auditivo de sobressalto (RAS). Fonte: material didático elaborado no grupo de pesquisa neurociências: imunohistoquímica, citoarquitetura e conectividade de centros neurais em primatas e roedores.

O RAS é uma reação motora rápida e intensa que culmina na contração da musculatura estriada esquelética da face e do corpo como um todo frente a um estímulo acústico inesperado e de alta intensidade (Koch, 1999). Ele apresenta um componente vegetativo, mediado pelo sistema nervoso autônomo, que se manifesta através do aumento da pressão arterial, bem como da frequência cardíaca (Landis & Hunt, 1939; Baudrie et al., 1997; Koch, 1999). Trata-se de um reflexo acústico-motor do tronco encefálico que está presente em diversas espécies de mamíferos, inclusive no homem. Primariamente, possui um caráter defensivo a uma provável agressão ou de alerta perante acontecimentos inesperados (Keay et al., 1988).

No homem, o sobressalto é descrito como uma contração generalizada da musculatura estriada esquelética, majoritariamente da face, pescoço e parte proximal do membro superior (Brown, 1995). Em contrapartida, em ratos, o reflexo se apresenta de maneira mais ampla, com o encurtamento do comprimento total do animal, através da contração dos membros e flexão do pescoço. Essas contrações musculares generalizadas permitem que o animal assuma uma postura defensiva, protegendo partes importantes do seu corpo, como face, pescoço e abdome.

Através de eletromiografia, constatou-se que a latência desse reflexo é de apenas 8ms no rato (Davis et al., 1982) e entre 5 e 10ms no homem (Koch, 1999). Essa latência condiz com o fato de os axônios dos CRN serem extremamente grossos (5-7 μ m), permitindo rápida transmissão neural, essencial ao desencadeamento do reflexo (Sinex et al., 2001). Sons compostos por um amplo espectro de frequências, conhecidos como ruído branco, de alta intensidade, acima de 80dB SPL, são os principais desencadeadores do RAS (Grillon et al., 1994; Koch, 1999).

Além do valor etológico dos reflexos acústico-motores para a sobrevivência do indivíduo, existe grande interesse por parte da clínica médica e da pesquisa básica relacionada à integração sensorio-motora (Hoffman & Ison, 1980; Wilkins et al., 1986; Valls-Solé, 1998; Swerdlow et al., 2000a). A avaliação clínica do RAS permite a análise da funcionalidade do tronco encefálico. Em pediatria perinatal, por exemplo, a observação dos reflexos acústico-motores, em conjunto com a realização de potenciais evocados, é uma ferramenta de grande valia que permite conhecer o estado de desenvolvimento e funcionalidade do sistema nervoso; em otorrinolaringologia, essa avaliação proporciona informações a respeito da funcionalidade da porção baixa da via auditiva, até o nível da ponte e, principalmente, parte coclear do nervo vestibulo-coclear.

O RAS pode ser modificado tanto quantitativamente quanto qualitativamente por uma série de condições naturais ou experimentais (Swerdlow et al., 2000; Bell et al., 2003), chamadas de modulações, e que revelam sua plasticidade. O reflexo pode ser diminuído devido à habituação ao estímulo (Gonzalez-Lima et al., 1989; Pilz & Schnitzler, 1996), por um estímulo prévio de menor intensidade (Hoffman & Fleshler, 1963; Braff et al., 2001; Fendt et al., 2001; Swerdlow et al., 2007), conhecido por PPI, e pela administração de substâncias químicas (Swerdlow & Geyer, 1993; Bakshi et al., 1994; Geyer et al., 2001). Não obstante, o reflexo pode ser aumentado em condições de potenciação por medo (Anisman et al., 2000; Davis, 2006; Winslow et al., 2007), ansiedade (Kaviani et al., 2004), e estresse (Andreski et al., 1998; Stam, 2007). Comumente, essas modulações são mais sensíveis a alterações do que o próprio reflexo (Hoffman & Ison, 1980; Justus & Finn, 2007). Portanto, as provas comportamentais envolvendo as modulações do RAS têm despertado interesse em questões de diagnóstico clínico (Wilkins et al., 1986). Tanto em neurologia quanto em psiquiatria, registram-se alterações nas respostas às modulações provocadas por doenças neurodegenerativas, esquizofrenia, hiperreflexia, depressão e estados de dependência de drogas, como opiáceos e álcool (Mansbach et al., 1992; Borowski & Kokkinidis, 1994; Grillon et al., 1994; Brown, 1995; Koch, 1999). Por ser um comportamento avaliado sem a utilização de provas invasivas e modificar-se diante de várias condições, o reflexo acústico de sobressalto constitui um modelo experimental interessante.

O RAS também pode ser modificado por manipulações farmacológicas. Os agonistas dopaminérgicos diretos, ou seja, aqueles fármacos que atuam diretamente sobre os receptores dopaminérgicos, simulando a dopamina, como a bromocriptina, aumentam a magnitude do reflexo (Swerdlow et al., 2002), assim como os agonistas dopaminérgicos indiretos, da classe das anfetaminas (Bell et al., 2003), ou a cocaína, que promove a liberação do neurotransmissor armazenado nos terminais axônicos. O *ecstasy*, droga sintética, também produz modificações na amplitude do RAS, mediado pelo sistema serotoninérgico, através da liberação de serotonina (Vollenweider et al., 1999; Heekeren et al., 2004). Drogas de uso social, como álcool e tabaco, também exercem influência sobre o RAS. O álcool, por exemplo, reduz a amplitude (Grillon et al., 1994), como de se esperar por seu efeito depressor sobre o sistema nervoso central. Contudo, alguns estudos realizados em roedores mostraram um aumento da amplitude, o que poderia ser explicado pelo efeito bifásico da substância, que atua como estimulante inicialmente (Dudek et al., 1991), pela

liberação de dopamina (Lewis & Gould, 2003), e, em seguida, como um depressor por ativação GABAérgica. A nicotina, componente estimulante do tabaco, permite a liberação dopaminérgica com a consequente diminuição da latência da resposta de sobressalto, sem a alteração de sua amplitude (Hutchison et al., 2000).

Entre as principais modulações do RAS, encontra-se a inibição por estímulo prévio (PPI): uma diminuição da amplitude do reflexo quando o estímulo sonoro desencadeante é precedido por um estímulo sensorial de baixa intensidade, seja ele sonoro, visual ou tátil (Figura 4). As interações neurais que suportam a existência dessa modulação ainda não foram totalmente esclarecidas. A projeção colinérgica inibidora originada no núcleo pedúnculo pontino do tegmento que atua sobre o PnC (Fendt et al., 2001) é uma das vias propostas, entretanto os dados da literatura são contraditórios, ou parciais, sendo que nenhum dos circuitos propostos explica adequadamente todos os fenômenos associados à PPI (Fendt et al., 2001; Swerdlow et al., 2001).

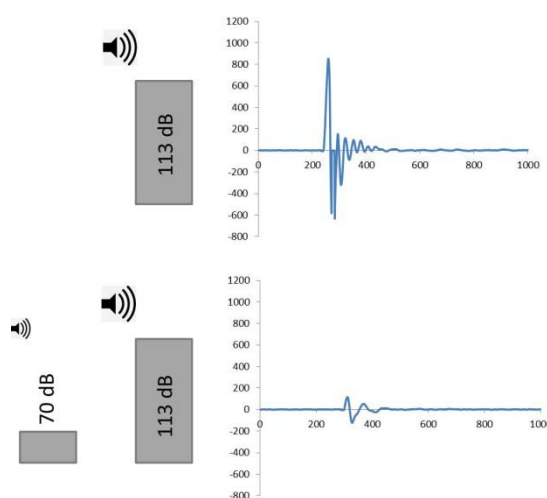


Figura 4. Esquema do RAS (acima) e da inibição por estímulo prévio (abaixo). Observe a diminuição da amplitude do reflexo quando o estímulo sonoro desencadeante é precedido por um pré-pulso de menor intensidade. Fonte: Martins, Marina Galleazzo. Estudo hodológico e neuroquímico das aferências da região noradrenérgica A5 aos neurônios da raiz coclear / Marina Galleazzo Martins. - Botucatu, 2013.

A avaliação das modulações do reflexo de sobressalto em animais de experimentação tornou-se um modelo equivalente para situações que ocorrem no homem, convertendo-se em uma ferramenta de pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos. Dessa maneira, o RAS potenciado por um estímulo adverso ocasiona, nesses modelos experimentais, um estado de temor equivalente ao de ansiedade no homem (Cook et al., 1992), sendo, assim, utilizado para se avaliar o efeito de fármacos em patologias psiquiátricas relacionadas à ansiedade.

As modulações próprias ao RAS, bem como suas modificações farmacológicas, relacionam-se com estruturas do sistema nervoso central que atuam sob o circuito neural do reflexo. Entre os núcleos mais estudados, encontra-se o PnC, cujas características eletrofisiológicas (Ligenhöhl & Friauf, 1994; Wagner & Mack, 1998), conectividade (Yeomans & Frankland, 1996) e respostas frente manipulações farmacológicas (Ebert & Koch, 1992; Krase et al., 1993; Miserendino & Davis, 1993; Kungel et al., 1994) são bem conhecidas.

Acredita-se que o PnC esteja relacionado com o grande número de modulações do reflexo (Koch, 1999), por atuar como centro integrador de aferências ao circuito do RAS. Os CRN, que também integram o circuito desse reflexo, recebem ao menos quatro diferentes tipos de aferências (Merchán et al., 1988) e poderiam, assim, participar de algumas modulações do reflexo. Entretanto, as aferências aos CRN não provenientes da cóclea ainda são pouco estudadas.

O estudo ultra-estrutural da raiz coclear demonstrou que cerca de metade da superfície celular dos CRN é recoberta por botões sinápticos classificados em quatro diferentes tipos (Merchán et al., 1988). Os botões do tipo I, mais numerosos, constituem 75% de todos os botões sinápticos, apresentando assimetria nas densidades pré e pós-sinápticas e contendo grande quantidade de vesículas circulares e eletrólúcidas, o que sugere contatos sinápticos excitatórios. Essas características assemelham-se aos botões sinápticos dos aferentes primários aos núcleos cocleares, glutamatérgicos (Zhou et al., 2007). Sugeriu-se, portanto, que os botões do tipo I se originassem de colaterais dos aferentes cocleares primários, demonstrado por Osen et al. (1991). Os demais 25% dos botões sinápticos não se originam dos aferentes primários e possuem característica morfológica heterogênea, com vesículas elétron-lúcidas circulares ou pleomórficas, indicando que se originam em outras regiões, e possuem identidades neuroquímicas diferentes (Merchán et al., 1988).

Embora os CRN formem o primeiro núcleo do circuito elementar do RAS, fundamental ao seu desencadeamento, ele foi o núcleo menos estudado até o momento, desconhecendo-se quais núcleos lhe enviam projeções axônicas, sua identidade neuroquímica e a influência dessas aferências em provas comportamentais de mensuração do RAS ou suas modulações.

A existência de aferências aos CRN com outros neurotransmissores, como noradrenalina, neuropeptídeos ou serotonina, ainda não é bem conhecida. Terminais axônicos serotoninérgicos provenientes do núcleo dorsal da rafe foram descritos no núcleo coclear ventral, nas imediações da raiz coclear. Igualmente, uma nova fonte de aferências colinérgicas aos CRN, oriunda do núcleo ventral do corpo trapezoide, foi descrita (Gómez-Nieto et al., 2008). Mesmo que não existam provas comportamentais a respeito dos aspectos funcionais dessa conexão, ela parece ser uma via importante na inibição por estímulo prévio, através da conexão indireta entre os CRN e o colículo inferior, centro fundamental desta modulação (Fendt et al., 2001; Yeomans et al., 2006).

Os CRN estão em justaposição a uma grande quantidade de botões imunorreativos para o transportador vesicular de glutamato (VGlut1), bem como terminais imunorreativos ao transportador vesicular de GABA e glicina (VGat) (Gómez-Nieto et al., 2008; Osen et al., 1991). A origem das aferências noradrenérgicas aos CRN foi recentemente descrita como proveniente do *locus coeruleus* (Gómez-Nieto et al., 2008; Hormigo et al., 2014) mas o envolvimento funcional destas aferências no RAS e suas modulações ainda precisa ser investigado.

Outros experimentos recentes realizados em nosso grupo de pesquisa buscaram identificar as fontes de aferências aos CRN injetando-se um traçador neuronal retrógrado (Fluoro-Gold® - FG) na raiz coclear. Os resultados obtidos indicam como principais fontes de aferências aos CRN neurônios do núcleo olivar superior lateral, a região do grupamento noradrenérgico A5, o *locus coeruleus* e o núcleo ventral do corpo trapezoide, o núcleo dorsal da rafe (Figura 5). Dentre estes núcleos aferentes, a região do grupamento noradrenérgico A5 nunca havia sido mencionada anteriormente e foi identificada pela primeira vez em nosso grupo de pesquisa. Estudos ainda não publicados foram realizados para a caracterização morfológica dessa fonte de aferências e neste trabalho, será investigada a importância funcional desta fonte de aferências a partir de experimentos de lesão seletiva da região noradrenérgica A5.

Além disso, buscamos averiguar a participação de neuropeptídeos na modulação do RAS. Revisando a literatura sobre a co-existência de neuropeptídeos e noradrenalina, encontramos relatos de co-localização de NPY no tronco encefálico de roedores e nos neurônios de gânglios simpáticos. O NPY também pode estar nas células cromafins¹ da glândula supra-renal e em melanocitomas de humanos (Tohyama & Takatsuji, 1998).

O NPY é encontrado em várias estruturas do encéfalo, sendo assim, considerado um dos neuropeptídeos mais abundantes, além de ser um dos mais conservados ao longo da evolução (Dumond & Quirion, 2006). Nos neurônios, encontra-se armazenado em vesículas, em regiões como o córtex cerebral, hipocampo, tálamo, hipotálamo, tronco cerebral e principalmente no núcleo arqueado.

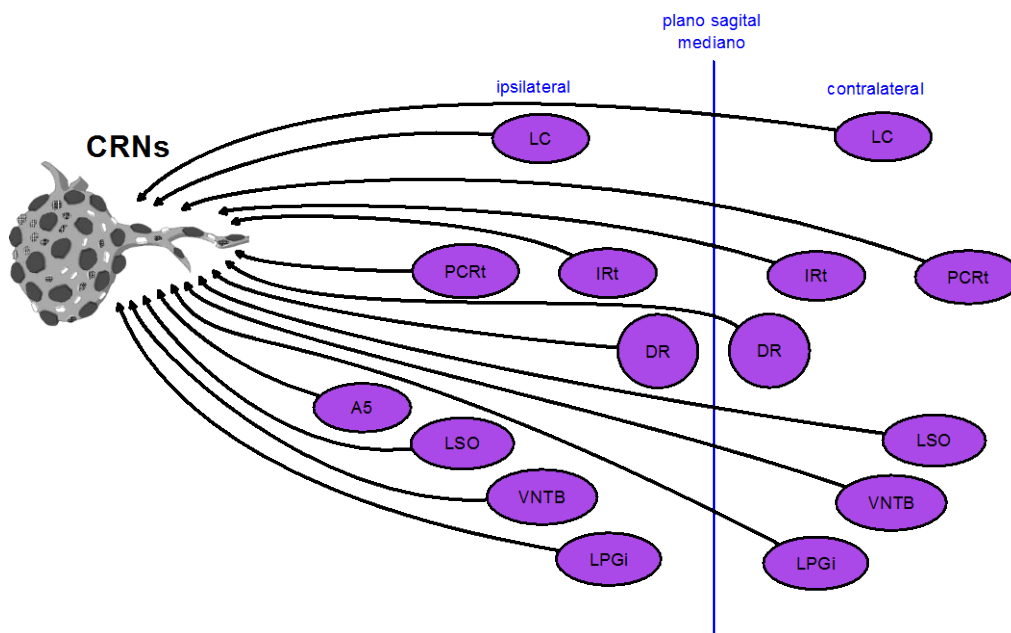


Figura 5. Esquema das aferências recebidas pelos CRN. Realizado com base no mapeamento de neurônios retrogradamente marcados após injeção de FG na raiz coclear. Para as abreviaturas, veja a lista de abreviaturas. Fonte: Barioni, Nicole Orsi. Estudo hodológico das aferências ao primeiro núcleo do circuito neural do reflexo auditivo de sobressalto : núcleo da raiz coclear / Nicole Orsi Barioni. – Botucatu : [s.n.], 2012

Devido a existência de duas importantes regiões noradrenérgicas do tronco encefálico aferentes aos CRN (a região do grupamento neuronal A5 e o *locus coeruleus*), pretende-se estudar a distribuição de NPY no tronco encefálico no intuito de buscar substratos morfológicos para relacionar o NPY com o circuito neuronal do RAS e suas modulações.

Além do NPY, o neuropeptídeo transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), pode co-localizar em algumas regiões encefálicas com neurotransmissores clássicos como a noradrenalina. OCART foi identificado primariamente em extratos de hipotálamos de ovelhas aproximadamente há duas décadas. Vários estudos demonstraram que esse peptídeo não possui uma distribuição ubíqua, pois se encontra em populações discretas no sistema nervoso e do intestino, na hipófise, na medula adrenal e nas ilhotas de Langerhans (Kuhar et al, 2000), sendo assim, encontrado no sistema nervoso central e periférico (Vicentic et al, 2006).

No sistema nervoso central o CART pode funcionar tanto como neurotransmissor ou neuromodulador. Estudos anatômicos e fisiológicos sugerem o seu envolvimento na regulação de diversos processos fisiológicos. Atualmente podemos confirmar o seu envolvimento na alimentação, remodelação óssea, processamento sensorio, regulação endócrina, estresse e ansiedade, e as propriedades de recompensa e de reforço dos psicoestimulantes (Burman et al, 2004).

O CART foi identificado em regiões encefálicas que estão envolvidas no RAS, como o A5, LC e DR (Burman et al., 2004; Dun et al., 2002; Koylu et al., 1998, 1999) porém não há relatos sobre aferências CART-érgicas aos núcleos do circuito essencial do RAS.

OBJETIVO

Neste trabalho estudamos o envolvimento da região noradrenérgica A5 com o circuito neural do RAS, especialmente com neurônios da raiz coclear, utilizando técnicas de citoarquitetura, imunohistoquímica e avaliação as alterações comportamentais do RAS após a lesão seletiva do grupamento noradrenérgico A5, além da distribuição de NPY no tronco encefálico e CART na região noradrenérgica A5, de ratos Wistar fêmeas, adultas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de experimentação e seu manuseio

Todos os experimentos realizados nesse trabalho necessitam da utilização de animais de experimentação, não existindo método alternativo. Portanto, tomou-se o maior cuidado possível no planejamento, preparação e execução dos experimentos a fim de se aumentar ao máximo as possibilidades de êxito, o que pressupõe uma redução no número de animais a serem utilizados. Esse preceito foi seguido na elaboração dos protocolos experimentais, aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (Protocolo N°. 17/08).

O rato albino adulto, fêmea, (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, foi utilizado como modelo experimental. Os animais foram obtidos no Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo. No momento em que foram realizados os experimentos possuíam por volta de cem dias de idade e pesavam entre 250g e 300g. Essa espécie é representativa dos mamíferos roedores, que apresentam um ótimo funcionamento dos reflexos acústico-motores para a sobrevivência em um habitat terrestre, predominantemente noturno, sendo amplamente utilizada para o estudo do RAS (Yeomans & Frankland, 1996; Koch, 1999). Neste estudo utilizamos 26 animais de experimentação. Os animais foram alojados em gaiolas (41x34x17cm) com acesso livre à água e ração, em biotério com temperatura controlada (20 a 25°C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acessas às 07h). Em cada gaiola foram alocados dois animais, para evitar o estresse por isolamento.

As intervenções cirúrgicas e a eutanásia dos animais foram realizadas sob anestesia profunda. Antes do início de qualquer procedimento cirúrgico, foi comprovada a ausência de reflexo palpebral, de retirada dos membros e de tônus muscular no pescoço como prova de anestesia eficaz (Lapchik et al., 2009). Foram utilizados anestésicos de uso comum na experimentação animal, cuja eficácia já foi constatada em experimentos prévios e em diversos laboratórios de pesquisa (Damy et al., 2010). Os seguintes fármacos foram utilizados:

- Solução anestésica para cirurgia: Xilasin® (xilazina 2%, concentração final = 0,5mg/ml), Dopalen® (ketamina 10%, concentração final = 25mg/ml) e Acepran® (acepromazina 1%, concentração final = 1mg/ml), diluídos em água purificada, na dose de 0,2ml por 100g de peso corporal do animal, administrado por via subcutânea, antes da cirurgia para injeção do traçador.

- Analgésico: Paracetamol® solução oral 200 mg/ml (80mg/kg), administrado após a cirurgia.

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

Após os tempos de sobrevivência desejados em função dos procedimentos experimentais, a fixação dos tecidos para análise histológica foi realizada em todos os casos por perfusão transcardíaca. Para isto, inicialmente foi realizada a lavagem do leito vascular com 150 ml de uma variante sem cálcio do soro de Ringer (37 °C, pH 6,9), seguida da fixação com 500 a 1000 ml de fixador constituído de uma solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,125%, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3.

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

O encéfalo foi cortado para redução a um bloco que se estende do núcleo do nervo hipoglosso ao hipotálamo, com o auxílio de uma matriz para encéfalos (Insight Ltda.). O bloco foi crioprotectado em solução de sacarose 30%, em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, durante 48h a 4°C. Foram feitas secções seriadas de 30µm, no plano coronal, em movimento de deslizamento (Leixa SM2010R), equipado com platina congeladora (Physiotemp Inc.). Os cortes foram recolhidos em 10 séries de cortes em cada caso experimental, de forma que a distância entre os cortes de cada série foi de 300 micrômetros.

Procedimentos experimentais

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

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

Uma vez que estudos hodológicos prévios em nosso grupo de pesquisa demonstraram a conexão da região noradrenérgica A5 com núcleos pertencentes ao circuito elementar do RAS e relacionados com a inibição por estímulo prévio, foi necessário avaliar o seu envolvimento funcional por meio de lesão nesta área. Devido a complexidade destes experimentos, eles foram realizados em colaboração com o aluno de doutorado André Valério da Silva.

O desenho experimental consistiu em 4 avaliações comportamentais para avaliação do RAS e inibição por estímulo prévio (anexo C). A primeira, antes da lesão foi chamado de dia zero (pré-lesão) os animais passaram por uma sessão de avaliação comportamental no mesmo dia em que foi realizada a cirurgia. Posteriormente o comportamento foi avaliado no dia 7, 14 e 21 após a lesão. No 21º os animais foram perfundidos e seguiram o procedimento histológico para Nissl, imuno-histoquímica para DBH para confirmação histológica da lesão (Figura 6).

Antes de separarmos os animais em grupos foram realizados primeiramente um período de habituação no qual consiste em acondicionar os animais na caixa de sobressalto uma vez por dia por um período de 5 minutos durante três dias, uma vez acondicionados os animais passaram pelo testes de RAS e inibição por estímulo prévio (PPI), os animais selecionados, ou seja aqueles que apresentaram boa resposta comportamental foram separados para os grupos comportamentais.

Os animais foram distribuídos em dois grupos comportamentais (8 por grupo), sendo um grupo lesão (LESÃO/RAS+PPI) na qual foi realizada a cirurgia e injeção do neurotóxico (6-OHDA 3µg/µl diluído em ácido ascórbico a 0,2µg/ml), injetando o volume de 100 nanolitros (cada lado) a um fluxo de 10 nanolitros por minuto, e um grupo controle da lesão (SHAM/RAS+PPI) no qual os animais passaram pela mesma cirurgia, porém sem a injeção do neurotóxico.

Após anestesia profunda os animais foram posicionados em aparelho estereotáxico, conforme previamente descrito. Para injeção da 6-OHDA foi utilizada uma seringa de 10 µl com ponta em aço com 60 µm de diâmetro interno (Hamilton 1700 series) e controlada por uma bomba de microinjeção (micropump III – WPI).

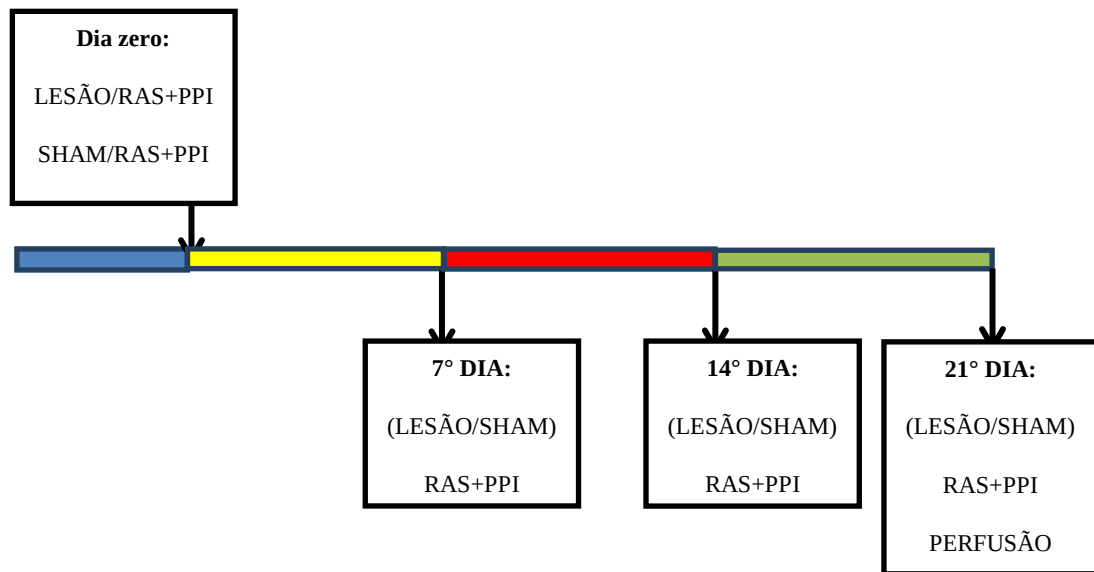


Figura 6: Desenho experimental para avaliação do RAS e inibição por estímulo prévio após lesão seletiva na área noradrenérgica A5. Fonte: material didático elaborado no grupo de pesquisa neurociências: imunohistoquímica, citoarquitetura e conectividade de centros neurais em primatas e roedores.

A avaliação do RAS foi verificada utilizando o sistema de avaliação do sobressalto da empresa Insight (Equipamentos Científicos Ltda.) que integra a parte de aquisição do movimento do animal e a geração dos estímulos sonoros. O sistema é constituído por duas câmaras de prova com isolamento acústico, nas quais há uma plataforma de medição, localizada a 9cm dos alto-falantes e um sistema gerador de estímulos sonoros controlados por software, conectados a um computador (Figura 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.

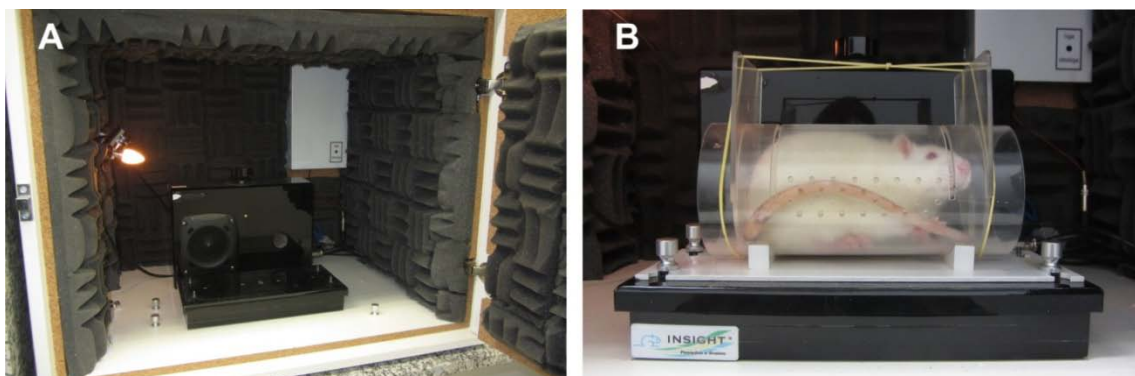


Figura 7: Foto do sistema de avaliação do sobressalto. Em A, interior da câmara de prova com isolamento acústico, na qual se observa a plataforma de captação do movimento do animal, o alto-falante responsável pela geração do ruído de fundo, pré-pulso e pulso, bem como luz ambiente e câmera de vídeo para acompanhamento de toda a sessão via computador. Em B, animal posicionado na gaiola de prova do reflexo, fixada à plataforma de medição. Fonte: Martins, Marina Galleazzo. Estudo etológico e neuroquímico das aferências da região noradrenérgica A5 aos neurônios da raiz coclear / Marina Galleazzo Martins. - Botucatu, 2013.

A avaliação do RAS/PPI consistiu de 6 tipos de apresentação de estímulos, descritos no 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 constante durante toda a sessão é importante para normalizar o ruído ambiente na câmara de prova. O intervalo entre as tentativas foi de $30s \pm 10$, determinado randomicamente pelo programa do equipamento.

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 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-aleatória, pelo método de quadrado latino.

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

Quadro 1: Características do pré-pulso, pulso e intervalo entre os estímulos em cada um dos blocos da sessão de PREPISI.

Consideraram-se respostas válidas do reflexo apenas aquelas em que a movimentação do animal antes da emissão do pulso sonoro não era superior a 25% da amplitude máxima obtida na tentativa (BELL et al., 2003). As porcentagens de PPI para os 4 intervalos interestímulos (ISI 25, ISI 50, ISI 100 e ISI 150) foram calculadas, em cada sessão, com a seguinte fórmula: $\%PPI = [(amplitude \text{ de RAS} - amplitude \text{ de RAS com pré-pulso}) / amplitude \text{ de RAS}] \times 100$.

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).

Identificação neuroquímica das aferências à raiz coclear

Para o mapeamento dos neurônios aferentes aos CRN e com identidade neuroquímica noradrenérgica ou CART-érgica na região do grupamento noradrenérgico A5, foram utilizadas secções de experimentos realizados previamente para estudar as aferências aos CRN por meio de injeção de neurotraçador retrógrado Fluoro-Gold (FG - Fluorochrome, Denver, CO, USA). O FG é um traçador o qual pode ser captado pelos axônios dos neurônios, transportado por meio do fluxo axonal de forma retrógrada e se acumular no pericário (SCHMUED e FALLON, 1986). Mesmo que o FG seja um traçador autofluorescente e não haja a necessidade de tratamento para ser observado em secções do encéfalo, existem anticorpos comerciais contra FG que permitem a realização de um

protocolo de imunoistoquímica para sua detecção. Neste trabalho o FG foi utilizado a 4%, diluído em soro fisiológico, por meio de injeção com abordagem estereotáxica na raiz coclear.

As coordenadas utilizadas foram determinadas com auxílio do atlas estereotáxico do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2005) e de trabalhos prévios que utilizaram esta abordagem, através de craniotomia dorsal, visando evitar o trajeto através do seio venoso transversal e a lesão de estruturas nobres que possam interferir de alguma maneira no experimento. As coordenadas foram: -1,0mm no eixo ântero-posterior (caudal em relação à linha interaural); +4,3mm no eixo látero-lateral (em direção ao lado esquerdo); +0,3mm no eixo dorsoventral (superiormente a linha interaural).

O neurotraçador foi injetado na raiz coclear, por iontoforese com uma micropipeta de vidro (30 micrômetros de calibre interno na ponta), aplicando uma corrente contínua positiva de 3mA, em pulsos intermitentes de 7 segundos (ligado/desligado), durante 15 minutos, em 4 casos experimentais. Após a cirurgia os animais ficaram em recuperação durante 14 dias.

Mapeamento dos neurônios do A5 aferentes aos CRN (FG) e neuroquimicamente identificados (DBH e CART)

Para o mapeamento dos neurônios aferentes aos CRN e neuroquimicamente identificados como noradrenérgicos ou CART-érgicos na região do grupamento noradrenérgico A5, foram realizados protocolos de imunoistoquímica material previamente coletado de experimentos em que foi injetado o neurotraçador retrógrado FG na raiz coclear. Devido a que os anticorpos primários para o FG e CART sejam produzidos no mesmo animal (coelho) foi necessário utilizar duas séries de cortes para identificar as três substâncias em cada caso experimental. Assim, em uma série foi identificado o FG e a dopamina beta hidroxilase (DHB, enzima precursora da noradrenalina) e em outra série, imediatamente subsequente, foram identificados o DBH e o CART. Para todas as substâncias neuroativas foi utilizado este mesmo protocolo de imunoistoquímica realizando mudanças somente nos anticorpos primários e secundários (apêndice A). Desta forma, em 4 casos experimentais foram capturadas imagens da região noradrenérgica A5, ao microscópio óptico e com iluminação epifluorescente, para identificação dos somas imuno-reativos ao FG, CART e DBH. A partir das imagens capturadas, a região de interesse reconstituída, para cada marcador, utilizando a ferramenta “*photomerge*” do programa *Adobe Photoshop* (versão CS2). Sobre as regiões de interesse, utilizando o programa *CorelDraw* (versão 12), os limites citoarquitectônicos da cada secção foram desenhados assim como mapeados os somas marcados com FG, CART e DBH que receberam um marcador distinto para representação de cada substância neuroativa.

Distribuição de NPY no tronco encefálico

Foram realizados seis casos experimentais para identificar a presença do NPY no tronco encefálico e na raiz coclear por meio de protocolos de imuno-histoquímica para o NPY (apêndice B). Dentre estes, em três casos, os animais receberam injeção de colchicina antes da perfusão. A Colchicina é um composto neurotóxico que desestabiliza os microtúbulos das células nervosas, bloqueando o fluxo axonal e, portanto, determinando o acúmulo dos neurotransmissores nos corpos celulares. Aproveitamos este efeito para aumentar a sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica para detecção de substâncias neuroativas como o NPY. Desta forma, em regiões com pouca ou sem imuno-reatividade em somas, podemos analisar o resultado com maior segurança. Para injeção de colchicina, injetamos 7µl de colchicina 1% no ventrículo lateral de ratas wistar fêmeas por meio de cirurgia estereotáxica 48 horas antes da eutanásia. As coordenadas utilizadas para injeção de

colchicina no ventrículo lateral foram: 0,72 mm na dimensão ântero-posterior; + 2,0 mm na dimensão médio-lateral; + 4,0 mm na dimensão dorso-ventral; sem ângulo.

Análise das preparações histológicas e fotodocumentação

As lâminas de encéfalo preparadas foram estudadas em microscópio óptico (Axioplan2, Carl Zeiss) em campo claro nos casos para o NPY no tronco encefálico. A documentação fotográfica foi realizada com câmara digital (axioCam HRC, Zeiss). Os casos processados com marcadores fluorescentes, para o mapeamento através da identificação neuroquímica de DBH, CART e FG, foram analisados em microscópio óptico equipado com epifluorescência (Axioplan, Carl Zeiss), utilizando o fluoróforo CY3 (FG e CART) e o CY2 (DBH).

A documentação fotográfica foi realizada com câmara digital (axioCam HRC, Zeiss). As imagens capturadas foram organizadas em figuras e trabalhadas com os programas Adobe Photoshop CS2, Canvas X ou CorelDraw X3, ajustando-se brilho, contraste e balanço de cores, bem como removendo-se artefatos localizados externamente aos cortes, de acordo com o preconizado por Schenk et al. (1999) e Saper (1999) para a preparação de imagens digitais para publicação científica. As barras de calibração das fotomicrografias foram confeccionadas fotografando-se, com os mesmos equipamentos e aumentos, uma lâmina de escala micrométrica calibrada (Leica, Leitz Wetzlar), cuja menor divisão corresponde a 10µm.

RESULTADOS

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

Os dados obtidos com os experimentos de avaliação comportamental revelaram que o peso dos animais entre os grupos experimentais não diferiu quando foram comparados os resultados obtidos em um mesmo momento (idade). Nos dois grupos houve diferença no peso 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 aumentado peso corporal com a idade. Desta forma a análise dos dados permite afirmar que o processo de crescimento do peso corporal permaneceu igual em ambos os grupos (Tabela 1).

Tabela1. Média (desvio padrão) e mediana (mínimo e máximo) do peso dos animais (em gramas) segundo grupo e momento da avaliação.

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

* Comparação dos grupos e dos momentos por meio das medianas (teste não paramétrico).

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 verificássemos um 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).

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

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	

Com relação as porcentagens de PPI nos diferentes intervalos interestímulo (ISI), a análise dos dados indica que não há diferenças entre os grupos sham e lesão quando comparados os mesmos momentos e ISIs, assim como não há 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 21 dias pós-lesão (Tabela 3).

Tabela 3. Média (desvio padrão) e Mediana (mínimo e máximo) da variável % de PPI segundo grupo, momento da avaliação e ISI.

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

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).

Distribuição de NPY no tronco encefálico

Inicialmente o protocolo de detecção imunoistoquímica para o neuropeptídeo Y foi padronizado (apêndice B) utilizando diferentes concentrações de anticorpo primário e observado o resultado do protocolo em regiões com grande imunorreatividade ao NPY com o corpo estriado (caudado e putame) e núcleo dorsal da rafe. Desta forma determinou-se que a concentração de 1/5000 de anticorpo primário produziu melhores resultados (Figura 8 B, F, D e H) na relação sinal versus marcação inespecífica (fundo).

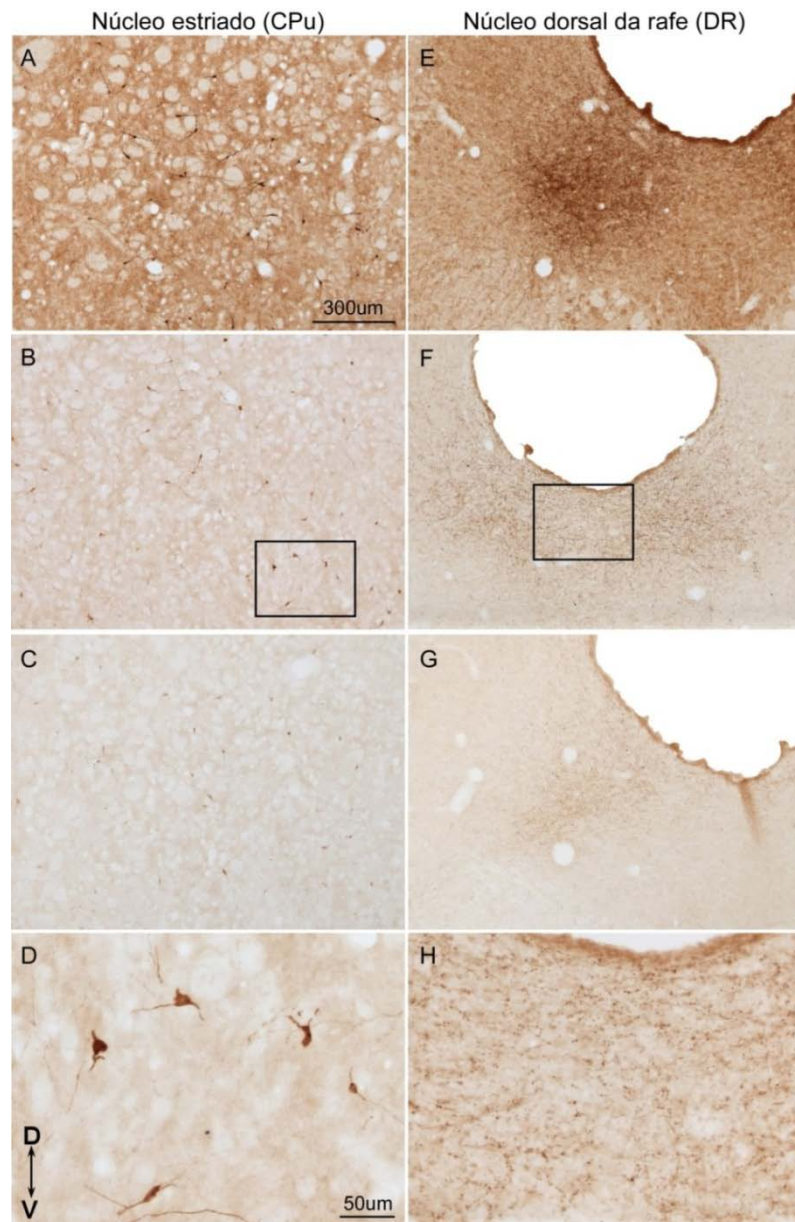


Figura 8. Resultado da padronização do protocolo imuno-histoquímico para detecção de NPY. Em A, B, C e D, fotomicrografias do núcleo estriado e em E, F, G e H fotomicrografias do DR imunorreagidos com diferentes concentrações de anticorpo primário (A e E=1/1.000, B e F=1/5.000, C e G=1/10.000). Em D, detalhe em maior aumento, de somas imunorreativas da área delimitada em B. Em H, detalhe em maior aumento de fibras imunorreativas da área delimitada em F. A barra de calibração em A, é válida para B, C, E, F, e G. A Barra de calibração em D é válida para H. As setas de orientação em D é válida para todas fotomicrogradias (D=dorsal, V=ventral). Fonte: material elaborado pelo autor

A pós a padronização, séries de cortes de 3 casos experimentais sem tratamento com colchicina foram processadas com o protocolo imunistoquímico para detecção do NPY. Nestes casos foi possível observar somas e fibras nervosas marcadas. O estudo da distribuição da imunorreatividade ao NPY no troncoencefálico revelou fibras imunorreativas nos seguintes núcleos: grupamento noradrenérgico A2 (A2) (figura 9-A); núcleo trigemial espinal, parte caudal (Sp5C); células adrenérgicas C1 e células noradrenérgicas A1 (C1/A1) (figura 9-B); núcleo do trato solitário (Sol) (figura 9-C); área subpostrema (SubP); núcleo paragigantocelular lateral, parte externa (LPGiE) (figura 9-D); células noradrenérgicas A5 (A5) (figura 9-E); núcleo reticular pontino, parte caudal (PnC) (figura 9-F); *locus coeruleus* (LC) (figura 9-G); núcleo reticulotegmental da ponte, parte lateral (RrTgL); núcleo dorsal da rafe, parte caudal (DRC); núcleo dorsal da rafe (DR) (figura 9-H); núcleos parabraquiais laterais (LPBI, LPBB, LPBCr); núcleo tegmental subpeduncular (SPTg). Todas essas áreas mostraram fibras imunorreativas com varicosidades (Figura 9) e as regiões do LC e do A1/C1 também apresentaram somas imunorreativos.

Para evidenciar com maior sensibilidade os somas imunorreativos para o NPY, séries de cortes de casos experimentais submetidos ao tratamento com colchicina foram submetidas ao protocolo de imunohistoquímica para NPY (Figura 10). Nestes casos praticamente em todas as regiões estudadas não foram observadas fibras nervosas pois as mesmas deixam de apresentar marcação devido a interrupção do fluxo axonal, com exceção do DR e do LC que mesmo com aplicação de colchicina foram observadas poucas fibras nervosa marcadas. Nestes casos foram evidenciados somas nas seguintes áreas: Sol (figura 10-A e B); LPGi (figura 10-C e D); LC (figura 10-E e F) e DR (figura 10-G e H).

Mapeamento dos neurônios do A5 aferentes aos CRN (FG) e neuroquimicamente identificados (DBH e CART)

O mapeamento de neurônios retrogradamente marcados com FG na região do grupamento noradrenérgico A5, após a injeção deste traçador neuronal retrógrado na raiz coclear, juntamente com a evidenciação dos neurônios noradrenérgicos, imunorreativos a enzima dopamina beta hidroxilase (DBH) ou imunorreativos ao anticorpo anti-CART, evidenciou a presença destes três marcadores distribuídos ao longo de todo eixo rostro caudal do A5, desde o nível interaural -1,7mm a -0,5mm (Figuras 11, 12, 13 e 14).

Embora a quantidade de neurônios retrogradamente marcados tenha variado entre os casos experimentais, o que provavelmente reflete pequenas variações na injeção ou captação do traçador retrógrado, em todos os casos foi possível observar que na região do grupamento noradrenérgico A5 os neurônios aferentes a raiz coclear estão entremeados com neurônios imunorreativos a DBH e CART, não sendo possível a segregação de subdivisões nesta região com base nas características neuroquímicas ou de conectividade estudadas. Além disso, foi possível observar somas de neurônios duplamente marcados para FG+DBH e FG+CART, o que sugere que a raiz coclear deve receber aferências noradrenérgicas e CART-érgicas. Isto indica a possível participação destas duas substâncias neuroativas no RAS e em suas modulações.

Também foram identificadas células duplamente imunorreativas a DBH e CART, confirmando achados prévios da literatura, porém não foram encontradas células triplamente marcadas, ou seja, células DBH e CART que foram identificadas como aferentes a raiz coclear.

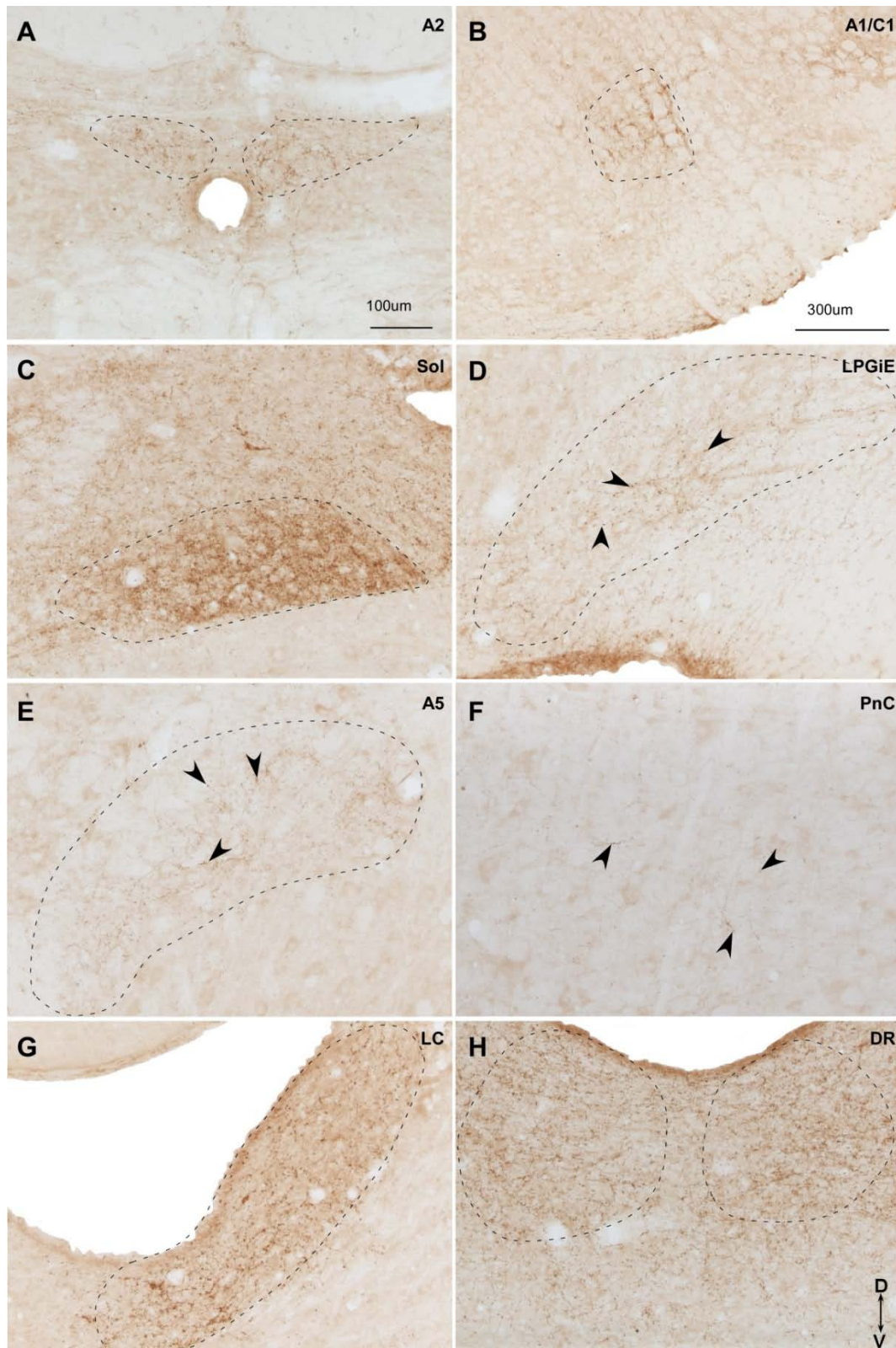


Figura 9. Principais regiões do tronco encefálico imunorreativas ao NPY evidenciadas sem tratamento com colchicina. Em todas as fotomicrografias evidenciam-se fibras imunorreativas. A barra de calibração em A é válida para todas as fotomicrografias, exceto para B. Em A, grupamento de células adrenérgicas A2. Em B, grupamento A1/C1, o qual além de fibras, também apresenta somas imunorreativos. Em C, Núcleo do trato solitário (Sol). Em D, núcleo paragigantocelular lateral parte caudal (LPGiE). Em E, grupamento de células noradrenérgicas A5. Em F, núcleo reticular pontinho caudal (PnC). Em G, *locus coeruleus* (LC). Em H, núcleo dorsal da rafe (DR). Fonte: material elaborado pelo autor.

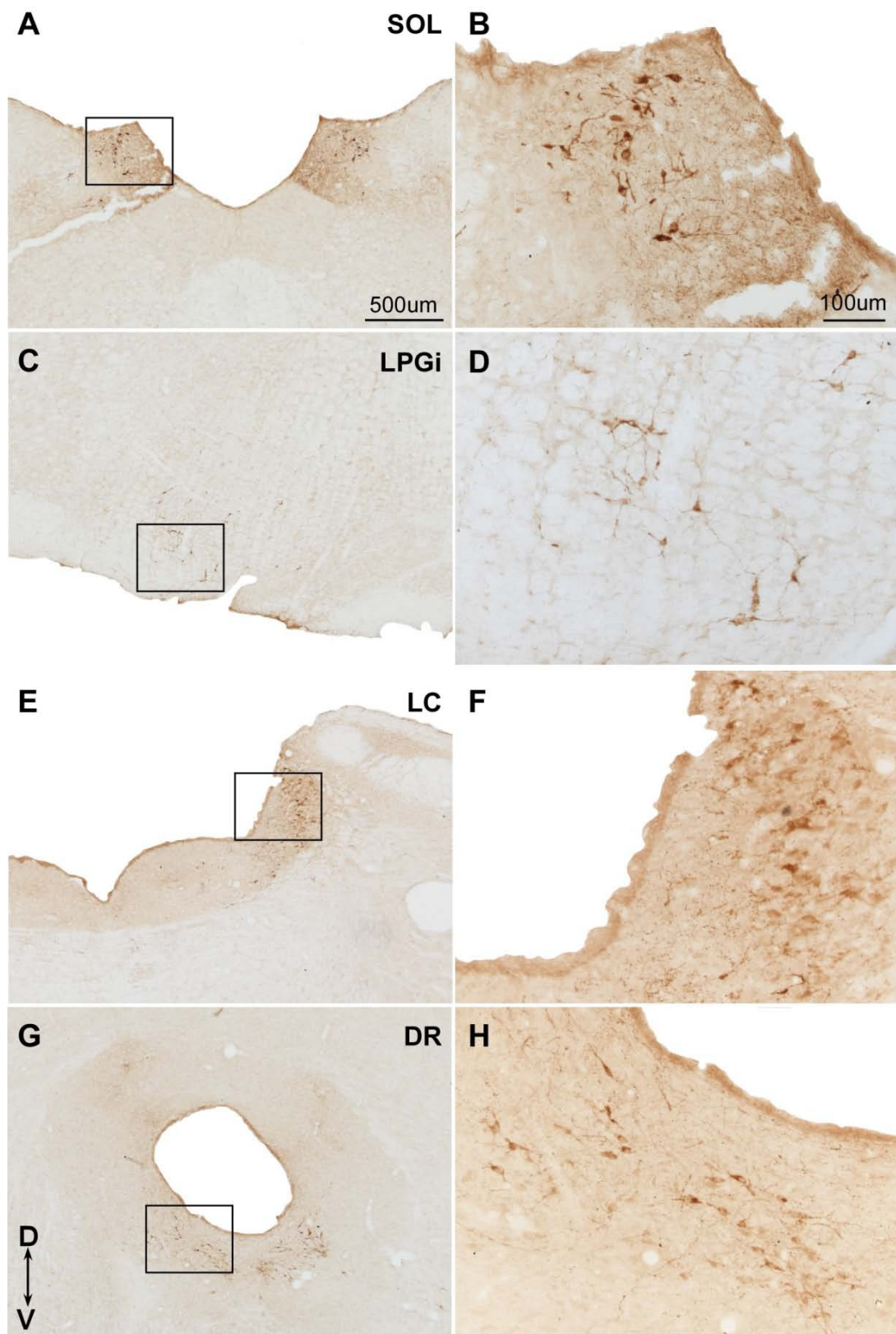


Figura 10. Principais regiões do tronco encefálico imunorreativas ao NPY evidenciadas com tratamento de colchicina. Em todas as fotomicrografias evidenciam-se somas imunorreativos. A barra de calibração em A é válida para C, E e G. A barra de calibração em B é válida para D, F e H. Em A, C, E e G fotomicrografias respectivamente dos núcleos Sol, LPGi, LC e DR. Em B, D, F e H detalhes em maior aumento das áreas delimitadas respectivamente em A, C, E e G. Para abreviaturas veja a lista. Fonte: material elaborado pelo autor.

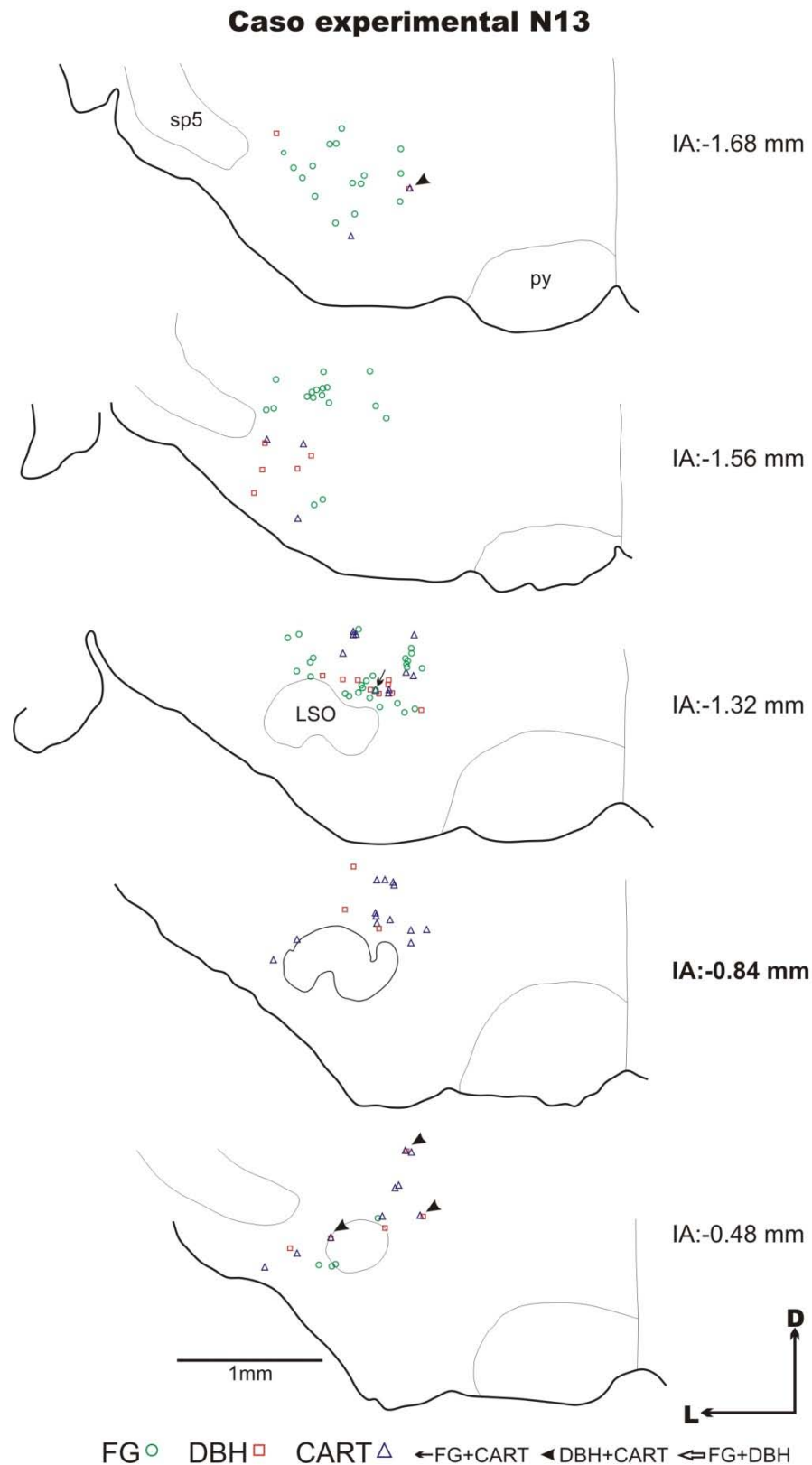


Figura 11. Esquemas de cortes coronais do troncoencefálico, na região do grupamento noradrenérgico A5, do caso experimental N13, onde foram mapeados os neurônios imunorreativos ao FG (círculos verdes), DBH (quadrados vermelhos) e CART (triângulos azuis). O nível rostrocaudal aproximado com relação a 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. Fonte: material elaborado pelo aluno.

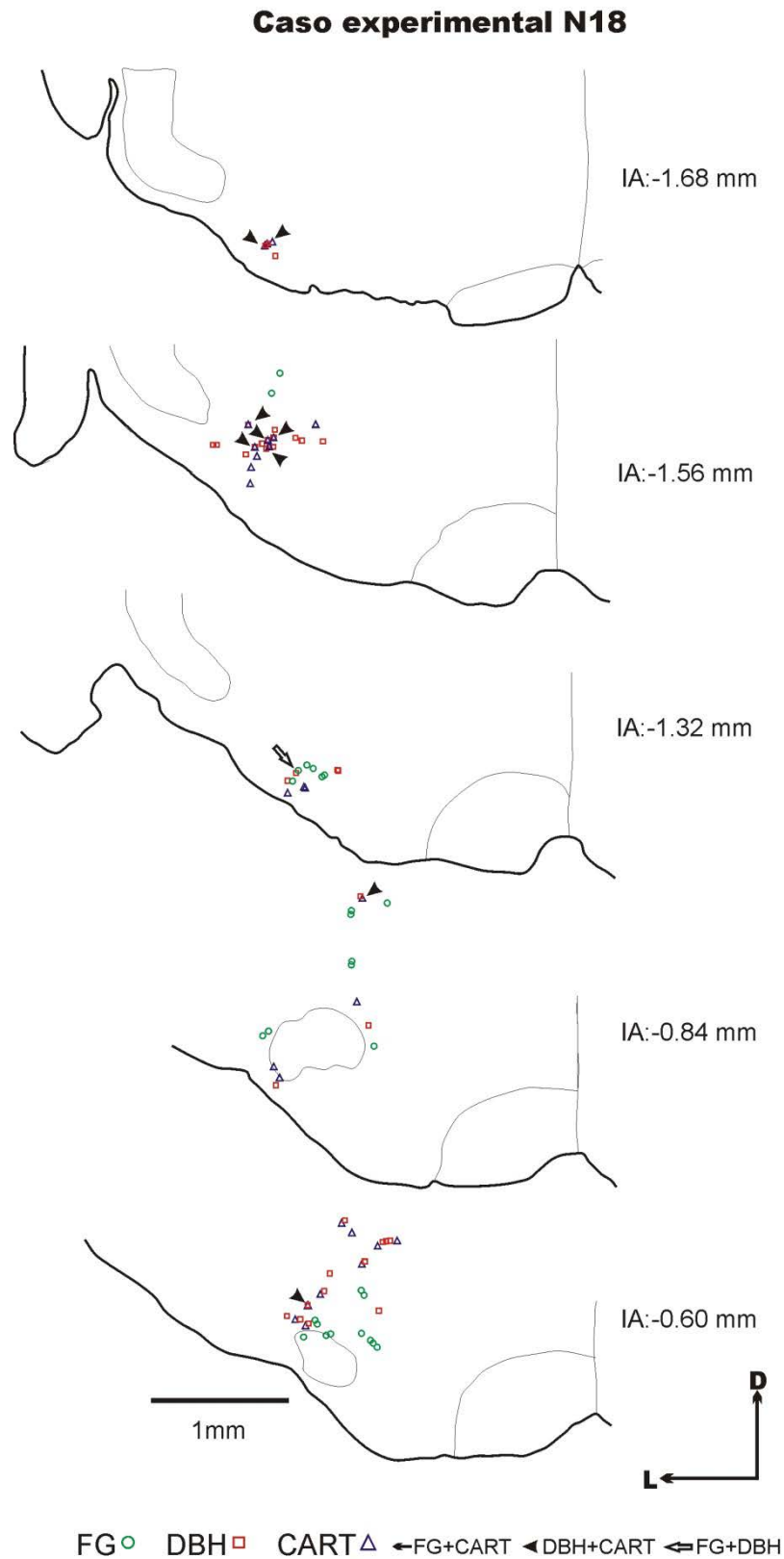


Figura 12. Esquemas de cortes coronais do troncoencefálico, na região do grupamento noradrenérgico A5, do caso experimental N18, onde foram mapeados os neurônios imunorreativos ao FG (círculos verdes), DBH (quadrados vermelhos) e CART (triângulos azuis). O nível rostrocaudal aproximado com relação a 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. Fonte: material elaborado pelo aluno.

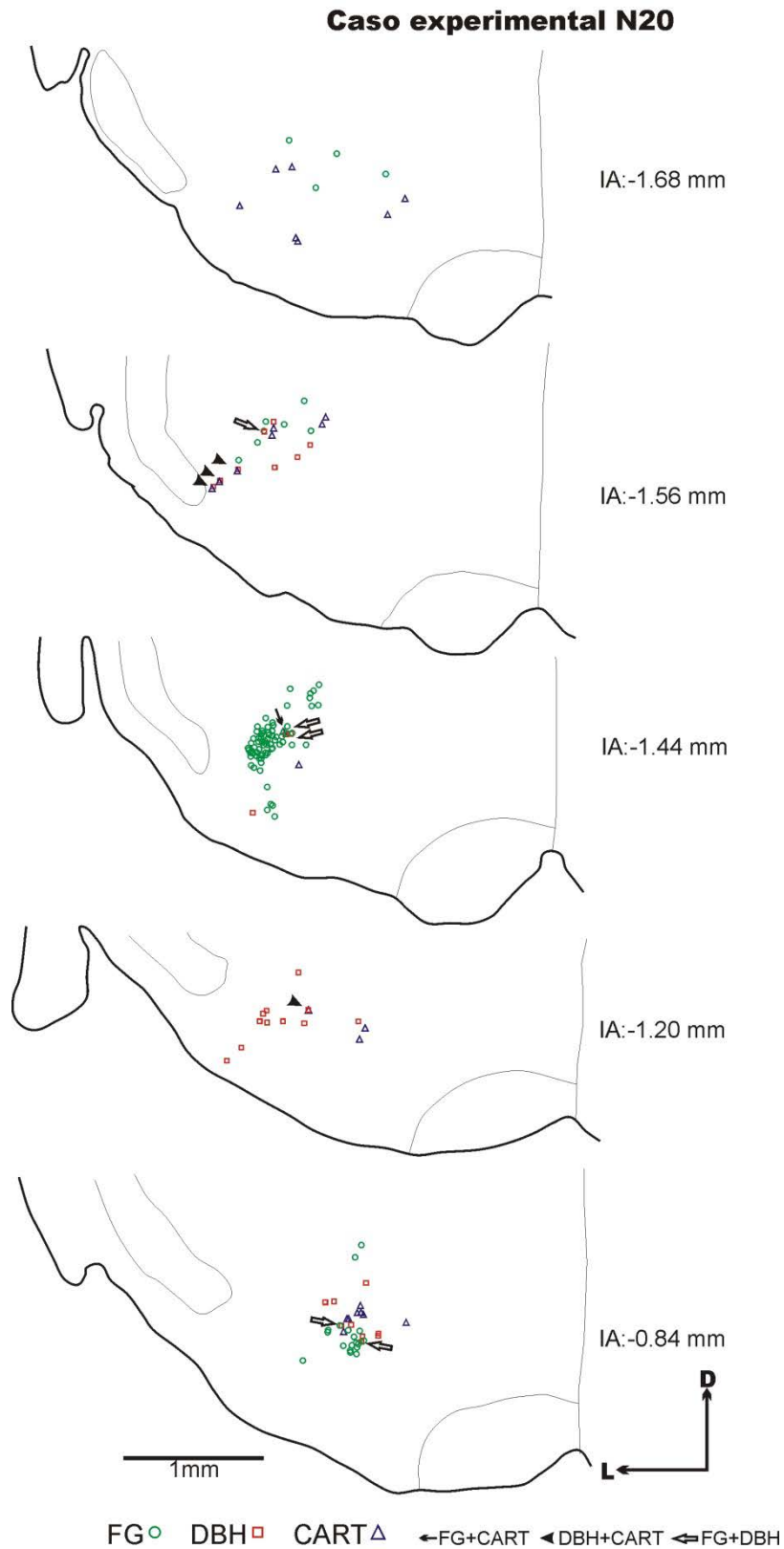


Figura 13. Esquemas de cortes coronais do troncoencefálico, na região do grupamento noradrenérgico A5, do caso experimental N20, onde foram mapeados os neurônios imunorreativos ao FG (círculos verdes), DBH (quadrados vermelhos) e CART (triângulos azuis). O nível rostrocaudal aproximado com relação a 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. Fonte: material elaborado pelo aluno.

Caso experimental N25

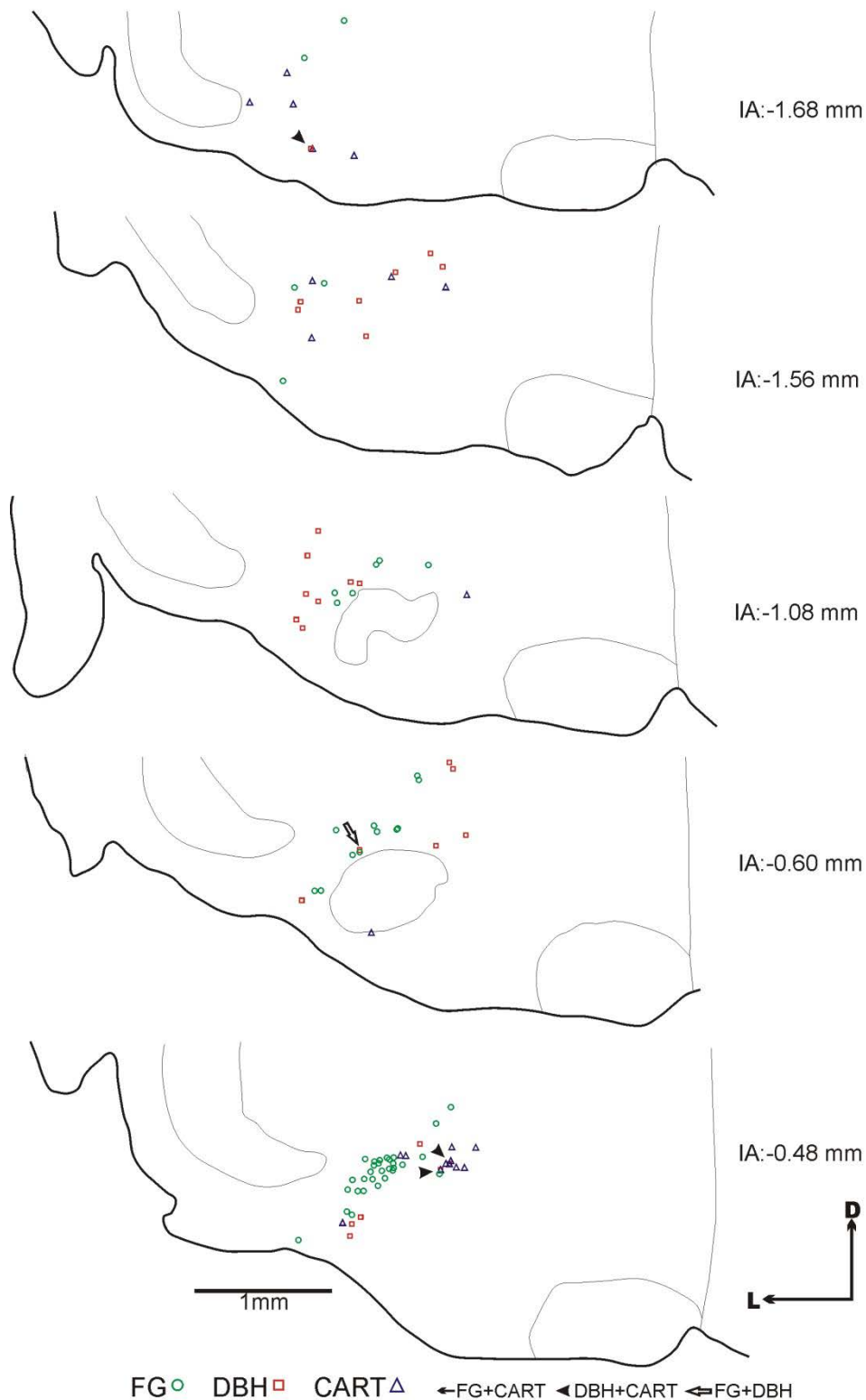


Figura 14. Esquemas de cortes coronais do troncoencefálico, na região do grupamento noradrenérgico A5, do caso experimental N25, onde foram mapeados os neurônios imunorreativos ao FG (círculos verdes), DBH (quadrados vermelhos) e CART (triângulos azuis). O nível rostrocaudal aproximado com relação a 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. Fonte: material elaborado pelo aluno.

DISCUSSÃO

Neste trabalho evidenciamos que a região noradrenérgica A5 possui influência sobre o paradigma comportamental da inibição por estímulo prévio (uma das modulações do RAS) interferindo de forma significativa nos intervalos interestímulo longos como 100 e 150ms. Também observamos que esta região é aferente a raiz coclear e sua identidade neuroquímica inclui a noradrenalina e o neuropeptídeo CART, embora não possam ser segregadas subregiões com base na distribuição destas substâncias neuroativas ou sua conectividade, já que os somas retrogradamente marcados com FG e imunorreativos a DBH e CART estão entremeados ao longo de todos os níveis rostro-caudais.

Devido a existência de somas noradrenérgicos e CART-érgicos duplamente marcados com FG, assim como a existência de fibras nervosas imunorreativas ao NPY na região A5, sugere-se que estas substâncias neuroativas tem um possível envolvimento nas respostas comportamentais do RAS e suas modulações.

Segundo Chronwall et al. (1985) o NPY pode ser encontrando em diversas regiões do encéfalo, no entanto, é encontrado em maior concentrações em regiões prosencefálicas como: núcleo hipotalâmico paraventricular, núcleo arqueado hipotalâmico, núcleo supraquiasmático, eminência mediana, núcleo hipotalâmico dorsomedial, núcleo talâmico paraventricular e núcleo estriado (putamen-caudado). Devido grande imunoreatividade do núcleo estriado, utilizamos esta região no prosencéfalo como controle positivo em nossos experimentos.

Tatemoto (2004), sugere que o papel do NPY no sistema nervoso central é bastante complexo devido a sua ampla distribuição e a sua co-existência com outros neurotransmissores ou neuropeptídeos como a noradrenalina. Gutman et al. (2008), mostraram que o NPY está envolvido no sobressalto potenciado pelo medo, uma vez que quando administrado de forma exógena inibiu este comportamento, chegando a sugerir que o NPY presente no encéfalo pode apresentar um importante papel no desenvolvimento da extinção desta modulação do RAS. Além disso, Tatemoto (2004) demonstrou que o NPY possui ação anti-estresse. Sabe-se que animais que apresentam estresse possuem um RAS aumentado, dessa forma acredita-se que o NPY pode modular resultados no sobressalto diminuindo-o ou até mesmo deixando-o normal.

Em nossos experimentos observamos que o LC é imunorreativo ao NPY tanto para fibras quanto para somas. Também foram observadas fibras nervosas imunorreativas ao NPY no PnC e na região noradrenérgica A5 (a qual identificamos como aferente a raiz coclear em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, ainda não publicados). Contudo, não houve marcação nem de fibras nem de somas na raiz coclear. Sabe-se que o PnC é considerado a interface sensorio-motora mais importante no circuito primário do reflexo de sobressalto, pois possui aferências excitatórias auditivas de diferentes latências, provindas de vários núcleos do tronco encefálico, incluindo o LC (Koch, 1999). Por outro lado, sabe-se que o LC inerva a região noradrenérgica A5, a raiz coclear e o próprio PnC (Hormigo et al. 2014). Dessa forma, acreditamos que o NPY tenha um provável envolvimento no circuito basal e na potenciação por medo no sobressalto. O NPY pode estar envolvido indiretamente na modulação da via de sobressalto através de núcleos que inervam o PnC e através do LC, que participa da modulação da potenciação por medo do RAS (Koch, 1999).

BIBLIOGRAFIA

- Adrian TE, Allen JM, Bloom SR et al. (1983) Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature* 306:584–586
- Allen YS, Adrian TE, Allen JM et al. (1983) Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 221:877–879
- Andreski P, Chilcoat H, Breslau N. 1998. Post-traumatic stress disorder and somatization symptoms: A prospective study. *Psychiatry Research* 79(2):131-138.
- Anisman H, Kelly O, Hayley S, Borowski T, Merali Z, McIntyre DC. 2000. Acoustic startle and fear-potentiated startle in rats selectively bred for fast and slow kindling rates: Relation to monoamine activity. *European Journal of Neuroscience* 12(12):4405-4416.
- Bakshi VP, Swerdlow NR, Geyer MA. 1994. Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of the startle response. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 271(2):787-794.
- Baudrie V, Tulen JH, Blanc J, Elghozi JL. 1997. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. *J Auton Pharmacol* 17(5):303-309.
- Bell RL, Rodd ZA, Hsu CC, Lumeng L, Murphy JM, McBride WJ. 2003. Amphetamine-modified acoustic startle responding & prepulse inhibition in adult & adolescent alcohol-preferring & -nonpreferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 75(1):163-171.
- Borowski TB, Kokkinidis L. 1994. Cocaine preexposure sensitizes conditioned fear in a potentiated acoustic startle paradigm. *Pharmacol Biochem Behav* 49(4):935-942.
- Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR. 2001. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl)* 156(2-3):234-258.
- Brown P. 1995. Physiology of startle phenomena. *Adv Neurol* 67:273-287.
- Burman, K. J. et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in catecholamine and noncatecholamine presympathetic vasomotor neurons of rat rostral ventrolateral medulla. *J Comp Neurol*, v. 476, p. 19-31, 2004.
- Casey MA, Feldman ML. 1982. Aging in the rat medial nucleus of the trapezoid body I: light microscopy. *Neurobiol Aging* 3:187-195.
- Chronwall BN, DiMaggio, DA, Massari VJ et al. (1985) The anatomy of neuropeptide Y- containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 15:1159–1181
- Cook EW, 3rd, Davis TL, Hawk LW, Spence EL, Gautier CH. 1992. Fearfulness & startle potentiation during aversive visual stimuli. *Psychophysiology* 29(6):633-645.
- Davis M, Gendelman DS, Tischler MD, Gendelman PM. 1982. A primary acoustic startle circuit: lesion & stimulation studies. *J Neurosci* 2(6):791-805.
- Davis M. 2006. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. *American Psychologist* 61(8):741-756.
- Dudek BC, Phillips TJ, Hahn ME. 1991. Genetic analyses of the biphasic nature of the alcohol dose-response curve. *Alcoholism, clinical & experimental research* 15(2):262-269.
- Dun SL, Ng YK, Brailoiu GC, Ling EA, Dun NJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide-immunoreactivity in adrenergic C1 neurons projecting to the intermediolateral cell column of the rat. *J Chem Neuroanat* 23:123–132, 2002.

- Ebert U, Koch M. 1992. Glutamate receptors mediate acoustic input to the reticular brain stem. *Neuroreport* 3(5):429-432.
- Fendt M, Li L, Yeomans JS. 2001. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology (Berl)* 156(2-3):216-224.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. 2001. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: A decade in review. *Psychopharmacology* 156(2-3):117-154.
- Gómez-Nieto R, Horta-Junior JAC, Castellano O, Herrero Turrión MJ, Rubio ME, López DE. Neuroscience, In press. Neurochemistry of the afferents to the rat cochlear root nucleus: Possible synaptic modulation of the acoustic startle.
- Gomez-Nieto R, Rubio ME, Lopez DE. 2008. Cholinergic input from the ventral nucleus of the trapezoid body to cochlear root neurons in rats. *J Comp Neurol* 506(3):452-468.
- Gonzalez-Lima F, Finkenstadt T, Ewert JP. 1989. Neural substrates for long-term habituation of the acoustic startle reflex in rats: a 2-deoxyglucose study. *Neurosci Lett* 96(2):151-156.
- Grillon C, Sinha R, O'Malley SS. 1994. Effects of ethanol on the acoustic startle reflex in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 114(1):167-171.
- Gutman, AR., Yang Y, Ressler KJ and Davis M. 2008. The role of neuropeptide Y in the expression and extinction of fear-potentiated startle. *J Neurosci* 28(48): 12682-12690.
- Harrison JM, Warr WB, Irving RE. 1962. Second order neurons in the acoustic nerve. *Science* 138:893-895.
- Heekeren K, Daumann J, Geyer MA, Gouzoulis-Mayfrank E. 2004. Plasticity of the acoustic startle reflex in currently abstinent ecstasy (MDMA) users. *Psychopharmacology (Berl)* 173(3-4):418-424.
- Hoffman HS, Fleshler M. 1963. Startle reaction: Modification by background acoustic stimulation. *Science* 141:928-930.
- Hoffman HS, Ison JR. 1980. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev* 87(2):175-189.
- HORMIGO, S. et al. The noradrenergic projection from the *locus coeruleus* to the cochlear root neurons in rats. *Brain Struct Funct*, v. p. 2014.
- Horta-Junior JAC, Lopez DE, Alvarez-Morujo AJ, Bittencourt JC. 2008. 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* 507(5):1763-1779.
- Hutchison KE, Niaura R, Swift R. 2000. The effects of smoking high nicotine cigarettes on prepulse inhibition, startle latency, & subjective responses. *Psychopharmacology (Berl)* 150(3):244-252.
- Justus AN, Finn PR. 2007. Startle modulation in non-incarcerated men and women with psychopathic traits. *Personality and Individual Differences* 43(8):2057-2071.
- Kaviani H, Gray JA, Checkley SA, Raven PW, Wilson GD, Kumari V. 2004. Affective modulation of the startle response in depression: Influence of the severity of depression, anhedonia, and anxiety. *Journal of Affective Disorders* 83(1):21-31.
- Keay KA, Redgrave P, Dean P. 1988. Cardiovascular & respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus. *Brain Res Bull* 20(1):13-26.
- Koch M. 1998. Sensorimotor gating changes across the estrous cycle in female rats. *Physiol Behav* 65(5):625-628.

- Koch M. 1999. The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 59(2):107-128.
- Koylu, E. O. et al. Cart peptides colocalize with tyrosine hydroxylase neurons in rat *locus coeruleus*. *Synapse*, v. 31, p. 309-11, 1999.
- Krase W, Koch M, Schnitzler HU. 1993. Glutamate antagonists in the reticular formation reduce the acoustic startle response. *Neuroreport* 4(1):13-16.
- Kuhar, M. J. et al. Cart peptides. *Regul Pept*, v. 89, p. 1-6, 2000.
- Kulesza RJ, Berrebi, AS. 2000. Superior paraolivary nucleus of the rat is a GABAergic nucleus. *J Asso Res Oto* 1:255-269
- Kungel M, Ebert U, Herbert H, Ostwald J. 1994. Substance P and other putative transmitters modulate the activity of reticular pontine neurons: an electrophysiological and immunohistochemical study. *Brain Res* 643(1-2):29-39.
- Landis C, Hunt WA. 1939. The startle pattern. New York: Ferrar & Rinehart.
- Lee Y, López DE, Meloni EG, Davis M. 1996. A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons & the nucleus reticularis pontis caudalis. *J Neurosci* 16(11):3775-3789.
- Lewis MC, Gould TJ. 2003. Nicotine & ethanol enhancements of acoustic startle reflex are mediated in part by dopamine in C57BL/6J mice. *Pharmacol Biochem Behav* 76(1):179-186.
- Lingenhöhl K, Friauf E. 1994. Giant neurons in the rat reticular formation: a sensorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit? *J Neurosci* 14(3 Pt 1):1176-1194.
- López DE, Merchán MA, Bajo VM, Saldana E. 1993. The cochlear root neurons in the rat, mouse & gerbil. In: Merchán MA, editor. *The mammalian cochlear nuclei: organization & function*. New York: Plenum Press. p 291-301.
- López DE, Saldana E, Nodal FR, Merchán MA, Warr WB. 1999. Projections of cochlear root neurons, sentinels of the rat auditory pathway. *J Comp Neurol* 415(2):160-174.
- Mansbach RS, Gold LH, Harris LS. 1992. The acoustic startle response as a measure of behavioral dependence in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 108(1-2):40-46.
- Merchán MA, Collia F, López DE, Saldana E. 1988. Morphology of cochlear root neurons in the rat. *J Neurocytol* 17(5):711-725.
- Miserendino MJ, Davis M. 1993. NMDA and non-NMDA antagonists infused into the nucleus reticularis pontis caudalis depress the acoustic startle reflex. *Brain Res* 623(2):215-222.
- Nodal FR, López DE. 2003. Direct input from cochlear root neurons to pontine reticulospinal neurons in albino rat. *J Comp Neurol* 460(1):80-93.
- Osen KK, López DE, Slyngstad TA, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. 1991. GABA-like & glycinelike immunoreactivities of the cochlear root nucleus in rat. *J Neurocytol* 20(1):17-25.
- Osterlund MK, Hurd YL. 1998. Acute 17beta-estradiol treatment down-regulates serotonin 5HT1A receptor mRNA expression in the limbic system of female rats. *Mol. Brain Res.* 55, 169–172.
- Paxinos G, Watson C. 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: the new coronal set – 161 diagrams*. San Diego: Academic Press.
- Pilz PK, Schnitzler HU. 1996. Habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats: amplitude, threshold, and latency measures. *Neurobiol Learn Mem* 66(1):67-79.
- Sinex DG, López DE, Warr WB. 2001. Electrophysiological responses of cochlear root neurons. *Hearing Research* 158(1-2):28-38.

- Stam R. 2007. PTSD and stress sensitisation: A tale of brain and body. Part 1: Human studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31(4):530-557.
- Swerdlow NR, Blumenthal TD, Sutherland AN, Weber E, Talledo JA. 2007. Effects of prepulse intensity, duration, and bandwidth on perceived intensity of startling acoustic stimuli. *Biol Psychol* 74(3):389-395.
- Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA. 2000. Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, & what we hope to know soon. *Behav Pharmacol* 11(3-4):185-204.
- Swerdlow NR, Eastvold A, Karban B, Ploum Y, Stephany N, Geyer MA, Cadenhead K, Auerbach PP. 2002. Dopamine agonist effects on startle & sensorimotor gating in normal male subjects: time course studies. *Psychopharmacology (Berl)* 161(2):189-201.
- Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL. 2001. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge & future challenges. *Psychopharmacology (Berl)* 156(2-3):194-215.
- Swerdlow NR, Geyer MA. 1993. Clozapine and haloperidol in an animal model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 44(3):741-744.
- Tatemoto K, 2004. Neuropeptide Y and Related Peptides. In: _____. *Neuropeptide Y: History and Overview*. Springer Berlin Heidelberg. pp 1-21.
- Tohyama, M., Takatsuji, K., & Kantha, S. Sri. (1998). *Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat*. Oxford: Oxford University Press.
- Valls-Solé J. 1998. Acoustic & somatosensory prepulse modulation of the blink reflex & the startle reaction. *Brainstem Reflexes & Functions*. Madrid: Litofinter, S.A. p 119-131.
- Vicentic, A.; Jones, D. C. The cart (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 320, p. 499-506, 2007.
- Vollenweider FX, Remensberger S, Hell D, Geyer MA. 1999. Opposite effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on sensorimotor gating in rats versus healthy humans. *Psychopharmacology (Berl)* 143(4):365-372.
- Wagner T, Mack A. 1998. Membrane properties of giant neurons in the caudal pontine reticular formation in vitro. *Neuroreport* 9(6):1211-1215.
- Wilkins DE, Hallett M, Wess MM. 1986. Audiogenic startle reflex of man & its relationship to startle syndromes. A review. *Brain* 109 (Pt 3):561-573.
- Winslow JT, Noble PL, Davis M. 2007. Modulation of Fear-Potentiated Startle and Vocalizations in Juvenile Rhesus Monkeys by Morphine, Diazepam, and Buspirone. *Biological psychiatry* 61(3):389-395.
- Yeomans JS, Frankl PW. 1996. The acoustic startle reflex: neurons & connections. *Brain Res Brain Res Rev* 21(3):301-314.
- Yeomans JS, Lee J, Yeomans MH, Steidl S, Li L. 2006. Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rat. *Neuroscience* 142(4):921-929.
- ZAR, J. H. *Biostatistical analysis*, 5 ed. Prentice-Hall, New Jersey, 994 p., 2009.

Apêndice A – Protocolo imunoistoquímica para fluorescência

*****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!!)

***** Caso já tenha sido realizado outro procedimento de imunoistoquímica passar para lavagem com tbs-tx.. Para materiais previamente mantidos em solução anticongelante, acrescentar mais 3 lavagens de 10 minutos com pb (tampão fosfato) antes de se iniciar o protocolo. *****

- 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.

- 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, em soro fetal bovino inativado ou com albumina bovina (BSA). Preparar a solução a 2% em TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar 1 ml por potinho. Obs: caso sobre soro normal na alíquota, marcar um ponto com caneta na tampa do microtubo e guardar a alíquota em sua caixa, no freezer.

Obs: não é necessário lavar a solução de bloqueio, incubar diretamente.

- Anticorpo primárioconcentração: 1/10.00048 horas à 4 °C em agitação.

Em uma alíquota _____ adicionar _____ de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.

Incubar de 0,5 a 1 ml por potinho.

*****2º Dia*****

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

- Anticorpo secundário _____ concentração _____ 120 min. temp. ambiente em agitação.

Adicionar _____ μ l de anticorpo secundário para _____ μ l de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6, agitar, descansar até que não hajam bolhas e incubar de 0,5 a 1ml por potinho. Obs: pode ficar 1 noite a 4 °C em agitação.

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

- Tris-HCl 0,05 M pH 7,6.....2 X 10 min. em agitação

Tris-HCl se prepara:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 $C_4H_{11}NO_3$ PM 121,1).....6,06 gr

- H₂O dest.q.s.p. 1000 ml

Ajustar o pH com solução de HCl até 7,6

- Montagem dos cortes

Montar os cortes em lâminas, organizando-os em uma placa de Petri com gelatina (Merck 1.04078.0500, Gelatina 0,1%). Para preparar gelatina a 0,1%, diluir 50 ml da solução estoque em 750 ml de H₂O 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..... 0,2g(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 reagentes fluorescentes, cobrir usando meio de montagem Fluoromount (Sigma #F4680). Selar as bordas da lamínula com esmalte de unha. Armazenar as lâminas em geladeira envolvidas com papel alumínio.

OBS.: Devido a que os anticorpos primários para o FG e CART serem produzidos no mesmo animal (coelho) foi necessário utilizar duas séries de cortes para identificar no tecido as três substâncias. Assim, em uma série foi identificado o FG e o DBH e em outra série imediatamente subsequente, foram identificados o DBH e o CART. Para todas as substâncias neuroativas foi utilizado este mesmo protocolo realizando mudanças somente nos anticorpos primários e secundários segundo segue:

-DBH: anticorpo primário – anti-DBH (Chemicon MAB 308) 1/10.000; Anticorpo secundário – anti-mouse CY2 (Jackson Immunoresearch #115225003) 1/250

-CART: anticorpo primário – α -Cart (55-102) PHOENIX (#H-003-62) 1/10.000; Anticorpo secundário – goat anti-rabbit CY3 - 1/200

-FG: Anticorpo primário rabbit anti-Fluoro Gold 1:10.000; Anticorpo secundário goat anti-rabbit CY3 - 1:200

Apêndice B – Protocolo imunohistoquímica NPY

*****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!!)

***** Caso já tenha sido realizado outro procedimento de imunoistoquímica passar para lavagem com tbs-tx.. Para materiais previamente mantidos em solução anticongelante, acrescentar mais 3 lavagens de 10 minutos com pb (tampão fosfato) antes de se iniciar o protocolo. *****

- 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 NPY n X-100 (Merck - 1.08603.1000 C₃₄H₆₂O₁₁ PM 646,37) à 20%.....12,5 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 ou com albumina bovina (BSA). Preparar a solução a 2% em TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar 1 ml por potinho. Obs: caso sobre soro normal na alíquota, marcar um ponto com caneta na tampa do microtubo e guardar a alíquota em sua caixa, no freezer.

- Anticorpo primário (Sheep anti-NPY polyclonal antibody -Chemicon #AB1583) concentração 1/5000....48 horas à 4 °C em agitação.

Em uma alíquota 2µl de NPY adicionar 998µl de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar de 0,5 a 1 ml por potinho. Obs: não é necessário lavar a solução de bloqueio, incubar diretamente.

Obs: Foram feitas três diferentes concentrações (1/1000, 1/5000 e 1/10000). Sendo que dentre estas três foi escolhido a concentração de 1/5000.

*****2º Dia*****

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

- Anticorpo secundário anti-sheep biotinilado, concentração: 1/200 120 min. temp. ambiente em agitação.

Adicionar 30 µl de anticorpo secundário para 2970 µl de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6, agitar, descansar até que não hajam bolhas e incubar de 0,5 a 1ml por potinho. Obs: pode ficar 1 noite a 4 °c em agitação. (Solução suficiente para incubar três potinhos).

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

Obs: caso seja utilizado anticorpo secundário fluorescente passe para a montagem das lâminas, caso seja utilizado anticorpo secundário biotinilado siga para o passo seguinte.

- 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 DE 0,5 a 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 121,1).....6,06 gr
- H₂O dest.q.s.p. 1000 ml

Ajustar o pH com solução de HCl até 7,6

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

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

Solução de revelação DAB (até 8 potinhos):

-12,5 ml Tris-HCl 0,05 M pH 7,60

-Adicionar uma alíquota de 200µl de solução de DAB a 1% em H₂O₂ (pegar no freezer)

-Adicionar 2,5µl de água oxigenada P.A. imediatamente antes de incubar (H₂O₂ 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. 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 material processado para fluorescência= Gelatina 0,1%). Colocar as lâminas com os cortes já montados em um suporte coberto com papel alumínio em estufa por 1 dia à uma temperatura de aproximadamente 38°C.

Para preparar a gelatina 0,4% diluir 50 ml da solução estoque 4X, congelada nos tubos falcon, em 150 ml de H₂O dest. Para gelatina a 0,1% diluir 50 ml da solução estoque em 750 ml de H₂O 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

- Desidratação (somente para material com DAB)

Álcool 100%.....3 min.

Álcool 100%.....3 min.

Álcool 100%.....3 min.

Xilol I5 min.

Xilol II.....5 min.

Xilol III.....5 min.

- Cobertura com lamínula

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

Para material com reagentes fluorescentes, cobrir usando meio de montagem específico de fluorescência. Armazenar as lâminas em geladeira envolvidas com papel alumínio.

Apêndice C – Protocolo para mensuração do reflexo acústico de sobressalto

As avaliações do RAS e da PPI são realizadas em sessões que duram cerca de 40min. Durante toda sessão, as câmaras são mantidas com ventilação constante e com as luzes acessas, 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 sonora, modelo DEC-460, Instrutherm Ltda., calibração interna 94,0dB) colocado sobre a plataforma de medição, na mesma posição na qual é afixada a gaiola de prova,. Para aferição do ruído de fundo, o decibelímetro foi usado nas configurações Speed SLOW e dB low, enquanto que para aferição dos estímulos acústicos (pré-pulsos e pulsos), as configurações foram Speed FAST e dB hi, seguindo as especificações do fabricante. Foram construídas curvas de calibração do ruído de fundo e dos estímulos acústicos de dois tipos: ruído branco e tons puros. Os tons puros foram calibrados nas frequências de 2kHz, 4kHz e 18kHz, que representam estímulos de baixas, médias e altas frequências, respectivamente, e compreendem grande parte do espectro auditivo do rato. Os estímulos acústicos foram utilizados como desencadeadores do reflexo de sobressalto e como pré-pulsos, variando-se unicamente sua intensidade.

Passos para avaliação comportamental do RAS e PPI:

1. Iniciar o sistema

- Ligar o computador.
- Ligar a caixa de sobressalto.
- Verificar se a régua de força está ligada.
- Verificar se o plug USB está conectado.

2. Iniciar a rotina

- Colocar as duas Câmeras de video no canto direito do desktop
- Abrir o programa “Sobressalto”, na Área de Trabalho.
- Ir em Editar > Procedimento.
- Abrir “Arquivo de procedimento existente” ou buscá-lo em histórico.
- Localizar o arquivo da sessão de interesse e abri-lo.

3. Resumo do procedimento

- Anotar na ficha de experimento número, espécie e peso do animal que será submetido à prova de sobressalto, bem como a data, o número da sessão (ID) e a caixa (01 ou 02) na qual a prova foi realizada.

- Colocar o animal na gaiola cilíndrica (tamanho máximo do animal = 310g) e fechá-la com dois elásticos para evitar a abertura das portas.

- Posicionar a gaiola na balança, dentro da caixa, e fixar os parafusos (Sempre segurar a balança para que não se faça força na balança, evitando sua descalibração).

- Abrir a sessão desejada. - Preencher cuidadosamente os dados de cada balança no sistema: pesquisador (responsável pela sessão), título (Prova Basal ou PREPISI), sujeito (número do animal NXX/ANO), cobaia (rato) e peso. *Obs.:* caso alguma das balanças esteja vazia durante uma sessão, escrever, em todos os campos, “vazio”.

- Antes de iniciar a sessão, utilizar o comando “Converter para planilha – Excel” para salvar o protocolo do procedimento em um arquivo Excel.

- Iniciar a sessão.

- Acompanhar resposta do animal através da câmara (acesso por Meu Computador > Câmera 01/02) e dos dados gerados pelo programa.

- Após o término da sessão, retirar o animal da gaiola e limpá-la com água durante as sessões. Ao término das sessões daquele período, lavar a gaiola com água e sabão e higienizar com álcool 90%.

04. Prova Basal

Período de habituação com ruído de fundo (RF) ligado – 05 minutos

Bloco 01: estímulo sozinho (treino) – 75dB – 05 repetições

Bloco 02: estímulo sozinho – 75dB

Bloco 03: estímulo sozinho – 79dB

Bloco 04: estímulo sozinho – 84dB

Bloco 05: estímulo sozinho – 87dB

Bloco 06: estímulo sozinho – 89dB

Bloco 07: estímulo sozinho – 91dB

Bloco 08: estímulo sozinho – 93dB

Bloco 09: estímulo sozinho – 95dB

Bloco 10: estímulo sozinho – 97dB

Bloco 11: estímulo sozinho – 99dB

Bloco 12: estímulo sozinho – 101dB

Bloco 13: estímulo sozinho – 103dB

Bloco 14: estímulo sozinho – 105dB

Bloco 15: estímulo sozinho – 107dB

Bloco 16: estímulo sozinho – 109dB

Bloco 17: estímulo sozinho – 111dB

Bloco 18: estímulo sozinho – 113dB

05. PREPISI

Período de habituação com ruído de fundo (RF) ligado – 05 minutos

Bloco 06: estímulo sozinho (treino) – 113dB – 05 repetições

Bloco 01: estímulo sozinho – 113dB – 12 repetições

Bloco 02: estímulo + pré-pulso 25ms – 12 repetições

Bloco 03: estímulo + pré-pulso 50ms – 12

Bloco 04: estímulo + pré-pulso 100ms – 12 repetições

Bloco 05: estímulo + pré-pulso 150ms – 12 repetições

Repetições	sistematicamente
randomizadas	através do
processo de quadrado latino	

06. Exportação de relatórios com dados das sessões

- Para gerar o relatório de respostas, acessar, no programa, Relatórios > Sequências Respostas.
- Selecionar o ID da prova de interesse, bem como a balança do animal desejado.
- Verificar se a caixa “Organizar pesquisa por tentativa” está marcada e clicar em “Pesquisar”.
- Exportar os dados para o Excel (menu superior à esquerda) e salvar a planilha na pasta da sessão. *Obs.:* padronizar o nome do arquivo como “ID_X-NY”.

07. Exportação de dados das respostas individuais (para elaboração de gráficos das respostas)

- Para gerar os gráficos das respostas, acessar, no programa, Ferramentas > Exportar Dados.
- Selecionar o tipo de arquivo para “Arquivo de dados”.
- Escolher e abrir a sessão desejada pelo ID e número da balança (descrito no nome de cada arquivo).
- Exportar para planilha Excel (menu superior à esquerda) e salvar na pasta da sessão. *Obs.:* padronizar o nome do arquivo como “ID_X-NY Gráficos”.