



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



ESTUDO COMPORTAMENTAL DAS AFERÊNCIAS DO NÚCLEO VENTRAL DO CORPO TRAPEZÓIDE AO PRIMEIRO NÚCLEO DO CIRCUITO NEURAL DO REFLEXO AUDITIVO DE SOBRESSALTO: NÚCLEO DA RAIZ COCLEAR

NICOLE ORSI BARIONI

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

José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

**BOTUCATU – SP
2015**



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**ESTUDO COMPORTAMENTAL DAS AFERÊNCIAS DO
NÚCLEO VENTRAL DO CORPO TRAPEZÓIDE AO PRIMEIRO
NÚCLEO DO CIRCUITO NEURAL DO REFLEXO AUDITIVO DE
SOBRESSALTO: NÚCLEO DA RAIZ COCLEAR**

NICOLE ORSI BARIONI

JOSÉ DE ANCHIETA DE CASTRO E HORTA JÚNIOR

RICARDO GÓMEZ NIETO

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

**BOTUCATU – SP
2015**

NICOLE ORSI BARIONI

**ESTUDO COMPORTAMENTAL DAS AFERÊNCIAS DO
NÚCLEO VENTRAL DO CORPO TRAPEZÓIDE AO PRIMEIRO
NÚCLEO DO CIRCUITO NEURAL DO REFLEXO AUDITIVO DE
SOBRESSALTO: NÚCLEO DA RAIZ COCLEAR**

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

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

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Gómez Nieto

Comissão Examinadora:

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

Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu

Profª. Drª. Luciane Valeria Sita

Instituto de Ciências Biomédicas – USP/São Paulo

Profª. Drª. Mirela Barros Dias

Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu

Botucatu, 31 de julho de 2015

DEDICATÓRIA

À minha vó Concha (in memorian), que infelizmente não pode estar presente neste momento de grande conquista da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Thelma e Edson, pela dedicação e confiança em mim, pelo apoio em minhas decisões e pela oportunidade em realizar meus sonhos. Por acreditarem em quem eu sou e quem eu posso ser, por sempre me incentivarem e me motivarem a ir mais longe.

Ao meu namorado, Felipe, por todo carinho e compreensão. Pelo apoio, pela força e pela coragem. Por estar sempre ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis desta jornada.

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. Agradeço também ao meu co-orientador, Ricardo Gómez Nieto do Instituto de Neurociências de Castilla y León, Espanha, pelas orientações valiosas durante minhas estadias em Salamanca, e pelo qual tive o prazer de ser co-orientada durante meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Sérgio Augusto Rodrigues FATEC e Professor Titular Carlos Roberto Padovani do Depto pelo auxílio e colaboração na análise estatística dos dados deste trabalho.

Agradeço aos meus grandes amigos e companheiros de bancada, Rian e André, os quais proporcionaram muitos momentos de descontração, que me fizeram passar por épocas difíceis do mestrado e os quais nunca hesitaram em me ajudar em meus experimentos, e por isto sou muito grata, pois sem eles este trabalho não teria êxito. Agradeço também à Fernanda, que além de minha companheira científica, a qual me ajudou no início de mestrado, é também minha amiga para toda vida. Também agradeço à Thaís, que apesar de pouco tempo de convivência no laboratório, já se tornou uma grande amiga.

Às minhas colegas do Laboratório de Neuromorfologia do Departamento de Anatomia IBB – UNESP, Carla e Marina, as quais criaram um ambiente saudável e agradável no laboratório.

Agradeço também à Profa. Dra. Maria Dolores Estilita López García pela oportunidade que me foi concedida para realização de parte de meu mestrado em seu Laboratório de Transtornos Audiomotores do Instituto de Neurociências de Castilla y León em Salamanca, na Espanha. Fico muito agradecida aos colaboradores deste laboratório que me auxiliaram e acolheram durante todos os momentos em que estive na Espanha: Sonia, David, Lymarie, Orlando e Consuelo.

Ao Departamento de Anatomia, onde realizei meu mestrado, 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, a CAPES e a FAPESP (processo 2013/25737-6) pelo apoio financeiro durante meu mestrado. Ao Instituto de Biociências 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

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

Sumário

Resumo	8
Abstract.....	9
Lista de abreviaturas	10
Lista de Figuras e Quadros	11
Introdução	14
Objetivos.....	21
Materiais e Métodos.....	21
Animais de experimentação	21
Estudo da distribuição dos neurônios do VNTB que são aferentes aos CRN	22
Morfometria dos neurônios do VNTB aferentes aos CRN	23
Distribuição dos neurônios do VNTB aferentes aos CRN	24
Avaliação do efeito no RAS e na PPI de lesões seletivas no VNTB	24
Forma de análise dos resultados.....	28
Resultados.....	30
Estudo da distribuição dos neurônios retrogradamente marcados no VNTB após injeção de FG na raiz coclear	30
Efeito no RAS e na PPI de lesões seletivas no VNTB	36
Análise das lesões no OCB	36
Análise das lesões no VNTB	40
Análise dos neurônios imunorreativos para FOS em núcleos da via auditiva.....	46
Avaliação comportamental do RAS e da PPI	49
Discussão	52
Conclusões.....	57
Bibliografia	58
Apêndices	63
APÊNDICE A – Protocolo de imuno-histoquímica e evidenciação do FG	64
APÊNDICE B – Protocolo para técnica de Nissl.....	66
APÊNDICE C - Protocolo de imuno-histoquímica para proteína FOS	67
APÊNDICE D - Protocolo de imuno-histoquímica para enzima colina acetiltransferase (ChAT)	69
APÊNDICE E – Protocolo de mensuração da área e contagem de células imunorreativas para a proteína Fos71	71
APÊNDICE F – Protocolo de Morfometria	73
APÊNDICE G - Lesões do OCB nos casos experimentais do grupo SHAM	74
APÊNDICE H – Lesões do OCB e do VNTB nos casos experimentais do grupo LESÃO	78
APÊNDICE I – Análise da área e contagem de células imunorreativas a FOS de 3 casos de cada grupo experimental.....	87

Resumo

Os neurônios da raiz coclear (CRN) são os primeiros neurônios do sistema nervoso central a receber a informação auditiva e conectam-se com centros de integração sensoriomotora do tronco encefálico, como o núcleo reticular caudal da ponte. Os CRN estão envolvidos no circuito elementar do reflexo auditivo de sobressalto (RAS) juntamente com os neurônios do gânglio espiral, o núcleo reticular caudal da ponte e os motoneurônios da medula espinal. O RAS apresenta uma série de modulações como a habituação, a sensibilização, a potenciação por um estímulo adverso e a inibição por estímulo prévio (PPI). As modulações do RAS ocorrem mediante a influência de diversos núcleos sobre os componentes do circuito elementar deste reflexo e possuem valor diagnóstico na clínica médica de enfermidades neurodegenerativas e psiquiátricas como Parkinson e esquizofrenia. O núcleo da raiz coclear é o menos estudado do circuito neural do RAS. Pouco se conhece sobre as origens das aferências aos CRN e a identidade neuroquímica das mesmas. Recentemente foi descrita uma nova fonte de aferências aos neurônios da raiz coclear, de natureza colinérgica e proveniente do núcleo ventral do corpo trapezóide (VNTB). Os neurônios deste núcleo recebem informação auditiva diretamente do colículo inferior que faz parte da via auditiva e também participa do circuito neuronal responsável por mediar a PPI. Acredita-se que o colículo inferior possa mediar a PPI também ao nível do núcleo da raiz coclear via a conexão com o VNTB, o que constituiria uma via descentente curta, com participação na PPI com intervalos interestímulo curtos. Contudo, não existem estudos a respeito de aspectos funcionais desta conexão. Neste trabalho estudamos o papel da projeção colinérgica proveniente do VNTB através da lesão seletiva deste núcleo e avaliação comportamental do RAS e da PPI. Para isto realizamos 3 grupos experimentais: Controle (n=6, sem qualquer tipo de lesão), Sham (n=11, com lesão no feixe olivococlear (OCB)) e Lesão (n=9, com lesão no OCB e no VNTB). Inicialmente foram mapeados os neurônios do VNTB não olivococleares, retrogradamente marcados após a injeção do neurotraçador retógrado Fluoro-Gold na raiz coclear de 3 ratos Wistar, para determinação de coordenadas estereotáxicas que foram utilizadas nos experimentos de lesão. Para lesionar o OCB foram realizadas lesões eletrolíticas bilaterais e para lesionar o VNTB injetamos bilateralmente a droga imunotóxica seletiva para neurônios colinérgicos, anti-ChAT-Saporina. Todos os grupos passaram por provas de avaliação comportamental no início do experimento e decorridos 7, 14, e 21 dias. Após este período, os animais foram perfundidos e os encéfalos coletados para análise morfológica. A análise estatística indicou que nos grupos Controle e Sham, nos quais o VNTB estava íntegro, os valores de %PPI aumentaram entre os momentos pré-lesão e 21 dias pós-lesão, sendo a diferença estatisticamente significativa no intervalo interestímulo (ISI) de 50ms. Isto não ocorreu no grupo Lesão, sugerindo que o VNTB exerça um papel inibitório relacionado a PPI mediada por uma via curta.

Palavras chave: acetilcolina, proteína FOS, neurônios da raiz coclear, núcleo ventral do corpo trapezóide, lesão neurotóxica, feixe olivococlear

Abstract

The cochlear root neurons (CRN) are the first in the central nervous system to receive the acoustic information. They are in connection with sensory integration centers in the brainstem, particularly the pontine caudal nucleus. The CRN are related with the fundamental neural circuit of the acoustic startle reflex, together with the spiral ganglion neurons, the pontine reticular nucleus and the spinal cord motoneurons. The acoustic startle reflex shows various modulations such as habituation, sensitization, fear potentiation and prepulse inhibition. The modulations of the acoustic startle reflex are important in clinical diagnostics of psychiatric and neurodegenerative illnesses such as schizophrenia and Parkinson's disease. Startle modulations are promoted by influences from several nuclei on the fundamental neural circuit of the startle reflex. The cochlear root nucleus is the least studied nucleus of this circuit. The origins of the afferents to cochlear root neurons and its neurochemical identity remain unclear. Recently was described a new source of afferents to cochlear root neurons, cholinergic and coming from the ventral nucleus of the trapezoid body (VNTB). The neurons of this nucleus receive auditory information directly from the inferior colliculus which take part of the auditory pathway and also participates in the neural circuitry responsible for mediating the prepulse inhibition. Therefore, the inferior colliculus may mediate the prepulse inhibition at the cochlear root level via ventral nucleus of the trapezoid body connection, which would be a short and low latency pathway. However, there are no studies on functional aspects of this connection. We intend to study the role of cholinergic projections from the ventral nucleus of the trapezoid body by selective lesion of this nucleus and behavioral assessment of auditory startle reflex and prepulse inhibition. To achieve the purpose we proposed 3 experimental groups: Control (n=6, without any experimental approach), Sham (n=11, with olivocochlear bundle (OCB) lesion) and Lesion (n=9, with OCB and VNTB lesion). Initially the non olivocochlear neurons retrogradely labeled within the VNTB were mapped after the injection of the retrograde neurotracer Fluoro-Gold in the cochlear root of 3 Wistar rats, to determine the stereotaxic coordinates that were used in the lesion experiments. It was used an electrolytic approach to lesion the OCB bilaterally and an injection of the selective immunotoxic drug anti-ChAT-Saporin to lesion the cholinergic neurons within the VNTB bilaterally. All animals were submitted to behavioral evaluation at the beginning of experiments and after 7, 14 and 21 days. After this period, the animals were perfused and the brains were collected to the morphological analysis. The statistical analysis showed that in the Control and Sham group, in which the VNTB was untouched, the %PPI values had risen between the pre-lesion and the 21 days after lesion moments, being statistically significant in the interstimulus intervals (ISI) of 50ms. This did not happen in the Lesion group, suggesting that the VNTB plays an inhibitory role related to the PPI mediated by short pathways.

Keywords: acetylcholine, FOS protein, cochlear root neurons, ventral nucleus of the trapezoid body, neurotoxic lesion, olivocochlear bundle

Lista de abreviaturas

4V	4º ventrículo	min	Minutos
5n	Nervo do trigêmio	Me5	Núcleo mesencefálico do trigêmio
7n	Nervo facial	mm	Milímetro
10N	Núcleo do nervo vago	MOC	Sistema olivococlear medial
μA	Microampéres	Mot5	Núcleo motor do nervo trigêmio
μl	Microlitro	Mot7	Núcleo motor do nervo facial
μm	Micrometro	MVPO	Núcleo periolivar médio-ventral
μg	Micrograma	ms	Milisegundo
ABC	Complexo avidina biotina peroxidase	MSO	Oliva superior medial
BDA	Dextrano biotilado	MNTB	Núcleo medial do corpo trapezóide
°C	Graus centígrados	NaCl	Cloreto de sódio
ChAT	Enzima colina acetiltransferase	nm	Nanômetro
CIC	Núcleo central do colículo inferior	nl	Nanolitro
Cm	Centímetro	OCB	Feixe olivococlear
CN	Núcleos cocleares	OHC	Células ciliadas externas
CR	Raiz coclear	PnC	Núcleo reticular caudal da ponte
CRN	Neurônios da raiz coclear	PnO	Núcleo reticular oral da ponte
CY2	CY2 bis-NHS ester	PPI	Inibição por estímulo prévio
CY3	CY3 bis-NHS ester	PPTg	Núcleo pedúnculo pontino tegmental
DAB	3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloreto	py	Trato piramidal
DAB-Ni	DAB reforçado com níquel amônio sulfato	RAS	Reflexo auditivo de sobressalto
dB	Decibel	RTTg	Núcleo reticular tegmental
DC	Núcleo coclear dorsal	SC	Colículo superior
FG	Fluoro-Gold	Sp5	Núcleo espinal do trigêmio
FOS	Proteína fos	sp5	Trato espinal do trigêmio
g	Gramma	SPON	Núcleo paraolivar superior
g7	Joelho do nervo facial	SPL	Sound pressure level
Gi	Núcleo gigantocelular	SOC	Complexo olivar superior
h	Horas	tz	Corpo trapezoide
HRP	Peroxidase do rábano-silvestre (raiz-forte)	VCA	Núcleo coclear ventral anterior
Hz	Hertz	VCN	Núcleo coclear ventral
I.A.	Nível interaural	VCP	Núcleo coclear ventral posterior
IC	Colículo inferior	VLtg	Núcleo tegmental ventrolateral
ICP	Pedúnculo do colículo inferior	VNTB	Núcleo ventral do corpo trapezoide
IHC	Células ciliadas internas	VTz	Núcleo ventral do trapezóide
ISI	Intervalo entre estímulos		
kHz	Quilohertz		
LOC	Sistema olivococlear lateral		
LSO	Oliva superior lateral		
LVPO	Núcleo periolivar latero-ventral		
M	Molar		
mg	Miligrama		

Lista de Figuras e Quadros

FIGURA 1 – Fotografia macroscópica do encéfalo do rato. O círculo vermelho indica a localização da raiz do nervo vestibulococlear. Em A, vista ventral. Em B, vista lateral.....	14
FIGURA 2 – Raiz coclear e os CRN.....	15
FIGURA 3 – Esquema das eferências dos CRN	16
FIGURA 4 – Representação esquemática do circuito do RAS.	16
FIGURA 5 – Representação esquemática do RAS desencadeado por estímulo acústico de alta intensidade em um rato.....	17
FIGURA 6 – Representação esquemática do Sistema Olivococlear no rato.....	20
FIGURA 7 – Morfometria utilizando programa ImageJ.....	23
FIGURA 8 - Comparação entre as barras auriculares para ratos e para gatos.	26
QUADRO 1. Características do pré-pulso, pulso e intervalo entre os estímulos em cada um dos blocos da sessão de avaliação comportamental do RAS e da PPI.	27
FIGURA 9 – Locais de injeção de FG na CR (casos N13, N15, N17, N18).....	32
FIGURA 10 – Locais de injeção de FG na raiz coclear (casos N15, N18 e N25).....	32
FIGURA 11 – Resultados da morfometria realizada em 260 neurônios do VNTB marcados retrogradamente após injeção de FG na raiz coclear em 3 casos experimentais.	33
FIGURA 12 – Localização de neurônios marcados retrogradamente após injeções de fluorogold na raiz coclear. ...	34
FIGURA 13 -Gráfico de dispersão que representa a distribuição de neurônios retrogradamente marcados em todos os casos estudados, com relação ao nível interaural, o tamanho e o lado do neurônio.	34
FIGURA 14 - Esquemas de cortes coronais do tronco encefálico ao nível do complexo olivar superior (SOC) no caso N15, nos quais foram representados os neurônios retrogradamente marcados com FG no VNTB, após injeção na raiz coclear.	35
FIGURA 15 - Imagens da reconstrução tridimensional dos núcleos do SOC e dos neurônios do VNTB marcados retrogradamente após injeção de Fluorogold no caso N15.....	36
FIGURA 16 – Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos do grupo controle após imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl.	37
FIGURA 17 – Fotomicrografias de cortes coronais de um caso controle (A e B) e de um caso em que foi realizada a lesão no OCB (C e D).....	38
QUADRO 2. Quadro sinóptico da análise morfológica das lesões no OCB, nos casos experimentais do grupo Sham.	39
QUADRO 3. Quadro sinóptico da análise morfométrica das lesões no OCB nos casos experimentais do grupo Sham e Lesão.....	41
FIGURA 18 – Fotomicrografias de cortes coronais de um caso controle (A, B, E e F) e de um caso do grupo Lesão (C, D, G e H) nos quais foi realizada lesão no OCB e no VNTB.....	42
QUADRO 4. Quadro sinóptico da análise morfológica das lesões bilaterais no OCB e no VNTB nos casos experimentais do grupo Lesão.	43
FIGURA 19 – Fotomicrografias de cortes coronais da raiz coclear após imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pela técnica de Nissl em animal do grupo Sham.....	44
FIGURA 20 – Fotomicrografias de cortes coronais da raiz coclear após imuno-histoquímica para ChAT contracolorados pelo método de Nissl em animal do grupo Lesão.....	44

QUADRO 5. Quadro sinóptico da análise morfométrica das lesões no VNTB nos casos experimentais do grupo Lesão.....	45
QUADRO 6. Quadro sinóptico da densidade média de neurônios imunorreativos a FOS no IC e nos CN dos grupos Lesão, Sham e Controle.....	46
FIGURA 21 – Fotomicrografias de cortes coronais dos CN de um caso experimental controle após imuno-histoquímica para FOS evidenciando as áreas que foram analisadas de cada grupo.....	47
FIGURA 22 – Fotomicrografias de cortes coronais do CI de um caso experimental controle após imuno-histoquímica para FOS evidenciando as áreas que foram analisadas de cada grupo.....	48
FIGURA 23 - Gráficos de densidade de neurônios imunorreativos a FOS nos CN e no IC.....	49
TABELA 1: Análise do peso dos animais nos momentos pré-lesão (inicial), 7, 14 e 21 dias.....	49
TABELA 2: Análise da amplitude média do RAS nos momentos pré-lesão (inicial), 7, 14 e 21 dias.....	50
TABELA 3: Análise da %PPI global nos momentos pré-lesão, 7, 14 e 21 dias.....	50
TABELA 4: Análise das %PPI nos diferentes ISIs entre os momentos pré-lesão, 7, 14 e 21 dias.....	51
FIGURA 24 – Esquema das projeções do VNTB descritas até o momento.....	52
FIGURA 25 – Diferentes vias propostas para subsidiar o RAS (azul) e a PPI com participação do VNTB e suas projeções (vermelho).....	54
FIGURA 26 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de três casos do grupo Sham evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros.....	74
FIGURA 27 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de três casos do grupo Sham evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros.....	75
FIGURA 28 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de três casos do grupo Sham evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros.....	76
FIGURA 29 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de três casos do grupo Sham evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros.....	77
FIGURA 30 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N386 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F).....	78
FIGURA 31 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N390 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F). O.....	79
FIGURA 32 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N428 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F).....	80
FIGURA 33 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N429 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F).....	81
FIGURA 34 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N430 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F).....	82

FIGURA 35 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N440 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F).....	83
FIGURA 36 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N457 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F).....	84
FIGURA 37 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N459 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F).....	85
FIGURA 38 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N469 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F).....	86

Introdução

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

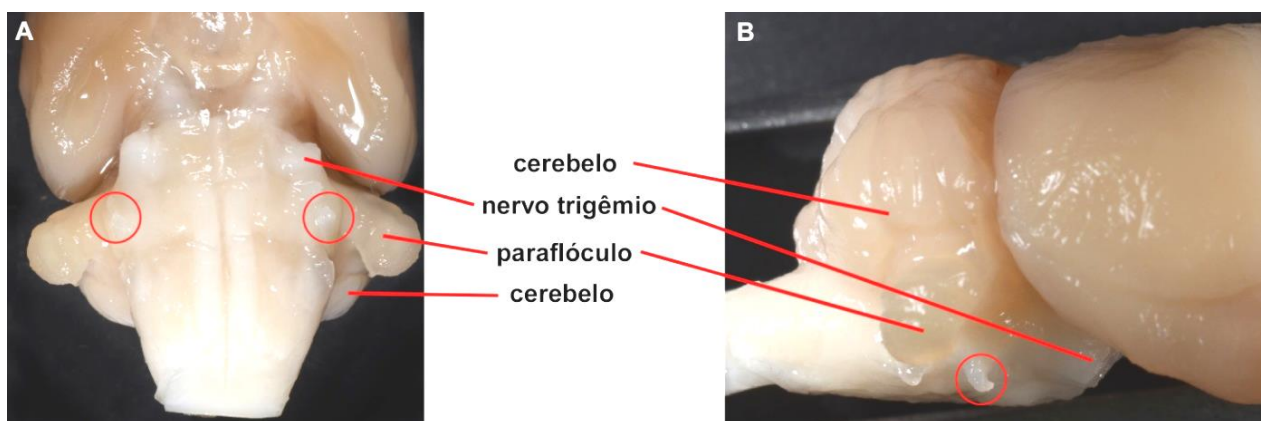


FIGURA 1 – Fotografia macroscópica do encéfalo do rato. O círculo vermelho indica a localização da raiz do nervo vestibulococlear. Em A, vista ventral. Em B, vista lateral.

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 and Stromberg 1976). Além disso, também é constituído de fibras eferentes oriundas do complexo olivar superior (SOC) que formam o feixe olivococlear (OCB) (Guinan, Warr et al. 1983, White and Warr 1983, Vetter and Mugnaini 1992, Warr 1992).

No rato, como em outros mamíferos, as fibras nervosas do nervo coclear terminam no complexo nuclear coclear (Lorente de Nó 1933) e estão organizadas em um padrão tonotópico. Cada fibra bifurca-se 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 and 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 nervo vestibulococlear (Merchán, Collia et al. 1988). Nela está situado um grupo de aproximadamente cinquenta células (de 30 a 38 μm de diâmetro) de cada lado (Figura 2), facilmente identificadas em secções histológicas do tronco encefálico de roedores e marsupiais (López, Merchán et al. 1993, Aitkin 1995, Aitkin 1996), 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, Warr et al. 1962, Osen, López et al. 1991).

Cada CRN recebe aferências de uma grande quantidade de colaterais provenientes de fibras nervosas de praticamente toda extensão do órgão de Corti (Osen, López 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, Collia et al. 1988). Os dendritos perpendiculares são especialmente extensos e cruzam transversalmente praticamente toda CR, o que permite que os CRN 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, López et al. 2001).

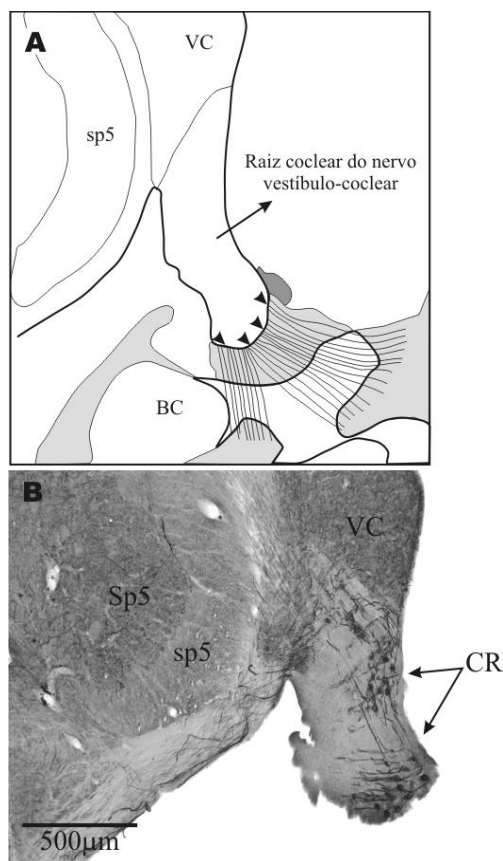


FIGURA 2 – Raiz coclear e os CRN. Em A, um esquema de um corte coronal do tronco encefálico e parte da espira basal da cóclea. As cabeças de seta indicam a borda glial que delimita a raiz coclear. Em B, fotomicrografia de corte coronal da raiz coclear submetida a técnica imuno-histoquímica para neurofilamentos SMI-32 evidenciando os neurônios da raiz coclear. Modificado a partir de Horta-Junior (2004). Abreviaturas: BC, espira basal da cóclea; sp5, trato espinhal do nervo trigêmeo; Sp5, núcleo do trato espinhal do nervo trigêmeo; VC, núcleo coclear ventral.

Apesar de serem os primeiros neurônios a receber aferências auditivas, os CRN relacionam-se com estruturas não auditivas (Lopez, Saldana et al. 1999, Nodal and López 2003), como os núcleos de integração sensorio-motora 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, Lopez et al. 2008). Devido a sua posição e padrão de conectividade, os CRN foram relacionados funcionalmente com o circuito do reflexo auditivo de sobressalto (RAS) (Figura 4), hipótese que foi confirmada por Lee et al. (1996). Portanto, no rato, o circuito neural elementar do RAS é constituído pelos neurônios do gânglio espiral, os CRN, os neurônios do PnC e os motoneurônios espinais (Lee, López et al. 1996, Koch 1999).

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 (Landis and Hunt 1939, Baudrie, Tulen et al. 1997, Koch 1999). Trata-se de um reflexo acústico-motor do tronco encefálico que está presente em muitas espécies de mamíferos, incluindo o homem. Possui caráter defensivo frente a uma possível agressão ou de alerta frente a acontecimentos não esperados (Keay, Redgrave 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 (Yeomans and Frankland 1996, Koch 1999), 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).

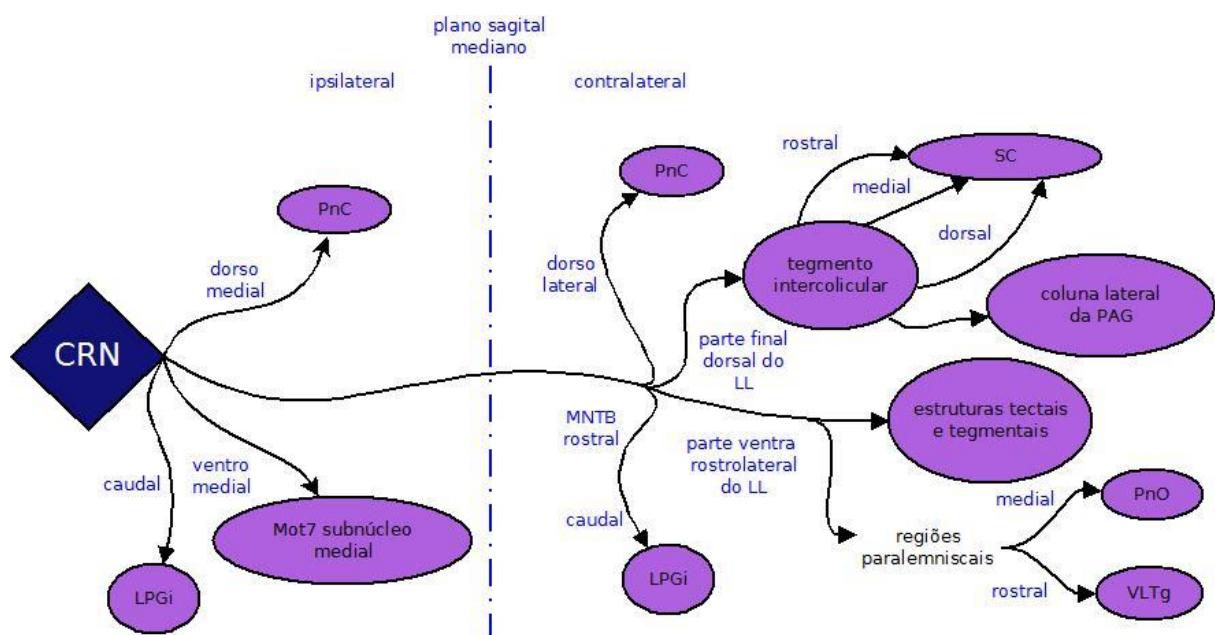


FIGURA 3 – Esquema das eferências dos CRN. Elaborado com base nos trabalhos de López et al. (1999) e Horta-Júnior et al. (2008). As setas em preto indicam as projeções do CRN (losango azul) para as respectivas regiões (elipses em roxo) as informações em azul próximas às setas indicam a direção do trajeto das fibras eferentes dos CRN

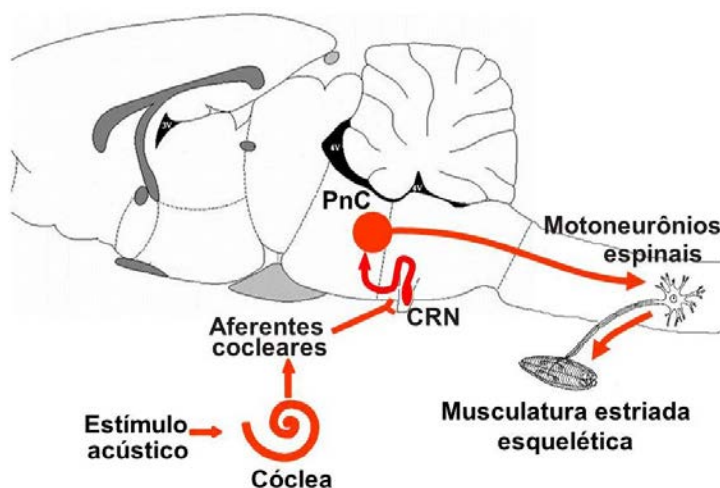


FIGURA 4 – Representação esquemática do circuito do RAS. A figura representa um corte sagital mediano do encéfalo no qual se evidenciam as estruturas que constituem o circuito elementar do RAS.

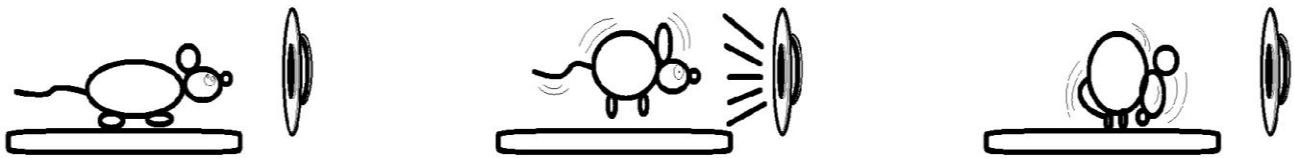


FIGURA 5 – Representação esquemática do RAS desencadeado por estímulo acústico de alta intensidade em um rato (imagem fornecida por Beduschi, R.S.)

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, Sinha et al. 1994, Pilz and Schnitzler 1996, Koch 1999). A latência deste reflexo é muito curta: 8ms no rato (Davis, Gendelman 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 μ m), permitindo uma rápida transmissão neural, necessária para o desencadeamento do RAS (Sinex, Lopez et al. 2001).

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 and Ison 1980, Wilkins, Hallett et al. 1986, Valls-Solé 1998, Swerdlow, Braff et al. 2000). A localização das estruturas que compõe o circuito do RAS em nível do tronco encefálico permite reconhecer o estado funcional desta importante parte do encéfalo 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 com provas não invasivas.

O RAS pode ser modificado quantitativamente ou qualitativamente por uma série de condições naturais ou experimentais (Swerdlow, Braff et al. 2000, Bell, Rodd et al. 2003), consideradas como modulações e que demonstram a plasticidade deste reflexo. O reflexo pode estar diminuído por: habituação ao estímulo (Gonzalez-Lima, Finkenstadt et al. 1989, Pilz and Schnitzler 1996), apresentação de um estímulo prévio de menor intensidade (Hoffman and Fleshler 1963, Braff, Geyer et al. 2001, Fendt, Li et al. 2001, Swerdlow, Blumenthal et al. 2007) e administração de drogas (Swerdlow, Auerbach et al. 1993, Bakshi, Swerdlow et al. 1994, Geyer, Krebs-Thomson et al. 2001). Por outro lado, o reflexo pode estar aumentado em condições de potenciação por medo (Anisman, Kelly et al. 2000, Davis 2006, Winslow, Noble et al. 2007), ansiedade (Kaviani, Gray et al. 2004, Prehn, Ohrt et al. 2006), e estresse (Andreski, Chilcoat 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 and Ison 1980, Justus and Finn 2007). Por esta razão, as provas comportamentais envolvendo as modulações do RAS tem despertado interesse no diagnóstico clínico

(Wilkins, Hallett et al. 1986). Na clínica neurológica e psiquiátrica, estão documentadas alterações no RAS e em suas modulações provocadas por doenças neurodegenerativas, esquizofrenia, hiperreflexia, depressão e estados de dependência de drogas como opiáceos e álcool (Mansbach, Gold et al. 1992, Borowski and Kokkinidis 1994, Grillon, Sinha et al. 1994, Brown 1995, Koch 1999).

A avaliação das modulações do RAS em animais de experimentação tem sido proposta como modelo equivalente para situações que podem ocorrer no homem, convertendo-se em um teste complementar para pesquisa de novos fármacos. Neste sentido, a potenciação do RAS por estímulo adverso tem sido equiparada ao estado de ansiedade no homem (Cook, Davis 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 estão relacionadas com estruturas do sistema nervoso central que modificam 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 and Friauf 1994, Wagner and Mack 1998), de conectividade (Yeomans and Frankland 1996) e as respostas à manipulação farmacológica (Ebert and Koch 1992, Krase, Koch et al. 1993, Miserendino and Davis 1993, Caicedo, Kungel et al. 1998). 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).

Uma das modulações mais interessantes do RAS, inclusive por sua aplicação clínica, é a inibição por estímulo prévio (PPI) que consiste na diminuição ou mesmo abolição total do reflexo quando o estímulo desencadeante é precedido, em uma fração de segundo (entre 20 e 500 ms), por outro estímulo sensorial (pré-estímulo) visual, sonoro ou tátil de baixa intensidade (Koch 1999). Este tipo de supressão se faz necessário para uma organização hierárquica do sequenciamento de ações. O significado biológico de tal mecanismo deve ser o de evitar interferências sobre os processos já ativados e em andamento e sua mensuração vem sendo utilizada como teste da capacidade de integração sensório-motora do sistema nervoso (Koch and Schnitzler 1997).

O conhecimento das vias neurais que regulam a PPI é importante no entendimento da patofisiologia das enfermidades nas quais ocorrem déficits da PPI, como a esquizofrenia (Swerdlow, Geyer et al. 2001). Porém, os circuitos neurais que suportam a existência desta modulação do RAS ainda não estão totalmente esclarecidos. Uma das vias propostas inclui uma projeção colinérgica inibitória originada no núcleo pedunculopontino do tegmento que atua sobre o PnC através de receptores muscarínicos M2 e M4 (Koch and Schnitzler 1997, Fendt, Li et al. 2001, Bosch and Schmid 2006). No entanto, os dados encontrados na literatura são contraditórios, parciais e nenhum dos circuitos propostos permite explicar satisfatoriamente todos os fenômenos associados à PPI, especialmente quando o intervalo entre o pré-estímulo e o estímulo é tão pequeno como 20 ms (Hoffman and Ison 1980, Fendt, Li et al. 2001, Swerdlow, Geyer et al. 2001).

De todos os núcleos constituintes da via do RAS, o núcleo da raiz coclear foi o menos estudado até o momento. As aferências aos CRN, que não provenham da cóclea, ainda são pouco conhecidas. Não foram investigadas com detalhes quais modulações do RAS poderiam relacionar-se com os CRN e seus aferentes diretos ou indiretos. No entanto, recentemente observou-se que protocolos experimentais para desencadear a PPI promovem inibição da atividade dos CRN (Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013).

Assim como no PnC, na raiz coclear encontram-se receptores colinérgicos, o que sugere que exista a liberação de acetilcolina nesta região. Funcionalmente a acetilcolina pode ser excitatória ou inibitória dependendo do receptor pós-sináptico sobre o qual atua. Os 5 subtipos de receptores muscarínicos conhecidos (M1 a M5) estão presentes na raiz coclear além de 4 subtipos de receptores nicotínicos (NB4, NB7, NB2 e NB3) (Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013). Entre os receptores muscarínicos destacam-se o M2 e o M4 que estão relacionados com efeitos inibitórios (Brown, Abogadie et al. 1997, Caulfield and Birdsall 1998). Desta forma, existe a possibilidade de que também ao nível dos CRN, as aferências colinérgicas participem da inibição observada durante a PPI, de maneira similar ao que ocorre no PnC (Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013).

O núcleo ventral do corpo trapezóide (VNTB) é a única fonte conhecida de aferências colinérgicas aos CRN (Gomez-Nieto, Rubio et al. 2008). O VNTB é um grupamento de neurônios pertencentes ao complexo olivar superior (SOC) situado na porção ventral da ponte. Este núcleo se estende desde o final da porção rostral do subnúcleo medial do núcleo motor do nervo facial (Mot7), até o início caudal do núcleo ventral do lemnisco lateral. Entre os neurônios colinérgicos do VNTB, imuno-reativos para enzima colina acetiltransferase (ChAT), foram identificadas duas subpopulações: uma com somas grandes e multipolares, intensamente imuno-reativa para ChAT, e outra população mais numerosa com somas arredondados, menores e menos imuno-reativas ChAT (Yao and Godfrey 1998).

Os neurônios colinérgicos grandes constituem os neurônios olivococleares mediais (MOC) cujos axônios fazem parte do feixe olivococlear (OCB) e enviam colaterais aos núcleos cocleares (White and Warr 1983, Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013) antes de se juntarem às fibras do nervo coclear e terminarem na cóclea inervando as células ciliares externas (OHC) (White and Warr 1983, Warr 1992, Maison, Adams et al. 2003, Warr and Boche 2003). O OCB é uma via eferente que se origina no SOC e se projeta à cóclea (Figura 6), sendo a via medial oriunda do VNTB, predominantemente contralateral, e a via lateral oriunda do núcleo olivar superior lateral (LSO), predominantemente ipsilateral (Kakigi, Hirakawa et al. 1997, Chen, Chen et al. 2000). O principal papel do OCB é a inibição eferente das OHC e com isso a supressão da atividade das células ciliares internas (IHC), resultando na proteção do órgão de Corti contra superestimulação por exposição a ruídos (Chen, Chen et al. 2000). Além disso, o OCB pode estar envolvido no processamento de sinais complexos na audição do animal, portanto sua função deve estar relacionada com a atenção seletiva ao inibir determinadas frequências que chegam ao ouvido, aumentando a percepção de outras (Chen, Chen et al. 2000). O trajeto das fibras nervosas dos MOC desde o VNTB até a cóclea é bem conhecido (White and Warr 1983), o que permite determinar o local ideal para injeção de neurotraçadores (para mapeamento) ou lesão (para inativação do OCB, Figura 6).-

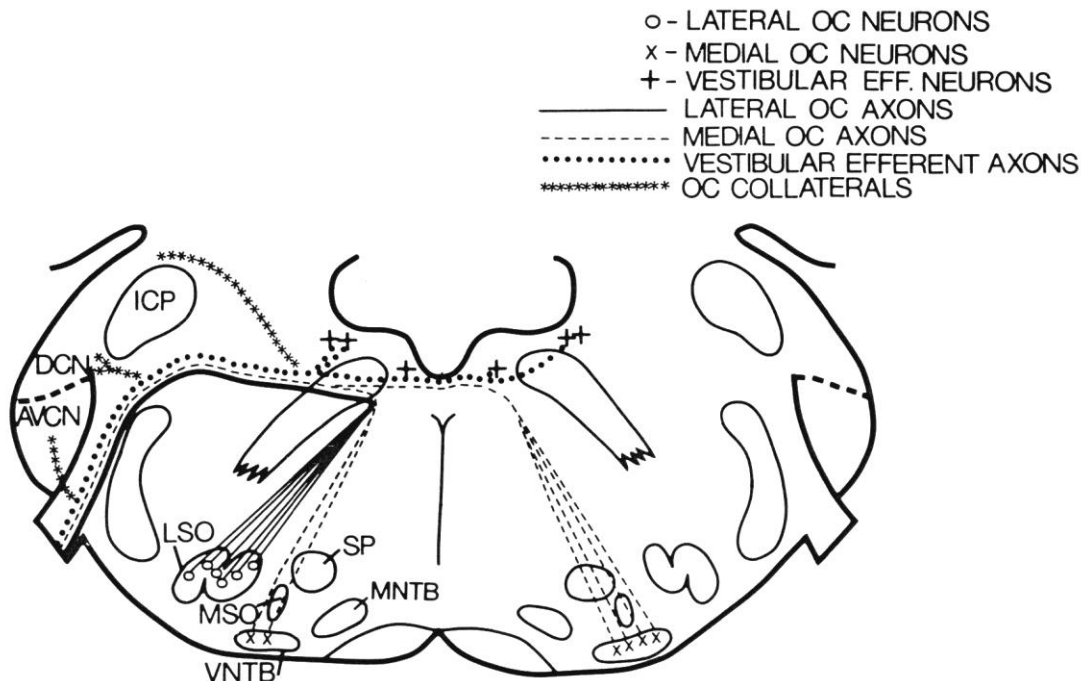


FIGURA 6 – Representação esquemática do Sistema Olivococlear no rato. Extraído de WHITE e WARR (1983). Os neurônios colinérgicos menores e mais numerosos do VNTB são responsáveis pelas projeções diretas do VNTB aos CRN, cujos axônios percorrem o corpo trapezoide até a raiz coclear sem emitir colaterais aos núcleos cocleares (Warr and Beck 1996, Gomez-Nieto, Rubio et al. 2008, Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013).

O VNTB possui importância como local de interação entre vias auditivas ascendentes e descendentes e está situado estrategicamente na interseção das projeções ascendentes dos núcleos cocleares e das projeções descendentes do colículo inferior (IC) (Warr and Beck 1996). Além dos CRN, os neurônios do VNTB conectam-se com as OHC da cóclea, com os núcleos cocleares, o LSO e reciprocamente com núcleo central do IC (Warr and Beck 1996, Gomez-Nieto, Rubio et al. 2008). Estudos recentes demonstraram que as projeções do VNTB à cóclea e aos CRN são colinérgicas, porém distintas em relação aos tipos celulares que a originam e à via de projeção (Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013). Devido a suas conexões, o VNTB pode participar de modulações da via auditiva (Yao and Godfrey 1998). A via descendente IC-VNTB-CRN pode ser importante para mediar a liberação colinérgica na raiz coclear relacionada a PPI (Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013), conectando indiretamente o IC, área fundamental para a PPI, com os CRN (Fendt, Li et al. 2001, Yeomans, Lee et al. 2006). No entanto, não existem estudos comportamentais relacionados com as funções das eferências do VNTB em relação com o RAS ou com a PPI. Desta forma, pretendemos avaliar a influência das eferências colinérgicas não olivococleares provenientes do VNTB no RAS e PPI.

Objetivos

Estudar a distribuição dos neurônios do VNTB que são aferentes aos CRN e avaliar o efeito de lesões seletivas no VNTB no RAS e na PPI.

Materiais e Métodos

Animais de experimentação

Todos os experimentos propostos neste projeto requerem a utilização de animais de experimentação. Não existe método alternativo. 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 nº574-CEUA).

Foi utilizado como modelo experimental, fêmeas de ratos albinos adultos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, por volta de 100 dias de idade, pesando entre 200g e 250g. Esta espécie é representativa dos mamíferos roedores que precisam de um ótimo funcionamento dos reflexos acústico-motores para sobrevivência em um *habitat* terrestre, principalmente noturno, e por isso é amplamente utilizada para o estudo do reflexo auditivo de sobressalto (Yeomans and Frankland 1996, Koch 1999). Os animais foram alojados em gaiolas (33x17x40cm) com livre acesso à água e ração, em biotério com temperatura controlada (21 a 23°C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7:00h). Para evitar o estresse por isolamento, antes dos procedimentos cirúrgicos, em cada gaiola foram alocados dois animais.

As intervenções cirúrgicas para a injeção do neurotraçador e a eutanásia dos animais foram realizadas sob anestesia profunda. Antes de iniciar qualquer procedimento cirúrgico ou imobilização do animal, foi comprovada a ausência do reflexo córneo-palpebral como sinal de anestesia eficaz. Como anestésicos, utilizamos drogas de uso comum em experimentação animal, com uma dose cuja eficácia foi constatada repetidamente em vários laboratórios de pesquisa. Foram empregadas as seguintes drogas:

- Para procedimentos cirúrgicos foi utilizada uma solução anestésica composta por uma mistura de xilazina 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 intraperitoneal, na dose de 0,2ml para cada 100g de peso corporal do animal. Além disso, como analgésico foi administrado paracetamol® (100µl/animal) por via oral após cirurgia.

- Para o sacrifício por perfusão transcardíaca foi utilizada uma sobredose de solução de hidrato de cloral a 10%, por via intraperitoneal, em quantidade de 1ml para cada 250g de peso corporal (400 mg/kg).

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

Estudo da distribuição dos neurônios do VNTB que são aferentes aos CRN

Dado o fato de que o VNTB é um núcleo extenso no eixo antero-posterior, sendo sua extremidade caudal localizada no nível interaural -1,56 e sua extremidade rostral no nível 0,36, totalizando 1920µm de extensão, seria difícil lesionar toda extensão do núcleo sem interferir com estruturas adjacentes do SOC ou o corpo trapezóide. Assim, foi necessário estudar qual seria a porção do VNTB que deveria ser preferencialmente lesionada com base na quantidade de neurônios não olivococleares que fossem aferentes a raiz coclear, permitindo assim um estudo funcional mais fidedigno quando da lesão deste núcleo. Para mapear os neurônios não olivococleares do VNTB que são aferentes à raiz coclear, foi injetado o neurotraçador retrógrado Fluoro-Gold (FG - Fluorochrome, Denver, CO, USA) na raiz coclear. 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 and Fallon 1986). Embora o FG seja um traçador autofluorescente e não careça de tratamento para ser observado em secções do encéfalo, existem anticorpos comerciais contra FG que permitem a realização de um protocolo de imuno-histoquímica para sua detecção. Este processamento adicional justifica-se pelo aumento da sensibilidade e da estabilização da marcação retrógrada obtida, além de permitir o estudo do material no microscópio óptico convencional por tempo indeterminado (Chang, Kuo et al. 1990, Nodal and López 2003). Neste trabalho o FG foi utilizado a 4%, diluído em soro fisiológico, em 3 casos experimentais (N15, N18 e N25), por meio de abordagem estereotáxica da raiz coclear.

As coordenadas empregadas foram determinadas com auxílio do atlas estereotáxico do encéfalo do rato (Paxinos and Watson 2005) e de trabalhos prévios que utilizaram esta abordagem (Lopez, Saldana et al. 1999, Horta-Junior, Lopez et al. 2008), 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.

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 3µA, em pulsos intermitentes de 7 segundos (ligado/desligado), durante 10 minutos, sendo mantida a micropipeta no local da injeção por mais 10 minutos sem corrente para evitar o refluxo do traçador e com isso a formação de trato ao ser retirada a micropipeta. Após a cirurgia os animais ficaram em recuperação durante 14 dias.

Após este período, os animais foram perfundidos com uma solução de paraformaldeído a 4%, o encéfalo removido, crioprotégido com sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1M e seccionado no plano coronal em 10 séries de cortes com espessura de 30µm, que foram armazenadas em solução anticongelante a -20 °C até o momento de seu processamento.

Para o protocolo de imuno-histoquímica para revelação do FG optamos pelo processamento em cortes flutuantes (free-floating) de quatro séries de cada caso experimental. Após imuno-histoquímica (apêndice A), 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. Duas séries de cada caso foram contracorados com tionina, pelo método de Nissl para referência citoarquitetônica (apêndice B). Nas séries sem contracoloração, os cortes foram desidratados e cobertos com lamínula utilizando Permont® como meio de montagem.

Morfometria dos neurônios do VNTB aferentes aos CRN

Para estudar a distribuição dos neurônios do VNTB não olivococleares, aferentes aos CRN foi necessário classificar os neurônios retrogradamente marcados em grandes (olivococleares) e pequenos (não olivococleares) por meio de morfometria (White and Warr 1983, Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013) (Yao and Godfrey 1998). A análise morfométrica foi realizada em 3 casos experimentais. Em duas séries de cortes de cada caso, foram adquiridas imagens com câmera digital (AxioCamHRc, Zeiss) e objetiva com aumento de 20x. Após a obtenção dessas imagens foi utilizado o programa Image J (version 1.48, Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014) para calcular a área dos neurônios marcados retrogradamente. Os neurônios foram enumerados e selecionados individualmente circundando-se o pericárdio (Figura 7, apêndice F). Somente foram medidos os neurônios cujos corpos celulares estiveram repletos de FG e cuja visualização do núcleo foi possível.

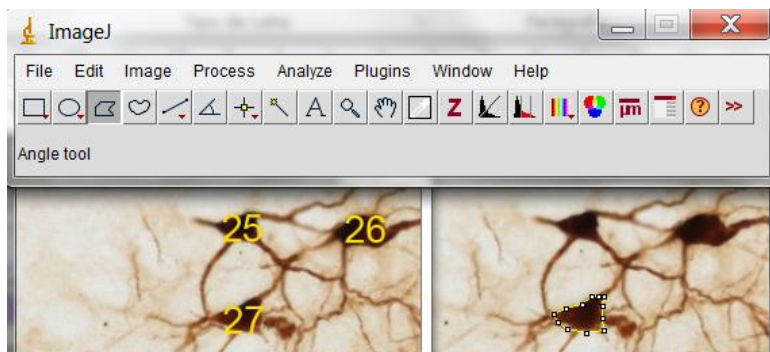


FIGURA 7 – Morfometria utilizando programa ImageJ. A imagem exibe o momento de enumeração dos neurônios para registro de identificação, seguido do contorno para mensuração da área do corpo neuronal.

Distribuição dos neurônios do VNTB aferentes aos CRN

Para estudar a distribuição dos neurônios do VNTB aferentes à CR e classificá-los morfometricamente, foi realizado o mapeamento e a reconstrução tridimensional do VNTB com os neurônios marcados retrogradamente após injeção de FG na CR e dos núcleos do SOC. A reconstrução tridimensional foi elaborada com auxílio do programa Neurolucida (versão 10, MBF Bioscience, MicroBrightfield, Inc.), com a finalidade de facilitar a compreensão da distribuição dos neurônios do VNTB marcados retrogradamente, pois desta forma é possível obter uma visualização integrada nos 3 planos do espaço. Para realizar esta reconstrução foi selecionado o caso N15 por se tratar do caso experimental de injeção de FG na CR sem nenhuma contaminação de estruturas vizinhas ou de passagem. As etapas para realização dos modelos 3D incluíram: elaboração de contornos, em fotomicrografias, dos núcleos do SOC bilateralmente e da superfície ventral do tronco encefálico, inserção destes contornos no programa Neurolucida, calibração do sistema incluindo o planejamento do intervalo de avaliação e número de secções utilizadas para reconstrução, definição de contornos e marcadores que foram desenhados sobre os contornos previamente elaborados para a execução da reconstrução tridimensional. Para representar os tamanhos dos perfis neuronais utilizamos diferentes cores e formas segundo os seguintes critérios: cor amarela para neurônios pequenos ($\text{área} < 260 \mu\text{m}^2$), e cor vermelha para neurônios grandes ($\text{área} > 260 \mu\text{m}^2$).

Avaliação do efeito no RAS e na PPI de lesões seletivas no VNTB

Para alcançar este objetivo, realizamos experimentos em 3 grupos de experimentais: controle, sham (lesão apenas no OCB) e lesão (lesão OCB-VNTB). Nestes grupos foram realizadas as seguintes manipulações experimentais:

- **Grupo Controle:** composto por 6 animais, nos quais não foi realizado procedimento cirúrgico. Foram submetidos às avaliações comportamentais do RAS e PPI com a finalidade de comparação com os demais grupos experimentais.

- **Grupo Sham:** composto por 11 animais, nos quais foi realizada a lesão eletrolítica do OCB bilateralmente, no intuito de eliminar a projeção colinérgica dos neurônios olivococleares sobre a cóclea prevenindo uma possível influência indireta no RAS e na PPI. Além disso, foi realizada a falsa lesão, simulando a injeção da droga imunotóxica no VNTB sem a injeção da mesma. Desta forma este grupo permitiu observar a influência do OCB e da cirurgia estereotáxica no RAS e na PPI.

- **Grupo Lesão:** composto por 9 animais, nos quais foi realizada a lesão eletrolítica do OCB combinada com lesão imunotóxica dos neurônios colinérgicos do VNTB para estudo da influência dos neurônios colinérgicos não olivococleares do VNTB no RAS e na PPI, por comparação com o grupo Sham.

Todos os grupos passaram pela avaliação do RAS e da PPI em quatro momentos diferentes: no início do experimento e posteriormente decorridos 7, 14 e 21 dias. Ao final da última sessão de avaliação do RAS e PPI em todos os grupos, os animais foram deixados em repouso por cinquenta minutos e então sacrificados e fixados por perfusão transcardíada. Em todos os animais dos grupos Sham, Lesão e em 3 animais do grupo controle, os encéfalos foram coletados para avaliação morfológica do VNTB e do OCB com protocolo de imuno-histoquímica para a enzima colina acetiltransferase (ChAT) e para a proteína Fos (FOS). A manutenção das gaiolas e os procedimentos experimentais foram realizados sempre pelo mesmo experimentador, para minimizar as influências de fatores externos no reflexo de sobressalto e na expressão de FOS.

Ao chegarem ao biotério setorial, os animais passaram por um período mínimo de 10 dias para aclimação ao novo ambiente até que alcancem no mínimo 90 dias de idade. Antes de iniciar a fase experimental, os animais foram manipulados por 3 vezes, 1 vez ao dia em dias consecutivos, como se fossem passar por uma seção de mensuração do RAS e PPI, contudo sem a estimulação acústica, apenas posicionamento dos animais na gaiola, dentro da câmara de prova, durante 5 min com o ruído de fundo (ruído branco, 60dB) ligado.

Posteriormente, todos os animais foram submetidos a uma triagem para averiguar se apresentavam respostas válidas nas seções de avaliação de RAS. Somente animais que respondiam adequadamente à estimulação acústica foram utilizados na fase experimental. Para tanto, no quarto dia de manipulação, os animais foram submetidos a uma prova de “avaliação basal” que possibilitou a eliminação dos animais que, inerentemente, não apresentaram respostas válidas para o reflexo. Nesta prova, os animais foram submetidos a 22 estímulos sonoros isolados (ruído branco) em ordem crescente de intensidade. Os cinco primeiros estímulos de 75dB, utilizados para habituação do animal; sendo, os posteriores, estímulos de 75dB, 79dB, 84dB, 87dB, 89dB, 91dB, 93dB, 95dB, 97dB, 99dB, 101dB, 103dB, 105dB, 107dB, 109dB, 111dB e 113dB. Durante todo o procedimento, o ruído de fundo manteve-se constante em 60dB. Após a seleção dos animais que respondiam adequadamente, a manipulação experimental dos grupos foi iniciada quando os animais atingiram ao menos 100 e no máximo 120 dias de idade.

Para evitar a lesão da membrana timpânica ou até mesmo os ossículos da audição, o que prejudicaria a avaliação do RAS e da PPI, quando necessário os animais foram posicionados no aparelho estereotático empregando barras auriculares desenhadas para animais de porte maior como gatos e macacos (David Kopf, #951), o que elimina a possibilidade de lesão mecânica no tímpano, que foi examinado ao final de cada cirurgia através do meato acústico externo (Figura 8). As lesões no VNTB foram realizadas com microinjeções bilaterais do neurotóxico Anti-ChAT-Saporina (Advanced Targeting Systems, #IT-42-25), seletivo para neurônios colinérgicos. Ao entrar em contato com os neurônios colinérgicos os receptores de ACh reconhecem a porção colinérgica do neurotóxico e permitem a entrada deste nos neurônios. Ao ser internalizado, a porção que contém saporina age inativando os ribossomos, bloqueando assim a síntese proteica e levando à morte celular.

O método de injeção foi realizado por pressão com uma seringa de Hamilton (agulha 36 gauge, diâmetro externo 160µm e diâmetro interno 60µm), controlada por uma bomba de microinjeção (micropump III – WPI) e abordagem estereotáxica bilateral. O Anti-ChAT-Saporina foi utilizado na concentração de 0,25µg/µl, volume de 400nl e foi injetado no fluxo de 40nl/min. Terminada a injeção, a seringa foi deixada em repouso por 10 minutos no local da injeção para evitar refluxo e a consequente formação de trato no trajeto da agulha. As coordenadas utilizadas para atingir o VNTB foram: ângulo -20°, ântero-posterior -0,2, médio-lateral $\pm 2,1$ e dorso-ventral -0,8.

As lesões eletrolíticas no OCB foram realizadas com abordagem estereotáxica bilateralmente, utilizando-se um eletrodo de aço inoxidável, com ponta de 12° de angulação, 254µm de diâmetro e 12MOhms de resistência (A-M Systems # 572700), com uma corrente negativa de 25uA, durante 1,5 minutos. As coordenadas utilizadas para atingir o OCB foram: ângulo 0°, ântero-posterior -2,2 e -1,9, médio-lateral $\pm 2,5$ e dorso-ventral +1,7.

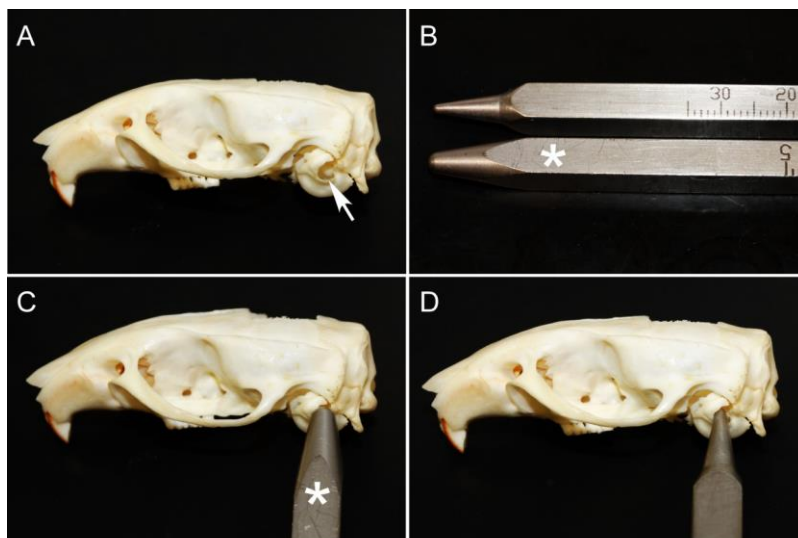


FIGURA 8 - Comparação entre as barras auriculares para ratos e para gatos. Em A fotografia de vista lateral do crânio de rato a seta aponta o meato acústico externo. Em B barras de fixação auricular. O asterisco marca a barra para gatos utilizada nos experimentos de lesão. Em C e D comparação entre o diâmetro da ponta das barras e o meato acústico externo.

As lesões no OCB e no VNTB foram analisadas morfometricamente sendo medida sua área no corte histológico de maior secção coronal. A extensão rostro-caudal das lesões foi estimada multiplicando-se o número de cortes em que foi possível observá-las pelo intervalo entre os cortes. As análises morfométricas das lesões foram realizadas com o programa ImageJ.

Para a avaliação do RAS e da PPI em ratos empregamos o sistema de avaliação do sobressalto da empresa Insight Ltda. que integra tanto a parte de aquisição de movimento do animal como a geração do estímulo sonoro. Ele é constituído por uma caixa de isolamento acústico, uma plataforma de medição, localizada a 9cm dos alto-falantes e um sistema gerador dos estímulos sonoros controlados por um software e conectados a um computador. Os estímulos acústicos foram calibrados com um decibelímetro digital (medidor de nível de pressão sonora, modelo DEC-460, Instrutherm Ltda., calibração interna 94,0dB) colocado sobre a plataforma de medição, na mesma posição na qual é afixada a gaiola do animal.

A quantificação do RAS é realizada por um sensor, localizado abaixo da gaiola de prova, que registra a variação do peso do animal durante e após a estimulação acústica, visto que a resposta pode ser caracterizada por um movimento balístico.

Para cada animal a sessão de avaliação do RAS teve duração de 35 minutos, durante os quais foram apresentados 65 estímulos divididos em 6 blocos como demonstrado no Quadro 1. Inicialmente foram apresentados 5 estímulos desencadeantes do RAS, pois é esperado que as primeiras respostas tenham maior amplitude que as seguintes. A apresentação dos demais blocos foi realizada da forma semi-aleatória, pelo método de quadrado latino com intervalo de 30 segundos e variação aleatória de 33%. Todas as sessões iniciaram com um tempo de aclimação de 5 minutos. Passado este período foram iniciadas as provas para se obter o RAS, empregando como estímulo ruído branco a 113 dB SPL de 20 milissegundos de duração. Para as provas de avaliação da PPI foi utilizado um ruído branco de 70 dB SPL 4Hz previamente ao estímulo desencadeante do reflexo com intervalos variáveis de 25, 50, 100 e 150 ms. Durante toda a sessão, as câmaras foram mantidas com ventilação e ruído de fundo (ruído branco de 60dB) constantes e os animais foram monitorados, através do computador, por meio de uma câmera de vídeo instalada dentro da caixa de isolamento. Para evitar possíveis diferenças de amplitude do reflexo devidas ao ritmo circadiano, todas as provas comportamentais foram realizadas no início do ciclo claro.

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

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

Após a avaliação do RAS e PPI do período de 21 dias pós-lesão, os animais foram deixados em repouso em suas gaiolas de origem, por 50 minutos. Passado este período os animais foram perfundidos com uma solução de paraformaldeído a 4%, o encéfalo removido, crioprotetido com sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1M e seccionado no plano coronal em 10 séries de cortes de 30µm de espessura, que foram armazenadas em solução anticongelante a -20 °C até o momento de seu processamento. Uma série de cortes (intervalo entre cortes de 300 µm) foi processada para detecção da proteína Fos por meio do protocolo de imuno-histoquímica (apêndice C) e outras duas séries foram utilizadas para identificação da imunorreatividade para ChAT (apêndice D). A imunorreatividade para ChAT marca neurônios

colinérgicos, porque estes possuem a enzima colina acetiltransferase que cataliza a síntese de acetilcolina a partir de acetil CoA e colina, permitindo a avaliação da extensão da lesão imunotóxica no VNTB no grupo Lesão. Além disso também evidenciam o OCB, que é colinérgico, e permite avaliar a extensão da lesão eletrolítica realizada em seu trajeto nos grupos Sham e Lesão.

A proteína FOS é um produto do proto-oncogene c-fos que é expressado no núcleo de neurônios após estimulação. Estudos indicaram que FOS é um fator de transcrição que converte estímulos externos de curta duração em eventos genéticos intracelulares prolongados, de modos que a expressão de seu RNAm atinge o pico em 30 minutos após a estimulação e seu produto proteico, 60 a 90min após a estimulação, persistindo por até 2 a 5 horas (Hoffman, Lee et al. 1993, Chen, Chen et al. 2000, Hoffman and Lyo 2002, Kovacs 2008). A imunorreatividade à FOS tem sido utilizada como um marcador de atividade neuronal do sistema auditivo (Chen, Chen et al. 2000). Embora fossem tomadas medidas para não provocar lesão na orelha do animal, devido a introdução das barras auriculares no meato acústico interno durante a cirurgia estereotáxica, verificou-se indiretamente a funcionalidade da via auditiva pela densidade de neurônios imunorreativos a FOS nos núcleos cocleares (CN) (dorsal e ventral) e no IC de ratos que foram submetidos a protocolos de mensuração de sobressalto e PPI nos três grupos experimentais.

Os protocolos empregados para a identificação de imunorreatividade para FOS e para ChAT, estão descritos nos apêndices C e D, respectivamente. Para a imuno-histoquímica de ChAT foi utilizado o anticorpo primário Anti-ChAT (#AB144P – Chemicon) na concentração de 1:1000. Enquanto para a Imuno-histoquímica de FOS foi utilizado o anticorpo primário Anti-c-fos (Cat#PC38 – Calbiochem) na concentração de 1:10.000.

Após o processamento para identificar a imunorreatividade à ChAT e à FOS, os cortes foram imersos em solução de gelatina 0,4% em tampão Tris 0,05M e montados em lâminas de vidro sequencialmente de caudal para rostral. Em todos os casos experimentais, as séries processadas para ChAT e para FOS foram contracoradas pelo método de Nissl, utilizando tionina como corante (apêndice B). A coloração de Nissl tem por objetivo evidenciar estruturas basófilas do tecido nervoso, especialmente o retículo endoplasmático rugoso, presente em grande quantidade nos corpos celulares de neurônios e por isto é frequentemente usada para referência citoarquitetônica.

Forma de análise dos resultados

Após as seções de avaliação comportamental os dados gerados pelo sistema foram exportados em planilhas do programa Microsoft Excel 2010. Para cada exposição ao estímulo foi construído um gráfico para visualização da curva de resposta do animal e validação dos valores informados pelo sistema. Somente foram considerados válidos os valores obtidos com respostas de típicas de sobressalto. Consideraram-se respostas típicas do reflexo apenas aquelas em que a movimentação do animal após a

estimulação é nitidamente maior do que a atividade locomotora registrada antes da emissão do pulso sonoro (Bell, Rodd et al. 2003). A amplitude do RAS foi ponderada pelo peso do animal em cada momento de avaliação. As porcentagens de PPI para os 4 intervalos interestímulos (ISI 25, ISI 50, ISI 100 e ISI 150) foram calculadas em cada sessão com a seguinte fórmula: $\%PPI = [(média \text{ da amplitude de RAS} - média \text{ amplitude de RAS com pré-pulso}) / média \text{ amplitude de RAS}] \times 100$. Para o cálculo da amplitude da resposta de sobressalto e PPI foram levados em conta os 1000 milissegundos posteriores ao início do estímulo. Sabendo que a habituação do RAS se produz nas primeiras apresentações ao estímulo, foram estudados em separado os valores da resposta de sobressalto correspondentes as cinco primeiras apresentações, já que é esperado que sejam de maior amplitude de variação do que as restantes.

A comparação do peso considerando todos os grupos e o perfil de resposta durante os momentos de avaliação foi realizada por meio da técnica da análise de variância não-paramétrica para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o respectivo teste de comparações múltiplas de Dunn, tanto para a avaliação dos grupos fixando cada momento, quanto para os momentos dentro de cada grupo. A opção pelo procedimento não paramétrico foi estabelecida pela não adequação as suposições básicas do procedimento paramétrico (Zar 2010). Para comparação médias de amplitude do RAS e das %PPI considerando o perfil de resposta durante os momentos de avaliação foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman, complementado com o teste de comparações múltiplas de Dunn. A comparação dos valores absolutos e das %PPI considerando os diferentes ISIs foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal Wallis, complementado com o teste de comparações múltiplas de Dunn. Já a comparação dos grupos foi realizada por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney (ZAR, 2009). A significância das comparações foi apresentada por meio de letras maiúsculas (comparação entre os momentos), letras minúsculas (comparação entre os grupos) e letras gregas (comparações entre os ISI). Dessa forma, duas medianas seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si quanto os respectivos grupos ($p < 0,05$) dentro de cada momento e ISI, considerando um nível de 5% de significância. Duas medianas seguidas de letras maiúsculas distintas diferem quanto aos respectivos momentos ($p < 0,05$) dentro de cada grupo e ISI. Já duas medianas seguintes de letras gregas distintas diferem quanto aos respectivos valores ISI dentro de cada grupo e momento. A análise estatística foi realizada com a colaboração do Professor Titular Carlos Roberto Padovani e do Prof. Dr. Sérgio Augusto Rodrigues.

Os resultados morfológicos foram observados em microscópio óptico utilizando as técnicas de microscopia de campo claro. A confirmação e a mensuração da lesão no OCB e no VNTB no corte de sua maior área de secção transversal foram documentadas. Os cortes processados contracorados foram estudados com auxílio do atlas extereotáxico do encéfalo do rato (Paxinos and Watson 2005), e foram utilizados para demonstrar com exatidão o local de lesão do OCB e do VNTB e estimativa semiquantitativa dos neurônios imunorreativos a FOS nos CN e IC e a ChAT no VNTB.

Para avaliar com maior acurácia a dimensão da lesão realizada nos neurônios colinérgicos do VNTB, foi realizada a contagem dos neurônios imunorreativos a ChAT ao longo de toda a extensão rostrocaudal do VNTB, bilateralmente, em uma série de cortes em cada caso experimental considerado

válido, no grupo Lesão e no grupo Sham. A avaliação da ativação da via auditiva pela FOS foi realizada de acordo com o método empregado em estudos prévios (Zhang, Haenggeli et al. 1996, Chen, Chen et al. 2000), determinando a densidade de neurônios imunorreativos nos CN e no IC, por meio da razão entre o número de perfis neuronais marcados e a área de secção do núcleo observado (apêndice E). Para a análise destes experimentos as imagens dos CN e IC, em todas as secções de uma série de cortes de cada caso experimental, foram capturadas no microscópio óptico (Scope.A1, Carl Zeiss) equipado com câmera digital (axioCam HRc, Zeiss). Utilizando o programa PhotoShop® CS2 (version 9.0; Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) as imagens foram unidas, como um mosaico, para a confecção de imagens panorâmicas do complexo coclear e do IC de ambos lados. Em cada lado, os CN e IC foram delimitados e utilizando o software IMAGE J, a área dos núcleos e os perfis neuronais imunorreativos para FOS foram contados para o cálculo da densidade neuronal. Os resultados foram agrupados em planilhas do programa EXCEL 2010 (Microsoft®), descritos em média, desvio-padrão, e analisados estatisticamente quanto à sua significância através de ANOVA ($p < 0,05$), com pós-teste de Tukey, após comprovada a normalidade dos dados com o software Prism 5 (version 5.01, GraphPad, Software, Inc.).

Toda a iconografia científica foi digitalizada. As imagens foram organizadas em figuras com o programa CorelDRAW® graphics suite X3 (Corel Corporation, Ottawa, Canada) e trabalhadas com o programa PhotoShop® CS2 software (version 9.0; Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA), ajustando o brilho, contraste e balanço de cores de acordo com o preconizado para preparação de imagens digitais para publicação científica (Saper 1999, Schenk, Manning et al. 1999). As barras de calibração das fotomicrografias foram confeccionadas fotografando, com os mesmos equipamentos e aumentos do material histológico em questão, uma lâmina com escala micrométrica calibrada (Leica, Leitz Wetzlar), cuja menor divisão é de 10µm. A nomenclatura e as abreviaturas utilizadas na descrição dos resultados foram baseadas no atlas estereotáxico do encéfalo do rato (Paxinos and Watson 2005).

Resultados

Estudo da distribuição dos neurônios retrogradamente marcados no VNTB após injeção de FG na raiz coclear

Após a análise dos experimentos de injeção de FG na raiz coclear, foram selecionados 3 casos experimentais, nos quais os locais de injeção foram considerados corretos. Os casos selecionados foram: N15, N18 e N25.

A análise da injeção de neurotraçador demonstrou que no caso N15, a injeção foi a mais restrita à raiz, sem contaminação no cerebelo e pouca contaminação nos núcleos cocleares; no caso N18, verificamos que houve pouca contaminação nos núcleos cocleares e no cerebelo, no caso N25, a injeção

também se localizou mais rostralmente, houve pouca contaminação no cerebelo e difusão para o VCP (Figura 10).

Nos 3 casos experimentais foram identificados e medidos 260 neurônios no VNTB de ambos os lados. A análise morfométrica dos perfis neuronais retrogradamente marcados no VNTB evidenciou que no lado ipsilateral a área média dos perfis neuronais foi de $179,72 \mu\text{m}^2$ ($\pm 79,17$) e no lado contralateral a média foi de $183,69 \mu\text{m}^2$ ($\pm 82,97$), sendo que a menor área encontrada foi de $64 \mu\text{m}^2$ e a maior $494 \mu\text{m}^2$. Os neurônios analisados distribuem-se bilateralmente, sendo 58,08% (151) contralaterais e 41,92% (109) ipsilaterais. (Figura 11).

Em todos os casos foram observados neurônios retrogradamente marcados ao longo de toda extensão do VNTB de ambos os lados (Figuras 12, 13 e 14). O VNTB se estende do nível interaural -1,56 ao 0,36 (Paxinos & Watson, 2007). O estudo da distribuição dos perfis neuronais retrogradamente marcados nos 3 casos analisados indica que 61,54% (160) dos neurônios se situam entre os níveis interaurais -0,40 ao 0,00, distribuídos em um intervalo de 400 micrômetros (Figura 12). Com relação ao tamanho expresso pela área e a sua distribuição, verificamos que nos dois antímeros a maioria dos neurônios marcados retrogradamente estão localizados rostralmente no VNTB, independentemente sua área, não sendo possível distinguir uma distribuição rostrocaudal dos somas com relação ao seu tamanho (Figura 13)

O mapeamento dos somas retrogradamente marcados no VNTB, classificados por seu tamanho, confirma a distribuição da maior parte dos somas em níveis rostrais tanto para neurônios pequenos como para neurônios grandes, sem distinção também da posição destes neurônios no sentido dorsoventral (Figura 14). Por meio da reconstrução tridimensional do complexo olivar superior (SOC) no caso N15 confirmamos de forma mais gráfica e interativa o padrão de distribuição dos neurônios do VNTB aferentes à raiz coclear (Figura 15). Desta forma, foi possível reconhecer que os neurônios grandes (provavelmente olivococleares) e pequenos (provavelmente não olivococleares) estão mesclados no interior do VNTB sem uma organização topográfica passível de distingui-los, porém ambos estão preferencialmente distribuídos em níveis rostrais, entre I.A. 0,0 e -0,4 mm.

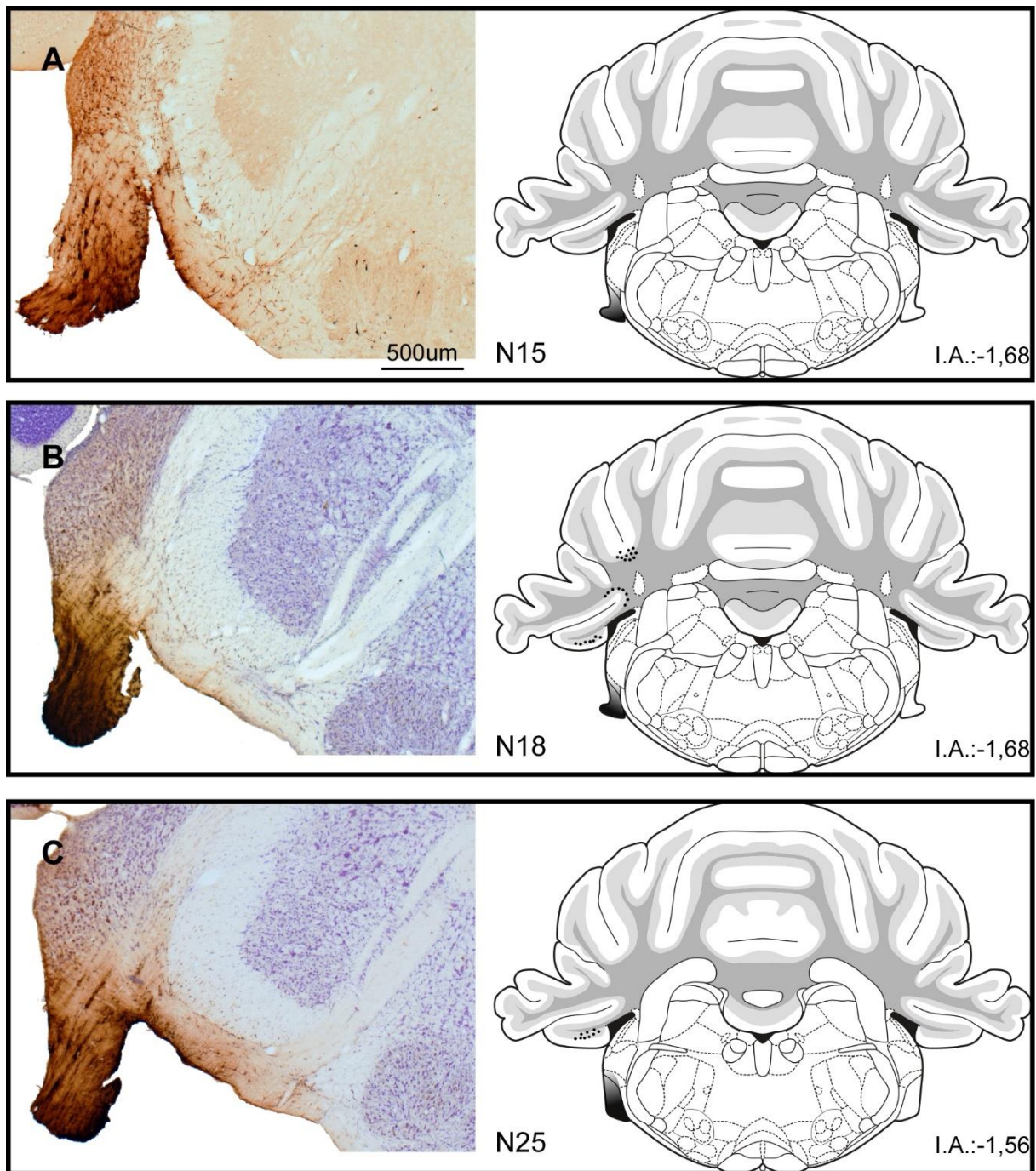


FIGURA 10 – Locais de injeção de FG na raiz coclear (casos N15, N18 e N25). Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico evidenciando o depósito de traçador FG (marrom) na raiz coclear nos casos N15 em A, N18 em B e N25 em C. Ao lado das fotomicrografias está a representação gráfica do sítio de injeção e das contaminações observadas em áreas próximas e no trajeto da micropipeta através do cerebelo (pontos negros). A barra de calibração em A também é válida para B e C.

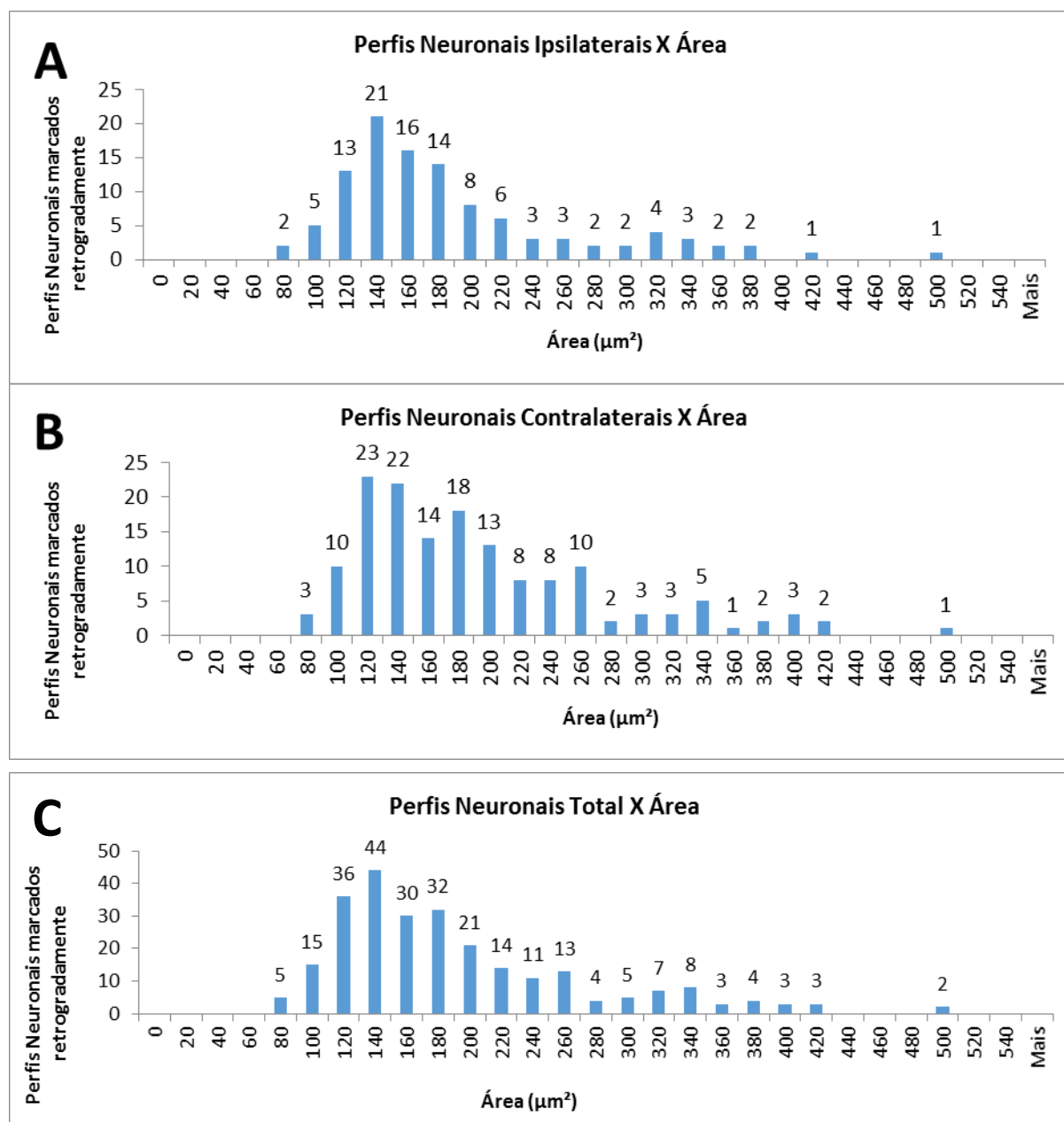


FIGURA 11 – Resultados da morfometria realizada em 260 neurônios do VNTB marcados retrogradamente após injeção de FG na raiz coclear em 3 casos experimentais. Os histogramas representam a frequência de neurônios e sua distribuição por área. Em A, resultados de neurônios marcados retrogradamente do mesmo lado da zona de injeção. Em B, resultados de neurônios marcados retrogradamente do lado contralateral à zona de injeção. Em C, resultados dos neurônios retrogradamente marcados de ambos lados.

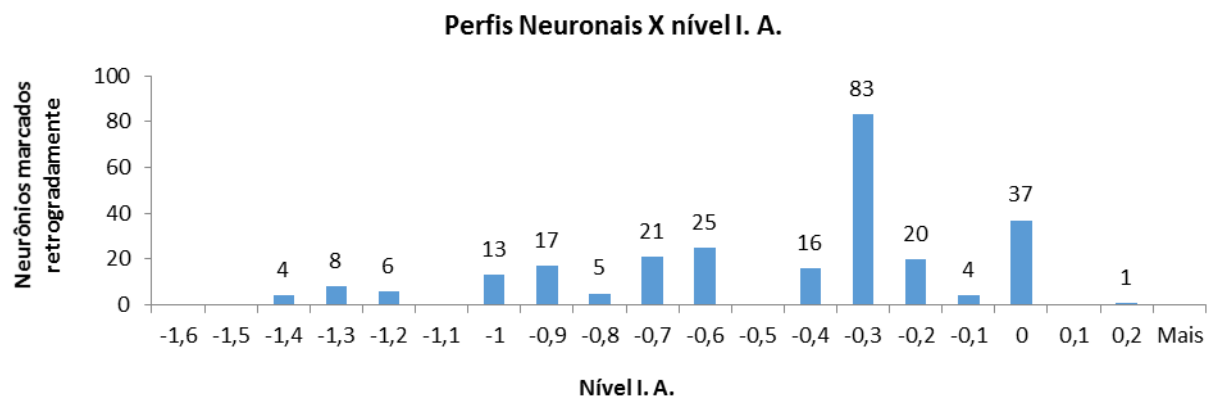


FIGURA 12 – Localização de neurônios marcados retrogradamente após injeções de fluorogold na raiz coclear. O histograma representa a frequência de neurônios marcados em diferentes intervalos de níveis interaurais. Pode-se observar a maior frequência de neurônios marcados retrogradamente no VNTB no intervalo entre -0,4 a 0.

Nível interaural (I.A.)

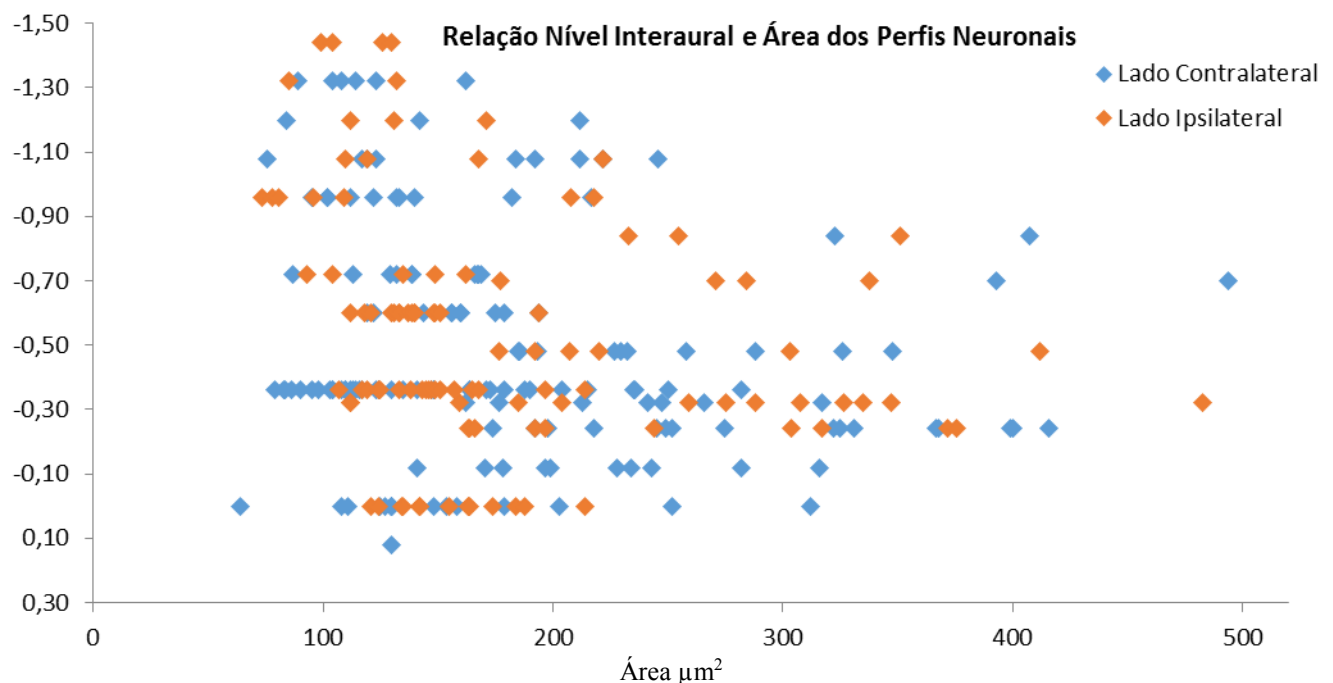


FIGURA 13 -Gráfico de dispersão que representa a distribuição de neurônios retrogradamente marcados em todos os casos estudados, com relação ao nível interaural, o tamanho e o lado do neurônio. Os neurônios localizados ipsilateralmente estão representados por losangos vermelhos e aqueles localizados contralateralmente estão representados por losangos azuis.

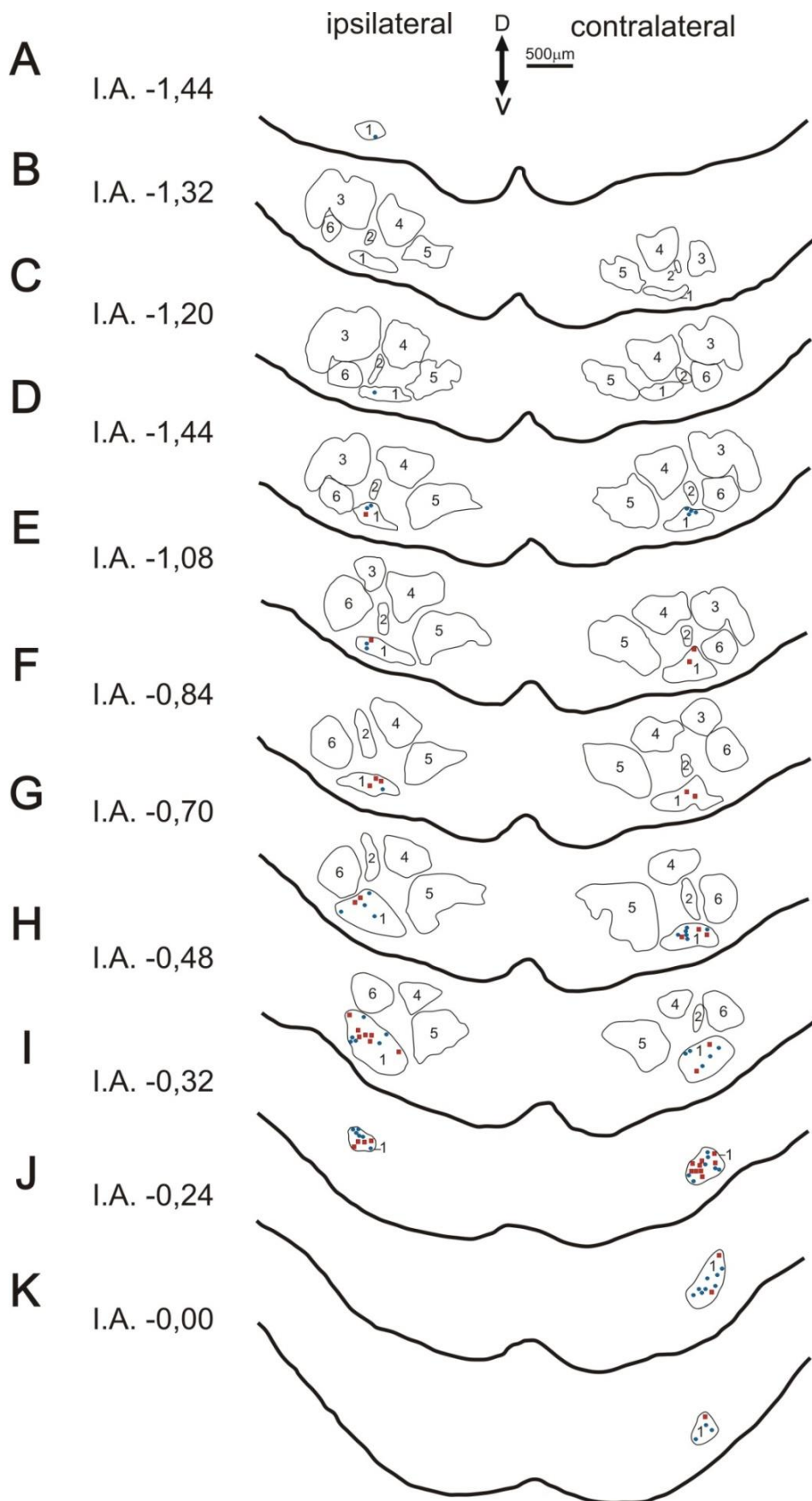


FIGURA 14 - Esquemas de cortes coronais do tronco encefálico ao nível do complexo olivar superior (SOC) no caso N15, nos quais foram representados os neurônios retrogradamente marcados com FG no VNTB, após injeção na raiz coclear. Os esquemas estão organizados de caudal para rostral (A à K), com indicação do nível interaural (I. A.) em milímetros. Os núcleos do SOC estão indicados por números: 1- VNTB; 2-MSO; 3-LSO; 4-SPON; 5-MNTB e 6-LNTB.. Os círculos azuis representam neurônios pequenos (área < 260 μm²) e os quadrados vermelhos representam neurônios grandes (área > 260 μm²). A barra de calibração é válida para todos os esquemas.

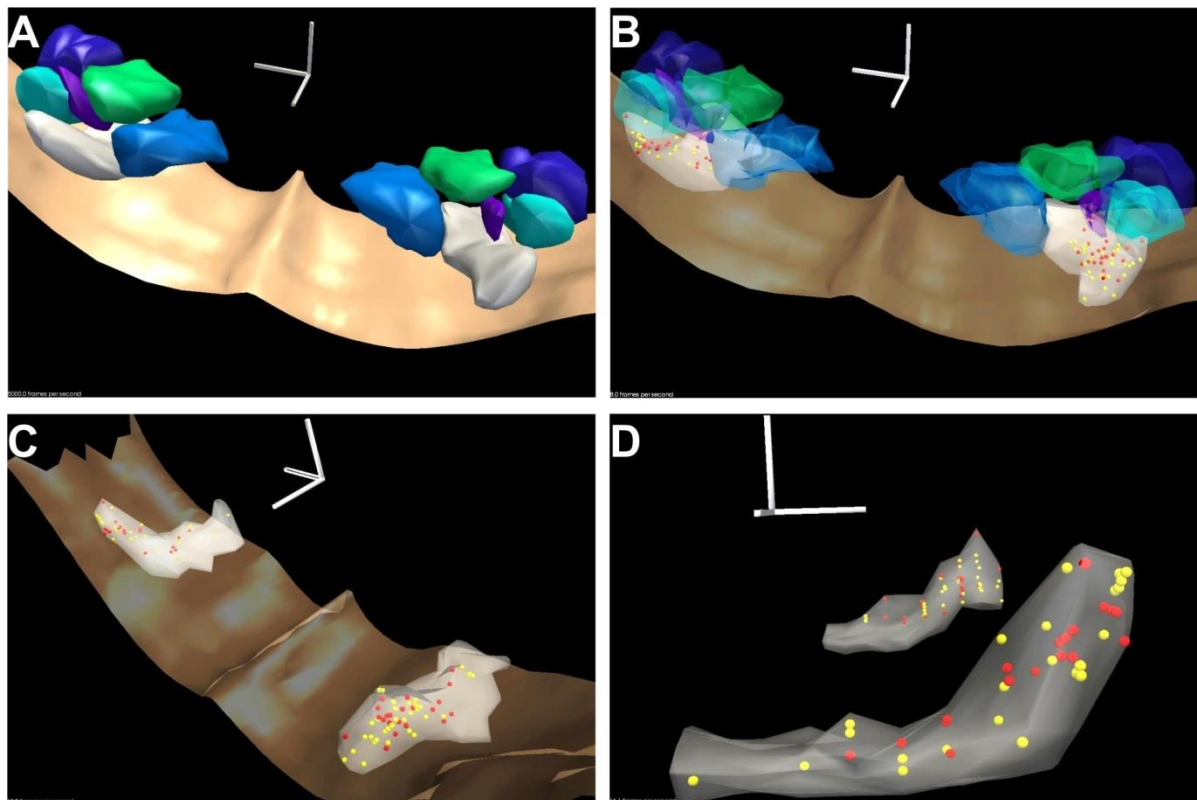


FIGURA 15 - Imagens da reconstrução tridimensional dos núcleos do SOC e dos neurônios do VNTB marcados retrogradamente após injeção de Fluorogold no caso N15. A: Vista rostral dos núcleos do SOC. B: Vista rostral dos núcleos do SOC em semitransparência. C: Vista latero-superior do VNTB em semitransparência. D: Vista lateral do VNTB contralateral, onde é possível visualizar a representação de neurônios marcados retrogradamente. As esferas amarelas representam neurônios pequenos (área menor que $260 \mu\text{m}^2$) e as esferas vermelhas representam neurônios grandes (área maior que $260 \mu\text{m}^2$). Cada eixo das barras representadas tridimensionalmente equivalem a $500 \mu\text{m}$.

Efeito no RAS e na PPI de lesões seletivas no VNTB

Análise das lesões no OCB

Devido a impossibilidade de realizar lesões no VNTB que preservassem os neurônios olivococleares mediais, para avaliar a influência no RAS e na PPI, de lesões no VNTB, planejamos a realização de lesões eletrolíticas no OCB tanto do grupo Sham como do grupo Lesão. Desta forma, pudemos analisar o efeito dos neurônios não olivococleares do VNTB comparando os resultados entre grupos, ambos com ablação do OCB.

A integridade do OCB foi verificada histologicamente após imuno-histoquímica para a enzima ChAT. Nos casos controle, foi possível observar as fibras OCB imunorreativas e os neurônios colinérgicos presentes no VNTB (Figura 16), bem como outros núcleos e feixes de fibras colinérgicos: núcleo mesencefálico do trigêmeo (Me5), núcleo motor do nervo trigêmeo (Mot5) e seu feixe (n5), o Mot7 e o local onde seu feixe de fibras forma o joelho do facial (g7).

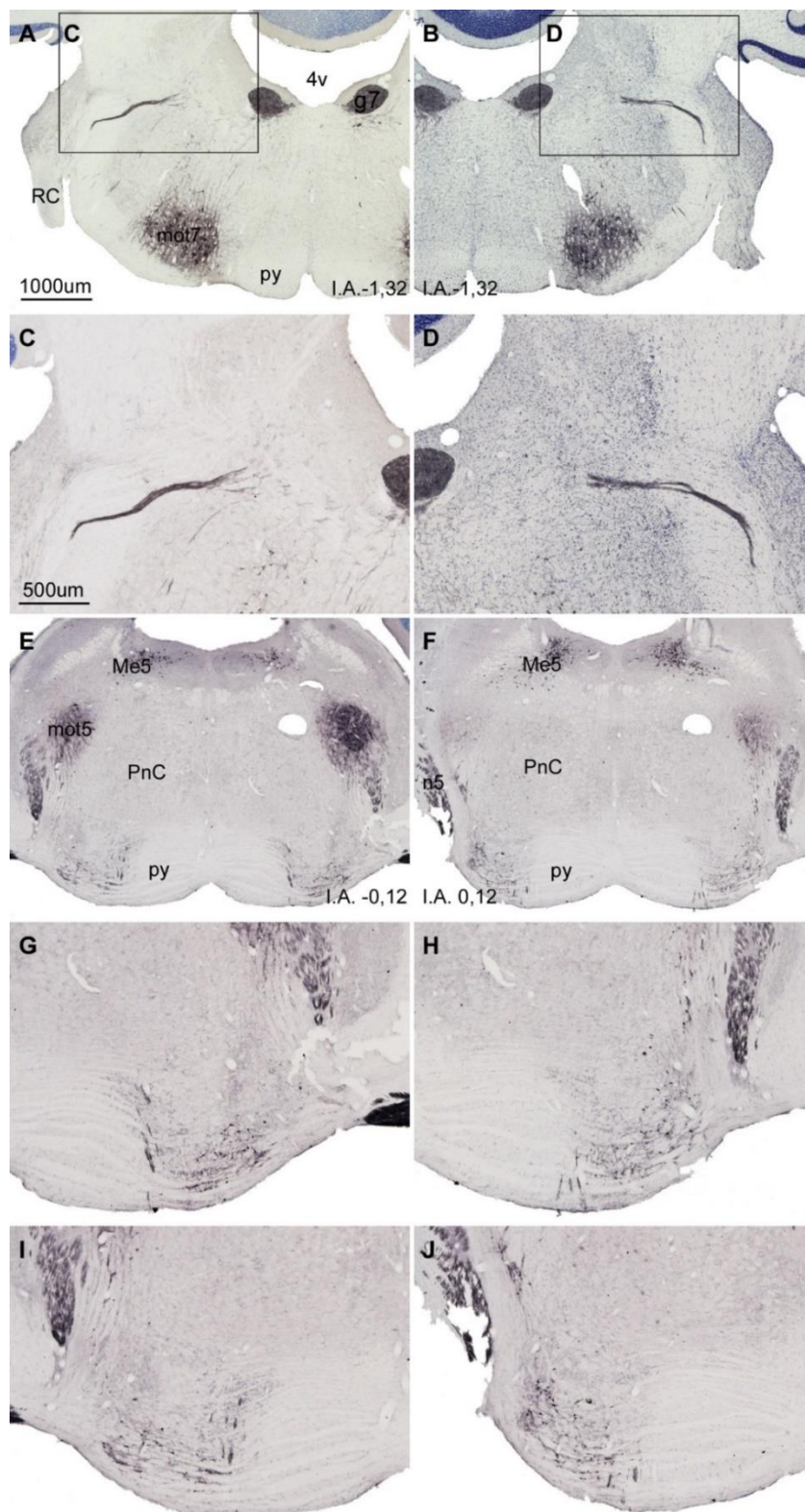


FIGURA 16 – Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos do grupo controle após imunohistoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A e B, ambos antímeros de um caso controle. Os quadrados destacam o OCB que é visualizado em maior aumento em C e D. Em E e F, dois níveis ideais para de lesão no VNTB. Em G e I imagens em maior aumento destacando o VNTB de ambos os lados no nível I. A. -0,12. Em H e J, imagens em maior aumento detacando o VNTB de ambos lados no nível I. A. 0,12. A barra de calibração indicada em A também é válida para B, E e F, enquanto que a barra indicada em C também é válida para D, G, H, I e J.

Nos casos dos grupos Sham e Lesão, após imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração com a técnica de Nissl, o local da lesão na região do OCB foi identificado e delimitado para realização de morfometria. A lesão eletrolítica provoca gliose que pode ser facilmente observada, acompanhada de perda de imunoreatividade para ChAT no OCB (Figura 17). Os casos foram considerados válidos somente quando obtivemos sucesso na realização da lesão bilateral, com perda total do OCB em ambos grupos (Quadro 2, apêndice G).

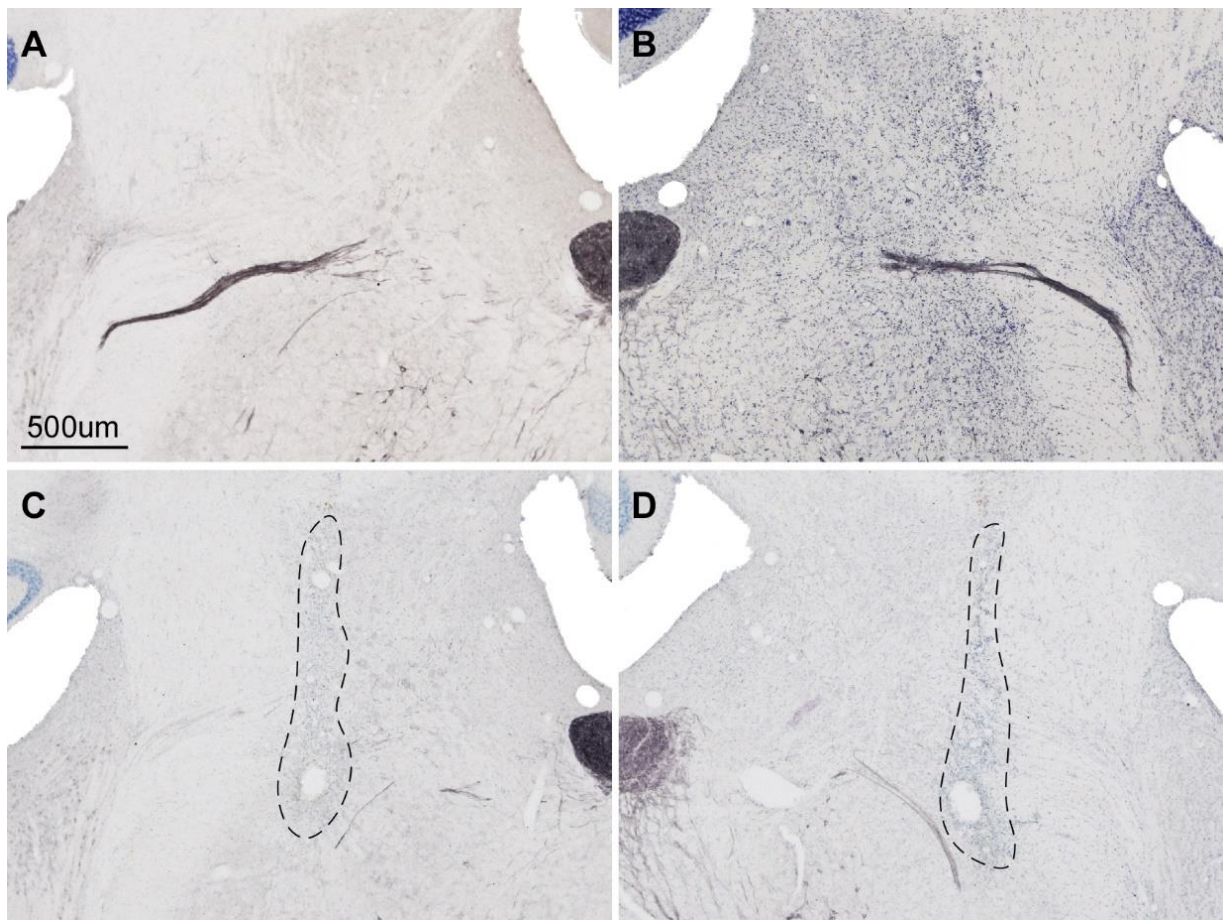


FIGURA 17 – Fotomicrografias de cortes coronais de um caso controle (A e B) e de um caso em que foi realizada a lesão no OCB (C e D). Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. As áreas circundadas pela linha tracejada em C e D evidenciam o local da lesão. A barra de calibração em A também é válida para B, C e D.

A análise morfométrica das lesões no OCB possibilitou mensurar sua área nas secções onde as lesões apresentavam-se mais desenvolvidas, bem como a extensão da lesão no eixo antero-posterior. As lesões em OCB apresentaram área média de $238.105,985\mu\text{m}^2 (+101606,6753\mu\text{m}^2)$ e extensão média de $498\mu\text{m} (+148,38\mu\text{m})$ (Quadro 3). Isto demonstra que o método utilizado produz lesões no OCB reprodutíveis e de tamanho suficiente para interromper este feixe de fibras preservando áreas adjacentes.

CASOS DO GRUPO SHAM – LESÃO EM OCB		
CASO	Lesão OCB direito	Lesão OCB esquerdo
N301/2014	Total	Ausente (local da lesão 300um rostral)
N304/2014	Ausente (local da lesão 300um rostral)	Ausente (local da lesão 300um rostral)
N305/2014	Total	Total
N306/2014	Total	Total
N309/2014	Ausente (local da lesão 300um rostral e 200um ventral)	Ausente (local da lesão 300um rostral e 200um ventral)
N311/2014	Ausente (local da lesão 300um caudal)	Ausente (local da lesão 300um caudal)
N396/2014	Ausente (local da lesão 300um caudal)	Ausente (local da lesão 300um caudal)
N397/2014	Ausente (local da lesão 300um caudal)	Ausente (local da lesão 300um caudal)
N400/2014	Ausente (local da lesão 600um caudal)	Ausente (local da lesão 600um caudal)
N402/2014	Ausente (local da lesão 600um caudal)	Ausente (local da lesão 600um caudal)
N404/2014	Ausente (local da lesão 300um caudal)	Ausente (local da lesão 300um caudal)
N406/2014	Total	Total
N420/2014	Total	Total
N421/2014	Ausente (local da lesão 300um caudal)	Ausente (local da lesão 300um caudal)
N422/2014	Ausente (local da lesão 300um caudal)	Ausente (local da lesão 300um caudal)
N441/2014	Total	Total
N442/2014	Total	Total
N443/2014	Ausente (local da lesão 300um rostral)	Ausente (local da lesão 300um rostral)
N447/2014	Ausente (local da lesão 900um rostral)	Ausente (local da lesão 900um rostral)
N448/2014	Total	Total
N460/2014	Total	Total
N467/2014	Ausente	Ausente
N470/2014	Total	Total
N491/2014	Total	Total
N493/2014	Total	Total
N499/2014	Total	Total

QUADRO 2. Quadro sinóptico da análise morfológica das lesões no OCB, nos casos experimentais do grupo Sham. Foram consideradas ausentes as lesões que não atingiram o local de interesse, estando portanto rostrais ou caudais, e totais nas quais foi constatada gliose e interrupção de fibras imunorreativas para ChAT distalmente a lesão (sombreado em cinza).

Análise das lesões no VNTB

A análise dos casos do grupo lesão, após o mesmo processamento morfológico realizado no grupo Sham, foi realizada a partir da comparação das lesões no VNTB com regiões equivalentes de um caso controle (Figura 18), o que auxiliou a análise crítica da extensão da lesão e a avaliação do envolvimento de estruturas adjacentes. As lesões no VNTB foram identificadas e delimitadas a partir das áreas de gliose causadas pela injeção da droga imunotóxica Anti-ChAT-Saporina. Foram utilizados para o estudo comportamental apenas os casos nos quais foi verificada lesão bilateral, excluindo das análises subsequentes os casos onde a lesão foi unilateral ou não pôde ser observada (Quadro 4, apêndice H).

A análise morfométrica das lesões no VNTB (grupo Lesão) possibilitou mensurar sua área nas secções onde as lesões apresentavam-se mais desenvolvidas. As lesões no VNTB tiveram como área média $380.307,220\mu\text{m}^2$ ($\pm 83345,041\mu\text{m}$), o que demonstra uma área grande o suficiente para atingir o local de interesse sem lesionar áreas adjacentes. Estas lesões se estenderam em média no eixo ântero-posterior por $658\mu\text{m}$ ($\pm 91,152\mu\text{m}$) com o centro da lesão entre os níveis I.A -0,12 e 0,12 (Quadro 5). Com esses resultados é possível determinar que as lesões no VNTB tiveram tamanho suficiente em área e extensão, pois os neurônios marcados retrogradamente após injeção de FG na raiz coclear se situam entre os níveis interaurais -0,40 ao 0,00, equivalendo a um intervalo de $400\mu\text{m}$.

Além disso, outra forma de certificar a efetividade das lesões seletivas no VNTB foi observar na raiz coclear, a presença de fibras nervosas colinérgicas de passagem (provavelmente parte do OCB) ou formando campos terminais nas imediações dos CRN (inervação dos CRN por neurônios não olivococleares do VNTB).

Caso e antímero	Area (um)	extensão AP (um)
N305 OCBd	143.170,917	450
N305 OCBe	155.700,422	600
N306 OCBd	143.597,314	450
N306 OCBe	162.932,767	600
N386 OCBd	143.810,512	450
N386 OCBe	142.974,118	450
N390 OCBd	223.185,911	600
N390 OCBe	143.777,712	450
N406 OCBd	192.871,885	600
N406 OCBe	134.046,002	450
N420 OCBd	208.897,805	600
N420 OCBe	189.753,757	600
N428 OCBd	378.808,552	750
N428 OCBe	199.899,182	600
N429 OCBd	596.244,586	900
N429 OCBe	279.011,729	600
N430 OCBd	236.366,626	600
N430 OCBe	206.512,124	600
N440 OCBd	186.765,378	600
N440 OCBe	409.947,974	750
N441 OCBd	200.066,598	600
N441 OCBe	144.689,490	450
N442 OCBd	236.207,580	600
N442 OCBe	133.351,225	450
N448 OCBd	327.020,626	450
N448 OCBe	303.631,416	450
N457 OCBd	171.215,735	300
N457 OCBe	151.164,841	300
N459 OCBd	220.862,167	300
N459 OCBe	220.656,410	300
N460 OCBd	235.920,284	300
N460 OCBe	475.678,581	600
N469 OCBd	271.671,762	450
N469 OCBe	148.322,024	300
N470 OCBd	277.932,679	300
N470 OCBe	266.116,299	300
N491 OCBd	392.060,923	600
N491 OCBe	356.739,893	450
N493 OCBd	190.192,413	300
N493 OCBe	224.430,309	300
N499 OCBd	230.761,832	300
N499 OCBe	343.483,007	450
média	238.105,985	489
desvio padrão	101606,6753	148,38

QUADRO 3. Quadro sinóptico da análise morfométrica das lesões no OCB nos casos experimentais do grupo Sham e Lesão. A área foi mensurada da secção com a lesão mais evidente e a extensão foi calculada contando-se os cortes coronais que possuíam lesão aparente.

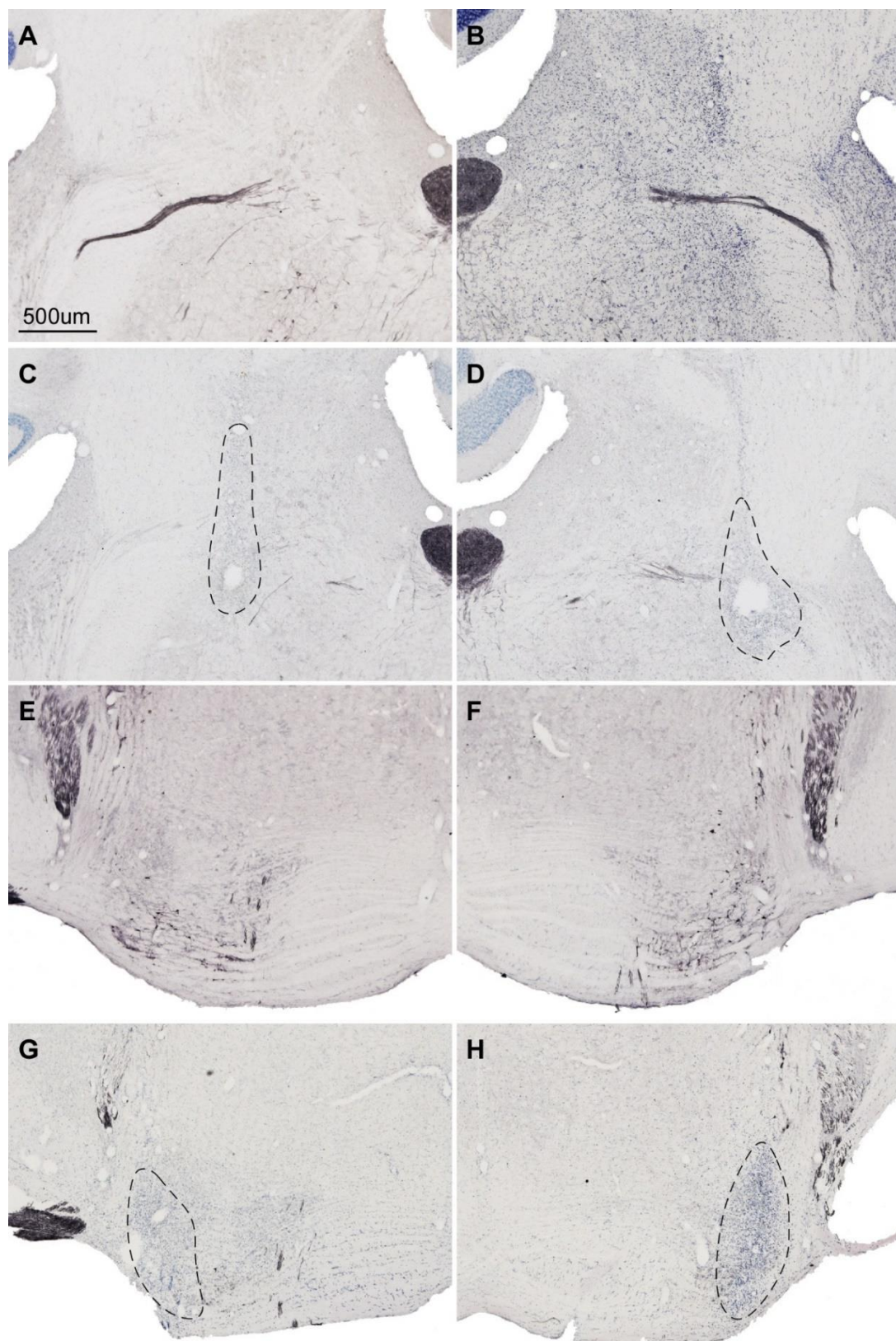


FIGURA 18 – Fotomicrografias de cortes coronais de um caso controle (A, B, E e F) e de um caso do grupo Lesão (C, D, G e H) nos quais foi realizada lesão no OCB e no VNTB. Os cortes foram submetidos ao protocolo de imunohistoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. As áreas circundadas pela linha tracejada em C, D, G e H evidenciam o local da lesão A barra de calibração em A também é válida para B, C, D, E, F, G e H.

CASOS DO GRUPO LESÃO - LESÃO VNTB-OCB				
CASO	Lesão OCB direito	Lesão OCB esquerdo	Lesão VNTB direito	Lesão VNTB esquerdo
N268/2014	Parcial	Total	Porção rostral (I.A. -0,48) extensão: 900um	Ausente
N272/2014	Parcial	Total	Ausente	Ausente
N273/2014	Ausente (local de lesão 300um rostral)	Ausente (local de lesão 300um rostral)	Lesão caudal (I.A. -0,60) em LSO e VNTB extensão: 600um	Ausente
N275/2014	Ausente (local de lesão 300um rostral)	Ausente (local de lesão 300um rostral)	Lesão caudal (I.A. -1,20) em LSO	Ausente
N276/2014	Total	Parcial	Porção rostral (I.A. -0,24) extensão: 900um	Ausente
N277/2014	Ausente (local de lesão 300um rostral)	Ausente (local de lesão 300um rostral)	Porção rostral (I.A. 0,00) extensão: 600um	Ausente
N281/2014	Total	Ausente (local de lesão 300um rostral)	Lesão caudal (I.A. -1,20) em LSO e VNTB, extensão: 1200um	Ausente
N386/2014	Total	Total	Total	Total
N390/2014	Total	Total	Total	Total
N389/2014	Ausente (local de lesão 300um caudal)	Ausente (local de lesão 300um caudal)	Parcial (local de lesão 300um caudal)	Parcial (local de lesão 300um caudal)
N391/2014	Ausente (local de lesão 300um caudal)	Ausente (local de lesão 300um caudal)	Ausente	Ausente
N395/2014	Ausente	Total	Ausente	Total
N403/2014	Total	Total	Parcial VNTB / MNTB	Parcial VNTB / MNTB
N407/2014	Ausente (local da lesão 600um caudal)	Ausente (local da lesão 600um caudal)	Parcial VNTB / MNTB	Parcial VNTB / MNTB
N408/2014	Ausente	Ausente	Parcial VNTB / LSO	Parcial VNTB / MNTB
N417/2014	Ausente (local da lesão 300um caudal)	Ausente (local da lesão 300um caudal)	Parcial VNTB / MNTB	Parcial VNTB / MNTB
N418/2014	Ausente (local da lesão 300um caudal)	Ausente (local da lesão 300um caudal)	Parcial VNTB / MNTB	Parcial VNTB / MNTB
N426/2014	Total	Total	Ausente	Total
N427/2014	Ausente (local da lesão 300um rostral)	Ausente (local da lesão 300um rostral)	Total	Total
N428/2014	Total	Total	Total	Total
N429/2014	Total	Total	Total	Total
N430/2014	Total	Total	Total	Total
N438/2014	Total	Ausente (local da lesão 300um rostral)	Total	Total
N440/2014	Total	Total	Total	Total
N456/2014	Ausente	Total	Ausente	Ausente
N457/2014	Total	Total	Total	Total
N458/2014	Total	Ausente	Parcial VNTB / MNTB	Ausente
N459/2014	Total	Total	Total	Total
N461/2014	Ausente (local da lesão 600um rostral)	Ausente (local da lesão 600um rostral)	Ausente	Total
N465/2014	Ausente (local da lesão 300um caudal)	Ausente (local da lesão 300um caudal)	Total	Total
N469/2014	Total	Total	Total	Total

QUADRO 4. Quadro sinóptico da análise morfológica das lesões bilaterais no OCB e no VNTB nos casos experimentais do grupo Lesão. Foram consideradas ausentes as lesões que não atingiram o local de interesse, situando-se rostrais ou caudais. As lesões foram consideradas totais quando foi constatada gliose e ausência de células e fibras imunorreativas para ChAT no OCB e no VNTB (sombreado em cinza).

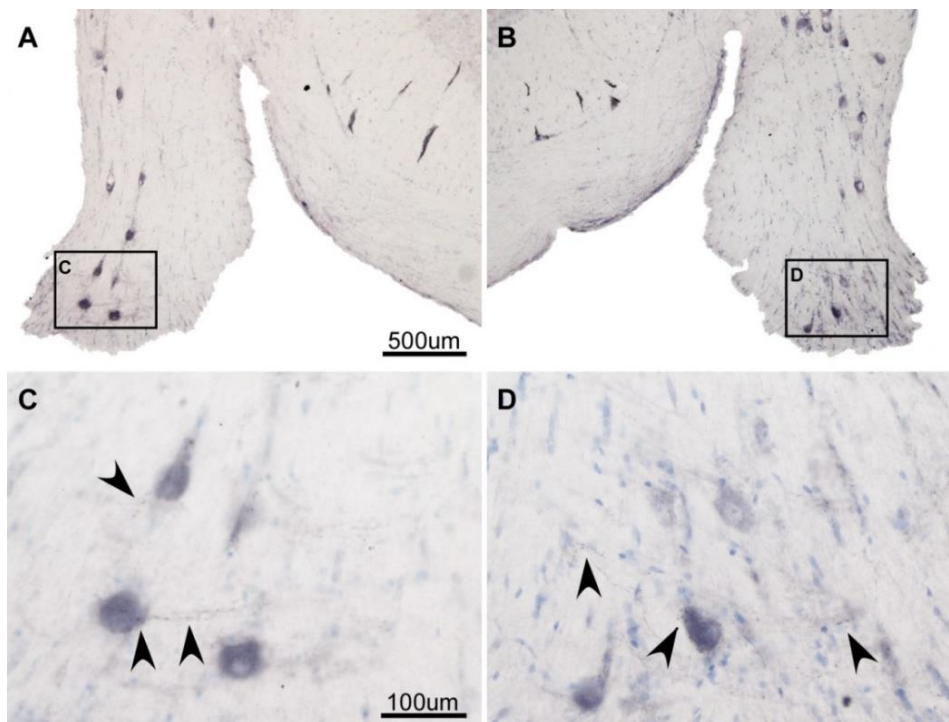


FIGURA 19 – Fotomicrografias de cortes coronais da raiz coclear após imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pela técnica de Nissl em animal do grupo Sham. Em A e B, raiz coclear de ambos antímeros. Em C e D, fotomicrografias em maior aumento das regiões destacadas em A e B. As cabeças de seta indicam fibras nervosas com varicosidades imunorreativas para ChAT em aposição aos CRN. A barra de calibração em A também é válida para B e a barra em C também é válida para D.

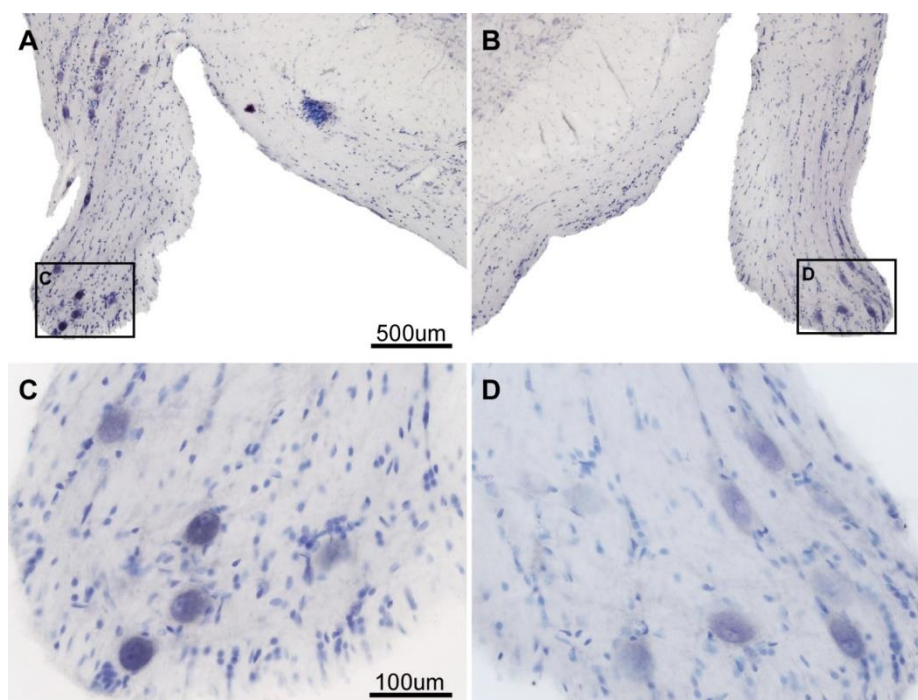


FIGURA 20 – Fotomicrografias de cortes coronais da raiz coclear após imuno-histoquímica para ChAT contracolorados pelo método de Nissl em animal do grupo Lesão. Em A e B, raiz coclear de ambos antímeros. Em C e D, fotomicrografias em maior aumento das regiões destacadas em A e B. Nota-se a ausência de fibras colinérgicas na raiz coclear. A barra de calibração em A também é válida para B e a barra em C também é válida para D.

Nos casos do grupo Sham, não foram observadas fibras nervosas de passagem, medialmente na CR, na posição típica do OCB. No entanto, foi possível a visualização de fibras nervosas colinérgicas formando campos terminais com varicosidades em aposição aos CRN (Figura 19), confirmando experimentos anteriores realizados em nosso laboratório e dados descritos em literatura, sobre a projeção de neurônios colinérgicos do VNTB aos CRN através do corpo trapezoide (Gomez-Nieto, Rubio et al. 2008, Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013). Nos casos lesão, houve ausência de fibras de passagem e de botões e fibras ChAT positivas sobre os CRN após a lesão da parte rostral do VNTB (Figura 20), o que apoia o indicativo de lesão dos neurônios colinérgicos deste núcleo que se projetam aos CRN.

Caso	Antímero	Area (μm^2)	Extensão AP (μm)
N386	Direito	331.221,000	600
N386	Esquerdo	256.580,000	600
N390	Direito	337.159,000	600
N390	Esquerdo	626.391,000	900
N428	Direito	374.786,377	600
N428	Esquerdo	290.144,909	600
N429	Direito	462.554,343	750
N429	Esquerdo	371.630,581	600
N430	Direito	420.553,793	750
N430	Esquerdo	476.361,998	750
N440	Direito	331.639,025	600
N440	Esquerdo	364.113,591	600
N457	Direito	327.453,138	600
N457	Esquerdo	314.628,964	600
N459	Direito	407.576,928	750
N459	Esquerdo	405.636,926	750
N469	Direito	352.438,021	600
N469	Esquerdo	394.660,374	600
Média		380.307,220	658
Desvio padrão		83345,041	91,152

QUADRO 5. Quadro sinóptico da análise morfométrica das lesões no VNTB nos casos experimentais do grupo Lesão. A área foi mensurada da secção com a lesão mais evidente e a extensão foi calculada contando-se os cortes coronais que possuíam lesão aparente.

A análise dos neurônios imunorreativos a ChAT no VNTB, a partir da contagem semiquantitativa de uma série de cada caso experimental dos grupos Sham e Lesão, revelou que houve uma redução de 56,86% de neurônios colinérgicos nos casos do grupo Lesão ($29,30 \pm 12,72$) quando comparados ao grupo Sham ($67,80 \pm 14,43$), o que demonstra a boa eficácia das lesões realizadas.

Análise dos neurônios imunorreativos para FOS em núcleos da via auditiva

A análise de 3 casos de cada grupo experimental após imuno-histoquímica para evidenciar FOS, demonstrou imunorreatividade em núcleos da via auditiva como seria esperado já que os animais foram perfundidos após a última seção de avaliação do RAS e PPI. Entre os núcleos auditivos marcados, foram analisados os CN (Figura 21), como representantes da via auditiva que recebem influencia direta dos aferentes cocleares primários e o IC (Figura 22) por ser um núcleo auditivo reconhecidamente relacionado com a PPI (Fendt, Li et al. 2001). Em todos os grupos experimentais foram visualizados núcleos celulares imunorreativos a FOS em todo DCN de ambos os lados, já em VCP e VCA foram visualizados núcleos marcados apenas na região da concha externa (Figura 21). No IC, foram visualizados núcleos imunorreativos a FOS em todas as suas porções: núcleo central, córtex dorsal e córtex externo (Figura 22). A densidade média de neurônios imunorreativos a FOS em cada grupo experimental está indicada no Quadro 6 (apêndice I).

Grupo	Densidade média IC - direito	densidade média IC - esquerdo	Densidade média CN - direito	densidade média CN - esquerdo
LESÃO	31,34 (+-19,92)	26,68 (+-13,42)	39,27 (+-17,45)	34,68 (+-24,09)
SHAM	76,14 (+-56,24)	66,88 (+-37,34)	55,83 (+-17,23)	61,34 (+-33,08)
CONTROLE	16,87 (+-4,54)	19,44 (+-3,73)	36,25 (+-8,95)	41,67 (+-10,54)

QUADRO 6. Quadro sinóptico da densidade média de neurônios imunorreativos a FOS no IC e nos CN dos grupos Lesão, Sham e Controle. Os dados estão expressos em nº de neurônios por mm².

A análise semiquantitativa de três animais de cada grupo permitiu observar a maior densidade células imunorreativas a FOS no grupo Sham, tanto no IC quanto nos CN, quando comparado ao grupo controle. A análise estatística dos dados indicou que não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto à imunorreatividade para FOS nos CN. Por outro lado, a análise dos dados provenientes do IC, indicou diferenças significativas entre o grupo Sham e os grupos Lesão e Controle. Não houve diferenças significativas entre os grupos Controle e Lesão no IC (Figura 23).

A preresença de imunorreatividade no CN e IC nos grupos Sham e Lesão com densidade maior ou igual ao grupo Controle, permite inferir que, apesar da complexidade do procedimento cirúrgico estereotáxico, que depende da fixação do animal por meio de barras auriculares para acesso ao VNTB e ao OCB, a via auditiva não foi danificada durante este procedimento.

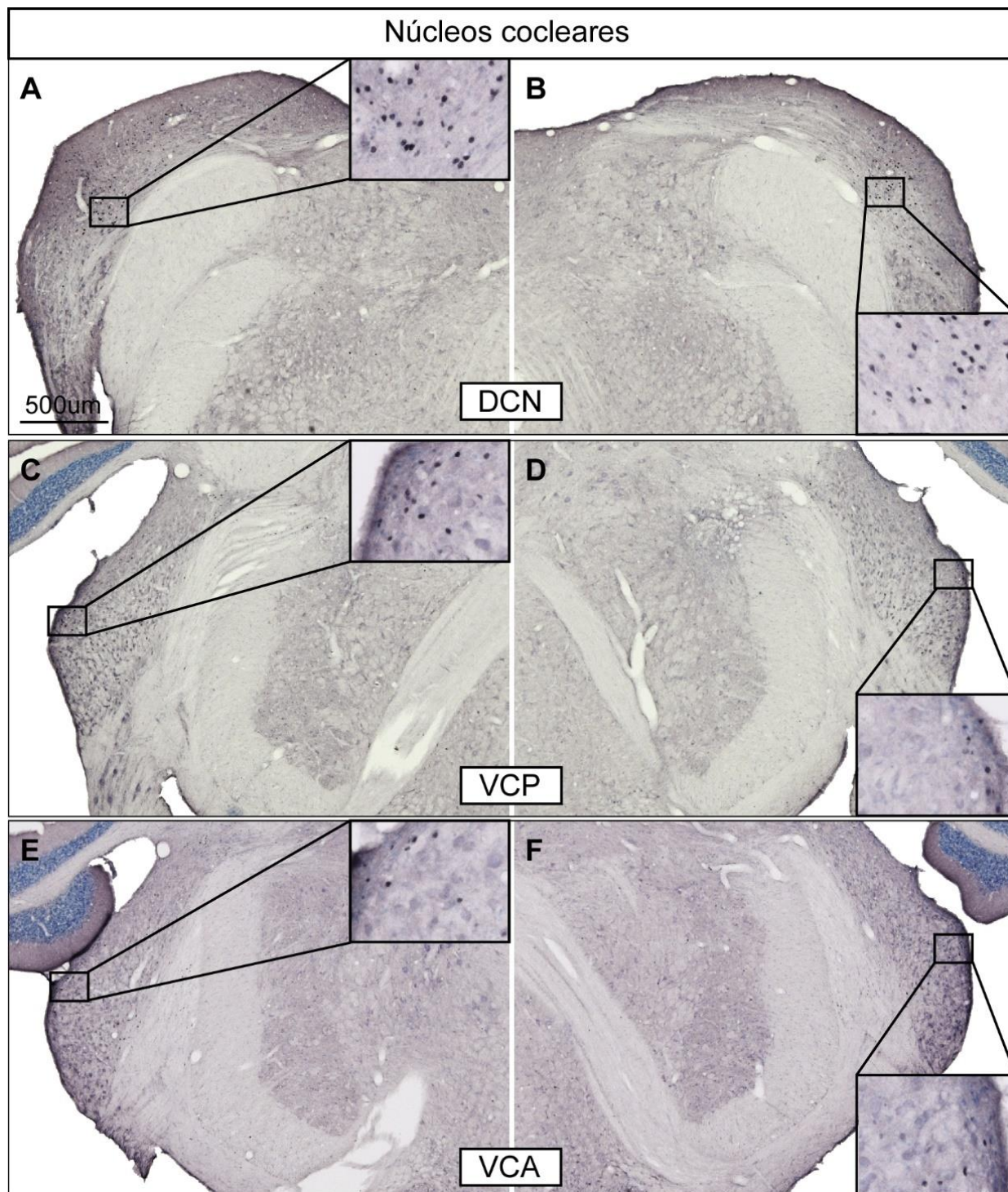


FIGURA 21 – Fotomicrografias de cortes coronais dos CN de um caso experimental controle após imunohistoquímica para FOS evidenciando as áreas que foram analisadas de cada grupo. Em todas as imagens em menor aumento a área delimitada pelo retângulo está ampliada para observação dos núcleos imunorreativos. Em A e B, DCN de cada lado. Em C e D, VCP de cada lado. Em E e F, VCA de cada lado. A barra de calibração em A também é válida para C, D, E e F.

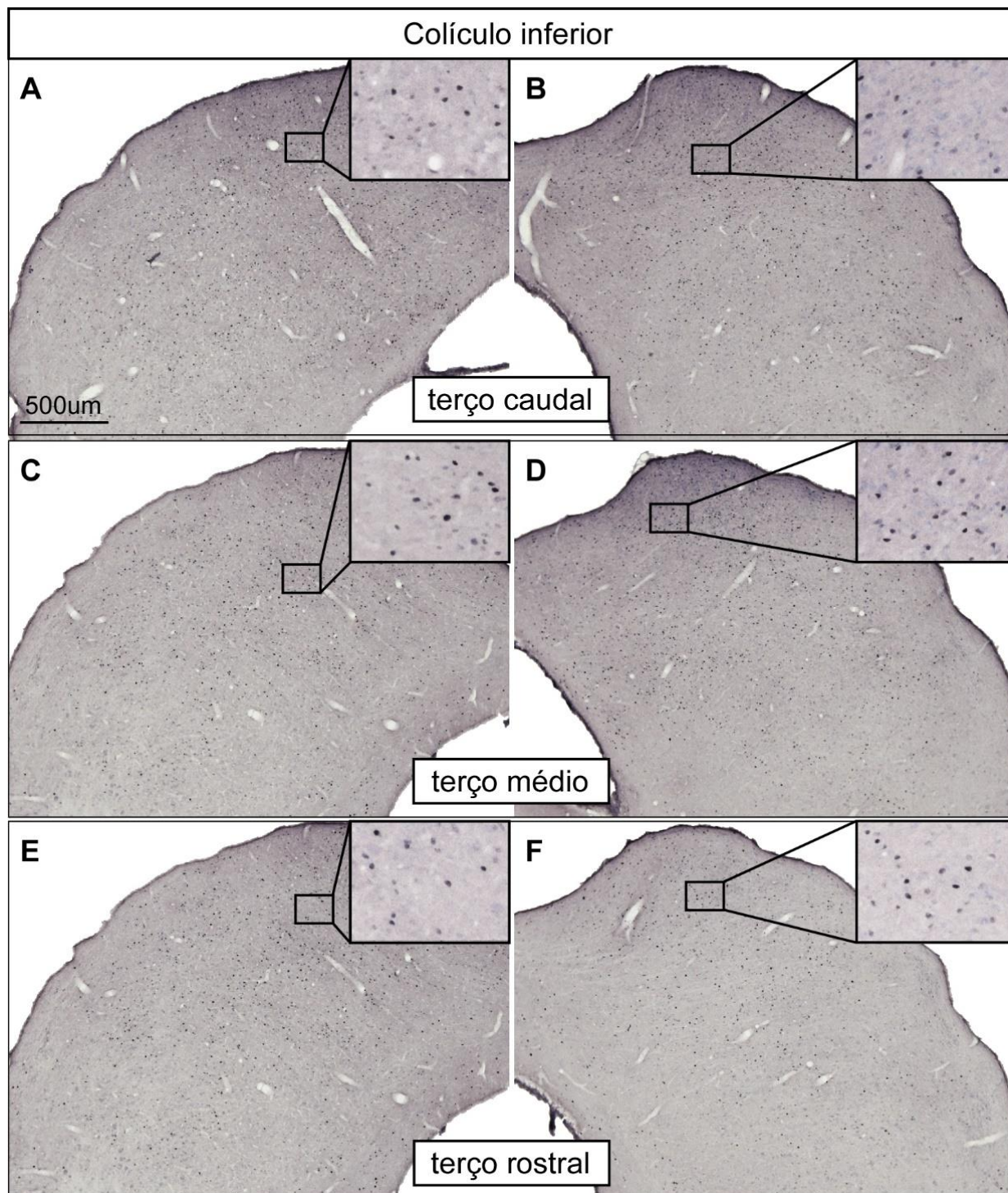


FIGURA 22 – Fotomicrografias de cortes coronais do CI de um caso experimental controle após imuno-histoquímica para FOS evidenciando as áreas que foram analisadas de cada grupo. Em todas as imagens em menor aumento a área delimitada pelo retângulo está ampliada para observação dos núcleos imunorreativos. Em A e B, terzo caudal do IC de cada lado. Em C e D, terzo médio do IC de cada lado. Em E e F, terzo rostral do IC de cada lado. A barra de calibração em A também é válida para C, D, E e F.

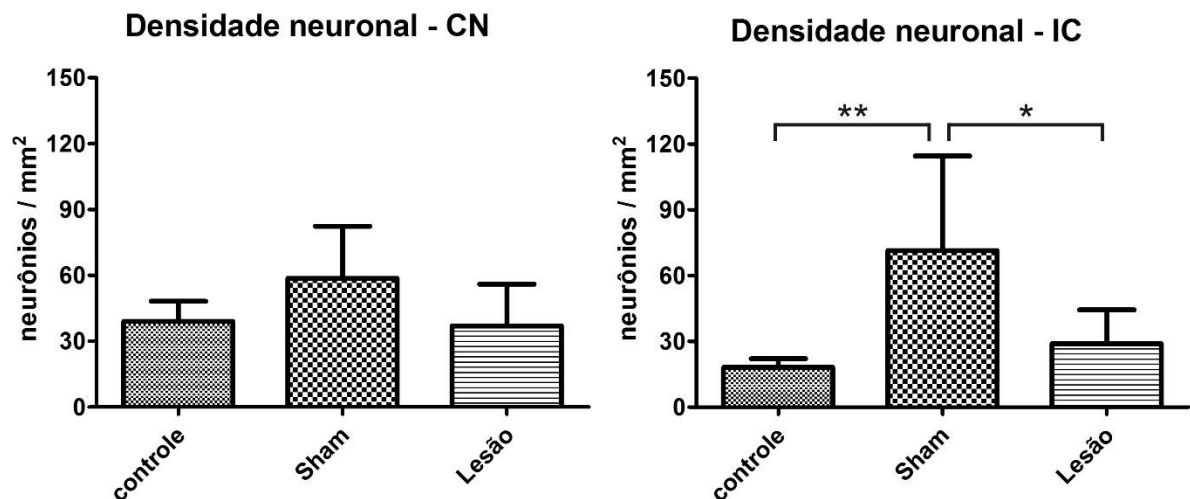


FIGURA 23 - Gráficos de densidade de neurônios imunorreativos a FOS nos CN e no IC. As barras de erro indicam o desvio-padrão (*= p<0,05, **=p<0,01).

Avaliação comportamental do RAS e da PPI

O peso dos animais de todos os grupos foi mensurado em todos os momentos de avaliação comportamental: pré-lesão (inicial), 7, 14 e 21 dias pós-lesão para posterior análise da amplitude do RAS em cada momento ponderada pelo peso. A análise estatística indicou que o peso difere significativamente entre os momentos de avaliação em todos os grupos e no momento 7 dias entre os grupos Lesão e Controle.

ANÁLISE DO PESO DOS ANIMAIS					
Grupo	Momento da avaliação				Valor p*
	pré-lesão (inicial)	7 dias	14 dias	21 dias	
Lesão	$\bar{x} = 230,9 (\pm 17,9)$	$\bar{x} = 206,5 (\pm 26,5)$	$\bar{x} = 224,8 (\pm 26,2)$	$\bar{x} = 238,8 (\pm 18,8)$	<0,001
	231,0(205-255) ^B	209,0(164-243) ^{aA}	229,0(183-260) ^{AB}	236,5(215-260) ^B	
Sham	$\bar{x} = 221,6 (\pm 12,2)$	$\bar{x} = 214,2 (\pm 9,6)$	$\bar{x} = 225,9 (\pm 11,9)$	$\bar{x} = 230,8 (\pm 12,3)$	<0,001
	220,0(198-245) ^{AB}	218,5(190-223) ^{abA}	225,5(206-253) ^{BC}	229,5(210-260) ^C	
Controle	$\bar{x} = 229,7 (\pm 16,5)$	$\bar{x} = 235,2 (\pm 16,4)$	$\bar{x} = 240,5 (\pm 14,9)$	$\bar{x} = 238,7 (\pm 13,5)$	0,002
	227,0(207-255) ^A	235,50(212-260) ^{bAB}	238,5(222-266) ^B	237,0(222-262) ^B	
Valor p*	0,392	0,031	0,168	0,528	

TABELA 1: Análise do peso dos animais nos momentos pré-lesão (inicial), 7, 14 e 21 dias. Comparação dos grupos e dos momentos por meio das medianas (teste não paramétrico). Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre os grupos. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os momentos dentro de cada grupo.

Embora a análise dos dados de amplitude média do RAS ponderados pelo peso nos indicassem diferenças entre os grupos experimentais em todos os momentos, inclusive no momento pré-lesão, não foram encontradas diferenças significativas entre os momentos em cada grupo experimental. Assim, podemos concluir que tanto a lesão no OCB isolada como a lesão conjunta do OCB e do VNTB não modificam significativamente a amplitude média do RAS. Nos animais pertencentes ao grupo Sham observou-se que após a lesão bilateral do OCB, a amplitude média do RAS aumentou gradativamente a partir do momento 7 dias até aos 21 dias pós-lesão (Tabela 2). Para o grupo Lesão, o mesmo tipo de análise resultou, com relação ao momento pré-lesão, em uma diminuição da amplitude média do RAS aos 7 dias com recuperação gradual aos 14 e 21 dias pós-lesão aproximando-se dos valores pré-lesão.

ANÁLISE DA AMPLITUDE MÉDIA DO RAS					
Grupo	Momento da avaliação				Valor p
	Pré-lesão (inicial)	7 dias	14 dias	21 dias	
Lesão	$\bar{x} = 2,71(\pm 0,86)$ 2,74(1,36-4,29) ^a	$\bar{x} = 1,61(\pm 1,24)$ 1,26(0,22-4,08) ^a	$\bar{x} = 2,16(\pm 1,00)$ 2,11(0,98-3,88) ^a	$\bar{x} = 2,29(\pm 0,95)$ 2,21(1,11-3,60) ^a	0,241
Sham	$\bar{x} = 4,38(\pm 1,61)$ 4,46(2,01-6,86) ^{ab}	$\bar{x} = 4,55(\pm 1,99)$ 3,82(2,04-7,70) ^b	$\bar{x} = 4,79(\pm 1,66)$ 5,40(2,58-7,20) ^b	$\bar{x} = 5,24(\pm 1,66)$ 5,94(1,75-7,33) ^b	0,407
Controle	$\bar{x} = 5,78(\pm 0,56)$ 5,73(5,11-6,53) ^b	$\bar{x} = 5,11(\pm 1,95)$ 5,37(2,63-7,13) ^b	$\bar{x} = 5,88(\pm 0,97)$ 5,68(4,76-7,61) ^b	$\bar{x} = 5,89(\pm 1,32)$ 6,07(4,02-7,67) ^b	0,457
Valor p	0,003	0,003	0,001	<0,001	

TABELA 2: Análise da amplitude média do RAS nos momentos pré-lesão (inicial), 7, 14 e 21 dias. Duas medianas seguidas de letras minúsculas distintas diferem quanto os respectivos grupos, fixado o momento ($p < 0,05$). Não houve diferenças quanto os respectivos momentos, fixado o grupo ($p < 0,05$).

Os dados relacionados a %PPI global, calculada pela área abaixo da curva de %PPI em todos os ISIs, não identificaram diferenças significativas entre os grupos em nenhum momento. No grupo controle o aumento da %PPI torna-se significativo a partir do 14 dia pós-lesão. No grupo Sham esta análise revelou um grande aumento gradual da %PPI com o passar do tempo pós-lesão, porém sem se tornar significativo estatisticamente. No grupo Lesão também não foi verificada diferença significativa alguma entre os momentos e neste grupo. (Tabela 3).

Grupo	Análise da %PPI global (área abaixo da curva de %PPI em todos os ISIs) nos momentos da avaliação				Valor p
	Pré-lesão (inicial)	7 dias	14 dias	21 dias	
Lesão	$\bar{x} = 57,7(\pm 13,8)$ 59,6(37,9-77,1) ^A	$\bar{x} = 58,9(\pm 15,7)$ 58,3(27,6-80,0) ^A	$\bar{x} = 66,8(\pm 10,7)$ 68,9(49,8-79,6) ^A	$\bar{x} = 62,0(\pm 7,9)$ 63,3(47,1-73,0) ^A	0,717
Sham	$\bar{x} = 50,8(\pm 13,0)$ 51,3(27,1-70,8) ^A	$\bar{x} = 56,8(\pm 13,8)$ 59,8(29,1-71,8) ^A	$\bar{x} = 57,2(\pm 13,7)$ 61,2(25,7-71,2) ^A	$\bar{x} = 60,8(\pm 11,6)$ 61,9(37,5-76,6) ^A	0,079
Controle	$\bar{x} = 49,0(\pm 17,0)$ 47,4(22,6-71,0) ^A	$\bar{x} = 58,1(\pm 12,5)$ 58,6(38,0-76,9) ^{AB}	$\bar{x} = 60,3(\pm 15,3)$ 60,3(33,4-77,8) ^B	$\bar{x} = 61,7(\pm 11,6)$ 62,9(43,0-76,6) ^B	0,014
Valor p	0,489	0,986	0,248	0,935	

TABELA 3: Análise da %PPI global nos momentos pré-lesão, 7, 14 e 21 dias. Média (desvio padrão) e Mediana (mínimo e máximo) da %PPI segundo grupo e momento da avaliação, independente do ISI (área abaixo da curva de %PPI em todos os ISIs no eixo X). Duas medianas seguidas de letras maiúsculas distintas diferem quanto os respectivos momentos, fixado o grupo ($p < 0,05$).

Os dados de %PPI analisados segundo grupo, momento e ISI (Tabela 4), indicaram que no grupo Controle as %PPI aumentaram com o tempo, tornando-se diferentes significativamente nos ISI de 25, 50 e 100ms. No grupo Sham o aumento da %PPI esteve relacionado somente ao ISI de 50ms entre os momentos pré-lesão e 21 dias pós-lesão. Por outro lado, no grupo Lesão não foi observada nenhuma diferença significativa. A comparação da evolução das %PPI com o tempo indica que nos grupos em que o VNTB está intacto (grupo Sham e Controle) houve aumento da %PPI e no grupo em que o VNTB foi lesionado (grupo lesão) não ocorreu o aumento da %PPI, sugerindo uma participação do VNTB no sentido de promover influência inibitória responsável pelo aumento da %PPI. A comparação entre os grupos Sham e Lesão, ambos com ablação do OCB, evidencia ainda a participação mais provável do VNTB no ISI de 50ms.

Grupo	ISI	Análise da %PPI nos momentos da avaliação para casa ISI			
		Pré-lesão (inicial)	7 dias	14 dias	21 dias
Lesão	25	$\bar{x} = 71,8(\pm 11,3)$ 73,1(53,4-89,6) ^{aAα}	$\bar{x} = 64,1(\pm 32,6)$ 72,4(-11,6-93,2) ^{aAα}	$\bar{x} = 76,1(\pm 12,4)$ 78,6(52,9-91,1) ^{aAα}	$\bar{x} = 66,6(\pm 22,1)$ 75,9(25,5-84,8) ^{aAα}
	50	$\bar{x} = 61,0(\pm 21,0)$ 64,6(30,1-86,8) ^{aAα}	$\bar{x} = 64,9(\pm 25,0)$ 68,4(14,3-89,2) ^{aAα}	$\bar{x} = 77,0(\pm 16,4)$ 79,7(43,5-94,6) ^{aAα}	$\bar{x} = 71,7(\pm 10,0)$ 70,8(57,9-90,4) ^{aAα}
	100	$\bar{x} = 63,7(\pm 20,9)$ 65,5(28,7-91,9) ^{aAα}	$\bar{x} = 65,4(\pm 18,8)$ 68,7(37,0-88,4) ^{aAα}	$\bar{x} = 71,8(\pm 17,9)$ 73,1(45,8-93,2) ^{aAα}	$\bar{x} = 69,3(\pm 17,0)$ 69,4(43,5-89,1) ^{aAα}
	150	$\bar{x} = 58,8(\pm 14,5)$ 62,2(34,0-81,0) ^{aAα}	$\bar{x} = 72,8(\pm 11,0)$ 75,5(52,3-84,9) ^{bAα}	$\bar{x} = 71,5(\pm 13,2)$ 76,1(52,6-87,9) ^{aAα}	$\bar{x} = 68,3(\pm 11,3)$ 69,6(52,6-85,7) ^{aAα}
Sham	25	$\bar{x} = 63,4(\pm 16,5)$ 63,3(35,9-83,8) ^{aAα}	$\bar{x} = 65,7(\pm 17,2)$ 69,8(30,1-84,1) ^{aAα}	$\bar{x} = 67,7(\pm 19,3)$ 72,7(16,0-86,1) ^{aAα}	$\bar{x} = 71,2(\pm 15,7)$ 74,4(42,5-91,4) ^{aAα}
	50	$\bar{x} = 56,0(\pm 15,4)$ 61,5(22,3-78,1) ^{aAα}	$\bar{x} = 66,9(\pm 17,5)$ 69,0(29,6-87,3) ^{aBα}	$\bar{x} = 64,2(\pm 15,4)$ 68,7(33,3-82,6) ^{aBα}	$\bar{x} = 70,0(\pm 13,1)$ 69,7(46,2-88,7) ^{aBα}
	100	$\bar{x} = 55,5(\pm 15,8)$ 54,7(22,2-75,4) ^{aAα}	$\bar{x} = 61,2(\pm 16,0)$ 64,2(38,1-82,4) ^{aAα}	$\bar{x} = 62,5(\pm 14,2)$ 67,6(34,3-78,8) ^{aAα}	$\bar{x} = 64,9(\pm 14,4)$ 69,2(39,2-83,0) ^{aAα}
	150	$\bar{x} = 46,5(\pm 21,5)$ 46,8(5,3-79,8) ^{aAα}	$\bar{x} = 53,8(\pm 16,8)$ 54,5(24,0-80,4) ^{aAα}	$\bar{x} = 56,9(\pm 14,7)$ 57,3(28,3-73,9) ^{aAα}	$\bar{x} = 61,9(\pm 13,6)$ 61,5(26,4-79,2) ^{aAα}
Controle	25	$\bar{x} = 62,2(\pm 16,6)$ 60,5(40,0-88,6) ^{aAα}	$\bar{x} = 68,2(\pm 15,8)$ 70,6(42,2-90,8) ^{aBα}	$\bar{x} = 73,1(\pm 14,9)$ 72,7(47,2-90,5) ^{aBα}	$\bar{x} = 74,1(\pm 9,8)$ 70,9(63,6-89,8) ^{aBα}
	50	$\bar{x} = 58,0(\pm 18,7)$ 57,8(29,1-79,8) ^{aAα}	$\bar{x} = 67,2(\pm 14,3)$ 66,8(46,2-88,4) ^{aBα}	$\bar{x} = 65,6(\pm 18,5)$ 66,3(33,6-88,8) ^{aBα}	$\bar{x} = 71,8(\pm 15,3)$ 74,2(47,1-91,5) ^{aBα}
	100	$\bar{x} = 49,6(\pm 21,7)$ 55,0(13,3-71,7) ^{aAα}	$\bar{x} = 64,0(\pm 13,8)$ 64,3(41,7-81,7) ^{aBα}	$\bar{x} = 69,4(\pm 17,0)$ 72,6(36,4-85,3) ^{aBα}	$\bar{x} = 64,8(\pm 18,0)$ 69,7(36,4-80,5) ^{aBα}
	150	$\bar{x} = 40,0(\pm 25,6)$ 34,3(7,9-74,2) ^{aAα}	$\bar{x} = 52,3(\pm 16,2)$ 52,1(34,6-77,3) ^{aAα}	$\bar{x} = 53,8(\pm 21,3)$ 47,6(26,7-81,0) ^{aAα}	$\bar{x} = 58,7(\pm 12,3)$ 61,7(41,0-70,7) ^{aAα}

TABELA 4: Análise das %PPI nos diferentes ISIs entre os momentos pré-lesão, 7, 14 e 21 dias. Duas medianas seguidas de letras minúsculas distintas diferem quanto os respectivos grupos, fixado o momento e ISI ($p < 0,05$). Duas medianas seguidas de letras maiúsculas distintas diferem quanto os respectivos momentos, fixado o grupo e ISI ($p < 0,05$). Duas medianas seguidas de letras gregas distintas diferem quanto os respectivos ISI, fixado o grupo e momento ($p < 0,05$).

Discussão

O SOC é um grande centro auditivo no tronco encefálico, que não apenas retransmite informação auditiva ascendente proveniente dos núcleos cocleares bilateralmente, aos centros superiores, mas também dá origem a vias descendentes importantes para a cóclea e para os núcleos cocleares (Malmierca and Merchán 2004). Fazem parte deste complexo o LSO, MSO, SPON, VNTB e MNTB, sendo colinérgicos apenas o LSO e o VNTB (Yao and Godfrey 1998).

Neste estudo utilizamos a abreviatura “VNTB” para se referir ao núcleo ventral do corpo trapezoide, conforme MALMIERCA E HACKETT (2010), porém este núcleo pode ser também descrito com a abreviatura “VTz” (Malmierca and Merchán 2004) ou até dividido em duas partes (Paxinos and Watson 2005), MVPO e LVPO, no entanto estas divisões não são utilizadas frequentemente na literatura.

O VNTB possui um padrão de conectividade abrangente com diferentes núcleos do sistema nervoso (Figura 24). Recebe aferências bilateralmente do VCA (Warr 1972, Friauf and Ostwald 1988), do IC (Caicedo and Herbert 1993, Gomez-Nieto, Rubio et al. 2008) e ipsilateralmente do VCP (Thompson 1998). Envia eferências bilateralmente para ambas as cócleas, para os núcleos cocleares dorsal e ventral, para os CRN (Gomez-Nieto, Rubio et al. 2008, Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013), para o PnC (Lingenhöhl and Friauf 1994), contralateralmente para o LSO e ipsilateralmente para o IC (Warr and Beck 1996) e para o MNTB (Albrecht, Dondzillo et al. 2014).

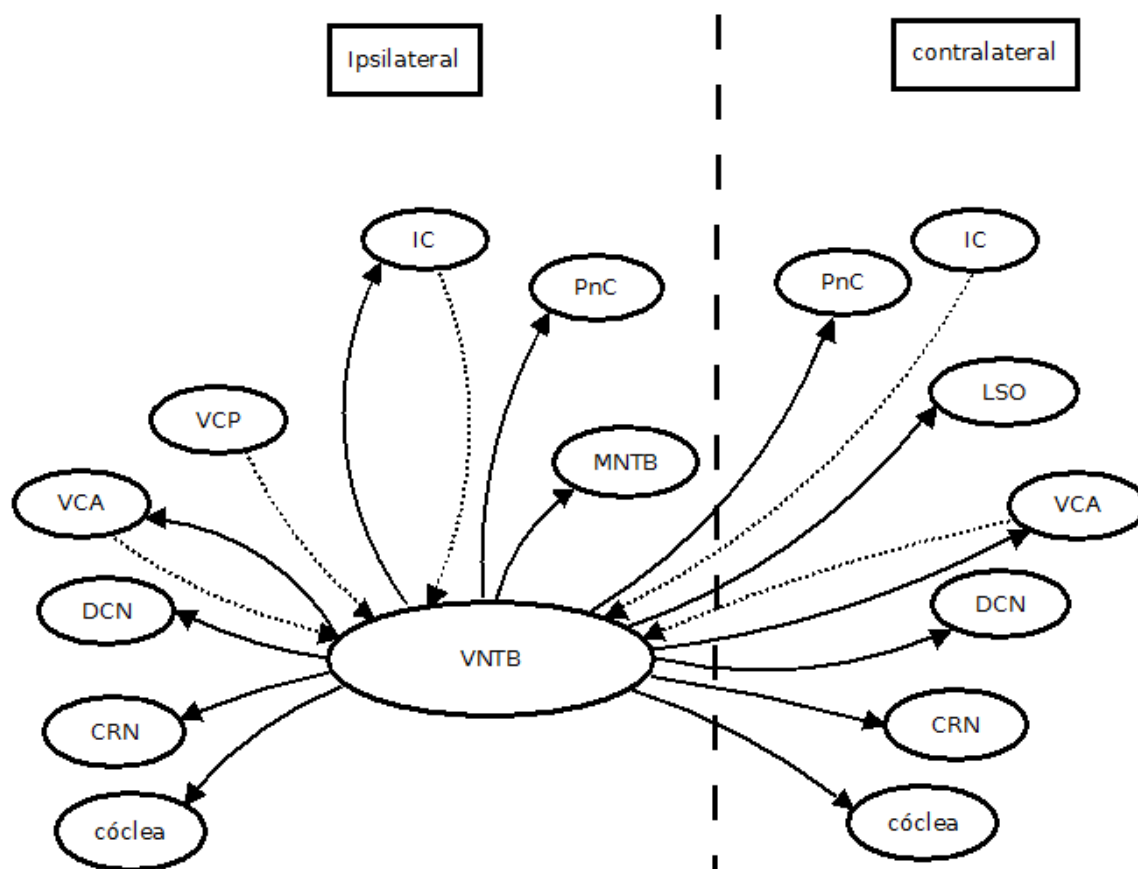


FIGURA 24 – Esquema das projeções do VNTB descritas até o momento. As setas contínuas representam suas eferências, enquanto as setas pontilhadas representam suas aferências.

A conexão do VNTB com as cócleas de ambos lados ocorre por meio do OCB, com predominância contralateral, formando o sistema olivococlear medial que termina sobre células ciliares externas do órgão de Corti (White and Warr 1983, Godfrey, Park-Hellendall et al. 1987, Warr and Boche 2003). Este sistema possui grande importância na modulação da sensibilidade coclear para sons de alta intensidade, de modo a redefinir a codificação neuronal de intensidade para compensar os ajustes na sensibilidade da cóclea (Benson and Brown 1990, Chen, Chen et al. 2000)

Em nossos experimentos, quando comparamos os valores das médias de amplitude do RAS nos momentos pós-lesão em relação a média de RAS no momento pré-lesão (inicial), nota-se que no grupo Sham o tratamento cirúrgico e a lesão no OCB produziram um aumento gradual do RAS com o passar do tempo (7, 14 e 21 dias após lesão do OCB). Apesar destas alterações não produzirem diferenças significativas, a lesão do OCB isoladamente eleva a amplitude do RAS o que está de acordo com o efeito esperado com a ablação do sistema eferente coclear durante o desencadeamento de reflexos áudio-motores com estímulos de grande intensidade como ocorre no RAS. Há evidências em literatura de que a lesão no OCB deixa de inibir a entrada de informação auditiva na cóclea (Hine, Thornton et al. 1997, Chen, Chen et al. 2000) e portanto o mesmo estímulo apresentado para um animal no qual o OCB foi lesionado poderia desencadear o RAS com maior intensidade.

Um aspecto metodológico importante neste trabalho foi a busca por condições experimentais que nos permitissem separar o efeito do OCB sobre o RAS e PPI do possível efeito que as lesões seletivas no VNTB poderiam promover. O nosso estudo de distribuição dos neurônios do VNTB aferentes a raiz coclear evidenciou que não seria possível segregar topograficamente subpopulações neuronais no VNTB. Portanto a estratégia experimental que utilizamos promoveu a ablação do OCB tanto no grupo Sham quanto no grupo Lesão. Esta abordagem experimental tem por objetivo a comparação entre o efeito da lesão isolada do OCB (grupo Sham) e combinada OCB+VNTB (grupo Lesão) na busca de interpretar o efeito comportamental da lesão no VNTB. A lesão isolada do VNTB não seria elucidativa, pois sabemos, através da literatura, que lesionando o VNTB como um todo, estaremos eliminando também os neurônios olivococleares mediais que participam da formação do OCB e se dirigirem à cóclea (White and Warr 1983). Portanto, a única forma de verificar o papel dos neurônios do VNTB que não fazem parte do OCB é a comparação entre os resultados dos grupos Sham e Lesão, já que em ambos partimos de uma condição experimental de ablação eletrolítica bilateral do OCB.

Os resultados da análise de densidade de neurônios imunorreativos a FOS e os dados comportamentais confirmam que a via auditiva não foi lesionada pela metodologia empregada nas cirurgias estereotáxicas tanto pelas barras auriculares como pela injeção de imunotóxico e lesão eletrolítica. Assim, a ausência de abolição total e permanente do RAS permite inferir que as lesões no VNTB, apesar da proximidade, não afetaram o corpo trapezóide, feixe de fibras pelo qual passam as aferências dos CRN ao PnC, essenciais para o desencadeamento do RAS. Este aspecto é corroborado pela evidência da proteína FOS nos núcleos cocleares e no colículo inferior dos casos dos grupos Sham e Lesão, já que pelo corpo trapezóide transitam as fibras nervosas que levam a informação auditiva dos

núcleos cocleares ao complexo olivar superior e ao colículo inferior. Além disso, foram mensuradas as barras auriculares e o meato acústico interno do rato wistar fêmea (2,4 mm em um crânio seco) para verificar se o diâmetro da barra era capaz de chegar ao tímpano e danificar o ouvido médio. A barra auricular que utilizamos para as cirurgias estereotáxicas (David Kopf, model 951) é calibrosa e possui o diâmetro de 3,0mm, diferentemente do modelo convencional para ratos (model 957) que possui diâmetro de 1,6mm. Desta forma descartamos qualquer possibilidade de ferimento da orelha média durante o procedimento cirúrgico estereotáxico.

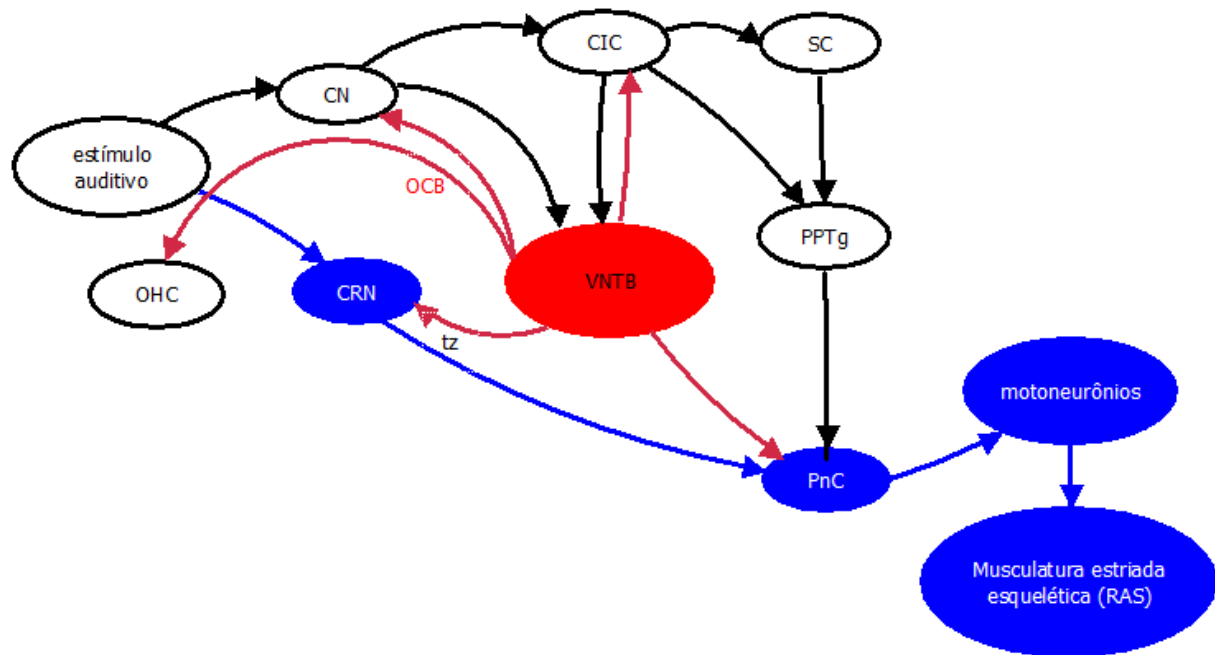


FIGURA 25 – Diferentes vias propostas para subsidiar o RAS (azul) e a PPI com participação do VNTB e suas projeções (vermelho). Elaborado a partir de trabalhos prévios (Caicedo and Herbert 1993, Lopez, Saldana et al. 1999, Okoyama, Ohbayashi et al. 2006, Gomez-Nieto, Rubio et al. 2008, Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013)

Ao analisarmos a imunorreatividade para FOS, observamos que no grupo Controle os CN possuem densidade neuronal que não se demonstra diminuída nos grupos Sham e Lesão. Isto nos assegura que os procedimentos experimentais de lesão e mensuração do RAS e PPI não estão afetando a via auditiva. Além disso, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais quanto à densidade de neurônios imunorreativos para FOS nos CN, apesar de uma maior densidade observada no grupo Sham, que poderia estar relacionada ao efeito da perda da influência do OCB sobre a cóclea, aumentando estimulação promovida pela de informação auditiva e consequentemente o aumento não significativo da densidade dos neurônios imunorreativos a FOS. Quando observado o IC, nota-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos Sham e Lesão, que poderia ser explicada pela perda das projeções recíprocas entre o VNTB e o IC no grupo Lesão, diminuindo assim sua ativação e consequentemente a densidade de neurônios imunorreativos a FOS.

O padrão de ação da Acetilcolina já foi bastante descrito e atualmente sabe-se que a função de uma projeção colinérgica depende dos receptores sobre os quais o neurotransmissor atua. Todos os receptores colinérgicos atuam via ativação de proteínas G para influenciar as propriedades da membrana através de segundos mensageiros. Os receptores muscarínicos M1, M3 e M5 estão associados a proteínas G (Gq/11) que ativam a fosfolipase C, enquanto os receptores M2 e M4 estão associados a proteínas G (Gi/Go) que inibem a adenililciclase (Caulfield 1993, Shideler and Yan 2010). Por outro lado, os receptores nicotínicos, sobre os quais a ACh também atua, parecem afetar a ativação do sistema sensório-motor (Acri, Morse et al. 1994). Além disso, como já demonstrado em outras áreas do sistema nervoso, os terminais colinérgicos podem regular a transmissão sináptica glutamatérgica (Caulfield 1993, Buno, Cabezas et al. 2006).

Nos estudos de GÓMEZ-NIETO et al. (2008) foram descritos receptores na raiz coclear para vários neurotransmissores, entre eles, os receptores muscarínicos M1, M2, M3, M4 e M5, além de quatro membros de receptores nicotínicos (NB4, NB7, NB2 e NB3). Experimentos realizados com agonistas e antagonistas de receptores nicotínicos na PPI demonstraram o envolvimento dos subtipos de receptores nicotínicos A2 e B2, e possivelmente A7 no controle da PPI (Schreiber, Dalmus et al. 2002, Suemaru, Yasuda et al. 2004). Algumas evidências sugerem que estes receptores nicotínicos possuam um papel na via rápida da PPI atuando em ISIs curtos (Bosch and Schmid 2008). A presença destes receptores sugeriu a existência de aferências colinérgicas aos CRN (Vetter, Saldana et al. 1993, Yao and Godfrey 1999), fato que foi confirmado recentemente (Gomez-Nieto, Rubio et al. 2008). Experimentos prévios em nosso laboratório de injeção de BDA no VNTB confirmaram esta inervação aos CRN, de forma direta e bilateral via corpo trapezoide (Gomez-Nieto, Rubio et al. 2008, Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013).

As conexões do VNTB com os CRN e com o PnC sugerem a implicação do VNTB na modulação do RAS por uma via colinérgica. Nossos resultados comportamentais para o RAS, indicam que a lesão OCB+VNTB determina uma diminuição do RAS aos 7 dias que tende a se recuperar gradualmente com o passar do tempo. Acreditamos que este não seja um efeito causado pela cirurgia ou pela lesão do OCB já que no grupo Sham e Controle nota-se um aumento do RAS com o passar do tempo e dado também que o RAS não é abolido e se recupera. A recuperação da amplitude do RAS aos 21 dias pós-lesão, no sentido de se aproximar aos valores pré-lesão pode estar relacionada a uma compensação das aferências colinérgicas de outras origens que terminam no circuito elementar do RAS como o núcleo pedúnculo pontino tegmental (PPTg) (Figura 25).

Um aspecto importante na análise dos dados de amplitude de RAS é a ponderação dos valores de amplitude pelo peso. O sistema de avaliação do RAS baseia-se em um sensor que capta o movimento balístico do animal após cada estimulação acústica desencadeante do RAS. Desta forma o sistema avalia a quantidade de movimento global do animal produzida reflexamente e quantifica este movimento na forma de oscilação do “peso” em gramas. Assim, o peso corporal está relacionado com a amplitude do RAS e pode ser uma fonte de aumento deste dado o aumento gradual do peso dos animais com o passar do

tempo. Portanto, os dados coletados foram ponderados pelo peso para que a análise do RAS fosse refinada.

O VNTB tem sido implicado em modelos de vias anatômicas para explicar a PPI que integram as seguintes estruturas do tronco encefálico (Figura 25): IC, colículo superior (SC) e o núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPTg) que, por sua vez, emite projeções colinérgicas modulando inibitóriamente o PnC (Koch, Kungel et al. 1993, Fendt, Li et al. 2001). A via curta recentemente descrita IC-VNTB-CRN permite compreender como ocorre a PPI em curtos intervalos entre estímulos (Hoffman and Ison 1980).

A análise da %PPI global em cada momento do estudo é interessante pois agrega informação proveniente da %PPI obtida em todos os ISIs em uma única variável. Desta forma, foi possível observar nitidamente o aumento significativo de PPI no grupo controle ao longo do tempo, provavelmente relacionada a exposição repetitiva do animal ao protocolo de mesuração do RAS e PPI. Este aumento posteriormente foi verificado com maior detalhe nas %PPI obtidas nos ISIs de 25, 50 e 100ms. Isto explica o fato de a %PPI global não exibir diferenças estatisticamente significativas para o grupo Sham, uma vez que neste grupo apenas na %PPI obtida com ISI de 50ms apresentou diferenças estatisticamente significantes. Este aspecto contrasta com o comportamento do grupo lesão que apresentou estabilidade da %PPI ao longo do tempo do experimento.

Os dados de %PPI analisados segundo grupo, momento e ISI, indicaram aumentos significativos no grupo Sham e Controle na %PPI produzida no ISI de 50ms entre os momentos pré-lesão e 21 dias pós-lesão. Este efeito não foi observado no grupo Lesão. Acreditamos que o aumento da inibição produzida nos grupos Sham e Controle tenha sido principalmente ao efeito inibitório do VNTB que está presente e intacto neste grupo experimental. Esta hipótese encontra apoio na comparação da evolução das %PPI no grupo Lesão, uma vez que com a lesão do VNTB não houve aumento da %PPI. O papel inibitório do VNTB já havia sido sugerido em trabalhos prévios de nosso grupo de pesquisa, assim como a o registro de atividade eletrofisiológica compatível com a PPI ao nível dos CRN que recebem aferências do VNTB (Gomez-Nieto, Rubio et al. 2008, Gomez-Nieto, Sinex et al. 2013). No entanto, este é o primeiro relato na literatura sobre o papel de lesões seletivas para neurônios colinérgicos do VNTB. Nossos resultados corroboram os trabalhos prévios no sentido de indicar que o VNTB produza um efeito inibitório reforçando a PPI. Além disso, este efeito poderia estar modulando a inibição em vias curtas (Figura 25) que medeiam a PPI em intervalos interestímulos curtos (50ms).

Acreditamos que este efeito observado na %PPI se deva a presença dos neurônios colinérgicos do VNTB no grupo Sham e Controle e a sua ausência no grupo Lesão uma vez que a lesão imunotóxica provocou a perda significativa de neurônios colinérgicos levando a uma redução de 56,86% no número de neurônios imunorreativos a ChAT nos casos Lesão quando comparados ao grupo Sham. Isto demonstra, além da efetividade do imunotóxico utilizado, que de fato no grupo Lesão o VNTB foi seletivamente lesionado. Portanto a mudança comportamental observada na %PPI está associada com os neurônios colinérgicos do VNTB.

Conclusões

Os resultados e discussão permitiram concluir que:

- Existem neurônios grandes (provavelmente olivococleares), e pequenos (provavelmente não-olivococleares), que constituem o VNTB e dispostos ao longo de toda extensão rostrocaudal do núcleo sem a existência de um padrão distinguível de distribuição entre estas duas populações celulares.
- A maioria dos neurônios do VNTB que se projetam à CR estão localizados nos níveis I.A. 0,00 e -0,40
- O VNTB participa da modulação do RAS na PPI de maneira inibitória em intervalos entre estímulos curtos (50ms), estando portanto envolvido na via curta da PPI.

Bibliografia

- Acri, J. B., D. E. Morse, E. J. Popke and N. E. Grunberg (1994). "Nicotine increases sensory gating measured as inhibition of the acoustic startle reflex in rats." *Psychopharmacology (Berl)* **114**(2): 369-374.
- Aitkin, L. (1995). "The auditory neurobiology of marsupials: a review." *Hear Res* **82**(2): 257-266.
- Aitkin, L. (1996). "The anatomy of the cochlear nuclei and superior olivary complex of arboreal Australian marsupials." *Brain Behav Evol* **48**(2): 103-114.
- Albrecht, O., A. Dondzillo, F. Mayer, J. A. Thompson and A. Klug (2014). "Inhibitory projections from the ventral nucleus of the trapezoid body to the medial nucleus of the trapezoid body in the mouse." *Front Neural Circuits* **8**: 83.
- Andreski, P., H. Chilcoat and N. Breslau (1998). "Post-traumatic stress disorder and somatization symptoms: A prospective study." *Psychiatry Research* **79**(2): 131-138.
- Angulo, A., J. A. Merchan and M. A. Merchan (1990). "Morphology of the rat cochlear primary afferents during prenatal development: a Cajal's reduced silver and rapid Golgi study." *J Anat* **168**: 241-255.
- Anisman, H., O. Kelly, S. Hayley, T. Borowski, Z. Merali and D. C. McIntyre (2000). "Acoustic startle and fear-potentiated startle in rats selectively bred for fast and slow kindling rates: Relation to monoamine activity." *European Journal of Neuroscience* **12**(12): 4405-4416.
- Bakshi, V. P., N. R. Swerdlow and M. A. Geyer (1994). "Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of the startle response." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **271**(2): 787-794.
- Baudrie, V., J. H. Tulen, J. Blanc and J. L. Elghozi (1997). "Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats." *J Auton Pharmacol* **17**(5): 303-309.
- Bell, R. L., Z. A. Rodd, C. C. Hsu, L. Lumeng, J. M. Murphy and W. J. McBride (2003). "Amphetamine-modified acoustic startle responding and prepulse inhibition in adult and adolescent alcohol-preferring and -nonpreferring rats." *Pharmacol Biochem Behav* **75**(1): 163-171.
- Benson, T. E. and M. C. Brown (1990). "Synapses formed by olivocochlear axon branches in the mouse cochlear nucleus." *J Comp Neurol* **295**(1): 52-70.
- Borowski, T. B. and L. Kokkinidis (1994). "Cocaine preexposure sensitizes conditioned fear in a potentiated acoustic startle paradigm." *Pharmacol Biochem Behav* **49**(4): 935-942.
- Bosch, D. and S. Schmid (2006). "Activation of muscarinic cholinergic receptors inhibits giant neurones in the caudal pontine reticular nucleus." *European Journal of Neuroscience* **24**(7): 1967-1975.
- Bosch, D. and S. Schmid (2008). "Cholinergic mechanism underlying prepulse inhibition of the startle response in rats." *Neuroscience* **155**(1): 326-335.
- Braff, D. L., M. A. Geyer and N. R. Swerdlow (2001). "Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies." *Psychopharmacology (Berl)* **156**(2-3): 234-258.
- Brown, D. A., F. C. Abogadie, T. G. J. Allen, N. J. Buckley, M. P. Caulfield, P. Delmas, J. E. Haley, J. A. Lamas and A. A. Selyanko (1997). "Muscarinic mechanisms in nerve cells." *Life Sci* **60**(13-14): 1137-1144.
- Brown, P. (1995). "Physiology of startle phenomena." *Adv Neurol* **67**: 273-287.
- Buno, W., C. Cabezas and D. Fernandez de Sevilla (2006). "Presynaptic muscarinic control of glutamatergic synaptic transmission." *J Mol Neurosci* **30**(1-2): 161-164.
- Caicedo, A. and H. Herbert (1993). "Topography of descending projections from the inferior colliculus to auditory brainstem nuclei in the rat." *J Comp Neurol* **328**(3): 377-392.
- Caicedo, A., M. Kungel, R. Pujol and E. Friauf (1998). "Glutamate-induced Co^{2+} uptake in rat auditory brainstem neurons reveals developmental changes in Ca^{2+} permeability of glutamate receptors." *European Journal of Neuroscience* **10**(3): 941-954.
- Caulfield, M. P. (1993). "Muscarinic receptors--characterization, coupling and function." *Pharmacol Ther* **58**(3): 319-379.
- Caulfield, M. P. and N. J. Birdsall (1998). "International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors." *Pharmacol Rev* **50**(2): 279-290.
- Chang, H. T., H. Kuo, J. A. Whittaker and N. G. Cooper (1990). "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* **35**(1): 31-37.
- Chen, T. J., S. S. Chen and Y. L. Hsieh (2000). "Evaluating the protective role of the olivocochlear bundle against acoustic overexposure in rats by using Fos immunohistochemistry." *J Neurol Sci* **177**(2): 104-113.

- Cook, E. W., 3rd, T. L. Davis, L. W. Hawk, E. L. Spence and C. H. Gautier (1992). "Fearfulness and startle potentiation during aversive visual stimuli." *Psychophysiology* **29**(6): 633-645.
- Davis, G. W. (2006). "Homeostatic Control of Neural Activity: From Phenomenology to Molecular Design." *Annu Rev Neurosci*.
- Davis, M., D. S. Gendelman, M. D. Tischler and P. M. Gendelman (1982). "A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies." *J Neurosci* **2**(6): 791-805.
- Ebert, U. and M. Koch (1992). "Glutamate receptors mediate acoustic input to the reticular brain stem." *Neuroreport* **3**(5): 429-432.
- Fendt, M., L. Li and J. S. Yeomans (2001). "Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex." *Psychopharmacology (Berl)* **156**(2-3): 216-224.
- Friauf, E. and J. Ostwald (1988). "Divergent projections of physiologically characterized rat ventral cochlear nucleus neurons as shown by intra-axonal injection of horseradish peroxidase." *Exp Brain Res* **73**(2): 263-284.
- Geyer, M. A., K. Krebs-Thomson, D. L. Braff and N. R. Swerdlow (2001). "Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: A decade in review." *Psychopharmacology* **156**(2-3): 117-154.
- Godfrey, D. A., J. L. Park-Hellendall, J. D. Dunn and C. D. Ross (1987). "Effects of trapezoid body and superior olive lesions on choline acetyltransferase activity in the rat cochlear nucleus." *Hear Res* **28**(2-3): 253-270.
- Gomez-Nieto, R., J. A. Horta-Junior, O. Castellano, M. J. Herrero-Turron, M. E. Rubio and D. E. Lopez (2008). "Neurochemistry of the afferents to the rat cochlear root nucleus: possible synaptic modulation of the acoustic startle." *Neuroscience* **154**(1): 51-64.
- Gomez-Nieto, R., M. E. Rubio and D. E. Lopez (2008). "Cholinergic input from the ventral nucleus of the trapezoid body to cochlear root neurons in rats." *J Comp Neurol* **506**(3): 452-468.
- Gomez-Nieto, R., D. G. Sinex, C. H.-J. JD, O. Castellano, J. M. Herrero-Turron and D. E. Lopez (2013). "A fast cholinergic modulation of the primary acoustic startle circuit in rats." *Brain Struct Funct*.
- Gonzalez-Lima, F., T. Finkenstadt and J. P. Ewert (1989). "Neural substrates for long-term habituation of the acoustic startle reflex in rats: a 2-deoxyglucose study." *Neurosci Lett* **96**(2): 151-156.
- Grillon, C., R. Sinha and S. S. O'Malley (1994). "Effects of ethanol on the acoustic startle reflex in humans." *Psychopharmacology (Berl)* **114**(1): 167-171.
- Guinan, J. J., W. B. Warr and B. E. Norris (1983). "Differential olivocochlear projections from lateral versus medial zones of the superior olivary complex." *J Comp Neurol* **221**(3): 358-370.
- Harrison, J., W. Warr and R. Irving (1962). "Second order neurons in the acoustic nerve. Science" *Journal of Comparative Neurology* **138**: 893-895.
- Harrison, J. M. and M. L. Feldman (1970). "Anatomical aspects of the cochlear nucleus and superior olivary complex." *Contrib Sens Physiol* **4**: 95-142.
- Hebel, R. and M. W. Stromberg (1976). *Anatomy of the Laboratory Rat*. Baltimore, Williams & Wilkins Co.
- Hine, J. E., A. R. Thornton and G. B. Brookes (1997). "Effect of olivocochlear bundle section on evoked otoacoustic emissions recorded using maximum length sequences." *Hear Res* **108**(1-2): 28-36.
- Hoffman, G. E., W. S. Lee, M. S. Smith, R. Abbud, M. M. Roberts, A. G. Robinson and J. G. Verbalis (1993). "c-Fos and Fos-related antigens as markers for neuronal activity: perspectives from neuroendocrine systems." *NIDA Res Monogr* **125**: 117-133.
- Hoffman, G. E. and D. Lyo (2002). "Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'?" *J Neuroendocrinol* **14**(4): 259-268.
- Hoffman, H. S. and M. Fleshler (1963). "Startle reaction: Modification by background acoustic stimulation." *Science* **141**: 928-930.
- Hoffman, H. S. and J. R. Ison (1980). "Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input." *Psychol Rev* **87**(2): 175-189.
- Horta-Júnior, J. A. C., J. C. Bittencourt and D. E. López (2004). *Conexão monossináptica entre os neurônios da raiz coclear do nervo vestibulo-coclear e os motoneurônios auriculares do núcleo motor do nervo facial* Doutorado (PhD), Universidade de São Paulo - USP.
- Horta-Junior, J. A. C., D. E. Lopez, A. J. Alvarez-Morujó and J. C. Bittencourt (2008). "Direct and indirect connections between cochlear root neurons and facial motor neurons: pathways underlying the acoustic pinna reflex in the albino rat." *J Comp Neurol* **507**(5): 1763-1779.
- Justus, A. N. and P. R. Finn (2007). "Startle modulation in non-incarcerated men and women with psychopathic traits." *Personality and Individual Differences* **43**(8): 2057-2071.
- Kadar, A., G. Wittmann, Z. Liposits and C. Fekete (2009). "Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining." *J Neurosci Methods* **184**(1): 115-118.

- Kakigi, A., H. Hirakawa, R. J. Mount and R. V. Harrison (1997). "The effects of crossed olivocochlear bundle section on transient evoked otoacoustic emissions." *Hear Res* **110**(1-2): 34-38.
- Kaviani, H., J. A. Gray, S. A. Checkley, P. W. Raven, G. D. Wilson and V. Kumari (2004). "Affective modulation of the startle response in depression: Influence of the severity of depression, anhedonia, and anxiety." *Journal of Affective Disorders* **83**(1): 21-31.
- Keay, K. A., P. Redgrave and P. Dean (1988). "Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus." *Brain Res Bull* **20**(1): 13-26.
- Koch, M. (1999). "The neurobiology of startle." *Prog Neurobiol* **59**(2): 107-128.
- Koch, M., M. Kungel and H. Herbert (1993). "Cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus are involved in the mediation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat." *Exp Brain Res* **97**(1): 71-82.
- Koch, M. and H. U. Schnitzler (1997). "The acoustic startle response in rats--circuits mediating evocation, inhibition and potentiation." *Behav Brain Res* **89**(1-2): 35-49.
- Kovacs, K. J. (2008). "Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond." *J Neuroendocrinol* **20**(6): 665-672.
- Krase, W., M. Koch and H. U. Schnitzler (1993). "Glutamate antagonists in the reticular formation reduce the acoustic startle response." *Neuroreport* **4**(1): 13-16.
- Landis, C. and W. A. Hunt (1939). *The startle pattern*. New York, Ferrar & Rinehart.
- Lee, Y., D. E. López, E. G. Meloni and M. Davis (1996). A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J Neurosci*. **16**: 3775-3789.
- Lingenhöhl, K. and E. Friauf (1994). "Giant neurons in the rat reticular formation: a sensorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit?" *J Neurosci* **14**(3 Pt 1): 1176-1194.
- López, D. E., M. A. Merchán, V. M. Bajo and E. Saldana (1993). The cochlear root neurons in the rat, mouse and gerbil. *The mammalian cochlear nuclei: organization and function*. M. A. Merchán. New York, Plenum Press: 291-301.
- Lopez, D. E., E. Saldana, F. R. Nodal, M. A. Merchan and W. B. Warr (1999). "Projections of cochlear root neurons, sentinels of the rat auditory pathway." *J Comp Neurol* **415**(2): 160-174.
- López, D. E., E. Saldana, F. R. Nodal, M. A. Merchán and W. B. Warr (1999). "Projections of cochlear root neurons, sentinels of the rat auditory pathway." *J Comp Neurol* **415**(2): 160-174.
- Lorente de Nó, R. (1933). "Anatomy of the eighth nerve III. General plan of structure of the primary cochlear nuclei." *Laryngoscope* **43**: 327-350.
- Maison, S. F., J. C. Adams and M. C. Liberman (2003). "Olivocochlear innervation in the mouse: Immunocytochemical maps, crossed versus uncrossed contributions, and transmitter colocalization." *Journal of Comparative Neurology* **455**(3): 406-416.
- Malmierca, M. S. and T. A. Hackett (2010). Structural organization of the ascending auditory pathway. *The Oxford Handbook of Auditory Science: The Auditory Brain*. A. Rees and A. Palmer. Oxford, Oxford University Press: 9-42.
- Malmierca, M. S. and M. Merchán (2004). Auditory System. *The Rat Nervous System*. G. Paxinos, Academic Press: 997-1081.
- Mansbach, R. S., L. H. Gold and L. S. Harris (1992). "The acoustic startle response as a measure of behavioral dependence in rats." *Psychopharmacology (Berl)* **108**(1-2): 40-46.
- Merchán, M. A., F. Collia, D. E. López and E. Saldana (1988). "Morphology of cochlear root neurons in the rat." *J Neurocytol* **17**(5): 711-725.
- Miserendino, M. J. and M. Davis (1993). "NMDA and non-NMDA antagonists infused into the nucleus reticularis pontis caudalis depress the acoustic startle reflex." *Brain Res* **623**(2): 215-222.
- Nodal, F. R. and D. E. López (2003). "Direct input from cochlear root neurons to pontine reticulospinal neurons in albino rat." *J Comp Neurol* **460**(1): 80-93.
- Okoyama, S., M. Ohbayashi, M. Ito and S. Harada (2006). "Neuronal organization of the rat inferior colliculus participating in four major auditory pathways." *Hear Res* **218**(1-2): 72-80.
- Osen, K. K., D. E. López, T. A. Slyngstad, O. P. Ottersen and J. Storm-Mathisen (1991). "GABA-like and glycine-like immunoreactivities of the cochlear root nucleus in rat." *J Neurocytol* **20**(1): 17-25.
- Paxinos, G. and C. Watson (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: the new coronal set - 161 diagrams*. San Diego, Academic Press.
- Pilz, P. K. and H. U. Schnitzler (1996). "Habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats: amplitude, threshold, and latency measures." *Neurobiol Learn Mem* **66**(1): 67-79.
- Prehn, A., A. Ohrt, B. Sojka, R. Ferstl and B. M. Pause (2006). "Chemosensory anxiety signals augment the startle reflex in humans." *Neuroscience Letters* **394**(2): 127-130.
- Saper, C. B. (1999). "Image is everything." *J Comp Neurol* **412**(3): 381-382.
- Schenk, M. P., R. J. Manning and M. H. Paalman (1999). "Going digital: image preparation for biomedical publishing." *Anat Rec* **257**(4): 128-136.

- Schmued, L. C. and J. H. Fallon (1986). "Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties." Brain Res **377**(1): 147-154.
- Schreiber, R., M. Dalmus and J. De Vry (2002). "Effects of alpha 4/beta 2- and alpha 7-nicotine acetylcholine receptor agonists on prepulse inhibition of the acoustic startle response in rats and mice." Psychopharmacology (Berl) **159**(3): 248-257.
- Shideler, K. K. and J. Yan (2010). "M1 muscarinic receptor for the development of auditory cortical function." Mol Brain **3**: 29.
- Sinex, D. G., D. E. Lopez and W. B. Warr (2001). "Electrophysiological responses of cochlear root neurons." Hear Res **158**(1-2): 28-38.
- Sinex, D. G., D. E. López and W. B. Warr (2001). "Electrophysiological responses of cochlear root neurons." Hear Res **158**(1-2): 28-38.
- Stam, R. (2007). "PTSD and stress sensitisation: A tale of brain and body. Part 1: Human studies." Neuroscience and Biobehavioral Reviews **31**(4): 530-557.
- Suamaru, K., K. Yasuda, K. Umeda, H. Araki, K. Shibata, T. Choshi, S. Hibino and Y. Gomita (2004). "Nicotine blocks apomorphine-induced disruption of prepulse inhibition of the acoustic startle in rats: possible involvement of central nicotinic alpha7 receptors." Br J Pharmacol **142**(5): 843-850.
- Swerdlow, N. R., P. Auerbach, S. M. Monroe, H. Hartston, M. A. Geyer and D. L. Braff (1993). "Men are more inhibited than women by weak prepulses." Biol Psychiatry **34**(4): 253-260.
- Swerdlow, N. R., T. D. Blumenthal, A. N. Sutherland, E. Weber and J. A. Talledo (2007). "Effects of prepulse intensity, duration, and bandwidth on perceived intensity of startling acoustic stimuli." Biol Psychol **74**(3): 389-395.
- Swerdlow, N. R., D. L. Braff and M. A. Geyer (2000). "Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon." Behav Pharmacol **11**(3-4): 185-204.
- Swerdlow, N. R., M. A. Geyer and D. L. Braff (2001). "Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges." Psychopharmacology (Berl) **156**(2-3): 194-215.
- Thompson, A. M. (1998). "Heterogeneous projections of the cat posteroventral cochlear nucleus." J Comp Neurol **390**(3): 439-453.
- Valls-Solé, J. (1998). Acoustic and somatosensory prepulse modulation of the blink reflex and the startle reaction. Brainstem Reflexes and Functions. Madrid, Litofinter, S.A.: 119-131.
- Vetter, D. E. and E. Mugnaini (1992). "Distribution and dendritic features of three groups of rat olivocochlear neurons. A study with two retrograde cholera toxin tracers." Anat Embryol (Berl) **185**(1): 1-16.
- Vetter, D. E., E. Saldana and E. Mugnaini (1993). "Input from the inferior colliculus to medial olivocochlear neurons in the rat: a double label study with PHA-L and cholera toxin." Hear Res **70**(2): 173-186.
- Wagner, T. and A. Mack (1998). "Membrane properties of giant neurons in the caudal pontine reticular formation in vitro." Neuroreport **9**(6): 1211-1215.
- Warr, W. B. (1972). "Fiber degeneration following lesions in the multipolar and globular cell areas in the ventral cochlear nucleus of the cat." Brain Res **40**(2): 247-270.
- Warr, W. B. (1992). Organization of olivocochlear efferent systems in mammals. The mammalian auditory pathway: neuroanatomy. D. B. Webster, A. N. Popper and R. R. Fay. New York, Springer-Verlag: 410-448.
- Warr, W. B. and J. E. Beck (1996). "Multiple projections from the ventral nucleus of the trapezoid body in the rat." Hear Res **93**(1-2): 83-101.
- Warr, W. B. and J. E. Boche (2003). "Diversity of axonal ramifications belonging to single lateral and medial olivocochlear neurons." Exp Brain Res **153**(4): 499-513.
- White, J. S. and W. B. Warr (1983). "The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat." J Comp Neurol **219**(2): 203-214.
- Wilkins, D. E., M. Hallett and M. M. Wess (1986). "Audiogenic startle reflex of man and its relationship to startle syndromes. A review." Brain **109 (Pt 3)**: 561-573.
- Winslow, J. T., P. L. Noble and M. Davis (2007). "Modulation of Fear-Potentiated Startle and Vocalizations in Juvenile Rhesus Monkeys by Morphine, Diazepam, and Buspirone." Biol Psychiatry **61**(3): 389-395.
- Yao, W. and D. A. Godfrey (1998). "Immunohistochemical evaluation of cholinergic neurons in the rat superior olivary complex." Microsc Res Tech **41**(3): 270-283.
- Yao, W. and D. A. Godfrey (1999). "Vesicular acetylcholine transporter in the rat cochlear nucleus: an immunohistochemical study." J Histochem Cytochem **47**(1): 83-90.
- Yeomans, J. S. and P. W. Frankland (1996). "The acoustic startle reflex: neurons and connections." Brain Res Brain Res Rev **21**(3): 301-314.

- Yeomans, J. S., J. Lee, M. H. Yeomans, S. Steidl and L. Li (2006). "Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rat." Neuroscience **142**(4): 921-929.
- Zar, J. H. (2010). Biostatistical analysis. Upper Saddle River, New Jersey, Pearson Prentice Hall.
- Zhang, J. S., C. A. Haenggeli, A. Tempini, M. W. Vischer, V. Moret and E. M. Rouiller (1996). "Electrically induced fos-like immunoreactivity in the auditory pathway of the rat: effects of survival time, duration, and intensity of stimulation." Brain Res Bull **39**(2): 75-82.

Apêndices

APÊNDICE A – Protocolo de imuno-histoquímica e evidenciação do FG

- Traçador: Fluoro-Gold 4% em soro salino (0,9% NaCl) estéril
Fluorochrome, Inc.. Em pH 4,5 excitação 323 nm, emissão 408 nm. Em pH 7,4 excitação 350-395 nm emissão 530-600 nm

Antes de iniciar a imuno verificar:

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

Potinhos a serem utilizados: _____

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

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

- PB (tampão fosfato) 0,1 M pH 7,4 2 X 10 min. em agitação.
PB se prepara a partir da solução estoque 0,4M. Diluir 1 parte de PB 0,4M em 3 partes de H₂O destilada.
Tampão fosfato 0,4 M pH 7,4
- Na₂HPO₄ (M= 141,96 Merck 1.06586.0500).....45,12 g
- NaH₂PO₄ · H₂O (M= 137,99 Merck 1.06346.0500)11,04g
- H₂O destilada.....1000 ml

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

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

- Inibição da peroxidase endógena1 X 20 min. em agitação.
A solução de inibição da peroxidase endógena se prepara adicionando 9 partes de PB 0,1M pH 7,4 e uma parte de H₂O₂ 33% (P.A.). Incubar 3 ml por potinho.

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

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,603 X 10 min. em agitação.
TBS-Tx se prepara diluindo 1 parte da solução estoque 10X em 9 partes de H₂O destilada ou:
- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121,1).....6,06 gr
- NaCl.....8,85 gr
- Triton X-100 (Merck - 1.08603.1000 C₃₄H₆₂O₁₁ PM 646,37) à 20%.....25 ml
- H₂O dest.....q.s.p. 1000 ml
*Ajustar o pH com solução de HCl 3M até 7,60

- Anticorpo primário rabbit anti-fluoro gold 1:10.000.....48 horas à 4 °C em agitação.
Chemicon International A.B. 153 - 100 µl - preparar alíquotas de 100 µl 1:100 e guardar em freezer. Em uma alíquota de 100 µl 1:100 adicionar 10 ml de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar 1 ml por potinho.

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

- Anticorpo secundário goat anti-rabbit 1:200120 min. temp. ambiente em agitação.
Adicionar 20µl de anticorpo secundário (concentração: 7,5 µgr./ml) para 4 ml de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6, agitar, descansar até que não hajam bolhas e incubar 1ml por potinho. Pode-se preparar a solução stock deste anticorpo biotilado com o anticorpo purificado Vector- BA-1000 1,5 mgr., adicionando 1 ml de H₂O bidest. Esta solução preparada é a mesma que há nos kits Vectastain.

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

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

Solução de incubação ABC Kit:

- 4 ml TBS-Tx 0,05 M pH 7,6 + 20µl solução A (laranja)

- Agitar bem
- Adicionar 20µl solução B (marrom)
- Agitar bem e esperar 30 minutos para que o complexo se forme e possa ser usado.

Incubar 1 ml por potinho.

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

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

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

Tris-HCl se prepara:

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

- H₂O dest.q.s.p. 1000 ml

Ajustar o pH com solução de HCl até 7,6

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

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

Solução de revelação DAB (até 5 potinhos):

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

-Adicionar uma alíquota de 200µl de solução de DAB a 1% em H₂Odd (pegar no freezer) DAB = Sigma D - 9015 PM 360,1

-Adicionar 2,5µl de água oxigenada P.A. imediatamente antes de incubar (H₂O₂ a 30% PM= 34,01 Merck 108597, pegar na geladeira).

Obs: Deixar um pouco em geladeira para baixar a temperatura, assim tendo um maior controle sobre a reação. Tudo que entrar em contato com DAB, deve ser deixado na capela em um Becker com 50ml de hipoclorido de sódio comercial, para precipitação do DAB. Eliminar a solução no dia seguinte em local adequado (frasco de coleta de resíduos azul).

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

APÊNDICE B – Protocolo para técnica de Nissl

A coloração de Nissl tem por objetivo evidenciar estruturas basófilas do tecido nervoso, especialmente o retículo endoplasmático rugoso, presente em grande quantidade nos corpos celulares de neurônios. Dessa forma, esse protocolo é utilizado com frequência para referência citoarquitetônica (Paxinos and Watson 2005, Kadar, Wittmann et al. 2009).

- ✓ 30 min em fixador para Nissl (pode ser dispensada em casos bem fixados)

FIXADOR PARA NISSL

- 1l de PBS 0,1M
 - 4g de NaOH
 - 40g de paraformaldeído 90%
 - esperar esfriar e conservar a 4°C
 - no outro dia filtrar e acertar o pH=7,4
- | agitar e aquecer até 60-65°
- ✓ 1 min em álcool 95% I
 - ✓ 1 min em álcool 95% II
 - ✓ 1 min em álcool 100% I
 - ✓ 1 min em álcool 100% II
 - ✓ 1 min em álcool 100% III
 - ✓ 3 min em xilol I (para local de injeção: 3 min)
 - ✓ 3 min em xilol II (para local de injeção: 5 min)
 - ✓ 3 min em xilol I (para local de injeção: 3 min)
 - ✓ 1 min em álcool 100% III
 - ✓ 1 min em álcool 100% II
 - ✓ 1 min em álcool 100% I
 - ✓ 1 min em álcool 95% II
 - ✓ 1 min em álcool 95% I
 - ✓ 1 min em álcool 70%
 - ✓ 1 min em álcool 50%
 - ✓ 1 min em tionina

TIONINA 0,25%

- preparar em frasco alto (para não derramar do frasco)
 - 200ml de DH₂O
 - 12ml de ácido acético glacial
 - 1,44g de NaOH
 - completar para 1000ml
 - adicionar lentamente 2,5g de tionina
 - ferver por 45 min
 - filtrar para frasco escuro
 - armazenar a 37°
 - filtrar antes de usar
- | agitar e aquecer até 60°
- ✓ 10 mergulhos em DH₂O
 - ✓ 3 min em álcool 50%
 - ✓ 3 min em álcool 70%
 - ✓ 3 min em álcool 95% I
 - ✓ 3 min em álcool 95% II
 - ✓ álcool ácido (apenas se for necessário diferenciar)

ÁLCOOL ÁCIDO

- 250ml de álcool 95%
 - 2,5ml de ácido acético glacial
- ✓ 2 min em álcool 100% I
 - ✓ 2 min em álcool 100% II
 - ✓ 2 min em álcool 100% III
 - ✓ 3 min em xilol I
 - ✓ 3 min em xilol II
 - ✓ 3 min em xilol III
 - ✓ cobrir

com

lamínulas

APÊNDICE C - Protocolo de imuno-histoquímica para proteína FOS

*****1º Dia*****

Antes de iniciar a imuno verificar:

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

Potinhos a serem utilizados: _____

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

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

- PB (tampão fosfato) 0,1 M pH 7.42 X 10 min. em agitação.
PB se prepara a partir da solução estoque 0,4M. Diluir 1 parte de PB 0,4M em 3 partes de H₂O destilada.

A solução estoque se prepara:

Tampão fosfato 0,4 M pH 7,4

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

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

- H₂O destilada.....1000 ml

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

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

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

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

- PB (tampão fosfato) 0,1 M pH 7.45 X 5 min. em agitação.

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

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

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

- NaCl.....8,85 gr

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

- H₂O dest.....q.s.p. 1000 ml

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

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

Incubar em solução de soro normal de cabra à 2%, onde foi produzido o anticorpo secundário. Preparar 5ml de solução adicionando 100µl de soro à 4900µl de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar 1ml por potinho. Obs: caso sobre soro normal na alíquota, marcar um ponto com caneta na tampa do microtubo e guardar a alíquota em sua caixa, no freezer.

- Anticorpo primário **α-C-FOS Calbichem CAT#PC38** (1:10000)..48 horas à 4 °C em agitação.

Melhor concentração do anticorpo primário: 1/20.000 em TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar 1 ml por potinho. Obs: não é necessário lavar a solução de bloqueio, incubar diretamente.

*****2º Dia*****

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

- Anticorpo secundário **goat anti-rabbit 1:200**120 min. temp. ambiente em agitação.

Adicionar uma alíquota de 20µl de anticorpo secundário para 3960µl de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6, agitar, descansar até que não hajam bolhas e incubar 1ml por potinho. Obs: pode ficar uma noite a 4 °C em agitação.

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

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

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

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

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

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

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

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

Tris-HCl se prepara:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121,1).....6,06 gr
- H₂O dest.q.s.p. 1000 ml

Ajustar o pH com solução de HCl até 7,6

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

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

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

-12,5 ml Tris-HCl 0,05 M pH 8,00

-Adicionar 0,05 gr. (50 mgr.) de Níquel amônio sulfato (PM 395,00 Ni(NH₄)₂(SO₄)₂•6H₂O)

-Agitar bem (dissolver em ultra-som) e filtrar. *atenção: umidificar papel de filtro com H₂O dest.

-Adicionar uma alíquota de 200µl de solução de DAB a 1% em H₂O dest. (pegar no freezer)

-Adicionar 2,5µl de água oxigenada P.A. imediatamente antes de incubar (H₂O₂ a 30% PM= 34,01 Merck 108597, pegar na geladeira).

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

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

APÊNDICE D - Protocolo de imuno-histoquímica para enzima colina acetiltransferase (ChAT)

*****1º Dia*****

Antes de iniciar a imuno verificar:

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

Potinhos a serem utilizados: _____

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

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

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

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

A solução estoque se prepara:

Tampão fosfato 0,4 M pH 7,4

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

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

- H₂O destilada.....1000 ml

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- NaCl.....8,85 gr

- H₂O dest.....q.s.p. 1000 ml

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

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

Incubar em soro fetal bovino (FCS). Preparar a solução a 2% em TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar 1 ml por potinho.

Obs: caso sobre soro na alíquota, marcar um ponto com caneta na tampa do microtubo e guardar a alíquota em sua caixa, no freezer.

- Anticorpo primário **α-ChAT Chemicon® AB144P**.....48 horas à 4 °C em agitação.

Concentração **1/1000** por 72 horas à 4 °C em agitação.

Em uma alíquota 50ul (1/100) adicionar 450ul de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar de 0,5 a 1 ml por potinho. Obs: não é necessário lavar a solução de bloqueio, incubar diretamente.

*****2º Dia*****

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

- Anticorpo secundário Anti-Goat Biotinilado concentração **1/400** 120 min. temp. ambiente em agitação.

Adicionar 8ul de anticorpo secundário (1/2) para 1992ul de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6, agitar, descansar até que não hajam bolhas e incubar de 0,5 a 1ml por potinho. Obs: pode ficar 1 noite a 4 °C em agitação.

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

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

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

Solução de incubação ABC Kit para 4 ml (4 potinhos, Incubar DE 0,5 a 1 ml por potinho):

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

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

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

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

Tris-HCl se prepara:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121,1).....6,06 gr
- H₂O dest.q.s.p. 1000 ml

Ajustar o pH com solução de HCl até 7,6

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

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

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

-12,5 ml Tris-HCl 0,05 M pH 8,00

-Adicionar 0,05 gr. (50 mgr.) de Níquel amônio sulfato (PM 395,00 Ni(NH₄)₂(SO₄)₂•6H₂O)

-Agitar bem (dissolver em ultra-som) e filtrar. *atenção: umidificar papel de filtro com H₂O dest.

-Adicionar uma alíquota de 200µl de solução de DAB a 1% em H₂O dest (pegar no freezer)

-Adicionar 2,5µl de água oxigenada P.A. imediatamente antes de incubar (H₂O₂ a 30% PM= 34,01 Merck 108597, pegar na geladeira).

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

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

APÊNDICE E – Protocolo de mensuração da área e contagem de células imunorreativas para a proteína Fos

CAPTURA DE IMAGENS EM MICROSCÓPIO DE LUZ

Calibração do microscópio

- Posicionar a objetiva de 10X para análise das imagens (não utilizar a lente condensador)
- Executar o kholler (centralização de luz) e shading correction (uniformização da luz)
- Colocar uma lâmina com o material
- Observar no próprio microscópio a intensidade de luz que julgar adequada para observar o material
- Passar a aquisição da imagem para o computador e clicar em measure para medir a intensidade luminosa sobre a imagem (deve estar com o valor de aproximadamente 1ms)
- Verificar se a resolução da imagem está ajustada para 1388X1040
- Ajustar foco e luz, sendo que todas as curvas de cor estejam pareadas e cobrindo todo o espectro de cores.
- Capturar todas as fotos da área desejada tomando-se o cuidado de deixar uma margem de segurança de sobreposição entre uma imagem e outra para permitir a posterior construção do mosaico utilizando a ferramenta photomerge em photoshop

PREPARO DAS IMAGENS NO ADOBE PHOTOSHOP

- Para realizar o photomerge das imagens e configurar uma imagem panorâmica:

Arquivo>automatizar>photomerge>selecionar as fotos>ok

Salvar as imagens descartando as camadas

MENSURAÇÃO E CONTAGEM DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS

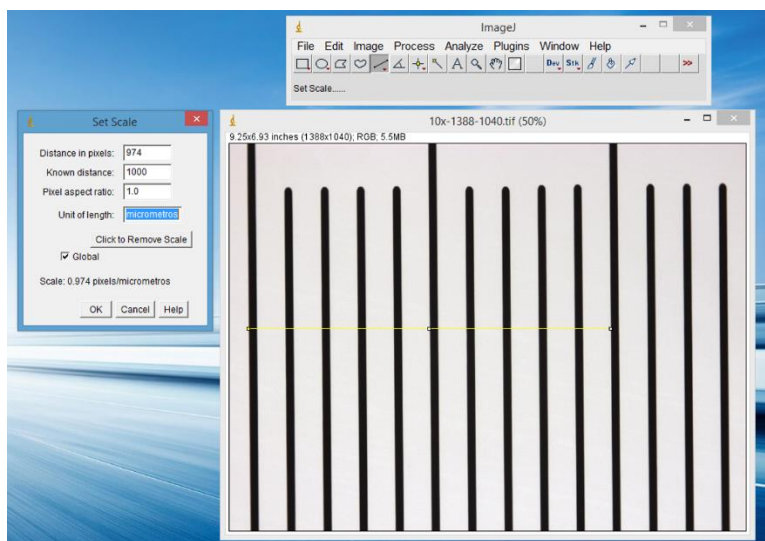
- Abrir o programa IMAGE J (versão 1.48)

File>open>abrir a imagem da barra de calibração capturada com a objetiva de 10X

- Clicar na ferramenta indicada por uma barra (straight) e fazer uma linha reta de um tamanho determinado utilizando as barras da régua de calibração.

Analyse>set scale

- Em known distance colocar o valor que foi determinado na barra de calibração
- Em unit of length escrever micrômetros
- Selecionar a caixa correspondente a Global (para que todas as futuras mensurações mantenham a calibração realizada) > ok

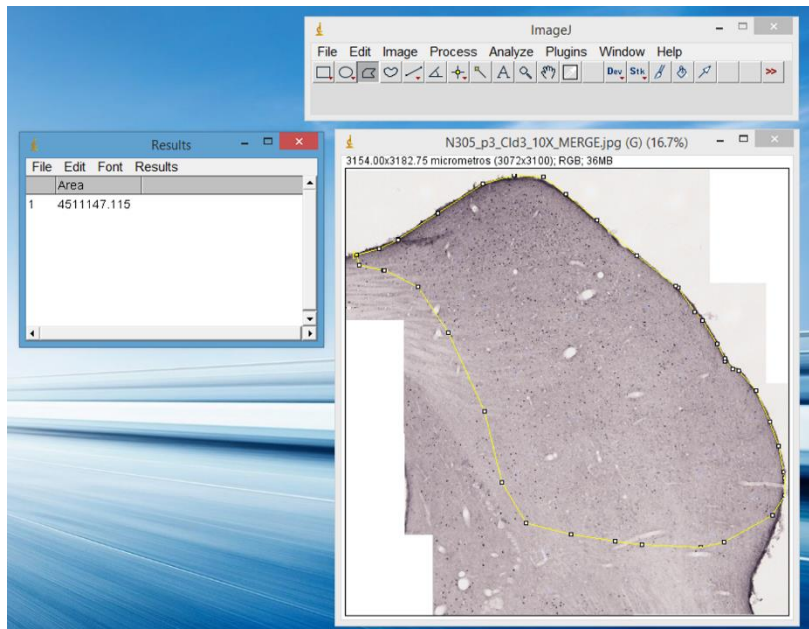


- Para iniciar a mensuração da área:

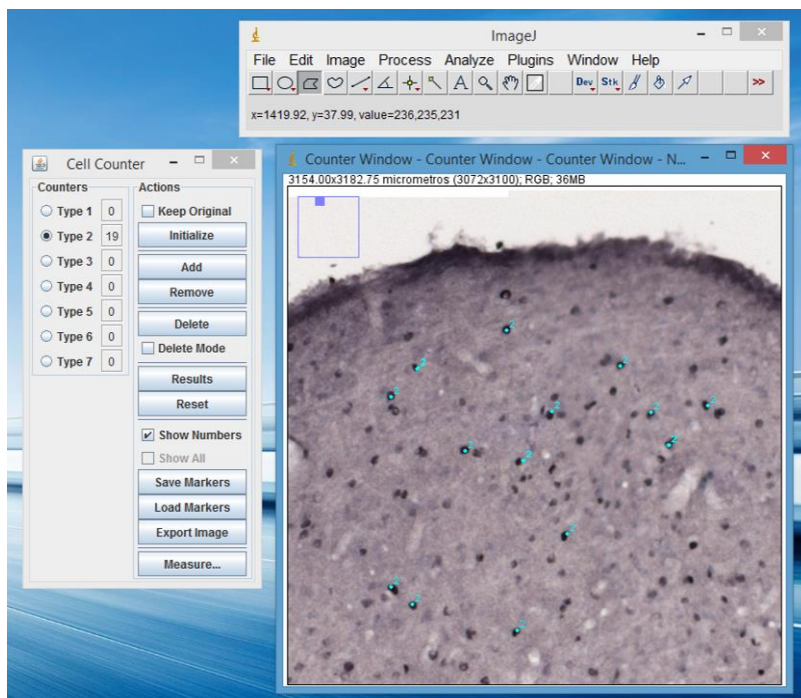
File>open>abrir a imagem que se quer analisar

- Desativar opção Disable Global Calibration (portanto manter a calibração global feita previamente) e ativar opção Disable these Messages.

- Selecionar a ferramenta representada por um polígono (polygonal selections) e contornar a área de interesse da imagem > ctrl+M > abrirá uma caixa chamada Results onde estará o valor da área selecionada. Neste momento é possível selecionar o resultado e transferi-lo para uma planilha excel.

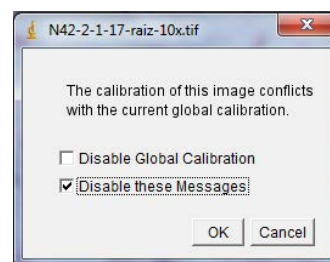


- Para iniciar a contagem de células manter a imagem aberta Plugins>analyze>cell counter
- Na nova janela clicar em Inicialize e selecionar o tipo de cor com a qual se quer marcar as células já contadas. Para iniciar a contagem, clicar em cima da célula a ser contada.
- Para aumentar a imagem permitindo uma melhor visualização das células, manter o cursor no local que se quer ampliar e clicar em ctrl+(+) e para diminuir, ctrl+(-)

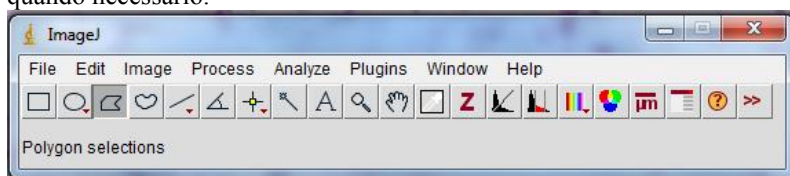


APÊNDICE F – Protocolo de Morfometria

- Abrir programa IMAGE J.
- Realizar Calibração.
 - CALIBRAÇÃO – Verificar resolução da imagem (1388x1040 dpi ou 2776x2080 dpi) e aumento da foto a ser analisada (objetiva utilizada para obtenção da imagem).
 - Abrir foto da barra de calibração (1 milímetro) do microscópio Zeiss obtida com a mesma resolução e aumento da foto a ser analisada.
 - Com a ferramenta straight line selecionar uma distância conhecida que ocupe a maior parte da imagem (por exemplo 100 micrômetros para grandes aumentos ou 1000 micrometros para pequenos aumentos).
 - Selecionar Analyse – Set Scale.
 - Na opção Know distance digite a distancia conhecida (por exemplo 100 ou 1000), e na opção Unit of Lenght digite micrômetros, não altere os outros valores, selecione a opção global para que a calibração seja válida para todas as fotos abertas na mesma sessão e pressione ok (calibração completa).
 - Fechar imagem
- Selecionar medidas a serem analisadas:
 - Selecionar Analyse – Set Measurements – selecionar seguintes opções:
 - Area
 - Perimeter
 - Fit Ellipse
 - Feret's Diameter
- Abrir a foto a ser analisada arrastando-a para a barra do programa Image
- Desativar opção Disable Global Calibration (portanto manter a calibração global feita previamente) e ativar opção Disable these Messages.
- Caso a imagem a ser analisada possua 3 camadas (RGB), selecionar a opção Image – Overlay – Flatten (CTRL + Shift + F) para obter foto com apenas 1 camada, fechar foto com 3 camadas.
- Com a ferramenta Polygon selections selecionar o perímetro do neurônio desejado utilizando ferramenta Magnifying Glass para zoom(ou utilize +/-) quando necessário.



J.



- Selecionar Analyse – Measure (Ctrl + M).
- Recortar neurônio medido (Ctrl + X).
- Abrir Nova Imagem (Ctrl + N), preencher caixa com os seguintes dados: Name = N° caso analisado, Type = RGB, Fill with = White, Width e Height = mesma resolução da foto, Slice = 1.
- Na nova imagem colar neurônio recortado (Ctrl + V) e posicionar neurônio em ordem previamente planejada.
- Clicar no centro da imagem para **desselecionar** o neurônio.
- Após medir e recortar todos os neurônios desejados da foto, salvar as fotos da qual foram recortados os neurônios e as pranchas dos neurônios recortados.
- Após análise de todas as fotos do **mesmo caso** salvar as medidas em planilha Excel.

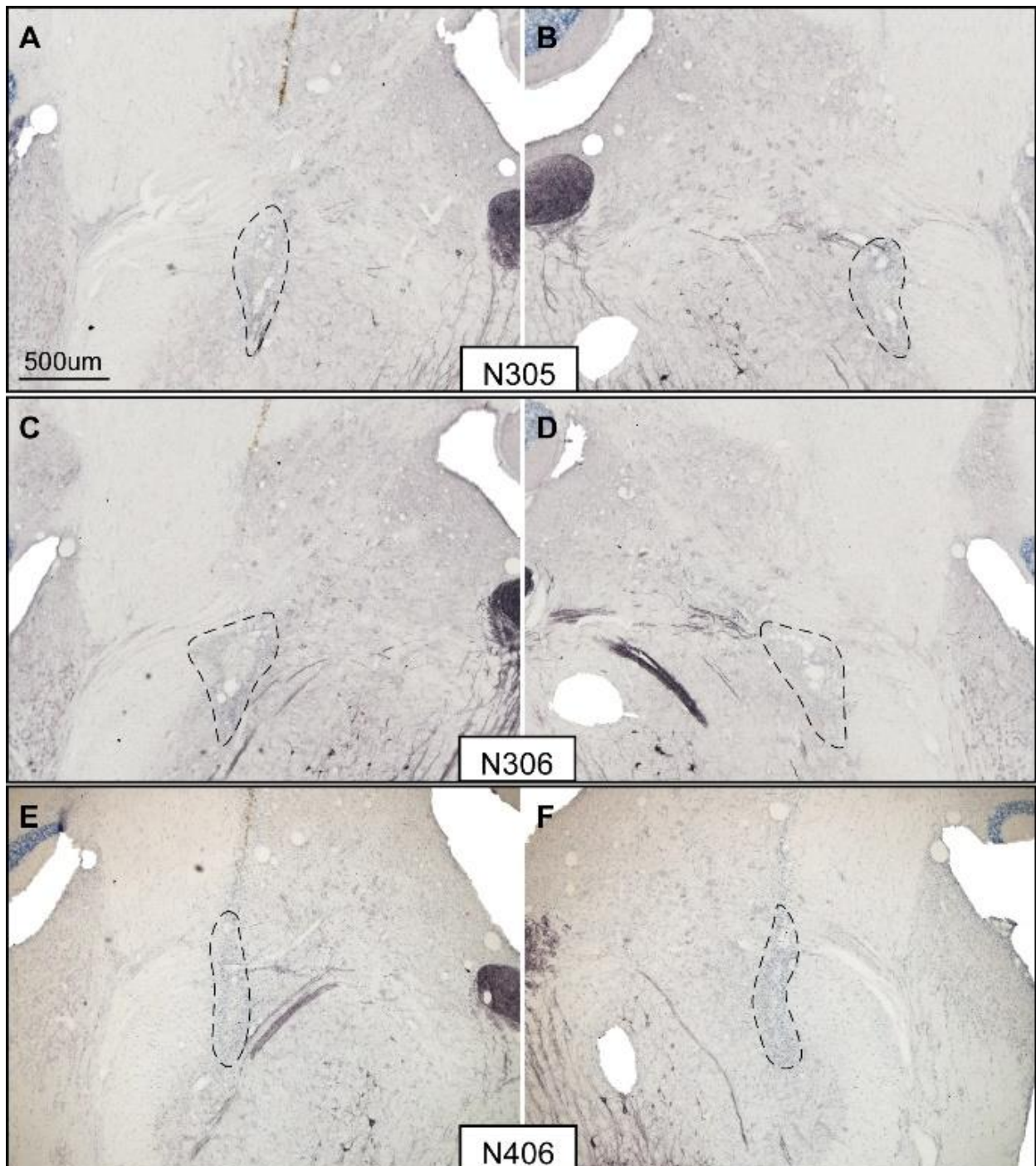
APÊNDICE G - Lesões do OCB nos casos experimentais do grupo SHAM

FIGURA 26 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de três casos do grupo Sham evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros. A e B são do caso N305, C e D são do caso N306 e E e F são do caso N406. Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

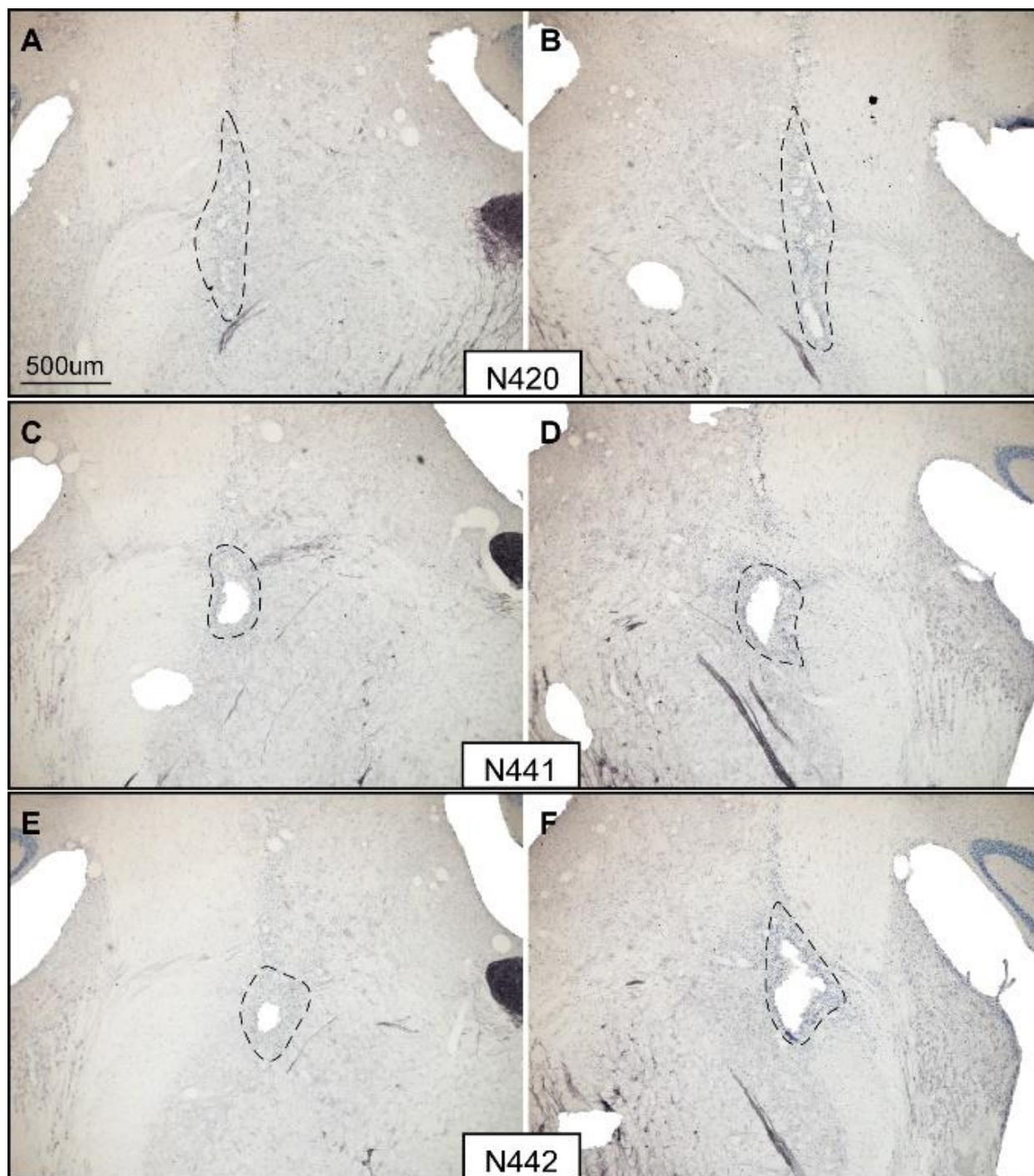


FIGURA 27 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de três casos do grupo Sham evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros. A e B são do caso N420, C e D são do caso N441 e E e F são do caso N442. Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

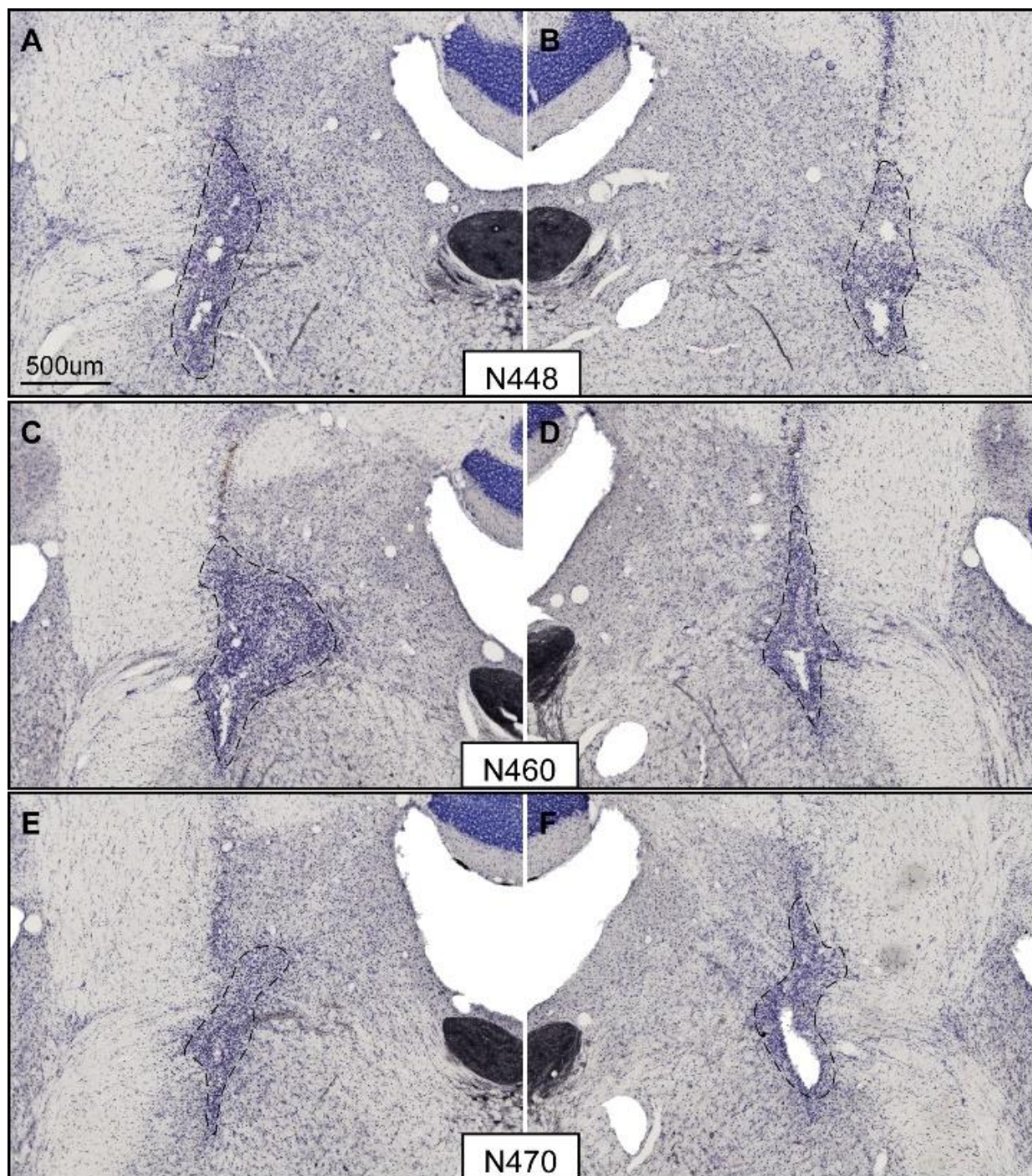


FIGURA 28 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de três casos do grupo Sham evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros. A e B são do caso N448, C e D são do caso N460 e E e F são do caso N470. Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

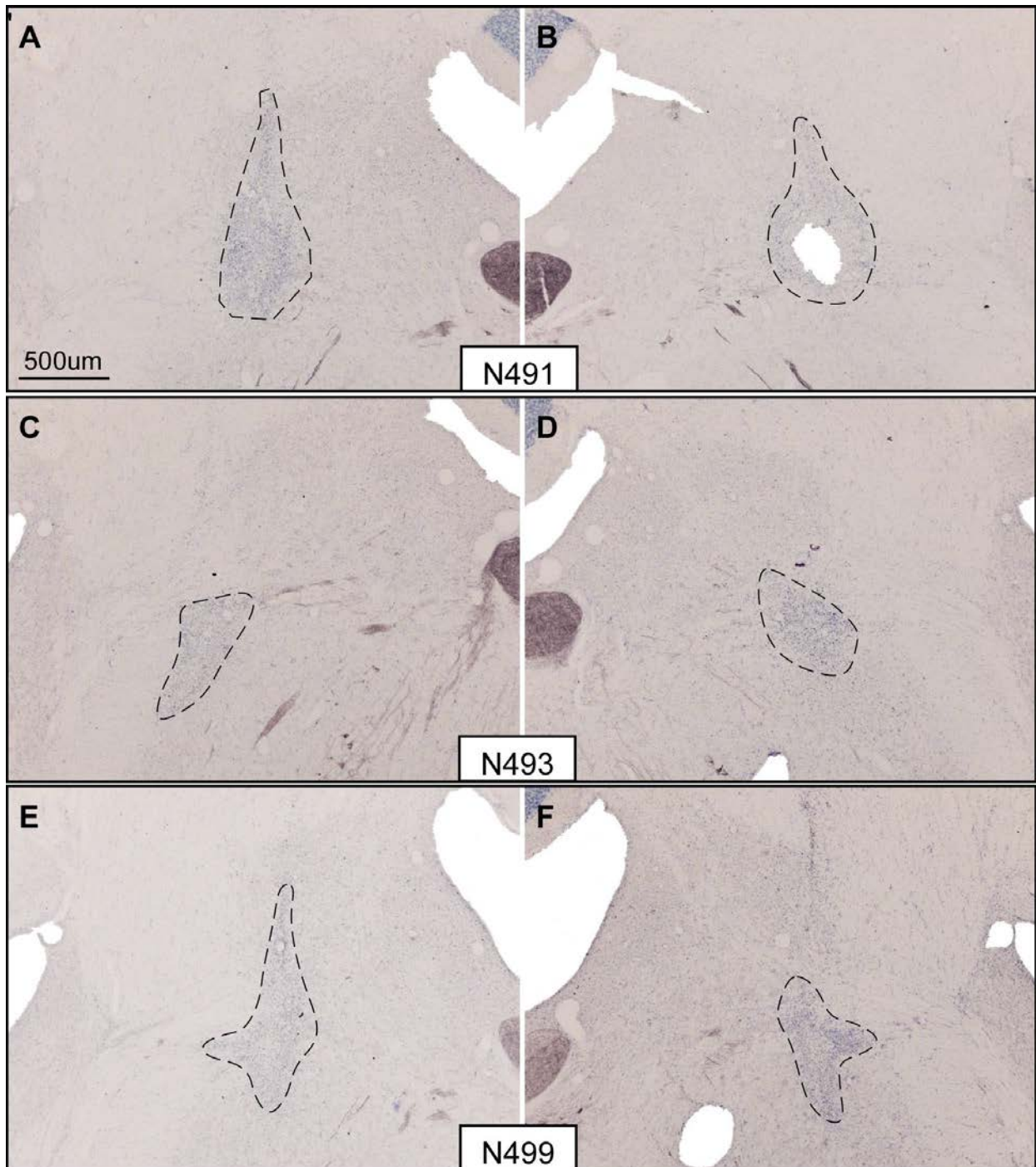


FIGURA 29 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de três casos do grupo Sham evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros. A e B são do caso N491, C e D são do caso N493 e E e F são do caso N499. Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

APÊNDICE H – Lesões do OCB e do VNTB nos casos experimentais do grupo LESÃO

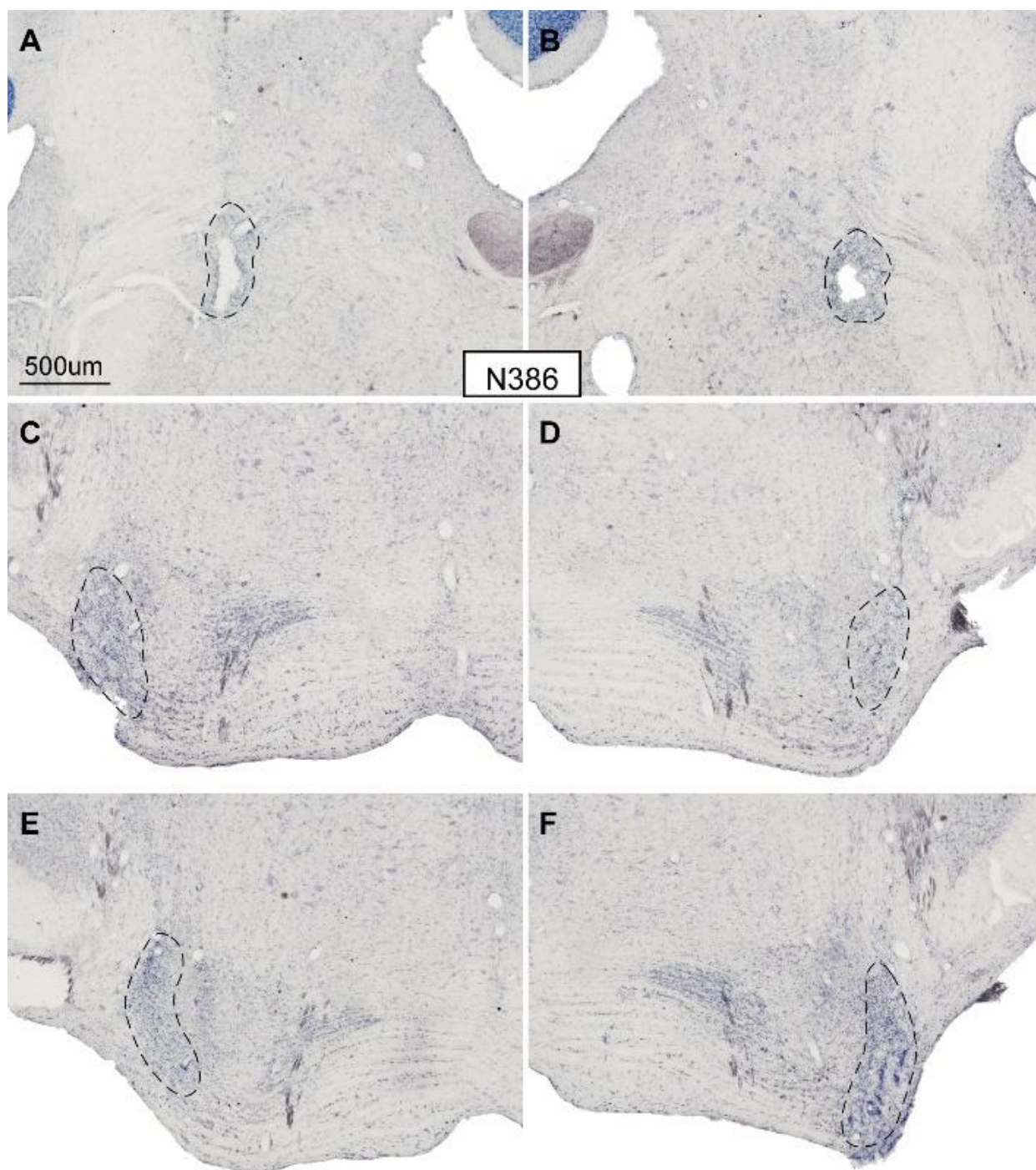


FIGURA 30 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N386 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F). Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

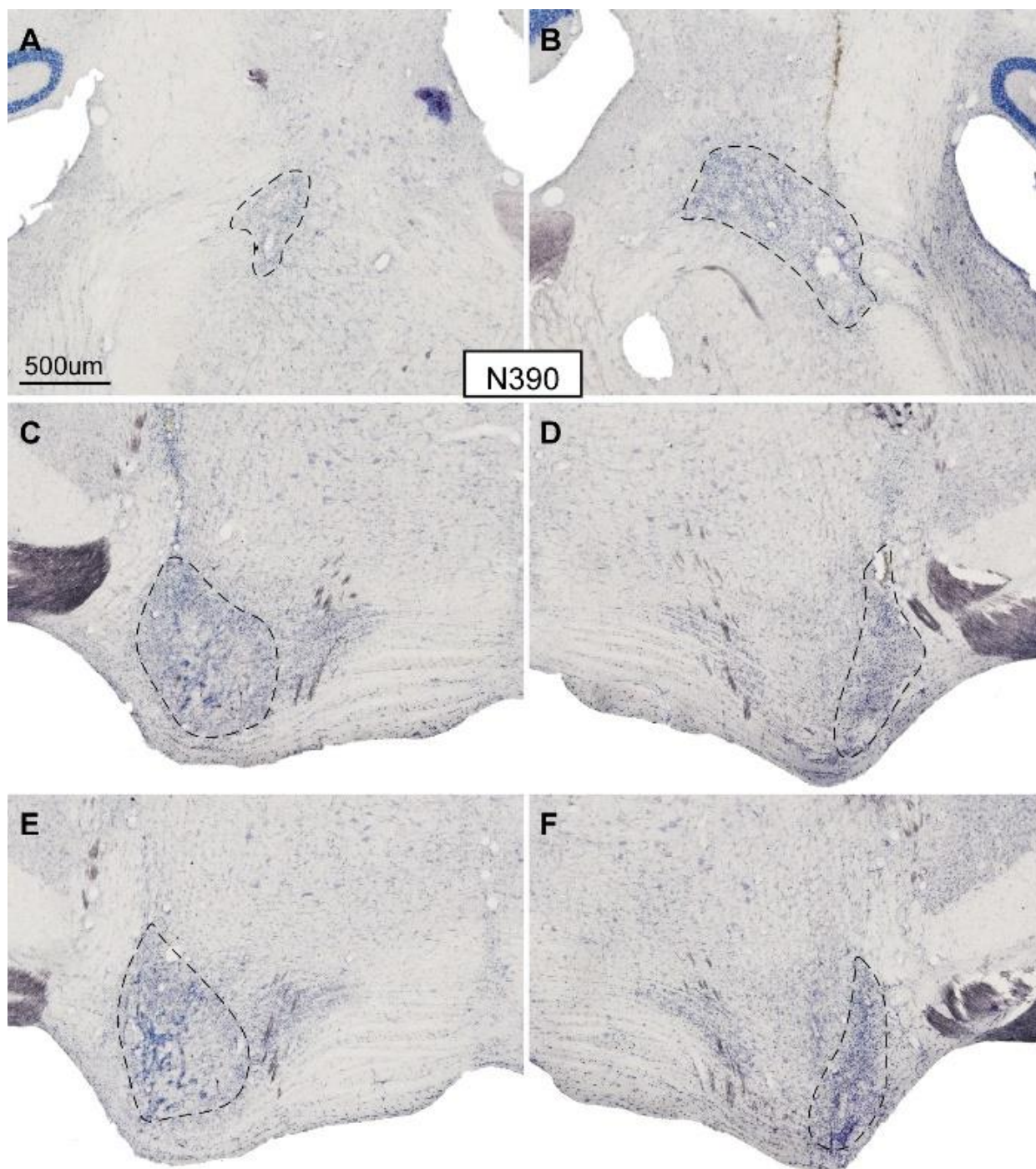


FIGURA 31 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N390 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F). Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

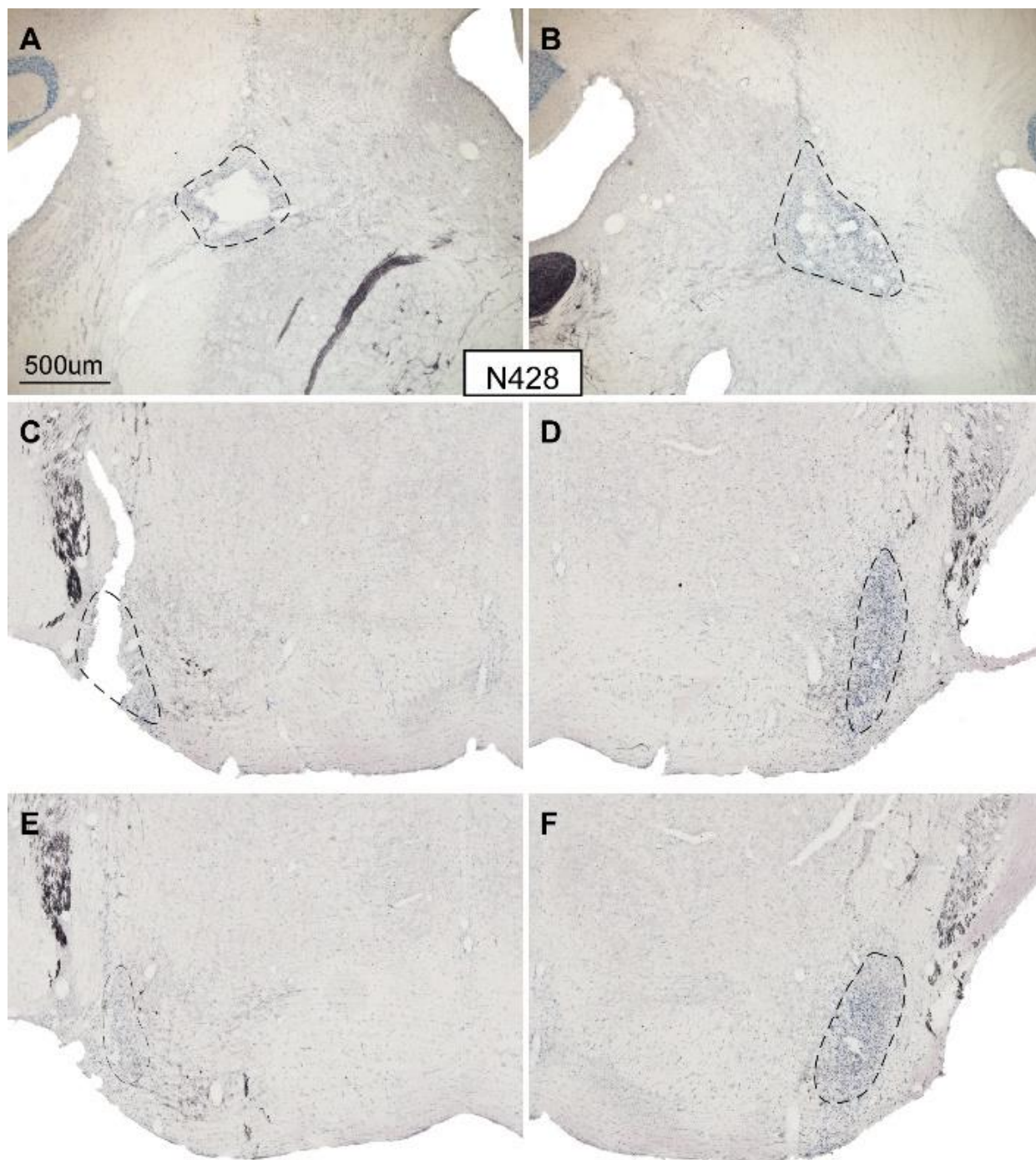


FIGURA 32 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N428 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F). Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

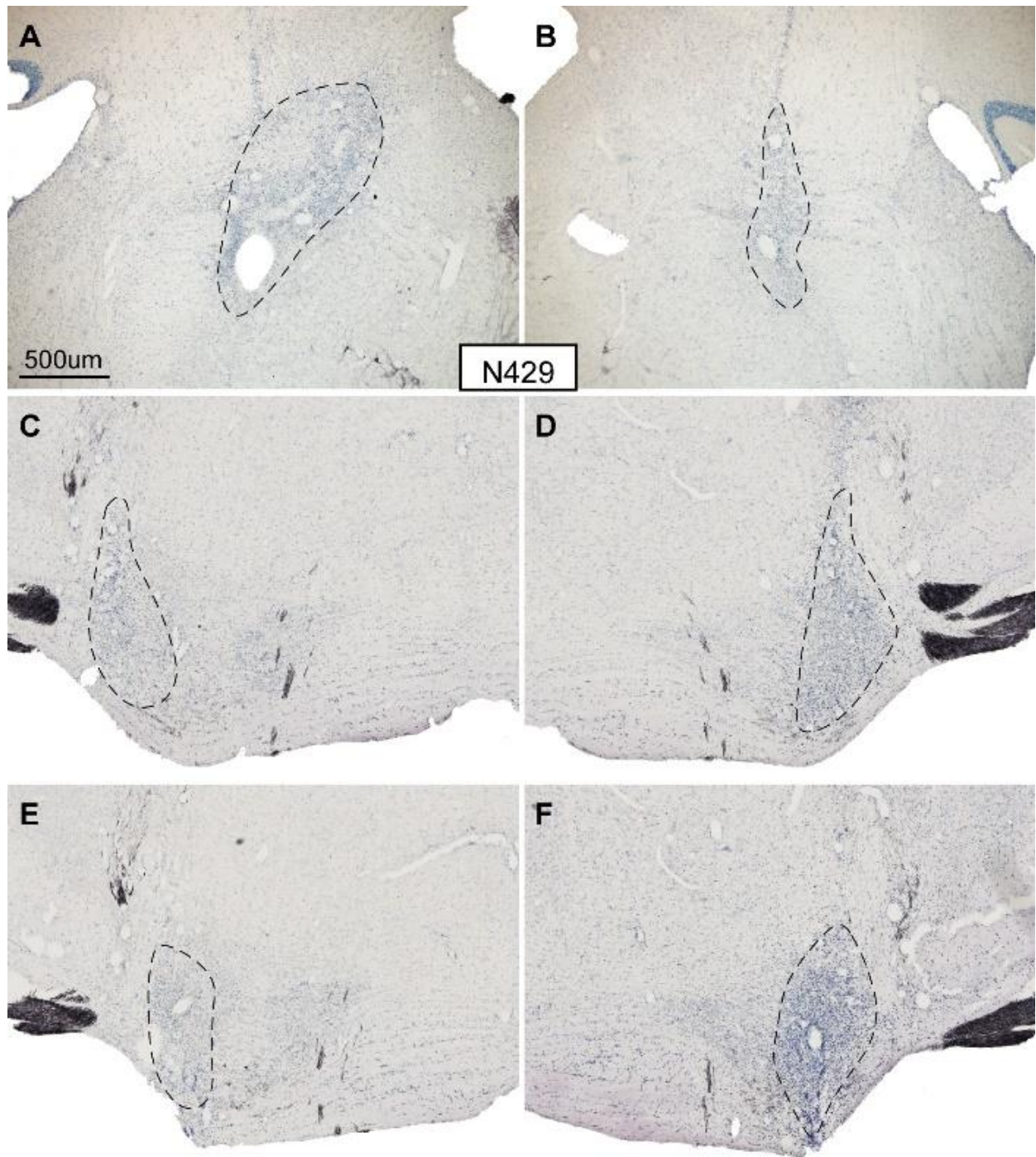


FIGURA 33 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N429 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F). Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

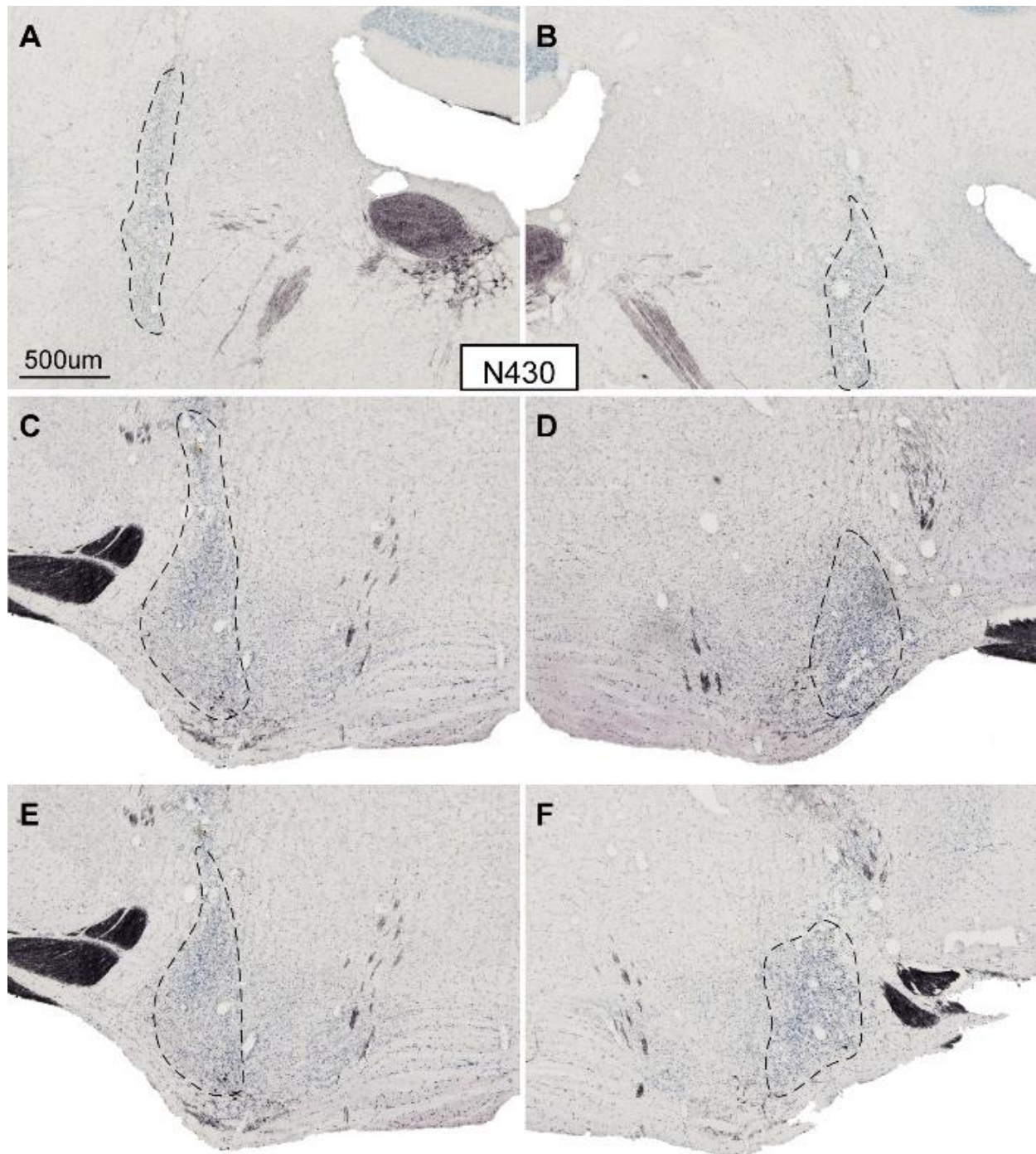


FIGURA 34 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N430 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F). Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

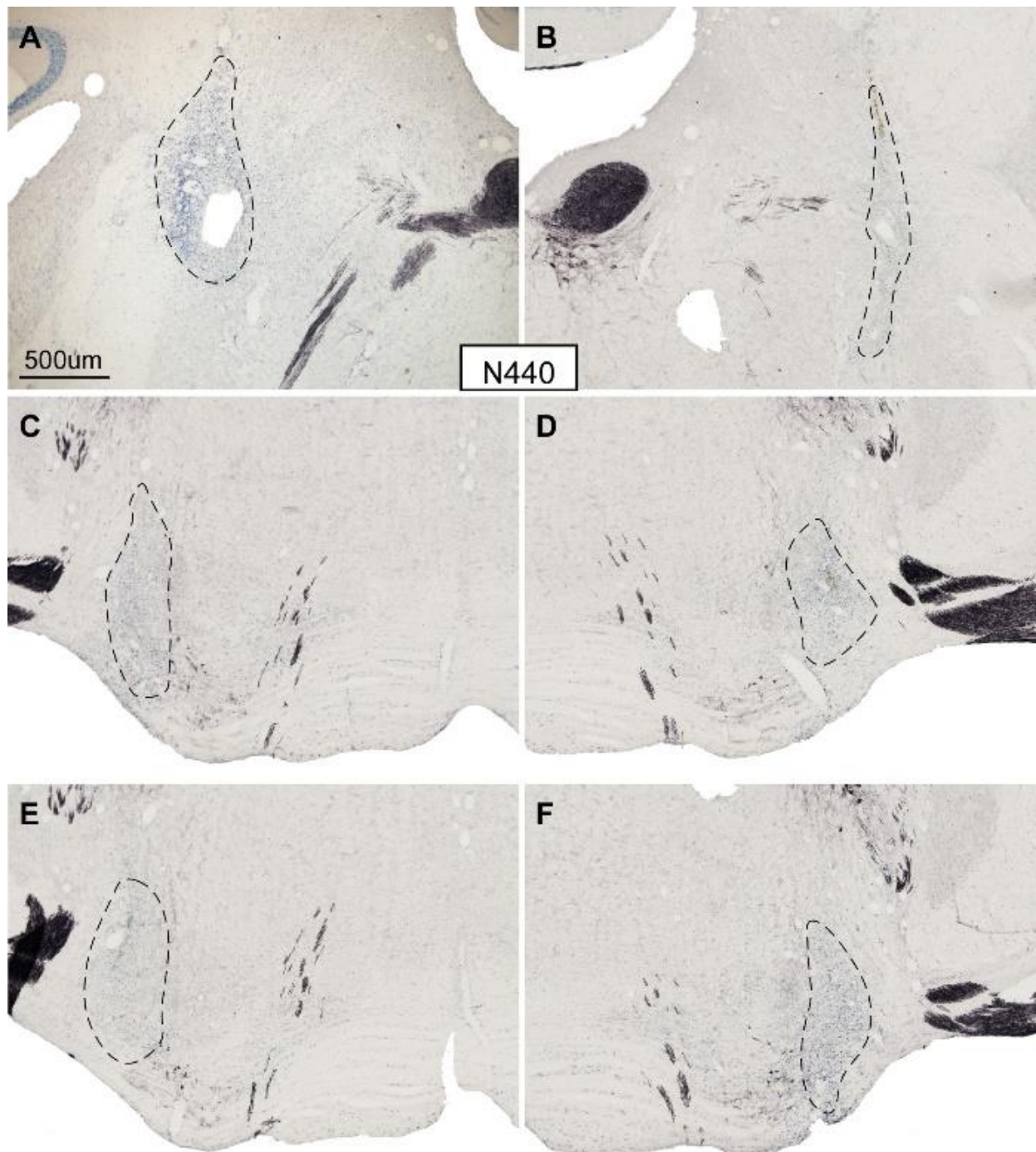


FIGURA 35 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N440 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F). Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

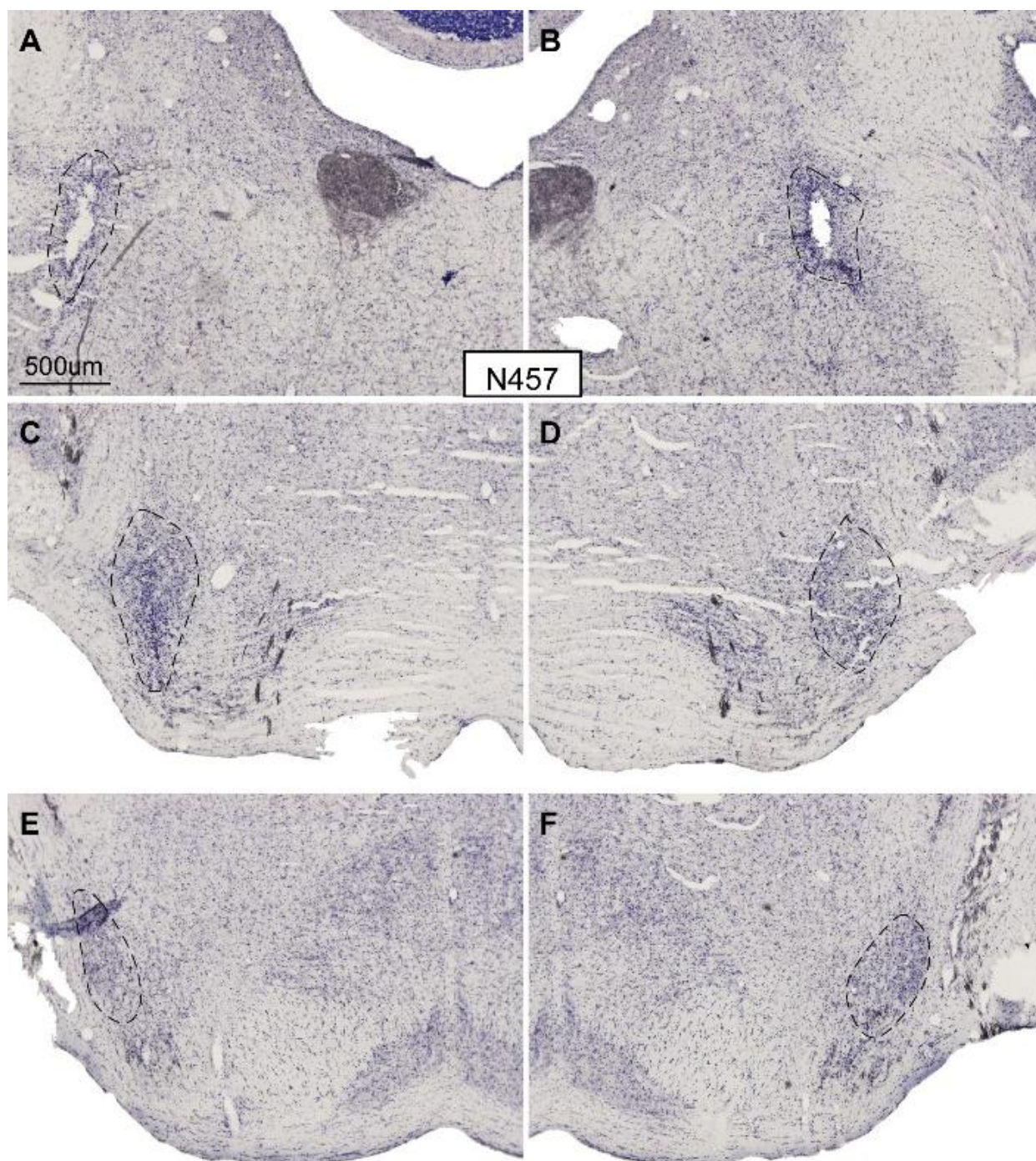


FIGURA 36 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N457 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F). Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

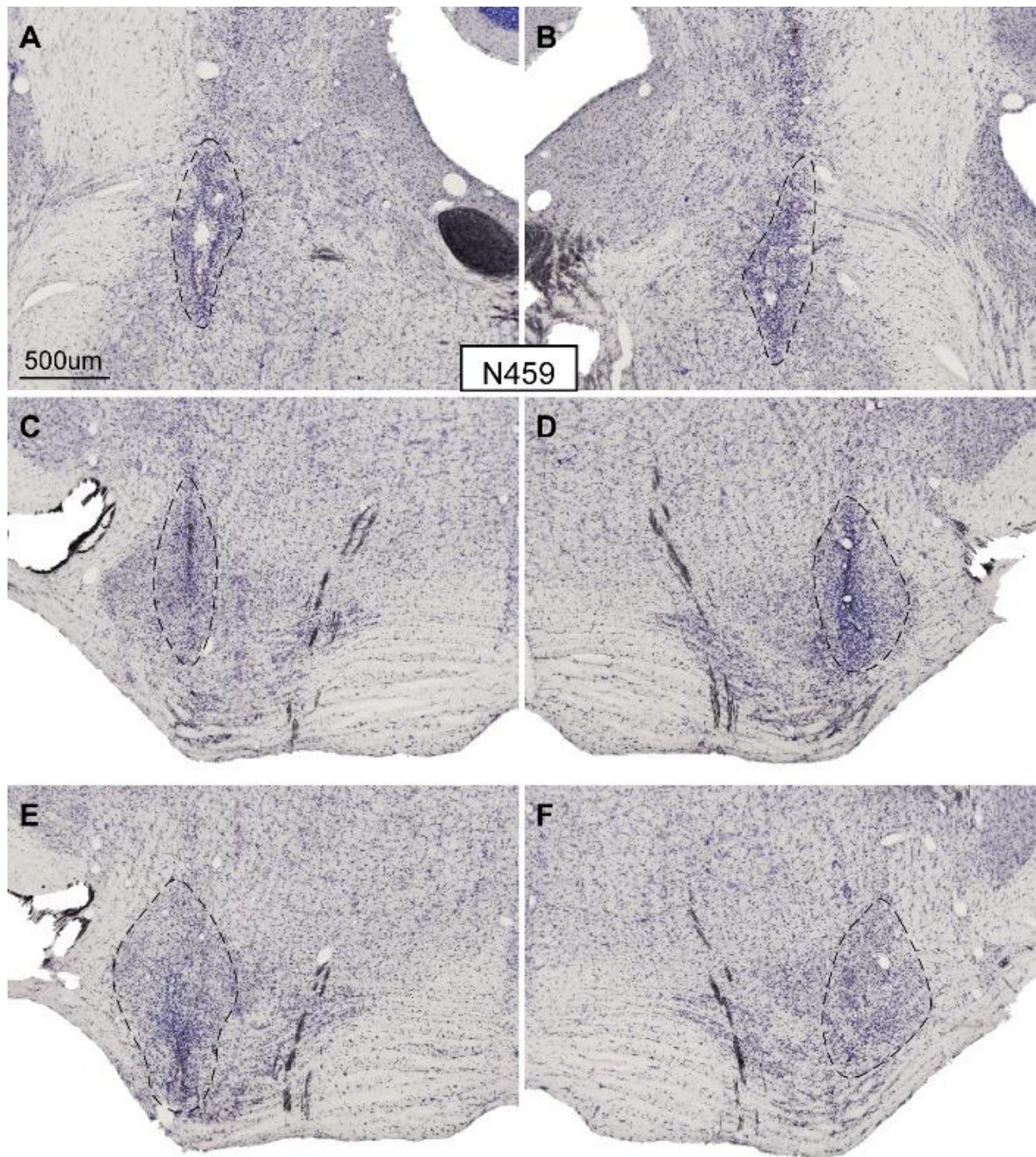


FIGURA 37 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N459 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F). Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

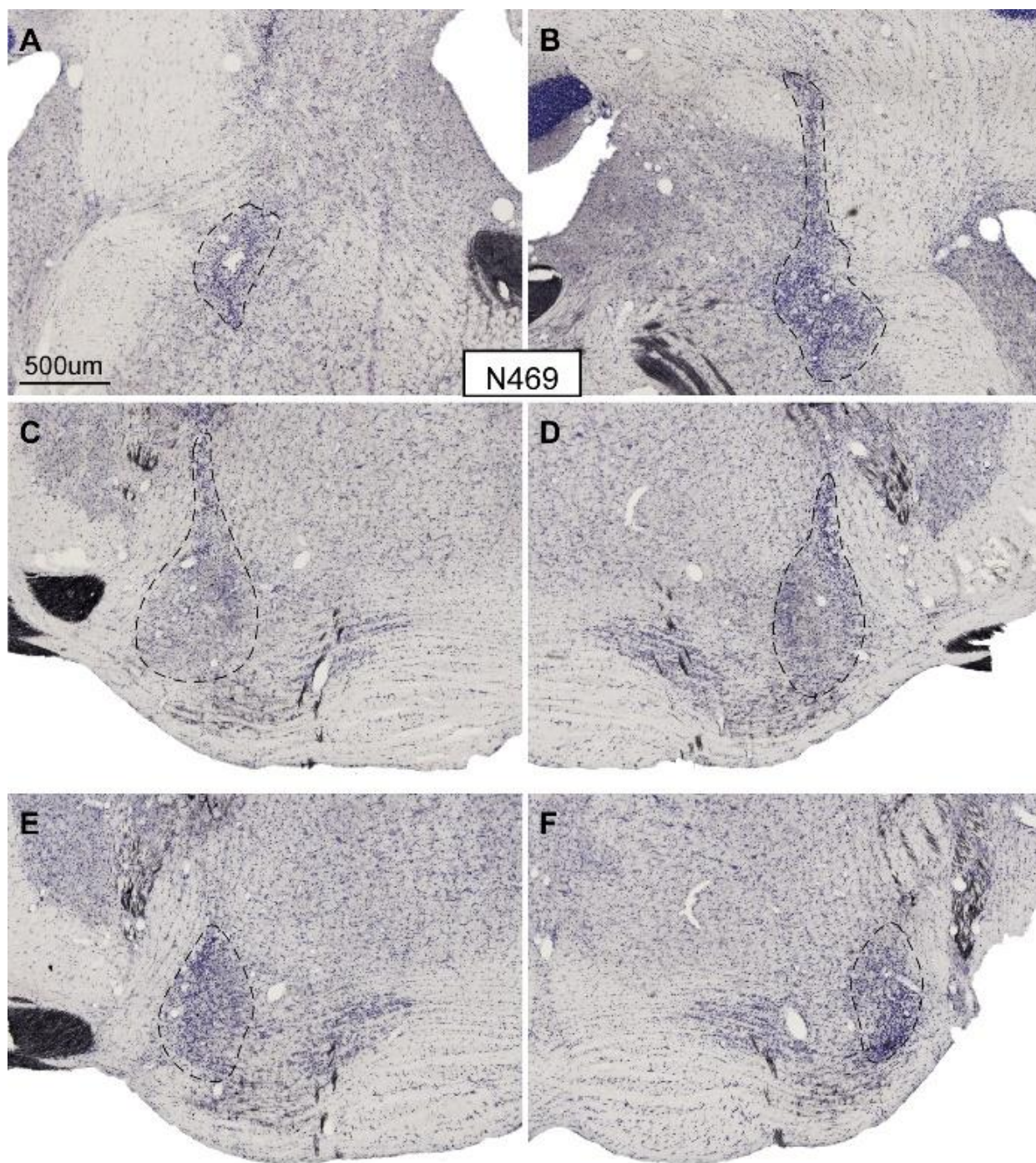


FIGURA 38 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico do caso N469 do grupo lesão evidenciando, na área tracejada, o local da lesão eletrolítica na região do OCB em ambos os antímeros (A e B) e de duas secções do local de lesão em VNTB em ambos os antímeros (C, D, E e F). Os cortes foram submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para ChAT e contracoloração pelo método de Nissl. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

APÊNDICE I – Análise da área e contagem de células imunorreativas a FOS de 3 casos de cada grupo experimental

caso N305 (Sham)							
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CId1	5,192	736	141,767	Cle1	5,232	720	137,604
CId2	5,439	519	95,423	Cle2	5,511	538	97,624
CId3	4,583	345	75,282	Cle3	4,888	308	63,006
CId4	4,329	235	54,287	Cle4	4,399	197	44,784
CId5	2,820	165	58,510	Cle5	2,690	145	53,897
total CId	22,362	2.000		total Cle	22,721	1.908	
densidade média CId	89,437			densidade média Cle	83,975		
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CNd1	0,832	86	103,363	CNe1	0,739	100	135,299
CNd2	1,016	98	96,467	CNe2	1,079	143	132,510
CNd3	0,996	72	72,277	CNe3	0,976	100	102,415
CNd4	1,092	45	41,201	CNe4	1,025	60	58,520
CNd5	0,752	47	62,510	CNe5	0,900	44	48,863
CNd6	0,861	34	39,489	CNe6	0,714	34	47,623
CNd7	0,704	27	38,362	CNe7	0,796	36	45,231
CNd8	0,427	30	70,185	CNe8	0,550	45	81,814
CNd9	0,304	20	65,862	CNe9	0,414	25	60,354
CNd10	0,082	12	145,595	CNe10	0,198	18	90,803
total CNd	7,066	471		total CNe	7,393	605	
densidade média CNd	66,653			densidade média CNe	81,837		
caso N306 (Sham)							
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CId1	3,798	748	196,961	Cle1	4,559	638	139,957
CId2	4,961	834	168,119	Cle2	5,047	535	106,001
CId3	4,913	678	137,996	Cle3	4,835	483	99,889
CId4	4,657	281	60,335	Cle4	4,614	270	58,517
CId5	2,827	94	33,250	Cle5	2,646	84	31,745
total CId	21,156	2.635		total Cle	21,701	2.010	
densidade média CId	124,551			densidade média Cle	92,622		
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CNd1	0,869	90	103562,3497	CNe1	0,718	110	153,171
CNd2	0,958	70	73047,88403	CNe2	1,064	138	129,746
CNd3	0,930	68	73105,65815	CNe3	1,001	76	75,940
CNd4	0,866	44	50818,23685	CNe4	0,875	44	50,306
CNd5	0,538	53	98538,04934	CNe5	0,741	48	64,774
CNd6	0,728	30	41227,72227	CNe6	0,639	45	70,388
CNd7	0,715	28	39139,509	CNe7	0,757	25	33,040
CNd8	0,505	20	39628,64182	CNe8	0,516	17	32,973
CNd9	0,322	15	46562,46112	CNe9	0,333	22	65,970
CNd10	0,134	8	59500,50162				
total CNd	6,566	426		total CNe	6,643	525	
densidade média CNd	64,884			densidade média CNe	79,027		
Análise Fos - caso N442 (Sham)							
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CId1	4,962	136	27,409	Cle1	5,121	220	42,958
CId2	5,148	96	18,646	Cle2	5,081	181	35,621
CId3	4,648	40	8,607	Cle3	4,307	59	13,700
CId4	4,397	37	8,414	Cle4	4,211	54	12,822
CId5	3,831	23	6,003	Cle5	3,474	20	5,757
total CId	22,987	332		total Cle	22,195	534	
densidade média CId	14,443			densidade média Cle	24,060		
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CNd1	0,545	24	44,034	CNe1	0,554	9	16,234
CNd2	1,009	53	52,529	CNe2	1,007	22	21,850
CNd3	1,084	58	53,528	CNe3	0,974	21	21,562
CNd4	0,859	22	25,599	CNe4	0,865	9	10,399
CNd5	0,810	14	17,285	CNe5	0,818	22	26,904
CNd6	0,515	33	64,048	CNe6	0,564	25	44,335
CNd7	0,757	13	17,168	CNe7	0,703	9	12,806

CNd8	0,607	12	19,758	CNe8	0,574	18	31,376
CNd9	0,349	6	17,197	CNe9	0,196	10	50,925
total CNd	6,536	235		total CNe	6,255	145	
densidade média CNd		35,957		densidade média CNe		23,181	

caso N386 (Lesão)							
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CId1	4,981	388	77,890	Cle1	4,745	269	56,692
CId2	5,468	385	70,407	Cle2	5,368	236	43,963
CId3	5,325	198	37,185	Cle3	5,635	121	21,473
CId4	5,260	160	30,419	Cle4	5,295	92	17,376
CId5	2,858	81	28,344	Cle5	2,884	44	15,255
total CId	23,892	1212		total Cle	23,927	762	
densidade média CId		50,728		densidade média Cle		31,847	

Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CNd1	0,993	84	84,627	CNe1	0,289	7	24,204
CNd2	1,462	101	69,101	CNe2	1,138	96	84,335
CNd3	1,059	64	60,458	CNe3	1,262	86	68,148
CNd4	0,772	29	37,545	CNe4	0,860	47	54,642
CNd5	0,490	25	51,019	CNe5	0,794	35	44,059
CNd6	0,713	24	33,681	CNe6	0,539	44	81,589
CNd7	0,588	15	25,512	CNe7	0,715	47	65,777
CNd8	0,405	8	19,753	CNe8	0,556	30	53,985
CNd9	0,090	2	22,196	CNe9	0,321	12	37,363
total CNd	6,571	352		total CNe	6,475	404	
densidade média CNd		53,570		densidade média CNe		62,397	

caso N390 (Lesão)							
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CId1	4,879	279	57,187	Cle1	4,993	289	57,882
CId2	4,787	150	31,336	Cle2	4,800	218	45,415
CId3	4,419	112	25,345	Cle3	4,801	116	24,162
CId4	3,178	56	17,622	Cle4	3,806	82	21,542
CId5	2,509	43	17,139	Cle5	3,044	83	27,267
total CId	19,771	640		total Cle	21,444	788	
densidade média CId		32,370		densidade média Cle		36,746	

Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CNd1	0,852	51	59,852	CNe1	0,680	17	24,99401
CNd2	1,188	56	47,148	CNe2	1,144	21	18,35063
CNd3	0,963	50	51,921	CNe3	0,807	24	29,74054
CNd4	0,727	29	39,914	CNe4	0,797	13	16,31168
CNd5	0,737	19	25,780	CNe5	0,399	18	45,15121
CNd6	0,642	28	43,621	CNe6	0,634	10	15,77269
CNd7	0,512	19	37,104	CNe7	0,501	14	27,96939
CNd8	0,279	10	35,903	CNe8	0,321	4	12,4571
total CNd	5,899	262		total CNe	5,283	121	
densidade média CNd		44,415		densidade média CNe		22,904	

caso N429 (Lesão)							
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CId1	4,894	107	21,863	Cle1	4,600	91	19,782
CId2	4,904	53	10,808	Cle2	4,829	81	16,774
CId3	4,404	42	9,537	Cle3	4,339	40	9,219
CId4	4,543	29	6,383	Cle4	4,672	37	7,920
CId5	3,659	14	3,826	Cle5	4,095	9	2,198
total CId	22,404	245		total Cle	22,535	258	
densidade média CId		10,935		densidade média Cle		11,449	

Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CNd1	0,668	30	44,883	CNe1	1,231	24	19,497
CNd2	1,128	18	15,955	CNe2	1,003	17	16,942
CNd3	0,884	15	16,976	CNe3	0,841	14	16,652
CNd4	0,480	10	20,825	CNe4	0,527	20	37,918
CNd5	0,406	6	14,778	CNe5	0,709	5	7,057
CNd6	0,637	5	7,854	CNe6	0,504	5	9,924
CNd7	0,477	6	12,589	CNe7	0,303	11	36,265
CNd8	0,262	8	30,537				
total CNd	4,942	98		total CNe	5,118	96	
densidade média CNd		19,832		densidade média CNe		18,756	

caso N425 (Controle)							
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CId1	5,057	201	39749,93903	CId1	4,725	170	35,975
CId2	5,700	68	11929,76102	CId2	4,962	77	15,519
CId3	4,662	73	15659,43097	CId3	4,478	93	20,770
CId4	3,481	52	14938,7435	CId4	3,896	43	11,037
total CId	18,899	394		total CId	18,061	383	
densidade média CId		20,847		densidade média CId		21,206	
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CNd1	0,793	40	50471,15403	CNe1	0,730	38	52,021
CNd2	1,238	37	29891,00911	CNe2	0,995	70	70,367
CNd3	0,880	23	26128,00354	CNe3	0,087	41	470,104
CNd4	0,771	15	19456,34876	CNe4	0,634	11	17,343
CNd5	0,703	11	15648,63936	CNe5	0,797	15	18,832
CNd6	0,582	13	22345,853	CNe6	0,575	10	17,378
CNd7	0,441	8	18139,20716	CNe7	0,616	4	6,490
CNd8	0,182	9	49512,21256	CNe8	0,475	10	21,050
				CNe9	0,292	3	10,265
total CNd	5,589	156		total CNe	5,202	202	
densidade média CNd		27,911		densidade média CNe		38,829	

caso N436 (Controle)							
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CId1	4,759	91	19,122	CId1	4,436	139	31,333
CId2	4,599	33	7,176	CId2	5,002	49	9,796
CId3	4,319	33	7,641	CId3	4,387	39	8,890
CId4	3,094	43	13,896	CId4	3,392	34	10,023
total CId	16,771	200		total CId	17,217	261	
densidade média CId		11,925		densidade média CId		15,159	
Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade	Secção	Área (mm ²)	Nº de células	Densidade
CNd1	0,760	28	36,830	CNe1	0,565	9	15,937
CNd2	0,969	47	48,514	CNe2	0,940	56	59,560
CNd3	0,661	31	46,884	CNe3	0,089	40	451,234
CNd4	0,714	35	49,017	CNe4	0,742	9	12,136
CNd5	0,731	38	52,012	CNe5	0,735	11	14,968
CNd6	0,493	15	30,437	CNe6	0,484	9	18,581
CNd7	0,670	27	40,325	CNe7	0,693	11	15,879
CNd8	0,587	34	57,889	CNe8	0,563	13	23,100
CNd9	0,191	9	47,074	CNe9			
total CNd	5,776	264		total CNe	4,810	158	
densidade média CNd		45,708		densidade média CNe		32,849	

caso N437 (Controle)							
Secção	Área (mm2)	No de células	Densidade	Secção	Área (mm2)	No de células	Densidade
CId1	5,404	127	23,500	CId1	3,940	139	35,280
CId2	5,878	155	26,368	CId2	4,763	209	43,882
CId3	4,861	53	10,903	CId3	4,619	59	12,772
CId4	3,918	47	11,997	CId4	4,143	32	7,724
CId5	3,359	36	10,719	CId5	3,602	24	6,663
total CId	23,420	418		total CId	21,067	463	
densidade média CId		17,848		densidade média CId		21,978	
Secção	Área (mm2)	No de células	Densidade	Secção	Área (mm2)	No de células	Densidade
CNd1	0,577	18	31,181	CNe1	0,327	5	15,268
CNd2	0,870	52	59,768	CNe2	0,726	43	59,201
CNd3	0,888	39	43,908	CNe3	0,082	73	891,310
CNd4	0,685	21	30,677	CNe4	0,715	41	57,364
CNd5	0,665	21	31,594	CNe5	0,679	21	30,910
CNd6	0,710	8	11,275	CNe6	0,741	18	24,308
CNd7	0,636	12	18,863	CNe7	0,596	20	33,557
CNd8	0,602	19	31,539	CNe8	0,444	15	33,806
CNd9	0,428	23	53,754	CNe9	0,414	10	24,148
CNd10				CNe10	0,246	6	24,390
total CNd	6,061	213		total CNe	4,724	252	
densidade média CNd		35,144		densidade média CNe		53,343	

Análise estatística da densidade de neurônios imunorreativos a FOS no IC

	controle	Sham	Lesão
Number of values	6	6	6
Minimum	11,93	14,44	10,94
25% Percentile	14,35	21,66	11,32
Median	19,35	86,71	32,11
75% Percentile	21,40	100,6	40,24
Maximum	21,98	124,6	50,73
Mean	18,16	71,51	29,01
Std. Deviation	3,976	43,00	15,40
Std. Error	1,623	17,55	6,287
Lower 95% CI	13,99	26,39	12,85
Upper 95% CI	22,33	116,6	45,17

KS normality test

KS distance	0,2503	0,2807	0,2397
P value	> 0.10	> 0.10	> 0.10
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes

One-way analysis of variance

P value	0,0079
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
F	6,810
R squared	0,4759

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	9542	2	4771
Residual (within columns)	10510	15	700,6
Total	20050	17	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
controle vs Sham	-53,35	4,938	Yes	**	-93.05 to -13.65
controle vs Lesão	-10,85	1,004	No	ns	-50.55 to 28.85
Sham vs Lesão	42,50	3,933	Yes	*	2.801 to 82.20

Análise estatística da densidade de neurônios imunorreativos a FOS nos núcleos cocleares

Number of values	controle Sham Lesão		
	6	6	6
Minimum	27,91	23,18	18,76
25% Percentile	31,61	32,76	19,56
Median	36,99	65,77	33,66
75% Percentile	47,62	79,73	55,78
Maximum	53,34	81,84	62,40
Mean	38,96	58,59	36,98
Std. Deviation	9,235	23,79	18,98
Std. Error	3,770	9,710	7,748
Lower 95% CI of mean	29,27	33,63	17,06
Upper 95% CI of mean	48,66	83,55	56,90

KS normality test			
KS distance	0,1725	0,2710	0,2708
P value	> 0.10	> 0.10	> 0.10
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes

One-way analysis of variance	
P value	0,1122
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	3
F	2,540
R squared	0,2530

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1712	2	856,1
Residual (within columns)	5056	15	337,1
Total	6768	17	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant	Summary	95% CI of diff
			P < 0.05?		
controle vs Sham	-19,63	2,618	No	ns	-47.16 to 7.912
controle vs Lesão	1,985	0,2648	No	ns	-25.55 to 29.52
Sham vs Lesão	21,61	2,883	No	ns	-5.927 to 49.15