

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO HODOLÓGICO DAS AFERÊNCIAS AO PRIMEIRO NÚCLEO DO CIRCUITO NEURAL DO  
REFLEXO AUDITIVO DE SOBRESSALTO: NÚCLEO DA RAIZ COCLEAR

Nicole Orsi Barioni

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

BOTUCATU – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO HODOLÓGICO DAS AFERÊNCIAS AO PRIMEIRO NÚCLEO DO CIRCUITO NEURAL DO  
REFLEXO AUDITIVO DE SOBRESSALTO: NÚCLEO DA RAIZ COCLEAR

Discente: Nicole Orsi Barioni

Orientador: José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

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

BOTUCATU – SP

2012

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

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

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

Orientador: José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Capes: 20604009

1. Neurônios. 2. Rato. 3. Circuitos neurais. 4. Tronco encefálico.

Palavras-chave: Fluoro-Gold; Integração Sensoriomotora; Núcleo da Raiz Coclear; Startle; Traçadores Neurais.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pois sem eles nada disso seria possível.  
À minha vó Concha (in memoriam), que infelizmente não pode estar presente  
neste momento de grande conquista da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Thelma e Edson, pela confiança em mim, pelo apoio em minhas decisões e pela oportunidade em realizar meus sonhos. Por acreditarem em quem eu sou e me darem confiança para ir mais longe.

Ao meu namorado Felipe, por toda paciência, ajuda, compreensão e carinho, por estar junto a mim, me dando força e coragem, mesmo quando estivemos separados por um oceano.

Eu agradeço ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior por toda paciência, dedicação e esforço pelo meu aprendizado e crescimento científico, e pelos bons momentos que passamos juntos.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Neuromorfologia do Departamento de Anatomia IBB – UNESP, André, Rian e Marina, os quais colaboraram com os experimentos contidos neste trabalho, que juntamente a Fernanda e Carla, criaram um ambiente saudável no laboratório.

Agradeço também à Profa. Dra. Maria Dolores Estilita López García pela oportunidade que me foi concedida para realização de parte de meu estágio obrigatório em seu Laboratório de Transtornos Audiomotores do Instituto de Neurociências de Castilla y León em Salamanca, na Espanha e pela revisão e orientação em meu trabalho de conclusão de curso. Fico muito agradecida aos colaboradores deste laboratório que me auxiliaram e acolheram durante este período maravilhoso que passei na Espanha: Richard, Orlando, Sonia, David, Biviana, Sebastian, Lymarie e Consuelo. Também não poderia deixar de agradecer às pessoas com quem morei em Salamanca: Prosper, Vincenzo, Artur, Carmen e Marco, que criaram um ambiente fraterno, fazendo com que minhas saudades de casa fossem amenizadas.

Aos meus amigos, Micaela e Rafael, que me apoiaram e que sempre estiveram ao meu lado durante esta longa caminhada, agradeço pelos momentos de risada que me fizeram esquecer minhas ansiedades e angústias.

Ao departamento de anatomia, onde realizei toda a minha iniciação científica, agradeço também ao técnico de laboratório (auxiliar acadêmico) deste departamento, Gelson, por todo apoio dado durante o desenvolvimento dos experimentos que realizei. À pró-reitoria de pesquisa e ao CNPq (PIBIC) pelo apoio financeiro durante minha iniciação científica, à FAPESP que financia o projeto ao qual estou vinculada e ao Instituto de Bociências da UNESP de Botucatu, todos os professores e funcionários por terem auxiliado em minha formação profissional.

E a todas as outras pessoas que estiveram presentes em pequenos momentos, mas que fizeram uma grande diferença nesta etapa da minha vida.

## EPÍGRAFE

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”  
Antonie de Saint-Exupéry

## 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 juntamente com as células ganglionares do órgão de Corti, o núcleo reticular caudal da ponte e os motoneurônios da medula espinal. O reflexo auditivo de sobressalto 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 reflexo auditivo de sobressalto ocorrem mediante a influência de diversos núcleos sobre os componentes do circuito elementar deste reflexo. O núcleo menos estudado do circuito neural do reflexo auditivo de sobressalto 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. O conhecimento das aferências aos neurônios da raiz coclear é relevante para compreender qual o papel do núcleo da raiz coclear nas modulações do reflexo auditivo de sobressalto. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar quais são as origens das aferências aos neurônios da raiz coclear com técnicas de mapeamento de vias nervosas. Para isto, foi utilizada uma abordagem estereotáxica para injetar um neurotraçador retrógrado na raiz coclear de 22 ratos wistar fêmea pesando entre 250g e 300g. Após este procedimento, os animais foram sacrificados, o encéfalo retirado do crânio, cortado em seções de 30um e dividido em 10 séries. Para cada caso foram utilizadas 4 séries para processamento imunohistoquímico e revelação do neurotraçador. Após isto, os cortes foram montados em lâminas para posterior fotodocumentação e mapeamento. A análise do material permitiu a realização de um estudo semi-quantitativo dos perfis neuronais marcados em cada caso. A partir dos dados obtidos, foi montada uma tabela para visualização e discussão dos resultados. As fontes de aferências comuns a todos os casos foram 8 núcleos: O lócus coeruleus (bilateralmente), núcleo subcoeruleus (contralateralmente), núcleo lateral superior da oliva (bilateralmente), núcleo ventral do corpo trapezoide (bilateralmente), núcleo noradrenérgico A5 (ipsilateralmente), núcleo paragigantocelular lateral (bilateralmente), núcleo reticular parvicelular (bilateralmente) e núcleo reticular intermédio (bilateralmente). Estes núcleos observados são os possíveis alvos de estudo anterógrados futuros para confirmação destas aferências aos neurônios da raiz coclear, juntamente a estudos neuroquímicos e comportamentais, para verificar sua influência sobre estes neurônios e seu papel nas modulações do reflexo acústico de sobressalto.

Palavras chave: Integração Sensoriomotora; Núcleo da Raiz Coclear; Startle; Traçadores Neurais, Fluoro-Gold

## RESUMEN

Las neuronas de la raíz coclear son las primeras neuronas del sistema nervioso central a recibir la información auditiva proveniente de la cóclea y se conectan con centros de integración sensoriomotora del tronco encefálico, especialmente con el núcleo reticular caudal del puente. Funcionalmente las neuronas de la raíz coclear están envueltos en el circuito elemental del reflejo auditivo de sobresalto juntamente con las células ganglionares del órgano de Corti, el núcleo reticular caudal del puente y las motoneuronas de la médula espinal. El reflejo auditivo de sobresalto presenta una serie de modulaciones como la habituación, la sensibilización, la inhibición por estímulo previo y la potenciación por un estímulo adverso. Las alteraciones en la reacción refleja de sobresalto y sus diferentes modulaciones poseen valor diagnóstico en la clínica médica de enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas como Parkinson y Esquizofrenia. Las modulaciones del reflejo auditivo de sobresalto ocurren mediante la influencia de diversos núcleos sobre los componentes del circuito elemental de este reflejo. El núcleo menos estudiado del circuito neural del reflejo auditivo de sobresalto es el núcleo de la raíz coclear. El patrón de conectividad eferente de las neuronas de la raíz coclear es bien conocido, sin embargo poco se conoce sobre los orígenes de sus aferencias y la identidad neuroquímica de las mismas. Estudios previos demostraron que el soma y en las dendritas de las neuronas de la raíz coclear están cubiertos por botones sinápticos de cuatro tipos, sugiriendo que existan diversos orígenes para estos terminales axonales, con características neuroquímicas propias. El conocimiento de las aferencias a las neuronas de la raíz coclear es relevante para comprender cual el papel del núcleo de la raíz coclear en las modulaciones del reflejo auditivo de sobresalto. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar cuáles son los orígenes de las aferencias a las neuronas de la raíz coclear con técnicas de trazado de vías nerviosas. Para esto, fue utilizado un abordaje estereotáxico para inyectar un neurotrazador retrógrado en la raíz coclear de 22 ratas Wistar hembra pesando entre 250g y 300g. Después de este procedimiento, los animales fueron sacrificados, el encéfalo retirado del cráneo, cortado en secciones de 30 $\mu$ m y dividido en 10 series. Para cada caso inmunohistoquímico y revelación del neurotrazador. Después de esto, los cortes fueron montados en porta objetos para posterior fotodocumentación y estudio. El análisis del material permitió la realización de un estudio semi-cuantitativo de los perfiles neuronales marcados en cada caso. A partir de los datos obtenidos, fue montada una tabla para visualización y discusión de los resultados. Las fuentes de aferencias comunes a todos los casos fueron 8 núcleos: El lócus coeruleus (bilateralmente), núcleo subcoeruleus (contralateralmente), núcleo lateral superior de la oliva (bilateralmente), núcleo ventral del cuerpo trapezoide (bilateralmente), núcleo noradrenérgico A5 (ipsilateralmente), núcleo paragigantocelular lateral (bilateralmente), núcleo reticular parvicelular (bilateralmente) y núcleo reticular intermedio (bilateralmente). Estos núcleos observados son los posibles blancos de estudios anterógrados futuros para confirmación de estas aferencias a las neuronas de la raíz coclear, juntamente a estudios neuroquímicos y comportamentales, para verificar su influencia sobre estas neuronas y su papel en las modulaciones del reflejo auditivo de sobresalto.

Palabras clave: Integración Sensoriomotora; Núcleo de la Raiz Coclear; Startle; Trazadores Neuronales, Fluoro-Gold

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

FIGURA 1 – Foto macroscópica do encéfalo do rato. O círculo vermelho indica a localização da parte inicial do nervo vestibulococlear. ....	1
FIGURA 2 - CR e os CRN.....	2
FIGURA 3 – Esquema das eferências dos CRN. Elaborado com base nos trabalhos de López et al. (1999) e Horta-Júnior et al. (2008).....	3
FIGURA 4 – Representação esquemática do RAS.....	3
FIGURA 5 – Representação esquemática do RAS desencadeado por estímulo acústico de alta intensidade em um rato.....	4
FIGURA 6 – Demonstração dos procedimentos de injeção intraperitoneal (à esquerda) e subcutânea (à direita).....	9
FIGURA 7 – Representação gráfica do procedimento de cirurgia estereotáxica.....	10
FIGURA 8 – Representação gráfica do crânio de um rato, indicando os parâmetros de referência utilizados na cirurgia estereotáxica: Labda, Bregma e linha interaural.....	11
FIGURA 9 – Fotomicrografias de alguns núcleos para demonstração do critério utilizado no estudo semi-quantitativo dos casos .....	14
FIGURA 10 – Locais de injeção de FG na CR (casos N13, N15, N17, N18).....	17
FIGURA 11 – Locais de injeção de FG na CR (casos N20, N25, N30, N32).....	18
FIGURA 12 – Locais de injeção de FG na CR (casos N74 e N84).....	19
Quadro 1 – Sistematização das aferências observadas nos casos experimentais em que a injeção de FG foi considerada efetiva (casos N13, N15, N17, N18 e N20).....	20
Quadro 2 – Sistematização das aferências observadas nos casos experimentais em que a injeção de FG foi considerada efetiva (casos N25, N30, N32, N74 e N84).....	21
FIGURA 13 – Representação esquemática do mapeamento dos perfis neuronais retrogradamente marcados com FG após a injeção na CR do caso experimental N15 desde o nível I.A. -5,76 a I.A. -1,44. ....	22
FIGURA 14 – Representação esquemática do mapeamento dos perfis neuronais retrogradamente marcados com FG após a injeção na CR do caso experimental N15 desde o nível I.A. -1,32 a I.A. +0,24.....	23

FIGURA 15 – Fotomicrografias dos núcleos com perfis neuronais retrogradamente marcados após a injeção de FG na CR.....	24
FIGURA 16 – Fotomicrografias dos núcleos com perfis neuronais retrogradamente marcados após a injeção de FG na CR.....	25
FIGURA 17 – Fotomicrografias dos núcleos com perfis neuronais retrogradamente marcados após a injeção de de FG na CR.....	26
FIGURA 18 – Fotomicrografias dos núcleos com perfis neuronais retrogradamente marcados após a injeção de FG na CR.....	27
FIGURA 19 – Representação esquemática dos núcleos identificados como aferências consistentes aos CRN neste trabalho .....	28
FIGURA 20 - Identificação das aferências noradrenérgicas da região do A5 aos CRN.....	33
FIGURA 21 - Fotomicrografias do sitio de injeção de BDA em VNTB à esquerda e respectiva representação esquemática à direita .....	34
FIGURA 22 - Fotomicrografias do sitio de injeção de BDA em VNTB à esquerda e respectiva representação esquemática à direita. ....	35
FIGURA 23 – Fotomicrografias da CR após injeção de BDA em VNTB e imunohistoquímica para calbindina .....	36
FIGURA 24 – Fotomicrografia e esquema do sistema olivococlear .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura	Significado
4V	Quarto ventrículo
6N	Nervo abducente
7n	Nervo facial
$\mu$ A	Microampere
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrometro
A5	Grupo noradrenérgico A5
ABC	Complexo avidina biotina peroxidase
Aq	Aqueduto do mesencéfalo
Amb	Núcleo ambíguo
Au1	Córtex auditivo primário
BDA	Dextrano biotilado
$^{\circ}$ C	Graus centígrados
CIC	Núcleo central do colículo inferior
Cm	Centímetro
CR	Raiz coclear do nervo vestibulo-coclear
CRN	Neurônios da raiz coclear
Cu	Núcleo cuneiforme
CuR	Núcleo cuneiforme, parte rotunda
CY2	CY2 bis-NHS ester Amax = 492nm; Emax = 510nm
CY3	CY3 bis-NHS ester Amax = 550nm; Emax = 570nm
DAB	3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloro
DAB-Ni	DAB reforçado com níquel amônio sulfato
dB	Decibel
DBH	Dopamina Beta Hidroxilase
DC	Núcleo coclear dorsal
DCIC	Córtex dorsal do colículo inferior
Dk	Núcleo de Darkschewitsch
DRV	Núcleo dorsal da rafe ventral
DRD	Núcleo dorsal da rafe dorsal
ECu	Núcleo cuneiforme externo
EVe	Núcleo eferente vestibular
ECIC	Córtex externo do colículo inferior
FG	Fluro-Gold <sup>®</sup>
g	Grama
g7	Joelho do nervo facial
Gi	Núcleo gigantocelular
h	Horas
HRP	Peroxidase do rábano-silvestre (raiz-forte)
Hz	Hertz
IC	Colículo inferior
icp	Pedúnculo cerebelar inferior
ION	Núcleo olivar inferior
IRt	Núcleo reticular intermédio
kHz	Quilohertz
LC	Locus cerúleus

LOC	Sistema olivococlear lateral
LPGi	Núcleo paragigantocelular lateral
LSO	Oliva superior lateral
LtR	Núcleo reticular lateral
LVe	Núcleo vestibular lateral
MdD	Núcleo medular reticular
mg	Miligrama
ml	Lâmina medular interna
mm	Milímetro
MOC	Sistema olivococlear medial
Mot7	Núcleo motor do nervo facial
MS	Milisegundo
MSO	Oliva superior medial
MNTB	Núcleo medial do corpo trapezóide
MVe	Núcleo vestibular medial
MVeMC	Núcleo vestibular medial parte magnocelular
MVePC	Núcleo vestibular medial parte parvicelular
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PCRt	Núcleo reticular parvicelular
PDTg	Núcleo tegmental posterodorsal
Pn	Núcleo pontino
PnC	Núcleo reticular caudal da ponte
PnO	Núcleo reticular caudal da ponte, parte oral
PPI	Inibição por estímulo prévio
Pr	Núcleo prepósito
Pr5VL	Núcleo ventrolateral principal do trigêmio
py	Trato piramidal
RAS	Reflexo auditivo de sobressalto
RtTg	Núcleo reticulotegmental da ponte
scp	Pedúnculo cerebelar superior
SOC	Complexo olivar superior
sp5	Trato espinal do nervo trigêmio
Sp5C	Núcleo espinal do trigêmio, parte caudal
Sp5I	Núcleo espinal interpolar do trigêmeo
Sp5O	Núcleo espinal do trigêmio, parte oral
SPL	<i>Sound pressure level</i> – nível de pressão de som
SpVe	Núcleo vestibular espinal
SuVe	Núcleo vestibular superior
SubC	Núcleo subcoeruleus
tz	Corpo trapezóide
VC	Núcleo coclear ventral
VCA	Núcleo coclear ventral anterior
VCP	Núcleo coclear ventral posterior
VNTB	Núcleo ventral do corpo trapezóide

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	I
AGRADECIMENTOS.....	II
EPÍGRAFE .....	III
RESUMO .....	IV
RESUMEN .....	V
LISTA DE FIGURAS E QUADROS .....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO E DESENHO EXPERIMENTAL .....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	8
3.1. Animais de experimentação e seu manuseio.....	8
3.2. Procedimentos experimentais .....	9
3.2.1 Injeção de traçador retrógrado na raiz coclear .....	9
3.2.2 Perfusão e coleta do material.....	12
3.2.3 Processamento.....	12
3.2.4 Análise do material e fotodocumentação.....	13
3.2.4 Normatização técnica .....	15
4. RESULTADOS .....	16
5. DISCUSSÃO .....	28
6. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	32
7. BIBLIOGRAFIA.....	38
APÊNDICE .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

O nervo coclear está localizado medialmente ao paraflóculo do cerebello, juntamente ao nervo vestibular com o qual se dirige ao meato acústico interno, posicionando-se lateralmente, dorsalmente e caudalmente (ANGULO *et al.*, 1990), para formar o nervo vestibulococlear, VIII par de nervos cranianos. A parte inicial do nervo vestibulococlear emerge do tronco encefálico na porção lateral do sulco bulbopontino, caudalmente a raiz do nervo trigêmeo (Figura 1), está formada pela união da raiz do nervo coclear e do nervo vestibular e ocupa o meato acústico interno juntamente ao nervo facial.

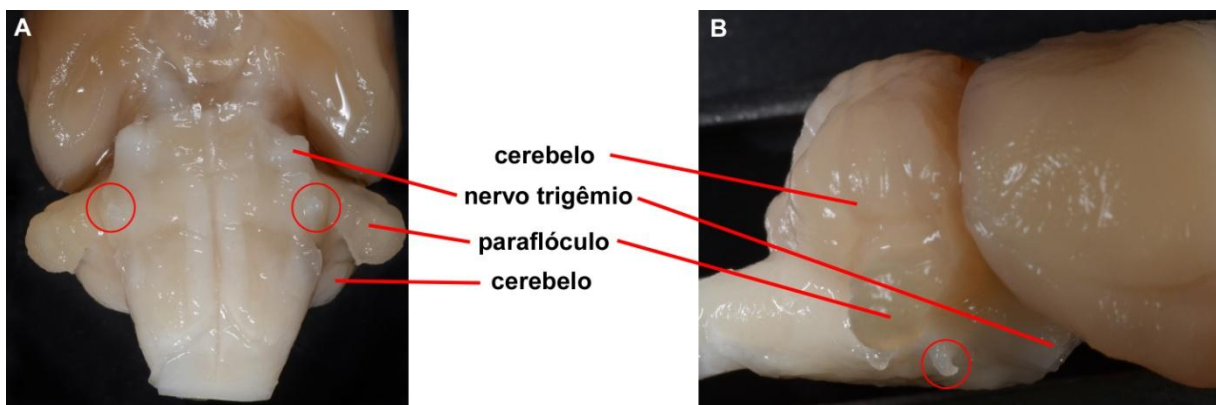


FIGURA 1 – Foto macroscópica do encéfalo do rato. O círculo vermelho indica a localização da parte inicial do nervo vestibulococlear. Em A, vista ventral. Em B, vista lateral.

O nervo coclear é constituído pelos axônios dos neurônios do gânglio espiral, os quais conduzem impulsos nervosos associados à audição procedentes do Órgão de Corti, situado na cóclea (HEBEL e STROMBERG, 1976; MACHADO, 2001), além disso, também é constituído de fibras eferentes oriundas do complexo olivar superior: o feixe olivococlear (GUINAN *et al.*, 1983; VETTER e MUGNAINI, 1992; WARR, 1992; WHITE e WARR, 1983)

No rato, como em outros mamíferos, as fibras do nervo coclear terminam no complexo nuclear coclear (LORENTE DE NÓ, 1933), e assim o fazem em um padrão tonotópico. Cada fibra bifurca em um ramo ascendente, que supre o núcleo coclear ventral anterior (VCA), e um ramo descendente, que supre os núcleos coclear ventral posterior (VCP) e dorsal (DC) (HARRISON, J. M. e FELDMAN, 1970).

A raiz coclear (CR) compreende a parte do nervo que está entre o núcleo coclear ventral (VC) e a borda de células de Schwann do VIII par (MERCHÁN *et al.*, 1988). Nela está situado um grupo de aproximadamente cinquenta células (de 30 a 38  $\mu\text{m}$  de diâmetro) de cada lado (Figura 2), facilmente identificadas em secções histológicas do tronco encefálico de roedores e marsupiais (AITKIN, 1995;1996; LÓPEZ *et al.*, 1993), as quais constituem os primeiros neurônios do sistema nervoso

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

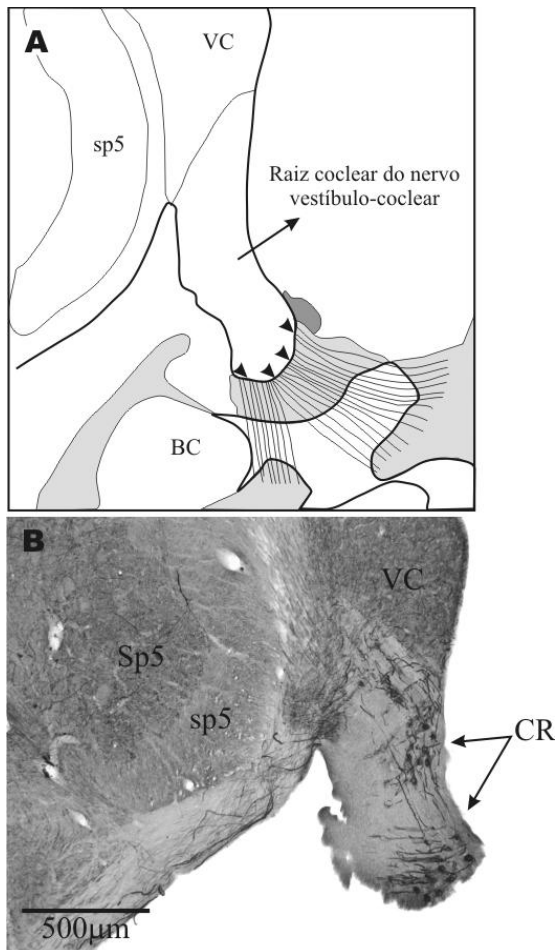


FIGURA 2 - CR e os CRN. Em A, um esquema de um corte coronal do tronco encefálico e parte da espira basal da cóclea. As cabeças de seta indicam a borda glial que delimita a raiz coclear. Em B, fotomicrografia de corte coronal da raiz coclear submetida a técnica imunoistoquímica para neurofilamentos SMI-32 evidenciando os neurônios da raiz coclear. Modificado a partir de Horta-Junior e López (2008). Abreviaturas: BC, espira basal da cóclea; sp5, trato espinhal do nervo trigêmeo; Sp5, núcleo do trato espinhal do nervo trigêmeo; VC, núcleo coclear ventral.

Cada CRN conecta-se com uma grande quantidade de colaterais provenientes de fibras nervosas de praticamente toda extensão do órgão de Corti (OSEN *et al.*, 1991) e isto é possível devido ao seu padrão de ramificação dendrítica, com dendritos longos dispostos em duas direções: paralelamente e perpendicularmente às fibras aferentes cocleares primárias (MERCHÁN *et al.*, 1988). Os dendritos perpendiculares são especialmente extensos e cruzam transversalmente praticamente toda CR, o que permite que os CRNs estejam sujeitos a estimulação por um amplo espectro de frequências acústicas, embora possuam o limiar de excitação mais baixo para frequências ao redor de 30 kHz (SINEX *et al.*, 2001b).

Apesar de serem os primeiros neurônios a receber aferências auditivas, os CRN relacionam-se com estruturas não auditivas (LOPEZ *et al.*, 1999; NODAL e LÓPEZ, 2003), como os núcleos de integração sensoriomotora da formação reticular (Figura 3), especialmente o núcleo reticular caudal da ponte (PnC) ou diretamente com o núcleo motor do nervo facial (Mot7) (HORTA-JUNIOR *et al.*, 2008).

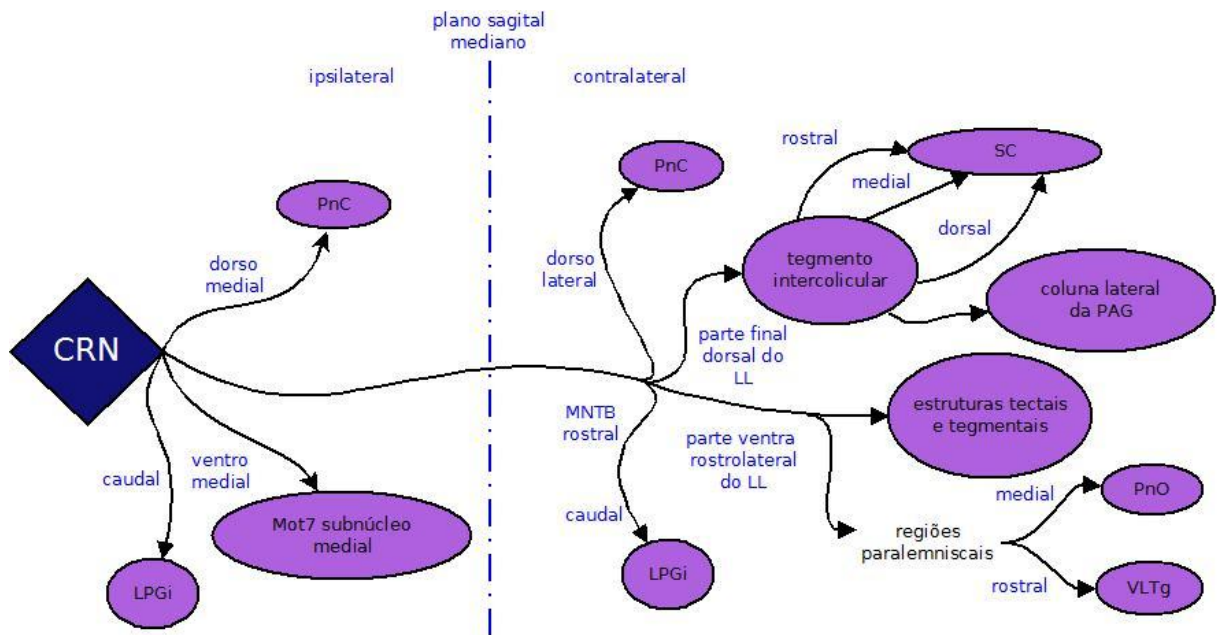


FIGURA 3 – Esquema das eferências dos CRN. Elaborado com base nos trabalhos de López et al. (1999) e Horta-Júnior et al. (2008).

Devido a sua posição e padrão de conectividade, os CRN foram relacionados funcionalmente com o circuito do RAS (Figura 4), hipótese que foi confirmada por Lee et al. (1996). Portanto, 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 espinais (KOCH, 1999; LEE *et al.*, 1996).

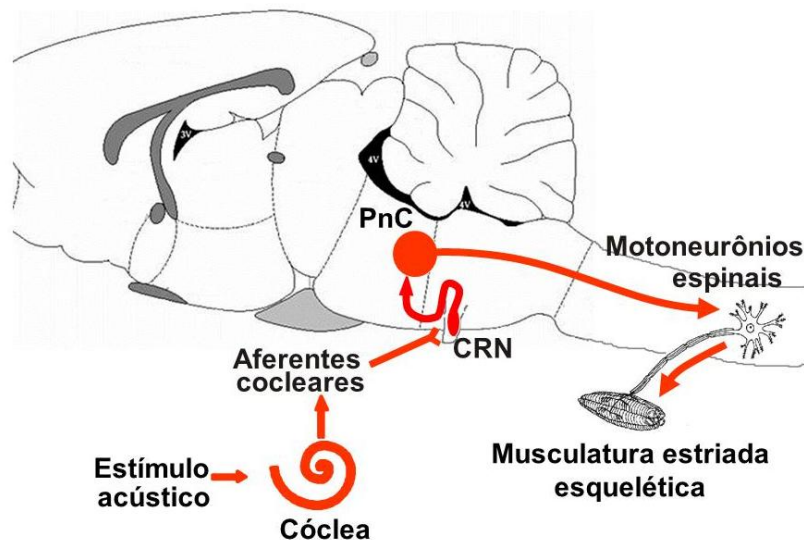


FIGURA 4 – Representação esquemática do circuito do RAS. A Figura representa um corte sagital mediano do encéfalo no qual se evidenciam as estruturas que constituem o circuito elementar do RAS.

O RAS é caracterizado por uma reação motora rápida e intensa que implica na contração de um grande número de grupos musculares de todo o corpo em resposta a um estímulo acústico intenso e inesperado. Apresenta um componente vegetativo mediado pelo sistema nervoso autônomo que se manifesta por um aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca (BAUDRIE *et al.*, 1997; KOCH, 1999; LANDIS e HUNT, 1939). Trata-se de um reflexo acústico-motor do tronco encefálico que está presente em muitas espécies de mamíferos, incluído o homem. Possui caráter defensivo frente a uma possível agressão ou de alerta frente a acontecimentos não esperados (KEAY *et al.*, 1988). No rato, a manifestação física do RAS é demonstrada com a contração dos membros, flexão do pescoço e encurtamento do comprimento total do animal (KOCH, 1999; YEOMANS e FRANKLAND, 1996), o que resulta em uma postura defensiva e na proteção de partes importantes do seu corpo como a face, o pescoço e o ventre (Figura 5).



FIGURA 5 – Representação esquemática do RAS desencadeado por estímulo acústico de alta intensidade em um rato (imagem fornecida por Beduschi, R.S.)

Tanto no homem como em animais de experimentação, os estímulos que desencadeiam mais facilmente o RAS são sons compostos por um amplo espectro de frequências (ruído branco), de alta intensidade, normalmente acima de 80 dB SPL (GRILLON *et al.*, 1994; KOCH, 1999; PILZ e SCHNITZLER, 1996). A latência deste reflexo é muito curta: 8ms no rato (DAVIS, M. *et al.*, 1982) e de 5 a 10 ms no homem (KOCH, 1999). Esta curta latência está de acordo com o fato de os axônios dos CRN serem extremamente grossos (5-7 $\mu$ m), permitindo uma rápida transmissão neural, necessária para o desencadeamento do RAS (SINEX *et al.*, 2001a).

Além do valor etológico dos reflexos acústico-motores para a sobrevivência do indivíduo, existe um enorme interesse nestes reflexos tanto na clínica médica como na pesquisa básica relacionada com a integração sensório-motora (HOFFMAN e ISON, 1980; SWERDLOW *et al.*, 2000; VALLS-SOLÉ, 1998; WILKINS *et al.*, 1986). A localização das estruturas que compõe o circuito do RAS em nível do tronco encefálico permite reconhecer o estado funcional desta importante parte do cérebro a partir da avaliação clínica do RAS. Esta estratégia é utilizada em pediatria perinatal, na qual a observação dos reflexos acústico-motores, juntamente com a realização de potenciais evocados, são as principais ferramentas que nos permitem conhecer o estado de desenvolvimento e

funcionalidade do sistema nervoso. Em otorrinolaringologia, a avaliação destes reflexos nos proporciona informação sobre a funcionalidade da porção baixa da via auditiva, até o nível da ponte e principalmente do nervo coclear. O RAS constitui um modelo experimental interessante já que é um comportamento bastante simples, facilmente avaliado sem provas invasivas.

O RAS pode ser modificado quantitativamente ou qualitativamente por uma série de condições naturais ou experimentais (BELL *et al.*, 2003; SWERDLOW *et al.*, 2000), consideradas como modulações e que demonstram a plasticidade deste reflexo. O reflexo pode estar diminuído por habituação ao estímulo (GONZALEZ-LIMA *et al.*, 1989; PILZ e SCHNITZLER, 1996), por um estímulo prévio de menor intensidade (BRAFF *et al.*, 2001; FENDT *et al.*, 2001; HOFFMAN e FLESHLER, 1963; SWERDLOW *et al.*, 2007) e por administração de drogas (BAKSHI *et al.*, 1994; GEYER *et al.*, 2001; SWERDLOW *et al.*, 1993). Por outro lado, o reflexo pode estar aumentado em condições de potenciação por medo (ANISMAN *et al.*, 2000; DAVIS, G. W., 2006; WINSLOW *et al.*, 2007), ansiedade (KAVIANI *et al.*, 2004; PREHN *et al.*, 2006), e estresse (ANDRESKI *et al.*, 1998; STAM, 2007). Em geral as modulações mostram-se mais sensíveis do que o próprio reflexo e apresentam alterações significativas em situações em que o reflexo propriamente dito não está alterado (HOFFMAN e ISON, 1980; JUSTUS e FINN, 2007). Por esta razão as provas comportamentais envolvendo as modulações do RAS tem despertado interesse no diagnóstico clínico (WILKINS *et al.*, 1986). Na clínica neurológica e psiquiátrica, estão documentadas alterações nas respostas às modulações provocadas por doenças neurodegenerativas, esquizofrenia, hiperreflexia, depressão e estados de dependência de drogas como opiáceos e álcool (BOROWSKI e KOKKINIDIS, 1994; BROWN, P., 1995; GRILLON *et al.*, 1994; KOCH, 1999; MANSBACH *et al.*, 1992).

A avaliação das modulações do RAS em animais de experimentação tem sido proposta como modelo equivalente para situações que podem ocorrer na espécie humana, convertendo-se em uma potencial ferramenta para pesquisa de novos fármacos. A potenciação do RAS por estímulo adverso, tem sido equiparada ao estado de ansiedade no homem (COOK *et al.*, 1992), podendo ser utilizada para avaliar o efeito de fármacos em patologias psiquiátricas relacionadas com estados de ansiedade.

As modulações próprias do RAS e suas alterações farmacológicas estão relacionadas com estruturas do sistema nervoso central que atuam sobre algum dos sistemas descendentes e terminam por influenciar a atividade dos núcleos do circuito elementar do reflexo. Dentre eles o núcleo mais estudado é o PnC, sobre o qual se conhecem as características eletrofisiológicas (LINGENHÖHL e FRIAUF, 1994; WAGNER e MACK, 1998), de conectividade (YEOMANS e FRANKLAND, 1996) e as respostas à manipulação farmacológica (CAICEDO *et al.*, 1998; EBERT e KOCH, 1992; KRASE *et al.*, 1993; MISERENDINO e DAVIS, 1993). Por ser parte da formação reticular, o PnC atua como

centro integrador de aferências de diversas origens com distintos neurotransmissores, fato que está relacionado com o grande número de modulações do RAS (KOCH, 1999).

Por outro lado, o núcleo da CR foi o menos estudado até o momento. A origem das aferências aos CRN que não provenham da cóclea ainda são pouco conhecidas. Estudos realizados por Merchán et al. (1988), confirmaram a existência de pelo menos quatro tipos diferentes de aferências aos CRN, o que corrobora com o fato de estes neurônios estarem relacionados com as possíveis modulações do RAS, porém ainda não foram investigadas com detalhes quais modulações do RAS poderiam relacionar-se com os CRN e seus aferentes diretos ou indiretos.

## **2. OBJETIVO E DESENHO EXPERIMENTAL**

De acordo com as informações obtidas na literatura, entre os núcleos participantes do circuito do RAS, o CRN foi o menos estudado até o momento. Portanto, o conhecimento da origem das aferências ao CRN poderia ampliar o que se sabe hoje sobre os circuitos neurais que medeiam as modulações do RAS e por isso, este é o objetivo fundamental deste trabalho.

Para atingir este objetivo, foi injetado um neurotraçador retrógrado, na CR através de abordagem estereotáxica. Após o tempo de sobrevivência necessário para captação, transporte axonal retrógrado e acúmulo do traçador nos somas dos neurônios aferentes à zona de injeção, os animais foram perfundidos e o encéfalo retirado, cortado e processado. Após imunohistoquímica para revelação do neurotraçador, os cortes foram montados em lâminas, contracorados para identificação da citoarquitetura e analisados em microscópio para mapeamento dos somas retrogradamente marcados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais de experimentação e seu manuseio

Todos os experimentos realizados necessitaram da utilização de animais de experimentação, não existindo método alternativo. Portanto, tratamos de tomar o maior cuidado possível no planejamento, preparação e execução dos experimentos para incrementar ao máximo as possibilidades de êxito, o que supõe uma redução do número de animais utilizados. Este preceito foi seguido na elaboração dos protocolos experimentais que foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (protocolo nº17/08).

Foi utilizado como modelo experimental o rato albino adulto fêmea (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, por volta de 100 dias de idade, pesando entre 250g e 300g. Esta espécie é representativa dos mamíferos roedores, os quais apresentam um ótimo funcionamento dos reflexos acústico-motores para sobrevivência em um habitat terrestre, principalmente noturno, e por isso é amplamente utilizada para o estudo do RAS (KOCH, 1999; YEOMANS e FRANKLAND, 1996). Os animais foram alojados em gaiolas (41x34x17cm) com livre acesso à água e ração, em biotério com temperatura controlada (22 a 24°C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7:00h). Para evitar o estresse por isolamento, em cada gaiola foram alocados dois animais. As intervenções cirúrgicas para injeção de traçadores e a eutanásia dos animais foram realizadas sob anestesia profunda, a qual foi comprovada com a ausência de reflexo palpebral, ausência de tônus muscular no pescoço e de reflexo de retirada dos membros como sinal de anestesia eficaz (LAPCHIK VBV, 2009). Como anestésicos, utilizamos drogas de uso comum em experimentação animal, cuja eficácia da dose utilizada foi constatada repetidamente em vários laboratórios de pesquisa (DAMY *et al.*). Foram empregadas as seguintes soluções anestésicas:

- Para injeção de traçadores neurais foi utilizada uma solução anestésica composta por uma mistura de xilasina a 2% (concentração final = 0,5mg/ml), Ketamina a 10% (concentração final = 25mg/ml) e acepromazina a 1% (concentração final = 1mg/ml), diluídos em água purificada, por via subcutânea (Figura 6), na dose de 0,2ml para cada 100g de peso corporal do animal. Além disso, foi administrado paracetamol® (100µl/animal) por via oral após cirurgia.

- Para o sacrifício por perfusão transcardíaca foi utilizada uma solução anestésica de hidrato de cloral a 10%, por via intraperitoneal (Figura 6), na dose 1ml para cada 250g de peso corporal (aproximadamente 400 mg/kg).

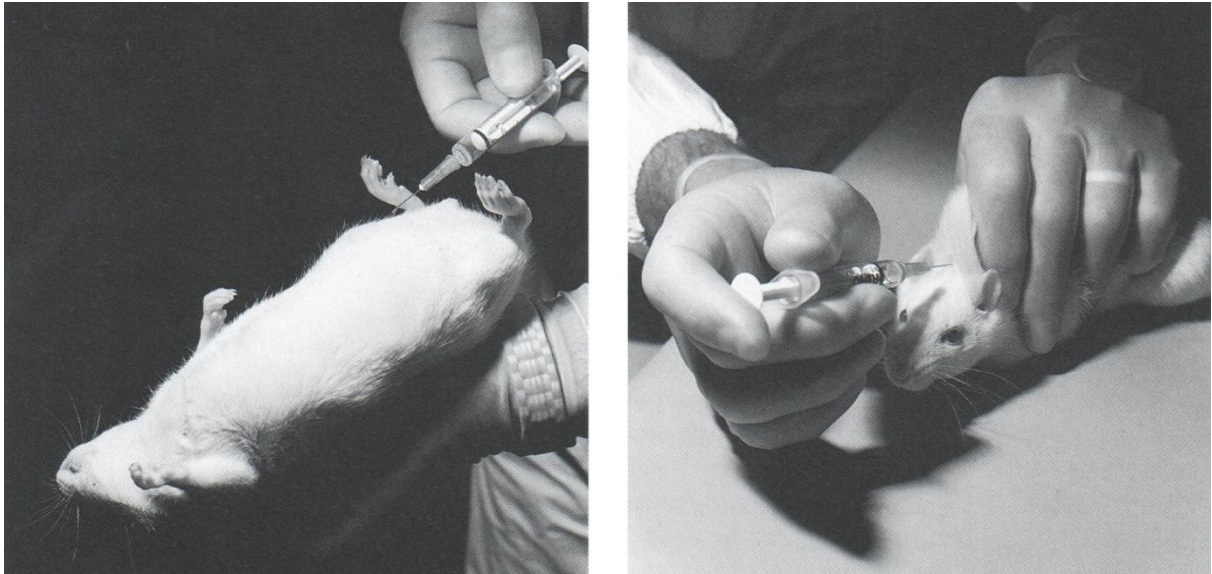


FIGURA 6 – Demonstração dos procedimentos de injeção intraperitoneal (à esquerda) e subcutânea (à direita)(REMIE, 2000).

### 3.2. Procedimentos experimentais

#### 3.2.1 Injeção de traçador retrógrado na raiz coclear

Para estudar a origem das aferências aos neurônios da raiz coclear foi usado o neurotraçador retrógrado Fluoro-Gold (FG - Fluorochrome, Denver, CO, USA). O FG é um traçador que pode ser captado pelos axônios dos neurônios, transportado por meio do fluxo axonal retrógrado e acumulado no pericário (SCHMUED e FALLON, 1986). Embora o FG seja um traçador autofluorescente e não careça de tratamento para ser observado em secções do encéfalo, existem anticorpos comerciais contra FG que permitem a realização de um protocolo de imunistoquímica para sua detecção. Este processamento adicional justifica-se pelo aumento da sensibilidade e da estabilização da marcação retrógrada obtida, além de permitir o estudo do material no microscópio óptico convencional por tempo indeterminado (CHANG *et al.*, 1990; NODAL e LÓPEZ, 2003). Neste trabalho o FG foi utilizado a 4%, diluído em soro fisiológico, em 22 casos experimentais, por meio de abordagem estereotáxica da CR (Figura 7).

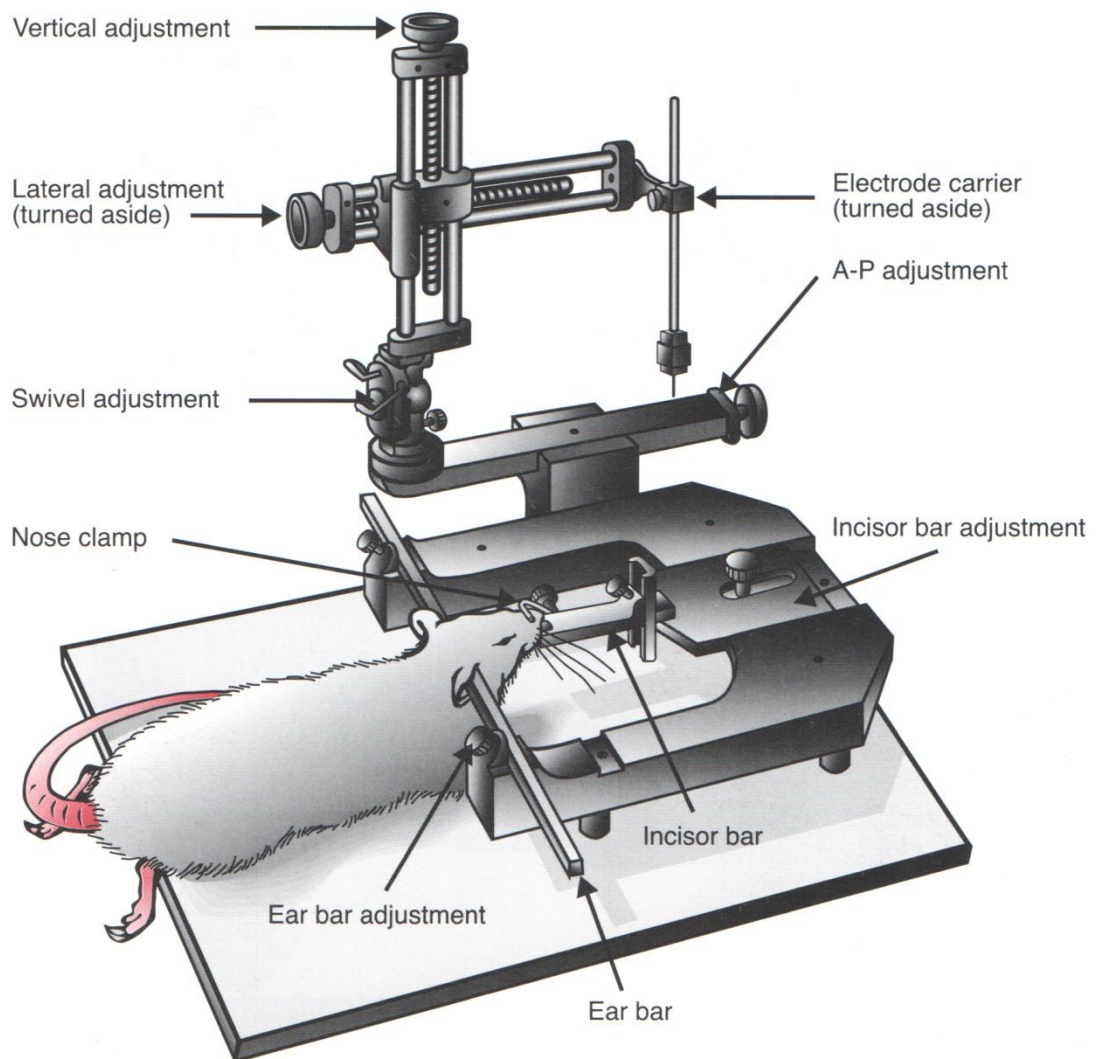


FIGURA 7 – Representação gráfica do procedimento de cirurgia estereotáxica (REMIE, 2000)

As coordenadas empregadas foram determinadas com auxílio do atlas estereotáxico do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2005) e de trabalhos prévios que utilizaram esta abordagem (HORTA-JUNIOR *et al.*, 2008; LOPEZ *et al.*, 1999), 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 utilizadas foram: no eixo antero-posterior, 1,0mm caudal em relação à linha interaural; no eixo látero-lateral, 4,3mm em direção ao lado esquerdo; no eixo dorsoventral, 0,3mm superiormente à linha interaural e um ângulo de 20° com relação ao plano frontal, em direção caudal (Figura 8).

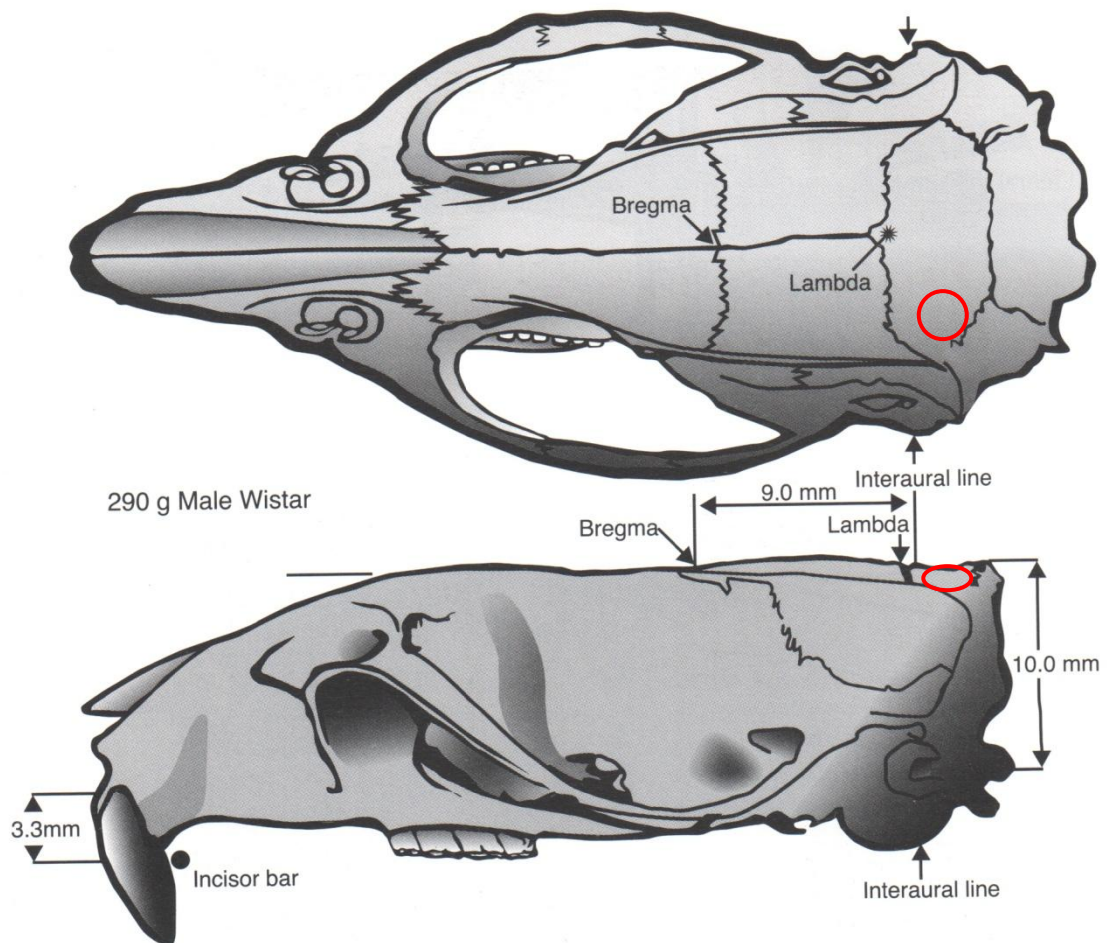


FIGURA 8 – Representação gráfica do crânio de um rato, indicando os parâmetros de referência utilizados na cirurgia estereotáxica: Lambda, Bregma e linha interaural. A área circundada em vermelho indica o local onde foi realizada a craniotomia (REMIE, 2000).

O neurotraçador foi injetado na CR, 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. Além disso, também foram feitos experimentos de injeção por pressão na CR, com as mesmas coordenadas das injeções por iontoforese. Este procedimento foi realizado em 2 casos para pesquisar possíveis diferenças qualitativas quanto a localização dos neurônios retrogradamente marcados devido à diferença do método de injeção. Para as injeções por pressão foi utilizada uma bomba de injeção (Micro4<sup>tm</sup>, MicroSyringe Controller, World Precision Instruments) conectada a uma seringa (Syringe 10um gastight, World Precision instruments) a qual foi acoplada uma micropipeta na ponta para maior precisão da injeção. A bomba foi ajustada para injetar 100nl a 10nl/min, totalizando 10min. Em ambos os tipos de injeção, após a cirurgia os animais ficaram em recuperação durante 14 dias.

### 3.2.2 Perfusão e coleta do material

Após o período de recuperação, os animais foram sacrificados por perfusão transcardíaca, utilizando uma bomba peristáltica durante 30 minutos. Para lavagem do leito vascular empregaram-se 150ml de soro de Ringer sem cálcio (NaCl 0,85%, KCl 0,025%, NaHCO<sub>3</sub> 0,02%, pH 6,9) com 0,5ml de heparina (Liquemine<sup>®</sup>, 5.000 U.I.), seguido de 1000 ml de uma solução fixadora constituída de formaldeído a 4%, recém preparado a partir de paraformaldeído e glutaraldeído a 0,125% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3. Terminada a perfusão, o animal permaneceu em repouso por aproximadamente uma hora, no intuito de otimizar a fixação do encéfalo. Este foi exposto por craniotomia e remoção da dura-máter. Para preservar a raiz do nervo vestibulo-coclear unida ao tronco encefálico, o osso temporal foi tracionado lateralmente até o rompimento do nervo vestibulococlear no interior do meato acústico interno. Em seguida, os demais nervos cranianos foram cortados e o encéfalo foi removido.

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

### 3.2.3 Processamento

Após a crioproteção o material foi cortado em secções seriadas de 30µm, paralelamente ao plano coronal, em micrótomo de deslizamento (SM2010R, Leica) equipado com platina congeladora (BFS-30MP, Phisiotemp Inc.). Os cortes foram recolhidos seqüencialmente, em uma série de 10 frascos: frascos 1,2,6 e 7 preenchidos com tampão fosfato 0,1M pH 7,4 para protocolo de imunistoquímica e o restante com solução anticongelante (solução aquosa constituída por: 6,25% de tampão fosfato 0,4M; 0,25% de NaCl; 15%de sacarose; 35% de etilenoglicol) para armazenamento e posterior processamento. Desta maneira, o intervalo entre os cortes consecutivos de cada frasco foi de 300µm.

Para o protocolo de imunistoquímica optamos pelo processamento em cortes flutuantes (free-floating). Inicialmente os cortes foram lavados em tampão TBS-TX composto por Tris (Trisma Base, Sigma #T-6066) 0,05 M pH 7,6 com 0,85% de NaCl e 0,5% de Triton X-100 (Merck #11869) para retirada da sacarose infiltrada no tecido. Para visualizar o FG, foi utilizado protocolo baseado no método do complexo avidina biotina peroxidase (ABC, Vectastain Standard<sup>®</sup>, Vector Labs, #PK-4000). Este método utiliza a grande afinidade (constante de dissociação 10<sup>-15</sup>) que a molécula de avidina apresenta pela molécula de biotina (HSU *et al.*, 1981). Antes de iniciar as incubações com anticorpos

realizou-se a inibição da peroxidase endógena com uma solução de água oxigenada P.A. a 10%, em agitação, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Esta etapa do protocolo visa eliminar a marcação inespecífica que poderia se formar devido à peroxidase do próprio tecido. Posteriormente os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-FluoroGold (Chemicon, #AB 153), obtido em coelho na concentração de 1:10.000 durante 48 horas em agitação a 4 °C. Após cuidadosa lavagem dos cortes com tampão TBS-TX, os mesmos foram incubados em anticorpo secundário biotinilado (Vector Labs, #BA-1000) anti-IgG de coelho produzido em cabra, na concentração de 1:200 durante 2 horas, em agitação, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário, conjugado a biotina, foi detectado mediante incubação dos cortes com complexo ABC em TBS-TX durante 2 horas à temperatura ambiente ou durante a noite à 4°C. Posteriormente, a peroxidase unida ao complexo foi evidenciada mediante a ação da água oxigenada, usando como cromógeno a 3,3' diaminobenzidinatetrahydrocloro (DAB), que gera um produto de reação estável de cor marrom. Para tanto os cortes foram incubados em uma solução de tampão Tris 0,05 M, pH 7,6 com 0,07% de DAB e 0,003% de água oxigenada, sob controle visual e microscópico. Após a evidenciação da marcação, a reação de revelação foi interrompida por três lavagens com tampão Tris 0,05 M, pH 7,6.

Após imunistoquímica, os cortes foram transferidos para uma solução de gelatina a 0,4% em tampão Tris 0,05M e montados em lâminas de vidro, de maneira sequencial de caudal para rostral. Os frascos 1, 2, 6 e 7 de cada caso foram preenchidos com tampão fosfato, sendo que os cortes dos frascos 2 e 7 foram contracorados com tionina, pelo método de Nissl para referência citoarquitetônica. O método de Nissl consiste em realizar a desidratação dos cortes montados em lâminas com alcoóis de concentração crescente (etanol de 50% a 100%), dissolução dos lipídeos (com dois banhos de xilol), re-hidratação dos cortes por meio alcoóis de concentração decrescente (etanol de 100% à 50%), coloração com tionina (Fisher #T-409), nova desidratação com alcoóis e diafanização com xilol e montagem da lamínula com Permont® (Fisher Scientific). Nas séries sem contracoloração, os cortes foram desidratados e cobertos com lamínula utilizando Permont® como meio de montagem.

#### 3.2.4 Análise do material e fotodocumentação

As lâminas preparadas foram estudadas no microscópio óptico (Scope.A1 ou Axioplan2, Carl Zeiss) em campo claro.

Os perfis celulares retrogradamente marcados foram mapeados em uma prancha confeccionada a partir de figuras retiradas do atlas estereotático do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2005) e manipuladas no programa Canvas X (ACD Systems Inc.). A nomenclatura e as

abreviaturas utilizadas na descrição dos resultados foram baseadas no atlas estereotático do cérebro do rato (PAXINOS e WATSON, 2005). A documentação fotográfica foi realizada com câmera digital (AxioCamHRc ou AxioCam MRc, Zeiss). As imagens capturadas foram organizadas em figuras e trabalhadas com os programas Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc.) e Canvas X, ajustando o brilho, contraste e balanço de cores e removendo artefatos localizados externamente aos cortes, de acordo com o preconizado por Schenk et al. (1999) e Saper (1999) para preparação de imagens digitais para publicação científica. As barras de calibração das fotomicrografias foram confeccionadas fotografando, com os mesmos equipamentos e aumentos, uma lâmina com escala micrométrica calibrada (Leica, LeitzWetzlar), cuja menor divisão é de 100µm.

Em cada caso foi realizado um estudo semi-quantitativo a partir de duas séries de cortes. Para melhor visualização e discussão, os resultados do mapeamento dos perfis neuronais retrogradamente marcados foram tabulados e representados através de símbolos obedecendo a seguinte escala: 1 ou 2 perfis neuronais = (+), de 3 a 8 perfis neuronais = (++) , de 9 a 14 perfis neuronais = (+++) e mais de 15 perfis neuronais = (++++) (Figura 9).

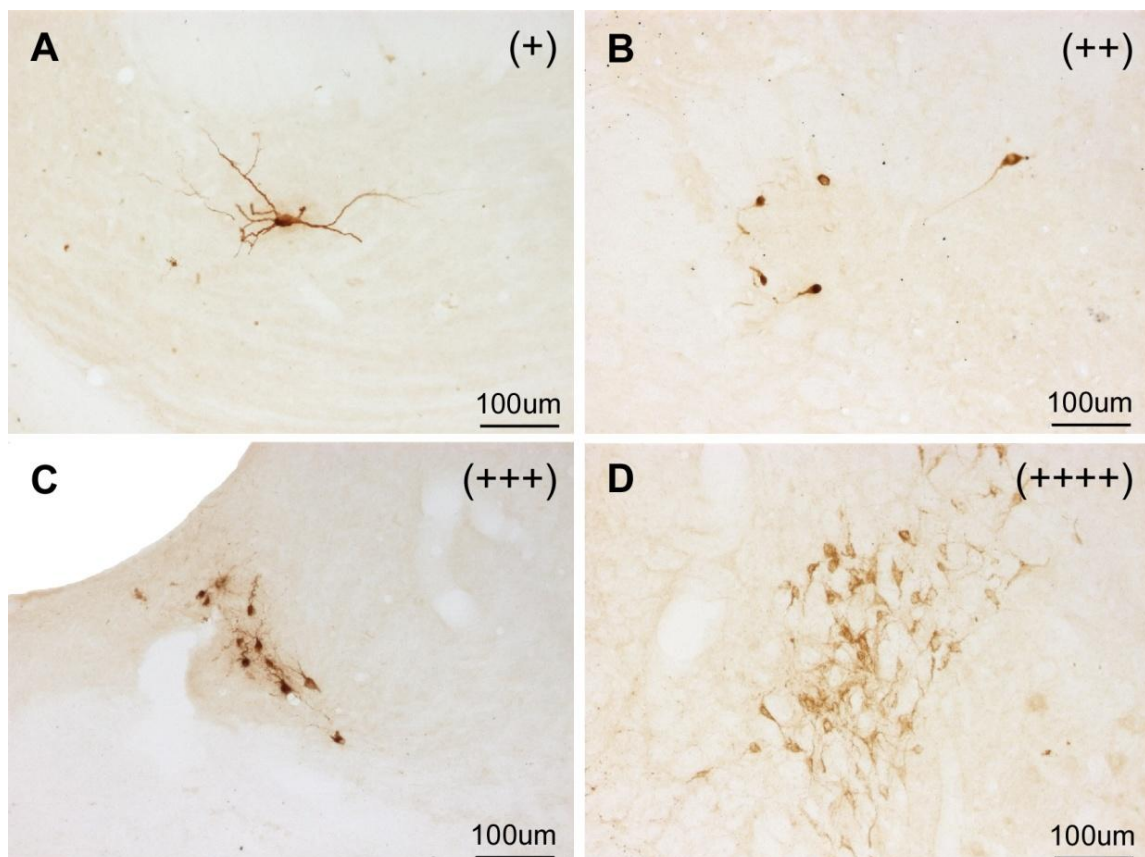


FIGURA 9 – Fotomicrografias de alguns núcleos para demonstração do critério utilizado no estudo semi-quantitativo dos casos. Na Figura A, há 1 perfil neuronal apenas no núcleo pontino (+); na Figura B há 5 perfis neuronais no núcleo cuneiforme (++) . Na Figura C há 12 perfis neuronais no núcleo eferente vestibular (+++) e na Figura D, há 16 perfis neuronais no núcleo A5 (++++).

### 3.2.4 Normatização técnica

Para redação deste trabalho foram utilizadas as seguintes normas técnicas, formuladas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas: ABNT NBR 14724:2011: para formatação e estruturação dos componentes do trabalho; ABNT NBR 6023:2002, para elaboração das referências bibliográficas; ABNT NBR 6024:2002, para numeração das seções do trabalho; ABNT NBR 6027:2002, para elaboração do sumário; e ABNT NBR 10520:2002, para citação das referências no texto.

## 4. RESULTADOS

Após a análise dos 22 experimentos de injeção de FG na CR, foram selecionados 10 casos experimentais: 8 nos quais foi injetado o neurotraçador por iontoforese e 2 por pressão, nos quais os locais de injeção foram considerados corretos. Os casos selecionados foram: N74, N84 (Figura 10) N13, N15, N17, N18 (Figura 11), N20, N25, N30, N32 (Figura 12).

A análise da injeção de neurotraçador demonstrou que no caso N13 houve contaminação no VC e um pouco no flóculo do cerebelo; no caso N15, a injeção foi a mais restrita à raiz, sem contaminação no cerebelo e pouca contaminação nos núcleos cocleares; no caso N17, observamos muita contaminação nos núcleos cocleares e no cerebelo; no caso N18, verificamos que houve pouca contaminação nos núcleos cocleares e no cerebelo (Figura 10); no caso N20, a injeção se localizou na parte mais rostral da raiz, o traçador extravasou para o líquido e contaminou o nervo facial, além da contaminação no cerebelo; no caso N25, a injeção também se localizou mais rostralmente, houve pouca contaminação no cerebelo e difusão para o VCP; no caso N30, o sítio de injeção foi localizado na parte mais rostral da CR, houve contaminação no cerebelo e no VCP; no N32, o sítio de injeção localizou-se na parte mais medial da raiz, o traçador extravasou para o líquido e contaminou o nervo facial, além da contaminação no núcleo coclear ventral anterior (VCA) e pouca contaminação no cerebelo (Figura 11); no caso N74, houve muita contaminação no cerebelo e VCP; enquanto que o caso N84 apresentou mais contaminação no cerebelo, porém sem contaminação nos núcleos cocleares (Figura 12).

Para análise e comparação dos resultados obtidos nos casos experimentais, os núcleos onde foram encontrados perfis neuronais retrogradamente marcados foram listados e dispostos em quadros onde, por meio de um critério semi-quantitativo (Figura 9), indica-se a quantidade de somas marcados (Quadros 1 e 2). Os núcleos retrogradamente marcados foram agrupados como: aferências consistentes a CR, nas quais foram englobados os núcleos com marcação em todos os casos ou em pelo menos 80% deles; aferências provavelmente originadas por contaminação no cerebelo; aferências provavelmente originadas por contaminação nos núcleos cocleares e aferências provavelmente originadas por contaminação no nervo facial. Um caso representativo do mapeamento realizado está ilustrado nas Figuras 13 e 14.

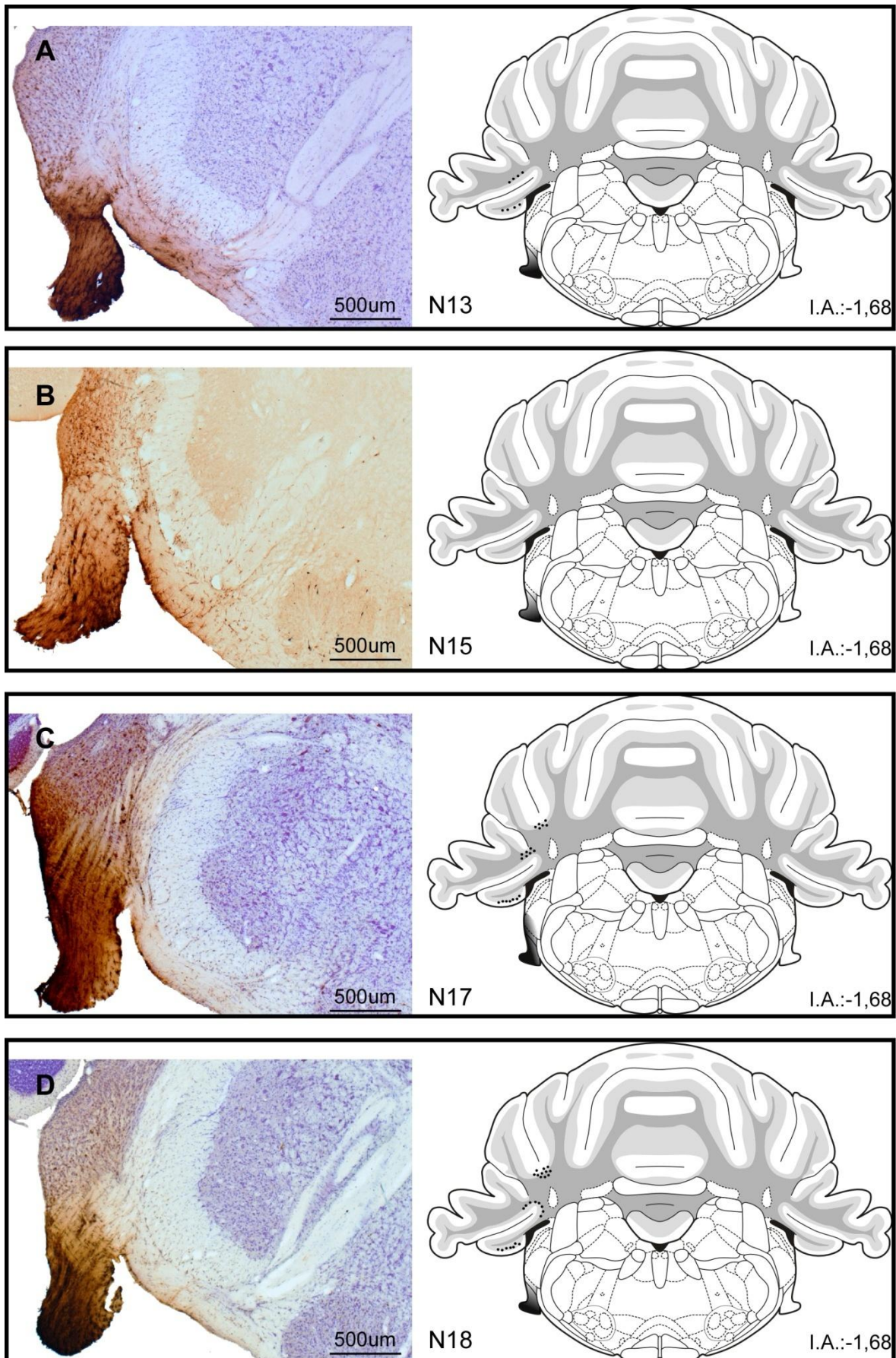


FIGURA 10 – Locais de injeção de FG na CR (casos N13, N15, N17, N18). Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico evidenciando o depósito de traçador FG (marrom) na CR nos casos N13 em A, N15 em B, N17 em C e N18 em D. Ao lado das fotomicrografias está a representação gráfica do sítio de injeção e das contaminações observadas em áreas próximas e no trajeto da micropipeta através do cerebelo (pontos negros).

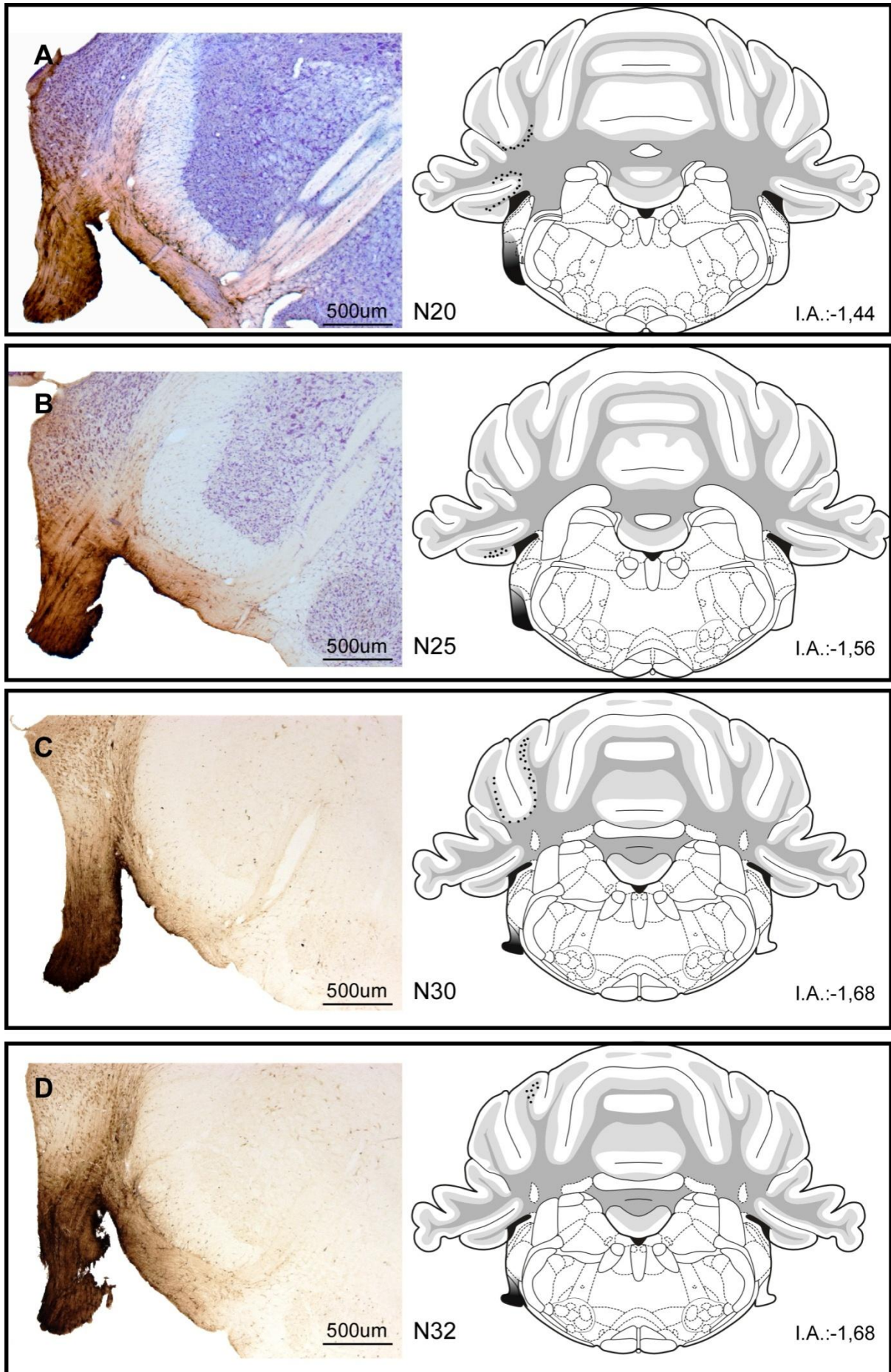


FIGURA 11 – Locais de injeção de FG na CR (casos N20, N25, N30, N32). Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico evidenciando o depósito de traçador FG (marrom) na CR nos casos N20 em A, N25 em B, N30 em C e N32 em D. Ao lado das fotomicrografias está a representação gráfica do sítio de injeção e das contaminações observadas em áreas próximas e no trajeto da micropipeta através do cerebelo (pontos negros).

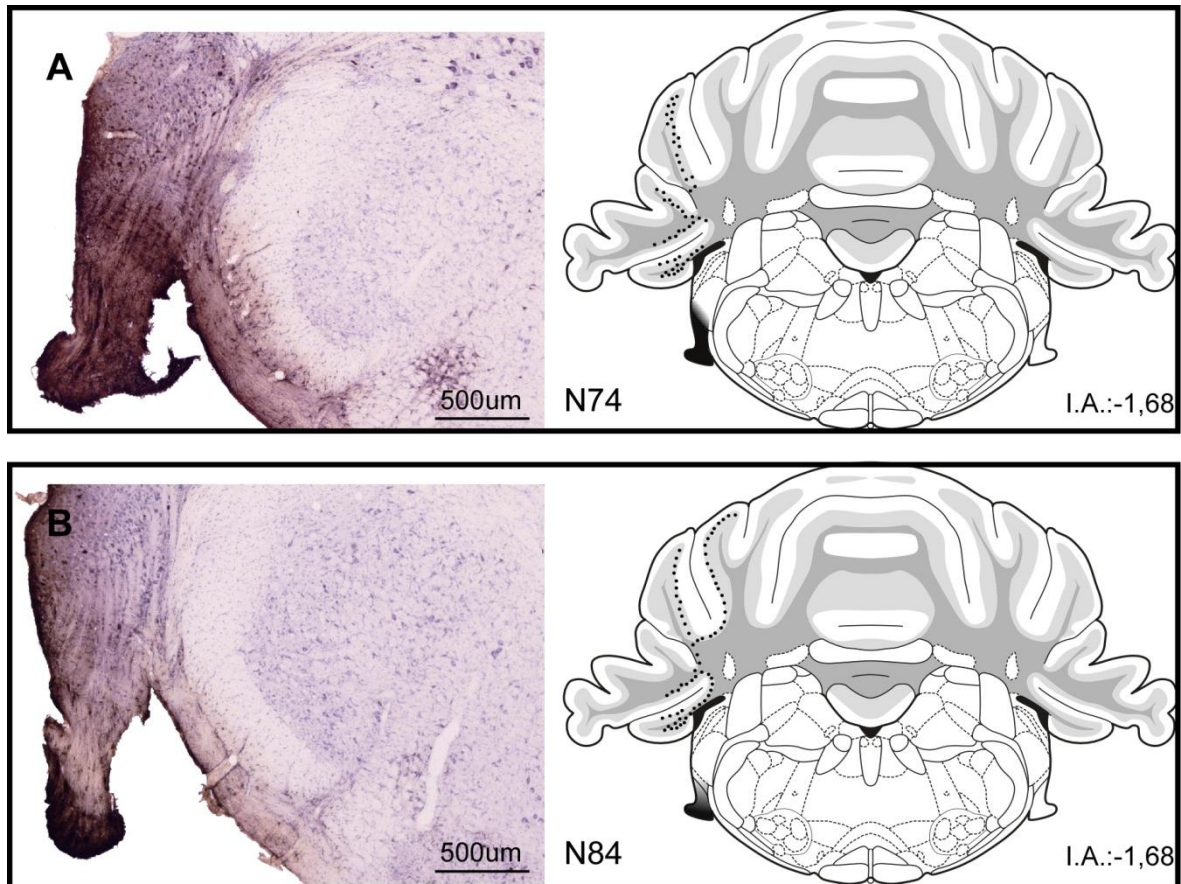


FIGURA 12 – Locais de injeção de FG na CR (casos N74 e N84). Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico evidenciando o depósito de traçador FG (marrom) na CR nos casos N74 em A e N84 em B. Ao lado das fotomicrografias está a representação gráfica do sitio de injeção e das contaminações observadas em áreas próximas e no trajeto da micropipeta através do cerebelo (pontos negros).

Os núcleos aferentes a raiz coclear foram: Oliva superior lateral (LSO) (ipsilateral e bilateral), Núcleo ventral do corpo rapézóide (VNTB) (bilateral), células adrenérgicas A5 (A5) (ipsilateral), Núcleo eferente vestibular (EVe) (bilateral), Lócus coeruleus (LC) (ipsilateral e bilateral), Núcleo subcoeruleus (SubC) (contralateral); Núcleo reticular intermédio (IRt) (ipsilateral, contralateral e bilateral); Núcleo reticular parvicelular (PCRt) (ipsilateral e bilateral) e Núcleo paragigantocelular lateral (LPGi) (bilateral e ipsilateral). Alguns núcleos apresentaram perfis neuronais retrogradamente marcados de forma ocasional dependendo do tamanho do sitio de injeção, da contaminação de estruturas nas áreas vizinhas ou de estruturas atravessadas pela micropipeta no trajeto em direção a CR. (Figuras 15, 16, 17 e 18)

REGIÕES / CASOS	N13 - iontoforese	N15 - iontoforese	N17 - iontoforese	N18 - iontoforese	N20 - iontoforese
análise do sítio de injeção	contaminação no núcleo coclear ventral e um pouco de contaminação no fóculo do cerebelo no trajeto da micropipeta em direção à raiz coclear	restrito à raiz, sem contaminação no cerebelo e pouca contaminação dos núcleos cocleares	muita contaminação nos núcleos cocleares além de contaminação no cerebelo	pouca contaminação nos núcleos cocleares e pouca contaminação no cerebelo	injeção na parte mais rostral da raiz, o traçador extravasou para o líquido encéfaloaracnóideo e contaminou o nervo facial, além da contaminação no cerebelo
núcleo pontino (Pn)	(++) contralateral		(+) contralateral		(++) contralateral
núcleo prepósito (Pr)			(+) bilateral		
núcleo lateral superior da oliva (LSO)	(+++)	(++++)	(+++)	(+++)	(++)
núcleo ventral do corpo trapezoide (VNTB = MVPO + LVPO)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
células adrenérgicas A5 (A5)	(++)	(++++)	(+++)	(+++)	(+++)
núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB ou Tz)	(+++)	(+++)	(+++)		(++)
região periolivar	(++)	(++)	(++)		
núcleo superior paraolivar (SPON)					
núcleo medial da oliva (MSO)					
núcleo eferente vestibular (Eve)	(++++)	(++++)	(++++)	(+++)	(++++)
núcleo coclear ventral posterior (VCP)	(+++)		(+++)	(++)	(+++)
núcleo coclear ventral anterior (VCA)	(+++)	(++)	(+++)	(++)	
núcleo coclear dorsal (DC)	(+)	(++)	(+)		
sub coeruleus (SuBC)	(+++)		(+++)	(+++)	
locus coeruleus (LC)	(+)	(+)	(+++)	(+)	(+)
gigante celular lateral (LPGi)	(++)		(+++)	(+)	(++)
núcleo olivar inferior (ION)			(++)		
núcleo reticular parvicelular (PCRT)	(+++)	(+++)	(+)		(+++)
núcleo reticular intermédio (IRt)	(+++)	(+++)	(++)	(+)	(+++)
núcleo vestibular lateral (Lve)					
núcleo vestibular espinal (SpVe)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
núcleo vestibular medial parte magno celular (MVeMC)		(+)	(++)		
núcleo vestibular medial parte parvicelular (MVePC)			(+)		
núcleo central do colículo inferior (CIC)	(+++)		(+++)		
núcleo trigeminal espinal interpolar (Sp5I)	(+)	(+)	(++)		
núcleo ventrolateral principal do trigêmeo (Pr5VL)			(+++)		
núcleo reticular lateral (LRt)			(+)		
núcleo cuneiforme (Cu)	(+)	(+)	(++)		
núcleo grácil (Gr)					
núcleo motor do nervo facial (mot7)	(++)	(+++)			(+++)
zona perifacial	(++)	(++)		(+)	(++)
córtex auditivo primário (Au1)			(++)		
núcleo dorsal da raiz ventral (DRV)			(++)		
núcleo paralemniscal ventral (PLV)					
substância cinzenta periaquedutal (PAG)					
núcleo reticular medular parte dorsal (MDD)					
núcleo pontino reticulotegmental (RTTg)					
núcleo paratrigeminal (Pa5)					
núcleo para-abducente (Pa6)					
núcleo motor do trigêmeo tensor do tímpano (STT)					
núcleo de Roller (Ro)					

<b>legenda:</b>	<b>verde:</b> aferências consistentes a raiz coclear
<b>1-2 perfis neuronais ( + )</b>	<b>vermelho:</b> aferências provavelmente originadas por contaminação no cerebelo
<b>3-8 perfis neuronais ( ++ )</b>	<b>azul:</b> aferências provavelmente originadas por contaminação nos núcleos cocleares
<b>9-14 perfis neuronais ( +++ )</b>	<b>laranja:</b> aferências provavelmente originadas por contaminação no nervo facial
<b>mais de 15 perfis neuronais ( +++++ )</b>	

Quadro 1 – Sistematização das aferências observadas nos casos experimentais em que a injeção de FG foi considerada efetiva (casos N13, N15, N17, N18 e N20). Os dados obtidos em cada caso estão dispostos em colunas e as regiões observadas como aferentes em linhas. A análise semi-quantitativa dos núcleos aferentes está representada pelos símbolos (+) e segue o critério da legenda. As regiões aferentes foram agrupadas segundo o código de cores da legenda.

REGIÕES / CASOS	N25 - iontoforese	N30 - iontoforese	N32 - iontoforese	N74 - pressão	N84 - pressão
análise do sitio de injeção	injeção na parte mais rostral da raiz, pouca contaminação no cerebelo e halo em VCP	injeção na parte mais rostral da raiz, com contaminação no cerebelo e em VCP	injeção na parte mais medial da raiz, traçador extravasou para o líquido encéfaloaracnóideo e contaminou o nervo facial. Além de contaminação em VCA e pouca contaminação no cerebelo.	muita contaminação no cerebelo e no flóculo, formando um trato no trajeto da micropipeta. Muita contaminação em VCA e VCP, e no nervo facial	muita contaminação no flóculo do cerebelo e em VCA e VCP (parte mais anterior), além da contaminação na parte mais superficial do cerebelo
núcleo pontino (Pn)		(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
núcleo prepósito (Pr)				(+)	(+)
núcleo lateral superior da oliva (LSO)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
núcleo ventral do corpo trapezoide (VNTB = MVPO + LVPO)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
células adrenérgicas A5 (A5)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB ou Tz)		(++)	(++)	(+++)	(+++)
região periolivar			(++)	(++)	(++)
núcleo superior paraolivar (SPON)			(++)		
núcleo medial da oliva (MSO)			(+)		
núcleo eferente vestibular (Eve)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
núcleo coclear ventral posterior (VCP)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
núcleo coclear ventral anterior (VCA)		(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
núcleo coclear dorsal (DC)		(++)	(++)	(+++)	(+++)
sub coeruleus (SuBC)		(+++)	(+++)	(++)	(++)
locus coeruleus (LC)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
giganto celular lateral (LPGi)		(+)	(+)	(++)	(++)
núcleo olivar inferior (ION)			(+)	(+++)	(+++)
núcleo reticular parvicelular (PCRT)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)
núcleo reticular intermédio (IRT)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)
núcleo vestibular lateral (Lve)		(++)		(+++)	
núcleo vestibular espinal (SpVe)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+)
núcleo vestibular medial parte magnocelular (MVeMC)		(+++)	(+++)	(+++)	(++)
núcleo vestibular medial parte parvicelular (MVePC)		(+++)	(+++)	(++)	(++)
núcleo central do colículo inferior (CIC)	(+++)		(+++)	(+++)	(+++)
núcleo trigeminal espinal interpolares (Sp5I)			(+)	(+++)	(++)
núcleo ventrolateral principal do trigêmeo (Pr5VL)				(+)	(++)
núcleo reticular lateral (LRT)			(+)	(+++)	(++)
núcleo cuneiforme (Cu)	*Ecu - (++)		(++)	(++)	(++)
núcleo grácil (Gr)			(+)	(++)	(+++)
núcleo motor do nervo facial (mot7)		(+++)	(+++)	(++)	
zona perifacial			(++)		
córtex auditivo primário (Au1)					
núcleo dorsal da rafe ventral (DRV)					
núcleo paralemniscal ventral (PLV)		(+)			
substância cinzenta periaquedutal (PAG)			(++)	(+)	
núcleo reticular medular parte dorsal (MDD)				(+)	
núcleo pontino reticulotegmental (RTTg)				(+++)	(+++)
núcleo paratrigeminal (Pa5)					(++)
núcleo para-abducente (Pa6)					(++)
núcleo motor do trigêmeo tensor do tímpano (STT)				(++)	(++)
núcleo de Roller (Ro)					(++)

<b>legenda:</b>	<b>verde:</b> aferências consistentes a raiz coclear
<b>1-2 perfis neuronais ( + )</b>	<b>vermelho:</b> aferências provavelmente originadas por contaminação no cerebelo
<b>3-8 perfis neuronais ( ++ )</b>	<b>azul:</b> aferências provavelmente originadas por contaminação nos núcleos cocleares
<b>9-14 perfis neuronais ( +++ )</b>	<b>laranja:</b> aferências provavelmente originadas por contaminação no nervo facial
<b>mais de 15 perfis neuronais ( ++++ )</b>	

Quadro 2 – Sistematização das aferências observadas nos casos experimentais em que a injeção de FG foi considerada efetiva (casos N25, N30, N32, N74 e N84). Os dados obtidos em cada caso estão dispostos em colunas e as regiões observadas como aferentes em linhas. A análise semi-quantitativa dos núcleos aferentes está representada pelos símbolos (+) e segue o critério da legenda. As regiões aferentes foram agrupadas segundo o código de cores da legenda.

## Prancha de marcações do caso N15

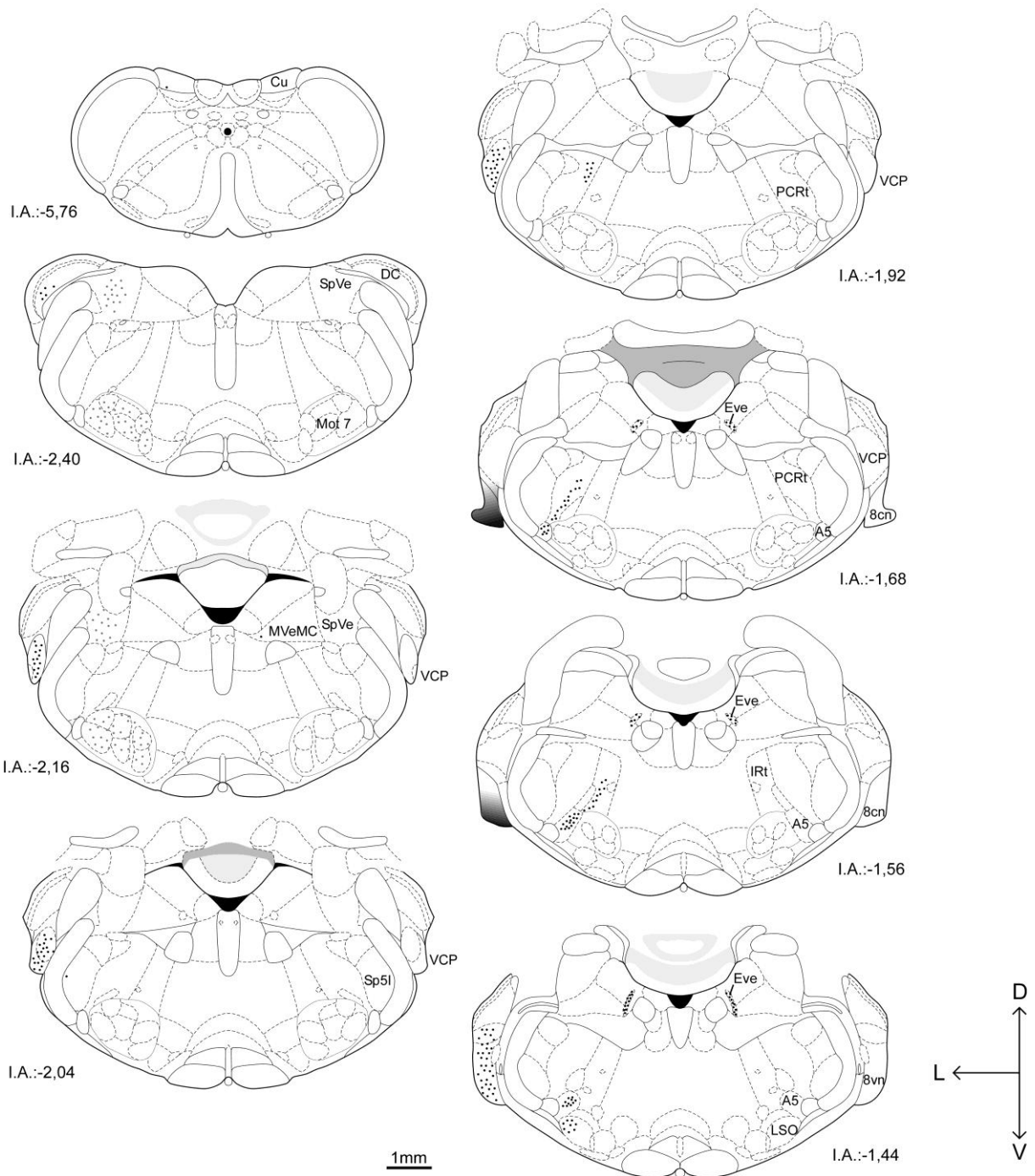


FIGURA 13 – Representação esquemática do mapeamento dos perfis neuronais retrogradamente marcados com FG após a injeção na CR do caso experimental N15 desde o nível I.A. -5,76 a I.A. -1,44. Os perfis neuronais estão representados pelos círculos pretos. Os esquemas foram confeccionados com base nos desenhos de Paxinos e Watson (2005). As setas de orientação e a barra de calibração são válidas para todos os esquemas.

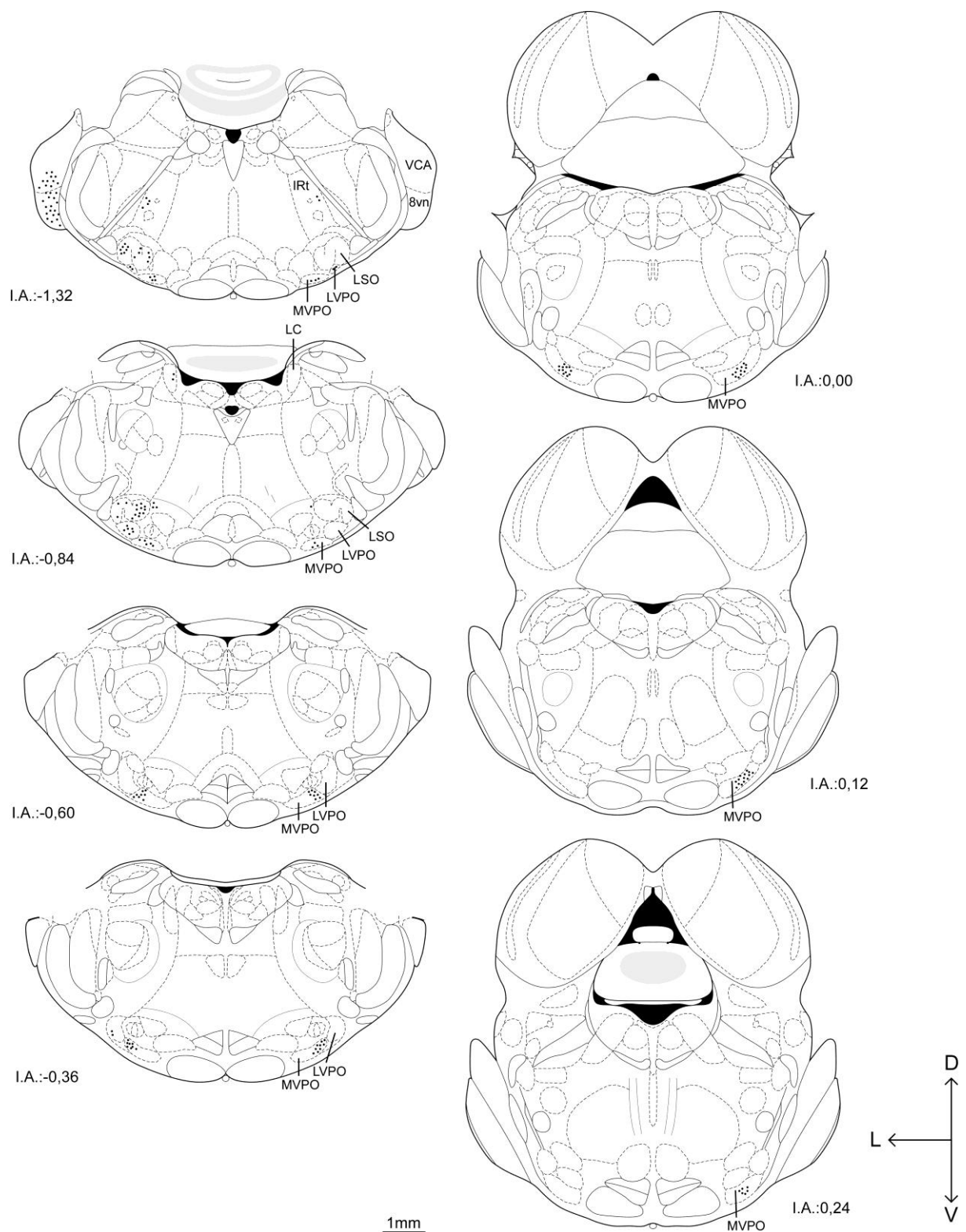


FIGURA 14 – Representação esquemática do mapeamento dos perfis neuronais retrogradamente marcados com FG após a injeção na CR do caso experimental N15 desde o nível I.A. -1,32 a I.A. +0,24. Os perfis neuronais estão representados pelos círculos pretos. Os esquemas foram confeccionados com base nos desenhos de Paxinos e Watson (2005). As setas de orientação e a barra de calibração são válidas para todos os esquemas.

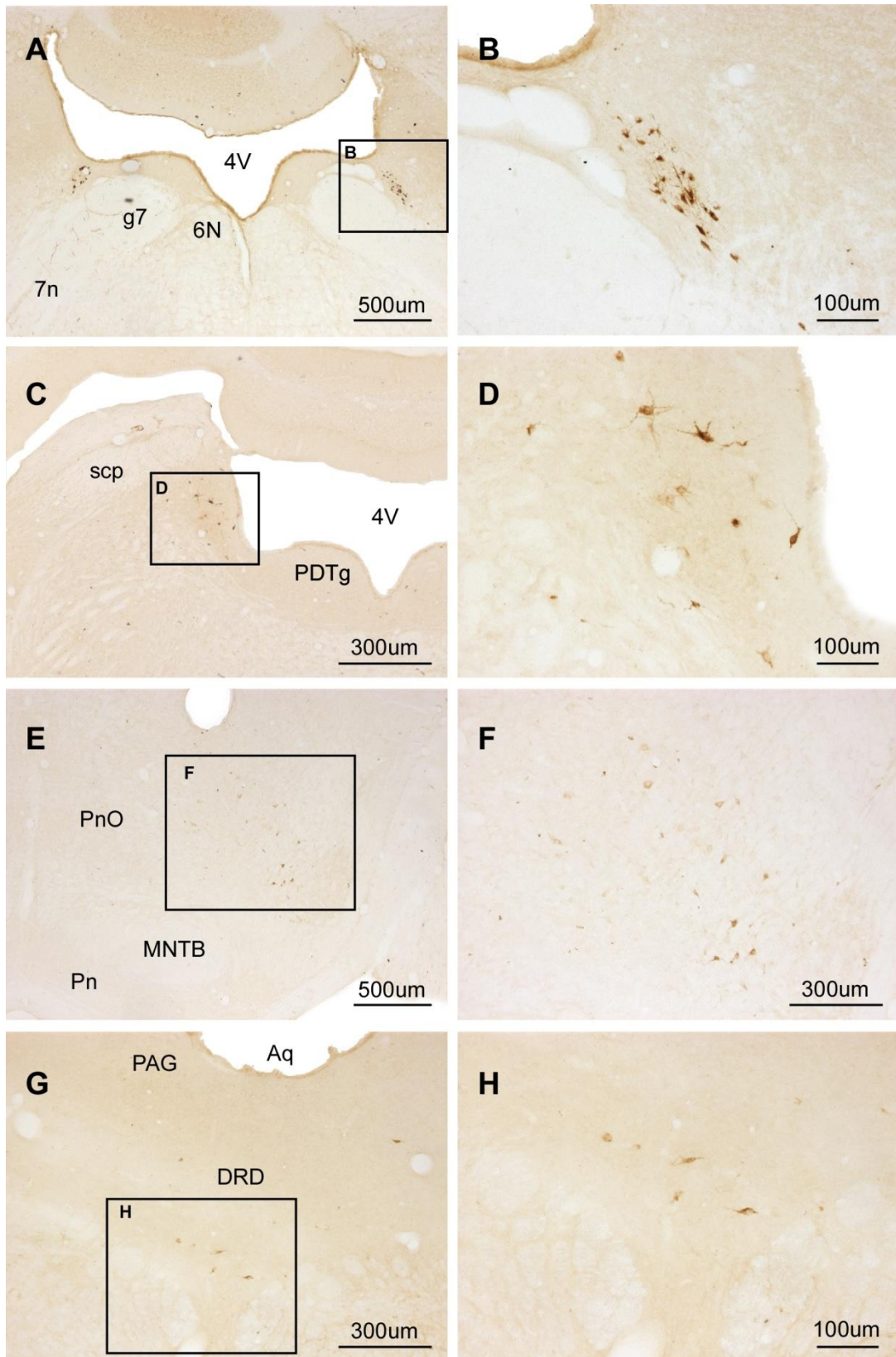


FIGURA 15 – Fotomicrografias dos núcleos com perfis neuronais retrogradamente marcados após a injeção de FG na CR. Em A o núcleo EVE do caso N15, com a área em destaque representada em B. Em C o núcleo LC do caso N17, com a área em destaque representada em D. Em E o núcleo SubC do caso N17, com a área em destaque representada em F. Em G o núcleo DRV do caso N17, com a área em destaque representada em H.

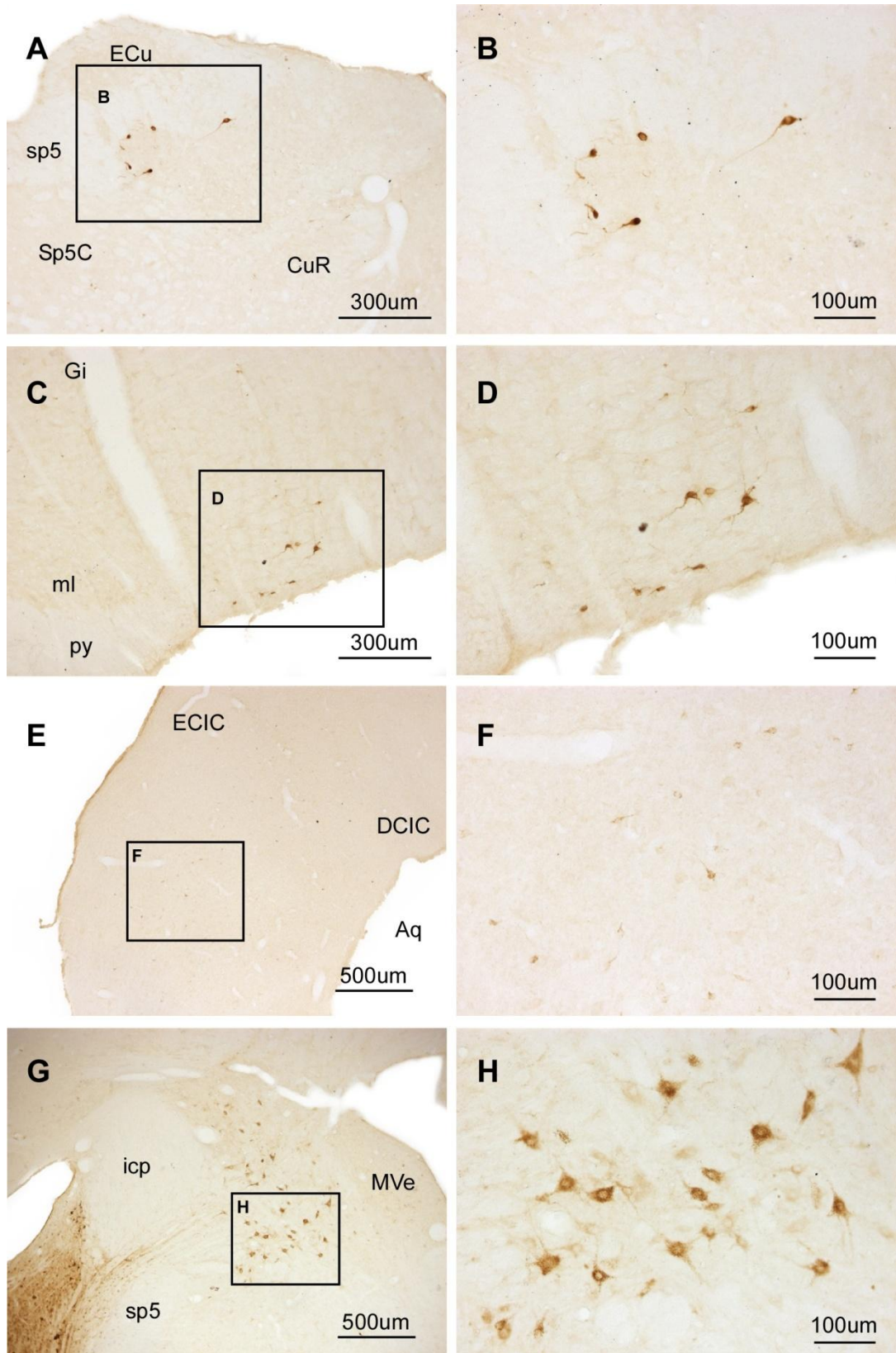


FIGURA 16 – Fotomicrografias dos núcleos com perfis neuronais retrogradamente marcados após a injeção de FG na CR. Em A o núcleo Cu do caso N17, cuja área em destaque está representada em B. Em C o núcleo LPGi do caso N17, cuja área em destaque está representada em D. Em E o núcleo CIC do caso N13, cuja área em destaque esta representada em F. Em G o núcleo SpVe do caso N17, cuja área em destaque está representada em H

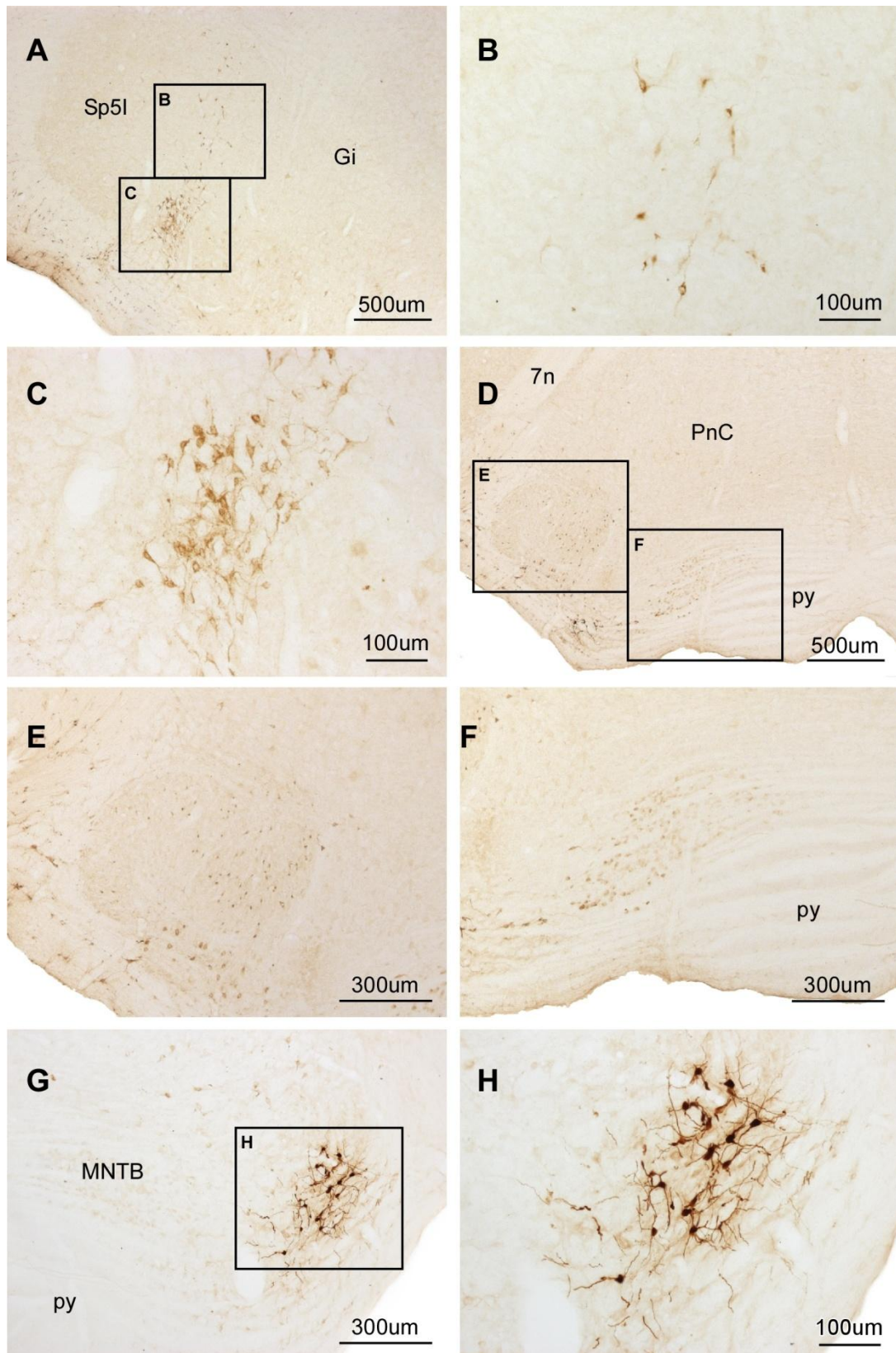


FIGURA 17 – Fotomicrografias dos núcleos com perfis neuronais retrogradamente marcados após a injeção de FG na CR. Em A o núcleo IRT e A5 do caso N13 com as áreas em destaque representadas em B e C. Em D o núcleo LSO e MNTB do caso N13, com as áreas em destaque representadas em E e F. Em G o núcleo VNTB do caso N18 com a área em destaque representada em G.

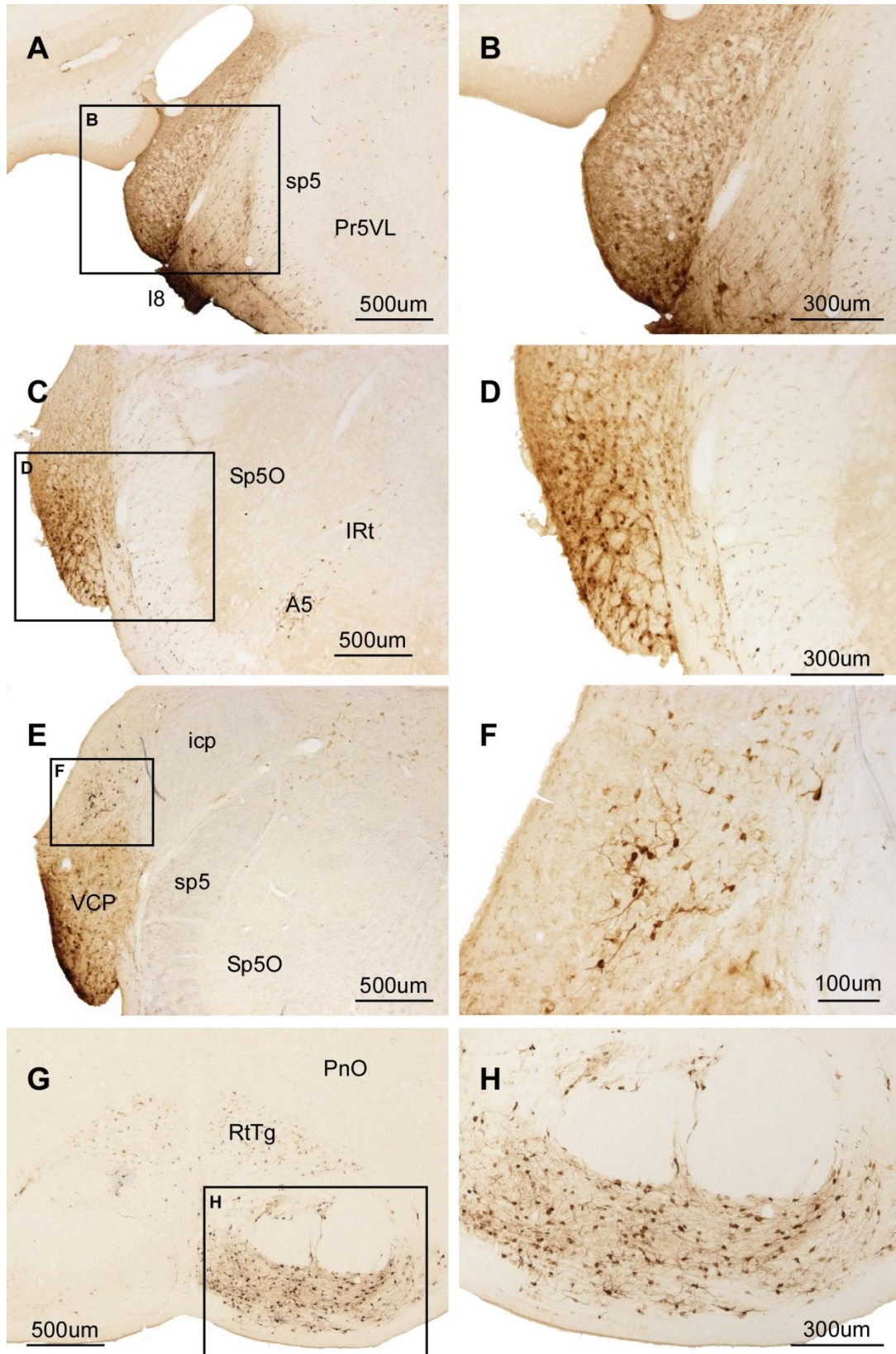


FIGURA 18 – Fotomicrografias dos núcleos com perfis neuronais retrogradamente marcados após a injeção de FG na CR. Em A o núcleo VCA do caso N30, com a área em destaque representada em B. Em C o núcleo VCP do caso N15, com a área em destaque representada em D. Em E o núcleo DCN do caso N17 com a área em destaque representada em F e em G o núcleo Pn do caso N74, com a área em destaque representada em H.

## 5. DISCUSSÃO

Após análise dos resultados e pesquisa bibliográfica, comparamos as informações obtidas em nossos experimentos com estudos prévios com intuito de melhor interpreta-las e com isto eliminar possíveis aferências originadas devido a difusão de traçador fora da CR. Os núcleos identificados como aferências consistentes aos CRN foram representados esquematicamente na Figura 19.

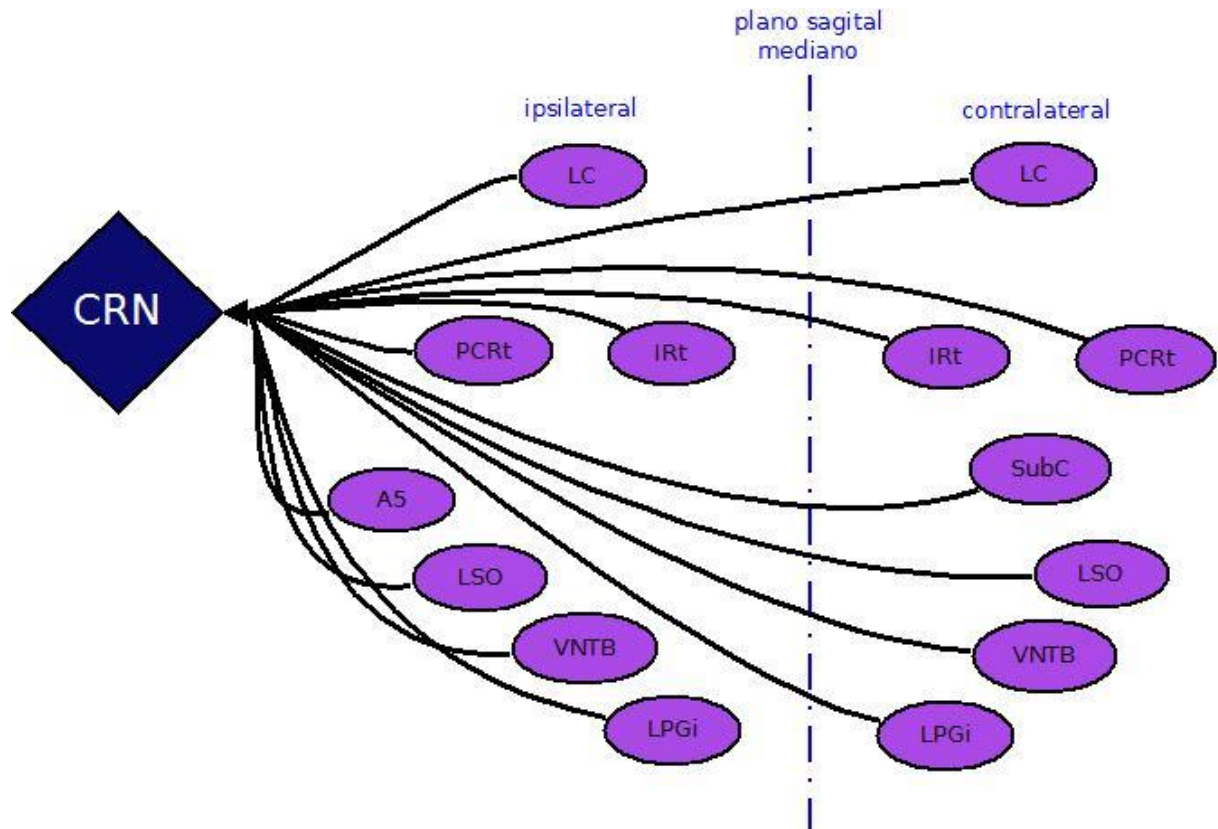


FIGURA 19 – Representação esquemática dos núcleos identificados como aferências consistentes aos CRN neste trabalho

Na maioria dos casos analisados observamos marcação no VC e especulamos que pode ser devida a 4 possíveis situações. Aferências diretas do VC aos CRN. Contaminação no VC por depósito de neurotraçador no trajeto da micropipeta em direção à CR, o que gera marcações em núcleos aferentes ao VCN como: o CIC (bilateralmente) dado que este núcleo inerva o VC (HUFFMAN e HENSON, 1990), no Au1 (WEEDMAN et al., 1996; WEEDMAN e RYUGO, 1996a;1996b) e no DC, o qual possui conexão recíproca com o VC (HARRISON, J. M. e FELDMAN, 1970) Contaminação do corpo trapezoide (tz), devido a eferências do próprio VC ((HARRISON, J. M. e FELDMAN, 1970), o que também resulta em marcação no IC ipsilateral (FAYE-LUND, 1986). Contaminação por halo de difusão

gerado a partir da dispersão do neurotraçador depositado na CR, o que não é capaz de gerar marcação em núcleos com aferência ao VC.

Nos estudos de Li et al. (1998) foi evidenciado que o IC é responsável pelo processamento da informação acústica e pela localização da fonte sonora. Acreditamos ainda que este núcleo possa influenciar a atividade dos CRN de maneira indireta, pois, o IC faz conexão com os neurônios do VNTB (GOMEZ-NIETO et al., 2008b), e a via IC-VNTB-CRNs teria um papel importante na modulação do RAS

Nossos resultados evidenciaram que o VNTB inerva os neurônios da CR, o que corrobora com os estudos de Gómez-Nieto (2008b), os quais indicam a existência de uma projeção direta bilateral, porém majoritariamente contralateral, do VNTB para o núcleo da CR além da presença de receptores muscarínicos M2 e M4 no corpo celular e dendritos. Sabendo-se que a identidade neuroquímica do VNTB é colinérgica, há a possibilidade deste núcleo ser um dos moduladores do RAS, dado que a inibição da neurotransmissão glutamatérgica por fibras colinérgicas foi demonstrada em outras áreas do cérebro (BUNO *et al.*, 2006). Da mesma maneira, os terminais colinérgicos do VNTB podem regular a força da transmissão sináptica glutamatérgica dos CRNs ao PnC (NODAL e LÓPEZ, 2003).

Também não podemos descartar a possível contaminação do feixe olivococlear medial e lateral no momento da injeção do neurotraçador na CR, o que poderia gerar marcação nos núcleos do sistema olivococlear, tanto medial, quanto lateral. Os neurônios do sistema olivococlear medial (MOC) estão localizadas no VNTB e projetam principalmente à cóclea contralateral, enquanto que os neurônios do sistema olivococlear lateral (LOC) estão localizados no LSO e região periolivar (concha) e projetam à cóclea ipsilateral (VETTER e MUGNAINI, 1992; WARR, 1992). Para diferenciação das projeções ao CRN desta marcação, é necessária uma análise morfométrica dos neurônios marcados, dado que os neurônios do MOC possuem geralmente um corpo grande, com formato estrelado ou triangular.

Também foram verificadas marcações majoritariamente na parte medial do LSO, o qual possui um importante papel na via auditiva relacionado com a localização sonora (HARNISCHFEGER *et al.*, 1985). O núcleo LSO é constituído de neurônios multipolares formando um S tonotopicamente organizado, com baixas frequências representadas lateralmente e altas frequências representadas medialmente (RIETZEL e FRIAUF, 1998), o que o torna um importante componente da via auditiva no que se trata da localização da fonte sonora, podendo modular a via essencial do RAS. Ainda não foram comprovadas suas aferências para os CRN, porém, já se sabe de sua inervação diferencial para outras estruturas do tronco encefálico, tais como os IC, para os quais há uma projeção bilateral, sendo a ipsilateral glicinérgica (inibitória) e a contralateral glutamatérgica (excitatória) (SAINT MARIE

*et al.*, 1989). Portanto, ainda são necessários mais estudos sobre o LSO para identificação de suas aferências e identidades neuroquímicas para melhor associação com o RAS.

A inibição do LSO pelo MNTB é necessária para o processamento das diferenças interaurais de intensidade, essencial para a localização da fonte sonora (MALMIERCA e MERCHÁN, 2004). Durante muitos anos, o MNTB tem sido considerado como um centro de retransmissão passiva, convertendo aferências excitatórias provenientes do VCN em aferências inibitórias ao LSO (KOPP-SCHEINPFLUG *et al.*, 2008). Marcações encontradas neste núcleo nos sugere que o MNTB possa ser uma fonte glicinérgica de projeção ipsilateral ao CRN, dado que em estudos realizados por Gómez-Nieto *et al.* (2008a) demonstraram a presença de botões com esta mesma característica neuroquímica no corpo celular e dendritos do CRN. No entanto estudos prévios de conectividade do MNTB (THOMPSON e SCHOFIELD, 2000) não descreveram conexões com os CRN

Foi verificada também marcação no LC. Este núcleo é a maior fonte de norepinefrina (GOMEZ-NIETO *et al.*, 2008a) no cérebro do rato e inerva diversas áreas encefálicas, entre elas os CRN, podendo indicar uma possível fonte de modulação noradrenérgica do sobressalto. Além do LC, também foi verificada, em uma porção mais rostral do encéfalo, do lado contralateral ao sitio de injeção, uma leve marcação no SubC, que também possui identidade neuroquímica noradrenérgica (TSURUOKA *et al.*, 2010). Estudos recentes demonstraram que o LC e o SubC estão relacionados ao reflexo de sobressalto desencadeado por estímulo tátil, influenciando na duração do tempo em que o rato mantém uma postura imóvel (*freezing*) após a apresentação do estímulo, durante o qual o rato provavelmente foca sua atenção no julgamento da situação, dessa forma, informação sensorial desnecessária pode ser descartada para extrair outras informações sensoriais essenciais para a sobrevivência do animal (TSURUOKA *et al.*, 2011)

O RAS também possui um componente do sistema nervoso autônomo, neste contexto, nossos resultados indicam a presença de os neurônios retrogradamente marcados no A5, o qual está relacionado com a regulação cardiovascular do baroreflexo, além de ser fonte noradrenérgica para o VC como descrito por Byrum e Guyenet (1987). Isto pode indicar que o núcleo A5 tem papel importante na regulação autonômica do reflexo, pois estudos recentes também concluíram que o A5 serve de conexão entre a medula caudal ventrolateral e a medula espinal (COBOS *et al.*, 2003), o que demonstra um caminho pelo qual a medula caudal ventrolateral exerce efeito sobre a pressão sanguínea e a função respiratória. Estes dados demonstram que o A5 possui uma função análoga à do LC, o qual inerva vastas áreas do encéfalo relacionadas com a integração sensório-motora. Isto sugere que os dois grupos noradrenérgicos representam duas partes de um único sistema funcional, influenciando porções diferentes do encéfalo (BYRUM e GUYENET, 1987) que entretanto atuam de maneira complementar sobre os CRN.

A possível contaminação no trajeto da micropipeta através do cerebelo em direção à CR pode ter originado algumas marcações em núcleos aferentes ao córtex cerebelar e ao paraflóculo, tais como: o Pn (MIHAILOFF, 1994), cuja projeção se dá através do pedúnculo cerebelar médio a uma extensa camada de células granulares do córtex cerebelar e ao paraflóculo principalmente contralateral; o SpVe, o qual projeta através de fibras vestibulocerebelares ao córtex cerebelar ipsilateral (BARMACK, 2003); o IOn, o qual envia projeções olivocerebelares ao córtex cerebelar (BRODAL, A. et al., 1980; DESCLIN, 1974); o MVe, tanto magnocelular, quanto parvocelular, que por sua vez possui uma projeção bilateral e recíproca com o verme caudal e o núcleo medial do cerebelo (VOOGD et al., 1996); McCrea and Horn (2006) também demonstraram uma projeção bilateral do Pr, parte magnocelular, ao cerebelo; também foi demonstrado uma fonte de aferências ao cerebelo derivadas da medula: o núcleo cuneiforme acessório (ECu) (ALISKY e TOLBERT, 1997), no qual também verificamos marcação. O LRt representa uma importante fonte de fibras ao córtex cerebelar, passando através do pedúnculo cerebelar inferior (icp) e terminando na camada de células granulares (BRODAL, P., 1975). Foram observadas poucas, mas consistentes marcações no Sp5I, o qual, de acordo com vários autores, também projeta ao cerebelo (WATSON e SWITZER, 1978). Outros núcleos observados com marcação retrógrada que são de origem possivelmente da contaminação no cerebelo são: Pr5VL (WATSON e SWITZER, 1978); RTTg (GERRITS e VOOGD, 1987); e MdD (LEITE-ALMEIDA et al., 2006). Além destes núcleos, marcações retrógradas observadas no EVE, também podem ser de origem da contaminação cerebelar pelo neurotraçador, uma vez que este núcleo projeta bilateralmente ao flóculo do cerebelo (SHINDER et al., 2001).

Em alguns casos foram observados perfis neuronais fracamente marcados ipsilaterais no Mot7 e na zona perifacial, que podem ser causadas por contaminação do nervo facial devido à proximidade anatômica ao VIII par, dado que ambos compartilham espaço no meato acústico interno, e aos ocasionais extravasamentos de traçador no líquido.

Para confirmar as aferências consistentes aos CRN descritas neste trabalho serão necessários estudos de controle com traçadores anterógrados nestes núcleos. Estes experimentos fogem do escopo deste trabalho de conclusão de curso embora já estejam em andamento no laboratório e alguns resultados preliminares serão apresentados no capítulo de perspectivas futuras. Desta forma este trabalho foi fundamental para discernir quais núcleos deverão receber as injeções de traçador anterógrado, o que permitirá também a identificação neuroquímica destas aferências.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Ainda não há conhecimento da origem das aferências responsáveis pela inervação gabaérgica aos CRN, embora tenham sido observados receptores de GABA na CR (GOMEZ-NIETO et al., 2008a) e botões sinápticos gabaérgicos na superfície somática e nos dendritos dos CRNs (OSEN et al., 1991). Por outro lado, também foram encontrados receptores de glicina na CR e botões sinápticos glicinérgicos na superfície somática dos CRNs (OSEN et al., 1991). Com o intuito de buscar as fontes de inervação gabaérgica queremos realizar novos experimentos de co-localização de neurônios retrogradamente marcados com FG e enzimas precursoras da síntese de GABA

No intuito de confirmar as aferências do A5 verificadas após injeção de neurotraçador retrógrado na raiz, foram realizados experimentos de injeção estereotáxica de neurotraçador anterógrado neste núcleo. O neurotraçador utilizado foi o dextrano amino biotilado (BDA, MolecularProbes # D-1956, PM 10.000), a uma concentração de 10% em soro fisiológico. Este neurotraçador é essencialmente anterógrado, portanto é captado pelos somas e dendritos dos neurônios e transportado por seus axônios até as terminações axonais onde se acumula. Para tal, usamos como referencia para determinação das coordenadas o atlas estereotáxico paxinos (2005), com o qual obtivemos as seguintes coordenadas: no eixo ântero-posterior, 1,9 mm caudal em relação à linha interaural; no eixo látero-lateral, 2,5mm em direção ao lado esquerdo; no eixo dorsoventral, 0,1mm inferiormente à linha interaural.

Como resultados prévios, observamos, fibras e botões sinápticos marcados com o neurotraçador na região da CR. Além disso, foram realizados experimentos de co-localização nos casos de injeção de FG na CR, onde foram encontrados neurônios retrogradamente marcados na região do A5, para verificar se estes também eram imunorreativos para a enzima dopamina beta hidroxilase (DBH), enzima que participa especificamente da síntese de noradrenalina e adrenalina. Após processamento imunoistoquímico para observação em fluorescência de DBH e FG, foi possível estudar se havia co-localização de ambas as marcações. Observou-se que na região do A5 alguns neurônios estavam duplamente marcados, indicando que inervam os CRN e possuem como identidade neuroquímica a noradrenalina (Figura 20). Além disso, verificamos que muitos neurônios marcados com FG não apresentavam imunoreatividade para DBH, portanto, sua identidade neuroquímica ainda precisa ser investigada.

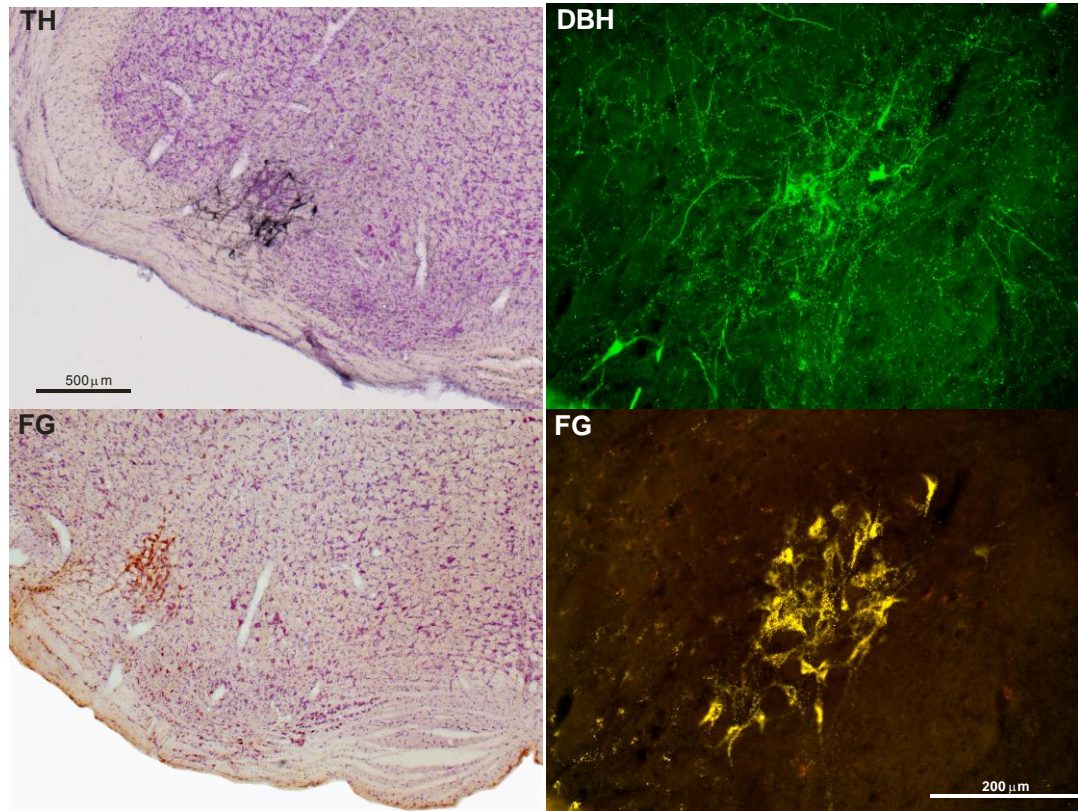


FIGURA 20 - Identificação das aferências noradrenérgicas da região do A5 aos CRN. Fotomicrografias da região do A5, marcado após injeção de FG na raiz coclear, com reação imunohistoquímica para detecção de tirosina hidroxilase (TH) e Dopamina Beta Hidroxilase (DBH).

Além disso, realizamos procedimentos de injeção de BDA em VNTB, no intuito de confirmar as projeções deste núcleo aos CRNs, observadas no caso de injeção de neurotraçador retrógrado na região dos CRN (Figuras 21 e 22). Para tal, usamos como referência para determinação das coordenadas o atlas estereotático Paxinos (2005), com o qual obtivemos as seguintes coordenadas: no eixo ântero-posterior, 0,78 mm caudal em relação à linha interaural; no eixo látero-lateral, 2,3mm em direção ao lado esquerdo; no eixo dorsoventral, 0,4mm inferiormente à linha interaural, e ângulo de 20° em direção caudal.

Os sítios de injeção observados foram satisfatórios, uma vez que se localizaram em diferentes porções do VNTB. No caso N91 é possível observar que a injeção se localizou na porção mais medial do VNTB, com contaminação do tz. No caso N93, o sítio de injeção se localizou na parte mais lateral do VNTB, com pouca contaminação do LSO e contaminação do tz. Já no caso N93, o sítio de injeção também se localizou na parte mais lateral do VNTB, porém é possível observar a presença de um trato no trajeto da micropipeta, que se estende desde a parte mais lateral do núcleo motor do trigêmio até o VNTB, além da grande contaminação no corpo trapezoide. No caso N96, também é possível verificar a presença de trato, com o sítio de injeção localizado na parte mais lateral do VNTB, com contaminação do tz e do LSO. No caso N97, a injeção se localizou na parte mais medial e ventral

do VNTB, com contaminação do tz. Já no caso N101, a injeção se localizou na parte mais lateral e rostral do VNTB, com pouca contaminação do tz.

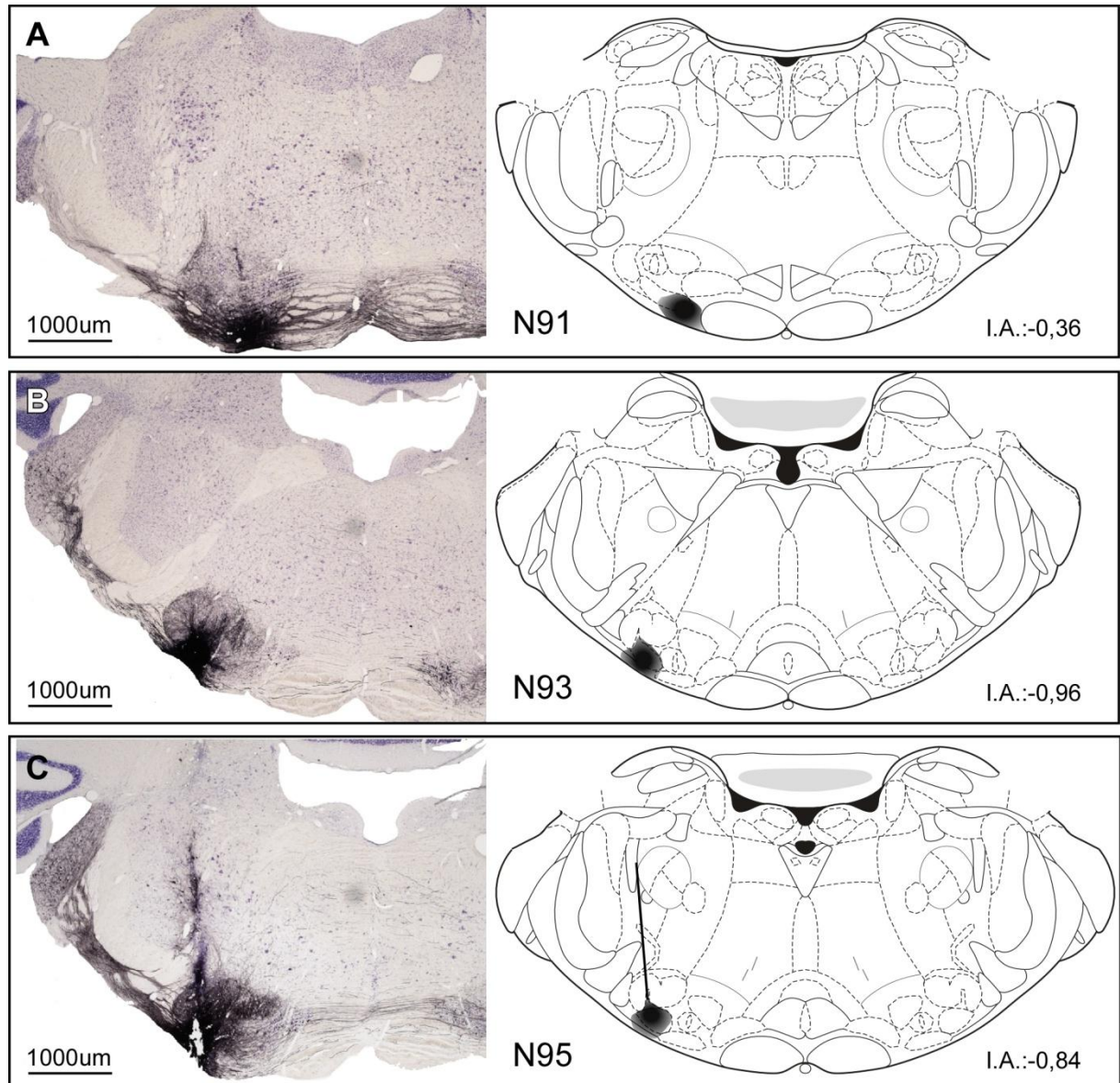


FIGURA 21 - Fotomicrografias do sitio de injeção de BDA em VNTB à esquerda e respectiva representação esquemática à direita. Em A, B e C estão representados o sitio de injeção de uma série de cada caso após revelação para BDA e contracoradas em Nissl. Em A, esta representado o caso N91. Em B, o caso N93 e em C, o caso N95.

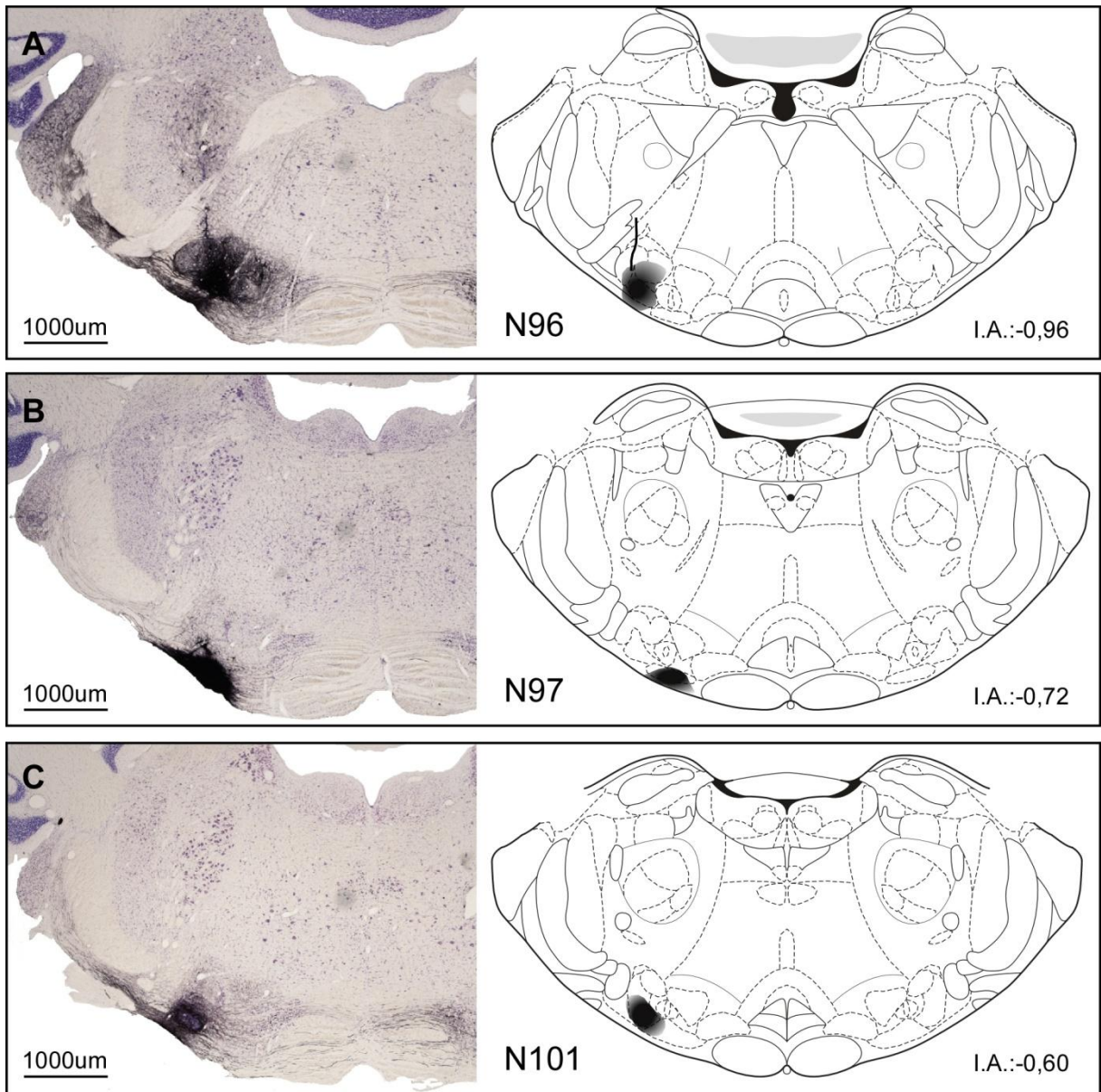


FIGURA 22 - Fotomicrografias do sitio de injeção de BDA em VNTB à esquerda e respectiva representação esquemática à direita. Em A, B e C estão representados o sitio de injeção de uma série de cada caso após revelação para BDA e contracoradas em Nissl. Em A, esta representado o caso N96. Em B, o caso N97 e em C, o caso N101.

Após revelação do neurotraçador BDA, realizamos uma imunohistoquímica para calbindina, no intuito de observar as projeções do VNTB aos CRN, dado que estes neurônios contém uma grande quantidade desta proteína ligadora de cálcio (LÓPEZ et al., 1993). Como resultados preliminares, confirmamos as projeções já demonstradas por Gómez-Nieto (2008b) e estabelecemos os parâmetros para realização de lesões seletivas no VNTB para pesquisar seu papel funcional no RAS e na inibição por estímulo prévio (PPI) (Figura 23)

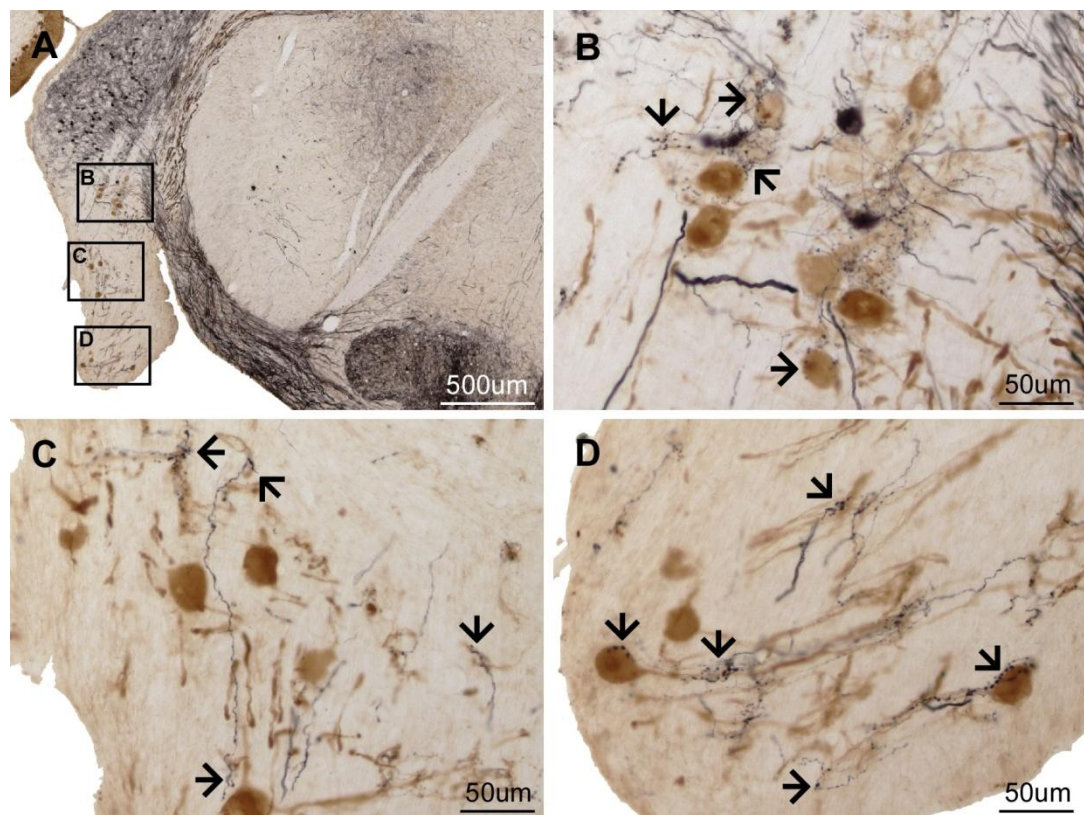


FIGURA 23 – Fotomicrografias da raiz coclear após injeção de BDA em VNTB e imunohistoquímica para calbindina. Em A, uma fotomicrografia da RC esquerda do caso N96, com 3 regiões destacadas, que são representadas em B, C e D com maior aumento. Em B, C e D fotomicrografias evidenciando a presença de aposições sinápticas entre os botões sinápticos corados em preto pela revelação do BDA e os perfis neuronais e dendritos dos CRN corados em marrom pela revelação da calbindina.

Futuramente, após estabelecimento das coordenadas para VNTB, cogitamos realizar análises morfométricas para discriminar os neurônios do sistema olivococlear medial dos neurônios do VNTB que projetam aos CRN (Figura 24).

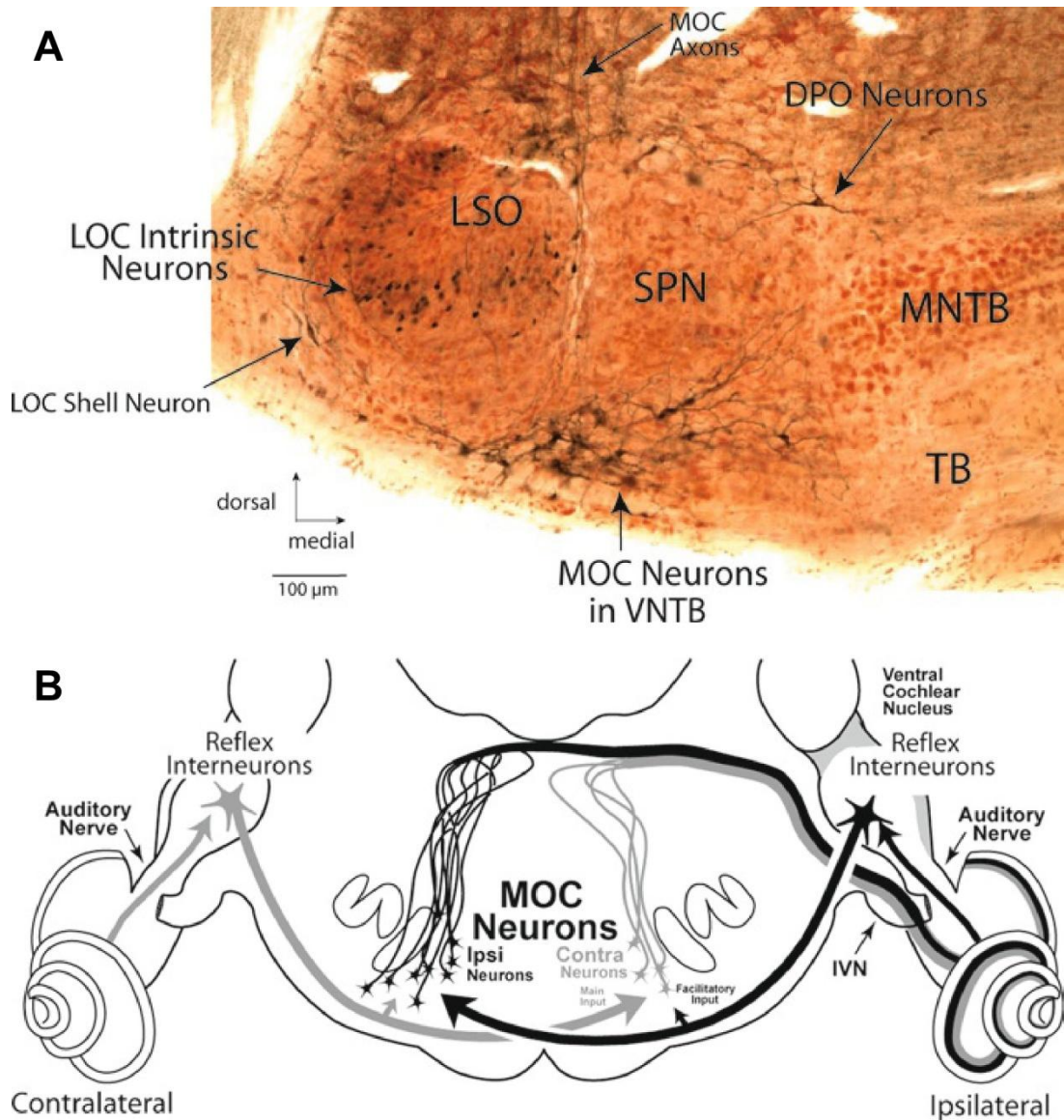


FIGURA 24 – Fotomicrografia e esquema do sistema olivococlear. Em A, uma fotomicrografia do complexo olivar superior, com os neurônios pertencentes aos sistemas MOC e LOC indicados pelas setas. Em B, um esquema das projeções destes neurônios para as cócleas (BROWN, M. C., 2011)

Além disso, visamos realizar experimentos de lesão neurotóxica deste núcleo, através de injeção de um neurotóxico específico para neurônios colinérgicos, a 192-IgG Saporina (BOTLY e DE ROSA, 2009), e posterior análise comportamental, para avaliar a influência deste núcleo em uma das modulações mais interessantes do reflexo acústico de sobressalto: a PPI.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- AITKIN, L. The auditory neurobiology of marsupials: A review. **Hear Res**, v. 82, p. 257-66, 1995.
- AITKIN, L. The anatomy of the cochlear nuclei and superior olivary complex of arboreal australian marsupials. **Brain Behav Evol**, v. 48, p. 103-14, 1996.
- ALISKY, J. M.; TOLBERT, D. L. Quantitative analysis of converging spinal and cuneate mossy fibre afferent projections to the rat cerebellar anterior lobe. **Neuroscience**, v. 80, p. 373-88, 1997.
- ANDRESKI, P.; CHILCOAT, H.; BRESLAU, N. Post-traumatic stress disorder and somatization symptoms: A prospective study. **Psychiatry Research**, v. 79, p. 131-138, 1998.
- ANGULO, A.; MERCHAN, J. A.; MERCHAN, M. A. Morphology of the rat cochlear primary afferents during prenatal development: A cajal's reduced silver and rapid golgi study. **J Anat**, v. 168, p. 241-55, 1990.
- ANISMAN, H. et al. Acoustic startle and fear-potentiated startle in rats selectively bred for fast and slow kindling rates: Relation to monoamine activity. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 4405-4416, 2000.
- BAKSHI, V. P.; SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A. Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of the startle response. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 271, p. 787-794, 1994.
- BARMACK, N. H. Central vestibular system: Vestibular nuclei and posterior cerebellum. **Brain Research Bulletin**, v. 60, p. 511-541, 2003.
- BAUDRIE, V. et al. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. **J Auton Pharmacol**, v. 17, p. 303-9, 1997.
- BELL, R. L. et al. Amphetamine-modified acoustic startle responding and prepulse inhibition in adult and adolescent alcohol-preferring and -nonpreferring rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, p. 163-71, 2003.
- BOROWSKI, T. B.; KOKKINIDIS, L. Cocaine preexposure sensitizes conditioned fear in a potentiated acoustic startle paradigm. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, p. 935-42, 1994.
- BOTLY, L. C.; DE ROSA, E. Cholinergic deafferentation of the neocortex using 192 igg-saporin impairs feature binding in rats. **J Neurosci**, v. 29, p. 4120-30, 2009.
- BRAFF, D. L.; GEYER, M. A.; SWERDLOW, N. R. Human studies of prepulse inhibition of startle: Normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 156, p. 234-58, 2001.
- BRODAL, A. et al. Anatomical demonstration of branching olivocerebellar fibres by means of a double retrograde labelling technique. **Neuroscience**, v. 5, p. 2193-202, 1980.
- BRODAL, P. Demonstration of a somatotopically organized projection onto the paramedian lobule and the anterior lobe from the lateral reticular nucleus: An experimental study with the horseradish peroxidase method. **Brain Res**, v. 95, p. 221-39, 1975.
- BROWN, M. C. Anatomy of olivocochlear neurons. In: RYUGO, D. K.; FAY, R. R.; POPPER, A. N. **Auditory and vestibular efferents**. Springer, 2011. 360.
- BROWN, P. Physiology of startle phenomena. **Adv Neurol**, v. 67, p. 273-87, 1995.
- BUNO, W.; CABEZAS, C.; FERNANDEZ DE SEVILLA, D. Presynaptic muscarinic control of glutamatergic synaptic transmission. **J Mol Neurosci**, v. 30, p. 161-4, 2006.
- BYRUM, C. E.; GUYENET, P. G. Afferent and efferent connections of the a5 noradrenergic cell group in the rat. **J Comp Neurol**, v. 261, p. 529-42, 1987.
- CAICEDO, A. et al. Glutamate-induced co<sup>2+</sup> uptake in rat auditory brainstem neurons reveals developmental changes in ca<sup>2+</sup> permeability of glutamate receptors. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, p. 941-954, 1998.
- CHANG, H. T. et al. Light and electron microscopic analysis of projection neurons retrogradely labeled with fluoro-gold: Notes on the application of antibodies to fluoro-gold. **J Neurosci Methods**, v. 35, p. 31-7, 1990.

- COBOS, A. et al. Brain afferents to the lateral caudal ventrolateral medulla: A retrograde and anterograde tracing study in the rat. **Neuroscience**, v. 120, p. 485-98, 2003.
- COOK, E. W., 3RD et al. Fearfulness and startle potentiation during aversive visual stimuli. **Psychophysiology**, v. 29, p. 633-45, 1992.
- DAMY, S. B. et al. [fundamental aspects on animal research as applied to experimental surgery]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, p. 103-11,
- DAVIS, G. W. Homeostatic control of neural activity: From phenomenology to molecular design. **Annu Rev Neurosci**, v. p. 2006.
- DAVIS, M. et al. A primary acoustic startle circuit: Lesion and stimulation studies. **J Neurosci**, v. 2, p. 791-805, 1982.
- DESCLIN, J. C. Histological evidence supporting the inferior olive as the major source of cerebellar climbing fibers in the rat. **Brain Res**, v. 77, p. 365-84, 1974.
- EBERT, U.; KOCH, M. Glutamate receptors mediate acoustic input to the reticular brain stem. **Neuroreport**, v. 3, p. 429-32, 1992.
- FAYE-LUND, H. Projection from the inferior colliculus to the superior olivary complex in the albino rat. **Anat Embryol (Berl)**, v. 175, p. 35-52, 1986.
- FENDT, M.; LI, L.; YEOMANS, J. S. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 156, p. 216-24, 2001.
- GERRITS, N. M.; VOOGD, J. The projection of the nucleus reticularis tegmenti pontis and adjacent regions of the pontine nuclei to the central cerebellar nuclei in the cat. **J Comp Neurol**, v. 258, p. 52-69, 1987.
- GEYER, M. A. et al. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: A decade in review. **Psychopharmacology**, v. 156, p. 117-154, 2001.
- GOMEZ-NIETO, R. et al. Neurochemistry of the afferents to the rat cochlear root nucleus: Possible synaptic modulation of the acoustic startle. **Neuroscience**, v. 154, p. 51-64, 2008a.
- GOMEZ-NIETO, R.; RUBIO, M. E.; LOPEZ, D. E. Cholinergic input from the ventral nucleus of the trapezoid body to cochlear root neurons in rats. **J Comp Neurol**, v. 506, p. 452-68, 2008b.
- GONZALEZ-LIMA, F.; FINKENSTADT, T.; EWERT, J. P. Neural substrates for long-term habituation of the acoustic startle reflex in rats: A 2-deoxyglucose study. **Neurosci Lett**, v. 96, p. 151-6, 1989.
- GRILLON, C.; SINHA, R.; O'MALLEY, S. S. Effects of ethanol on the acoustic startle reflex in humans. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 114, p. 167-71, 1994.
- GUINAN, J. J.; WARR, W. B.; NORRIS, B. E. Differential olivocochlear projections from lateral versus medial zones of the superior olivary complex. **J Comp Neurol**, v. 221, p. 358-70, 1983.
- HARNISCHFEGER, G.; NEUWEILER, G.; SCHLEGEL, P. Interaural time and intensity coding in superior olivary complex and inferior colliculus of the echolocating bat *Molossus ater*. **J Neurophysiol**, v. 53, p. 89-109, 1985.
- HARRISON, J.; WARR, W.; IRVING, R. Second order neurons in the acoustic nerve. **Science Journal of Comparative Neurology**, v. 138, p. 893-895, 1962.
- HARRISON, J. M.; FELDMAN, M. L. Anatomical aspects of the cochlear nucleus and superior olivary complex. **Contrib Sens Physiol**, v. 4, p. 95-142, 1970.
- HEBEL, R.; STROMBERG, M. W. **Anatomy of the laboratory rat**. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1976.
- HOFFMAN, H. S.; FLESHLER, M. Startle reaction: Modification by background acoustic stimulation. **Science**, v. 141, p. 928-930, 1963.
- HOFFMAN, H. S.; ISON, J. R. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychol Rev**, v. 87, p. 175-89, 1980.
- HORTA-JUNIOR, J. A. C. et al. Direct and indirect connections between cochlear root neurons and facial motor neurons: Pathways underlying the acoustic pinna reflex in the albino rat. **J Comp Neurol**, v. 507, p. 1763-79, 2008.

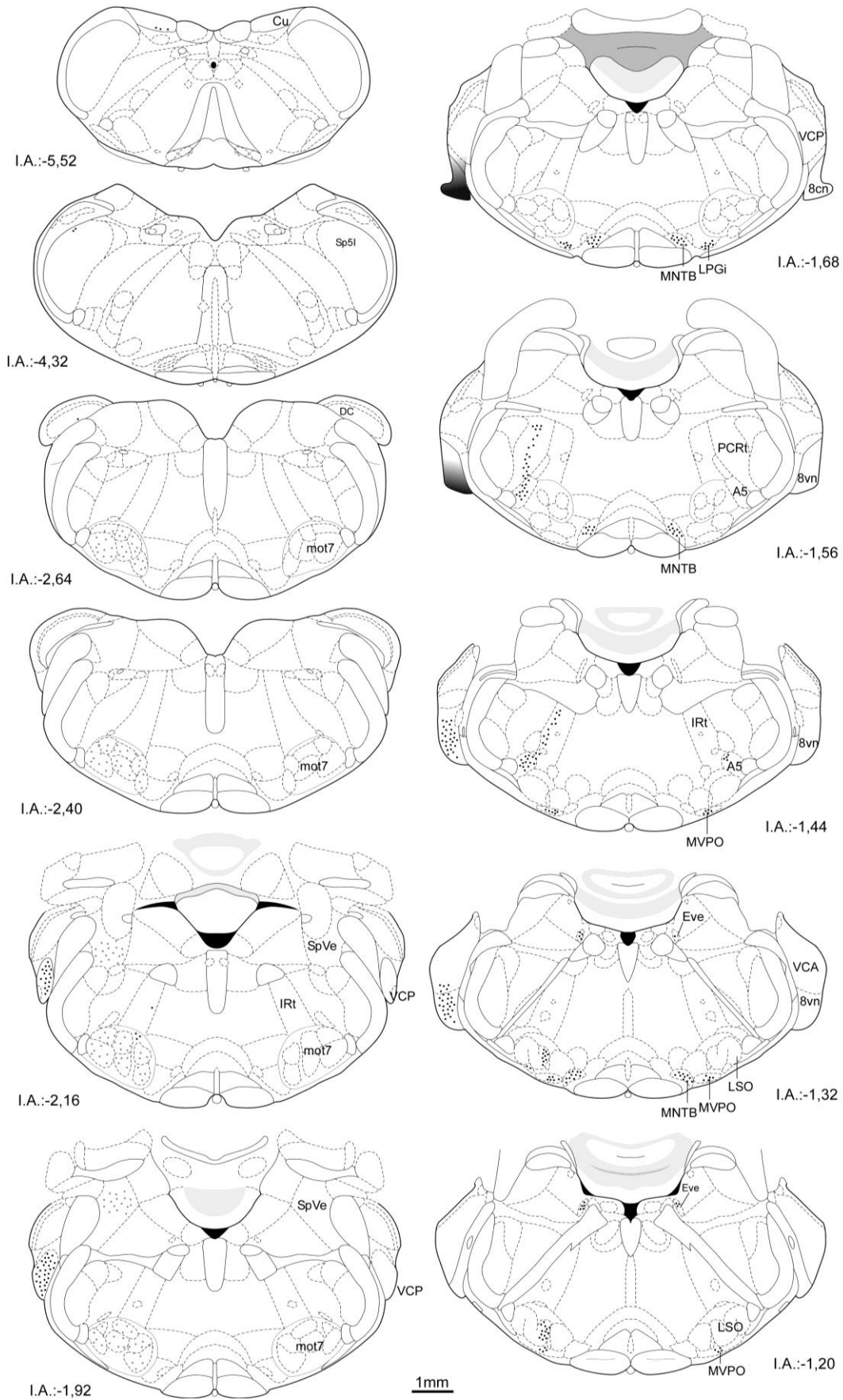
- HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (abc) in immunoperoxidase techniques: A comparison between abc and unlabeled antibody (pap) procedures. **J Histochem Cytochem**, v. 29, p. 577-80, 1981.
- HUFFMAN, R. F.; HENSON, O. W., JR. The descending auditory pathway and acousticomotor systems: Connections with the inferior colliculus. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 15, p. 295-323, 1990.
- JUSTUS, A. N.; FINN, P. R. Startle modulation in non-incarcerated men and women with psychopathic traits. **Personality and Individual Differences**, v. 43, p. 2057-2071, 2007.
- KAVIANI, H. et al. Affective modulation of the startle response in depression: Influence of the severity of depression, anhedonia, and anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 83, p. 21-31, 2004.
- KEAY, K. A.; REDGRAVE, P.; DEAN, P. Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus. **Brain Res Bull**, v. 20, p. 13-26, 1988.
- KOCH, M. The neurobiology of startle. **Prog Neurobiol**, v. 59, p. 107-28, 1999.
- KOPP-SCHEINPFLUG, C. et al. The medial nucleus of the trapezoid body: Comparative physiology. **Neuroscience**, v. 154, p. 160-70, 2008.
- KRASE, W.; KOCH, M.; SCHNITZLER, H. U. Glutamate antagonists in the reticular formation reduce the acoustic startle response. **Neuroreport**, v. 4, p. 13-6, 1993.
- LANDIS, C.; HUNT, W. A. **The startle pattern**. New York: Ferrar & Rinehart, 1939.
- LAPCHIK VBV, M. V., KO GM **Cuidados e manejo de animais delaboratório**  
Rio de Janeiro: 2009.
- LEITE-ALMEIDA, H.; VALLE-FERNANDES, A.; ALMEIDA, A. Brain projections from the medullary dorsal reticular nucleus: An anterograde and retrograde tracing study in the rat. **Neuroscience**, v. 140, p. 577-95, 2006.
- LI, L. et al. Prepulse inhibition following lesions of the inferior colliculus: Prepulse intensity functions. **Physiol Behav**, v. 65, p. 133-9, 1998.
- LINGENHÖHL, K.; FRIAUF, E. Giant neurons in the rat reticular formation: A sensorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit? **J Neurosci**, v. 14, p. 1176-94, 1994.
- LÓPEZ, D. E. et al. The cochlear root neurons in the rat, mouse and gerbil. In: MERCHÁN, M. A. **The mammalian cochlear nuclei: Organization and function**. New York: Plenum Press, 1993. 291-301.
- LOPEZ, D. E. et al. Projections of cochlear root neurons, sentinels of the rat auditory pathway. **J Comp Neurol**, v. 415, p. 160-74, 1999.
- LÓPEZ, D. E. et al. Projections of cochlear root neurons, sentinels of the rat auditory pathway. **J Comp Neurol**, v. 415, p. 160-74, 1999.
- LORENTE DE NÓ, R. Anatomy of the eighth nerve iii. General plan of structure of the primary cochlear nuclei. **Laryngoscope**, v. 43, p. 327-50, 1933.
- MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. São Paulo: Atheneu, 2001.
- MALMIERCA, M. S.; MERCHÁN, M. Auditory system. In: PAXINOS, G. **The rat nervous system**. Academic Press, 2004. 997-1081.
- MANSBACH, R. S.; GOLD, L. H.; HARRIS, L. S. The acoustic startle response as a measure of behavioral dependence in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 108, p. 40-6, 1992.
- MCCREA, R. A.; HORN, A. K. Nucleus prepositus. **Prog Brain Res**, v. 151, p. 205-30, 2006.
- MERCHÁN, M. A. et al. Morphology of cochlear root neurons in the rat. **J Neurocytol**, v. 17, p. 711-25, 1988.
- MIHAIOFF, G. A. Identification of pontocerebellar axon collateral synaptic boutons in the rat cerebellar nuclei. **Brain Res**, v. 648, p. 313-8, 1994.
- MISERENDINO, M. J.; DAVIS, M. Nmda and non-nmda antagonists infused into the nucleus reticularis pontis caudalis depress the acoustic startle reflex. **Brain Res**, v. 623, p. 215-22, 1993.
- NODAL, F. R.; LÓPEZ, D. E. Direct input from cochlear root neurons to pontine reticulospinal neurons in albino rat. **J Comp Neurol**, v. 460, p. 80-93, 2003.
- OSSEN, K. K. et al. Gaba-like and glycine-like immunoreactivities of the cochlear root nucleus in rat. **J Neurocytol**, v. 20, p. 17-25, 1991.

- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates: The new coronal set - 161 diagrams**. San Diego: Academic Press, 2005.
- PILZ, P. K.; SCHNITZLER, H. U. Habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats: Amplitude, threshold, and latency measures. **Neurobiol Learn Mem**, v. 66, p. 67-79, 1996.
- PREHN, A. et al. Chemosensory anxiety signals augment the startle reflex in humans. **Neuroscience Letters**, v. 394, p. 127-130, 2006.
- REMIE, R. Experimental surgery. In: KRINKE, G. J. **The laboratory rat**. Academic Press, 2000. 756.
- RIETZEL, H. J.; FRIAUF, E. Neuron types in the rat lateral superior olive and developmental changes in the complexity of their dendritic arbors. **J Comp Neurol**, v. 390, p. 20-40, 1998.
- SAINT MARIE, R. L. et al. Glycine-immunoreactive projection of the cat lateral superior olive: Possible role in midbrain ear dominance. **J Comp Neurol**, v. 279, p. 382-96, 1989.
- SAPER, C. B. Image is everything. **J Comp Neurol**, v. 412, p. 381-2, 1999.
- SCHENK, M. P.; MANNING, R. J.; PAALMAN, M. H. Going digital: Image preparation for biomedical publishing. **Anat Rec**, v. 257, p. 128-36, 1999.
- SCHMUED, L. C.; FALLON, J. H. Fluoro-gold: A new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. **Brain Res**, v. 377, p. 147-54., 1986.
- SHINDER, M. E. et al. Vestibular efferent neurons project to the flocculus. **Brain Res**, v. 889, p. 288-94, 2001.
- SINEX, D. G.; LOPEZ, D. E.; WARR, W. B. Electrophysiological responses of cochlear root neurons. **Hear Res**, v. 158, p. 28-38, 2001a.
- SINEX, D. G.; LÓPEZ, D. E.; WARR, W. B. Electrophysiological responses of cochlear root neurons. **Hear Res**, v. 158, p. 28-38, 2001b.
- STAM, R. Ptsd and stress sensitisation: A tale of brain and body. Part 1: Human studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 530-557, 2007.
- SWERDLOW, N. R. et al. Men are more inhibited than women by weak prepulses. **Biol Psychiatry**, v. 34, p. 253-60, 1993.
- SWERDLOW, N. R. et al. Effects of prepulse intensity, duration, and bandwidth on perceived intensity of startling acoustic stimuli. **Biol Psychol**, v. 74, p. 389-95, 2007.
- SWERDLOW, N. R.; BRAFF, D. L.; GEYER, M. A. Animal models of deficient sensorimotor gating: What we know, what we think we know, and what we hope to know soon. **Behav Pharmacol**, v. 11, p. 185-204, 2000.
- THOMPSON, A. M.; SCHOFIELD, B. R. Afferent projections of the superior olivary complex. **Microsc Res Tech**, v. 51, p. 330-54, 2000.
- TSURUOKA, M. et al. The nucleus locus coeruleus/subcoeruleus affects the defensive-like, immobile posture following an air-puff startle reaction in the rat. **Neuroscience**, v. 168, p. 149-55, 2010.
- TSURUOKA, M. et al. The nucleus locus coeruleus/subcoeruleus contributes to antinociception during freezing behavior following the air-puff startle in rats. **Brain Res**, v. 1393, p. 52-61, 2011.
- VALLS-SOLÉ, J. Acoustic and somatosensory prepulse modulation of the blink reflex and the startle reaction. In: **Brainstem reflexes and functions**. Madrid: Litofinter,S.A., 1998. 119-131.
- VETTER, D. E.; MUGNAINI, E. Distribution and dendritic features of three groups of rat olivocochlear neurons. A study with two retrograde cholera toxin tracers. **Anat Embryol (Berl)**, v. 185, p. 1-16, 1992.
- VOOGD, J.; GERRITS, N. M.; RUIGROK, T. J. Organization of the vestibulocerebellum. **Ann N Y Acad Sci**, v. 781, p. 553-79, 1996.
- WAGNER, T.; MACK, A. Membrane properties of giant neurons in the caudal pontine reticular formation in vitro. **Neuroreport**, v. 9, p. 1211-5, 1998.
- WARR, W. B. Organization of olivocochlear efferent systems in mammals. In: WEBSTER, D. B.; POPPER, A. N.; FAY, R. R. **The mammalian auditory pathway: Neuroanatomy**. New York: Springer-Verlag, 1992. 410-48.

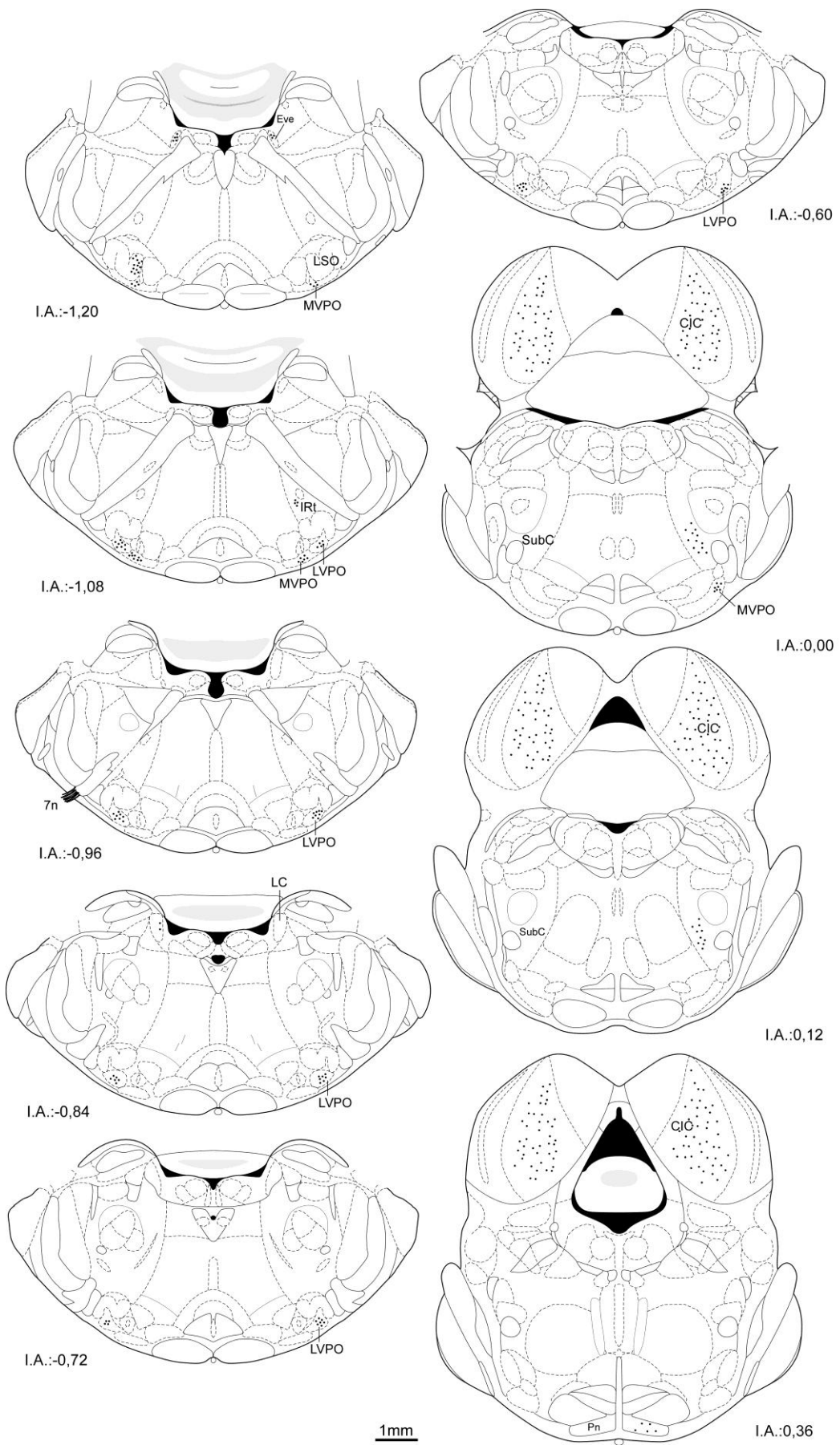
- WATSON, C. R.; SWITZER, R. C., 3RD Trigeminal projections to cerebellar tactile areas in the rat-origin mainly from n. Interpolaris and n. Principalis. **Neurosci Lett**, v. 10, p. 77-82, 1978.
- WEEDMAN, D. L.; PONGSTAPORN, T.; RYUGO, D. K. Ultrastructural study of the granule cell domain of the cochlear nucleus in rats: Mossy fiber endings and their targets. **J Comp Neurol**, v. 369, p. 345-60, 1996.
- WEEDMAN, D. L.; RYUGO, D. K. Projections from auditory cortex to the cochlear nucleus in rats: Synapses on granule cell dendrites. **J Comp Neurol**, v. 371, p. 311-24, 1996a.
- WEEDMAN, D. L.; RYUGO, D. K. Pyramidal cells in primary auditory cortex project to cochlear nucleus in rat. **Brain Res**, v. 706, p. 97-102, 1996b.
- WHITE, J. S.; WARR, W. B. The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat. **J Comp Neurol**, v. 219, p. 203-14, 1983.
- WILKINS, D. E.; HALLETT, M.; WESS, M. M. Audiogenic startle reflex of man and its relationship to startle syndromes. A review. **Brain**, v. 109 ( Pt 3), p. 561-73, 1986.
- WINSLOW, J. T.; NOBLE, P. L.; DAVIS, M. Modulation of fear-potentiated startle and vocalizations in juvenile rhesus monkeys by morphine, diazepam, and buspirone. **Biol Psychiatry**, v. 61, p. 389-395, 2007.
- YEOMANS, J. S.; FRANKLAND, P. W. The acoustic startle reflex: Neurons and connections. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 21, p. 301-14, 1996.

## **APÊNDICE**

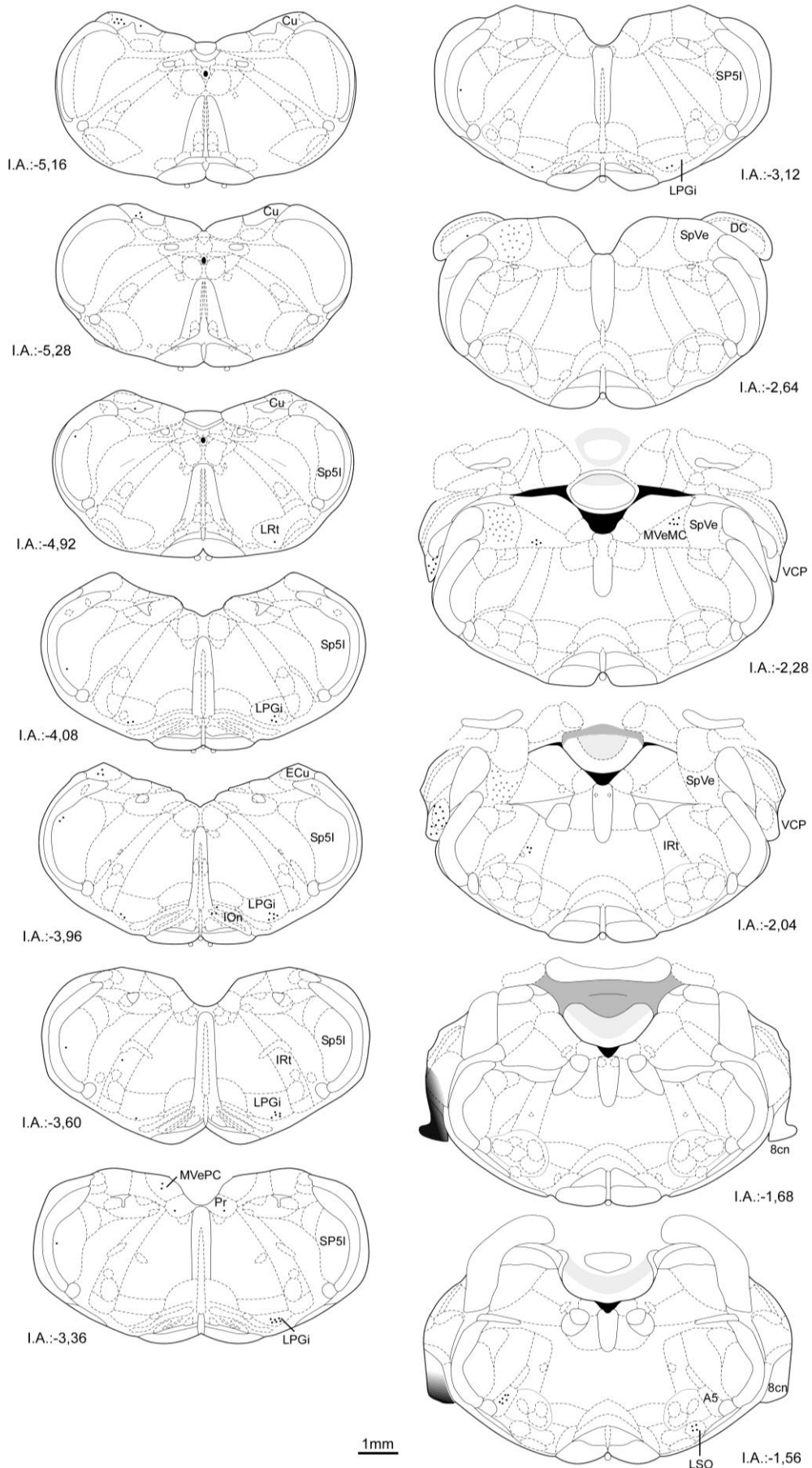
APÊNDICE 1 – Prancha de marcações do caso N13



APÊNDICE 2 – Continuação da prancha de marcações do caso N13

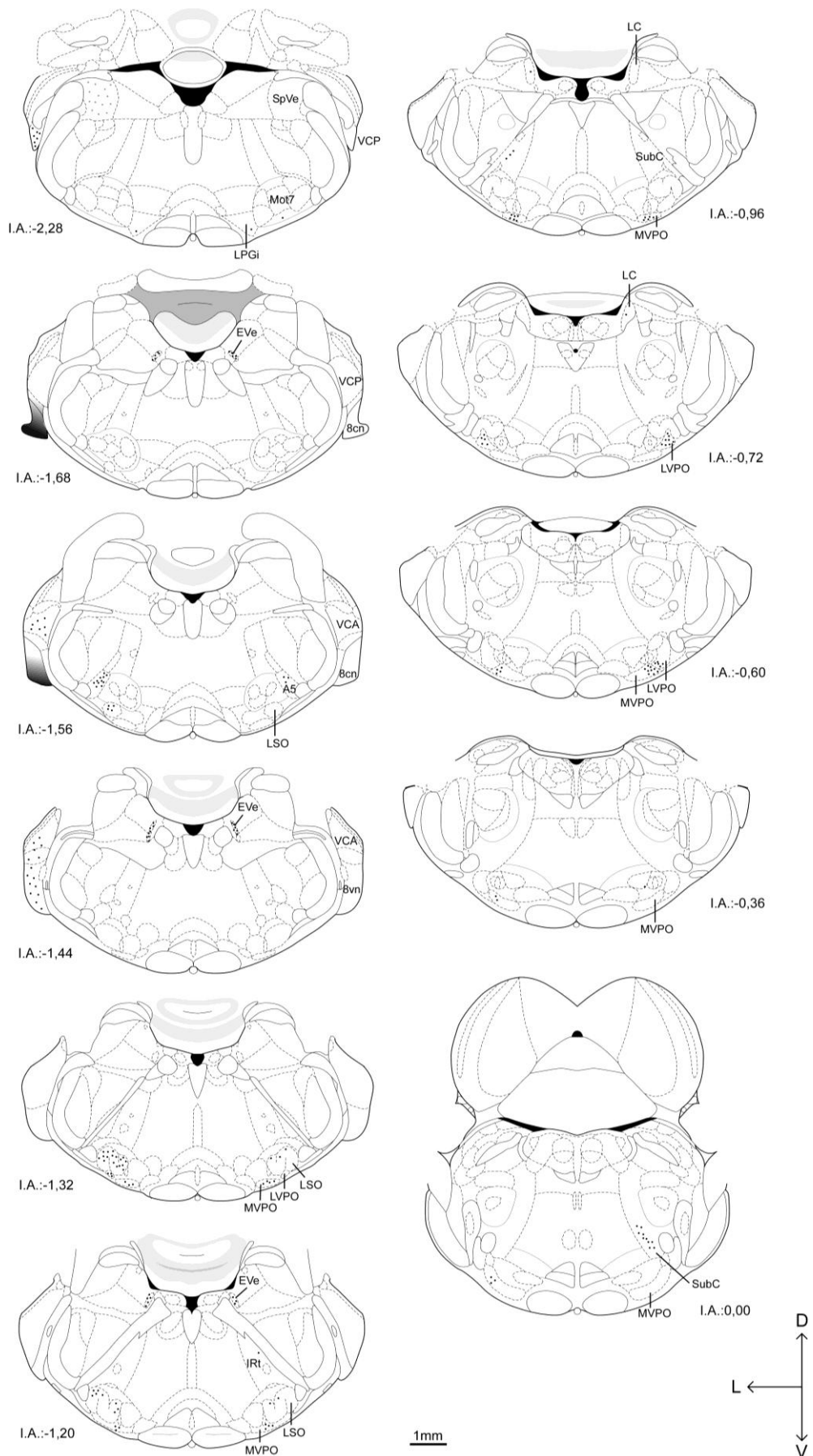


APÊNDICE 3 – Prancha de marcações do caso N17

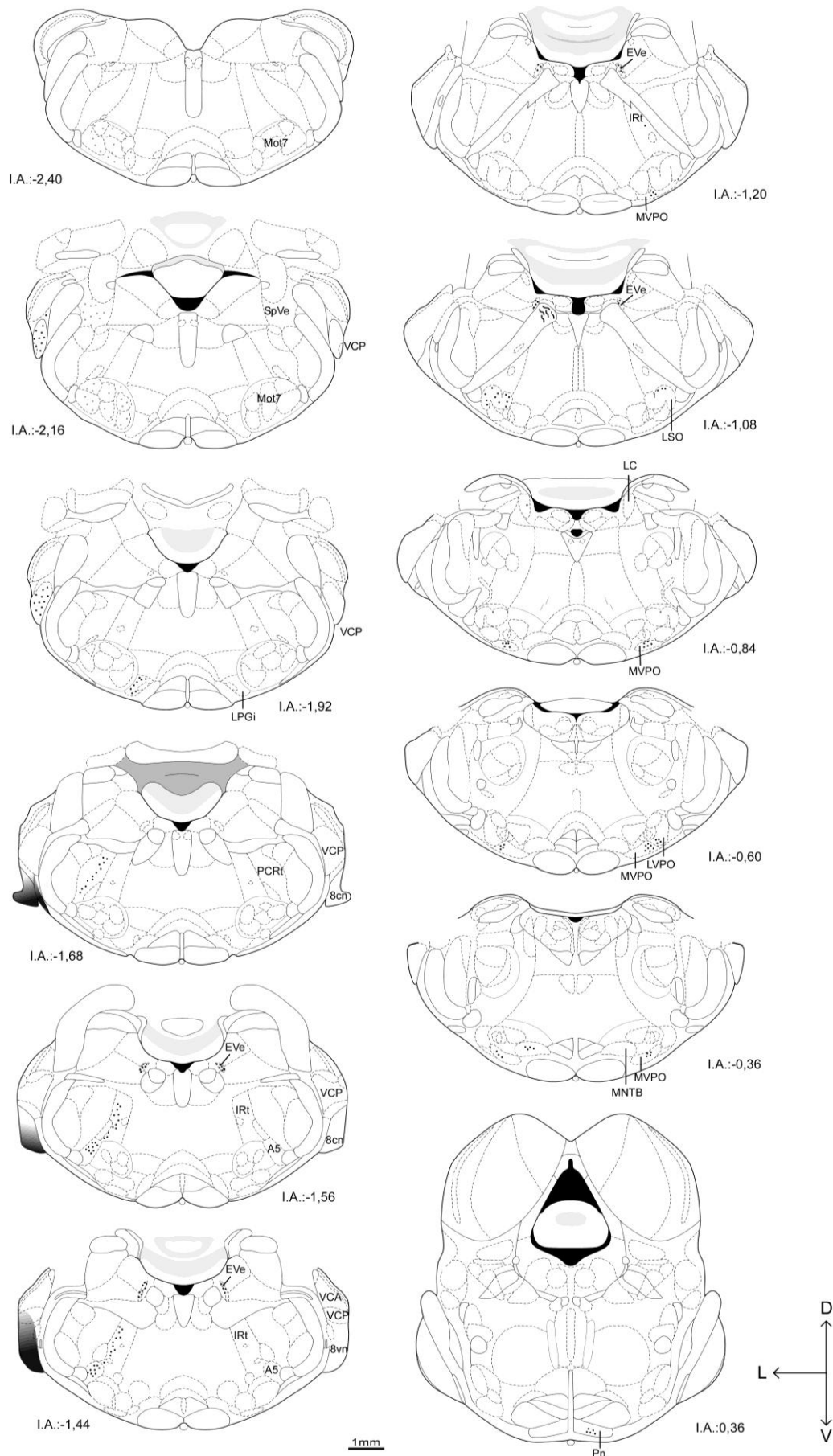




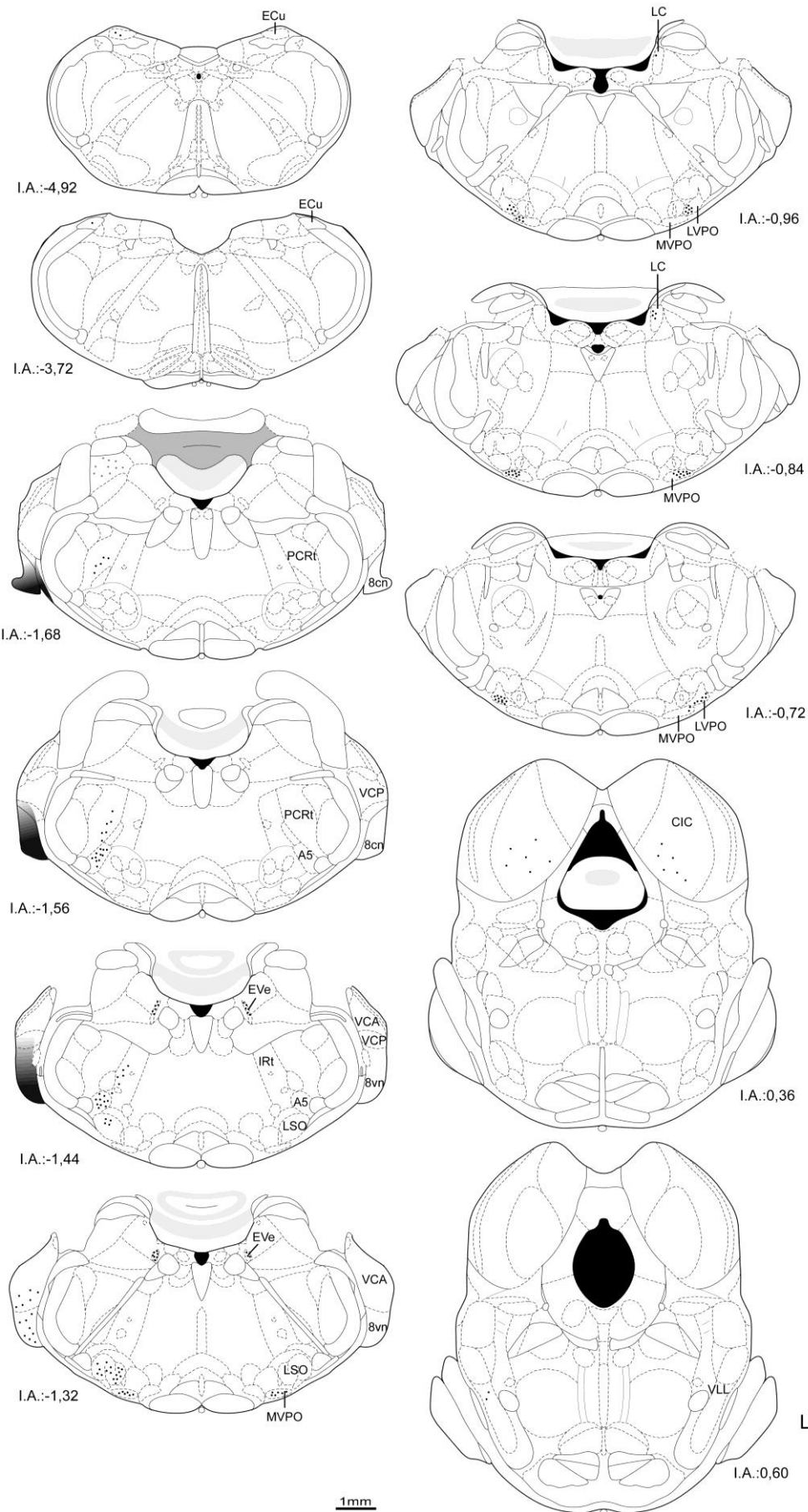
APÊNDICE 5 – Prancha de marcações do caso N18



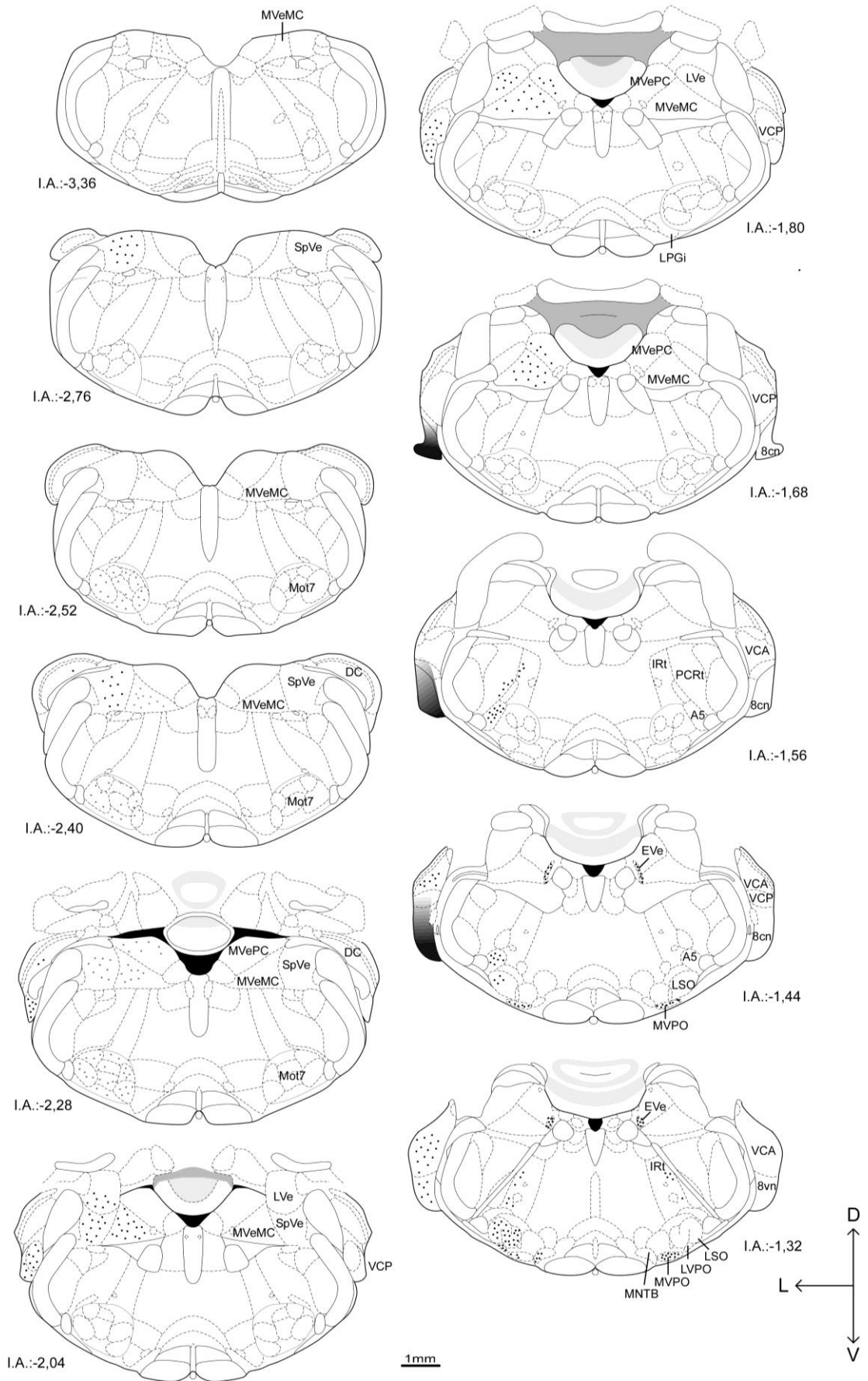
APÊNDICE 6 – Prancha de marcações do caso N20



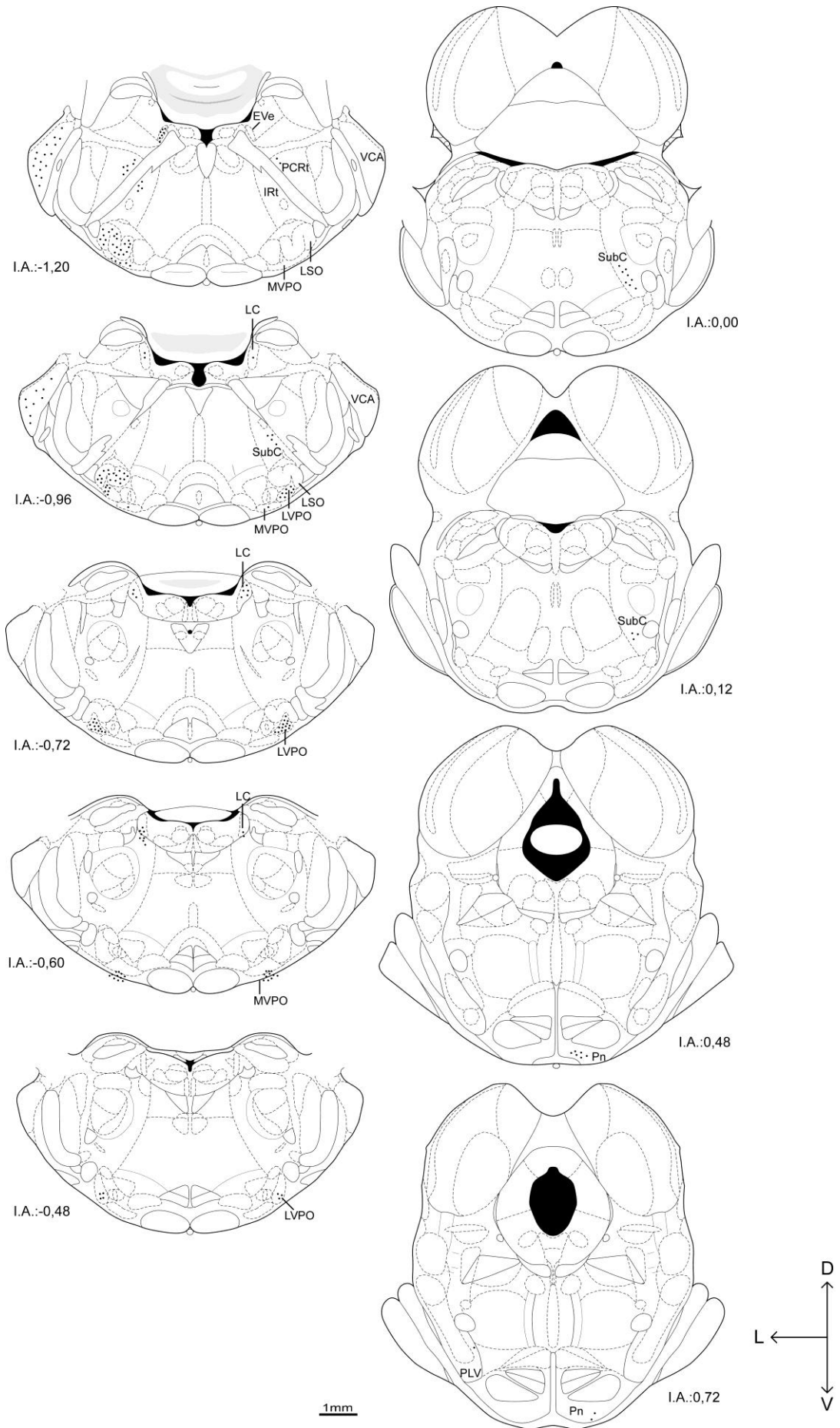
APÊNDICE 7 – Prancha de marcações do caso N25



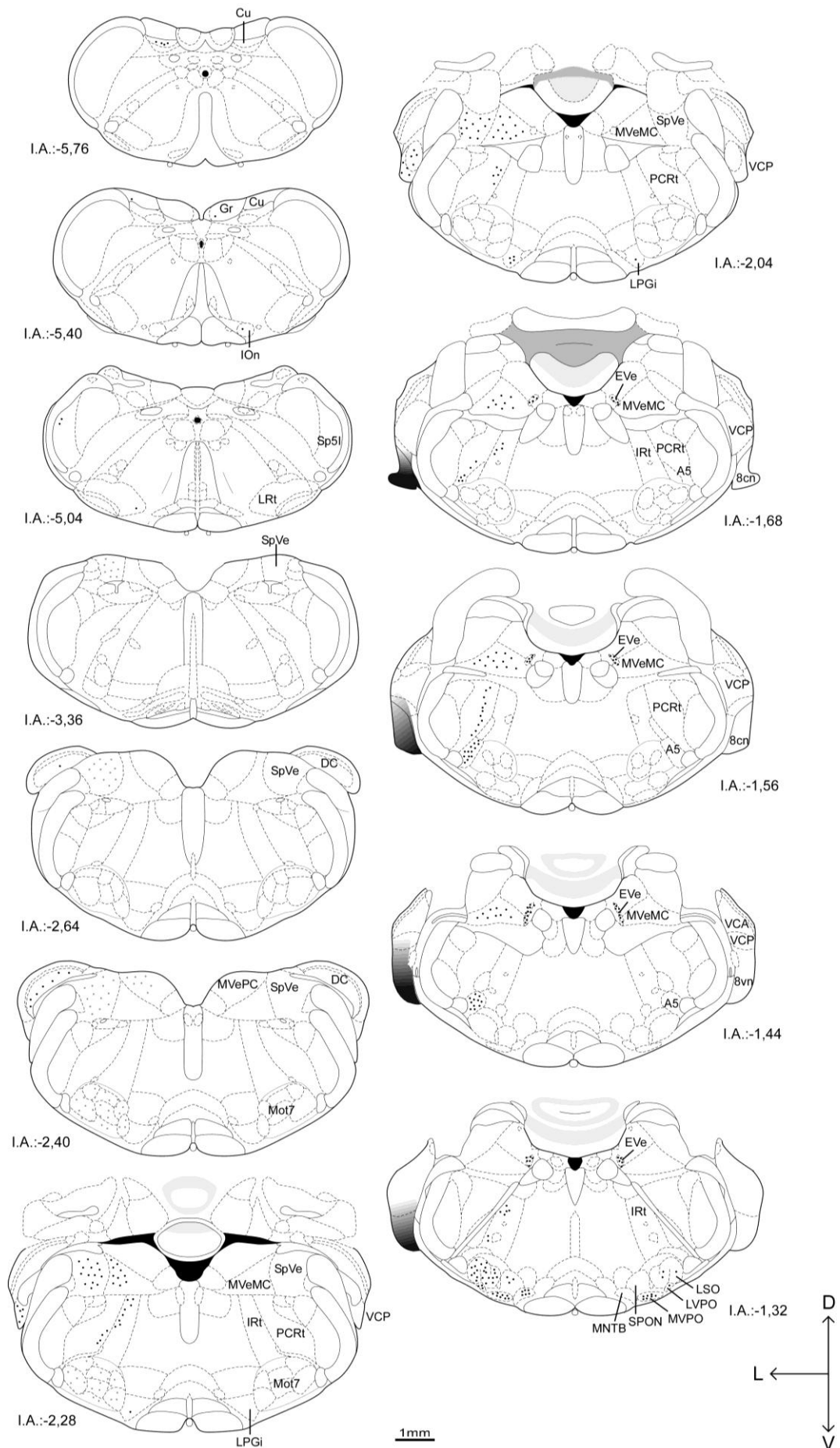
APÊNDICE 8 – Prancha de marcações do caso N30



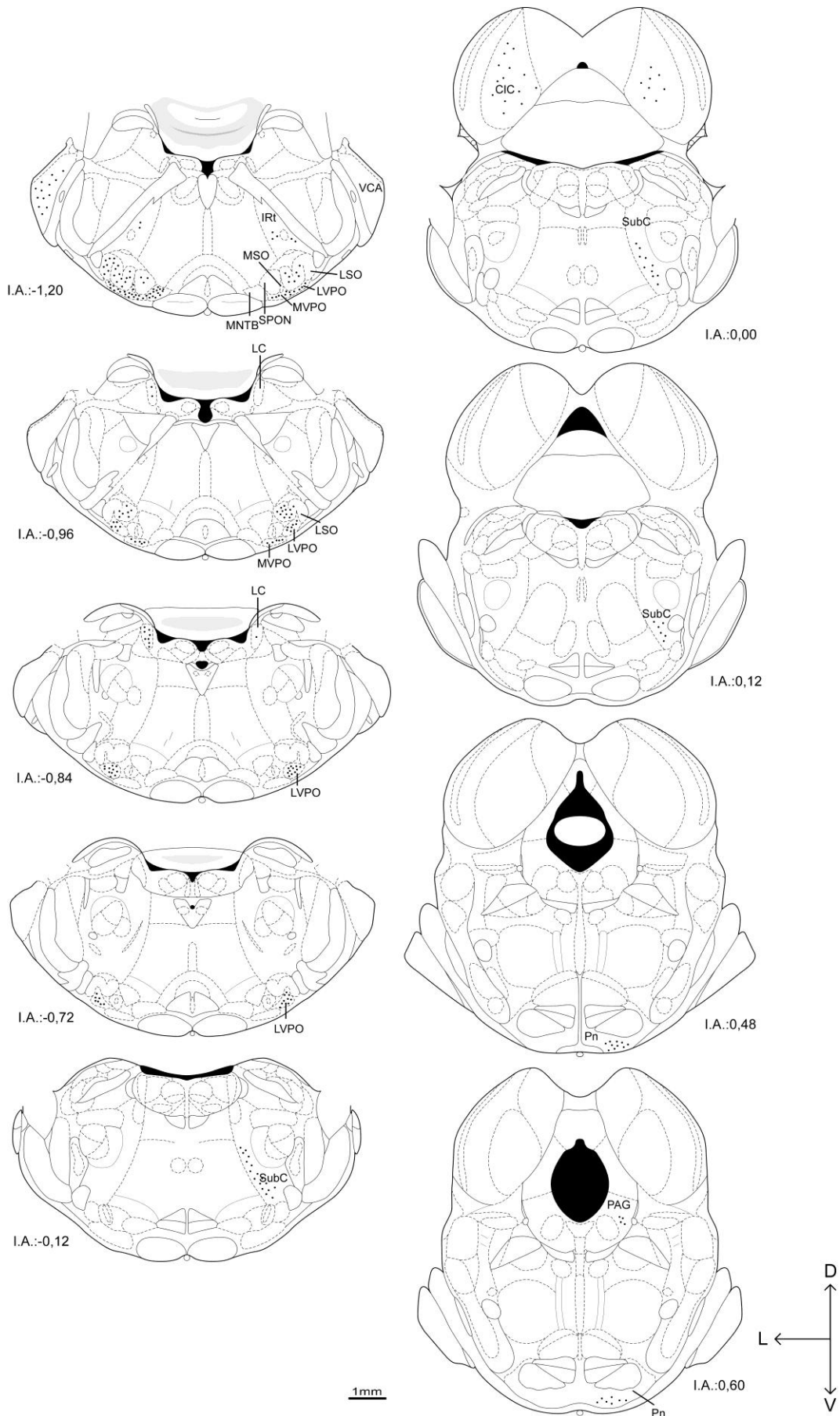
APÊNDICE 9 – Continuação da prancha de marcações do caso N30



APÊNDICE 10 – Prancha de marcações do caso N32



APÊNDICE 11 – Continuação da prancha de marcações do caso N32



APÊNDICE 12 –

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO NO EXTERIOR**

Aluna: **Nicole Orsi Barioni** (Estudante do curso de Ciências Biomédicas, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu - Brasil)

Orientador: **Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior** (Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu - Brasil)

Co-orientador: **Profa. Dra. Maria Dolores Estilita López García** (Instituto de Neurociências de Castilla y León, Universidade de Salamanca - Espanha)

Supervisor para estágio no exterior: **Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior**

Período: 27/fevereiro até 12/junho

Local: Laboratório de transtornos audiomotores do Instituto de Neurociências de Castilla y León (INCYL), Universidade de Salamanca – Espanha

Botucatu

2012

No período de março a junho de 2012 estive no laboratório da profa. Dra. Maria Dolores Estilita López García de Tanstornos Audiomotores do Instituto de Neurociências de Castilla y León (INCYL) da Universidade de Salamanca (USAL), na Espanha, realizando parte do meu estágio curricular obrigatório, relacionado ao projeto de pesquisa que desenvolvo no Laboratório de Neuromorfologia do Departamento de Anatomia do IBB – UNESP, em Botucatu, cujo título é “Estudo hodológico das aferências ao primeiro núcleo do circuito neural do reflexo auditivo de sobressalto: núcleo da raiz coclear”, sob supervisão do prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior, estando o mesmo projeto relacionado ao meu trabalho de conclusão de curso. Este intercâmbio foi possível devido ao convênio pré-existente entre a UNESP (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Brasil) e a USAL-INCYL firmado com o processo: AREX-UNESP 002132/06/01/2008 instrumento 0202/2012.

Durante este período tive a oportunidade de acompanhar alguns experimentos comportamentais, como a mensuração de aprendizagem através da evitação ativa, com a doutoranda Lymarie Millian Morell e a estimulação auditiva de hámsters GASH:Sal (derivados de uma cepa com epilepsia audiogênica) para o desencadeamento de crises epilépticas com a doutoranda Biviana Barrera Bailón.

Paralelamente desenvolvi, juntamente à profa. Dra. Maria Dolores Estilita López García e ao prof. Dr. Orlando Castellano, um projeto piloto de avaliação do efeito do estresse pré-natal entre 2 ratos da linhagem wistar adultos: um macho (07137) e uma fêmea (07146), através da quantificação da expressão de receptores de mineralocorticoides (MCR) na região do hipocampo. Estes receptores se encontram em grande quantidade nas regiões CA1 e CA2 do hipocampo (PRYCE, 2008) (Figura 1) e atuam na atividade neural, resposta ao estresse, adaptação e programação comportamental (MCEWEN, 1999; MCEWEN e SAPOLSKY, 1995). Após processamento dos cortes e análise das lâminas, observamos que havia uma maior quantidade de MCR nas regiões CA1 e CA2 do hipocampo do macho quando comparado ao da fêmea (Figura 2). A partir dos resultado obtidos e dos dados retirados da literatura, que mostram uma correlação positiva entre o nível de estresse e a expressão de MCR no hipocampo, acreditamos que as fêmeas sejam mais resistentes ao estresse pré-natal do que os machos<sup>1</sup>. Este projeto piloto culminou na padronização de um protocolo para revelação dos MCR, o qual está demonstrado no final deste documento.

---

<sup>1</sup> Estes são resultados preliminares de um estudo piloto. Para confirmação dos dados obtidos serão necessários mais experimentos com um número maior de animais submetidos às mesmas condições experimentais.

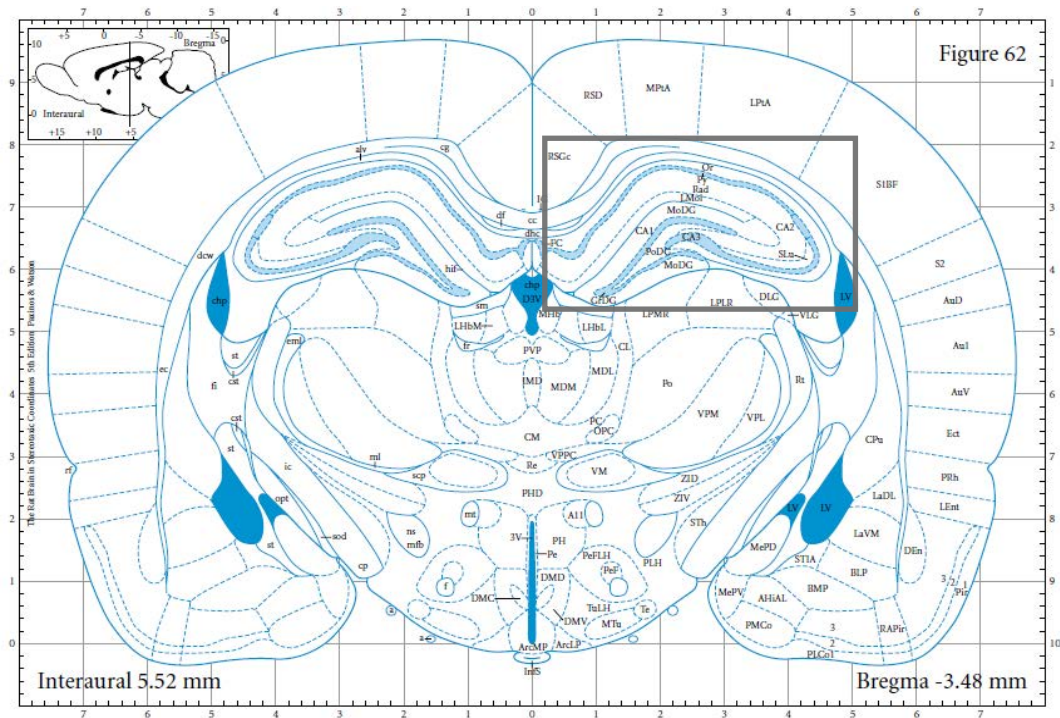


FIGURA 1 – Esquema do corte coronal do encéfalo do rato, extraído e modificado do atlas estereotáxico: The rat brain in stereotaxic coordinates (PAXINOS e WATSON, 2005), com a área destacada que demonstra o nível interaural da região do hipocampo observada.

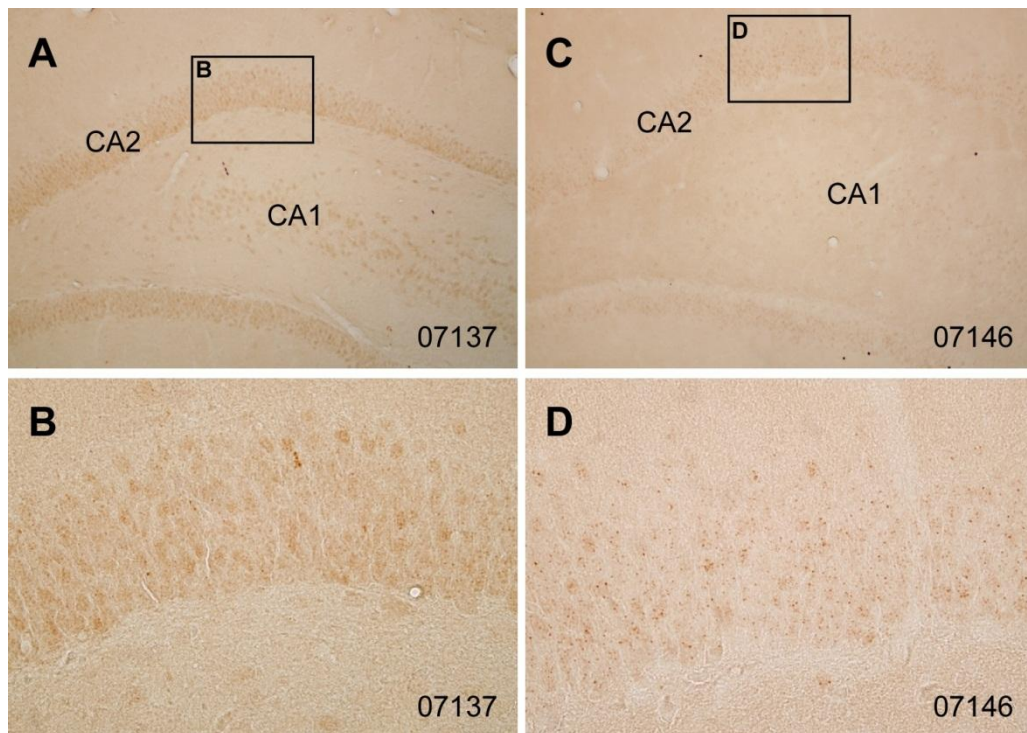


FIGURA 2 – Fotomicrografias da área demonstrada na Figura 1, dos casos 07137 e 07146. Em A, as regiões hipocâmpais CA1 e CA2 do caso 07137 em um aumento de 10x, com a área destacada em B, com aumento de 40x. Em C, as regiões hipocâmpais CA1 e CA2 do caso 07146 em um aumento de 10x, com a área destacada em D, com aumento de 40x.

Relacionado à linha de pesquisa da qual faço parte, além de aperfeiçoar as técnicas já conhecidas no laboratório de neuromorfologia do prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior, realizei técnicas de lesão estereotáxica no núcleo ventral do corpo trapezoide (VNTB). Este núcleo é um dos aferentes à raiz coclear (CR) e possui como identidade neuroquímica a acetilcolina (GOMEZ-NIETO et al., 2008) e por isso, embora não existam estudos comportamentais a respeito de aspectos funcionais desta conexão, parece ser uma via importante para uma das modulações do reflexo auditivo de sobressalto (RAS): a inibição por estímulo prévio (PPI) (KOCH, 1999), que conecta indiretamente os neurônios da raiz coclear (CRN) com o colículo inferior (IC), centro fundamental para esta modulação (FENDT et al., 2001; YEOMANS et al., 2006). Com isso, nosso objetivo foi coletar resultados preliminares sobre a avaliação funcional do papel das aferências provenientes do VNTB aos CRN por meio de provas comportamentais de mensuração do RAS e da PPI. Para tal, realizei, juntamente ao Prof. Dr. Richard Gomez-Nieto, experimentos piloto de lesão do VNTB através de injeções de 192 IgG-saporina, um neurotóxico seletivo para neurônios colinérgicos (BOTLY e DE ROSA, 2009), por pressão. Para tal, utilizamos 2 grupos experimentais: um control-sham, no qual foi injetado apenas BDA, e um grupo de lesão, no qual foi injetado BDA com 192 IgG-saporina, ambas as injeções realizadas bilateralmente. As duas cirurgias utilizaram das mesmas coordenadas retiradas do atlas estereotáxico do cérebro do rato (PAXINOS e WATSON, 2005): no eixo ântero-posterior, 0,7mm caudal em relação à linha interaural; no eixo látero-lateral, 1,8mm em direção ao lado esquerdo e ao lado direito; no eixo dorsoventral, 0,2mm inferiormente à linha interaural, e ângulo de 20° em direção caudal. A concentração de BDA utilizada nos casos control-sham (L12060 e L12073) foi de 10% em água bidestilada e a concentração de saporina injetada com o BDA 10% no caso de lesão (L12072) em cada um dos núcleos foi de 0,2ug/ul a uma velocidade de 0,1ul/min por 3min (BOTLY e DE ROSA, 2009)

Além disso, realizamos análises comportamentais dos animais através da mensuração do RAS e da PPI 1 dia antes e 14 dias depois do procedimento cirúrgico, para avaliação da integridade da via auditiva e avaliação qualitativa das lesões. Após a última mensuração auditiva os animais foram perfundidos com uma solução contendo 4% de paraformaldeído, 0,125% de glutaraldeído e PB a 0,06M, o cérebro retirado do crânio e cortado em secções de 40um divididas em 10 séries. Todas as séries foram processadas imunohistoquimicamente para revelação de BDA e calbindina, no intuito de ver as posições sinápticas entre os axônios do VNTB e os CRN, dado que estes são ricos nesta proteína ligadora de cálcio (LÓPEZ et al., 1993).

Após o processamento dos cortes e análise dos resultados morfológicos e comportamentais (gráficos 1 e 2), verificamos que o sitio de injeção dos dois grupos se localizou na parte mais dorsal do VNTB, contaminando grande parte do núcleo reticular caudal da ponte (PnC).

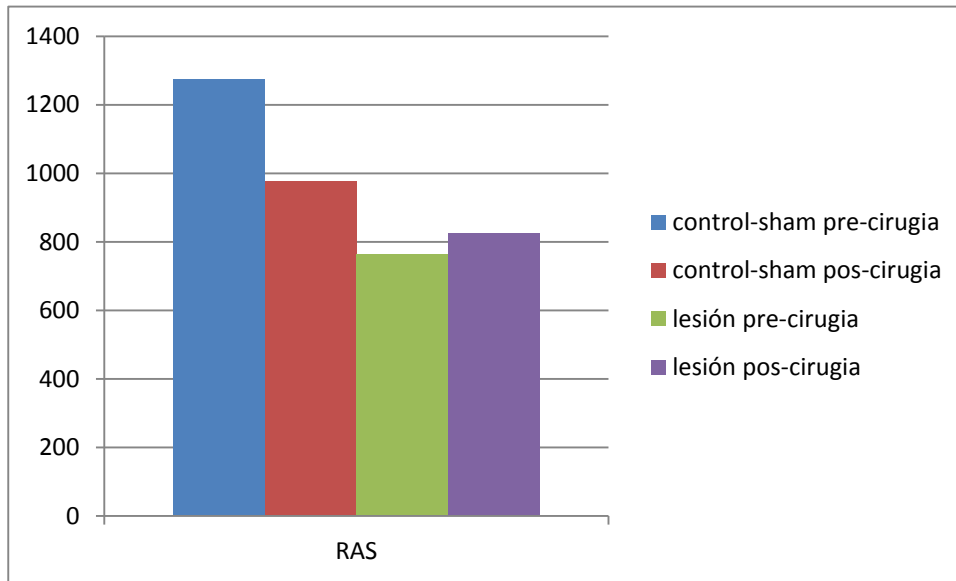


Tabela 1 – Resultado da avaliação do RAS nos grupos control-sham (azul e vermelho) e lesão (verde e roxo) antes e depois da cirurgia.

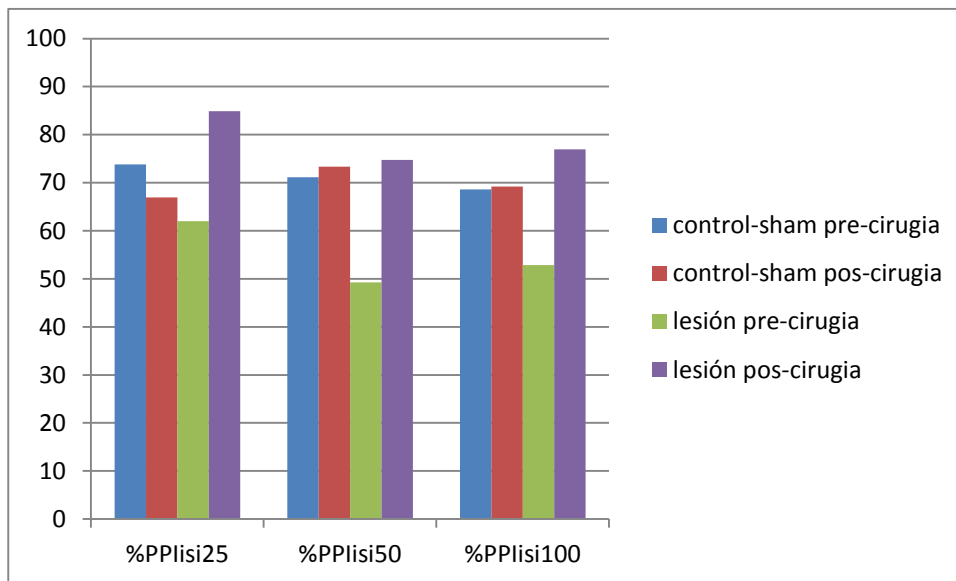


Tabela 2 – Resultado da avaliação da PPI com intervalos entre estímulos de 25ms, 50ms e 100ms nos grupos control-sham (azul e vermelho) e lesão (verde e roxo) antes e depois da cirurgia.

É possível observar nestas tabelas que os valores mensurados do RAS não apresentaram uma grande diferença entre os animais de um mesmo grupo antes e depois da cirurgia, enquanto que a PPI dentro do grupo lesionado aumentou por volta de 25% após a cirurgia. A partir dos resultados obtidos, é possível supor que a saporina tenha lesionado os receptores muscarínicos do PnC (FENDT

e KOCH, 1999) e com isso aumentou a PPI. Portanto, a acetilcolina deve ter um papel modulador no sentido de facilitar o reflexo sobre os neurônios do PnC, uma vez que a PPI aumentou após a injeção do neurotóxico.

Além dos experimentos realizados em laboratório, aprendi técnicas de manuseio do programa Neurolúcida, para fazer reconstruções 3D e mosaicos. Particpei dos seminários científicos que ocorriam às sextas-feiras no instituto e do curso oferecido pela Universidade de Connecticut com a colaboração de professores do próprio INCYL: Neurobiology Hearing Course (Quadro 1). Também tive a oportunidade de assistir algumas aulas do mestrado em Neurociências oferecido pela Faculdade de Medicina da Universidade de Salamanca.

Este estágio foi de grande proveito para minha formação pessoal e profissional. Em Salamanca tive o privilégio de conhecer grandes profissionais da área e de aprender muito com eles. Adquiri um vasto conhecimento e ampliei minha visão sobre as neurociências. Somado a isso, o ambiente cultural e as pessoas com as quais me relacionei, fizeram deste período uma experiência ímpar.

MON	21/05/12	Course Introduction Auditory pathway overview	Dr. Oliver Dr. Malmierca
TUES	22/05/12	Sound and Cochlear Function Hair cell mechanotransduction	Dr. Fuchs Dr. Fuchs
WED	23/05/12	Afferent synaptic signaling Efferent inhibition of the cochlea	Dr. Fuchs Dr. Fuchs
THURS	24/05/12	Neuroanatomical Methods Physiology Methods	Dr. Saldaña Dr. Oliver
MON	28/05/12	Acousticomotor reflexes Eight nerve, root nucleus	Dr. DE López Dr. DE López
TUES	29/05/12	Cochlear nucleus/nerve	Dr. Nell Cant
WED	30/05/12	Cochlear nucleus	Dr. Nell Cant
THURS	31/05/12	SOC Anatomy IC Anatomy	Dr. Oliver Dr. Oliver
MON	04/06/12	Frequency selectivity, masking and the critical band	Dr. Lopez-Poveda
TUES	05/06/12	The perception of loudness Biologically Inspired Speech Processors for Auditory Prostheses	Dr. Lopez-Poveda Dr. Lopez-Poveda
WED	06/06/12	IC Physiology	Dr. Tom CT Yin
THURS	07/06/12	IC Physiology	Dr. Tom CT Yin

Quadro 1 – programação do curso Neurobiology Hearing Course promovido pela Universidade de Connecticut em colaboração com o INCYL

**PROTOCOLO IMUNOISTOQUÍMICA MINERALOCORTICOIDES****Casos y posillos:**

- PB (tampón fosfato) 0,1 M pH 8,0 .....2 X 10 min. en agitación.

PB se prepara a partir de la solución stock 0,4M. Diluir 1 parte de PB 0,4M en 3 partes de H<sub>2</sub>O destilada.

- TBS (sin tritón) 0,05 M pH 8,0 .....3 X 10 min. en agitación.

TBS se prepara diluyendo 1 parte de la solución stock 10X em 9 partes de H<sub>2</sub>O destilada o:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> PM 121,1).....6,06 gr

- NaCl.....8,85 gr

- H<sub>2</sub>O dest.....q.s.p. 1000 ml

\*Ajustar o pH hasta 8,0

- Anticuerpo primário rabbit anti-MCR 1:100.....72 horas à 4 °C en agitación.

Diluir el AC1º [1/1] en TBS (sin tritón) 0,05 M pH 8,0 y añadir 1% FCS. Agitar.

\*MCR (H-300) sc-11412, lot #D0110, rabbit policlonal IgG, Santa Cruz Biotechnology.

| TBS:

| suero:

| AC1º:

- TBS (sin tritón) 0,05 M pH 8,0.....3 X 10 min. en agitación.

- Anticuerpo secundário goat anti-rabbit 1:200 .....120 min. temp. ambiente en agitación.

Diluir el AC2º que esta a una concentración de 1/1 en TBS 0,05 M pH 7,6, 0,3% Tritón-Tx. Agitar.

\*Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) made in goat (BA-1000), lot X0212, VECTOR

| TBS:

| tritón:

| AC2º:

- TBS (sin tritón) 0,05 M pH 8,0.....3 X 10 min. en agitación.

- Incubación en ABC (Vector - Vectastain Standart Kit PK4000)..... 120 min. à temp. amb.

O una noche à 4 °C, em agitación.

Solución de incubación ABC Kit:

a) 10 ml TBS-Tx (triton a 0,3%) 0,05 M pH 8,0 + 2 gotas solución A (naranja)

b) Agitar bien

c) Añadir 2 gotas solución B (marrón)

d) Agitar bien y esperar 30 minutos a que el complejo se forme y pueda usarse.

- TBS (sin tritón) 0,05 M pH 8,0.....2 X 10 min. en agitación.

- Tris-HCl 0,05 M pH 8,0.....3 X 10 min. en agitación.

Tris-HCl se prepara:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> PM 121,1).....6,06 gr

- H<sub>2</sub>O dest. ....q.s.p. 1000 ml

Ajustar el pH con solución de HCl hasta 7,6

- Revelación con DAB (sin níquel) .....en baja agitación y control visual en microscópio.

|

- Tris-HCl 0,05 M pH 8,0.....3 X 10 min. en agitación.

Guardar em nevera.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOTLY, L. C.; DE ROSA, E. Cholinergic deafferentation of the neocortex using 192 igg-saporin impairs feature binding in rats. **J Neurosci**, v. 29, p. 4120-30, 2009.
- FENDT, M.; KOCH, M. Cholinergic modulation of the acoustic startle response in the caudal pontine reticular nucleus of the rat. **Eur J Pharmacol**, v. 370, p. 101-7, 1999.
- FENDT, M.; LI, L.; YEOMANS, J. S. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 156, p. 216-24, 2001.
- GOMEZ-NIETO, R.; RUBIO, M. E.; LOPEZ, D. E. Cholinergic input from the ventral nucleus of the trapezoid body to cochlear root neurons in rats. **J Comp Neurol**, v. 506, p. 452-68, 2008.
- KOCH, M. The neurobiology of startle. **Prog Neurobiol**, v. 59, p. 107-28, 1999.
- LÓPEZ, D. E. et al. The cochlear root neurons in the rat, mouse and gerbil. In: MERCHÁN, M. A. **The mammalian cochlear nuclei: Organization and function**. New York: Plenum Press, 1993. 291-301.
- MCEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. **Annu Rev Neurosci**, v. 22, p. 105-22, 1999.
- MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Curr Opin Neurobiol**, v. 5, p. 205-16, 1995.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates: The new coronal set - 161 diagrams**. San Diego: Academic Press, 2005.
- PRYCE, C. R. Postnatal ontogeny of expression of the corticosteroid receptor genes in mammalian brains: Inter-species and intra-species differences. **Brain Res Rev**, v. 57, p. 596-605, 2008.
- YEOMANS, J. S. et al. Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rat. **Neuroscience**, v. 142, p. 921-9, 2006.