



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Geruza Olivieri de Paiva

**Estudo da Expressão do Canal para Sódio Dependente de Voltagem Nav1.6
nas Células Esféricas e Globulares em Arbusto do Núcleo Coclear do
Sistema Auditivo**

Uberaba - MG
2011

Geruza Olivieri de Paiva

**Estudo da Expressão do Canal para Sódio Dependente de Voltagem Nav1.6
nas Células Esféricas e Globulares em Arbusto do Núcleo Coclear do
Sistema Auditivo**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração 1: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues

Uberaba - MG
2011

Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro

P168e Paiva, Geruza Olivieri de
Estudo da expressão do canal para sódio dependente de voltagem Nav1.6
nas células esféricas e globulares em arbusto do núcleo coclear do sistema
auditivo / Geruza Olivieri de Paiva. -- 2012.
76 f. : fig., graf.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Fede-
ral do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2012.
Orientador: Prof. Dr. Aldo Rogalis Aquiles Rodrigues

1. Canais de sódio. 2. Núcleo coclear. 3. Segmento inicial do estribo. 4.
Sistema auditivo. 5. Neurônios esféricos em arbusto. 6. Neurônios globulares
em arbusto. I. Rodrigues, Aldo Rogalis Aquiles. II. Universidade Federal do
Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 612.858



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E NATURAIS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Mestrado em Ciências Fisiológicas

Uberaba, MG, 15 de julho de 2011.

À
COORDENADORIA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, UFTM.

Defesa de dissertação e exame final de GERUZA OLIVIERI DE PAIVA, candidata ao grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração I – Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

A Banca Examinadora que esta subscreve, comunica a essa Coordenadoria, para os devidos fins, que procedeu nesta data, ao exame da dissertação de mestrado intitulada **Estudo da expressão do canal para sódio dependente de voltagem $Na_v1.6$ nas células esféricas e globulares em arbusto do núcleo coclear do sistema auditivo**, do Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (Área de Concentração I – Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia), bem como ao exame final.

A candidata foi considerada aprovada (aprovada/reprovada).

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wamberto Antonio Varanda (Examinador) Wamberto Antonio Varanda
Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva (Examinador) Valdo José Dias da Silva
Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues - Orientador Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues

Dedico essa dissertação aos meus pais Maria Alice e Pedro Paulo, meus ideais eternos de perseverança. Dedico também à minha filha Carolina e ao meu esposo Yuri, os alicerces da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha filha Carolina, meu raio de sol que renova minhas energias com seu sorrisinho lindo.

Ao meu querido esposo Yuri, por sempre me compreender, apoiar e me amar.

À minha mãe, minha melhor amiga, meu porto seguro, agradeço por me ajudar a cuidar da Carolina para que eu concluísse esse trabalho.

Ao meu pai, que sempre acreditou no meu potencial, me aconselhando a buscar o melhor para minha vida e carreira.

Aos meus irmãos Thiago e Samuel, pelos conselhos valiosos e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

À minha sobrinha Luiza, pelas brincadeiras e pelos momentos de descontração.

Ao meu orientador Prof. Aldo R. A. Rodrigues pela oportunidade de realizar esse trabalho, pelos ensinamentos, por estar presente em todos os momentos em que precisei, mas o mais importante por engrandecer minha vivência.

Aos professores Ricardo Leão e Wamberto Antonio Varanda da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) por disponibilizarem gentilmente seus laboratórios para a realização dos experimentos iniciais desse trabalho.

À UFU pelo pleno acesso ao microscópio confocal, e ao trabalho do Prof. Marcelo Belletti na coordenação do uso do mesmo, e à técnica Mariane Borges Franco pela ajuda na sua operação. O mesmo agradecimento à FMRP por possibilitar a aquisição de imagens confocais e ao Prof. Lenaldo Blanco Rocha pelo auxílio nessa tarefa. Agradeço também ao Prof. Marcos Antonio Rossi do Departamento de Patologia da FMRP pelo uso de seu microscópio de fluorescência.

Ao colega Ricardo Martins Merino (FMRP) por me apresentar a técnica de imunomarcagem e dar suporte à fase inicial desse trabalho, e ao técnico Rubens Fernando de Melo (FMRP) por me ensinar a técnica de coloração pelo método de Nissl.

Aos professores do curso da Pós-Graduação e do Departamento de Fisiologia da UFTM pelo período de aprendizado e convívio. Em especial ao Prof. Luiz Carlos Reis por ter iniciado a minha jornada na Fisiologia, à Prof^a. Maria Laura pelo auxílio na aquisição de um dos anticorpos utilizados no trabalho, e ao Prof. Valdo José Dias da Silva pela atenção e suporte durante a realização do trabalho.

Ao meu parceiro de bancada Glauco, por me acompanhar e me ajudar nos experimentos, principalmente no período em que ganhei minha bebezinha.

Às minhas leais companheiras Marília, Carolina e Caroline, pela amizade, cumplicidade, suporte e carinho, especialmente durante o período em que eu estava esperando a Carolzinha.

Aos colegas do laboratório e do curso de Pós-Graduação Angélica, Weder, Livia, Suzana, Marcelo, Rodney, Lucas, Vanessa, Aletéia, Leonardo, Thales, Otávio, Igor, Marcos Paulo, Liciane, Lidiane, Sharon e Marco Túlio pelo convívio diário e troca de experiências.

À querida Elisabete Ambrosio, secretária do curso de Pós-Graduação, um verdadeiro anjo que caiu do céu para iluminar nossos caminhos.

Agradeço a atenção da secretária Isabel e dos técnicos da Fisiologia (Ana, Margarete, Marco Aurélio, Fausto e Donizete), em especial à Ana pelo carinho com os alunos fazendo quitutes deliciosos.

À disciplina de Bioquímica pela ajuda sempre que requisitada, em especial aos técnicos Geraldo e Flávio.

À CAPES-REUNI pela bolsa de estudo, e à FAPEMIG e FUNEPU pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização desse trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
volta ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

PAIVA GO. Estudo da expressão do canal para sódio dependente de voltagem Nav1.6 nas células esféricas e globulares em arbusto do núcleo coclear do sistema auditivo. [dissertação]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2011.

RESUMO

O canal para sódio Nav1.6 apresenta algumas propriedades biofísicas notáveis como um baixo limiar de ativação, rápida inativação e a capacidade de gerar correntes de sódio ressurgente e persistente. Tais propriedades têm sido associadas a neurônios que disparam em alta frequência. O presente trabalho buscou estudar a expressão e localização celular desse canal durante o desenvolvimento neuronal pós-natal (P8, P15 e P30 dias) das células esféricas (SBCs) e globulares (GBCs) em arbusto do núcleo coclear do sistema auditivo. Para isso, reações de coloração pelo método de Nissl e imunofluorescência de dupla marcação foram realizadas em fatias do núcleo utilizando anticorpos contra as proteínas Nav1.6, proteína 2 associada à microtúbulos, anquirina-G e proteína de vesícula sináptica 2. Nossos resultados sugerem que o canal para sódio Nav1.6 é expresso nos neurônios em arbusto já no oitavo dia pós-natal, e que sua expressão acompanha o desenvolvimento neuronal permanecendo após sua maturação. A expressão do canal Nav1.6 é intensa nos segmentos iniciais do axônio (AISs) das células em arbusto, e sua densidade de marcação aumenta com a distância a partir do soma, apresentando um pico de fluorescência na região distal do AIS. A média da extensão da marcação anti-Nav1.6 nos AISs das SBCs em P15 (n=5) e P30 (n=17) foi de $17 \pm 0,8$ e $19 \pm 0,6$ μm , respectivamente, enquanto nas GBCs em P15 (n=6) e P30 (n=13) foi de $26,7 \pm 2,8$ e $27,3 \pm 1$ μm , respectivamente. A comparação entre a extensão da marcação anti-Nav1.6 nos AISs em cada tipo celular, nos diferentes estágios de desenvolvimento (P15 e P30), não se mostrou significativa. Já a análise da extensão da marcação anti-Nav1.6 nos AISs, entre esses neurônios, mostrou-se significativa tanto em P15 como em P30. A alta concentração desse canal para sódio no AIS sugere que o Nav1.6 seja o canal responsável pela geração do potencial de ação nesses neurônios. A anquirina-G, uma proteína de ligação citoesqueleto-membrana, parece estar envolvida com a ancoragem desses canais no AIS. Nodos de Ranvier intensamente marcados pelo Nav1.6 foram observados na raiz nervosa e ao longo da região anteroventral do núcleo coclear, sugerindo que esse canal participa também na condução do potencial de ação em fibras nervosas da parte inferior do sistema auditivo. Experimentos adicionais poderão revelar se esse canal desempenha essas funções isoladamente, como sua alta densidade sugere, ou em associação com outros canais para sódio.

Palavras-chave: Nav1.6. Canais para sódio. Segmento inicial do axônio. Núcleo coclear. Sistema auditivo. Neurônios esféricos em arbusto. Neurônios globulares em arbusto.

PAIVA GO. Estudo da expressão do canal para sódio dependente de voltagem Nav1.6 nas células esféricas e globulares em arbusto do núcleo coclear do sistema auditivo. Study of expression of the voltage-dependent sodium channel Nav1.6 on spherical and globular bushy cells of the cochlear nucleus of auditory system. [dissertation]. Uberaba (BR): Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2011.

ABSTRACT

The voltage-gated sodium channel Nav1.6 exhibits some striking biophysical peculiarities as low threshold for activation, fast inactivation and the capacity to generate the resurgent and persistent sodium currents. These biophysical properties have been associated to neurons that fire at high frequency. The present work has sought to study the expression and cellular localization of Nav1.6 during neuronal development (P8, P15 and P30 days) of spherical (SBCs) and globular bushy cells (GBCs) of the cochlear nucleus. For this purpose, Nissl's staining and double labeling immunofluorescence reactions were done in sections of this nucleus using antibodies directed against Nav1.6, microtubule associated protein 2, ankyrin-G and synaptic vesicle 2. Our results suggest that Nav1.6 channel is expressed in bushy cells of cochlear at P8 and that its expression follows the post-natal neuronal development and persist after their maturation. The expression of Nav1.6 is intense at axonal initial segments (AISs) of bushy cells, and the density of labeling at the AIS increases with the distance from the soma, showing a fluorescence peak at the distal part of this axon domain. The average extension of Nav1.6 labeling at the AIS from SBCs at P15 (n=5) and P30 (n=17) was $17 \pm 0,8$ and $19 \pm 0,6$ μm whereas in the GBCs, at P15 (n=6) and P30 (n=13), was $26,7 \pm 2,8$ and $27,3 \pm 1$ μm , respectively. The statistical analysis of the extension of Nav1.6 labeling at the AIS in each cell type, at different ages (P15 and P30), did not show significant difference. The analysis of the extension of Nav1.6 labeling at the AIS, between these neurons, did show significant statistical difference at P15 and P30. The high density of this sodium channel subtype at the AIS suggests that Nav1.6 is responsible for action potential generation at these cells. The membrane-cytoskeleton linker protein AnkG seems to be involved with anchorage of this channel at the AIS. At the nerve root and following the ascending branches of the auditory nerve, nodes of Ranvier showed an intense labeling for Nav1.6, suggesting that this channel participates on the conduction of action potentials at nerve fibers from the inferior auditory system. Additional experiments may reveal whether this channel can perform these activities alone, as its high density suggests, or in combination with other sodium channels subtypes.

Key words: Nav1.6. Voltage-gated sodium channels. Axon initial segment. Cochlear nucleus. Auditory system. Spherical bushy cells. Globular bushy cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 1: Inervação de diferentes tipos de neurônios do núcleo coclear pelas fibras auditivas em gatos.....	14
FIG. 2: Estrutura do canal para sódio dependente de voltagem.....	18
FIG. 3: Progressão caudorostral de um corte coronal do núcleo coclear corado pelo método de Nissl.....	30
FIG. 4: Progressão lateromedial de um corte parassagital do núcleo coclear corado pelo método de Nissl.....	31
FIG. 5: Visão panorâmica do padrão de imunomarcção para o canal Nav1.6 na parte anteroventral do núcleo coclear (AVCN).....	33
FIG. 6: Expressão do canal Nav1.6 na parte anteroventral do núcleo coclear de ratos de trinta dias.....	34
FIG. 7: Expressão do canal Nav1.6 na parte anteroventral do núcleo coclear de ratos de trinta dias.....	36
FIG. 8: Expressão do canal Nav1.6 na parte anteroventral do núcleo coclear de ratos de trinta dias.....	37
FIG. 9: Expressão do canal Nav1.6 na parte anteroventral do núcleo coclear de ratos de trinta dias.....	38
FIG. 10: Expressão do canal Nav1.6 em neurônios da raiz nervosa do núcleo coclear de ratos de trinta dias.....	40
FIG. 11: Expressão do canal Nav1.6 em neurônios da raiz nervosa do núcleo coclear de ratos de trinta dias.....	41
FIG. 12: Expressão do canal Nav1.6 em neurônios do AVCN de ratos de quinze dias.....	43
FIG. 13: Expressão do canal Nav1.6 em neurônios da raiz nervosa do VCN de ratos de quinze dias.....	44
FIG. 14: Expressão do canal Nav1.6 nas células de Purkinje do cerebelo de ratos de trinta dias (controle positivo interno)	46
FIG. 15: Expressão do canal Nav1.6 nas células de Purkinje do cerebelo de ratos de trinta dias (controle positivo interno).....	46
FIG. 16: Expressão do canal Nav1.6 nas células de Purkinje do cerebelo de ratos de trinta dias (controle positivo interno).....	47
FIG. 17: Reação de imunofluorescência para o controle positivo anti-Nav1.6 (Alomone) em ratos de trinta dias.....	47

FIG. 18: Co-localização de anquirina-G e do canal Nav1.6 no AIS de neurônios do AVCN e da raiz nervosa.....	49
FIG. 19: Co-localização de anquirina-G e do canal Nav1.6 na raiz nervosa de um rato de 8 dias.....	50
FIG. 20: Análise da expressão do canal Nav1.6 em terminais sinápticos no AVCN de um rato de trinta dias.....	52
FIG. 21: Análise da expressão do canal Nav1.6 nos terminais sinápticos de células da raiz nervosa de um rato de quinze dias.....	53
FIG. 22: Análise da expressão do canal Nav1.6 em terminais sinápticos no AVCN de um rato de quinze dias.....	54
FIG. 23: Análise da expressão do canal Nav1.6 em terminais sinápticos da raiz nervosa de ratos de quinze dias.....	55
FIG. 24: Análise da expressão do canal Nav1.6 nos terminais sinápticos do VCN de um rato de oito dias.....	56
FIG. 25: Análise da co-localização da marcação anti-Nav1.6 e anti-SV2 nas células de Purkinje do cerebelo. Controle positivo interno da marcação anti-Nav1.6 (Alomone) em um rato de trinta dias.....	57
FIG. 26: Relação entre a extensão da marcação do canal Nav1.6 no AIS e área somática de neurônios do AVCN e da raiz nervosa.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8cn	Ramo coclear do nervo vestibulo-coclear
8vn	Ramo vestibular do nervo vestibulo-coclear
AIS	Segmento inicial do axônio
AnkG	Anquirina-G
AVCN	Núcleo coclear anteroventral
DCN	Núcleo coclear dorsal
DIV	Dias em vitro
DLPO	Núcleo periolivar dorsolateral
DMPO	Núcleo periolivar dorsomedial
DRG	Gânglio da raiz dorsal
GBCs	Células globulares em arbusto
ICP	Pedúnculo cerebelar inferior
IgG	Imunoglobulina
Kv	Canal para potássio dependente de voltagem
LNTB	Núcleo lateral do corpo trapezoidal
LSO	Oliva superior lateral
MAP-2	Proteína 2 associada à microtúbulos
MCP	Pedúnculo cerebelar médio
MNTB	Núcleo medial do corpo trapezoidal
MSO	Oliva superior medial
Nav	Canal para sódio dependente de voltagem
NR	Raiz nervosa
Pn	Dia pós-natal
PAN	Anticorpo anti-canais para sódio
PBS	Solução de salina tamponada com fosfato
PFA	Paraformaldeído
PLP	Paraformaldeído-lisina-periodato
PVCN	Núcleo coclear pósteroventral
Sn	Número do segmento transmembrana
SBCs	Células esféricas em arbusto
SV2	Proteína de vesícula sináptica 2
TE5	Trato espinhal trigeminal
TTX	Tetrodotoxina
TTX-R	Tetrodotoxina resistente
TTX-S	Tetrodotoxina sensível
Tz	Corpo trapezoidal
V _{0.5}	Valor de voltagem onde 50% dos canais iônicos estão disponíveis
VCN	Núcleo coclear ventral
VNLL	Núcleo ventral do lemenisco lateral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PARTE INFERIOR DO SISTEMA AUDITIVO	13
1.2 DIFERENTES TIPOS NEURONAIS ENCONTRADOS NO NÚCLEO COCLEAR .	13
1.3 CANAIS E CORRENTES DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM	17
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL.....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 ANIMAIS	23
4.2 PREPARAÇÕES DO TECIDO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	23
4.3 PREPARAÇÃO DE FATIAS DE 200 μ M NO VIBRÁTOMO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA DE RATOS DE 8 DIAS	24
4.4 EXPERIMENTO DE IMUNOMARCAÇÃO	25
4.5 COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE NISSL.....	26
4.6 MEDIDA DA ÁREA SOMÁTICA E DA EXTENSÃO DA MARCAÇÃO ANTI-NAV1.6 NO AIS	27
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5 RESULTADOS	28
5.1 ANÁLISE DA ANATOMIA E DAS SUBDIVISÕES DO NÚCLEO COCLEAR AUDITIVO.....	28
5.2 EXPRESSÃO DO CANAL NAV1.6 NO AVCN DE RATOS DE 30 DIAS.....	32
5.3 EXPRESSÃO DO NAV1.6 NA RAIZ NERVOSA DO VCN DE RATOS DE 30 DIAS	39
5.4 EXPRESSÃO DO CANAL NAV1.6 NO AVCN E NA RAIZ NERVOSA DE RATOS DE 15 DIAS	42
5.5 EXPRESSÃO DO CANAL NAV1.6 NAS CÉLULAS DE PURKINJE DO CEREBELO EM RATOS DE 30 DIAS.....	45
5.6 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL NAV1.6 E DA ANQUIRINA-G NO AIS .	48
5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO CANAL NAV1.6 NOS TERMINAIS SINÁPTICOS DE NEURÔNIOS DO AVCN E DA RAIZ NERVOSA	51
5.8 RELAÇÃO ENTRE A EXTENSÃO DA MARCAÇÃO DO CANAL NAV1.6 NO AIS E ÁREA SOMÁTICA DE NEURÔNIOS DO AVCN E DA RAIZ NERVOSA DE RATOS DE 30 DIAS E DE 15 DIAS	58
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	74
ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS Nº61 PELO CEUA-UFTM	74
ANEXO B - REFERÊNCIAS DAS FIGURAS	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PARTE INFERIOR DO SISTEMA AUDITIVO

Uma característica única e notável do sistema auditivo é o grande número de centros de processamento interpostos entre a periferia do sistema e seu córtex. Os núcleos auditivos no tronco encefálico, incluindo o núcleo coclear com sua parte ventral (VCN) e dorsal (DCN) e o complexo olivar superior, compreendendo o núcleo medial do corpo trapezoidal (MNTB), a oliva superior medial (MSO) e a oliva superior lateral (LSO), executam uma série de transformações e interpretações dos sinais elétricos carregados pelas fibras aferentes auditivas (Smith, Spirou, 2002).

As células ciliadas internas, que são as células sensoriais do órgão de Corti da cóclea, iniciam a análise da frequência e da intensidade do estímulo sonoro através de sinapses com neurônios do tipo I do gânglio espiral (fibras aferentes auditivas mielinizadas). As células ciliadas externas, também observadas na cóclea, estão dispostas em três camadas e fazem sinapse com os neurônios do tipo II do gânglio espiral (fibras aferentes auditivas amielinizadas) (Smith, Spirou, 2002). Essas últimas apresentam motilidade e participam do ajuste da micromecânica do Órgão de Corti (Nobili, Mammano, Ashmore, 1998). As fibras aferentes auditivas (mielinizadas e amielinizadas) formam a divisão coclear do nervo vestibulo-coclear (VIII par craniano) e terminam tanto na parte ventral quanto na dorsal do núcleo coclear do tronco encefálico (Smith, Spirou, 2002).

Nos neurônios dos núcleos auditivos do tronco encefálico são definidos e refinados os parâmetros como frequência, intensidade e localização do som no espaço (Smith, Spirou, 2002). A execução dessas funções está associada com a morfologia celular, dinâmica das conexões sinápticas pelas quais as células se comunicam e características elétricas dos neurônios presentes nesses centros. Estudos eletrofisiológicos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, têm ajudado a decifrar os padrões de resposta e as características elétricas de neurônios presentes nesses núcleos (Trussell, 2002).

1.2 DIFERENTES TIPOS NEURONAIS ENCONTRADOS NO NÚCLEO COCLEAR

No núcleo coclear, especificamente na sua parte ventral (VCN), distinções entre as formas dos neurônios, projeções e características biofísicas, possibilitaram a classificação dos mesmos em três grupos principais: células em arbusto (*bushy*), *octopus*, e multipolares (*T-*

stellate e *D-stellate*) (Golding, Robertson, Oertel, 1995). Todos esses neurônios recebem a aferência das fibras auditivas do tipo I, que terminam unicamente no núcleo coclear, utilizando terminais nervosos de morfologias distintas. Essas diferentes formas de terminal sináptico estão associadas a diferentes tipos de neurônios pós-sinápticos relativamente segregados no núcleo coclear (Young, 2004).

Na região ventral do núcleo, as células esféricas em arbusto (SBCs, *spherical bushy cells*) são encontradas anteriormente. As globulares em arbusto (GBCs, *globular bushy cells*) são encontradas principalmente entre as bifurcações das fibras auditivas na raiz nervosa, na parte posterior do núcleo coclear ânteroventral (AVCN) e em partes do núcleo coclear pósteroventral (PVCN), com exceção da sua parte mais posterior e dorsal, ou seja, mais centralmente no VCN (Osen, 1969; Hackney, Osen, Kolston, 1990; Young, 2004). As células multipolares (*stellate*) são encontradas mais anteriormente no PVCN e também na raiz nervosa (Smith, Rhode, 1989; Oertel et al., 1990) e as células *octopus* ocupam, com quase exclusividade, uma área mais caudal e dorsal do PVCN (Osen, 1969; Oertel et al., 1990; Golding, Robertson, Oertel, 1995), como pode ser observado na figura 1.

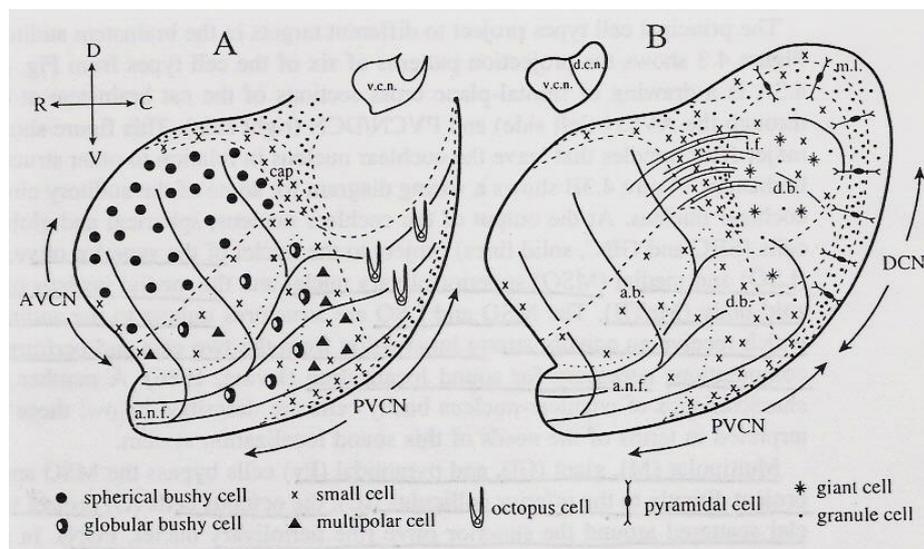


FIG. 1- Inervação de diferentes tipos de neurônios do núcleo coclear pelas fibras auditivas em gatos. Ao entrar pela face ventral do núcleo as fibras nervosas auditivas (a.n.f.) se bifurcam, formando os ramos ascendentes (a.b.) que projetam para parte anterior e ventral do núcleo coclear (AVCN) e os ramos descendentes (d.b.) que inervam a área posterior e ventral (PVCN) e a parte dorsal do núcleo coclear (DCN), onde fazem sinapse com outros neurônios. Vista sagital do núcleo.

Fonte: Young (2004, p.123)

As células esféricas em arbusto (SBCs) recebem a aferência glutamatérgica excitatória das fibras auditivas primárias da cóclea na forma de grandes terminais axo-somáticos em bulbo de Held (*endbulb of Held*), enquanto as células globulares em arbusto (GBCs) recebem a aferência excitatória na forma de pequenos terminais axo-somáticos em bulbo (Ryugo, Wu,

Pongstaporn, 1996; Smith, Spirou, 2002). Os grandes terminais em bulbo representam a metade das sinapses que se formam na superfície somática das SBCs; a outra metade, que não é proveniente da cóclea, consiste de terminais inibitórios glicinérgicos ou gabaérgicos (Cant, Benson, 2003). Esses terminais em bulbo de Held das SBCs de gatos foram descritos como grandes ramos espessos, de tamanho e formato variados, que se dividem para formar uma arborização em garra, envolvendo aproximadamente a metade do corpo celular. Os terminais das fibras de baixa frequência são grandes, mas estabelecem poucas sinapses, exibindo uma menor curvatura da região de densidade pós-sináptica, com menos vesículas e mitocôndrias menores. Por outro lado, os pequenos terminais das fibras de alta frequência estabelecem quatro vezes mais sinapses, exibindo uma maior curvatura da região de densidade pós-sináptica, com mais vesículas, mitocôndrias maiores, e uma área total de zona ativa duas vezes maior (Ryugo, Wu e Pongstaporn, 1996). Segundo os autores, a existência de características morfológicas diferentes realça o fato de que os terminais sinápticos são altamente especializados e que sua plasticidade morfológica reflete a diversidade de demandas fisiológicas. Dessa forma, o número de fibras auditivas que fazem sinapse em cada SBC é pequeno (Young, 2004). No entanto, o potencial pós-sináptico excitatório que esses terminais produzem é de grande amplitude, com uma alta probabilidade de gerar um potencial de ação (Oertel, 1983).

De acordo com Ostapoff e Morest (1991) um grande número de terminais sinápticos excitatórios glutamatérgicos das fibras auditivas é observado no corpo celular nas GBCs. Logo, as GBCs e as SBCs são semelhantes no sentido de que ambas recebem sinapses no corpo celular, mas nas GBCs essas sinapses são oriundas de um grande número de fibras auditivas, ao invés de uma a três fibras como nas SBCs (Sento, Ryugo, 1989). Assim, o número de terminais observados em um neurônio do VCN não pode ser traduzido em número de fibras auditivas independentes, visto que, essas fibras podem fazer múltiplos contatos nessas células (Rouiller et al., 1986). Terminais inibitórios são extensamente observados nos somas e dendritos das GBCs, aparentemente mediados pelos neurônios tuberculoventrais do DCN (Wu, Oertel, 1986; Wickesberg, Whitlon, Oertel, 1991).

As GBCs são similares às SBCs, no entanto possuem uma árvore dendrítica mais longa e ramificada e um corpo celular mais ovóide (Smith, Rhode, 1987). O núcleo parece sempre formar uma protuberância na superfície celular, e o seu citoplasma é sempre abundante (Osen, 1969). Os axônios das GBCs deixam o núcleo coclear ventral via corpo trapezoidal e projetam para quatro vias ipsilaterais principais: núcleo periolivar posterior (PPO), núcleo lateral do corpo trapezoidal (LNTB), núcleo periolivar dorsolateral (DLPO) e

núcleo lateral da oliva superior (LSO). As projeções contralaterais incluem o núcleo periolivar dorsomedial (DMPO), a porção ventromedial do núcleo facial, o núcleo ventral do lemeniscolateral (VNLL) e o núcleo medial do corpo trapezoidal (MNTB) (Smith et al., 1991). Os axônios das SBCs atravessam a linha média do componente dorsal do corpo trapezoidal e inervam os (MSO) bilateralmente, o LSO ipsilateral e o núcleo ventral do lemenisco lateral (VNLL) contralateral (Smith et al., 1993).

A projeção das GBCs para o MNTB contralateral e a sinapse com as células principais desse núcleo são alvos de muitos estudos. Uma característica dessa conexão é a presença de grandes terminais sinápticos conhecidos como cálice de Held (*Calyx of Held*). Cada célula principal do MNTB recebe apenas uma sinapse do tipo cálice de Held enquanto os axônios das GBCs podem dar origem a dois (Smith et al., 1991) ou mesmo três destes terminais (Kuwabara, DiCaprio, Zook, 1991). Assim, a relação sináptica entre a GBC e o neurônio principal do MNTB não é de um para um (Yin, 2002). As células do MNTB que recebem impulsos das GBCs são glicinérgicas e projetam para o LSO ipsilateral, propiciando uma via inibitória do núcleo coclear contralateral (Cant, Benson, 2003).

Vários autores têm apontado diferentes razões para a existência dessa sinapse gigante e muito especializada. Uma delas seria assegurar que o disparo das células envolvidas no processamento da informação acústica fosse transmitido fielmente, para que cada disparo pré-sináptico resultasse em um disparo no neurônio do MNTB (Kuwubara et al., 1991; Banks, Smith, 1992; Forsythe, 1994; Borst et al., 1995). Outra função atribuída a essa sinapse especializada seria preservar com precisão o momento do disparo (*spike timing*) ao minimizar atrasos sinápticos (Wu, Kelly, 1994; Wang et al., 1998); ou ainda, a de seguir as altas taxas de disparos repetidos (Wu, Kelly, 1994; Borst et al., 1995; Wang et al, 1998). Yin (2002) sugere que a principal razão da existência da sinapse cálice de Held é a velocidade, ou seja, apresentar o estímulo inibitório dos neurônios principais do MNTB ao LSO tão rápido quanto possível, de modo que sua chegada coincida com a chegada do estímulo excitatório contralateral.

Além de especializações anatômicas, diversas especializações biofísicas foram observadas na sinapse cálice de Held. Entre essas, a expressão de um canal de potássio (Kv3.1) que apresenta uma rápida transição do estado aberto para o fechado. Essa propriedade assegura que o canal Kv3.1 desative rapidamente após a repolarização, de modo que uma corrente de potássio residual não se acumule durante potenciais de ação repetidos, o que poderia levar a uma acomodação na frequência de disparo (Wang et al., 1998). Mais recentemente, foi demonstrado que a constante de tempo necessária para a recuperação da

inativação dos canais para sódio (Nav) dessa sinapse se acelera com o desenvolvimento. Esses canais para sódio (Nav1.6), estão segregados do terminal sináptico, sendo observados apenas no heminodo axonal pré-cálice. Esta distribuição espacial parece otimizar todos os fatores para que essa sinapse possa disparar em altas frequências (Leão et al., 2005).

1.3 CANAIS E CORRENTES DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM

A membrana plasmática forma uma barreira de permeabilidade seletiva que separa o citoplasma do meio extracelular. Sua bicamada lipídica cumpre a função de barreira hidrofóbica e confere à membrana fluidez e alta resistência elétrica. Os canais iônicos, que são proteínas integrais da membrana, são necessários para estabelecer um meio de comunicação entre o espaço intracelular e extracelular (Gende, 2004). Eles formam poros para a difusão de íons através da membrana e possuem propriedades específicas de reconhecimento, seletividade e transporte (Celesia, 2001). Por serem altamente seletivos para espécies iônicas particulares, sua classificação corresponde a sua seletividade, sendo denominados conforme o íon pelo qual permeiam pela membrana.

A direção do transporte iônico é dependente do gradiente eletroquímico dos próprios íons, que é controlado por transportadores ativos e passivos (Hübner, Jentsch, 2002). Os gradientes iônicos através da membrana celular e a permeabilidade seletiva variável são indispensáveis para a excitabilidade das células nervosas e musculares, pois permitem uma mudança rápida e transitória do potencial de membrana, ou seja, a geração de potenciais de ação (Venosa, 2004). Os canais iônicos conduzem íons através da membrana de forma extremamente rápida, na ordem de 100 milhões de íons por segundo, e sua abertura e fechamento são regulados por vários estímulos como variação de voltagem (*voltage-gated*), ligação de transmissores químicos (*ligand-gated*) e por estiramento mecânico (*mechanically-gated*) (Siegelbaum, Koester, 2000).

As propriedades biofísicas dos canais iônicos dependentes de voltagem e sua distribuição subcelular definem as características elétricas de um neurônio, que podem ser alteradas diante da modificação na expressão e localização desses canais (Lai, Jan, 2006). Os canais para sódio dependentes de voltagem desempenham um papel crucial na regulação elétrica da excitabilidade celular, sendo responsáveis pela fase de despolarização do potencial de ação (Goldin, 2003). Controlam não só a iniciação, mas também a propagação do potencial de ação em células excitáveis, incluindo nervos, músculos e células endócrinas (Catterall et al., 2005). Os membros desta família de canais iônicos apresentam uma distribuição

subcelular diferenciada, e são capazes de controlar a excitabilidade da membrana devido às suas propriedades eletrofisiológicas (Lee, Goldin, 2009).

A família dos canais para sódio dependentes de voltagem possui uma estrutura singular da subunidade α formadora do poro do canal (FIG. 2). Essa subunidade é organizada na forma de quatro domínios homólogos (I-IV), cada um deles contendo seis segmentos transmembrana (S1-S6). A junção das alças extracelulares entre S5 e S6 de cada domínio contribui para a formação do poro do canal. O segmento S4, presente em cada domínio, é constituído por resíduos de aminoácidos carregados positivamente, localizados a cada três aminoácidos da sequência de S4, que atuam como um sensor de voltagem que ativa o poro do canal em resposta à despolarização da membrana. A pequena alça intracelular, entre os domínios III e IV, atua como portão de inativação quando se dobra para o interior do canal e bloqueia a parte interna do poro durante uma despolarização prolongada da membrana (Catterall et al., 2005).

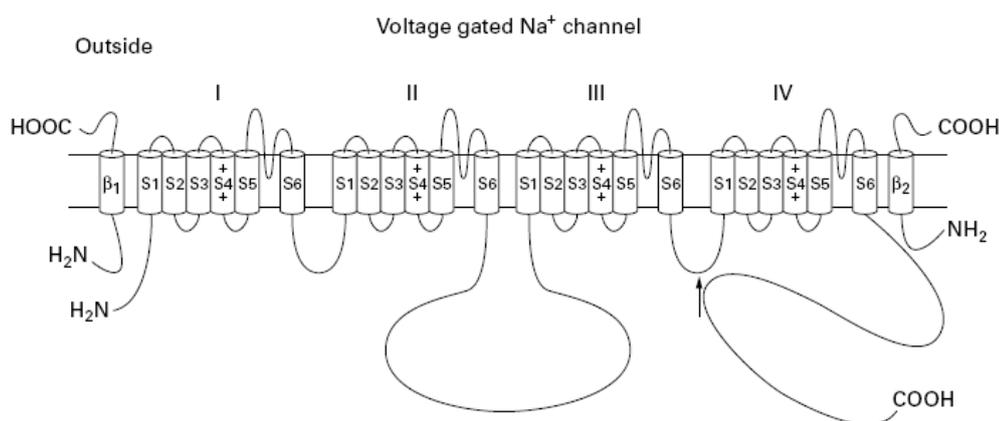


FIG. 2- Estrutura do canal para sódio dependente de voltagem. O canal é formado pela subunidade α (~260 kDa), que é composta por quatro domínios homólogos (I-IV), contendo seis segmentos transmembrana (S1-S6). A junção das alças extracelulares entre S5 e S6 de cada domínio forma o poro do canal. O portão de inativação é formado pela alça intracelular que liga os segmentos S6 e S1 entre os domínios III e IV (seta). O sensor de voltagem é formado por resíduos de aminoácidos presentes no S4 de cada domínio. A subunidade α geralmente se associa às subunidades β , que participam da modulação funcional do canal.
Fonte: Felix (2000, p. 733)

As nove isoformas de canais para sódio (Nav1.1-Nav1.9) identificadas e expressas em mamíferos apresentam uma porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos superior a 50%, o que permite sua classificação na mesma família de canais para sódio dependentes de voltagem. O sistema de nomenclatura utilizado identifica a isoforma (Nav), onde (Na) representa o símbolo químico do íon que permeia pelo canal, e (v) o regulador fisiológico de sua ativação (variação da voltagem na membrana). O primeiro número (Nav1) identifica a família a qual pertence o canal, e o número seguinte a isoforma específica dentro da mesma

família (Nav1.1 - Nav1.9) (Goldin, 2000; Catterall et al., 2005). Essas nove isoformas possuem distribuição variada entre os tecidos, entre elas apenas a Nav1.4 é a representante típica da musculatura esquelética. Na musculatura cardíaca a isoforma Nav1.5 é a predominante. As isoformas Nav1.8 e Nav 1.9 são características de nociceptores do gânglio da raiz dorsal da medula, e as demais são encontradas no sistema nervoso central Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6 e Nav1.7 (Catterall et al., 2005).

As correntes iônicas de influxo geradas por esses canais foram descritas em diferentes preparações. Em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal essas correntes foram bastante estudadas e dessa forma funcionam como modelo para a compreensão da expressão e das propriedades biofísicas e bioquímicas dos canais para sódio. Assim, no mesmo neurônio nociceptivo, observa-se uma corrente de Na^+ de cinética rápida e sensível à tetrodotoxina (TTX), uma corrente de Na^+ de cinética mais lenta e resistente à TTX e uma corrente de Na^+ persistente que é também resistente à TTX (Matsutomi et al., 2006). Uma revisão um pouco mais recente (Rush, Cummins, Waxman, 2007) resume bem a expressão de canais para sódio no gânglio da raiz dorsal e a contribuição deles para a geração do potencial de ação. Os neurônios de grande diâmetro expressam predominantemente canais para sódio sensíveis à TTX, tais como Nav1.1, Nav1.6 e Nav1.7 e pouca expressão de Nav1.8. Pequenos neurônios, provavelmente nociceptores, expressam canais para sódio sensíveis à TTX juntamente com canais resistentes à TTX como o Nav1.8 e Nav1.9. Nestes neurônios de pequeno diâmetro os canais Nav1.8 geram cerca de 80% da corrente de sódio de influxo e, portanto, são os responsáveis pela fase de elevação do potencial de ação. Uma dependência de voltagem para inativação dos canais Nav1.8 deslocada para potenciais despolarizantes, juntamente com uma rápida recuperação da inativação, permitem disparos repetidos em resposta à despolarização contínua. A cinética de ativação e inativação do canal Nav1.9 é tão lenta que parece não contribuir para a geração de potenciais de ação, mas parece prolongar a resposta despolarizante de estímulos que são sublimiares para geração de um potencial de ação.

Além das correntes de sódio acima descritas, observa-se em neurônios uma corrente de sódio chamada de ressurgente. Essa corrente foi descrita inicialmente em células Purkinje do cerebelo (Raman, Bean, 2001). Nesses neurônios a corrente ressurgente é mediada pelos canais Nav1.6 que recuperam rapidamente da inativação. Devido a essa rápida recuperação, ocorre um encurtamento do período refratário de potenciais de ação, permitindo a geração de potenciais de ação em altas frequências (Raman, Bean, 2001). Afshari et al. (2004) avaliaram a presença do componente ressurgente nas correntes de sódio em outros neurônios cerebelares, além das células de Purkinje eles observaram que as células granulares,

unipolares em escova e nucleares também expressam canais para sódio com cinética ressurgente.

Cummins et al. (2005) avaliaram a expressão do componente ressurgente gerado pela corrente de sódio sensível à tetrodotoxina (TTX-S) em neurônios pequenos e grandes do DRG de camundongos selvagens e nocautes para Nav1.6 e Nav1.8. A corrente ressurgente foi observada somente nas células de grande diâmetro de camundongos selvagens e nocautes para Nav1.8, não sendo observada em nocautes para Nav1.6. Quando os neurônios nocautes Nav1.8, que expressaram o componente ressurgente anteriormente foram expostos à TTX, a corrente ressurgente foi bloqueada. Estes resultados indicam que a corrente ressurgente em neurônios do DRG é gerada pelos canais Nav1.6. Entretanto, Do e Bean (2004) utilizaram camundongos nocautes para o canal Nav1.6 e demonstram que a corrente ressurgente foi reduzida em 63% em relação aos camundongos selvagens, assim como a redução do componente transiente de sódio (em 40%) e persistente (em 55%). Com esses resultados os autores concluíram que a corrente ressurgente também pode ser gerada por outros canais para sódio em neurônios do núcleo subtalâmico. Em resumo, o canal Nav1.6 tem sido descrito como o principal responsável pela característica do disparo em altas frequências de diferentes subtipos neuronais (Afshari et al., 2004, Rush, Dib-Hajj, Waxman, 2005; Leão et al., 2005).

A iniciação e propagação do potencial de ação em fibras nervosas mielinizadas requerem uma alta densidade de canais para sódio dependentes de voltagem e sua precisa distribuição em subdomínios especializados como o segmento inicial do axônio (AIS) e nodos de Ranvier (Susuki, Rasband, 2008). A alta densidade de canais para sódio dependentes de voltagem que se acumula no AIS é responsável pelo baixo limiar de ativação para a iniciação de potenciais de ação, e pela frequência de disparo do axônio (Kole et al., 2008; Hu et al., 2009). Entre os canais para sódio dependentes de voltagem o Nav1.6 é o que apresenta maior expressão no sistema nervoso, e parece ser o prevalente também no AIS (Boiko et al., 2003; Van Wart et al., 2007; Lorincz, Nusser, 2008). A segregação dos canais Nav1.6 no AIS parece ser dependente principalmente da anquirina-G e interações com o citoesqueleto celular (Garrido et al., 2003; Ogawa e Rasband, 2008; Brechét et al., 2008; Brachet et al., 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Pequenas alterações na função das múltiplas partes que compõem o sistema auditivo podem levar a distúrbios como o tinnitus, hipoacusia neurosensorial, ou mesmo a surdez. A perda do estímulo sensorial carregado pelas fibras auditivas primárias pode alterar as características da excitabilidade de neurônios do núcleo coclear. O conhecimento da expressão de proteínas envolvidas com a excitabilidade neuronal é de grande importância para o conhecimento do funcionamento normal e de possíveis alterações do sistema auditivo. Nada se sabe sobre a expressão de canais para sódio nos neurônios do núcleo coclear. Estudos de imunomarcção dos canais para sódio podem indicar quais isoformas, entre as nove descritas, estão expressas nesses neurônios e se a expressão é regulada temporalmente. Podem ainda indicar se existe uma localização celular específica e, caso exista, como os neurônios ancoram esses canais em compartimentos específicos. Tal conhecimento pode, em última análise, contribuir para uma maior compreensão da geração de atividade elétrica nesses neurônios e também em outras células excitáveis.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a expressão do canal para sódio Nav1.6 durante o desenvolvimento neuronal das células em arbusto do núcleo coclear do sistema auditivo em ratos de oito, 15 e 30 dias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão do canal Nav1.6 nas células esféricas em arbusto do AVCN e nas células globulares em arbusto da raiz nervosa no VCN;
- Determinar a localização celular desse canal para sódio, verificando a expressão em dendritos proximais, soma e no segmento inicial do axônio. Comparar as diferenças entre a localização celular do canal Nav1.6 nas células esféricas em arbusto e globulares em arbusto;
- Avaliar se ocorre a expressão desse canal em terminais em bulbo de Held das fibras auditivas na sua sinapse com as células em arbusto do VCN;
- Observar se há diferenças na expressão desse canal durante a maturação neuronal nas idades acima descritas.
- Avaliar a expressão da proteína anquirina-G no segmento inicial do axônio das células em arbusto e se ocorre a co-localização dessa proteína com o canal Nav1.6 nessa região do axônio.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Os procedimentos com animais e a coleta de material realizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA-UFTM) em 17/09/2010 de acordo com o protocolo nº61 (em anexo). Foram utilizados 28 ratos Wistar machos ou fêmeas com idade de oito dias (n=2), 15 dias (n=9) e 30 dias (n=17), sob os cuidados do biotério da disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os animais eram mantidos em condições fixas de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e luz (ciclo de 12 horas), em caixas plásticas (40 x 34 x 17 cm) e com livre acesso à água filtrada e ração balanceada (Nuvilab). As caixas eram limpas três vezes por semana e forradas com maravalha não autoclavada, e todo esforço para reduzir ao máximo o número de animais utilizados foi realizado.

4.2 PREPARAÇÕES DO TECIDO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA

Ratos Wistar de 15 e 30 dias foram anestesiados com Tiopental (100 mg/Kg, intraperitoneal) e perfundidos transcárdiacamente para a lavagem de sangue dos tecidos, por seis minutos com uma solução salina (PBS) da seguinte composição: 142 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 8,06 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4. Para isto, os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica, com os quatro membros fixados em abdução. Dentro de uma capela de exaustão de gases, foi realizada uma incisão mediana longitudinal da parede abdominal até a caixa torácica. O músculo diafragma foi cortado, para a realização do pneumotórax, e logo em seguida uma agulha ligada ao sistema de perfusão, foi introduzida pelo ventrículo esquerdo até a aorta ascendente e clampeada com uma pinça e o átrio direito foi perfurado para o escoamento do sangue e solução perfusora. A perfusão foi realizada com uma bomba peristáltica (Incibrás BP-100) com fluxo de 8 ml/min. A solução de PBS foi perfundida a 24°C . Em seguida, foi feita a perfusão com solução fixadora gelada constituída de paraformaldeído (PFA) (Sigma P6148) a 4% (peso/volume) em PBS, ou de tampão paraformaldeído-lisina-periodato (PLP) com a seguinte composição: 0,01 M de metaperiodato de sódio (Sigma S1878), 0,075 M lisina (L-lysine monohydrochloride, Sigma L5626), 0,037 M de fosfato de sódio e 1% ou 2% de PFA (Sigma, P6148) durante 35 minutos. Após o término da perfusão, os animais foram decapitados com uma tesoura para a realização da dissecação cirúrgica.

A calota craniana foi aberta rapidamente para obtenção do acesso à cavidade craniana, onde o nervo auditivo foi cuidadosamente seccionado, no ponto onde esse emerge do meato acústico interno do osso temporal, com auxílio de um estereomicroscópio (D.F. Vasconcellos M90). Em seguida, um bloco de tecido contendo o núcleo coclear foi cortado de forma coronal ou parassagital e pós-fixado na solução fixadora por uma hora a 4° C. O tecido foi retirado da pós-fixação e crioprotégido em solução de sacarose 20% em tampão fosfato de sódio 0,1 M *overnight* e depois 30% até o tecido absorver a solução e submergir. Em seguida, o tecido foi imerso em uma solução própria para congelamento *Tissue-Tek* (*Sakura Finetek, Japan*) em uma cápsula plástica e congelado pela imersão em metilbutano (isopentano, 99% P.A. Vetec) resfriado em nitrogênio líquido. O bloco congelado foi seccionado em criostato *Leica* (CM1850 UV), em fatias parassagitais ou coronais de 30 a 40 µm, montadas em lâminas gelatinizadas com sulfato de cromo-potássio (Sigma-Aldrich), lâminas tratadas com poli-lisina, ou ainda, previamente tratadas para aumento de adesão (lâminas *Superfrost®/Plus, Fisher scientific*). Após uma hora de secagem em temperatura ambiente controlada (24° C) o experimento de imunomarcção foi iniciado. As secções montadas em lâminas, não utilizadas no mesmo dia, foram congeladas e mantidas em freezer (-80 °C) para experimentos posteriores.

4.3 PREPARAÇÃO DE FATIAS DE 200 µM NO VIBRÁTOMO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA DE RATOS DE 8 DIAS

Após anestesia com Tiopental (40 mg/Kg, intraperitoneal), ratos Wistar de 8 dias foram rapidamente decapitados e a calota craniana removida. Sob o estereomicroscópio, o nervo auditivo de apenas um lado foi cortado e procedeu-se a remoção da parte do tronco encefálico contendo o núcleo coclear. Um bloco de tecido que possibilita secções parasagitais do núcleo coclear foi isolado. Durante essa etapa o tecido estava submerso em uma solução salina fisiológica gelada (4 °C) com a seguinte composição: 87 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄ X H₂O, 7 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, 25 mM glicose, 75 mM sacarose, e equilibrada com 95% O₂ e 5% de CO₂. Após a obtenção do bloco de tecido este foi transferido com o auxílio de uma espátula para um vibrátomo (*Vibratome 1000 Plus, Vibratome, EUA*) onde fatias de aproximadamente 200 µm foram obtidas. As fatias foram em seguida fixadas *overnight* na solução fixadora de paraformaldeído-lisina-periodato 0,01 M de metaperiodato de sódio (Sigma S1878), 0,075 M lisina (L-lysine monohydrochloride, Sigma

L5626), 0,037 M de fosfato de sódio e 1% de PFA (Sigma, P6148). Após a fixação o experimento de imunomarcação foi iniciado.

4.4 EXPERIMENTO DE IMUNOMARCAÇÃO

As secções nas lâminas ou as fatias foram lavadas com PBS (três lavagens de 15 min) sob agitação suave (*BIOMIXER TS-2000A VDRL SHAKER*) e incubadas em um tampão de bloqueio composto por 0.3% (vol/vol) de *Triton X-100*, 1,5% (vol/vol) soro de cabra normal (Invitrogen) em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente (24°C). Em seguida, as secções foram incubadas por aproximadamente 21-24 horas, em câmara úmida a 4 °C, com tampão de bloqueio contendo anticorpos primários, descritos abaixo, previamente centrifugados por 10 minutos à temperatura de 4 °C (*Rotanta 460R-Hettich Zentrifugen*).

- Anticorpo policlonal de coelho anti canal Nav1.6 de rato (usado na diluição de 1:100) gerado contra um peptídeo sintético que corresponde a uma sequência única (CSEDAIEEEGEDGVGSPRS; aminoácidos 460-477) da alça intracelular entre os domínios I-II do Nav1.6 (Krzemien et al., 2000). Esse anticorpo foi doado pelo Dr. S. Rock Levinson da Universidade do Colorado, Denver, EUA, e denominado anti-Nav1.6 (Dr. Rock) durante a realização deste estudo;

- Anticorpo policlonal de coelho anti canal Nav1.6 de rato (1:100) da Alomone (Israel) que reconhece o epítotope (CIANH TGVDI HRNGD FQKNG) correspondente aos resíduos de aminoácido 1042-1061 localizados na alça intracelular entre os domínios II-III da proteína Nav1.6. A concentração do anticorpo após a reconstituição foi de 0,8 mg/ml. Ele foi denominado anti-Nav1.6 (Alomone) durante a realização deste estudo;

- Anticorpo monoclonal de camundongo contra a proteína associada à microtúbulos (1:1000 a 1:500) (MAP-2 Millipore, MAB378);

- Anticorpo monoclonal de camundongo anti-anquirina-G de rato (1:400, Invitrogen, 33-8800);

- Anticorpo monoclonal de camundongo anti-proteína de vesícula sináptica de rato (SV2, 1:1000) *Developmental Studies, Hybridoma Bank, Department of Biological Sciences* (University of Iowa, Iowa city, EUA).

Após a incubação com um ou mais anticorpos primários, as secções foram lavadas com PBS (três vezes por 15 min) e incubadas por duas horas à temperatura ambiente (24 °C) em tampão de bloqueio contendo um ou ambos dos seguintes anticorpos secundários fluorescentes (Invitrogen - Molecular Probes, EUA), previamente centrifugados:

- IgG de cabra anti-coelho conjugada a *Alexa 568* (1:400);
- IgG de cabra anti-camundongo conjugada a *Alexa 488* (1:400);

O excesso de anticorpo secundário não ligado foi lavado das Secções/fatias com PBS (três vezes de 15 min). As secções foram montadas em meio protetor contra perda de emissão de fluorescência (*Vectashield; Vector Laboratories, CA, EUA*) ou (*Fluoro-gel W/ Anti Fading Agent, Electron Microscopy Sciences*) em seguida fotografadas utilizando microscopia de fluorescência (*Leica DM 6000*) e confocal *Leica SP2* ou *SP5* (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto) e microscopia confocal Zeiss LSM (Universidade Federal de Uberlândia). As figuras foram processadas e montadas usando os softwares *ImageJ* ou *Fiji-Win 32* e *Adobe Illustrator (Adobe System, EUA)*. O controle da imunomarcação foi feito pela omissão do anticorpo primário e pelo uso do peptídeo antigênico.

4.5 COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE NISSL

Secções coronais e parassagitais do núcleo foram coradas com violeta de cresila pelo método de Nissl e fotografadas por microscopia comum para auxiliar na análise anatômica e morfológica das regiões do núcleo coclear e na seleção das lâminas para o experimento de imunomarcação. Esse método de coloração foi criado pelo francês Franz Nissl e utiliza violeta de cresila para marcar a membrana do retículo endoplasmático rugoso. Franz Nissl denominou grânulos ou corpúsculos de Nissl as estruturas de aparência “tigróide” observadas nos corpos celulares e dendritos, que se mostraram ausentes em axônios.

As lâminas preparadas a fresco ou retiradas do freezer (-80°C) foram deixadas sobre uma placa quente (40°C) por 10 minutos para garantir a aderência dos cortes. Depois foram colocadas dentro do copo de Coplen (cuba) para passar por uma bateria de soluções para desengorduramento e hidratação dos cortes (Xilol, álcool absoluto 100%, álcool 100% e clorofórmio 1:1, álcool 95% e por último álcool 70%, cada uma delas por 3 minutos) em capela de exaustão. As lâminas foram deixadas em gotejamento com água corrente, para depois receberem a solução de violeta de cresila filtrada (0, 25% em água destilada) por um minuto. Após a retirada do corante, as lâminas foram deixadas sob gotejamento em água corrente por dez minutos. Fora da capela, as lâminas foram rapidamente mergulhas em uma bateria de soluções para a desidratação dos cortes (álcool 70%, álcool 95%, álcool e clorofórmio 1:1 e álcool absoluto). Dentro da capela novamente, as lâminas passaram por uma solução de álcool e xilol 1:1 e depois por xilol puro para a montagem das lâminas com lamínulas de vidro (*Kinittel Glaser*) em meio de montagem *Entellan new (Rapid mounting for*

microscopy, Electron Microscopy Sciences). As lâminas foram fotografadas por microscopia comum para a análise anatômica e morfológica das subdivisões do núcleo coclear (*Leica DM 6000 - software LAS*) e (*Nikon Eclipse-E 200 - software Image Pro Plus 6.2*).

4.6 MEDIDA DA ÁREA SOMÁTICA E DA EXTENSÃO DA MARCAÇÃO ANTI-NAV1.6 NO AIS

Todos os segmentos iniciais do axônio que puderam ser identificados como pertencentes a um neurônio específico nas imagens confocais, tiveram seu comprimento medido (μm) com a utilização do *software Fiji-win 32*, que também foi utilizado para medir a área somática neuronal. Cada célula foi analisada em todas as secções confocais no eixo Z para o estabelecimento da relação AIS-soma, e só então através da máxima sobreposição de imagens das secções correlacionadas o segmento inicial do axônio foi reconstituído e sua extensão foi medida. A relação entre o comprimento do AIS e a área somática das células esféricas em arbusto e das células globulares em arbusto foi estudada com a utilização do *software Origin 7.5*.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas da área somática e da extensão da marcação anti-Nav1.6 nos AISs das células esféricas e globulares em arbusto de 15 e 30 dias foram submetidas ao teste de Grubbs, para a detecção de valores de desvio significativo entre as medidas, utilizando o *software GraphPad* (www.graphpad.com/quickcals/ContMenu.cfm). Em seguida, foi avaliada a normalidade dos dados de cada amostra pelo método de *Shapiro-Wilk* ($p \leq 0,05$) utilizando o *software Origin 7.5* (*Microcal, USA*). A comparação entre os dados das amostras foi realizada através do teste não pareado (*two-sample t-Test*) com valor de significância $p \leq 0,05$ (*Origin 7.5, Microcal, USA*).

5 RESULTADOS

O estudo da expressão e localização celular do canal para sódio Nav1.6 nas células esféricas e globulares em arbusto de ratos de 8, 15 e 30 dias foi baseado na análise de imunofluorescência de secções coronais e parassagitais do núcleo coclear. A marcação com o anticorpo anti-proteína 2 associada à microtúbulos (MAP-2) possibilitou a visualização dos dendritos e corpos celulares. Para a análise da presença de canais para sódio no segmento inicial do axônio e nos terminais sinápticos foram utilizados os anticorpos anti-anquirina G (AnkG) e anti-proteína 2 associada à membrana de vesícula sináptica (SV2), respectivamente. A marcação anti-Nav1.6 (Dr. Rock) e anti-Nav1.6 (Alomone) foram reveladas pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao Alexa 568 (vermelho); e os anticorpos usados como auxiliares no estudo da marcação do canal para sódio foram revelados pelo anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao Alexa 488 (verde).

5.1 ANÁLISE DA ANATOMIA E DAS SUBDIVISÕES DO NÚCLEO COCLEAR AUDITIVO

A figura 3 apresenta secções coronais (40 µm) do tronco encefálico de um rato de 30 dias, contendo o núcleo coclear, coradas pelo método de Nissl. Nessa figura, é possível observar a morfologia e as subdivisões do núcleo em parte ventral (VCN) e dorsal (DCN), assim como observar as estruturas anatômicas presentes na proximidade do núcleo. As figuras estão dispostas em uma ordem de progressão de secções mais posteriores ou caudais (FIG. 3A e B) para secções mais anteriores ou rostrais (FIG. 3C e D). O núcleo coclear aparece envolvido pelo cerebelo (CE) e plexo coróide (CP), e repousa sobre o pedúnculo cerebelar inferior (ICP) e sobre o trato espinhal trigeminal (TE5) (FIG. 3A). A subdivisão do núcleo em parte ventral (VCN) e dorsal (DCN) pode ser visualizada na FIG. 3B (seta) e FIG. 3C, assim como o corpo trapezoidal (Tz), também denominado estria acústica ventral, uma importante via de projeção do núcleo coclear. Nas secções mais anteriores (FIG. 3C e D), o ramo coclear (8cn) e o ramo vestibular (8vn) do nervo vestibulo-coclear podem ser observados. A parte coclear foi representada como raiz nervosa (NR), estrutura seccionada transversamente durante a cirurgia de retirada do núcleo coclear. Na secção mais anterior (FIG. 3D) é possível visualizar somente a parte anteroventral do núcleo coclear (AVCN), pois a porção dorsal (DCN) não é observada na extremidade anterior do núcleo, em seu lugar pode ser observado o pedúnculo cerebelar médio (MCP).

As subdivisões do núcleo coclear e suas características neuroanatômicas e de regiões vizinhas foram avaliadas em secções parasagitais de um animal de 30 dias utilizando a coloração de Nissl (FIG. 4). O núcleo pode ser observado mais lateralmente (FIG. 4A) ou mais medialmente (FIG. 4B). Na secção mais lateral (FIG. 4A), o DCN aparece em menor tamanho e o VCN mostra-se subdividido pela raiz nervosa (NR) em porção anteroventral (AVCN) e posteroventral (PVCN). A progressão lateral (FIG. 4A) para medial (FIG.4B) permite a visualização do aumento da densidade de células da camada granular (GL) que marca a divisão dorsoventral do núcleo (setas).

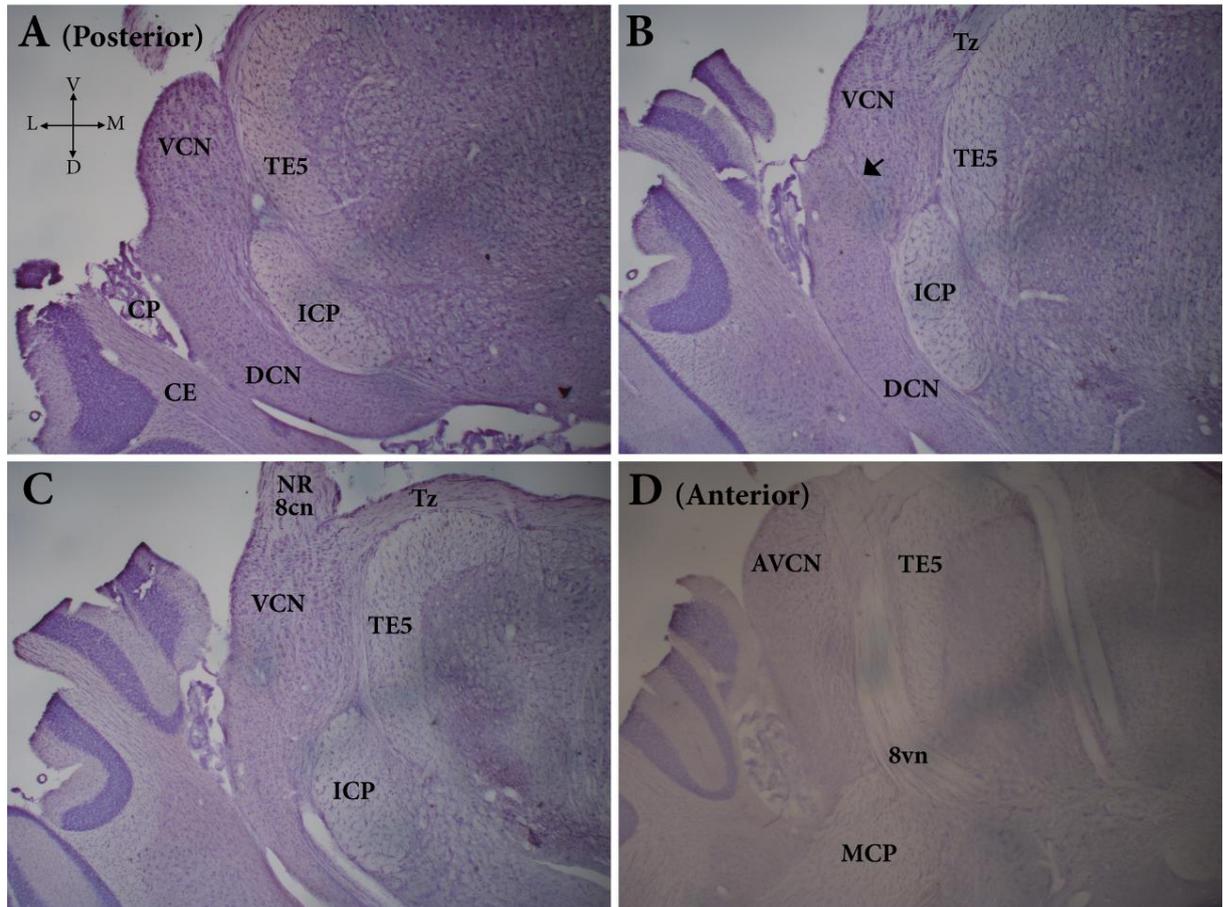


FIG. 3- Progressão caudorostral de um corte coronal do núcleo coclear corado pelo método de Nissl. (A) Secção coronal posterior mostra a subdivisão do núcleo coclear em parte ventral (VCN) e dorsal (DCN), assim como as estruturas anômicas que o cercam: cerebelo (CE), plexo coróide (CP), pedúnculo cerebelar inferior (ICP) e o trato espinhal trigeminal (TE5). (B) A separação ventral e dorsal do núcleo é evidenciada pela seta, e o corpo trapezoidal (Tz) pode ser observado próximo ao VCN. (C) Secção de transição entre a progressão caudorostral que mostra a raiz nervosa (NR) que representa a porção coclear (8cn) do VIII par craniano. (D) Essa secção coronal mais anterior permite a observação somente da parte ventral do núcleo, mais especificamente da porção anteroventral (AVCN), e também a visualização da porção vestibular (8vn) do nervo vestibulo-coclear e pedúnculo cerebelar médio (MCP).

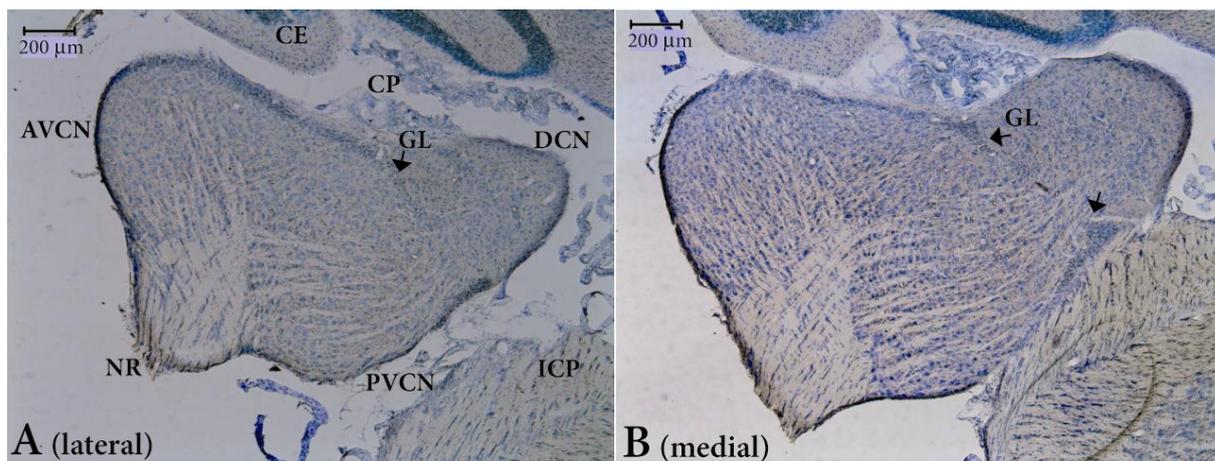


FIG. 4- Progressão lateromedial de um corte parasagital do núcleo coclear corado pelo método de Nissl. (A) Secção parasagital mais lateral mostra a subdivisão do núcleo coclear em parte dorsal (DCN), anteroventral (AVCN) e posteroventral (PVCN), assim como as estruturas anatómicas que o envolvem: cerebelo (CE), plexo coróide (CP), e pedúnculo cerebelar inferior (ICP). A raiz nervosa (NR) da porção coclear do nervo vestibulo-coclear, seccionada durante a cirurgia, divide a parte ventral do núcleo em AVCN e PVCN. A camada das células granulares (GL) divide o VCN do DCN (setas).

5.2 EXPRESSÃO DO CANAL NAV1.6 NO AVCN DE RATOS DE 30 DIAS

A figura 5 mostra uma visão panorâmica da parte anteroventral do núcleo coclear (AVCN) de um corte coronal de 40 μm de um rato de 30 dias. A coloração pelo método de Nissl (FIG. 5A) revela os corpos celulares do AVCN, que é delimitado pelo corpo trapezoidal em toda sua extensão. A imunofluorescência anti-Nav1.6 (Dr. Rock), em uma secção adjacente, ilustra o padrão de marcação desse anticorpo no AVCN (FIG. 5B).

A figura 6 refere-se ao mesmo corte coronal do AVCN da figura 5, porém ilustra a capacidade da microscopia confocal em explorar o resultado através da captura de várias secções no eixo Z. A imunomarcação com os anticorpos anti-Nav1.6 (Dr. Rock) e anti-MAP-2 é demonstrada em uma única secção confocal (FIG. 6A, B e C) e também através de 18 secções confocais sobrepostas (FIG. 6D, E e F). A marcação para MAP-2 é restrita aos corpos celulares e dendritos (FIG. 6A e D). Na região superior das imagens (6A, C, D e F) pode-se observar distintivamente a camada de células granulares que recobre o núcleo coclear. A intensa marcação para Nav1.6 nos corpos celulares, num segmento inicial do axônio (AIS, seta) e nodos de Ranvier (marcação puntiforme) é evidenciada nas imagens (6E e F). Explorando a capacidade da microscopia confocal em obter imagens em pequenas variações no eixo Z, a marcação para o Nav1.6 é observada no citoplasma, mas definitivamente não encontrada no núcleo (FIG. 6B). A sobreposição da dupla marcação indica que o canal Nav1.6 não é expresso nos dendritos dos neurônios do AVCN (FIG. 6C e F).

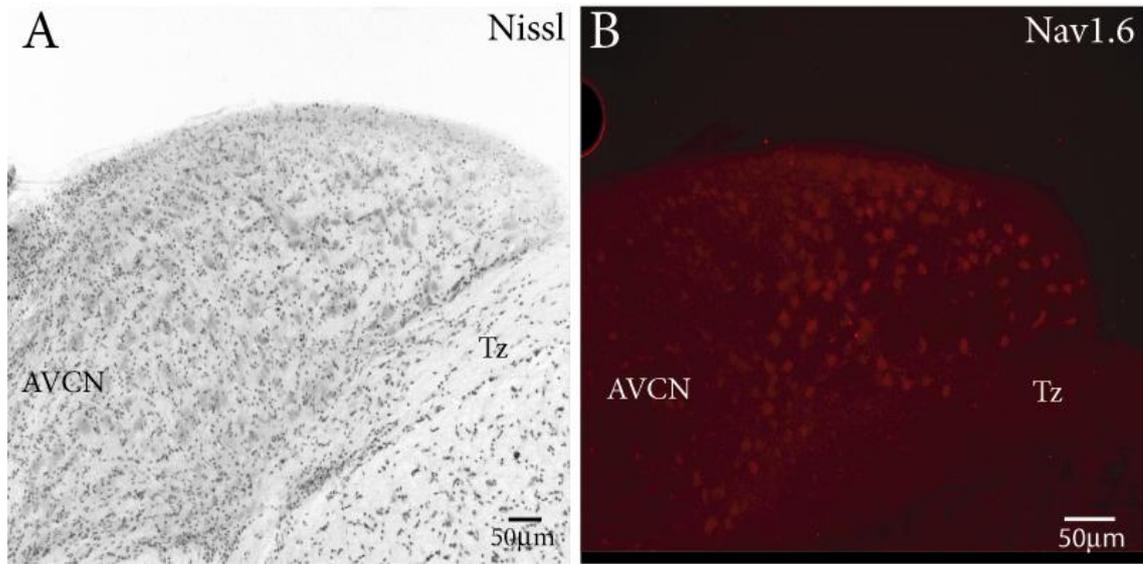


FIG. 5- Visão panorâmica do padrão de imunomarcção para o canal Nav1.6 na parte anteroventral do núcleo coclear (AVCN). (A) Imagem de um corte coronal do AVCN tratada pelo método de Nissl, ilustrando os corpos celulares (microscopia comum). Tz (corpo trapezoidal). (B) Imunofluorescência para o canal Nav1.6 (Dr. Rock) de uma secção adjacente do AVCN.

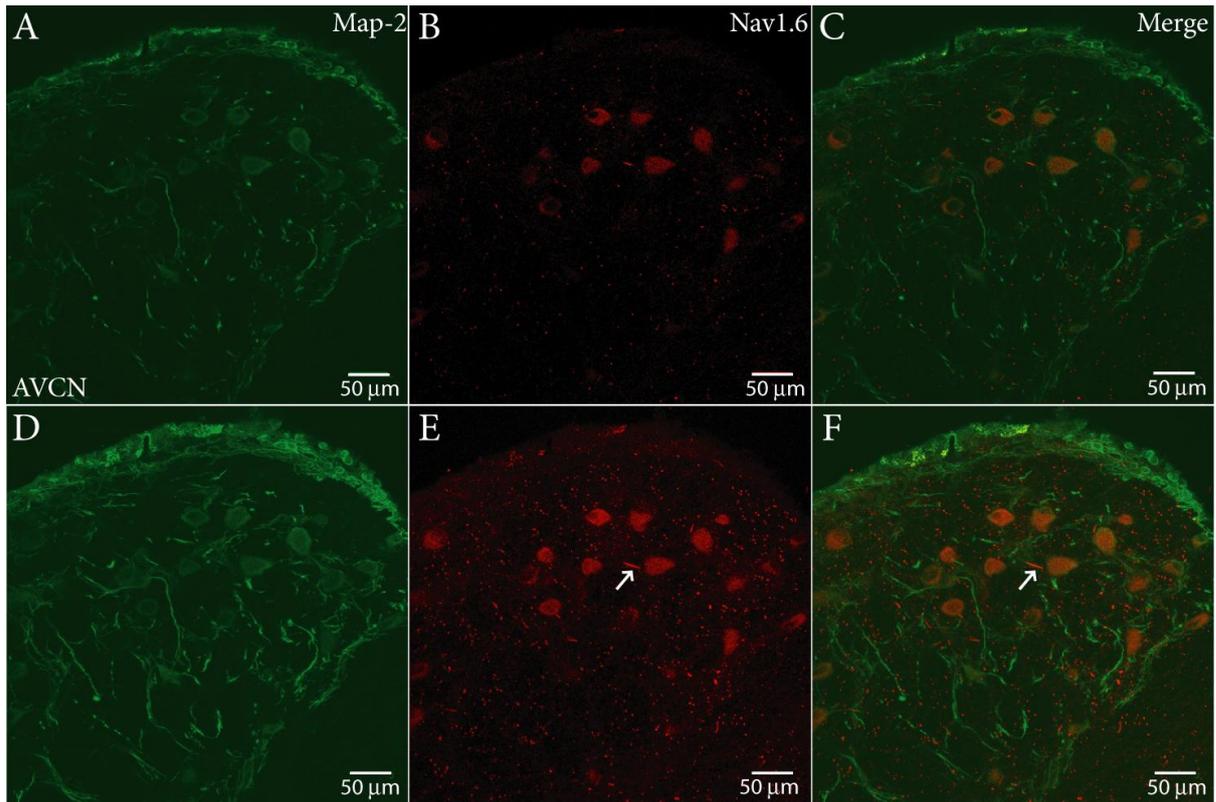


FIG. 6- Expressão do canal Nav1.6 na parte anteroventral do núcleo coclear de ratos de 30 dias. Uma única secção confocal de um corte coronal do AVCN marcado com anti-MAP-2 (A) e com anti-Nav1.6 (Dr. Rock) (B). (C) Superposição das imagens A e B ilustra a marcação citoplasmática para essas proteínas no corpo celular. Dendritos são marcados apenas pelo anticorpo anti-MAP-2 e nodos de Ranvier são marcados apenas pelo anticorpo anti-Nav1.6 (marcação puntiforme). (D, E e F) Projeção do tipo máxima intensidade de 18 secções confocais ilustrando principalmente a intensa expressão do canal Nav1.6 no AIS (seta) e nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e co-localização somática de MAP-2 e Nav1.6. Merge (superposição das duas marcações).

A figura 7, em maior resolução, apresenta a expressão do canal para sódio Nav1.6 em neurônios do AVCN. O segmento inicial do axônio (AIS) corresponde a um segmento intensamente marcado com anticorpo anti-Nav1.6 (Dr. Rock) (setas, 7B e E). As imagens 7C e 7F formadas pelas sobreposições de 7A, 7B e 7D, 7E, respectivamente, indicam claramente a ausência de expressão do canal Nav1.6 nos dendritos, que são intensamente marcados com o anticorpo anti-MAP-2.

A expressão do canal para sódio Nav1.6 em nodos de Ranvier, AISs e corpos celulares da região anteroventral (AVCN) do núcleo coclear pode ser observada através de secções confocais de um corte coronal (40µm) de outro rato de 30 dias (FIG. 8). A expressão do canal não foi observada em dendritos, nem na região nuclear, apenas a marcação citoplasmática. A marcação para MAP-2, além de evidente nos dendritos, é observada no soma e também próximo ao cone de implantação (*axon hillock*), onde AISs podem ser observados em continuidade (FIG. 8 C e F, setas).

A figura 9 ilustra a disposição de um grande número de AISs (setas) em um corte coronal (40 µm) do AVCN de outro rato de 30 dias (FIG. 9B e E). A ausência de marcação em dendritos pode ser evidenciada pela sobreposição das imagens (9C e F). Os AISs observados, aparecem bem marcados pelo anti-Nav1.6 (Dr. Rock) e aparentemente estão separados do soma do qual derivam por uma área sem expressão do canal Nav1.6, tornando difícil correlacionar a qual neurônios um dado AIS pertence.

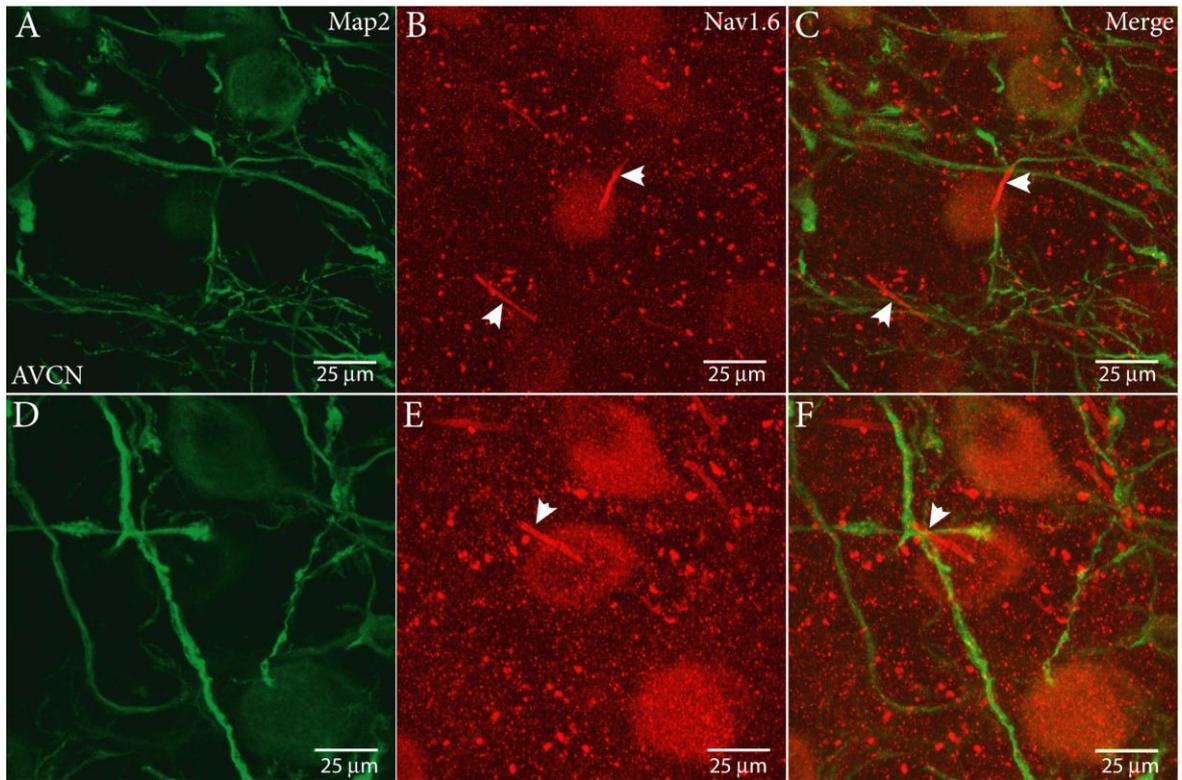


FIG. 7- Expressão do canal Nav1.6 na parte anteroventral do núcleo coclear de ratos de 30 dias. Corte coronal (40 μm) do AVCN marcado pelo anticorpo anti-MAP-2 (A, D) e anti-Nav1.6 (Dr. Rock) (B, E). (C, F) Superposição das imagens A e B e D e F, respectivamente. Nota-se a intensa expressão do canal Nav1.6 em AISs (setas), nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e corpos celulares e a ausência de expressão nos dendritos, intensamente marcados pelo anticorpo anti-MAP-2.

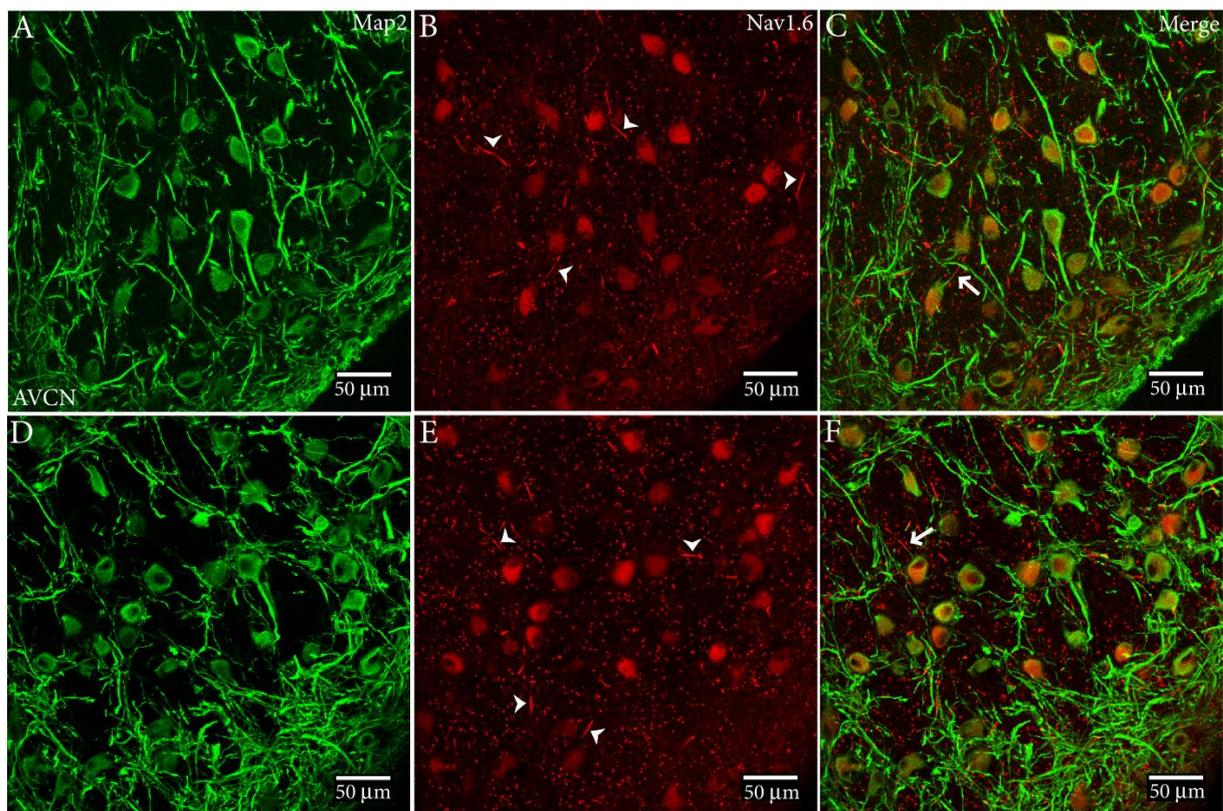


FIG. 8- Expressão do canal Nav1.6 na parte anteroventral do núcleo coclear de ratos de 30 dias. Corte coronal marcado com anticorpo anti-Map-2 (A e D) e com anticorpo anti-Nav1.6 (Dr. Rock) (B e E). A expressão do canal é encontrada no citoplasma dos corpos celulares, nos nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e AISs (B e E, cabeças de seta). Dendritos são marcados apenas pelo anticorpo anti-Map-2. A marcação para Map-2, além de evidente nos dendritos, é observada no soma e também próximo ao cone de implantação (setas em C e F).

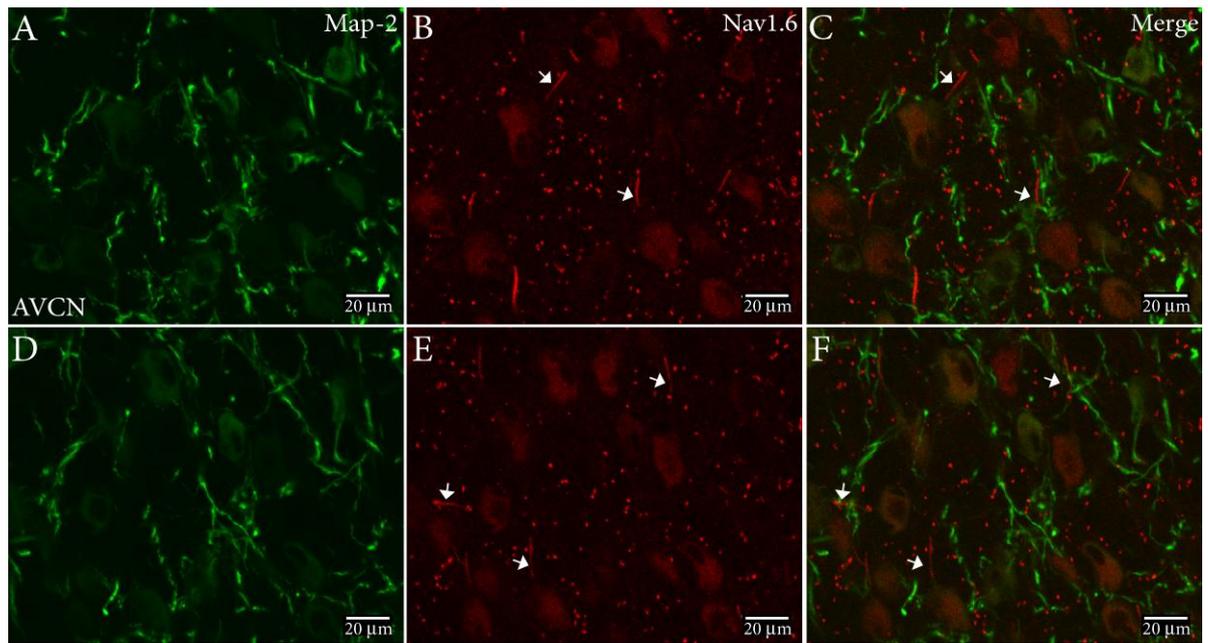


FIG. 9- Expressão do canal Nav1.6 na parte anteroventral do núcleo coclear de ratos de 30 dias. Corte coronal do AVCN marcado com anticorpo anti-MAP-2 (A e D) e com anticorpo anti-Nav1.6 (Dr. Rock) (B e E). Em B e E pode ser observada a marcação para Nav1.6 nos corpos celulares, nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e nos AISs (setas). (C e F) Superposição das imagens A e B e D e E ilustra a ausência da expressão de Nav1.6 nos dendritos.

5.3 EXPRESSÃO DO NAV1.6 NA RAIZ NERVOSA DO VCN DE RATOS DE 30 DIAS

As reações de imunofluorescência com o anticorpo anti-Nav1.6 (Dr. Rock) ilustraram a expressão do canal para sódio nos neurônios esféricos em arbusto do AVCN de ratos de 30 dias. O estudo da expressão do canal na raiz nervosa dos ratos de 30 dias, no AVCN e na raiz nervosa dos ratos de oito e 15 dias foi realizado apenas com o anti-Nav1.6 (Alomone).

A imunofluorescência para Nav1.6 na raiz nervosa de um rato de 30 dias, revela a expressão do canal nos nodos de Ranvier das fibras auditivas (marcação puntiforme), corpos celulares e a intensa marcação nos AISs (FIG. 10D e G, setas). A imagem panorâmica do núcleo coclear (FIG. 10A) ilustra a entrada da raiz nervosa no núcleo e indica a localização das células fotografadas (cabeças de seta), cuja marcação para o anticorpo MAP-2 pode ser visualizada em maior magnificação em seus somas e dendritos (FIG. 10B e C). A marcação para MAP-2 também pode ser observada próximo ao cone de implantação (FIG. 10B e C), onde AISs podem ser observados em continuidade (FIG. 10E e H). A superposição das imagens B e D, e C e G indica a ausência da expressão do canal em dendritos (FIG. 10 E e H). As imagens 10F e I, ilustram a análise da intensidade de fluorescência anti-Nav1.6, normalizada pelo valor máximo, ao longo dos AISs (setas, D e G). A intensidade da marcação anti-Nav1.6 no AIS aumenta com a distância a partir do soma.

A figura 11 ilustra o mesmo padrão de marcação anti-Nav1.6 e anti-MAP-2 na raiz nervosa de outro animal de 30 dias, onde a presença do canal foi observada em corpos celulares, nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e nos AISs de células globulares em arbusto (11B e F, setas). A ausência de co-localização das duas marcações demonstra que o canal não é expresso em dendritos (FIG. 11C e G). A intensidade de fluorescência anti-Nav1.6 foi medida ao longo dos AISs indicados pelas setas em 11B e 11F, essa análise demonstra que a densidade do canal no AIS aumenta com a distância a partir do soma, particularmente na sua porção distal (FIG. 11D e H). A marcação anti-MAP-2 também foi observada próximo ao cone de implantação (11 G).

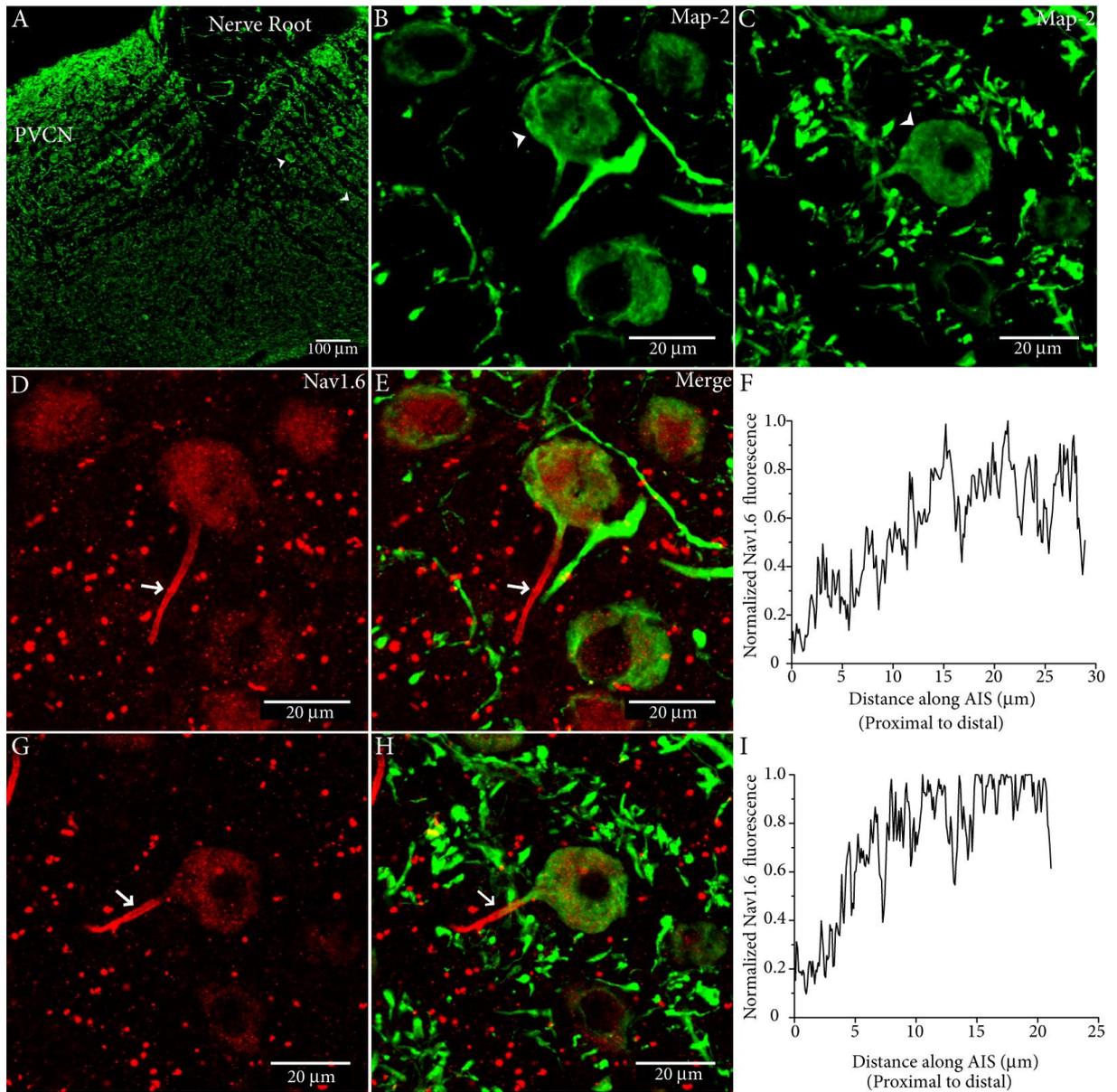


FIG. 10- Expressão do canal Nav1.6 em neurônios da raiz nervosa do núcleo coclear de ratos de 30 dias. (A) Imunomarcção anti-Map-2 ilustra a entrada da raiz nervosa (*nerve root*) no núcleo e indica a localização das células fotografadas (cabeças de seta), cuja marcação no soma e dendritos pode ser visualizada em maior magnificação em B e C. O anticorpo anti-Nav1.6 (Alomone) evidencia a expressão do canal em nodos de Ranvier (marcação puntiforme), corpos celulares, e nos AISs intensamente marcados (setas em D e G). A superposição das imagens B e D (E) e C e G (H) indica a ausência de co-localização das marcações nos dendritos. Em F e I, a intensidade de fluorescência anti-Nav1.6, normalizada pelo valor máximo, foi analisada ao longo dos AISs (setas, D e G), a intensidade da marcação anti-Nav1.6 aumenta com a distância a partir do soma. (PVCN) núcleo coclear posteroventral.

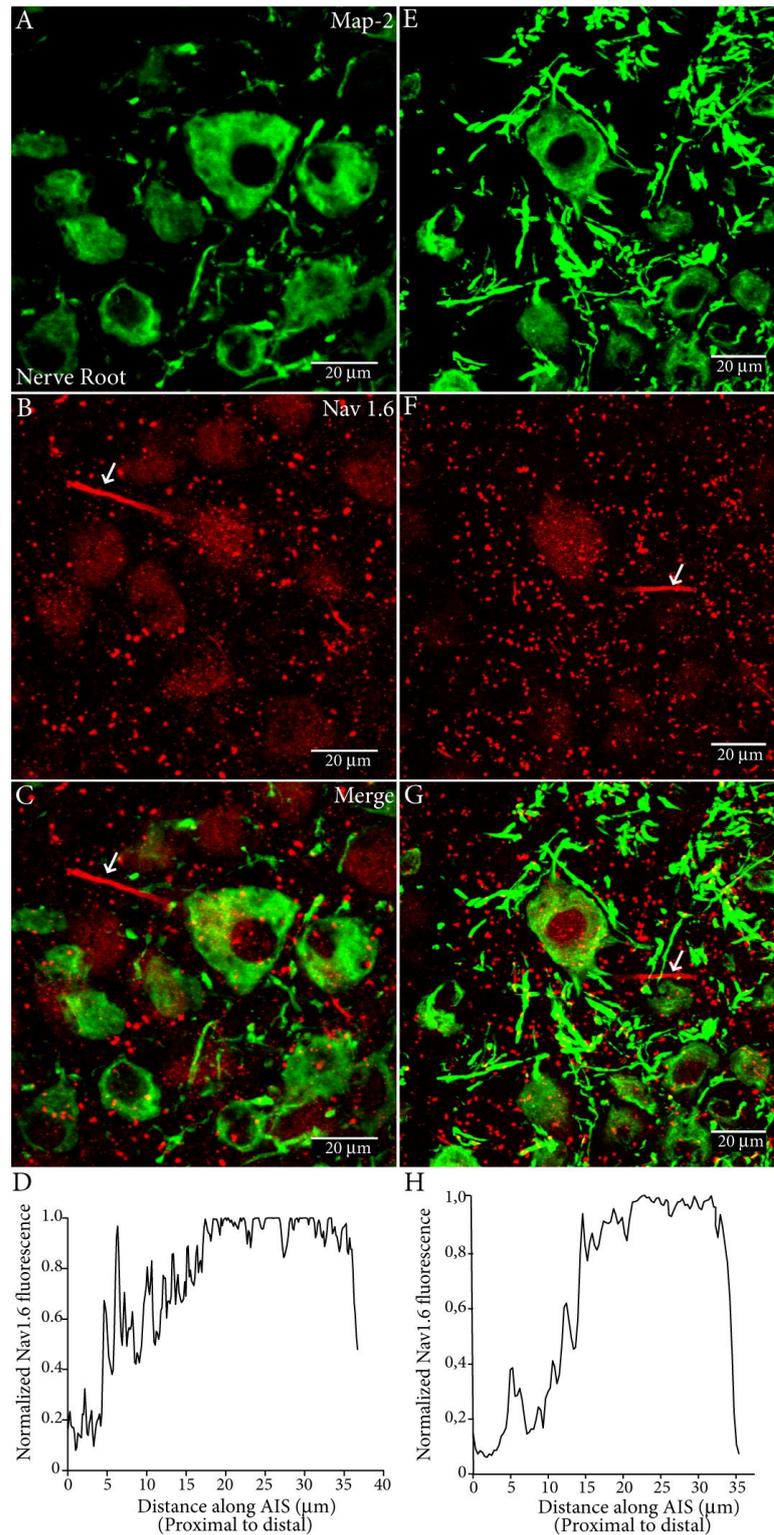


FIG. 11- Expressão do canal Nav1.6 em neurônios da raiz nervosa do núcleo coclear de ratos de 30 dias. (A e E) Imunomarcção anti-Map-2 revela o soma de células globulares em arbusto. O anticorpo anti-Nav1.6 (Alomone) evidencia a expressão do canal em nodos de Ranvier (marcação puntiforme), corpos celulares, e nos AISs intensamente marcados (setas em B e F). A superposição das imagens A e B (C) e E e F (G) indica a ausência de co-localização das marcações nos dendritos. Em D e H, a intensidade de fluorescência anti-Nav1.6, normalizada pelo valor máximo, foi analisada ao longo dos AISs (setas, B e F), a intensidade da marcação anti-Nav1.6 aumenta com a distância a partir do soma.

5.4 EXPRESSÃO DO CANAL NAV1.6 NO AVCN E NA RAIZ NERVOSA DE RATOS DE 15 DIAS

A figura 12 ilustra a marcação para MAP-2 e Nav1.6 (Alomone) no AVCN de um rato de 15 dias. Como citado nos resultados dos ratos de 30 dias, AISs longos e bem marcados pelo anti-Nav1.6 foram observados, e aparentemente estão separados do soma do qual derivam por uma área sem expressão do canal Nav1.6, tornando difícil correlacionar a qual neurônios um dado AIS pertence. Não foi observada a expressão desse canal em dendritos, visto a ausência de co-localização da dupla marcação na superposição das imagens 12 A e B (FIG. 12 C). No corpo celular foi observada apenas uma marcação citoplasmática (indicada por asteriscos).

A figura 13 apresenta os resultados da marcação para o Nav1.6 em neurônios localizados na região da raiz nervosa do núcleo coclear de um rato de 15 dias. Os neurônios globulares em arbusto, comuns nessa região, apresentaram os somas e suas árvores dendríticas bem marcados para MAP-2 (FIG. 13A, D e G). Há uma marcação bem acentuada para o anti-Nav1.6 (Alomone) nos nodos de Ranvier (marcação puntiforme) das fibras auditivas e nos AISs (FIG. 13 B, E e H, setas). Não foi observada a co-localização do Nav1.6 e MAP-2 nos dendritos (13C, F e I). Interessantemente, como visto nas figuras 10B, E, C e H (em ratos de 30 dias), a variação da expressão de MAP-2 e Nav1.6 com a distância a partir do soma pode ser apreciada também nas figuras 13G, H e I (em ratos de 15 dias). A intensidade da marcação para o canal Nav1.6 fica mais intensa à medida que o AIS se distancia do soma, já a marcação para MAP-2 parece apresentar o padrão oposto, desaparecendo ao se distanciar do soma.

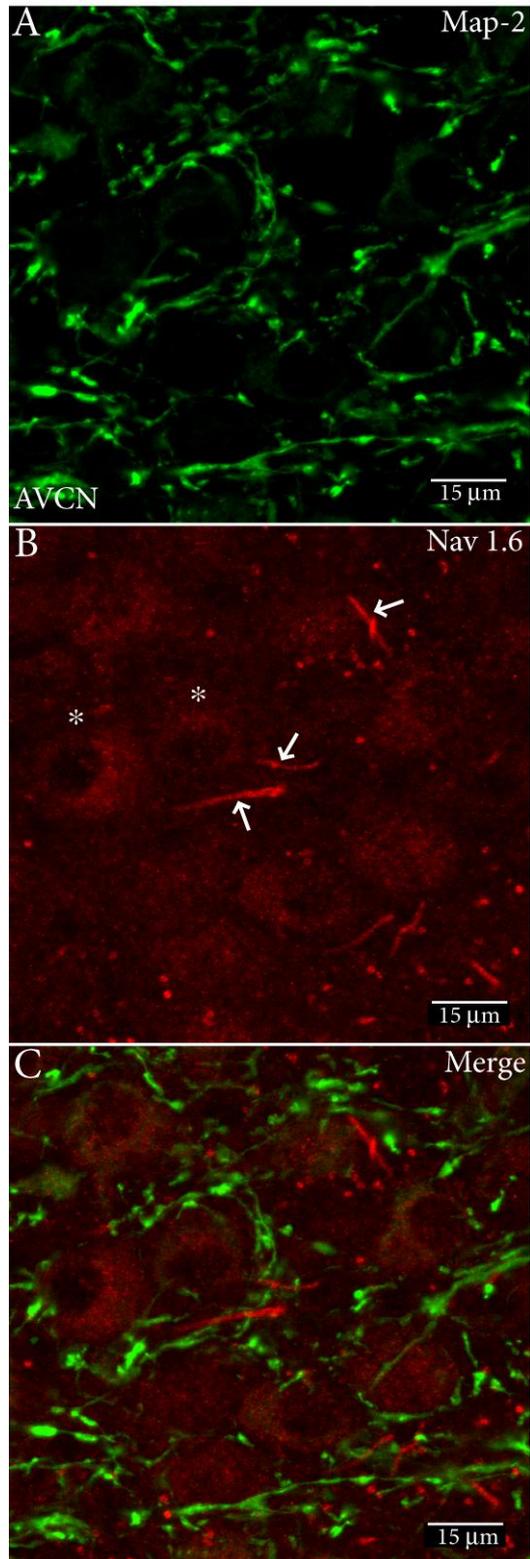


FIG. 12- Expressão do canal Nav1.6 em neurônios do AVCN de ratos de 15 dias. (A) Secções confocais ilustrando a marcação dendrítica para a proteína MAP-2. (B) Marcação intensa para Nav1.6 (Alomone) em AISs (setas) e pouca marcação nos corpos celulares (asteriscos). (C) Sobreposição das imagens ilustra a ausência de co-localização em dendritos, indicando que o canal Nav1.6 é expresso preferencialmente no AIS. Cortes parassagitais de 40 μm.

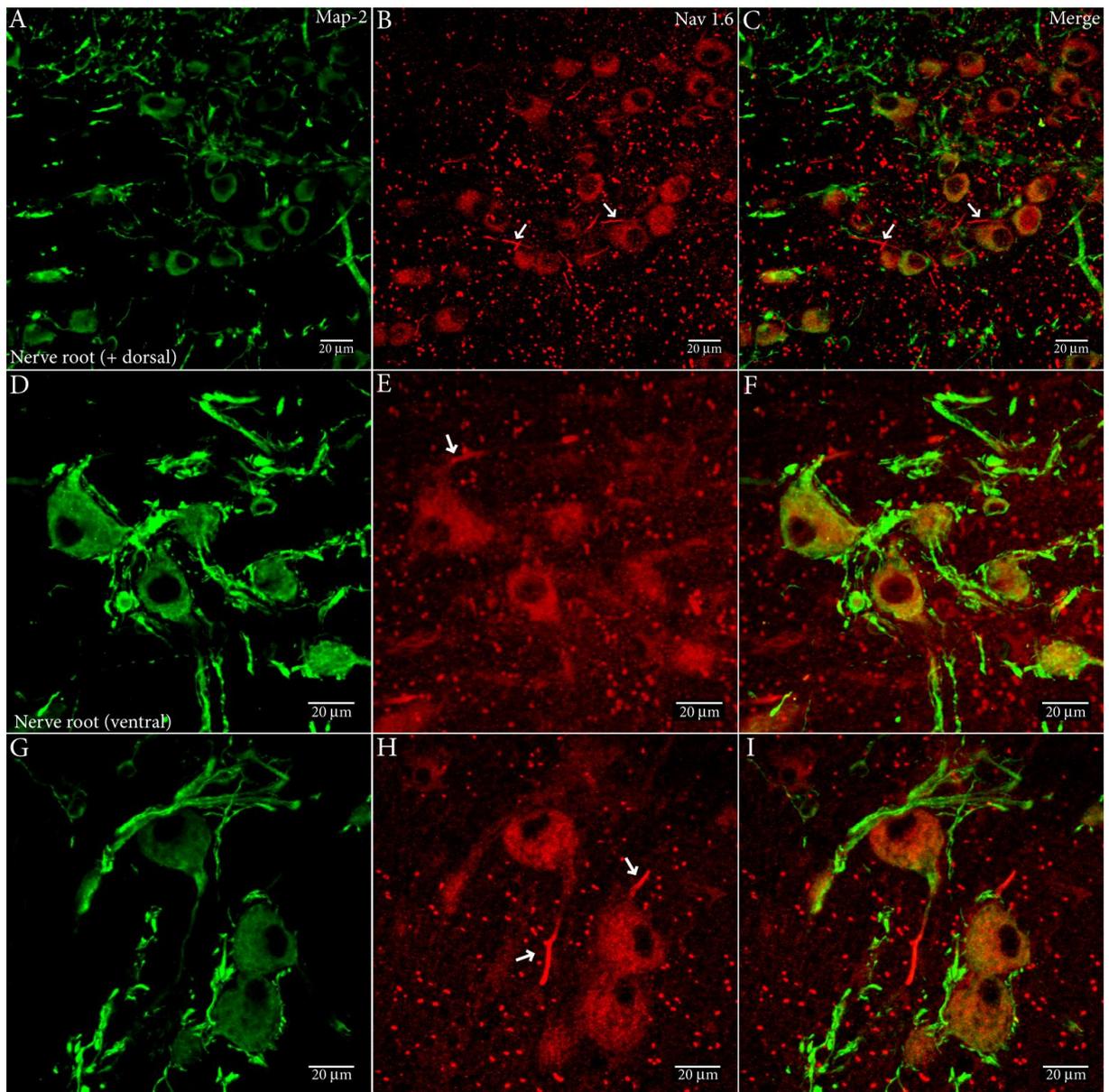


FIG. 13- Expressão do canal Nav1.6 em neurônios da raiz nervosa do VCN de ratos de 15 dias. (A, D e G) Secções confocais ilustrando a marcação somática e dendrítica para a proteína MAP-2. (B, E e H) Marcação intensa para Nav1.6 (Alomone) em AISs (setas), nodos de Ranvier das fibras auditivas (marcação puntiforme) e nos corpos celulares. D, E, F e G, H, I ilustram o padrão de expressão de MAP-2 e Nav1.6 em neurônios da raiz nervosa em maior magnificação. A sobreposição das imagens ilustra a ausência de co-localização em dendritos, indicando que o canal Nav1.6 é expresso preferencialmente no AIS (C, F e I).

5.5 EXPRESSÃO DO CANAL NAV1.6 NAS CÉLULAS DE PURKINJE DO CEREBELO EM RATOS DE 30 DIAS

Em nossos experimentos, utilizamos a marcação de células de Purkinje do cerebelo como controle positivo interno para a expressão do canal para sódio Nav1.6, já que uma parte do cerebelo foi seccionada junto ao tronco encefálico contendo o núcleo coclear. As figuras 14 e 15 descrevem a reação de imunofluorescência anti-Nav1.6 (Dr. Rock) em cortes parassagitais de 40 μm . A reação de imunofluorescência para MAP-2 marca muito bem os dendritos das células de Purkinje projetando para o córtex do cerebelo na camada molecular (ML) (FIG. 14A e 15 A). As figuras 14B e 15B mostram que a marcação para o canal Nav1.6 está presente em AISs (cabeças de seta) das células de Purkinje, que projetam para o córtex da camada granular do cerebelo.

Esse controle positivo interno nas células de Purkinje também foi realizado para as marcações anti-Nav1.6 (Alomone). A figura 16 ilustra a expressão do canal para sódio Nav1.6 na camada de Purkinje do cerebelo, tanto no soma quanto nos AISs (FIG. 16B), e a ausência de co-localização das marcações anti-Nav1.6 e anti-MAP-2 nos dendritos (FIG. 16C). A figura 17 mostra a reação de imunofluorescência que serviu como controle positivo pós-incubação com o peptídeo antigênico (Alomone). A marcação para o canal Nav1.6 pode ser observada no soma e no AIS de células da raiz nervosa do núcleo coclear (FIG. 17A, seta), e também no soma e AISs das células de Purkinje do cerebelo (FIG. 17B, setas). Essa marcação foi abolida com a pré-incubação do anti-Nav1.6 (Alomone) com o peptídeo antigênico em um corte adjacente do mesmo animal (FIG.17C).

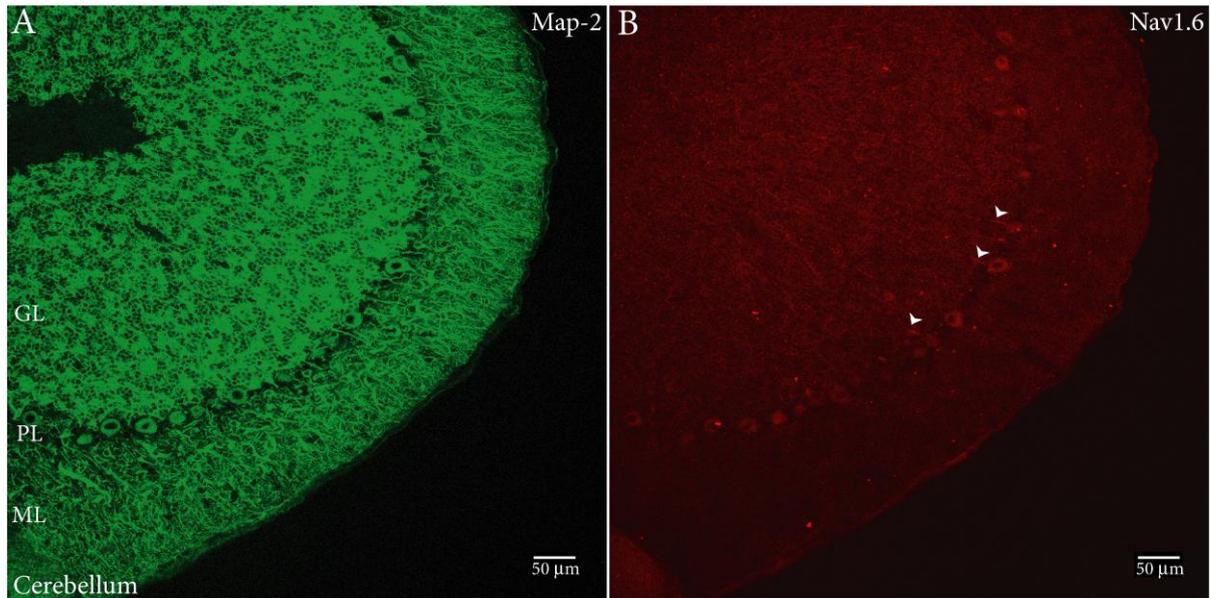


FIG. 14- Expressão do canal Nav1.6 nas células de Purkinje do cerebelo de ratos de 30 dias. Imagem de um corte parassagital ilustra a marcação de corpos celulares e dendritos pelo anticorpo anti-MAP-2 (A) e a marcação anti-Nav1.6 (Dr. Rock, B). As setas em B evidenciam a expressão do canal Nav1.6 nos AISs de células de Purkinje. (ML) Camada molecular do cerebelo; (GL) Camada das células granulares.

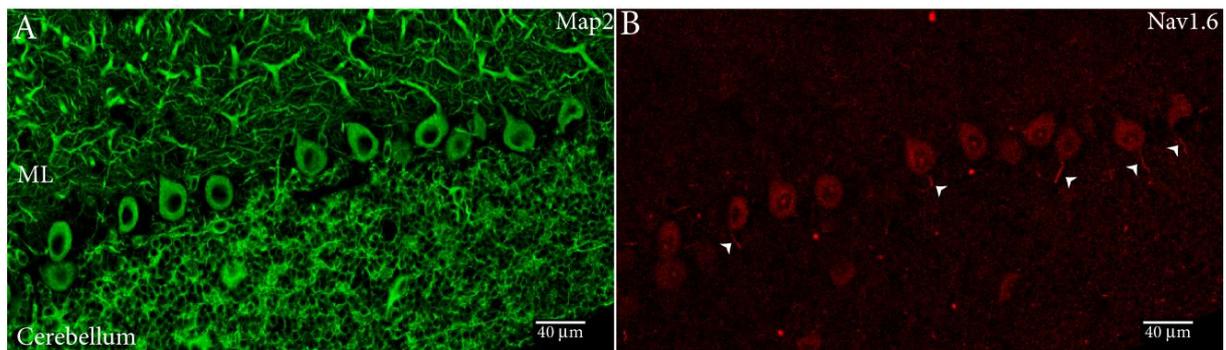


FIG. 15- Expressão do canal Nav1.6 nas células de Purkinje do cerebelo de ratos de 30 dias (controle positivo interno). Corte parassagital ilustra a marcação anti-MAP-2 (A) e anti-Nav1.6 (Dr. Rock, B). As cabeças de seta em B evidenciam a expressão do canal Nav1.6 em AISs de células de Purkinje, que também é observada no soma dessas células. (ML) Camada molecular; (GL) Camada das células granulares.

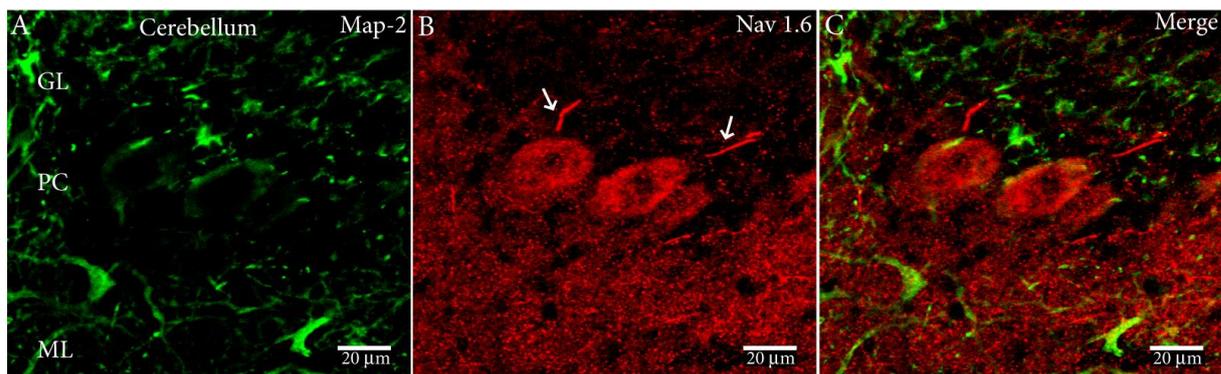


FIG. 16- Expressão do canal Nav1.6 nas células de Purkinje do cerebelo de ratos de 30 dias (controle positivo interno) com o anticorpo anti-Nav1.6 (Alomone). Cortes parassagitais com a marcação anti-MAP-2 ilustram as camadas do cerebelo (A). As setas em B evidenciam a expressão do canal Nav1.6 no soma e nos AISs das células de Purkinje. (GL) Camada das células granulares, (ML) Camada molecular e (PC) Camada das células de Purkinje.

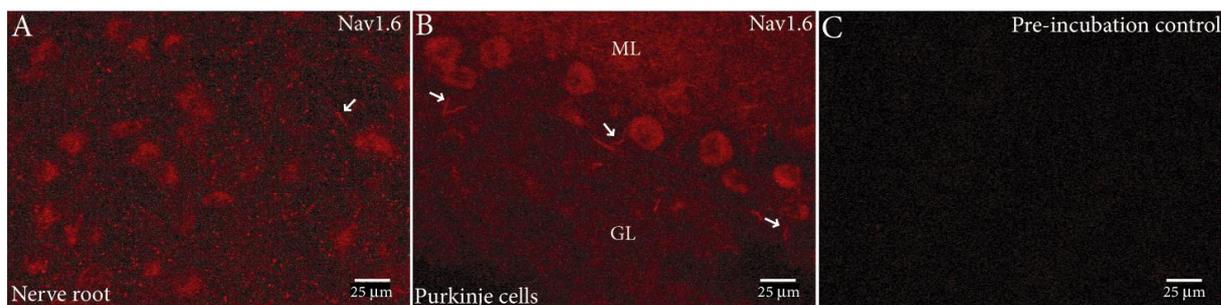


FIG. 17- Reação de imunofluorescência para o controle positivo anti-Nav1.6 (Alomone) em ratos de 30 dias. A marcação para o canal Nav1.6 pode ser observada no soma e nos AISs de células da raiz nervosa do núcleo coclear (A, seta), e também de células de Purkinje (B, setas). Essa marcação foi abolida com a pré-incubação com o peptídeo antigênico em um corte adjacente do mesmo animal (C). Camada molecular do cerebelo (ML), camada de células granulares (GL).

5.6 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL NAV1.6 E DA ANQUIRINA-G NO AIS

A figura 18 mostra o resultado de experimentos de dupla marcação anti-anquirina-G (AnkG) e anti-Nav1.6 (Alomone) no AVCN de um rato de 30 dias (FIG. 18A-C) e na raiz nervosa de um rato de 15 dias (FIG. 18D-F). A marcação anti-AnkG está presente nos feixes axonais das fibras auditivas e nos AISs (FIG. 18A e D, setas), não sendo observada nos corpos celulares. A marcação anti-Nav1.6 ilustra a expressão do canal nos corpos celulares, nodos de Ranvier (marcação puntiforme), no AIS de uma provável célula esférica em arbusto (FIG. 18B, seta) e no AIS de uma provável célula globular em arbusto (FIG. 18E, seta). A superposição das imagens indica a co-localização da dupla marcação nos AISs (FIG. 18C e F), mas não foi observada a co-localização nos nodos de Ranvier das fibras auditivas. O controle positivo interno da reação foi fotografado em uma célula de Purkinje do cerebelo do rato de 15 dias (FIG. 18G-I).

A figura 19 mostra a co-localização da AnkG e do canal Nav1.6 no AIS de uma provável célula globular em arbusto da raiz nervosa de um rato de oito dias. A marcação para AnkG pode ser observada, ao longo do AIS (setas), através da sequência de três secções confocais adjacentes (FIG. 19A-C). A extensão do AIS aparece em diferentes secções, desde o seu início, próximo ao soma e ao cone de implantação neuronal (FIG. 19A, seta), passando pela sua região proximal (FIG. 19B), até sua região distal onde termina de forma abrupta (FIG. 19C). A co-localização do canal Nav1.6 com a AnkG no AIS pode ser observada através da superposição da dupla marcação na mesma sequência de secções (FIG. 19D-F, setas). A expressão do canal Nav1.6 pode ser observada ao longo da extensão do AIS (FIG. 19D-F, setas). Nodos de Ranvier marcados pelo anticorpo anti-Nav1.6 (Alomone) não co-localizam com os feixes das fibras auditivas marcados pelo anticorpo anti-AnkG. O soma, identificado pela visualização de todas as secções fotografadas, foi circundado pela linha pontilhada para indicar o neurônio ao qual o AIS pertence (FIG. 19E).

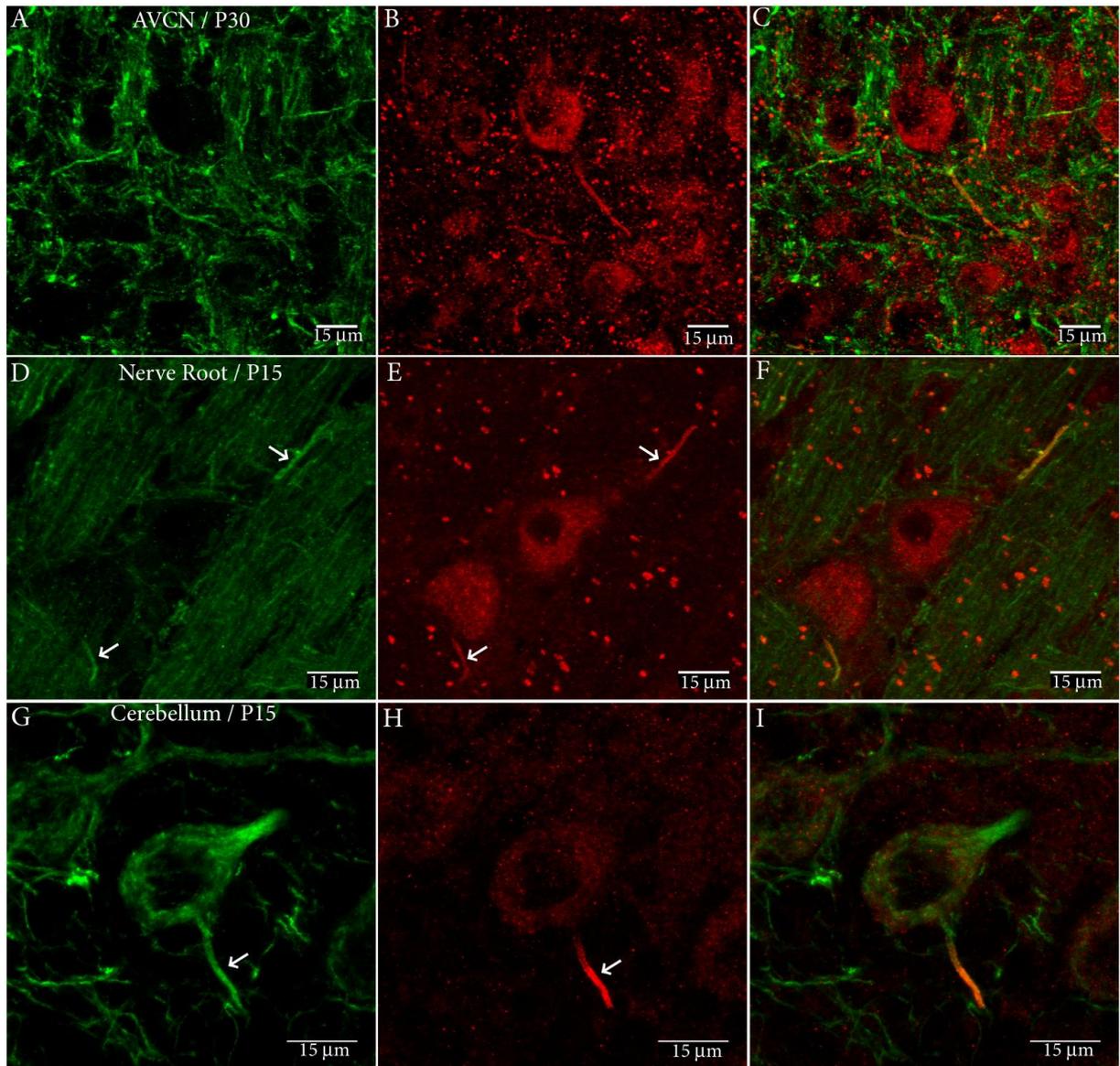


FIG. 18- Co-localização de anquirina-G e do canal Nav1.6 no AIS de neurônios do AVCN e da raiz nervosa. Imunofluorescência anti-AnkG e anti-Nav1.6 (Alomone) no AVCN de um rato de 30 dias (A-C) e na raiz nervosa de um rato de 15 dias (D-F). Prováveis ramos ascendentes das fibras auditivas aparecem bem marcados pelo anticorpo anti-AnkG (D). A análise das figuras superpostas em C e F ilustra a co-localização da dupla marcação nos AISs indicados pelas setas em A-B e D-E. O controle positivo interno da reação foi fotografado em uma célula de Purkinje do cerebello do rato de 15 dias (FIG. 18G-I). Pós-natal de 15 dias e 30 dias (P15, P30).

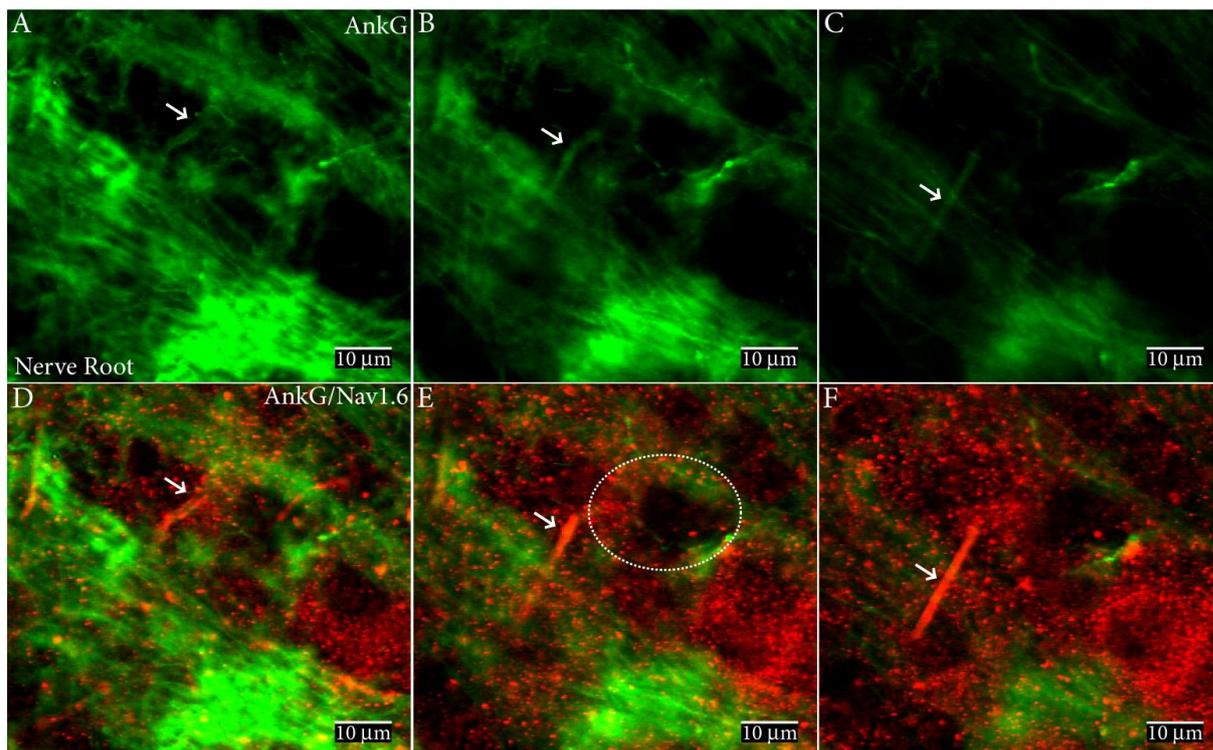


FIG. 19- Co-localização de anquirina-G e do canal Nav1.6 na raiz nervosa de um rato de 8 dias. A extensão do AIS, marcada pelo anticorpo anti-AnkG, pode ser visualizada em secções confocais adjacentes, que indicam o seu início, próximo ao soma e ao cone de implantação neuronal (A, seta), sua região proximal (B, seta), e sua região distal, que termina de forma abrupta (C, seta). A co-localização do canal Nav1.6 com a AnkG foi demonstrada através da superposição da dupla marcação na mesma sequência de secções (D, E e F, setas). O soma, da célula em questão, foi circundado pela linha pontilhada para indicar o neurônio ao qual o AIS pertence (E).

5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO CANAL NAV1.6 NOS TERMINAIS SINÁPTICOS DE NEURÔNIOS DO AVCN E DA RAIZ NERVOSA

Para analisar a expressão do canal Nav1.6 em terminais sinápticos do AVCN e da raiz nervosa utilizamos os anticorpos anti-Nav1.6 (Alomone) e anti-proteína de vesícula sináptica (SV2). Não observamos a expressão do canal em terminais sinápticos, já que não houve co-localização dos dois anticorpos em nenhuma das imunomarcações realizadas. A figura 20 ilustra essa análise em células esféricas em arbusto do AVCN de um rato de 30 dias. Os terminais intensamente marcados para SV2 (FIG. 20A e D) parecem anéis que circundam o soma das células sem co-localizar com as regiões de intensa expressão do canal: corpos celulares, nodos de Ranvier (marcação puntiforme), e AISs (FIG. 20B, E e G, setas). A intensidade da fluorescência anti-Nav1.6, normalizada pelo valor máximo, foi analisada ao longo do AIS da célula esférica em arbusto da imagem 20G. Nota-se que a intensidade aumenta gradativamente com a distância a partir do soma e termina abruptamente na parte distal do AIS (FIG. 20I). A ausência de co-localização das duas marcações também pode ser observada na raiz nervosa de um rato de 30 dias (FIG. 21). A marcação anti-SV2 apenas circunda as células globulares em arbusto (FIG. 21C), e a expressão do canal mostra-se intensa no soma, nos nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e nos AISs (FIG. 21B, setas).

As imunomarcações em ratos de 15 dias, tanto no AVCN quanto na raiz nervosa, também indicaram ausência da expressão do canal Nav1.6 em terminais sinápticos, já que a marcação anti-SV2 não co-localizou com a anti-Nav1.6, ela apenas circundou o soma das células analisadas. A marcação para o canal é intensa nos soma das células esféricas em arbusto no AVCN, e nos seus AISs (FIG. 22B e E, setas). O canal pode ser observado nos neurônios globulares em arbustos da raiz nervosa e no AIS indicado pela seta (FIG. 23B e E). Devido a um corte óptico diferenciado é possível observar um terminal sináptico envolvendo o soma (FIG. 23D e F).

No estudo da expressão do canal Nav1.6 nos terminais sinápticos de um rato de oito dias, é possível observar a marcação anti-SV2 em terminais que envolvem os corpos celulares dos neurônios do VCN (FIG. 24A). O canal é expresso nos corpos celulares e AISs (FIG. 24B, D e E, setas). A presença do canal Nav1.6 não foi observada nos terminais sinápticos pela análise da co-localização com a marcação anti-SV2 (FIG. 24C e F). A camada de células de Purkinje foi fotografada para controle positivo interno da marcação anti-Nav1.6 (Alomone) em ratos de 30 dias, que pode ser observada no soma e nos AISs (FIG. 25B e C, setas).

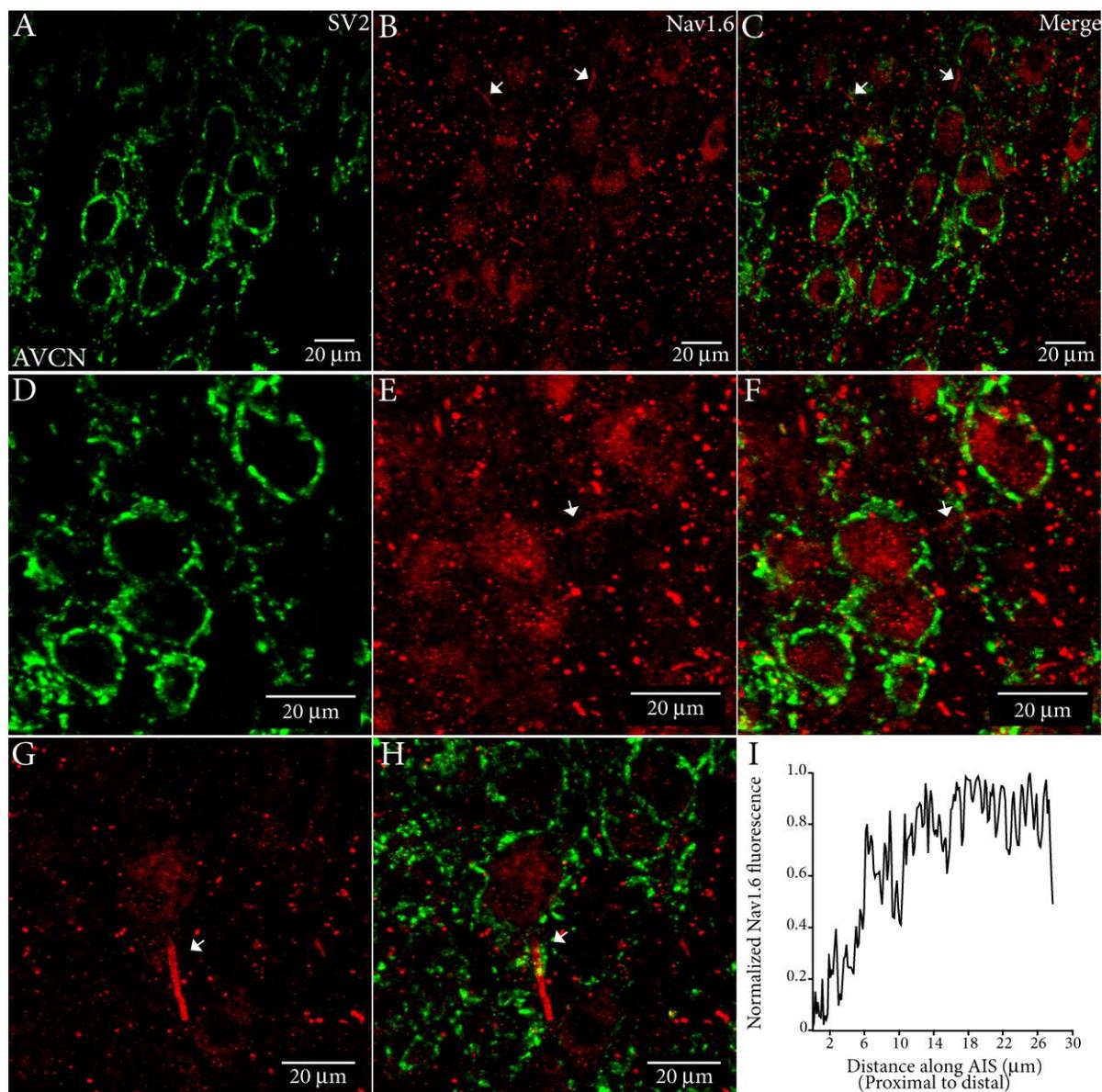


FIG. 20- Análise da expressão do canal Nav1.6 em terminais sinápticos no AVCN de um rato de 30 dias. Corte parassagital marcado com anticorpo anti-SV2 (A e D) e anti-Nav1.6 (Alomone) (B, E e G). Em B pode ser observada a marcação para Nav1.6 nos corpos celulares, nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e nos AISs (setas), o que pode ser identificado em maior magnitude em outras imagens desse corte (E e G). A superposição das imagens ilustra a ausência da expressão de Nav1.6 nos terminais sinápticos (C, F e H). Em I, a intensidade da fluorescência anti-Nav1.6, normalizada pelo valor máximo, foi analisada ao longo do AIS da célula esférica em arbusto em G. Observa-se que ela aumenta gradativamente com a distância a partir do soma, ficando mais intensa na parte final do AIS e termina de modo abrupto na parte final do AIS.

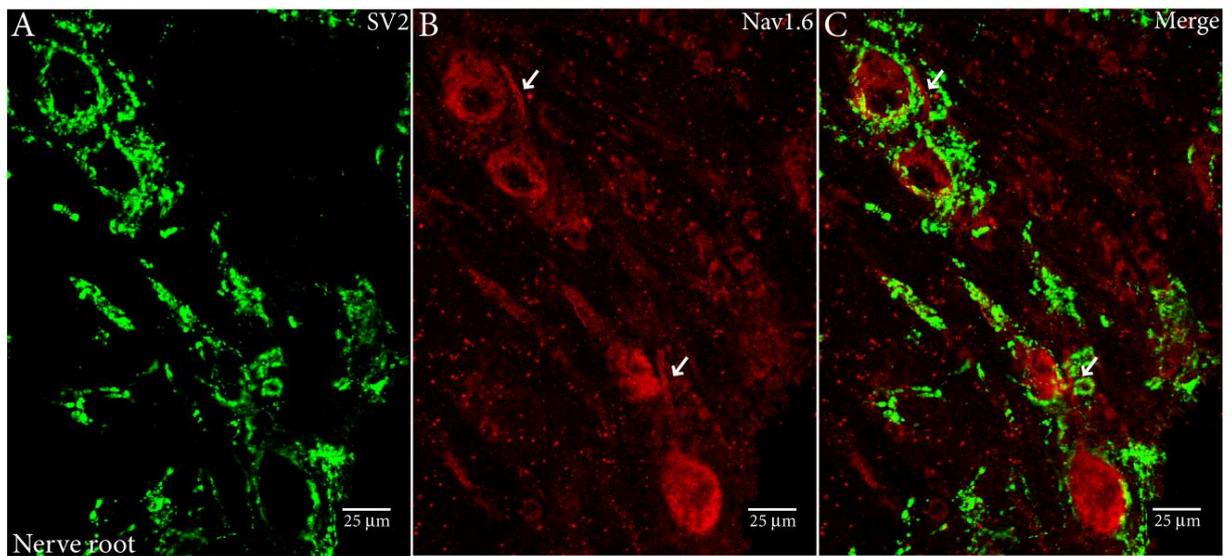


FIG. 21- Análise da expressão do canal Nav1.6 nos terminais sinápticos de células da raiz nervosa de um rato de 30 dias. Corte parassagital marcado pelo anticorpo anti-SV2 (A) e anti-Nav1.6 (Alomone, B). A marcação para o canal é observada nos corpos celulares, nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e nos AIS (setas, B). A colocalização das imagens evidencia a ausência do canal nos terminais sinápticos de células globulares em arbusto (C).

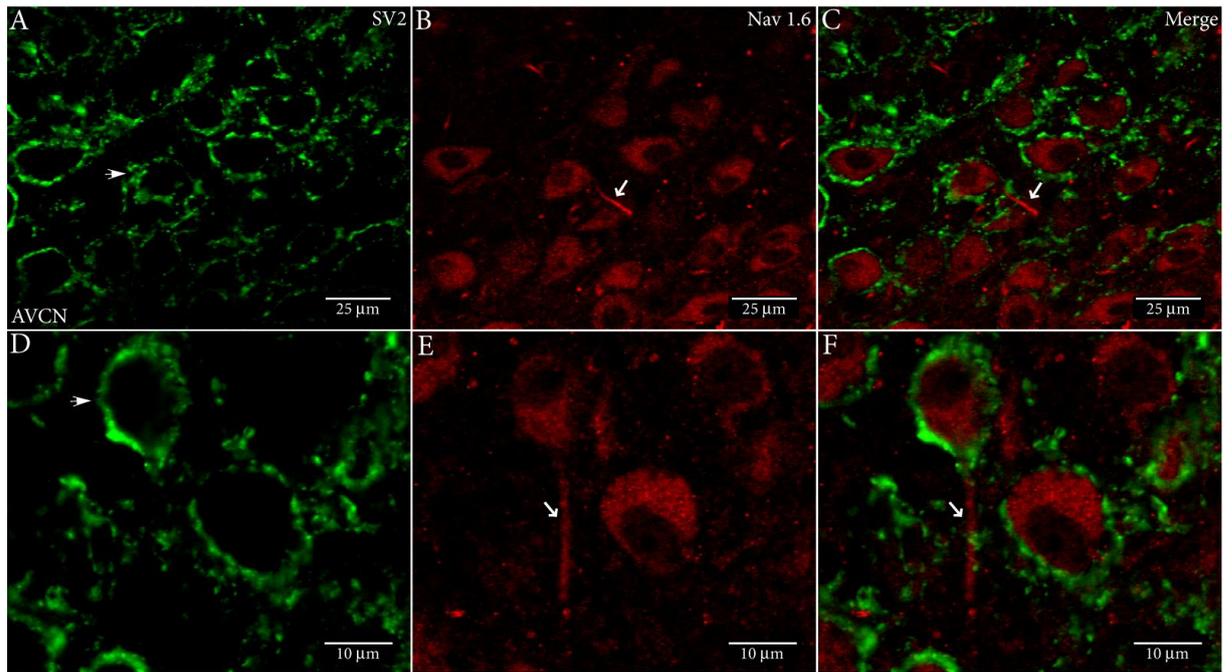


FIG. 22- Análise da expressão do canal Nav1.6 em terminais sinápticos no AVCN de um rato de 15 dias. A marcação para o canal é intensa em corpos celulares e AISs (B e E, setas), e ausente nos terminais sinápticos intensamente marcados pelo anticorpo anti-SV2 (A e D, setas), o que pode ser observado pela sobreposição das imagens em C e F.

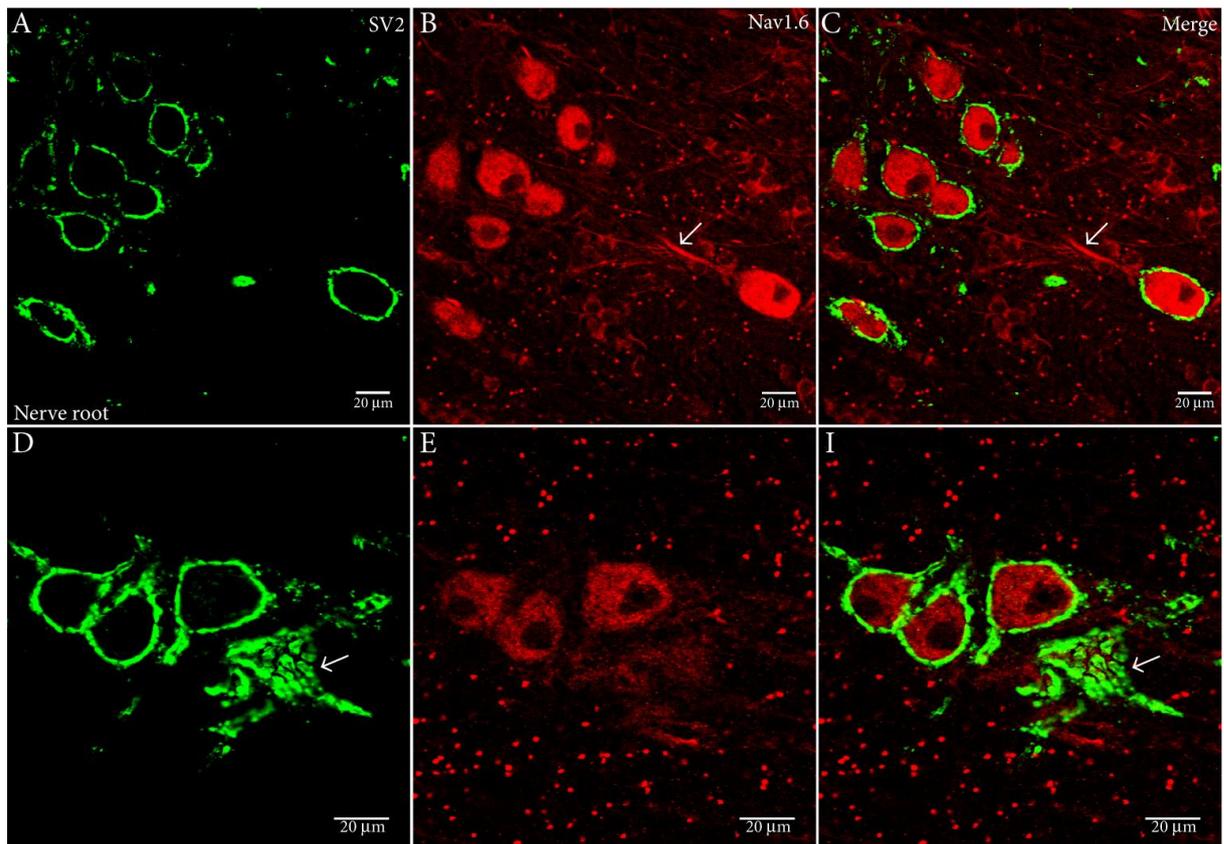


FIG. 23- Análise da expressão do canal Nav1.6 em terminais sinápticos da raiz nervosa de ratos de 15 dias. A marcação dos terminais (anti-SV2) é ilustrada em A e D, que aparecem envolvendo o soma. Em B e E a marcação para o canal Nav1.6 pode ser observada nos corpos celulares, nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e no AIS (setas). A superposição das imagens ilustra a ausência da expressão do canal Nav1.6 nos terminais sinápticos nas células globulares em arbusto (C e F). É possível observar um terminal sináptico envolvendo o soma, intensamente marcado pelo anticorpo anti-Sv2 (D e F).

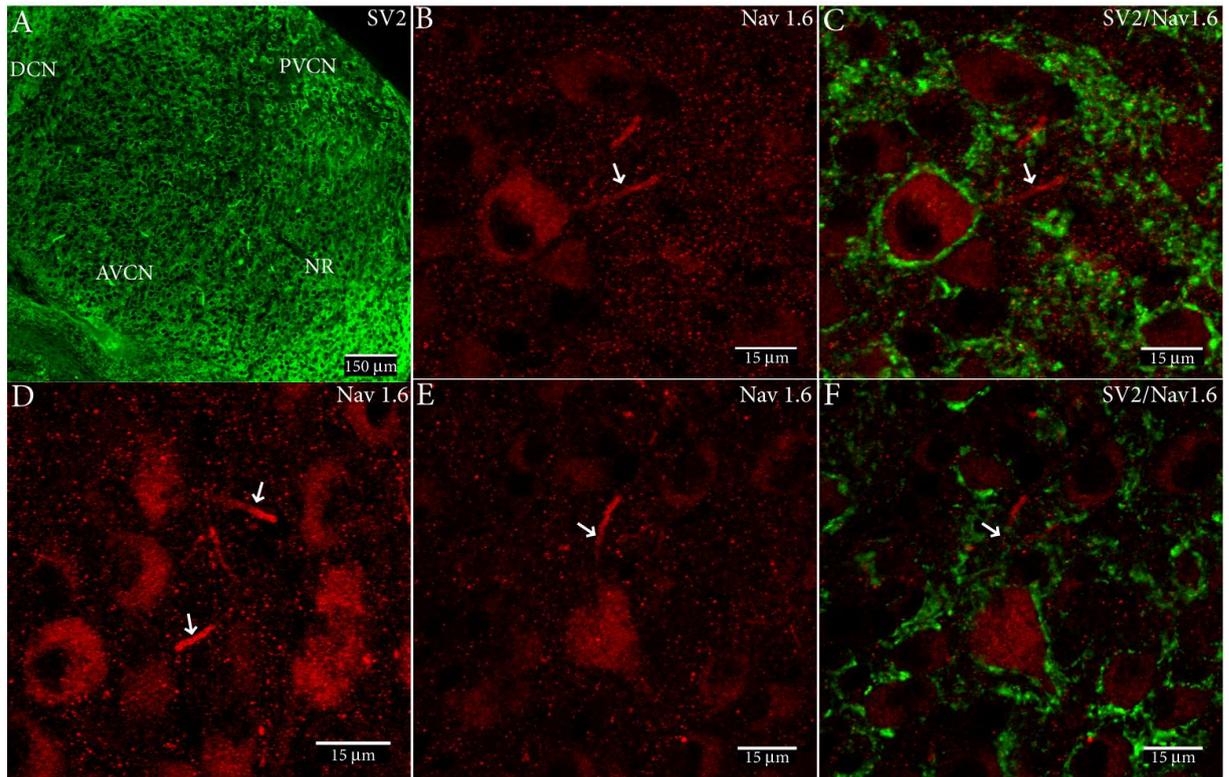


FIG. 24- Análise da expressão do canal Nav1.6 nos terminais sinápticos do VCN de um rato de 8 dias. (A) Vista panorâmica da marcação anti-SV2 ilustrando terminais sinápticos que envolvem os corpos celulares dos neurônios do VCN. (B, D e E) ilustram a expressão do canal Nav1.6 em corpos celulares e AISs (setas) bem marcados pelo anti-Nav1.6 (Alomone). A análise das marcações superpostas indica a ausência da expressão do canal Nav1.6 nos terminais sinápticos das células em arbusto (C e F).

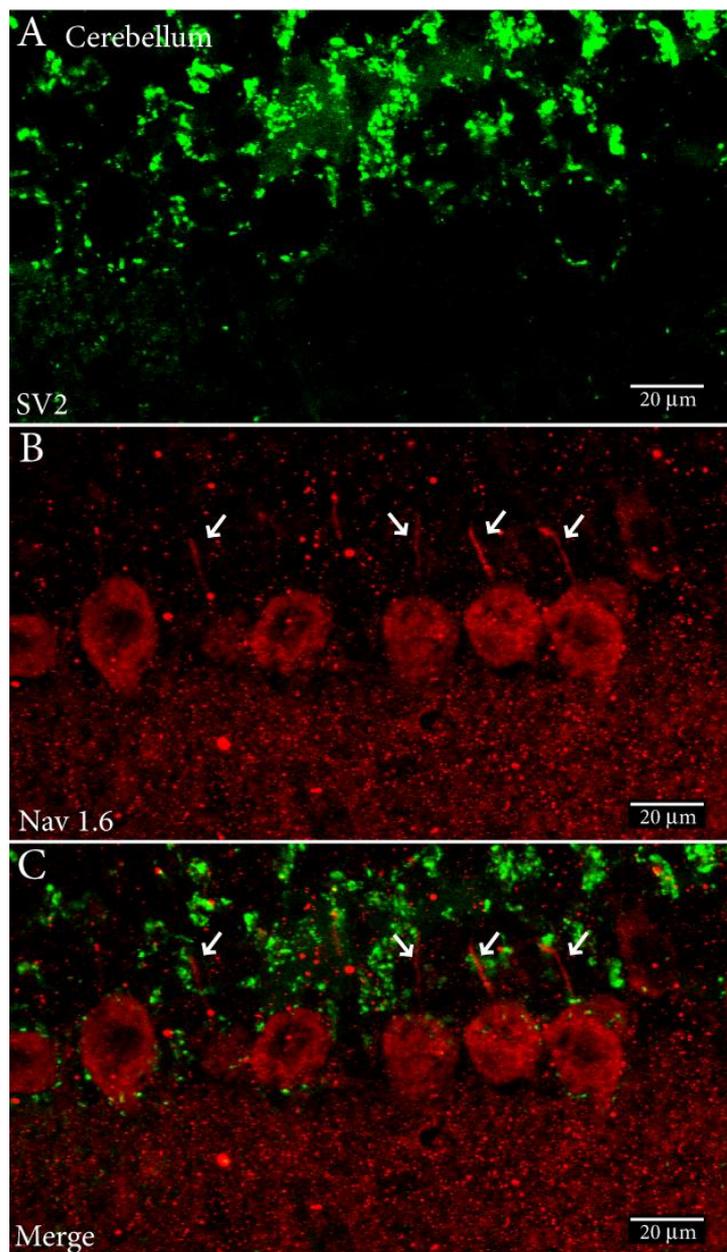


FIG. 25- Análise da co-localização da marcação anti-Nav1.6 e anti-SV2 nas células de Purkinje do cerebelo. Controle positivo interno da marcação anti-Nav1.6 (Alomone) em um rato de 30 dias. A expressão do canal Nav1.6 pode ser observada tanto no soma quanto nos AISs das células de Purkinje (B e C, setas).

5.8 RELAÇÃO ENTRE A EXTENSÃO DA MARCAÇÃO DO CANAL NAV1.6 NO AIS E ÁREA SOMÁTICA DE NEURÔNIOS DO AVCN E DA RAIZ NERVOSA DE RATOS DE 30 DIAS E DE 15 DIAS

As medidas da extensão da marcação anti-Nav1.6 no seguimento inicial do axônio e na área somática das células em arbusto foram separadas em amostras segundo o tipo celular (esféricas e globulares) e segundo o estágio de desenvolvimento pós-natal (15 e 30 dias). A análise pelo teste de Grubbs não apontou nenhum valor de desvio significativo entre as medidas, e o teste de Shapiro-Wilk mostrou que as amostras são paramétricas. A comparação entre os dados das amostras foi realizada através do teste não pareado (two-sample t-Test) com valor de significância $p \leq 0,05$. A análise da extensão da marcação anti-Nav1.6 no AIS das células esféricas em arbusto entre ratos de 15 dias ($n=5$) e 30 dias ($n=17$) mostrou-se não significativa ($p=0,1$), assim como não foi significativa a comparação da área somática nesses dois grupos ($p=0,6$). A média de valores para a extensão da marcação do canal no AIS das células esféricas e para a extensão da área somática foi respectivamente $17 \pm 0,8 \mu\text{m}$ e $311,2 \pm 7,5 \mu\text{m}^2$ para ratos de 15 dias, e $19 \pm 0,6 \mu\text{m}$ e $325 \pm 15,1 \mu\text{m}^2$ para ratos de 30 dias (FIG. 26A).

A análise da extensão da marcação anti-Nav1.6 no AIS das células globulares em arbusto entre ratos de 15 dias ($n=6$) e 30 dias ($n=13$) mostrou-se não significativa ($p=0,8$), assim como não foi significativa a comparação da área somática nesses dois grupos ($p=0,8$). Os valores médios para a extensão da marcação do canal Nav1.6 no AIS e para as áreas somáticas foram respectivamente $26,7 \pm 2,8 \mu\text{m}$ e $700,8 \pm 71,8 \mu\text{m}^2$ para as células globulares de 15 dias, e $27,3 \pm 1 \mu\text{m}$ e $723,4 \pm 52,3 \mu\text{m}^2$ para as células de 30 dias (FIG. 26B). Já a análise da diferença entre a extensão da marcação anti-Nav1.6 no AIS dos dois tipos celulares, no mesmo estágio de desenvolvimento pós-natal (15 e 30 dias), mostrou-se significativa entre a marcação do canal nos AISs das células esféricas e globulares de 15 dias ($p=0,01$) e 30 dias ($p=0,00$).

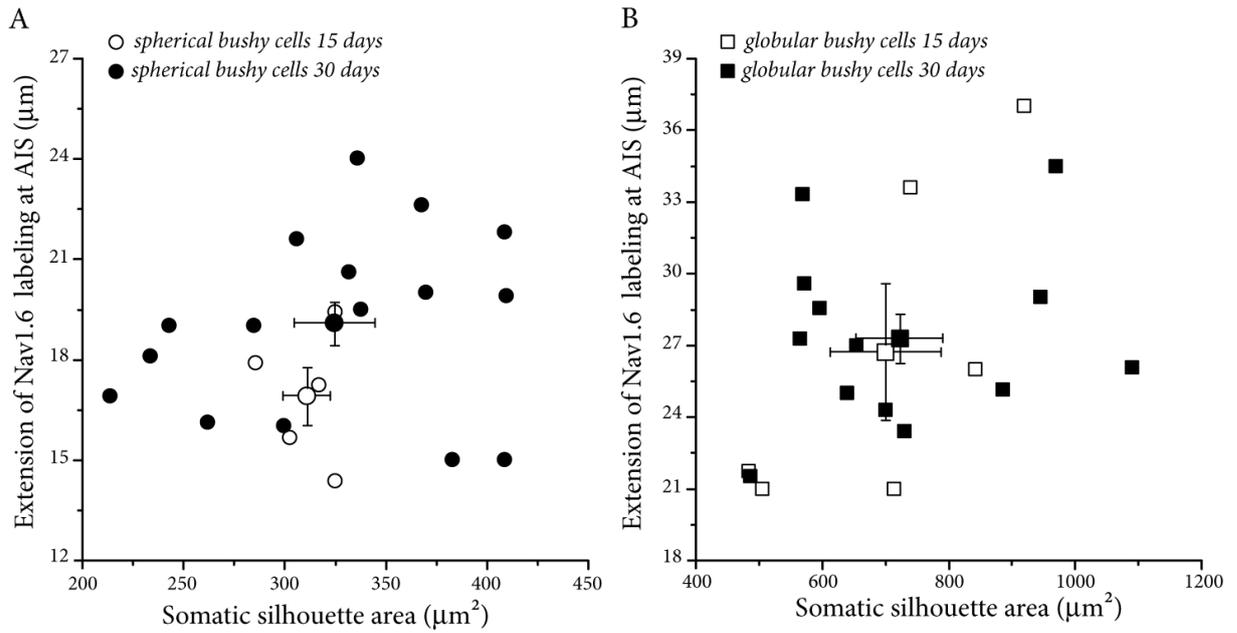


FIG. 26- Relação entre a extensão da marcação do canal Nav1.6 no AIS e área somática de neurônios do AVCN e da raiz nervosa. (A) Relação da marcação anti-Nav1.6 no AIS e área do soma dos neurônios esféricos em arbusto do AVCN de ratos de 15 e 30 dias. A média da extensão da marcação do canal no AIS e a média da área somática nas células esféricas em arbusto foi de $17 \pm 0,8 \mu\text{m}$ e $311,2 \pm 7,5 \mu\text{m}^2$ para ratos de 15 dias ($n=5$); e $19 \pm 0,6 \mu\text{m}$ e $325 \pm 15,2 \mu\text{m}^2$ para ratos de 30 dias ($n=17$). (B) Relação da marcação anti-Nav1.6 no AIS e área do soma dos neurônios globulares em arbusto da raiz nervosa de ratos de 15 e 30 dias. A extensão média da marcação do canal no AIS e área somática nas células globulares em arbusto foi de $26,7 \pm 2,8 \mu\text{m}$ e $700,8 \pm 72 \mu\text{m}^2$ para ratos de 15 dias ($n=6$); e $27,3 \pm 1 \mu\text{m}$ e $723,4 \pm 52,3 \mu\text{m}^2$ para ratos de 30 dias ($n=13$).

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, analisou-se a expressão do canal para sódio Nav1.6 em neurônios esféricos e globulares em arbusto da região ventral do núcleo coclear do sistema auditivo. Buscou-se determinar, através de reações de imunofluorescência, a localização celular desse subtipo de canal para sódio e sua expressão durante o desenvolvimento pós-natal em ratos de 8, 15 e 30 dias. A expressão do canal Nav1.6 foi avaliada pelo uso de dois anticorpos distintos sendo um deles doado (Dr. Rock Levinson, University of Colorado, EUA) e outro disponível comercialmente (Alomone Labs, Israel). Esses anticorpos foram utilizados previamente para evidenciar o canal Nav1.6 em diferentes preparações. Como exemplo, o anti-Nav1.6 (Dr. Rock) foi usado para demonstrar a presença do canal Nav1.6 no bulbo olfatório, retina, gânglio da raiz dorsal, cerebelo, núcleo supraóptico, hipocampo, junção neuromuscular e em nodos de Ranvier do nervo ciático (Krzemien et al., 2000). Neste trabalho os autores fizeram experimentos iniciais (não demonstrados) que sugerem a presença do Nav1.6 no núcleo coclear de ratos. Artigos um pouco mais recentes, usando esse anticorpo, aprofundaram o estudo do canal Nav1.6 nas células ganglionares da retina (Boiko et al., 2003; Van Wart, Trimmer e Matthews, 2007), no núcleo medial do corpo trapezoidal (Leão et al., 2005) e em neurônios do gânglio espiral do sistema auditivo (Hossain et al., 2005). O anti-Nav1.6 (Alomone) foi utilizado para estudar a contribuição do canal Nav1.6 na geração do potencial de ação em neurônios corticais piramidais (Royeck et al., 2008; Hu et al., 2009), em células granulares do cerebelo (Osorio et al., 2005; Osorio et al., 2010), em nodos de Ranvier do nervo ótico (Jenkins e Bennett, 2002) e em axônios da coluna dorsal da medula (Black, Waxman, Smith, 2006).

Em nossos resultados, os dois anticorpos anti-Nav1.6 apresentaram o mesmo padrão de marcação. Essa marcação foi intensa no segmento inicial do axônio (AIS), tanto em células esféricas em arbusto de 30 dias (FIG. 8, 9, 18B e 20), 15 dias (FIG. 12 e 22), quanto em células globulares em arbusto de 30 dias (FIG. 10, 11 e 21) e 15 dias (FIG. 13, 18E e 23). O canal Nav1.6 também foi detectado no AIS de neurônios do núcleo em ratos de oito dias, exibindo o mesmo padrão de marcação (FIG. 19 e 24). A marcação de ambos os anticorpos também revelou ser semelhante nas células de Purkinje do cerebelo, logo, a marcação dessas células foi utilizada como controle positivo interno das reações de imunofluorescência para o núcleo coclear, considerando o conhecimento prévio do padrão de expressão e localização do canal Nav1.6 nessas células (Jenkins, Bennett, 2001). Os resultados semelhantes obtidos com dois anticorpos contra a mesma proteína, mas que reconhecem epítomos distintos sugerem que

a fixação do tecido não compromete o acesso dos anticorpos aos seus respectivos epítomos. Nesse sentido, para o anticorpo anti-Nav1.6 (Dr. Rock) a fixação do tecido com PFA 4% produz a marcação apresentada. Entretanto, para o anti-Nav1.6 (Alomone) a fixação com PFA 4% impede a imunomarcação, de modo que, tornou-se necessário a fixação com PLP (Periodato-lisina-paraformaldeído) a 1% para obtenção de um mesmo padrão de marcação que o do anticorpo do Dr. Rock. O método de fixação de tecido com PLP foi descrito por Mclean e Nakane (1974) como um fixador que estabiliza estruturas de carboidratos em proteínas preservando a antigenicidade. Os canais para sódio são proteínas conhecidas por apresentarem sítios de glicosilação (Marban, Yamagishi, Tomaselli, 1998).

A marcação do anticorpo anti-Nav1.6 (Alomone), mais utilizada nos experimentos, foi abolida pela pré-incubação com o peptídeo antigênico fornecido pelo fabricante (FIG. 17). Tal resultado indica que o anticorpo reconhece um epítopo específico que está presente nos canais para sódio Nav1.6 dos neurônios do núcleo coclear. A omissão desse anticorpo ou do anti-Nav1.6 (Dr. Rock) durante a etapa de incubação também resultou na ausência de marcação (dados não apresentados), sugerindo que a marcação é devida à ligação do anticorpo primário ao canal e não por ligação inespecífica do anticorpo secundário fluorescente. Idealmente, a especificidade dos anticorpos poderia ser adicionalmente comprovada por experimentos de *western-blot* utilizando um homogeneizado do núcleo coclear. Porém, tanto para o anticorpo do Dr. Rock (Krzemien et al., 2000) quanto para o da Alomone Labs/Israel (www.alomone.com/system/uploadfiles/dgalleries/docs/asc-009.pdf), tais experimentos já foram feitos, e ambos os anticorpos reconhecem uma banda única de aproximadamente 250 kDa de membrana neuronal purificada.

O AIS é uma estrutura localizada na parte proximal do axônio, entre o cone de implantação (*axon hillock*) e a bainha de mielina (Palay et al., 1968), esta é uma definição geral que não se aplica a axônios não mielinizados (Clark et al., 2009). É uma região única do neurônio em apresentar microtúbulos arranjos em fascículos. Esses microtúbulos se originam do cone de implantação e se afinam para formar AISs calibrosos, que podem apresentar de cinco a seis fascículos, ou AISs finos com apenas um fascículo de microtúbulos. Essa organização é similar em neurônios mielinizados e amielinizados. O AIS, observado por microscopia eletrônica, apresenta ainda uma densa camada granular abaixo da membrana plasmática (Palay et al., 1968). Esses autores sugeriram que tal camada granular, observada também em nodos de Ranvier, seria uma especialização estrutural da superfície, composta por proteínas envolvidas com a geração de atividade elétrica.

A organização de proteínas no AIS parece depender especificamente do citoesqueleto axonal e de proteínas de ancoragem (scaffold proteins) como a anquirina-G (AnkG) e espectrina β IV (Hedstrom et al., 2007; Ogawa e Rasband, 2008). Essas proteínas do citoesqueleto no AIS formam uma barreira para a difusão de outras proteínas entre os compartimentos do neurônio como soma e axônio distal e são importantes para o direcionamento e manutenção dessas proteínas como canais iônicos dependentes de voltagem no AIS (Susuki e Rasband, 2008). Jenkins e Bennett (2001) relataram que essas proteínas, principalmente a AnkG e a espectrina β IV, se mostram presentes durante a formação do AIS em neurônios de Purkinje, antes mesmo das moléculas de adesão celular (CAMs) como a neurofascina-186 (NF-186) e a molécula de adesão neuronal (NrCAM), e também do canal para sódio dependente de voltagem Nav1.6. Em animais que não expressam a anquirina-G, as outras proteínas como a espectrina β IV e Nav1.6 não se aglomeram no AIS de células de Purkinje adultas, e assim, os autores sugeriram que a AnkG coordena a formação do AIS.

Outros autores também apontam a AnkG como a principal responsável pela ancoragem e manutenção dos canais para sódio nos subdomínios do axônio. Como exemplo, Zhou et al. (1998) mostraram uma redução drástica de canais para sódio no AIS de células granulares do cerebelo, em camundongos nocautes para o gene da AnkG, e também a redistribuição no compartimento axonal da NF-186, molécula de adesão celular restrita ao AIS nos camundongos selvagens; Pan et al. (2006) demonstraram que a concentração de canais para sódio no AIS das células de Purkinje do cerebelo é completamente abolida em camundongos nocautes para o gene da AnkG; Hedstrom et al. (2007) utilizaram neurônios hipocámpais em cultura, transfectados com RNA de interferência, para mostrar que a AnkG é essencial não só para a expressão e ancoragem dos canais para sódio no AIS, mas também para a interação e manutenção de seus componentes estruturais como a espectrina β IV, e as moléculas de adesão celular NF-186 e NrCAM.

Garrido et al. (2003) demonstraram que o canal Nav1.2 possui uma sequência de 27 aminoácidos (1102-1128) numa alça intracelular conectando os domínios II e III que exibe alta afinidade pela AnkG e que a super-expressão dessa sequência em neurônios hipocámpais restringe a concentração do canal para sódio endógeno no AIS. Essa sequência de aminoácidos está presente também no canal Nav1.6 (Caldwell et al., 2000). Bréchet et al. (2008) mostraram que a afinidade da AnkG pelo canal para sódio Nav1.2, que é determinante para sua concentração no AIS, é dependente dos resíduos de glutamato (E1111) e de serina nas posições 1112, 1124 e 1126. A fosforilação desses resíduos pela proteína quinase CK2 regula a afinidade de interação entre o canal para sódio e a anquirina-G. Interessantemente, os

autores demonstraram que a CK2 é encontrada em níveis elevados no AIS e nodos de Ranvier in vivo. Brachet et al. (2010) mostraram que em axônios de neurônios hipocampais em desenvolvimento a imobilização do canal para sódio no AIS pela AnkG precede a formação completa do AIS e sua função como barreira de difusão que possibilita a segregação de proteínas e lipídios distintos nos compartimentos somatodendrítico e axonal. Lowe et al. (2008) mostraram através de silenciamento genético, que a redução da expressão da AnkG em miócitos cardíacos provocou também a redução da expressão do canal Nav1.5 e conseqüente redução da corrente de sódio, evidenciando a importância da AnkG na despolarização cardíaca.

Nossos resultados com dupla marcação, anti-Nav1.6 e anti-AnkG, mostraram vários segmentos intensamente marcados pelo anticorpo anti-Nav1.6 que colocalizaram com a marcação anti-AnkG, por isso propomos que tais segmentos correspondam aos AISs das células esféricas e globulares em arbusto do núcleo coclear do sistema auditivo. Vários estudos, em diferentes preparações, mostram a co-localização de canais para sódio dependentes de voltagem com a AnkG no segmento inicial do axônio (Boiko et al., 2003; Van Wart, Trimmer, Matthews, 2007; Lorincz, Nusser, 2008; Roeyck et al., 2008; Hu et al., 2009; Osorio et al., 2010; Kuba, Oichi, Ohmori, 2010). Nas células esféricas em arbusto de ratos de 30 e 15 dias, esse segmento inicial do axônio mediu 21,6 e 20,3 μm , respectivamente. Nas células globulares em arbusto a extensão do AIS nos ratos de 30 e 15 dias foi de 26,2 e 30 μm . Esses resultados indicam que essa estrutura pode estar completamente desenvolvida já em ratos de 15 dias. Experimentos em ratos de oito dias indicam uma co-localização do canal Nav1.6 e da AnkG no AIS nessa idade do desenvolvimento pós-natal, e embora o número de experimentos com animais dessa idade seja menor, os resultados sugerem que o canal também já está presente no AIS no oitavo dia de desenvolvimento pós-natal numa extensão semelhante (FIG. 19). A análise do comprimento do segmento inicial do axônio nas células globulares e esféricas em ratos de 30 e 15 revelou que as células globulares apresentam AISs significativamente maiores ($p=0,00048$) com 15 dias de desenvolvimento e ($p=0,009$) para 30 dias de desenvolvimento.

Como a análise da intensidade de fluorescência anti-Nav1.6 ao longo do AIS revelou, esse canal está presente numa densidade maior em segmentos mais distais do AIS tanto em células globulares (FIG. 10 e 11) como nas células esféricas (FIG. 20). Na parte inicial do AIS, logo após o cone de implantação, foi observado uma região de baixa expressão do canal Nav1.6, o que gerou uma dificuldade de relacioná-los com um corpo celular específico. A expressão de MAP-2 segue um padrão inverso no AIS, ou seja, decresce rapidamente com a

distância a partir do soma. Entretanto, em vários neurônios um sinal de fluorescência considerável para MAP-2 permanece na parte inicial do axônio (FIG. 10, 11 e 13) o que possibilitou uma identificação direta da célula da qual o AIS se origina. De modo semelhante, uma região de baixa expressão do canal Nav1.6 entre o soma e o AIS também foi observada em neurônios ganglionares da retina (Boiko et al., 2003; Van Wart, Trimmer, Matthews, 2007). Dessa forma, os nossos resultados e os descritos nas células ganglionares da retina sugerem que cone de implantação não é o local de maior expressão de canais para sódio, e nem o sítio gerador do potencial de ação, visto que a maior densidade dos canais para sódio Nav1.6, é observada em partes distais do segmento inicial do axônio. Resultados semelhantes foram descritos em neurônios do núcleo *laminaris* de pássaros (Kuba, Ishii, Ohmori, 2006), em neurônios piramidais da camada cortical 5 (Kole et al., 2008, Hu et al., 2009), e em neurônios da camada 2/3 do neocórtex (Lorincz, Nusser, 2008).

A presença de outros subtipos de canais para sódio ao longo do AIS foi avaliada nas células ganglionares da retina (Boiko et al., 2003). Nessas células, o Nav1.2 é encontrado ao longo de todo o AIS, bem como ao longo do axônio amielinizado (o axônio de projeção dessas células e que forma o nervo óptico só se torna mielizado depois da saída da retina) indicando a coexistência desses canais no AIS. Van Wart, Trimmer e Matthews (2007) mostraram que o Nav1.1 pode ser também encontrado na parte proximal do AIS dessas células e decai ao longo do AIS de um modo oposto à expressão de Nav1.6. Nas células piramidais da camada 5 do córtex o Nav1.2 é encontrado na parte inicial do AIS e sua expressão decai com a distância enquanto a expressão do Nav1.6 aumenta com a distância ao longo do AIS (Hu et al., 2009). Nas células globulares do núcleo coclear é possível que o canal Nav1.2 esteja também presente no AIS. Nesse sentido, foram feitos experimentos utilizando um anticorpo monoclonal anti-Nav1.2 (*Neuromab*) mas, os resultados não foram satisfatórios. Experimentos utilizando um anticorpo que reconhece todas as isoformas que formam canais para sódio (anti-Pan) poderiam também auxiliar nessa questão. Um desses anticorpos foi adquirido, mas a marcação foi muito fraca e difícil de ser analisada.

Kole et al. (2008) evidenciaram a necessidade de uma alta densidade de canais para sódio no AIS para a geração de potenciais de ação em neurônios piramidais da camada cortical 5. Foi observada a imunomarcação para o anticorpo Pan-Nav mais intensa a partir de 10 μm de distância do cone de implantação neuronal, que não foi observada no soma nem em dendritos proximais. Registros da corrente de sódio foram realizados no soma e no AIS e os picos de corrente medidos foram similares. Os autores também mediram o sódio interno durante potenciais de ação usando um corante sódio-sensível (SBFI, 1 mM) e também

encontraram um aumento de fluorescência maior no AIS em relação ao soma. Os autores refizeram os experimentos eletrofisiológicos após a aplicação de um agente que despolimeriza filamentos de actina (e.g. citocalasina B) e encontraram uma maior densidade de canais para sódio no AIS. Discutem os autores que os canais para sódio no AIS estão presos ao citoesqueleto e indisponíveis para sua medida usando experimentos de *cell-attached*. Após esse resultado, os autores concluíram que os canais para sódio estão de fato concentrados em partes distais do AIS e permitem a geração de potenciais de ação nesses neurônios.

Royeck et al. (2008) descreveram que o baixo limiar para geração de potenciais de ação, característico do AIS de diversos tipos neuronais, é determinado pela alta concentração e localização específica de canais para sódio dependentes de voltagem. Através de experimentos de imunomarcção e registros eletrofisiológicos, em neurônios piramidais CA1 do hipocampo de camundongos selvagens e nocautes para o canal Nav1.6, eles demonstraram a importância da concentração específica desse canal para sódio para o baixo limiar de ativação elétrica no AIS, e para a regulação do padrão de disparos repetitivos, atribuindo três fatores essenciais para que o AIS atue como zona de gatilho para o disparo neuronal. O primeiro é sua pequena capacitância, quando comparada à maior capacitância somática. O segundo fator é a alta concentração de canais para sódio dependentes de voltagem, e o terceiro as propriedades biofísicas de ativação em potenciais mais negativos, o qual está estritamente relacionado à alta expressão do canal Nav1.6. Segundo os autores, a importância agregada ao canal Nav1.6 deve-se não apenas à sua ativação por voltagens mais negativas quando comparado às demais isoformas de canais para sódio, mas também por sua capacidade em gerar correntes de sódio do tipo persistente e ressurgente. A dependência de voltagem da ativação deslocada para valores negativos do canal Nav1.6 também foi demonstrada por Rush, Dib-hajj e Waxman (2005) como sendo de -36 mV ($V_{0,5}$). Além do que, segundo esses autores, o canal Nav1.6 é mais resistente à inativação cumulativa que o canal Nav1.2. Colbert e Pan (2002) demonstraram que em neurônios piramidais da camada 5 do neocórtex a dependência de voltagem da ativação decresce com a distância a partir do soma. Desse modo, não somente a densidade de canais para sódio, mas também a dependência de voltagem da ativação dos mesmos determina o sítio gerador do potencial de ação.

Osorio et al. (2010) observaram a ontogênese dos canais Nav1.6 e Nav1.2 em camundongos, através do estudo morfológico por imunomarcção e do registro eletrofisiológico das correntes de sódio formadas por elas. Os autores indicaram que a expressão do canal Nav1.6, no AIS de células granulares do cerebelo, apresenta-se completa somente na fase adulta, e que não foi observada antes de P14, iniciando uma maior incidência

a partir de P21. Já nas células cerebelares de Purkinje, este canal foi observado a partir do décimo dia pós-natal. O canal Nav1.2 aparece precocemente no AIS dos neurônios granulares do cerebelo, sendo observado a partir dos primeiros estágios de maturação até a idade adulta, não desaparecendo com o aumento do canal Nav1.6 nesta fase. Na idade adulta (P60), a colocalização dos canais Nav1.6 e Nav1.2 com o anticorpo marcador de AIS (anti-AnkG) foi de 90% nas células granulares do cerebelo. Os autores concluíram, através de registros eletrofisiológicos em fatias, e do uso de camundongos nocautes para o canal Nav1.6, que a presença do canal Nav1.2 no AIS dessas células é capaz de gerar níveis normais de corrente ressurgente de sódio, e ainda sustentar altas frequências de disparo de potenciais de ação. No entanto, indicaram a importância do canal Nav1.6 para a formação da corrente persistente de sódio, e para garantir a precisão temporal para o disparo repetitivo desses neurônios do cerebelo. Osorio et al. (2005) haviam demonstrado anteriormente, em cultura de neurônios granulares do cerebelo de ratos, que o canal Nav1.2 está presente no AIS no oitavo dia *in vitro* (DIV8), assim como o canal Nav1.6 está presente no soma, dendritos, axônios e ocasionalmente em AISs em DIV8, sendo expresso no AIS de forma mais evidente a partir de DIV13.

Já no sistema auditivo, nos neurônios principais do núcleo medial do corpo trapezoidal (MNTB), o canal Nav1.6 é expressa em camundongos em P7, mas não em camundongos em P14. Nos camundongos (P14), o canal Nav1.1 é expressa nesses neurônios enquanto Nav1.2 não foi detectada (Leão et al., 2006). Segundo esses autores, o canal Nav1.6 é expressa apenas em camundongos P14 surdos. Esses dados contrastam parcialmente com nossos resultados em neurônios do núcleo coclear visto que o Nav1.6 é encontrado em neurônios P8, à semelhança do MNTB. Com o desenvolvimento, os neurônios do núcleo mantêm a expressão de canais Nav1.6, especialmente no AIS como demonstrado, enquanto os neurônios do MNTB deixam de expressá-los.

A expressão dos canais para sódio Nav1.6 foi também avaliada no terminal cálice de Held do núcleo medial do corpo trapezoidal (MNTB), que é derivado da projeção das células globulares em arbusto da raiz nervosa do VCN (Leão et al. 2005). Estes autores observaram que a expressão do canal Nav1.6 aumenta consideravelmente com o desenvolvimento dos ratos (entre P6 e P13); o canal Nav1.2 não foi detectada (em P6 ou P13). Relataram ainda, que correntes de Na⁺ registradas em sinapses cálice de Held imaturas (P6-P7) inativam mais lentamente que as de sinapses maduras (P10-P12), o que contribuiria para um potencial de ação mais curto nas sinapses maduras. Esses autores discutem que o canal Nav1.6 possibilita

frequências mais altas de disparos de potenciais de ação. Dessa forma, esse último trabalho apresenta resultados semelhantes aos obtidos em nossos experimentos.

No núcleo coclear, existe a possibilidade que as estruturas longas e marcadas pelo Nav1.6 que documentamos fossem heminodos terminais das fibras auditivas primárias que fazem sinapse com os neurônios analisados. Os resultados da dupla marcação com MAP-2 e Nav1.6 sugerem uma continuidade do cone de implantação (anti-MAP-2 positiva) e a estrutura marcada pelo Nav1.6, como pode ser observado nas figuras 8, 11, 12 e 14. Esse dado sugere que a estrutura marcada seja o AIS. Nos experimentos utilizando o marcador de terminal sináptico SV2, não encontramos qualquer indício que a estrutura marcada pelo Nav1.6 pudesse estar em continuidade com o terminal sináptico (FIG. 20-23), o que deveria ser observado caso se tratasse do heminodo terminal. Por fim, experimentos de dupla marcação utilizando anticorpos anti-AnkG e anti-Nav1.6 (FIG. 18 e 19) foram importantes para a conclusão de que as estruturas intensamente marcadas pelo anticorpo Nav1.6 são de fato AISs, considerando que a AnkG é conhecida como um marcador desse domínio axonal (Jenkins, Bennett, 2001; Boiko et al., 2003; Brechét et al., 2008).

Observamos também em nossos resultados, uma intensa marcação para Nav1.6 nos nodos de Ranvier, não apenas no AVCN de ratos de 30 dias (FIG. 6-9, 18B, 20) e de 15 dias (FIG.12), mas também na raiz nervosa do núcleo de ratos de 30 dias (FIG. 10 e 11) e de 15 dias (FIG. 13, 18E e 23). Esses canais para sódio Nav1.6 estão envolvidos com a condução saltatória do potencial de ação, como já demonstrado em fibras mielinizadas do SNC (Black, Waxman, Smith, 2006; Lorincz, Nusser, 2008) e SNP (Caldwell et al., 2000, Krzemien et al., 2000). Em quase todos os artigos, à semelhança de nossos resultados, observa-se certa marcação somática (citosólica mas não nuclear) para Nav1.6. Acreditamos que se trata de canais recém-sintetizados e que estão a caminho de serem transportados para o AIS e nodos de Ranvier axonais.

7 CONCLUSÃO

Através dos nossos resultados, baseados em experimentos de dupla marcação, foi possível concluir que o canal para sódio Nav1.6 é expresso nos neurônios em arbusto do núcleo coclear do sistema auditivo já no oitavo dia pós-natal, e que sua expressão acompanha o desenvolvimento neuronal permanecendo após a sua maturação. A expressão do canal Nav1.6 apresentou-se intensa nos segmentos iniciais do axônio (AISs) das células em arbusto, e sua densidade de marcação aumenta com a distância a partir do soma, apresentando um pico de fluorescência na região distal do AIS. A alta concentração desse canal para sódio no AIS é um indício de que o Nav1.6 seja o responsável pela geração do potencial de ação nesses neurônios. A anquirina-G, uma proteína de ligação citoesqueleto-membrana, está envolvida com a ancoragem do canal Nav1.6 no AIS das células em arbusto. Não foi observada a expressão do canal em terminais sinápticos do AVCN ou na raiz nervosa. Nodos de Ranvier intensamente marcados pelo Nav1.6 foram observados na raiz nervosa do núcleo coclear e também ao longo do AVCN, sugerindo que esse canal participa também na condução do potencial de ação em fibras nervosas da parte inferior do sistema auditivo. Experimentos adicionais poderão revelar se esse canal desempenha essas funções isoladamente, como sua alta densidade sugere, ou em associação com outros canais para sódio.

REFERÊNCIAS

- Afshari FS, Ptak K, Khaliq ZM, Grieco TM, Slater NT, McCrimm DR, Raman IM. Resurgent Na⁺ currents in four classes of neurons of the cerebellum. *J Neurophysiol* 2004, 92: 2831-43.
- Banks MI, Smith PH. Intracellular recordings from neurobiotin-labeled cells in brain slices of the rat medial nucleus of the trapezoid body. *J Neurosci* 1992, 12: 2819-37.
- Black JA, Waxman SG, Smith KJ. Remyelination of dorsal column axons by endogenous Schwann cells restores the normal pattern of Nav1.6 and Nav1.2 at nodes of Ranvier. *Brain* 2006, 129: 1319-29.
- Boiko T, Van Wart A, Caldwell JH, Levinson SR, Trimmer JS, Matthews G. Functional specialization of the axon initial segment by isoform-specific sodium channel targeting. *J Neurosci* 2003, 23(6): 2306-13.
- Borst JG, Helmchen F, Sakmann B. Pre- and postsynaptic whole-cell recordings in the medial nucleus of the trapezoid body of rat. *J Physiol* 1995, 489: 825-40.
- Brachet A, Leterrier C, Irondelle M, Fache M-P, Racine V, Sibarita J-B, Choquet D, Dargent B. Ankyrin G restricts ion channel diffusion at the axonal initial segment before the establishment of the diffusion barrier. *J Cell Biol* 2010, 191 (2):383-95.
- Bréchet A, Fache MP, Bhasin N, Brachet A, Ferracci G, Baude A, Irondelle M, Pereira S, Leterrier C, Dargent B. Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G. *J Cell Biol* 2008, 183 (6): 1101-14.
- Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. Sodium channel Nav1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97 (10): 5616-20.
- Cant NB., Benson CG. Parallel auditory pathways: projection patterns of different neuronal populations in the dorsal and ventral cochlear nuclei. *Brain Research Bulletin* 2003, 60: 457-4.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG, Icrest M. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacology Reviews* 2005, 57: 397-409.
- Celesia GG. Clinical Disorders of membrane channels or channelopathies. *Neurophysiol* 2001, 112: 2-18.
- Clark BD, Goldberg EM, Rudy B. Eletrogenic tuning of the axon initial segment. *Neuroscientist* 2009, 15 (6): 651-68.
- Colbert CM, Pan E. Ion channels properties underlying axonal action potential initiation in pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2002, 5(6):533-8.
- Cummins TR, Dib-Hajj SD, Herzog RI, Waxman SG. Nav1.6 channels generate resurgent sodium currents in spinal sensory neurons. *FEBS Letters* 2005, 579: 2166-70.

Do MTH, Bean BP. Sodium currents in subthalamic nucleus neurons from Nav1.6-null mice. *J Neurophysiol* 2004, 92: 726-33.

Félix, R. Channelopathies: ion channel defects linked to heritable clinical disorders. *J Med Genet* 2000, 37:729-40.

Forsythe ID. Direct patch recording from identified presynaptic terminals mediating glutamatergic EPSCs in the rat CNS, in vitro. *J Physiol* 1994, 479: 381-7.

Garrido JJ, Fernandes F, Moussif A, Fache MP, Giraud P, Dargent B. Dynamic compartmentalization of the voltage-gated sodium channels in axons. *J Biol Cell* 2003, 45:437-45.

Gende OA. Transportadores de Membrana. In Cingolani HE, Houssay AB. *Fisiologia Humana de Houssay*, 7a ed. Artmed, São Paulo, 2004, cap 2, pp. 40-48.

Goldin AL. Mechanisms of sodium channel inactivation. *Current Opinion in Neurobiology* 2003, 13: 284-90.

Golding NL, Robertson D, Oertel, D. Recordings from slices indicate that octopus cells of the cochlear nucleus detect coincident firing of auditory nerve fibers with temporal precision. *J Neurosci* 1995, 15: 3138-53.

Hackney CM, Osen KK, Kolston J. Anatomy of the cochlear nuclear complex of guinea-pig. *Anat. Embryol* 1990, 182: 123-49.

Hedstrom KL, Xu X, Ogawa Y, Frischknecht R, Seidenbecher CI, Shrager P, Rasband MN. Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *J Cell Biol* 2007, 178(5): 875–886.

Hossain WA, Antic SD, Yang Y, Rasband MN, Morest DK. Where is the spike generator of the cochlear nerve? Voltage-gated sodium channels in the mouse cochlea. *J Neurosci* 2005, 25 (29): 6857-68.

Hu W, Tian C, Li T, Yang M, Hou H, Shu Y. Distinct contribution of Nav1.6 and Nav1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci* 2009, 12 (8): 996-1002.

Hübner CA, Jentsch TJ. Ion channel diseases. *Human Molecular Genetics* 2002, 11(20): 2435–45.

Jenkins SM, Bennett V. Developing nodes of Ranvier are defined by ankyrin-G clustering and are independent of paranodal axoglial adhesion. *PNAS* 2002, 99(4): 2303-8.

Jenkins SM, Bennett V. Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *J Cell Biol* 2001, 155: 739-46.

Kole MHP, Ilschner SU, Kampa BM, Williams SR, Ruben PC, Stuart GJ. Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nature Neuroscience* 2008, 11(2): 178-86.

- Krzemien DM, Schaller KL, Levinson SR, Caldwell JH. Immunolocalization of sodium channels isoform NaCh6 in the nervous system. *J Comp Neurol* 2000, 420:70-83.
- Kuba H, Ishii TM, Ohmori H. Axonal site of spike initiation enhances auditory coincidence detection. *Nature* 2006, 444: 1069-72.
- Kuba H, Oichi Y, Ohmori H. Presynaptic activity regulates Na⁺ channel distribution at the initial segment. *Nature* 2010, 465: 1075-8.
- Kuwabara N, DiCaprio RA, Zook JM. Afferents to the medial nucleus of the trapezoid body and their collateral projections. *J Comp Neurol* 1991, 314: 707-20.
- Lai HC, Jan LY. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nature Reviews Neuroscience* 2006, 7: 548-62.
- Leão RM, Kushmerick C, Pinaud R, Renden R, Li GL, Taschenberger H, Spirou G, Levinson SR, Von Gersdorff H. Presynaptic Na⁺ channels: locus, development, and recovery from inactivation at a high-fidelity synapse. *J Neurosci* 2005, 25: 3724-38.
- Leão RN, Naves MM, Leão KE, Walmsley B. Altered sodium currents in auditory neurons of congenitally deaf mice. *Eur J Neurosci* 2006, 24: 1137-46.
- Lee A, Goldin AL. Role of the terminal domains in sodium channel localization. *Channels* 2009, 3(3): 171-80.
- Lorincz A, Nusser Z. Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci* 2008, 28 (53): 14329-40.
- Lowe JS, Palygin O, Bhasin N, Hund, TJ, Boyden PA, Shibata E, Anderson ME, Mohler PJ. Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-G-dependent cellular pathway. *J Cell Biol.* 2008, 180(1): 173-88.
- McLean IW, Nakane PK. Periodate-Lysine-Paraformaldehyde fixative a new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochemistry and Cytochemistry.* 1974, 22 (12): 1077-83.
- Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol* 1998, 508 (3): 647-57.
- Matsutomi T, Nakamoto C, Zheng T, Kakimuta J, Ogata N. Multiple types of Na⁺ currents mediate action potential electrogenesis in small neurons of mouse dorsal root ganglia. *Eur J Physiol* 2006, 453: 83-96.
- Nobili R, Mammano F, Ashmore J. How well do we understand the cochlea? *TINS* 1998, 21: 159-67.
- Oertel, D. Synaptic responses and electrical properties of cells in brain slices of the mouse anteroventral cochlear nucleus. *J Neurosci* 1983, 3: 2043-53.
- Oertel D, Wu SH, Garb MW, Dizack C. Morphology and physiology of cells in slice preparations of the posteroventral cochlear nucleus of mice. *J Comp Neurol* 1990, 295: 136-54.

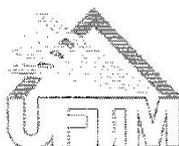
- Ogawa Y, Rasband MN. The functional organization and assembly of the axon initial segment. *Current Opinion in Neurobiology* 2008, 18: 307-13.
- Osen KK. Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in cat. *J Comp Neurol* 1969, 136: 453-84.
- Osorio N, Alcaraz G, Padilla F, Couraud F, Delmas P, Crest M. Differential targeting and functional specialization of sodium channels in cultured cerebellar granule cells. *J Physiol* 2005, 569 (3): 801-816.
- Osorio N, Cathala L, Meisler MH, Magistretti J, Delmas P. Persistent Nav1.6 current at axon initial segments tunes spike timing of cerebellar granule cells. *J Physiol* 2010, 588(4): 651-69.
- Ostapoff EM, Morest DK. Synaptic organization of globular bushy cells in the ventral cochlear nucleus of the cat: a quantitative study. *J Comp Neurol* 1991, 314: 598-613.
- Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM. The axon hillock and the initial segment. *J Cell Biol* 1968, 38:193-200.
- Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul J-Y, Cranstoun SD, Bennett V, Scherer SS, Cooper EC. A Common Ankyrin-G-Based Mechanism Retains KCNQ and NaV Channels at Electrically Active Domains of the Axon. *J Neurosci* 2006, 26(10):2599-613.
- Raman IM, Bean BP. Inactivation and recovery of sodium currents in cerebellar Purkinje neurons: evidence for two mechanisms. *Biophys J* 2001, 80: 729-37.
- Royeck M, Horstmann MT, Remy S, Reitze M, Yaari Y, Beck H. Role of axonal Nav1.6 sodium channels in action potential initiation of CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology* 2008, 100: 2361-80.
- Rouiller EM, Cronin-Schreiber R, Fekete DM, Ryugo DK. The central projections of intracellularly labeled auditory nerve fibers in cats: an analysis of terminal morphology. *J Comp Neurol* 1986, 249: 261-78.
- Rush AM, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Electrophysiological properties of two axonal sodium channels, Nav 1.2 and Nav 1.6, expressed in mouse spinal sensory neurons. *J Physiol* 2005, 564: 803-15.
- Rush AM, Cummins TR, Waxman SG. Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 2007, 579 (1): 01-14.
- Ryugo DK, Wu MM, Pongstaporn T. Activity-related features of synapse morphology: a study of Endbulbs of Held. *J. Comp Neurol* 1996, 365: 141-58.
- Sento S, Ryugo DK. Endbulbs of Held and spherical bushy cells in cats: morphological correlates with physiological properties. *J Comp Neurol* 1989, 280: 553-62.
- Siegelbaum SA, Koester J. Ion Channels In: KANDEL, ER, Schwartz, JH, Jessel TM. *Principles of Neural Science*, 4a ed, MacGraw Hill, cap 6, pp.105-124, 2000.
- Smith PH, Joris PX, Carney LH, Yin TCT. Projections of physiologically characterized globular bushy cell axons from the cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 1991, 304: 387-407.

- Smith PH, Joris PX & Yin TCT. Projections of physiologically characterized spherical bushy cell axons from the cochlear nucleus of the cat: evidence for delay lines to the medial superior olive. *J Comp Neurol* 1993, 331: 245-60.
- Smith PH, Rhode WS. Characterization of HRP-labeled globular bushy cell in the cat anteroventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 1987, 266: 360-75.
- Smith PH, Rhode WS. Structural and functional properties distinguish two types of multipolar cells in the ventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 1989, 282: 595-616.
- Smith PH, Spirou GA. From cochlea to the cortex and back. In: *Integrative functions in the mammalian auditory pathway*. 1 ed., Springer-Verlag Inc, New York, cap. 2, p. 6-71, 2002.
- Susuki K, Rasband MN. Spectrin and Ankyrin-Based Cytoskeletons at Polarized Domains in Myelinated Axons. *Exp Biol Med* 2008, 233(4): 394-400.
- Trussell LO. Cellular mechanisms for information coding in auditory brainstem nuclei. In: *Integrative functions in the mammalian auditory pathway*. 1 ed., Springer-Verlag Inc, New York, cap. 3, p. 72-98, 2002.
- Van Wart A, Trimmer JS, Matthews G. Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol* 2007, 500: 339-52.
- Venosa RA. Transporte iônico e excitabilidade. In Cingolani HE, Houssay AB. *Fisiologia Humana de Houssay*, 7a ed. Artmed: São Paulo, cap 3, pp. 49-77, 2004.
- Wang LY, Gan L, Forsythe ID, Kaczmarek LK. Contribution of Kv3.1 potassium channel to high-frequency firing in mouse auditory neurons. *J Physiol* 1998, 509: 183-94.
- Wickesberg RE, Whitlon D, Oertel D. Tuberculoventral neurons project to the multipolar cell area but not to the octopus cell area of the posteroventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 1991, 313: 457-68.
- Wu SH, Kelly JB. Physiological evidence for ipsilateral inhibition in the lateral superior olive: synaptic responses in mouse brain slice. *Hear Res* 1994, 73: 57-64.
- Wu SH, Oertel D. Inhibitory circuitry in the ventral cochlear nucleus is probably mediated by glycine. *J Neurosci* 1986, 6: 2691-706.
- Yin TCT. Neural mechanisms of encoding binaural localization cues in the auditory brainstem. In: *Integrative functions in the mammalian auditory pathway*. 1 ed., Springer-Verlag Inc, New York, cap. 3, p. 99-159, 2002.
- Young ED. Cochlear nucleus. In: *The synaptic organization of the brain*. 5 ed., Oxford University Press, New York, EUA, p. 121-157, 2004.
- Zhou W, Goldin AL. Use-dependent potentiation of $Na_v1.6$ sodium channel. *Biophys J* 2004, 87: 3862-72.
- Zhou D, Lambert S, Malen PL, Carpenter S, Boland LM, Bennett V. AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol* 1998, 143(5): 1295-304.

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS Nº61 PELO CEUA-UFTM

6/



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

Parecer Consubstanciado PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Estudo da excitabilidade e da expressão de canais para sódio dependentes de voltagem em neurônios do núcleo coclear do sistema auditivo.

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Aldo Rogélis Aquiles Rodrigues

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM: 20/07/2007

PROTOCOLO CEUA/UFTM: 61

do projeto.

11. ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS

Mencionado nos itens 7 e 8.

12. COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO

O protocolo está adequado a resolução FMTM 003/2004 e o projeto foi bem fundamentado e estruturado. A metodologia utilizada é adequada aos objetivos propostos.

O número de animais (60 ratos de idade entre 7-8 e 14-15 dias) foi considerado adequado.

As instalações e a manipulação dos animais realizada com tiopental sódico (40 mg/Kg) pela administração intraperitoneal e a eutanásia por decapitação foram consideradas adequadas.

PARECER DA CEUA: APROVADO

(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado pelo Pesquisador um ano após o início do processo).

DATA DA REUNIÃO: 17/09/2010

Prof. Guilherme Vannucchi Portari
Coordenador do CEUA

ANEXO B - REFERÊNCIAS DAS FIGURAS

FIG. 3 Cortes coronais de 40 μ m no criostato em 16/07/08, lâminas 1-4, animal de 30 dias. Coloração: 16/07/08. Documentação: 03/10, microscopia comum (Nikon Eclipse E 200). Tecido fixado em PFA 4% em PBS.

FIG.4 Cortes parassagitais de 30 μ m no criostato em 05/08/10, lâminas 1 e 3, animal de 30 dias. Coloração: 05/08/10. Documentação: 03/09/10, microscopia comum (Leica DM 6000). Tecido fixado em PFA 4% em PBS.

FIG. 5 Cortes coronais de 40 μ m no criostato em 16/07/08, lâmina 5A (A) e 5B (B), corte 2, animal 2 (30 dias). Experimento: 23/10/08. Documentação em 21/05/09, microscopia de fluorescência (Leica DM 6000). Tecido fixado em PFA 4% em PBS.

FIG. 6 Corte coronal de 40 μ m no criostato em 16/07/08, lâmina 5B, corte 2, animal 2 (30 dias). Experimento: 23/10/08. Documentação em 09/01/09, microscopia confocal (Leica SP5). Tecido fixado em PFA 4% em PBS.

FIG. 7 Corte coronal de 40 μ m no criostato em 16/07/08, lâmina 5B, corte 2, animal 2 (30 dias). Experimento: 23/10/08. Documentação em 09/01/09, microscopia confocal (Leica SP5) Tecido fixado em PFA 4% em PBS.

FIG. 8 Corte coronal de 40 μ m no criostato em 16/07/08, lâmina 5B, corte 2, animal 2 (30 dias). Experimento: 23/10/08. Documentação em 09/01/09, microscopia confocal (Leica SP5) Tecido fixado em PFA 4% em PBS.

FIG. 9 Corte coronal de 40 μ m no criostato em 22/02/08, lâmina 9B, corte 2, animal 1 (30 dias). Experimento: 16/07/08. Documentação em 07/08/08, microscopia confocal (Leica SP5). Tecido fixado em PFA 4% em PBS.

FIG. 10 Corte parassagital de 40 μ m no criostato em 26/05/11, lâmina 3, corte único (30 dias). Experimento: 26/05/11. Documentação em 06/06/11, microscopia confocal (Zeiss LSM) Tecido fixado em PLP 1% (paraformaldeído, lisina e periodato).

FIG. 11 Cortes parassagitais de 40 μ m no criostato em 27/05/11, lâmina 3, corte 2 (A-C) e lâmina 2, corte 1 (E-G) ratos de 30 dias. Experimento: 27/05/11. Documentação em 10/06/11 e 17/06/11, microscopia confocal (Zeiss LSM) Tecido fixado em PLP 1% (paraformaldeído, lisina e periodato).

FIG. 12 Corte parassagital de 40 μ m no criostato em 22/11/10, lâmina 1, corte 1, animal de 15 dias. Experimento: 22/11/10. Documentação: 26/11/10, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 2%.

FIG. 13 (A-C) e (D-F): Cortes parassagitais de 40 μ m no criostato em 19/11/10, lâmina 2, corte 2, animal de 15 dias. Experimento: 19/11/10. Documentação: 03/12/10. (G-I): Cortes parassagitais de 40 μ m no criostato em 22/11/10, lâmina 1, corte 1, rato de 15 dias. Experimento: 22/11/10. Documentação: 26/11/10, microscopia confocal (Zeiss lsm). Tecido fixado em PLP 2%.

FIG. 14 Corte parassagital de 40 μ m no criostato em 11/05/09, lâmina 8B, corte 2, animal 1 (30 dias). Experimento: 13/05/09. Documentação em 21/05/09, microscopia confocal (Leica SP5) Tecido fixado em PFA 4% em PBS e marcado pelo anticorpo doado pelo Dr. Rock

FIG. 15 Corte parassagital de 40 μm realizado no criostato em 11/05/09, lâmina 8B, corte 2, animal 1 (30 dias). Experimento: 13/05/09. Documentação em 21/05/09, microscopia confocal (Leica SP5) Tecido fixado em PFA 4% em PBS.

FIG. 16 Corte parassagital de 40 μm no criostato em 27/05/11, lâmina 2, corte 1, animal de 30 dias. Experimento: 27/05/11. Documentação em 10/06/11 e 17/06/11, microscopia confocal (Zeiss LSM) Tecido fixado em PLP 1% (paraformaldeído, lisina e periodato).

FIG. 17 Cortes parassagiais de 40 μm no criostato em 27/05/11, lâmina 3, corte 2 (A e B) e lâmina 3, corte 1 (C) ratos de 30 dias. Experimento: 27/05/11. Documentação em 10/06/11, microscopia confocal (Zeiss LSM) Tecido fixado em PLP 1% (paraformaldeído, lisina e periodato).

FIG. 18 A-C: Corte parassagital de 40 μm no criostato em 14/02/11, lâmina 3, corte 1, animal 1 (30 dias). Experimento: 14/02/11. Documentação: 16/02/11, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado com PLP 1%.

D-I: Corte parassagital de 20 μm no criostato em 22/11/10, lâmina 3, corte único, (15 dias). Experimento: 22/11/10. Documentação: 26/11/10, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 2%.

FIG. 19 Corte parassagital de 200 μm no vibrátomo em 16/12/10, corte 1, animal de 8 dias. Experimento: 16/12/10. Documentação: 23/12/10, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 1%.

FIG. 20 Corte parassagital de 40 μm no criostato em 14/02/11, lâmina 4, corte 1, animal de 30 dias. Experimento: 14/02/11. Documentação: 16/02/11, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado com PLP 1%.

FIG. 21 Corte parassagital de 40 μm no criostato em 14/02/11, lâmina 3, corte 1, animal 1 (30 dias). Experimento: 14/02/11. Documentação: 16/02/11, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado com PLP 1%.

FIG. 22 Corte parassagital de 40 μm no criostato em 26/01/11, lâmina 2, corte 1, animal de 15 dias. Experimento: 26/01/11. Documentação: 11/02/11, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado com PLP 2%.

FIG. 23 (A-C) e (D-F): Corte parassagital de 40 μm no criostato em 26/01/11, lâmina 2, corte 1, animal de 15 dias. Experimento: 26/01/11. Documentação: 11/02/11. (G-I): Corte parassagital de 40 μm no criostato em 07/02/11, corte 2, rato de 15 dias. Experimento: 07/02/11. Documentação: 11/02/11, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 2%.

FIG. 24 Corte parassagital de 40 μm no criostato em 16/03/11, lâmina 2, corte 2, animal de 8 dias. Experimento: 16/03/11. Documentação: 25/03/11, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 2% .

FIG. 25 Corte parassagital de 40 μm no criostato em 14/02/11, lâmina 4, corte 1, animal 1 (30 dias). Experimento: 14/02/11. Documentação: 16/02/11, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado com PLP 1% .