



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

**Imunolocalização de Canais para Sódio Voltagem-Dependentes em
Neurônios do Núcleo Coclear Dorsal e do Núcleo Medial do Corpo
Trapezoidal**

Liciane Mateus da Silva

Uberaba

2013

**Imunolocalização de Canais para Sódio Voltagem-Dependentes em
Neurônios do Núcleo Coclear Dorsal e do Núcleo Medial do Corpo
Trapezoidal**

Liciane Mateus da Silva

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

Orientador: Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues

Uberaba

2013

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

S581i Silva, Liciane Mateus da
Imunolocalização de canais para sódio voltagem-dependentes em
neurônios do núcleo coclear dorsal e do núcleo medial do corpo
trapezoidal / Liciane Mateus da Silva. – 2012.
77 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues

1. Sistema auditivo. 2. Canais de sódio. 3. Núcleo coclear. 4.
NA_v1.6. I. Rodrigues, Aldo Rogelis Aquiles. II. Universidade Federal
do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 612.858

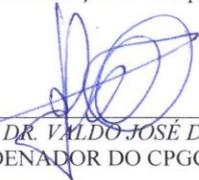
Liciane Mateus da Silva

Imunolocalização de Canais para Sódio Voltagem-Dependentes em Neurônios do Núcleo Coclear Dorsal e do Núcleo Medial do Corpo Trapezoidal

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação da banca examinadora para a obtenção do título de:

MESTRE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

e aprovada na sua versão final em 05 de abril de 2013, atendendo às normas da legislação vigente da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.



PROF. DR. VALDO JOSÉ DA SILVA
COORDENADOR DO CPGCF/UFTM

BANCA EXAMINADORA



PROF. DR. ALDO ROGELIS AQUILES RODRIGUES
-ORIENTADOR-
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM



PROF. DR. RICARDO MAURÍCIO X. LEÃO
Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP



PROF. DR. ANTÔNIO ROBERTO MARTINS
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

*Dedico essa dissertação aos meus pais
Álvaro e Marilda e ao meu noivo
Wellington, por tornarem essa
caminhada mais amena.*

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues pelos grandes ensinamentos, pela oportunidade de executar esse trabalho e pela atenção, a mim dispensada, ao longo dessa caminhada.

À mestranda Lívia Alves Martins, pela parceria nas bancadas, pelo apoio técnico e companheirismo que muito contribuíram para que eu atingisse esse objetivo.

Ao Prof. Dr. Valdo José Dias pelos esforços na manutenção da Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFTM e também pelos seus ensinamentos constantes como pesquisador e professor.

A todos os professores dessa Pós-Graduação que contribuíram para meu crescimento, enriquecendo minha vivência nesse período de aprendizado.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Reis por me apresentar a esse programa de ensino e por ter me ensinado Fisiologia nos tempos saudosos da graduação.

À bibliotecária e também secretária da pós-graduação, Elizabeth Perez Caramori Ambrósio, pelo profissionalismo ímpar, pela alegria contagiante e pelo apoio que sempre concedeu a todos os alunos, às vezes nos dando apenas um olhar de ânimo.

Ao Prof. Dr. André S. Vieira pelos ensinamentos teóricos e práticos que aperfeiçoaram nossa coloração de Nissl.

Aos funcionários do departamento de Fisiologia: Ana Maria de Moraes Santana, Angélica Cristina Alves, Donizete Ponciano da Silva, Fausto dos Reis Silva, Glauco da Rocha Finholdt, Lucas Felipe de Oliveira e Marco Aurélio da Silva pelo cuidado com os animais e pela organização do laboratório. À secretária da disciplina de fisiologia Isabel Terra pelo carinho e atenção. A todos os colegas que dividiram experiências dentro da instituição.

À Universidade de Uberlândia (UFU) pelo acesso ao microscópio confocal, cuja coordenação é realizada pelo Prof. Dr. Marcelo Belletti e à técnica Mariane Borges Franco por sempre nos atender com presteza. À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) pelo mesmo suporte dado para a aquisição de nossas imagens e pela gentileza do Prof. Dr. Lenaldo Branco Rocha no auxílio dessa tarefa.

Aos técnicos do departamento de Bioquímica pelo suporte sempre que necessário: Geraldo Garcia de Freitas Júnior, Marco Túlio Parolini e Flávio Henrique Oliveira Carvalho.

À CAPES-REUNI pelos incentivos à pesquisa. À FAPEMIG e FUNEPU pelos recursos disponibilizados para a realização desse projeto.

Aos meus pais Álvaro José da Silva e Marilda Teresinha Maia e Silva, pelos esforços para me educar e pelo amor incondicional que sempre me ofertaram. À minha irmã Cristiane Mateus da Silva que sempre torceu por mim. Ao meu noivo Welington Mrad Joaquim pelo incentivo, respeito e paciência, estando ao meu lado em todos os momentos. Aos demais familiares e amigos que sempre acreditaram em mim.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu conseguisse atingir esse objetivo, meu muito obrigada!

*“Só se pode alcançar um grande êxito quando
nos mantemos fiéis a nós mesmos.”*
Friedrich Nietzsche

SILVA LM. Imunolocalização de canais para sódio voltagem-dependentes em neurônios do núcleo coclear dorsal e do núcleo medial do corpo trapezoidal. [dissertação]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2013.

RESUMO

O presente trabalho buscou caracterizar a expressão de canais para sódio voltagem-dependentes em neurônios do sistema auditivo inferior, mais especificamente no núcleo coclear dorsal (DCN) e no núcleo medial do corpo trapezoidal (MNTB) de ratos Wistar de 30 dias. Para isso, utilizou-se reações de imunofluorescência de dupla marcação, em fatias de 40 ou 150 μm do tronco cerebral e documentação em microscopia confocal. Foi utilizado um anticorpo que reconhece todas as isoformas de canais para sódio (PAN- Na_v); anticorpos específicos contra as isoformas de canais para sódio ou cálcio voltagem-dependentes $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$ e $\text{Na}_v1.6$ ou $\text{Ca}_v3.2$ e para os marcadores neuronais anti-Map-2 e anti-anquirina-G. Não foi observada a imunomarcação anti- $\text{Na}_v1.1$ e anti- $\text{Na}_v1.2$ nos dois núcleos analisados, pelo menos em densidades detectáveis, pelo método de imunofluorescência utilizado. O canal $\text{Na}_v1.6$ é intensamente expresso nos segmentos iniciais do axônio (AIS) das células *cartwheel*, fusiformes e gigantes do DCN. As células *cartwheel* apresentaram uma área de silhueta somática média de $181,5 \pm 16,3$ ($n=8$), as fusiformes de $423,9 \pm 43,6$ ($n=8$) e as gigantes de $1119,3 \pm 123,4 \mu\text{m}^2$ ($n=3$), enquanto a marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ ao longo do AIS exibiu uma extensão de $17,6 \pm 0,5$; $22,5 \pm 1,8$; $45,3 \pm 1,5 \mu\text{m}$, respectivamente. Quando comparadas, tanto a área de silhueta somática quanto a extensão da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ no AIS diferiram estatisticamente entre essas subpopulações neuronais do DCN. Nas células *cartwheel* do DCN, embora demonstrado a presença do canal $\text{Ca}_v3.2$ no soma e em processos próximos ao soma, não foi observada a colocalização desse canal com o $\text{Na}_v1.6$ no AIS. Nas células principais do MNTB, a análise da marcação anti-PAN- Na_v e anti- $\text{Na}_v1.6$ ao longo do AIS, também não sugere a presença de outras isoformas, além da $\text{Na}_v1.6$. Nesse domínio neuronal observou-se colocalização anti- $\text{Na}_v1.6$ e anti-anquirina-G, onde apenas a marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ aumenta com a distância ao longo do AIS. Dessa forma, nossos dados sugerem que a alta densidade da isoforma $\text{Na}_v1.6$ no AIS é comum a distintos neurônios auditivos. Entretanto, a extensão de sua expressão no provável sítio gerador do potencial de ação difere entre distintas populações neuronais do sistema auditivo. Além do canal para sódio $\text{Na}_v1.6$, as células *cartwheel* do DCN exibiram uma expressão somática do canal de cálcio $\text{Ca}_v3.2$ e ambos canais iônicos voltagem-dependentes podem estar envolvidos com potenciais de ação complexos característicos desses neurônios.

Palavras-chave: canais para sódio, $\text{Na}_v1.6$, segmento inicial do axônio, núcleo coclear dorsal, núcleo medial do corpo trapezoidal, anquirina-G, geração de potenciais de ação, sistema auditivo.

SILVA LM. Imunolocalização de canais para sódio voltagem-dependentes em neurônios do núcleo coclear dorsal e do núcleo medial do corpo trapezoidal. Immunolocalization of voltage-gated sodium channels in neurons of the dorsal cochlear nucleus and the medial nucleus of the trapezoid body. [dissertation]. Uberaba (BR): Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2013.

ABSTRACT

The present study aimed to characterize the expression of voltage-gated sodium channels in neurons of inferior auditory system, more specifically at dorsal cochlear nucleus (DCN) and medial nucleus of trapezoid body (MNTB) of thirty days rats. For this purpose, double-labeling immunofluorescence reactions were done in slices of 40 or 150 μm of brain stem and documented using confocal microscopy. We have used an antibody that recognizes all the isoforms of sodium channels (PAN- Na_v), specific antibodies against the isoforms of voltage-dependent sodium or calcium channels $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$ e $\text{Na}_v1.6$ or $\text{Ca}_v3.2$, and also antibodies against the neuronal markers anti-Map-2 e anti-ankyrin-G. It was not observed anti-Nav1.1 or Nav1.2 labeled neurons from both nuclei evaluated, at least at densities normally detected through the immunofluorescence technique utilized. The $\text{Na}_v1.6$ channels are highly expressed at axon initial segments (AIS) of cartwheel, fusiforms and giant cells of DCN. The cartwheel cells showed a mean somatic silhouette area of $181,5 \pm 16,3$ ($n=8$), the fusiforms of $423,9 \pm 43,6$ ($n=8$) and the giant cells of $1119,3 \pm 123,4 \mu\text{m}^2$ ($n=3$), whereas the anti-Nav1.6 labeling along the AIS measured $17,6 \pm 0,5$; $22,5 \pm 1,8$; $45,3 \pm 1,5 \mu\text{m}$, respectively. When compared, both the somatic silhouette area and the extension of anti- $\text{Na}_v1.6$ at AIS, presented a statistically significant difference between the neuronal subpopulations of DCN. At cartwheel cells from DCN, the $\text{Ca}_v3.2$ calcium channel is observed in the soma and also in processes near the soma, although the colocalization of this channel with the $\text{Na}_v1.6$ at AIS was not detected. At MNTB principal cells, the analysis of anti-Pan and anti- $\text{Na}_v1.6$ along the AIS, also does not suggest the presence of other isoforms besides the $\text{Na}_v1.6$. At this neuronal domain we observed the colocalization of anti- $\text{Na}_v1.6$ e anti-ankyrin-G, where only the anti- $\text{Na}_v1.6$ labeling increases with the distance along the AIS. Therefore, our data suggest that the high density of $\text{Na}_v1.6$ isoform at AIS is a common finding of auditory neurons. However, the extension of its expression at the probable site of the action potential generation differs between neuronal populations of auditory neurons. Besides the $\text{Na}_v1.6$, the cartwheel cells of DCN exhibited a somatic expression of $\text{Ca}_v3.2$ calcium channel and both voltage-gated ion channels may be involved with complex action potential characteristic of these neurons.

Keywords: sodium channels, $\text{Na}_v1.6$ sodium channels, axon initial segment, dorsal cochlear nucleus, medial nucleus of the trapezoidal body, ankyrin-G, action potential generation, auditory system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Projeção de fibras auditivas tipo I para o núcleo coclear em gatos.....	12
Figura 2- As camadas superficiais do DCN formam uma estrutura semelhante ao cerebelo..	12
Figura 3- Esquema ilustrativo de algumas vias auditivas em mamíferos.	18
Figura 4- Organização transmembrana das subunidades de canais de sódio.	22
Figura 5- Estrutura da subunidade de canais Ca_v1	24
Figura 6- Anatomia do sistema auditivo inferior (núcleos cocleares e olivares superiores)..	35
Figura 7- Expressão do canal $Na_v1.6$ em neurônios do DCN.	39
Figura 8- Controle da reação de imunofluorescência do anticorpo anti- $Na_v1.6$ (PAb-1) em ratos de 30 dias.....	39
Figura 9- Análise da expressão do canal $Na_v1.6$ (PAb-1) nas células fusiformes e cartwheel do DCN utilizando cortes espessos no vibrátomo ($150\ \mu m$).....	41
Figura 10- Análise da expressão do canal $Na_v1.6$ (PAb-1) nas células gigantes do DCN utilizando cortes espessos no vibrátomo ($150\ \mu m$)	43
Figura 11- Colocalização de AnK-G e do canal $Na_v1.6$ no AIS de neurônios do DCN.	46
Figura 12- Ausência de colocalização dos canais $Na_v1.6$ e $Ca_v3.2$ nos AISs de neurônios do DCN.....	48
Figura 13- Distribuição de canais Na_v no MNTB.	52
Figura 14- $Na_v 1.6$ como a isoforma prevalente e análise de correlação entre a extensão de sua marcação no AIS e a área somática nas células principais do MNTB.....	53
Figura 15- Análise da intensidade de marcação anti- $Na_v1.6$ (PAb-1) e anti-PAN- Na_v ao longo do AIS de neurônios principais do MNTB.....	55
Figura 16- Expressão proeminente de AnK-G no MNTB e colocalização com $Na_v1.6$ no AIS.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados nos experimentos de imunomarcação.....	31
Tabela 2- Análise da área de silhueta somática e da extensão da marcação anti- $Na_v1.6$ ao longo do AIS em neurônios do DCN.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8cn e 8vn	Ramo coclear e ramo vestibular do nervo vestibulo-coclear
AIS	Segmento inicial do axônio
Ank-G	Anquirina-G
AP	Potencial de Ação
AVCN	Núcleo coclear antero-ventral
CN	Núcleo coclear
CWC	Célula cartwheel
DAS	Estria acústica dorsal
DCN	Núcleo coclear dorsal
DL	Camada profunda
DLPO	Núcleo periolivar dorsolateral
DMPO	Núcleo periolivar dorsomedial
FC	Célula fusiforme
FCL	Camada de células fusiformes
DRG	Gânglio da raiz dorsal
GC	Célula gigante
GBC	Células globulares em arbusto
HVA	Correntes de cálcio ativadas por alta voltagem
IC	Colículo inferior
ICP	Pedúnculo cerebelar inferior
IgG	Imunoglobulina
Kv	Canal para potássio voltagem-dependente
LNTB	Núcleo lateral do corpo trapezoidal
LSO	Oliva superior lateral
LVA	Correntes ativadas por baixa voltagem
MAb	Anticorpo monoclonal
MAP-2	Proteína associada aos microtúbulos
MCP	Pedúnculo cerebelar médio
MIF	Máxima Intensidade de Fluorescência
ML	Camada Molecular
MNTB	Núcleo medial do corpo trapezoidal
MSO	Oliva superior medial
Na _v	Canal para sódio voltagem-dependente
PAb	Anticorpo Policlonal
PAN-Na _v	Anticorpo anti-canais para sódio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PFA	Paraformaldeído
PLP	Paraformaldeído-lisina-periodato
PVCN	Núcleo coclear póstero-ventral
Py	Trato córtico-espinhal
SBC	Células esféricas em arbusto
SOC	Complexo Olivar Superior
TTX	Tetrodotoxina
TTX-R	Tetrodotoxina resistente
TTX-S	Tetrodotoxina sensível
Tz	Corpo trapezoidal
VCN	Núcleo coclear ventral
VNLL	Núcleo ventral do lemnisco lateral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO NÚCLEO COCLEAR DORSAL (DCN)	11
1.2 DIFERENTES TIPOS NEURONAIS ENCONTRADOS NO DCN	14
1.3 O NÚCLEO MEDIAL DO CORPO TRAPEZOIDAL (MNTB).....	17
1.4 CANAIS E CORRENTES DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM	20
1.5 CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM	23
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS	28
4.2 PREPARAÇÃO DO NÚCLEO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA	28
4.3 CORTE DE FATIAS ESPESSAS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA	29
4.4 EXPERIMENTOS DE IMUNOMARCAÇÃO.....	30
4.5 COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE NISSL.....	31
4.6 MEDIDAS DA EXTENSÃO DO SEGMENTO INICIAL DO AXÔNIO E DA ÁREA SOMÁTICA	33
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5. RESULTADOS	34
5.1 ANATOMIA DO SISTEMA AUDITIVO INFERIOR	34
5.2 EXPRESSÃO DO CANAL $Na_v 1.6$ EM NEURÔNIOS DO DCN	36
5.3 ESTUDO DA EXPRESSÃO DE CANAIS PARA SÓDIO NO MNTB	49
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS N°61 PELO CEUA-UFTM	74
REFERÊNCIAS DAS FIGURAS	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO NÚCLEO COCLEAR DORSAL (DCN)

Os núcleos cocleares (CN) estão localizados no extremo rostral do bulbo e contém uma população heterogênea de neurônios que recebem a projeção das fibras aferentes auditivas do nervo vestibulo-coclear. Esse núcleo pode ser subdividido em núcleo coclear dorsal (DCN), que corresponde ao tubérculo acústico, localizado dorso-lateralmente ao pedúnculo cerebelar inferior e o núcleo coclear ventral (VCN), localizado ventralmente a esse pedúnculo. O VCN pode ser ainda subdividido em núcleo coclear anteroventral (AVCN) e núcleo coclear posteroventral (PVCN) (Musiek, 1985; Osen, 1969; Brawer et al., 1974). A organização tonotópica que surge na cóclea é preservada tanto no VCN quanto no DCN (figura 1), de modo que neurônios localizados na porção dorsal respondam a frequências mais agudas e aqueles localizados mais ventralmente respondam a frequências mais graves (Ryugo, Parks, 2003).

O DCN apresenta uma morfologia bastante distinta do AVCN com uma estrutura organizada em camadas e que guarda semelhanças ao córtex cerebelar (figura 2) (Funfschilling, Reichardt, 2002; Oertel, Young, 2004). Recebe a aferência excitatória das fibras auditivas a partir do PVCN de um modo bastante organizado e que preserva o mapa tonotópico gerado na cóclea (Osen, 1970). Recebe também aferências excitatórias colaterais de axônios das células multipolares do PVCN (Oertel et al., 1990). Essas células fornecem a chamada "entrada de banda larga inibitória", parte essencial da maquinaria de processamento do DCN (Arnott et al., 2004).

Neurônios do DCN, assim como do córtex cerebelar, recebem também sinais carreados por axônios das células granulares (Oertel, Young, 2004). As células granulares são pequenos interneurônios excitatórios dispostos em aglomerados em torno do AVCN e na camada das células fusiformes do DCN (Osen, 1970; Mugnaini et al., 1980). Os axônios desses neurônios, chamados de fibras paralelas, são amielinizados e contactam dendritos das células fusiformes (FC), células gigantes (GC) e células *cartwheel* (CWC) (Mugnaini et al., 1980). Já os dendritos, em número de dois ou três, são curtos e com terminações em garra que formam glomérulos para receber as fibras musgosas, à semelhança das células granulares do cerebelo (Mugnaini et al., 1980; Oertel, Young, 2004).

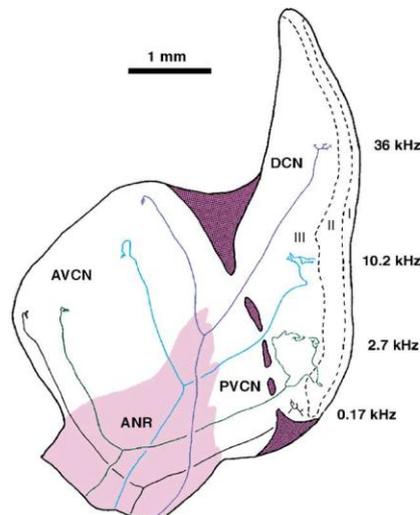


Figura 1- Projeção de fibras auditivas tipo I para o núcleo coclear em gatos. As três regiões do núcleo coclear (AVCN, PVCN e DCN) são inervadas por ramos do nervo auditivo. Dentro de cada região, a inervação é organizada tonotopicamente, mostrando que as fibras de baixa frequência encerram-se ventralmente e fibras de alta frequência, dorsalmente. O DCN tem mais tecido dedicado ao processamento de informação de alta frequência do que o VCN. ANR: raiz do nervo auditivo; AVCN: núcleo coclear anteroventral; DCN: núcleo coclear dorsal; PVCN: núcleo coclear posteroventral. (Ryugo, Parks, 2003).

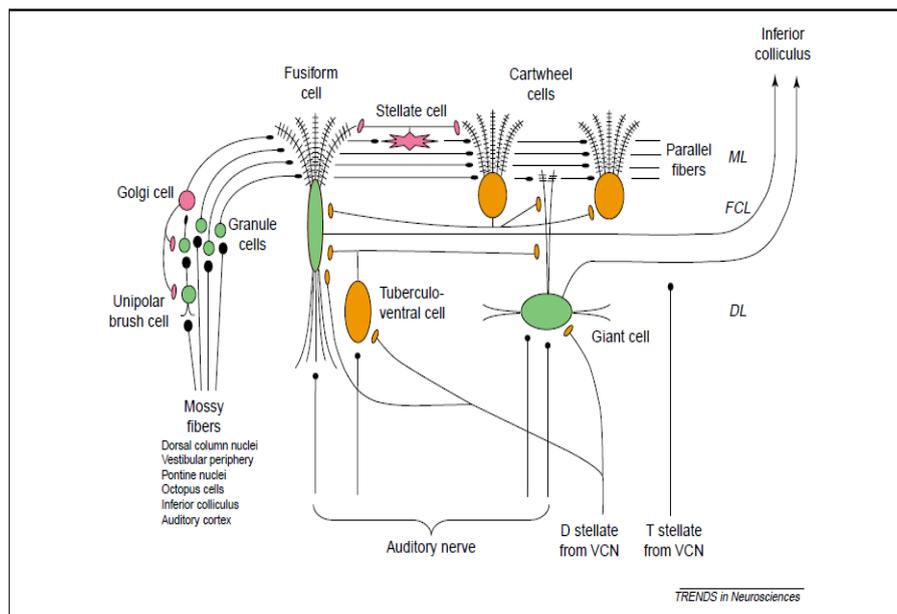


Figura 2- As camadas superficiais do DCN formam uma estrutura semelhante ao cerebelo. Células granulares são encontradas em grupos ao redor do AVCN e na camada de células fusiformes (FCL). Os axônios das células granulares (fibras paralelas) fazem sinapses com dendritos das células *cartwheel* na camada molecular (ML) e com interneurônios inibitórios como células esteladas e Golgi. As fibras paralelas também contactam dendritos apicais das células fusiformes. Os axônios das células *cartwheel* inibem as células fusiformes. Fibras do nervo auditivo inervam a camada profunda (DL), entrando em contato com os dendritos basais de células fusiformes e com as células gigantes e tuberculoventrais. Dois grupos de neurônios do VCN, células D e T estreladas, projetam para a camada profunda. Os alvos dos axônios de células T estreladas no DCN não são conhecidos. Células fusiformes e gigantes são as principais células de projeção do DCN para o colículo inferior. Neurônios glutamatérgicos são ilustrados em verde e os seus terminais em preto, os neurônios glicinérgicos em laranja e os GABAérgicos em rosa (Oertel, Young, 2004).

Dessa forma o DCN recebe, além da informação acústica gerada na cóclea ou parcialmente integrada no PVCN, informações não-auditivas como entradas somatossensoriais provenientes dos núcleos da coluna dorsal e dos núcleos trigeminais espinhais (Young, Nelken, Conley, 1995). Kanold & Young (2001), através da estimulação elétrica do segundo nervo cervical (C2) e de seus ramos que inervam o pavilhão auditivo de gatos, observaram que as maiores entradas somatossensoriais para o DCN originam de receptores musculares associados com o pavilhão auricular. Os autores sugeriram ainda que o DCN realiza um importante papel, na coordenação da posição da orelha, em relação ao som, ou que o DCN pode dar suporte à interpretação dos efeitos da posição da orelha em outros fatores envolvidos na localização da fonte sonora.

Em resumo, as células granulares transmitem informações que recebem de múltiplas áreas do cérebro que estão associadas a múltiplas modalidades sensoriais, recebendo aferências do córtex auditivo (Feliciano et al., 1995), dos núcleos da coluna dorsal (Weinberg, Rustioni, 1987), núcleos pontinos (Ohlrogge et al., 2001), gânglio trigeminal (Shore, Zhou 2006), aferentes vestibulares (Burian, Gstoettner, 1988), fibras nervosas amielínicas auditivas (Brown et al., 1988), área de células octopus do AVCN (Golding et al., 1995) e colículo inferior (IC) (Caicedo, Herbert, 1993).

As projeções das células principais do DCN para o IC são feitas através da estria acústica dorsal (DAS) (Oliver et al., 1997). O DCN não somente projeta para o IC contralateral, mas também recebe projeções do próprio IC, como também do córtex auditivo e complexo olivar superior (SOC) (Young et al., 1992).

Estudos sobre a citoarquitetura do núcleo coclear ainda não haviam sido iniciados até a década de 60 do século XX, quando Harison e colaboradores começaram a estudar a morfologia dos neurônios no núcleo coclear de ratos e Osen, no núcleo coclear de gatos. Recentemente, o DCN tem sido bastante estudado devido à hipótese que o aumento da atividade espontânea de seus neurônios pode levar ao surgimento do *tinnitus*, também chamado de zumbido (Kaltenbach et al., 2002; Brozoski, Bauer, Caspary, 2002; Kaltenbach et al., 2004). Dá-se o nome de *tinnitus* a uma sensação auditiva cuja fonte não provém de um estímulo externo ao organismo. Exposição prolongada a sons acima de 85 decibéis pode causar danos irreversíveis à audição e provocar tal sensação (Shemesh et al., 1993; Shemesh et al., 1996). Kaltenbach (2007), listou três prováveis mecanismos pelos quais a exposição sonora intensa provoca um aumento da atividade espontânea de neurônios do DCN. O primeiro pode resultar de

mudanças no balanço de entradas excitatórias e inibitórias, para os neurônios do DCN, resultantes da degeneração transneuronal e plasticidade provocada por lesão coclear; o segundo pode ser devido a uma lesão excitotóxica de neurônios resultante da supra-estimulação e hiperatividade do nervo auditivo e o terceiro mecanismo, devido a alterações na expressão de canais iônicos que afetam o nível de excitabilidade celular.

1.2 DIFERENTES TIPOS NEURONAIS ENCONTRADOS NO DCN

Assim como o vestibulocerebelo, o DCN contém células unipolares em arbusto (Mugnaini et al., 1997), células Golgi (Ferragamo et al., 1998) e células estreladas superficiais (Zhang, Oertel, 1993). CWC são interneurônios que ocupam uma posição semelhante no circuito do DCN ao ocupado pelas células de Purkinje do cerebelo (Wouterlood, Mugnaini, 1984). CWC e células de Purkinje são igualmente afetadas por fatores genéticos e mutações (Berrebi, Mugnaini, 1988) e ambos os potenciais de ação (AP) são complexos (*complex spikes*) (Zhang, Oertel, 1993; Manis et al., 1994). Ao contrário das células de Purkinje, CWC rescindem localmente, entrando em contato com outras CWC, FC e GC. Embora as CWC contenham ácido glutâmico e GABA descarboxilase, elas são glicinérgicas, fornecendo entradas inibitórias para demais interneurônios (Golding, Oertel, 1997). Células tuberculoventrais da camada profunda (DL) do DCN recebem entrada sináptica excitatória de fibras do nervo auditivo e das células T estreladas do VCN, sendo inibidas por células D estreladas também do VCN (Zhang, Oertel, 1993).

Utilizando-se de coloração de Golgi e câmara lúcida, Kane (1974) descreveu algumas observações sinápticas do CN de gatos e notificou que FC recebem influências de aferentes auditivos primários, direta ou indiretamente, através das células pequenas (*small cells*) e células granulares. Em seus experimentos, conseguiu diferenciar seis tipos axonais diferentes que arborizam e formam um emaranhado de fibras do DCN: a classe 1 arboriza na camada profunda (DL) e na camada de células fusiformes (FCL), incluem as fibras aferentes auditivas primárias e possuem axônios de diferentes diâmetros e comprimentos; a classe 2 arboriza dentro da DL e da FLC, apresenta-se mais fina que nas classes 1 e 4; a classe 3 possui axônios longos através da FCL e botões de passagem; a classe 4 possui aferentes primários que percorrem curvas rostralmente dentro do DCN; a classe 5, com minúsculos axônios ramificados de *small cells*, termina em pequenos botões, ocorrendo em todas as três camadas e a classe 6,

com finos axônios, cursa para longas distâncias dentro da camada molecular (ML), camada de células fusiformes (FLC) e para o exterior, podendo surgir de células granulares.

As FC estão localizadas na camada 2 (FCL) do DCN com corpo celular alongado, ou piramidal, medindo em torno de 25 a 30 μm no maior diâmetro e cerca de 20 μm no menor diâmetro com um ou dois dendritos apicais e uma árvore dendrítica basal que se estende para pontos opostos ao corpo celular (Ryugo et al, 1995; Rubio et al., 2008). Parecem ser importantes para a localização de sons e enviam projeções excitatórias diretas para o IC (Cant, Benson, 2003). O alinhamento das FC contribui para a organização laminar do DCN, representando cerca de 75-80% da população de suas grandes células (Ryugo, Willard, 1985).

As FC do DCN possuem curvas complexas de frequência e de ajuste de intensidade, sendo que suas propriedades de respostas variam de acordo com o estímulo e determinadas condições experimentais (Rhode et al., 1983). Entradas somatossensoriais inibem a atividade das FC, possivelmente silenciando sua atividade durante os movimentos da cabeça e do pavilhão auditivo (Young, Nelken, 1995), desempenhando um papel relevante na localização do som no eixo vertical (Shofner, Young, 1985).

Ryugo, Wright, Spirou (1993), utilizando-se de técnicas eletrofisiológicas para mapear a organização da frequência do DCN de gatos, verificaram que a maior densidade de FC e seu maior eixo rostro-caudal foram observados no terço médio do eixo dorsal-ventral do núcleo, com cerca de metade de todas as células respondendo a frequências entre 8-30 kHz.

Wouterlood, Mugnaini (1984) estudaram CWC do DCN de ratos por microscopia eletrônica e impregnação por coloração de Golgi e observaram que essas células estão geralmente situadas nas camadas 1-2 (ML e FCL, respectivamente) e possuem um diâmetro médio do corpo celular em torno de 10-14 μm , com árvores dendríticas predominantemente na ML. Os dendritos primários são curtos e formam poucas espinhas; os dendritos secundários e terciários são curtos, curvos e carregados de espinhas. Todas as espinhas dendríticas possuem sinapses assimétricas, com fibras não mielinizadas, presumivelmente axônios das células granulares, paralelas ao longo do eixo do DCN ou radialmente. CWC estão em maior número que outros neurônios nas camadas 1-2, com exceção de células granulares e exibem axônios mielinizados finos que não projetam para fora do DCN.

CWC respondem apenas fracamente à estimulação acústica (Ding, Benson, Voigt, 1999), consistente com o fato de seus dendritos estarem posicionados principalmente na ML, longe dos terminais do nervo auditivo da DL. Ostapoff et al., (1994) verificaram, com o empalamento de uma CWC de *gerbil*, um padrão de descarga vigoroso do tipo tônico (*sustained “chopping”*) porém não puderam generalizar esse padrão de resposta às demais CWC. Registros eletrofisiológicos em preparações com fatias em rato (Zhang, Oertel, 1993) e em cobaia (Manis et al., 1994) demonstraram que CWC possuem AP complexos assim como o observado em registros *in vivo* (Ding, Benson, Voigt, 1999).

Kane et al., (1981) ao analisar células da camada profunda do DCN de gatos, observaram que as GC possuem um diâmetro somático médio maior que 22 μm , descrito cuidadosamente por microscopia de luz e eletrônica. As secções de núcleo coclear de gatos foram marcadas com Nissl e os autores classificaram os neurônios pela forma somática, baseando-se na relação (largura/comprimento = r), em alongados ($r < 0,65$), ovóides ($0,65 < r < 0,75$), ou esféricos ($0,75 \leq r \leq 1,0$). As colorações rápidas de Golgi marcaram os detalhes citológicos da árvore dendrítica e da morfologia axonal desses neurônios. A orientação e localização do soma, seu tamanho, a quantidade de dendritos basais e sua distribuição, permitiu o reconhecimento de cinco classes de grandes neurônios: bipolar alongados, multipolar alongados, irradiados, globulares e multipolares orientados. Para os autores todas as GC, de DCN de gatos, possuem densa entrada sináptica nos dendritos basais e apicais, mas somente as multipolares alongadas e irradiadas possuem contínua cobertura sináptica no soma. Vários terminais axodendríticos e algumas terminações axosomáticas assemelham-se com terminações identificadas em FC do DCN. Há entrada da cóclea a todos os tipos de GC e diferentes padrões de entrada para cada tipo. Isso sugere que cada tipo de GC deve processar sinais auditivos de entrada, mas cada uma deve receber diferentes informações primárias, pois algumas GC possuem axônios que se dirigem para a DAS e todas elas devem levar informação codificada primária, através de entradas excitatórias, para os centros auditivos superiores, como IC. Porém, algumas GC podem fornecer impulsos inibitórios para o CN contralateral (Cant, Benson, 2003).

Zhang, Oertel, (1993) mediante a aplicação de glutamato em regiões do AVCN e PVCN, observaram que o VCN contém interneurônios que são monosinápticamente ou polisinápticamente ligados a GC da DL do DCN. Seus resultados verificaram ainda que

GC recebem entradas excitatórias do nervo auditivo, de células granulares e estreladas e são inibidas pelas células tuberculoventrais, glicinérgicas, também presentes na DL.

1.3 O NÚCLEO MEDIAL DO CORPO TRAPEZOIDAL (MNTB)

As células globulares em arbusto (GBC), presentes na porção ventral do CN, o AVCN, possuem longos axônios que projetam para vias ipsilaterais como núcleo periolivar posterior (PPO), núcleo lateral do corpo trapezoidal (LNTB), núcleo periolivar dorsolateral (DLPO) e núcleo lateral da oliva superior (LSO). Essas células ainda projetam contralateralmente para 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). Esses núcleos participam da coleção de núcleos do tronco cerebral que compõem o chamado complexo olivar superior (SOC), o qual participa em múltiplos aspectos da audição e é um importante componente das vias auditivas ascendentes e descendentes (Abbas, Miller, 1993).

O MNTB é um núcleo distinto no SOC, transformando a entrada excitatória proveniente das GBC do AVCN em uma saída inibitória para núcleos auditivos distintos do tronco cerebral, ou seja, os neurônios do MNTB são glicinérgicos e projetam para o LSO ipsilateral, gerando uma via inibitória do CN contralateral (Cant, Benson, 2003). Tsuchitani (1997) sugeriu que a entrada de inibição para uma única célula da LSO é fornecida por mais de uma célula do MNTB.

A conexão das GBC com o MNTB contralateral tem como característica a presença de grandes terminais sinápticos conhecidos como Cálice de Held (*Calyx of Held*). Os axônios das GBC podem dar origem a dois (Smith et al., 1991) ou três terminais (Kuwabara, DiCaprio, Zook, 1991), mas cada célula principal do MNTB recebe apenas uma sinapse do tipo Cálice de Held, não sendo de um para um a relação sináptica entre GBC e a célula principal do MNTB (Yin, 2002).

As células principais do MNTB formam uma população de neurônios com morfologia e função comuns, sendo um importante elo para as projeções ascendentes do CN contralateral para a LSO, via fundamental para a localização do som. O MNTB desempenha um papel relevante no processamento de diferenças interaurais de intensidade, uma característica que é fundamental para a localização de fontes sonoras (Kopp–Scheinpflug et al., 2003). Os diferentes núcleos que compõem o SOC contribuem

para o processamento de diferenças interaurais de tempo (ITD) e de intensidade (ILD), responsáveis por essa localização de fontes sonoras (figura 3). Neurônios do MNTB, por sua vez, formam sinapses inibitórias com neurônios do LSO, os quais codificam a intensidade relativa do som nas duas orelhas. Neurônios com grandes terminações em cálices garantem a preservação das informações de tempo ao longo do caminho ITD ¹ (Schnupp, Nelken, King, 2011).

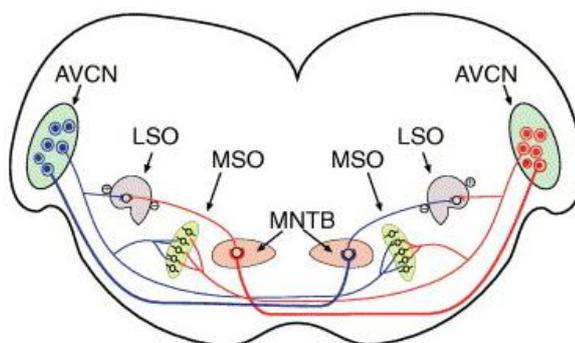


Figura 3- Esquema ilustrativo de algumas vias auditivas em mamíferos. Células esféricas em arbusto (SBC) do AVCN projetam para o MSO ipsilateral e contralateral. Este circuito calcula as diferenças de tempo de fase interaural. Esse tempo computado também é dependente de *inputs* inibitórios que surgem do MNTB e LNTB. As células globulares em arbusto (GBC) do AVCN fazem projeções estritamente para o MNTB contralateral, que envia conexões inibitórias ipsilaterais ao LSO. Células do LSO ipsilateral recebem uma entrada tonotopicamente combinada de SBC do AVCN. Essas projeções excitatórias e inibitórias para os neurônios do LSO colaboram no cálculo da intensidade de diferenças interaural, utilizado para localizar os sons de alta frequência (Cramer, 2005).

O MNTB se comporta como um relé passivo para conversão da entrada excitatória proveniente do CN contralateral em saída inibitória ao LSO (Irvine 1986; Sommer et al., 1993). Kopp–Scheinflug et al., (2003) sugeriram que o MNTB não é apenas um núcleo conversor de transmissão de sinal para o LSO, monitorando a entrada excitatória aferente em neurônios desse núcleo e seus disparos, simultaneamente, com um eletrodo *in vivo*, em registros extracelulares efetuados em *gerbils*. Seus resultados sugerem que, embora as células do MNTB recebam uma importante entrada excitatória graças aos Cálices de Held, as sinapses inibitórias desempenham um papel relevante no processamento de sinais desse núcleo.

¹ A diferença de tempo interaural (ITD) é a diferença de tempo de chegada de um som entre os dois ouvidos nos humanos e animais, sendo importante na localização de sons. Quando um sinal chega à cabeça de um lado, este tende a percorrer para alcançar a orelha contralateral. Essa diferença do caminho percorrido resulta em uma diferença de tempo entre as chegadas do som nos dois ouvidos, sendo esse tempo detectado o responsável pelo processo de identificação da direção de sons de baixa frequência (Schnupp, Nelken, King, 2011).

A população celular do MNTB apresenta subconjuntos distintos de neurônios reconhecidos em todas as espécies examinadas de morcegos e roedores, com base na posição dos dendritos e axônios (Kuwabara, DiCaprio, Zook, 1991). Utilizando de preparações de Golgi, Morest (1968) identificou três tipos de neurônios: principais, alongados e estrelados.

A maioria das células principais possui grupos dendríticos localizados dentro do MNTB, porém alguns neurônios possuem dendritos espalhados em núcleos periolivares adjacentes e que se espalham através da linha média e para dentro do MNTB contralateral. O soma das células principais são redondos ou ovais, medindo $22.4 \pm 3.01 \mu\text{m} \times 15.8 \pm 2.42 \mu\text{m}$ de diâmetro, com um ou dois dendritos de grande diâmetro que se ramificam profusamente (Banks, Smith, 1992; Kuwabara, Zook, 1991; Sommer et al., 1993; Smith et al., 1998). Parece que apenas as células principais recebem o Cálice de Held (Yin, 2002). Já com base nas projeções axonais, todas projetam para a LSO e cada axônio tem uma ou mais projeções secundárias e há ainda subgrupos com projeções colaterais incomuns que se estendem para o lemnisco lateral e subgrupos com axônios colaterais recorrentes (Kuwabara, DiCaprio, Zook, 1991).

Para Yin (2002), a principal razão da existência da sinapse Cálice de Held está relacionada à velocidade com que o estímulo inibitório dos neurônios principais do MNTB é apresentado ao LSO, tão rápido quanto possível, de forma que sua chegada coincida com a chegada do estímulo contralateral excitatório. O Cálice de Held também seria responsável por preservar com precisão, ao minimizar atrasos sinápticos, o momento do disparo (*spike timing*) (Wu, Kelly, 1994; Wang et al., 1998) e ainda, de seguir as altas taxas de disparos repetidos (Wu, Kelly, 1994; Borst et al., 1995; Wang et al., 1998).

Outra razão para a existência dessa sinapse gigante e especializada seria assegurar que cada disparo pré-sináptico resultasse em um disparo no neurônio do MNTB, ou seja, que o disparo das células, envolvidas no processamento da informação acústica, fosse transmitido fielmente, para cada célula do MNTB (Kuwabara, DiCaprio, Zook, 1991; Banks, Smith, 1992; Forsythe, 1994; Borst et al., 1995).

Várias especializações biofísicas foram observadas nessa sinapse, como a expressão de um canal de potássio: o $K_v3.1$, que apresenta uma rápida transição do estado aberto para o estado fechado. Tal propriedade contribui para que o canal desative rapidamente após a repolarização, gerando uma corrente de K^+ residual que não se acumula durante AP repetidos, o que poderia levar à acomodação na frequência de

disparo (Wang et al., 1998). Johnston et al., (2008) concluíram que o tipo de canal para potássio $K_v2.2$ possui localização no início do seguimento inicial do axônio (AIS²) das células principais do MNTB, exercendo função crucial na manutenção da amplitude do AP, devido a regulação do potencial *interspike* durante o disparo de alta frequência.

Leão et al., (2005) demonstraram que a constante de tempo necessária para a recuperação da inativação dos canais para sódio, nessa sinapse, se acelera com o desenvolvimento do animal, sendo que a isoforma $Na_v1.6$ não estaria presente no terminal sináptico, mas encontrada apenas no heminodo axonal pré-cálice, sendo que essa distribuição poderia contribuir para seus disparos em altas frequências.

Wu et al., (1999), sugeriram que a liberação de glutamato no terminal cálice se daria via influxo de Ca^{2+} mediado por canais do tipo P/Q (de forma mais eficaz) e do tipo N, R (de forma menos eficaz), isso se daria porque uma fração significativa de canais N e R estão distantes dos locais de lançamento. Posteriormente, Barnes-Davies, Owens, Forsythe (2001), por meio de registros eletrofisiológicas em fatias do tronco cerebral auditivo de ratos, observaram que a liberação de glicina em sinapses do MNTB é mediada predominantemente por canais de Ca^{2+} do tipo P/Q, mas com uma contribuição significativa com os do tipo N, em contraste com os neurônios do AVCN, que expressam canais do tipo T ($Ca_v 3,1, 3,2$ e $3,3$) e canais do tipo L.

1.4 CANAIS E CORRENTES DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM

Os canais iônicos são proteínas integrais da membrana plasmática necessários para comunicação entre o espaço intracelular e extracelular (Gende, 2004). É através dos poros desses canais que ocorre a difusão de íons através da membrana (Celesia, 2001). São altamente seletivos para determinadas espécies iônicas, sendo sua classificação correspondente a essa seletividade, ou seja, cada canal é nomeado pelo íon que o permeia pela membrana. Esses canais iônicos conduzem íons através da membrana em alta velocidade, em torno de 100 milhões de íons por segundo, sendo sua abertura e fechamento regulados por diferentes estímulos como a variação de voltagem,

² Nos neurônios mielinizados, a região da bainha localizada entre o cone de implantação axonal (*Axon Hillock*) e o início da bainha de mielina foi designada como segmento inicial do axônio (AIS) (Palay et al., 1968). Araki; Otani, 1955; Coombs et al., 1957; Edwards, Ottoson, 1958, foram os primeiros a proporem que o início do AP se daria nesse compartimento axonal.

estiramento mecânico e ligação de substâncias e/ou transmissores químicos (Siegelbaum, Koester, 2000).

A excitabilidade dos neurônios e células musculares se dá graças aos gradientes iônicos e à permeabilidade seletiva através da membrana celular, permitindo uma mudança transitória e rápida no potencial de membrana, gerando os AP (Venosa, 2004).

As características elétricas de um neurônio são definidas pelas propriedades biofísicas dos canais iônicos dependentes de voltagem e pela distribuição subcelular desses canais (Lai, Jan, 2006). Os responsáveis pela fase de despolarização do AP em neurônios são os canais de sódio (Na^+) dependentes de voltagem (Goldin, 2003); controlando não somente a iniciação, como também a propagação do AP em neurônios, células endócrinas e musculares (Catterall et al., 2005).

O início e a propagação do AP em fibras nervosas mielinizadas requerem uma alta densidade de canais para sódio dependentes de voltagem, cuja distribuição se encontra em subdomínios especializados como o AIS e nos nodos de Ranvier (Susuki, Rasband, 2008). A presença de uma alta densidade de canais para sódio dependentes de voltagem no AIS é responsável por promover um baixo limiar de ativação para a iniciação de AP e pela frequência de disparo do axônio (Kole et al., 2008; Hu et al., 2009).

Os diferentes tipos de canais de sódio foram agrupados em famílias e subfamílias baseando-se em suas propriedades eletrofisiológicas, bioquímicas e moleculares (Goldin, 2001). Esses canais são constituídos por subunidades α e β (figura 4), onde a subunidade α é formada por quatro domínios com seis segmentos transmembrana cada um, sendo que no quarto segmento de cada domínio há a presença de cargas positivas funcionando como o sensor de voltagem do canal. O filtro de seletividade do canal está entre os segmentos 5 e 6 e, entre os domínios 3 e 4, sua comporta de inativação. Já as subunidades β são definidas como moduladoras da atividade das subunidades α (Goldin et al., 2000).

Goldin et al., (2001) utilizaram-se de um sistema numérico para classificar as subfamílias e subtipos do canais de sódio. O nome do íon que permeia o poro do canal (Na) é utilizado na nomenclatura juntamente com o regulador fisiológico principal do canal, nesse caso, a voltagem, subescrita (Na_v). Em seguida, o primeiro número indica a subfamília do gene e o número que segue, após o ponto, indica o subtipo específico do canal, por exemplo, $\text{Na}_v1.1$. Há nove isoformas distintas de canais para sódio descritas na literatura e identificadas em mamíferos, cuja homologia da sequência de aminoácidos

é superior a 50%, por isso, todas as nove isoformas de canais de sódio são consideradas membros de uma única subfamília (Goldin et al., 2001).

Esses subtipos de canais de sódio são distribuídos de diferentes formas nos tecidos. As subunidades Na_v 1.1, 1.2, 1.3, 1.6 e 1.7 são identificadas no sistema nervoso central; Na_v 1.5 é expressa principalmente no músculo cardíaco; Na_v 1.4, na musculatura esquelética e as subunidades Na_v 1.8 e Na_v 1.9 são encontradas em maior concentração no gânglio da raiz dorsal (DRG) da medula (Catterall et al., 2005).

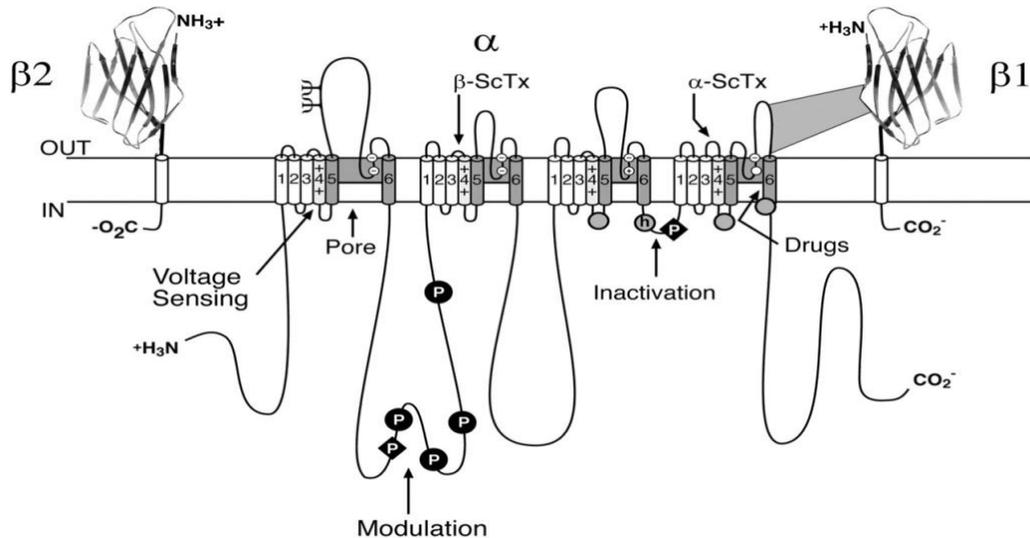


Figura 4- Organização transmembranar das subunidades de canais de sódio. Diagramas transmembranares dobráveis ilustram as estruturas primárias das subunidades dos canais iônicos voltagem-dependentes. Os cilindros representam α -segmentos transmembranares. Linhas em negrito representam as cadeias polipeptídicas de cada subunidade, com comprimento aproximadamente proporcional ao número de resíduos de aminoácidos dos subtipos de canais de sódio presentes no cérebro. Os domínios extracelulares das subunidades β 1 e β 2 são ilustrados como semelhantes a dobras de imunoglobulina. Ψ , são locais de provável glicosilação. P, são sítios de fosforilação pela proteína quinase A (círculos) e proteína cinase C (losangos). Sombreados são revestimentos de poros em segmentos S5-P-S6. Círculos brancos, do exterior (EEDD) e do interior (DEKA), anéis de resíduos de aminoácidos que formam o filtro de seletividade iônica e sítio vinculado à tetrodotoxina. ++, sensores de tensão S4; h em círculo sombreado, inativação das partículas no circuito do portão de inativação. Círculos abertos sombreados, locais envolvidos com a formação do receptor do portão de inativação. Sítios de ligação de α - e β -toxinas de escorpião (α -ScTx e β -ScTx) e um sítio de interação entre subunidade α e β -1 são também visualizados (Catterall et al., 2005).

As subunidades Na_v 1.5, Na_v 1.8 e Na_v 1.9 são resistentes a Tetrodotoxina (TTX), sendo as demais sensíveis a tal toxina. Neurônios de pequeno diâmetro, como os nociceptores, expressam canais de sódio sensíveis à TTX e Na_v 1.8 e Na_v 1.9, insensíveis à toxina. Nos nociceptores, 80% da corrente de sódio de influxo é gerada por canais Na_v 1.8. Em neurônios de grande diâmetro encontram-se predominantemente canais para

sódio, sensíveis à TTX, como o $Na_v1.1$, $Na_v1.6$ e $Na_v1.7$ e uma pouca expressão de $Na_v1.8$ (Rush et al., 2007).

Raman, Bean, (2001), encontraram uma corrente ressurgente em células de Purkinje do cerebelo, mediada por canais $Na_v1.6$ que recuperam rapidamente da inativação, ocorrendo um encurtamento do período refratário do AP, permitindo a geração de AP em altas frequências. Posteriormente, Afshari et al., (2004) verificaram que essa corrente também estava presente em células granulares, unipolares em escova e nucleares do cerebelo. Em seguida, Cummins et al., (2005) identificaram essa corrente ressurgente em neurônios do DRG que era gerada pelos canais $Na_v1.6$. Porém essa corrente pode ser gerada por outros canais de sódio além da isoforma $Na_v1.6$, como verificaram Do, Bean (2004), utilizando-se de neurônios do núcleo subtalâmico, de camundongos nocautes para o canal $Na_v1.6$, observaram que a corrente ressurgente foi reduzida em 63% quando comparada à gerada em camundongos selvagens; havendo ainda, redução do componente transiente em 40% e persistente de sódio em 55% .

A isoforma $Na_v1.6$ tem sido descrita como a principal responsável pela característica do disparo em altas frequências em diferentes células nervosas. (Afshari et al., 2004; Rush et al. 2005; Leão et al., 2005), sendo sua maior expressão no sistema nervoso, parecendo estar também prevalente no AIS (Boiko et al., 2003; Van Wart et al., 2007; Lorincz, Nusser, 2008). Os canais $Na_v1.6$ parecem estar segregados no AIS dependentes, principalmente, de anquirina-G e interações com o citoesqueleto axonal (Garrido et al., 2003; Ogawa e Rasband, 2008; Brechét et al., 2008; Brachet et al., 2010).

1.5 CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM

Os canais de cálcio são proteínas complexas formadas por 4 ou 5 diferentes subunidades: $\alpha1$, $\beta1$, $\alpha2\text{-}\delta$ e γ . A subunidade $\alpha1$ é a maior, com peso molecular entre 190-250 kDa, possui 4 domínios homólogos (Domínio I a IV), cada um contendo 6 segmentos transmembrana (S1-S6). A condutância iônica e a seletividade são determinadas pela alça entre os segmentos S5 e S6; já o S4 é o sensor de voltagem do canal (figura 5). As demais subunidades não formam poros, porém podem influenciar na modificação do poro formado pela subunidade $\alpha1$ (Hertitze et al., 1996; Catterall, 2005).

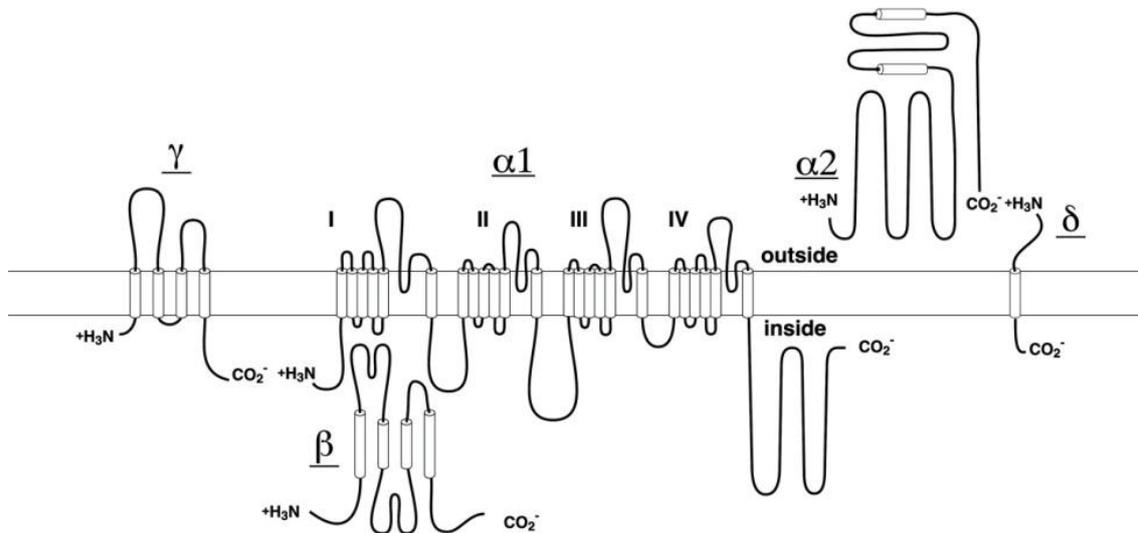


Figura 5- Estrutura da subunidade de canais Cav1. Composição e estrutura de subunidades de canais de cálcio purificados a partir de músculo esquelético. α -hélices são descritos como cilindros e os comprimentos das linhas correspondem aproximadamente aos comprimentos dos segmentos polipeptídicos representados (Catterall et al., 2005).

Tsien et al., (1988) subdividiram os canais de cálcio, de acordo com suas características biofísicas, em canais de cálcio do tipo: L, N, P, Q, R e T. Sendo quatro tipos desses canais identificados no DRG de mamíferos: L, N, T e P, e somente o tipo P que na está envolvido com a regulação da excitabilidade neuronal. Canais de Ca^{2+} do tipo L localizam-se no músculo cardíaco e esquelético, no cérebro e na retina; são de longa duração e sensíveis aos bloqueadores do tipo dihidropiridina; são ativados por uma forte despolarização a qual possui pouco efeito sobre a sua inativação. Canais de Ca^{2+} dos tipos N, P, Q e R localizam-se em terminais sinápticos, cujo principal papel está ligado à liberação de neurotransmissores, necessitando de concentrações citoplasmáticas/locais de Ca^{2+} entre 10 e 100 μM ; são ativados por uma forte despolarização e sua inativação é lenta. Canais de Ca^{2+} tipo T estão presentes no sistema nervoso, no músculo liso vascular e no músculo cardíaco; possuem baixa condutância e baixo limiar; são ativados por uma despolarização próxima do potencial de repouso; sua inativação é rápida e a reativação requer uma forte hiperpolarização. Estão envolvidos com os potenciais de ação rítmicos de neurônios, células musculares e células cardíacas. Apenas canais do tipo T são ativados por uma despolarização de baixo limiar, sendo inicialmente classificados como canais ativados por baixa voltagem (LVA), pois podiam ser ativados por pequenas despolarizações da membrana plasmática.

Mais tarde, Snutch et al., (1990) revelaram por clonagem molecular a existência de três genes que codificam canais tipo T (G, H, I), com sequência de aminoácidos semelhante a dos canais ativados por altas voltagens (HVA) e a dos canais de Na⁺. Os genes S, C, D, F codificam para os canais HVA do tipo L e os genes A, B e C codificam, respectivamente para os canais HVA do tipo P/Q, N e R.

Ertel e colaboradores (2000) propuseram uma nomenclatura estrutural para os canais de cálcio. Os canais do tipo L são subdivididos em Ca_v 1.1, 1.2, 1.3, 1.4; os tipos P/Q, N, R são subdivididos em Ca_v 2.1, 2.2, 2.3 e os do tipo T, em Ca_v 3.1, 3.2, 3.3. Esses subtipos são baseados da natureza da subunidade α1 que é responsável pela formação do poro principal desse canal.

Molitor, Manis (1999), sugeriram que há uma variedade de condutâncias de Ca²⁺ dependentes de voltagem (VGCCs) presente em neurônios do DCN de cobaias, capazes de desempenhar diferentes papéis na determinação dos padrões de respostas entre as populações neuronais do DCN. CWC, principais populações de interneurônios inibitórios no DCN, são os únicos desse núcleo que possuem complexos AP, em outras palavras, CWC respondem à despolarização de injeção de corrente com rápidos potenciais, sobrepostos a uma despolarização lenta, a qual tem sido atribuída a VGCCs, ou seja, cálcio-dependente (Zhang, Oertel 1993; Manis et al., 1994).

Nesse projeto intenta-se verificar a expressão de canais para sódio no DCN e MNTB com ênfase na análise da expressão do Nav1.6 em subtipos neuronais específicos, cuja identificação baseou-se na morfologia, localização e área de silhueta somática. Nessa análise buscou-se comparar a expressão desse canal entre os diferentes compartimentos neuronais (soma, dendritos e AIS) bem como avaliar se no DCN ocorre a colocalização desse canal com um subtipo específico de canal para cálcio (Cav3.2).

2 JUSTIFICATIVA

O conhecimento da expressão de proteínas envolvidas com a excitabilidade neuronal, que visa o presente estudo, é de grande relevância para o entendimento do funcionamento do sistema auditivo. Alguns relatos na literatura avaliaram a expressão de canais para sódio no sistema auditivo, mas pouco se sabe sobre os canais para sódio nos neurônios do DCN e de características específicas da expressão desses canais no MNTB.

A imunomarcção dos canais para sódio pode contribuir na identificação de quais isoformas, entre as nove descritas na literatura, estão presentes nos diferentes subtipos neuronais do DCN e nas células principais do MNTB. Ainda se pode indicar a existência de uma localização celular específica e como esses neurônios ancoram esses canais em compartimentos específicos. Além dos canais para sódio, canais para cálcio participam da eletrogênese neuronal, sendo que, aqueles do subtipo T (transientes), devido a sua alta sensibilidade à despolarização, desempenham um papel fundamental na geração de potenciais de ação naqueles neurônios onde são expressos. As células *cartwheel* do DCN apresentam potenciais de ação complexos (*complex-spikes*) provavelmente mediados por canais de sódio e de cálcio. Nesse sentido, justifica-se a análise da expressão tanto de canais de sódio quanto de cálcio nesses neurônios.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar, por meio de experimentos de imunofluorescência, a expressão dos canais para sódio voltagem-dependentes em neurônios do núcleo coclear dorsal (DCN) e nas células principais do núcleo medial do corpo trapezoidal (MNTB).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a localização dos canais para sódio utilizando um anticorpo PAN- Na_v (Sigma) que reconhece as diferentes isoformas desses canais tanto no DCN quanto no MNTB.

- Determinar a expressão das isoformas $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$ e $\text{Na}_v1.6$ em neurônios do DCN e no MNTB.

- Determinar a localização celular dessas isoformas no:

- Soma e dendritos, avaliando a colocalização com MAP-2 (anticorpo contra a proteína associada aos microtúbulos)
- Segmento inicial do axônio (AIS), avaliando a colocalização com anquirina-G

- Comparar as diferenças entre a localização celular desses canais nos diferentes tipos neuronais do DCN e no MNTB.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Os procedimentos na manipulação de animais e coleta de materiais realizados foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA-UFTM), com base no protocolo de nº 61 (em anexo). Foram utilizados 35 ratos Wistar machos ou fêmeas com idade de 30 dias, sob os cuidados do Biotério da disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os animais eram mantidos em ambiente com controle de temperatura (23 ± 1 °C) e ciclo de claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7:00 horas) e com livre acesso a água filtrada e ração balanceada (Nuvilab). Após o desmame aos 21 dias, os animais eram separados e mantidos em um número máximo de 5 animais/caixa até a idade de uso (30 dias). As caixas plásticas (40 x 34 x 17 cm) eram limpas três vezes por semana e forradas com maravalha autoclavada. Todo esforço foi feito para reduzir ao mínimo o número de animais utilizados.

4.2 PREPARAÇÃO DO NÚCLEO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os animais foram anestesiados com Tiopental (100 mg/Kg, intraperitoneal) e perfundidos transcardiacamente para a lavagem de sangue dos tecidos, por quatro a cinco minutos com uma solução salina (PBS), à temperatura de 24 °C, com a seguinte composição: 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 1,435 mM $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4. 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 ao longo da parede abdominal e 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 da solução perfusora. A perfusão foi realizada com uma bomba peristáltica (Incibrás BP-100 ou Pump P-1, Pharmacia Biotech) com fluxo de 9-10 ml/min. Logo em seguida, foi feita a perfusão com solução fixadora gelada de fixador 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% de paraformaldeído (Sigma, P6148) durante 30 minutos. Em experimentos realizados com o anticorpo doado pelo Dr. Rock Levinson (UCHSC-Denver-CO) ($\text{Na}_v1.6\text{-PAb-2}$)

utilizava-se a perfusão com PFA 4%, em que se obtinha uma boa marcação para esse anticorpo. Após o término da perfusão, os animais foram decapitados para a realização da dissecação cirúrgica do tronco cerebral.

A calota craniana foi aberta 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), uma tesoura oftálmica (RS5600, Roboz, USA) e uma pinça reta (Dumont N° 5, Switzerland). Em seguida, um bloco do tronco encefálico contendo o núcleo coclear e o núcleo medial do corpo trapezoidal foi cortado no plano coronal. Em alguns experimentos foram feitos cortes parassagitais do núcleo coclear.

Em seguida, o bloco de tecido foi pós-fixado no fixador PLP por quatro horas a 4° C. O tecido foi retirado da pós-fixação e crioprotégido em solução de sacarose 30% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, filtrada com filtro de Nylon de 0,45µm, de 25 mm de diâmetro (Millipore HNWP02500) utilizando um sistema de acoplamento (Millipore) à seringa de plástico, *overnight* até o tecido absorver a solução e submergir. Em seguida, o bloco de tecido foi imerso em uma solução própria para congelamento *Tissue-Tek* (*Sakura Finetek, Japan*) utilizando *blisters* de remédios de tamanho apropriado e, em seguida, o bloco foi congelado pela imersão em metilbutano (isopentano, 99% P.A. Vetec) ou n-hexano (32293-2, Sigma, USA) resfriado em nitrogênio líquido. O bloco congelado foi seccionado em criostato *Leica* (CM1850 UV), em fatias parassagitais ou coronais de 40 µm, montadas em lâminas gelatinizadas com sulfato de cromo-potássio (Sigma-Aldrich). Essas lâminas foram colocadas sobre uma placa quente (HistoTemp-3, Leica) mantida a 40 °C por 30 min, antes do início do experimento de imunomarcação. As lâminas não utilizadas no mesmo dia, foram mantidas em freezer (-80 °C) para experimentos posteriores.

4.3 CORTE DE FATIAS ESPESSAS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA

Um bloco de tecido, contendo o núcleo coclear, foi isolado após a perfusão transcardíaca como descrito acima. 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 150 a 200 µm foram cortadas no plano parassagital. Para a execução de corte do tecido no vibrátomo, o bloco foi colado ao substrato metálico (recoberto com teflon) com cola de cianoacrilato. Durante o corte o tecido

estava imerso no tampão fixador PLP e após o corte as fatias foram mantidas por uma hora a 24 °C nessa solução para a pós-fixação. Após esse tratamento as fatias foram imediatamente transferidas para placas contendo 24 poços para o início da imunomarcação.

4.4 EXPERIMENTOS DE IMUNOMARCAÇÃO

As secções nas lâminas ou as fatias foram lavadas (três lavagens de 15 min), sob agitação suave em agitador (BIOMIXER TS-2000A-VDRL SHAKER), com tampão fosfato de sódio 0,1 Molar, pH 7,2 (tampão PB). Em seguida, as fatias foram incubadas, por 30 minutos à temperatura ambiente (24°C), em solução de bloqueio composto por 1,5% (vol/vol) de Triton X-100, 10% (vol/vol) de soro de cabra normal (Invitrogen) em PB. Logo após, as secções foram incubadas por aproximadamente 21-24 horas, em câmara úmida à 4 °C, com tampão de bloqueio contendo um ou dois dos anticorpos primários, descritos na Tabela 1, previamente centrifugados por 10 minutos à temperatura de 4 °C (Rotanta 460R-Hettich Zentrifugen) a 19.000 rpm. Todas as soluções foram filtradas com sistema a vácuo (DIA PUMP-FANEM LTDA), utilizando-se filtro de nitrocelulose de 0,45 µm de 45 mm de diâmetro (Millipore, HAWPO4700).

Após a incubação com um ou dois anticorpos primários, as secções foram lavadas com PB (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, previamente centrifugados:

- IgG de cabra anti-coelho conjugada a Alexa 568 (1:500);
- IgG de cabra anti-camundongo conjugada a Alexa 488 (1:500);

O excesso de anticorpo secundário não ligado foi lavado das secções/fatias com PB (três vezes de 15 min), sendo que após a última lavagem, as lâminas foram mergulhadas em água destilada filtrada para retirada de possíveis impurezas presentes nos tecidos. 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*).

As imagens foram obtidas utilizando microscopia confocal por varredura a laser (LSM-510 Meta, Zeiss) e objetivas de 20x EC Plan-Neofluar, abertura numérica (NA): 0.5), 40x de imersão em óleo (EC Plan-Neofluar NA:1.3) e 63x de imersão em óleo (Plan-Apochromat NA: 1.4). Para obter imagens bidimensionais, múltiplas secções

confocais no eixo Z foram projetadas em um plano único. Em alguns casos, seções confocais únicas foram também utilizadas para ilustração. Para ambos os casos, nas legendas das figuras, foi descrito o número de seções ópticas no eixo Z utilizadas na projeção e a espessura (em micrômetros) de cada seção. Essas projeções foram do tipo máxima intensidade de fluorescência (MIF).

As imagens são apresentadas em código de cor (verde e vermelho) e em apenas uma delas (figura 12; painéis 12C;12D;12F e 12G), em escala de cinza. As análises foram feitas utilizando o *software Fiji/ImageJ 1.47* e montadas com o Adobe Illustrator CS (Adobe System, EUA).

O controle das imunomarcações foi feito pela omissão do anticorpo primário e pelo uso do peptídeo antigênico quando disponível.

ANTICORPOS PRIMÁRIOS	ORIGEM	EPÍTOPO	CONC. ORIGINAL E DILUIÇÃO
Anti-Na _v 1.6 (coelho; PAb-1)	Alomone (Israel)	CIANHTGVDIHRNGDFQKNG (aa 1042-1061 da alça intracelular entre os domínios II-III do canal de ratos)	0,8 mg/ml 1:100
Anti-Na _v 1.6 (coelho; PAb-2)	Dr. Rock Levinson	CSEDAIEEEGEDGVGSPRS (aa 460-477 da alça intracelular entre os domínios I-II do canal de ratos (Krzemien et al., 2000))	1:100
Anti-Na _v 1.6 (camundongo)	Neuromab, EUA; K87A/10	SEDAIEEEGEDGVGSPRS (aa 459-476 da alça intracelular entre os domínios I-II do canal de ratos)	≈ 1 mg/ml 1:200
Anti-Na _v 1.1 (camundongo)	Neuromab, EUA; clone K74/71	aa 1929-2009 (término citoplasmático do canal de ratos)	≈ 1 mg/ml Várias diluições
Anti-Na _v 1.2 (camundongo)	Neuromab, EUA; clone K69/3	aa 1882-2005 (término citoplasmático do canal de ratos)	≈ 1 mg/ml 1:400
Anti-PAN-Na _v (coelho)	Sigma, S6936	KKFGGQDIFMTEEQKKYY (aa 1491-1508 da alça intracelular entre domínios III e IV do Nav1.1 de ratos)	1:200
Anti-Map-2 camundongo (MAb)	Millipore, MAB378	Reconhece MAP2A & B.	1:300
Anti-Map-2 coelho (PAb)	Millipore, AB5622	Isoformas MAP2A, MAP2B, MAP2C e MAP2D (maior imunoreatividade contra MAP2A e MAP2B).	1:400
Anti-anquirina-G camundongo	Invitrogen, 33-8800	Domínio de ligação com a espectrina	1:400
Anti-Ca _v 3.2 coelho	Alomone, ACC-025	(CHVEGPQERARVAHS) (aa 581-595 da alça intracelular entre domínios D1 e D2 de ratos)	1:150

Tabela 1- Anticorpos primários utilizados nos experimentos de imunomarcações.

4.5 COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE NISSL

Seções coronais e parasagittais do tecido foram coradas com violeta de cresila pelo método de Nissl e fotografadas por microscopia de campo claro para auxiliar na

análise anatômica e morfológica das regiões do DCN e do MNTB e na seleção das lâminas para o experimento de imunomarcção. A coloração de Nissl é uma das técnicas mais utilizada em laboratórios que trabalham com sistema nervoso. Esse método possibilita a evidência da substância de Nissl, presente no soma neuronal e constituída por RNA ribossomial que se concentra na membrana do retículo, mas predominantemente, no nucléolo. O corante básico, violeta de cresila, tem possibilitado bons resultados nas colorações dos grânulos de Nissl (ácidos) (Xavier, 1999).

As lâminas, retiradas do freezer (-80°C), foram acondicionadas em temperatura de refrigerador ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) em torno de 1 hora, em seguida, por 30 min, elas foram colocadas em temperatura ambiente (24°C) e depois, por mais 30 min, sobre a placa quente (40 °C). Essa sequência de passos visou evitar o choque térmico no tecido e o uso da placa quente foi realizado para garantir a aderência dos cortes. Lâminas preparadas a fresco foram colocadas na chapa quente cerca de uma hora após coleta dos cortes. Depois foram colocadas dentro do copo de Coplin (cuba) para passar por uma bateria de soluções respeitando os seguintes passos:

- Álcool 70%; Álcool 95%; Álcool 100% I; Álcool 100% II; Xilol I: 5 min cada um, dentro da capela de exaustão.

- Xilol II; Xilol I, Álcool 100% II; Álcool 100% I; Álcool 95%; Álcool 70%; Solução salina (NaCl a 0,9%): 3 min cada um, dentro da capela de exaustão.

- Em seguida, fora da capela de exaustão, colocou-se as lâminas recém saídas da solução salina em placa quente à 55° C por 12 min e gotejou-se, sem deixar secar, a solução de violeta de cresila (200 mL de água destilada com 1,36 g de acetato de sódio, retirou-se 100 mL dessa solução estoque e adicionou-se 0,1g de violeta de cresila) previamente preparada e filtrada em papel filtro.

- Retirou-se o excesso de corante com a solução salina por 2 min.

- Álcool 70% com Ácido Acético (2 mL de Ácido acético em 200 mL de Álcool 70%): 1 min.

- Álcool 95%; Álcool 100% I: 1 min cada um.

- Álcool 100% II: 2 min.

- Xilol I por 3 min e Xilol II por 5 min em capela de exaustão.

- 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 de campo claro *Leica DM*

6000 - *software LAS*) e (*Nikon Eclipse-E 200 - software Image Pro Plus 6.2*) para a análise anatômica e morfológica do DCN e MNTB.

4.6 MEDIDAS DA EXTENSÃO DO SEGMENTO INICIAL DO AXÔNIO E DA ÁREA SOMÁTICA

Os segmentos iniciais do axônio (AIS) que podiam ser identificados como pertencentes a um neurônio específico nas imagens confocais, tiveram seu comprimento medido (μm) com a utilização do *software Fiji/ImageJ 1.47*, assim como a área somática. 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 AIS foi reconstituído e sua extensão foi medida, assim como a área somática. As medidas, das áreas de silhueta somática e da extensão da marcação ao longo do AIS de possíveis células fusiformes, *cartwheel* e gigantes, foram distribuídas em planilhas do *Microsoft Excel* para análise estatística. A relação entre a extensão da marcação ao longo do AIS e da área de silhueta somática, das diferentes células do DCN e das células principais do MNTB, foi estudada com a utilização do *software Origin 7.5*.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas das extensões dos AIS e das áreas somáticas dos neurônios do DCN e das células principais do MNTB de ratos de 30 dias foram submetidas ao teste de *Grubbs*, para a detecção de valores que desviam substancialmente da média, utilizando-se o *software GraphPad* (disponível em: 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 $p \leq 0,05$. O teste de correlação linear de *Pearson* (r de -1 a 1) foi realizado para verificar a existência de correlação positiva entre a extensão da marcação ao longo do AIS e a área de silhueta somática das células nervosas avaliadas.

5. RESULTADOS

5.1 ANATOMIA DO SISTEMA AUDITIVO INFERIOR

A figura 6 apresenta secções coronais de 40 μm do tronco encefálico coradas pelo método de Nissl, contendo o CN e o MNTB. Nessa figura, é possível observar a morfologia e as subdivisões do CN nas partes dorsal (DCN) e ventral (VCN), assim como observar as estruturas anatômicas próximas a esse núcleo. Os painéis estão dispostos em uma ordem de progressão caudo-rostral sendo que o primeiro (A, indicado 0 μm) representa o limite caudal do CN e o último (G, +1680 μm) onde o MNTB aparece exuberante. O painel 6A ilustra o limite caudal do DCN, envolvido lateralmente pelo cerebelo (CE) e plexo coróide (CP) e medialmente pelo pedúnculo cerebelar inferior (ICP). Em 6B (+240 μm rostral) o DCN aparece mais evidente. Em 6C (+640 μm), além do DCN, a subdivisão ventral (VCN) é observada. Essa região do VCN é conhecida como pósterio-ventral (PVCN). Em 6D (+880 μm), o DCN encontra-se menor, visto ser esse o extremo rostral do mesmo. Nesse corte o VCN é que aparece como a maior subdivisão do CN. Em 6E já se pode notar o corpo trapezoidal (Tz, ou estria acústica ventral) formado pelos axônios das células em arbusto do VCN, projetando para núcleos olivares superiores. Em 6F (+1440 μm), o ramo vestibular do nervo vestibulo-coclear (8vn) e o nervo facial (7cn) podem ser observados. (G) Corte mais rostral (1640 μm) onde o 7 cn (nervo facial) pode ser visto apenas próximo de sua emergência na borda ventral e não mais atravessando quase totalmente a ponte no sentido dorso-ventral. Nessa altura da sequência caudo-rostral, o núcleo medial do corpo trapezoidal (MNTB, seta) desponta exuberante, lateralmente ao trato córtico-espinhal-lateral (Py), bem como a oliva lateral superior (LSO) e oliva medial superior (MSO). O MNTB nesse nível é mostrado em maior magnificação em H (seta).

Alguns dos resultados relativos ao DCN que serão apresentados nessa dissertação foram feitos em cortes coronais que se assemelham aqueles mostrados nos painéis B e C, enquanto os resultados referentes ao MNTB em cortes que se assemelham aquele mostrado em G e H.

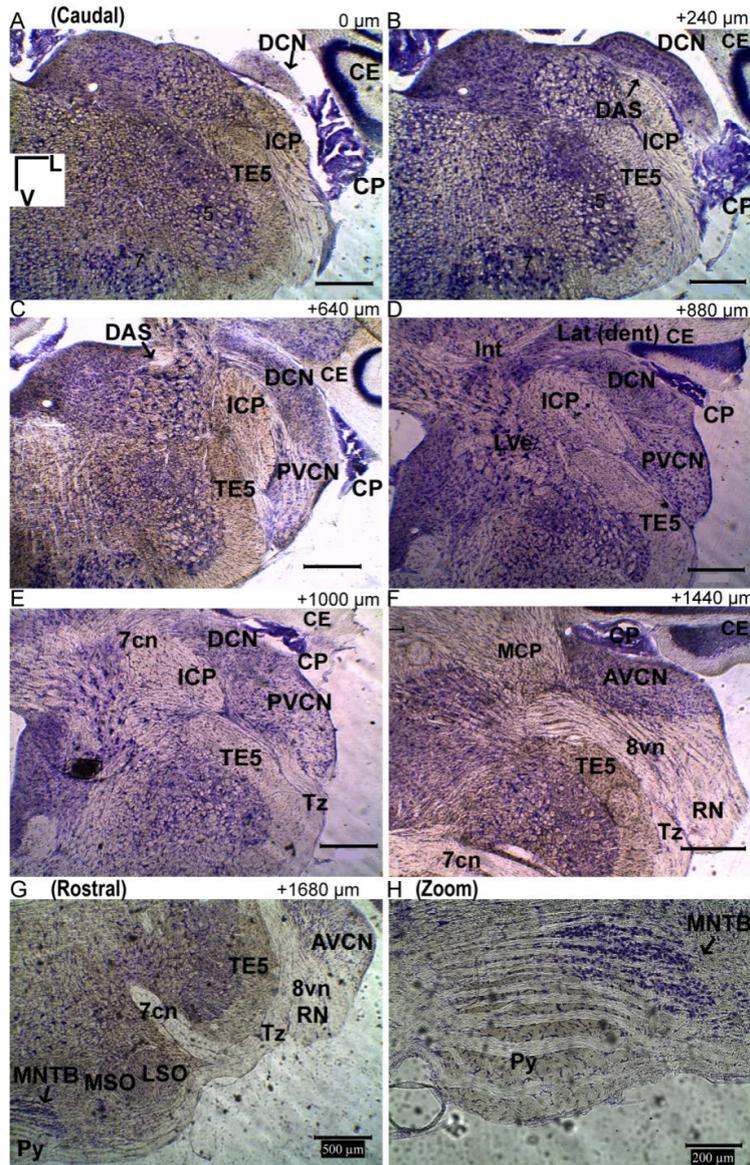


Figura 6- Anatomia do sistema auditivo inferior (núcleos cocleares e olivares superiores). Cortes coronais de 40 μm da parte rostral do bulbo e caudal da ponte corados pelo método de Nissl. **A**, Secção que ilustra o extremo caudal do núcleo coclear dorsal (DCN) (0 μm) e estruturas anatômicas vizinhas: cerebelo (CE), plexo coróide (CP), pedúnculo cerebelar inferior (ICP) e o trato trigeminal espinal (TE5). **B**, DCN num corte 240 μm rostral ao mostrado em A. **C**, Núcleo coclear (+ 640 μm) contendo tanto o DCN quanto o PVCN (posterior-ventral). **D**, DCN (+880 μm) onde o mesmo apresenta-se menor enquanto o PVCN está exuberante. **E**, Secção que ilustra o extremo rostral do DCN (+1000 μm) onde também pode ser observado o corpo trapezoidal (TZ). **F**, Secção (+1560 μm) contendo a raiz nervosa (NR) do nervo auditivo (8cn) e do vestibulo-coclear. O nervo facial (7 cn) e núcleos da oliva superior como o lateral (LSO), o medial (MSO) e o núcleo medial do corpo trapezóide (MNTB) (seta) também estão presentes. **G**, secção (+1640 μm) onde o MNTB desponta exuberante, lateralmente ao trato cortico-espinal-lateral (Py). Nesse nível o nervo facial (7 cn) não atravessa por completo a ponte no sentido dorso-ventral, embora parte de suas fibras ainda emergem ventralmente. **H**, maior magnificação do MNTB (seta).

5.2 EXPRESSÃO DO CANAL Na_v1.6 EM NEURÔNIOS DO DCN

A figura 7 ilustra o resultado da análise da expressão do canal Na_v1.6 em cortes parasagittais do CN. Esses experimentos foram feitos utilizando dupla-marcação sendo o anticorpo anti-Map-2 usado para análise morfológica do neurônio onde se observou a expressão do canal Na_v1.6. A secção mostrada em 7A ilustra a marcação anti-Map-2 na borda dorsal do DCN onde pode ser observado um emaranhado de dendritos e corpos celulares de maior e menor diâmetro. Em 1, maior aumento da área delimitada pelo retângulo 1 em 7A, com a marcação anti-Na_v1.6 (PAb-1) ao longo do AIS medindo 18 µm de extensão. Em 1', superposição das duas marcações, onde pode ser observada a morfologia do neurônio do qual deriva o AIS (seta). A área de silhueta somática (134 µm²) e a localização são sugestivos de se tratar de uma célula *cartwheel*. Em 2, tem-se o maior aumento do retângulo 2 em 7A, onde os asteriscos indicam células da camada de célula fusiformes (FCL) com seus dendritos apicais e basais. Em 2', tem-se uma marcação sutil do soma e evidente dos AIS e nodos de Ranvier. *Inset*, indica a marcação de células de Purkinje usada como controle positivo endógeno da reação. Em 2'', tem-se a superposição das imagens onde se observa uma célula fusiforme (seta), com área em torno de 312 µm², à qual um AIS pode ser inequivocamente associado. Em 7B é observada a marcação anti-Map-2 na borda do DCN de outro corte parasagittal exibindo a típica alta densidade de dendritos. Em 7C tem-se a marcação anti-Na_v1.6 (PAb-2) obtida com um segundo anticorpo policlonal (Dr. Rock Levinson - UCHSC) com padrão de marcação semelhante àquele observado com o anticorpo comercial PAb-1, ou seja, uma marcação pronunciada dos AIS, cuja extensão da marcação anti-Na_v1.6 é indicada. *Inset*, AIS de células de Purkinje usados como controle positivo endógeno da reação. Em 7D tem-se a superposição das imagens com indicação das áreas de silhueta somática das prováveis células *cartwheel* cujos AIS são indicados em 7B. Em 7E, tem-se a marcação anti-Map-2 (PAb) em borda do DCN de outro corte parasagittal. Em 7F, tem-se a reação obtida com um terceiro anticorpo anti-Na_v1.6 (MAb), também mantendo o mesmo padrão de marcação semelhante àqueles observados com os anticorpos PAb-1 e PAb-2, ou seja, a localização do canal Na_v1.6 ao longo dos AIS (seta). *Inset*, AIS de células de Purkinje usados como controle positivo endógeno da reação. Em 7G tem-se a superposição das imagens com indicação da área de silhueta somática de uma provável célula *cartwheel* cujo AIS é indicado em 7F.

Além da marcação de células de Purkinje cerebelares como controle positivo interno para a marcação do canal $\text{Na}_v1.6$ (figura 7) com o anticorpo da Alomone (PAb-1), realizou-se experimentos para o controle negativo desse das reações de imunofluorescência com esse mesmo anticorpo. O controle dessa reação foi feito pela omissão do anticorpo primário em algumas reações onde não foi observada marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) (dados não mostrados). Em outras reações o controle foi feito pela pré-incubação com o peptídeo antigênico como ilustrado na figura 8. Nessa figura é ilustrada a reação de imuno anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) no DCN (A) e MNTB (C). Em cortes adjacentes (B e D), a reação foi desenvolvida da mesma forma, exceto que o anticorpo anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) foi pré-incubado com seu peptídeo antigênico, anteriormente à aplicação nos cortes. Em 8A e 8C observa-se marcação de nodos de Ranvier (puntiforme), uma sutil marcação somática em algumas células e proeminente marcação de vários AIS (setas). Em 8B e 8D, cujas imagens foram adquiridas com os mesmos ajustes confocais, pode-se observar a ausência total de marcação devido à pré-incubação do anticorpo primário anti- $\text{Na}_v 1.6$ (PAb-1) com o peptídeo antigênico.

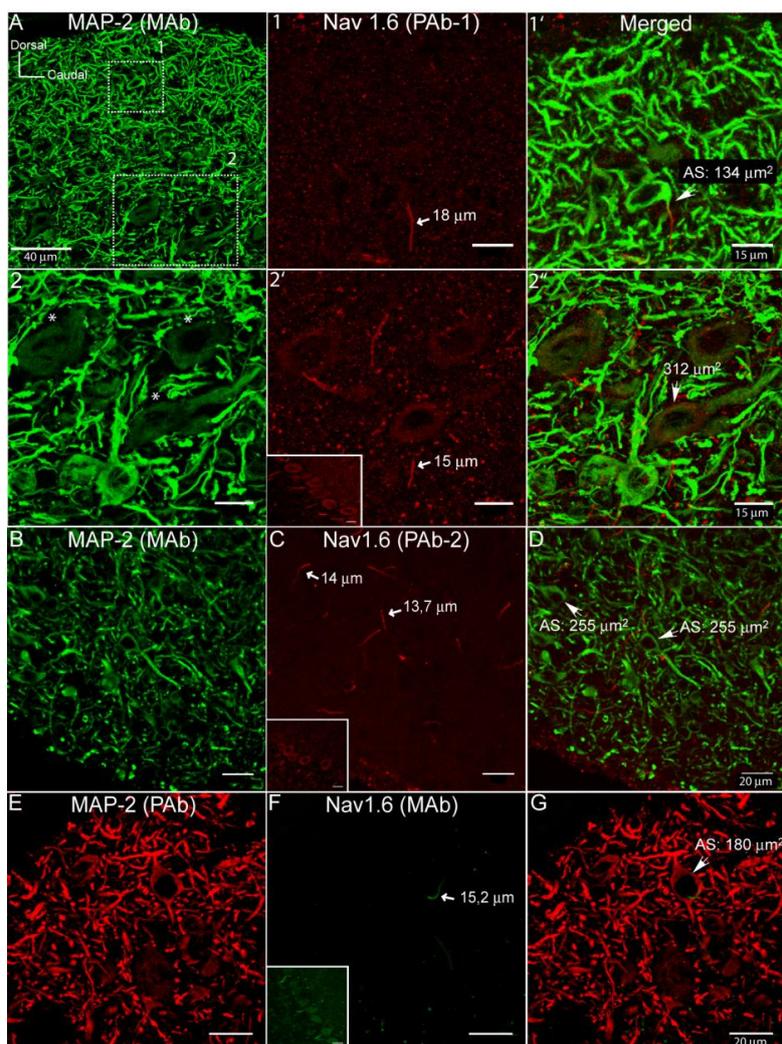


Figura 7- Expressão do canal $Na_v1.6$ em neurônios do DCN. A, única secção confocal no eixo Z ilustrando a marcação somato-dendrítica anti-Map-2 (Mab) em corte parassagital do DCN. **1**, marcação anti- $Na_v1.6$ (PAb-1) em um AIS (seta) observado na região delimitada em A (1) de 18 μm de extensão. **1'**, sobreposição da marcação anti- $Na_v1.6$ e anti-Map-2 dessa mesma área indicando a área de silhueta somática (134 μm^2) de uma provável célula *cartwheel*. **2**, magnificação da área delimitada em A (2) da marcação anti-Map-2 de uma área contendo células fusiformes (*). **2'**, embora múltiplos AIS possam ser observados, apenas um (seta) foi associado inequivocamente a uma célula fusiforme. **2''** sobreposição da marcação anti- $Na_v1.6$ e anti-Map-2 indicando a área da célula indicada (312 μm^2). 1 e 1'; 2 e 2': projeção do tipo MIF de 13 secções confocais ($Z=0,34$) e 20 secções confocais ($Z=0,21$), respectivamente. *Inset*, única secção confocal no eixo Z onde se observa a marcação de AIS de células de Purkinje usada como controle positivo endógeno da reação. **B**, marcação anti-Map-2. **C**, marcação obtida um segundo anticorpo anti- $Na_v1.6$ (PAb-2) com indicação da extensão da mesma ao longo dos AIS indicados e controle positivo no cerebelo ilustrado por uma projeção do tipo MIF de 4 secções confocais ($Z=1,05$) (*inset*). B e C: 2 secções confocais ($Z=1,05$). **D**, sobreposição das marcações com indicação das respectivas áreas de silhueta somática. **E**, marcação anti-Map-2 (Pab) de outra área do DCN. **F**, padrão de marcação de um terceiro anticorpo anti- $Na_v1.6$ (Mab) com indicação da marcação ao longo do AIS indicado (seta; 15,2 μm). **G**, sobreposição da marcação com indicação da área de silhueta de uma provável célula *cartwheel* da qual deriva o AIS indicado em B. E e F: projeções do tipo MIF de 7 secções ($Z=0,72$). *Inset*, marcação de AIS de células de Purkinje, usada como controle positivo endógeno da reação, ilustrada pela projeção do tipo MIF de 9 secções confocais ($Z=0,72$).

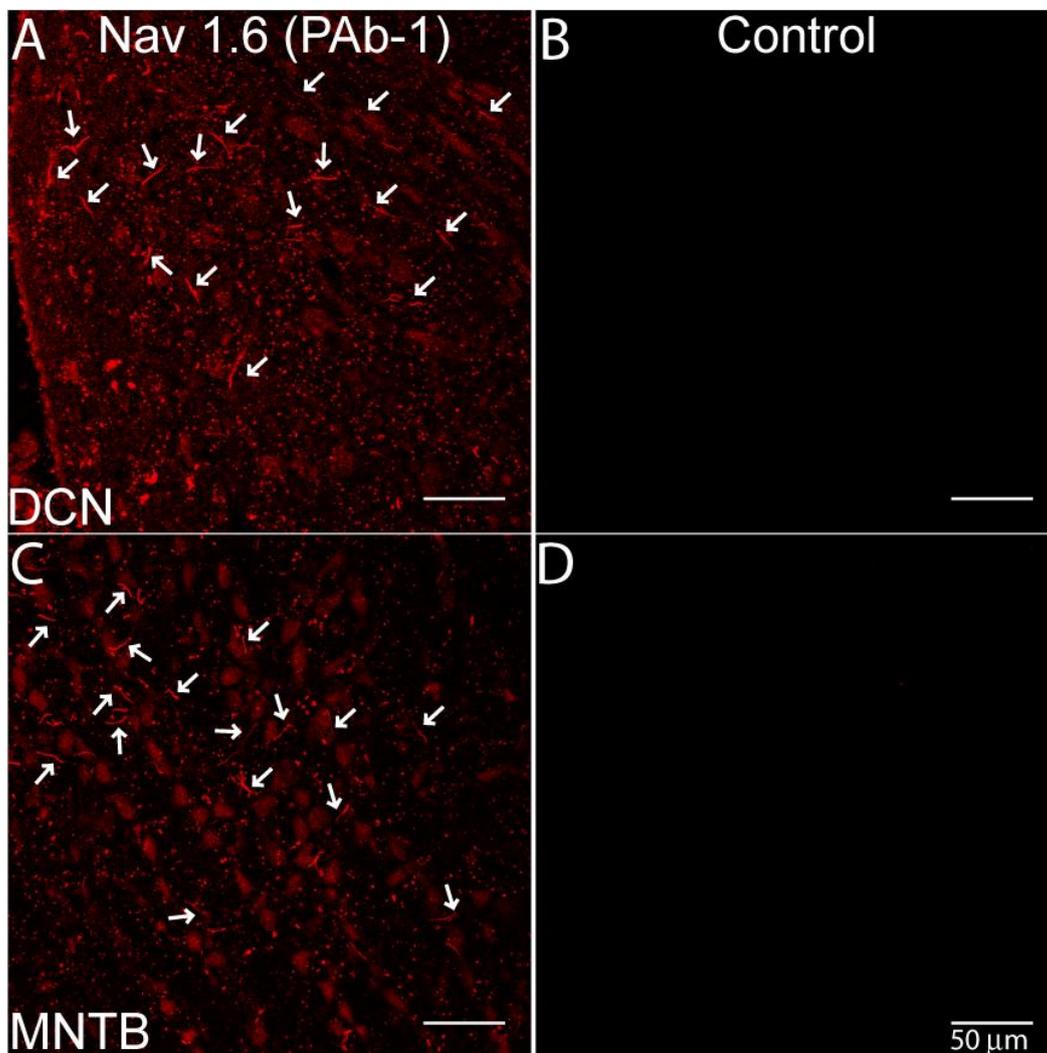


Figura 8- Controle da reação de imunofluorescência do anticorpo anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) em ratos de 30 dias. Reação positiva da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) no DCN (A) ou MNTB (C) em cortes nos quais a reação foi realizada com a incubação com o anticorpo primário. A e C: projeção do tipo MIF de 10 secções confocais ($Z=0,80$) e 11 secções confocais ($Z=0,80$), respectivamente. Cortes adjacentes aos mostrados em A e C, onde o anticorpo primário foi pré-incubado com o peptídeo antigênico (B e D, respectivamente). B e D: projeção do tipo MIF de 29 secções confocais ($Z=0,80$) e 20 secções confocais ($Z=0,80$), respectivamente. Setas em A e C indicam AISs marcados pelo anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1). Os ajustes para aquisição das imagens no confocal foram os mesmos em A e B ou em C e D.

Com o intuito de conseguir melhores detalhes da morfologia e da distribuição dos neurônios do DCN, foram feitos experimentos de dupla-marcação em cortes parasagittais espessos (150 μm) obtidos no vibrátomo (sem congelamento tecidual). A figura 9 mostra os resultados de reações de imunofluorescência de dupla-marcação para Map-2 e Nav1.6 (PAb-1). Nessa figura, a região do DCN na qual a aquisição foi direcionada é aquela correspondente ao terço anterior. A micrografia A, representa uma única secção confocal no eixo Z da marcação anti-Map-2 observada em menor magnificação. As células indicadas pelos dígitos 1, 2, 3 foram identificadas como células fusiformes enquanto as indicadas como 4, 5 e 6 correspondem a prováveis células *cartwheel*. Em 1', 2' e 3' pode ser observado a marcação anti-Nav1.6 (PAb-1) nas células fusiformes onde as setas indicam os AIS com exuberante expressão do canal Nav1.6. Em 1'', 2'', e 3'' é mostrado a superposição das marcações com indicação das áreas de silhuetas somáticas. Pode ser observado que nessas células o processo do qual o AIS deriva apresenta uma marcação anti-Map-2 que se estende até o AIS. Essa característica permitiu uma associação inequívoca entre soma e AIS. Em 4', 5' e 6', a marcação anti-Nav1.6 (PAb-1) ao longo dos AIS das células *cartwheel* são indicadas. A superposição das marcações (4'', 5'' e 6'') também indica que nessas células, os AIS marcados com o anti-Nav1.6 (PAb-1), derivam de processos somáticos Map-2 positivos na sua parte inicial.

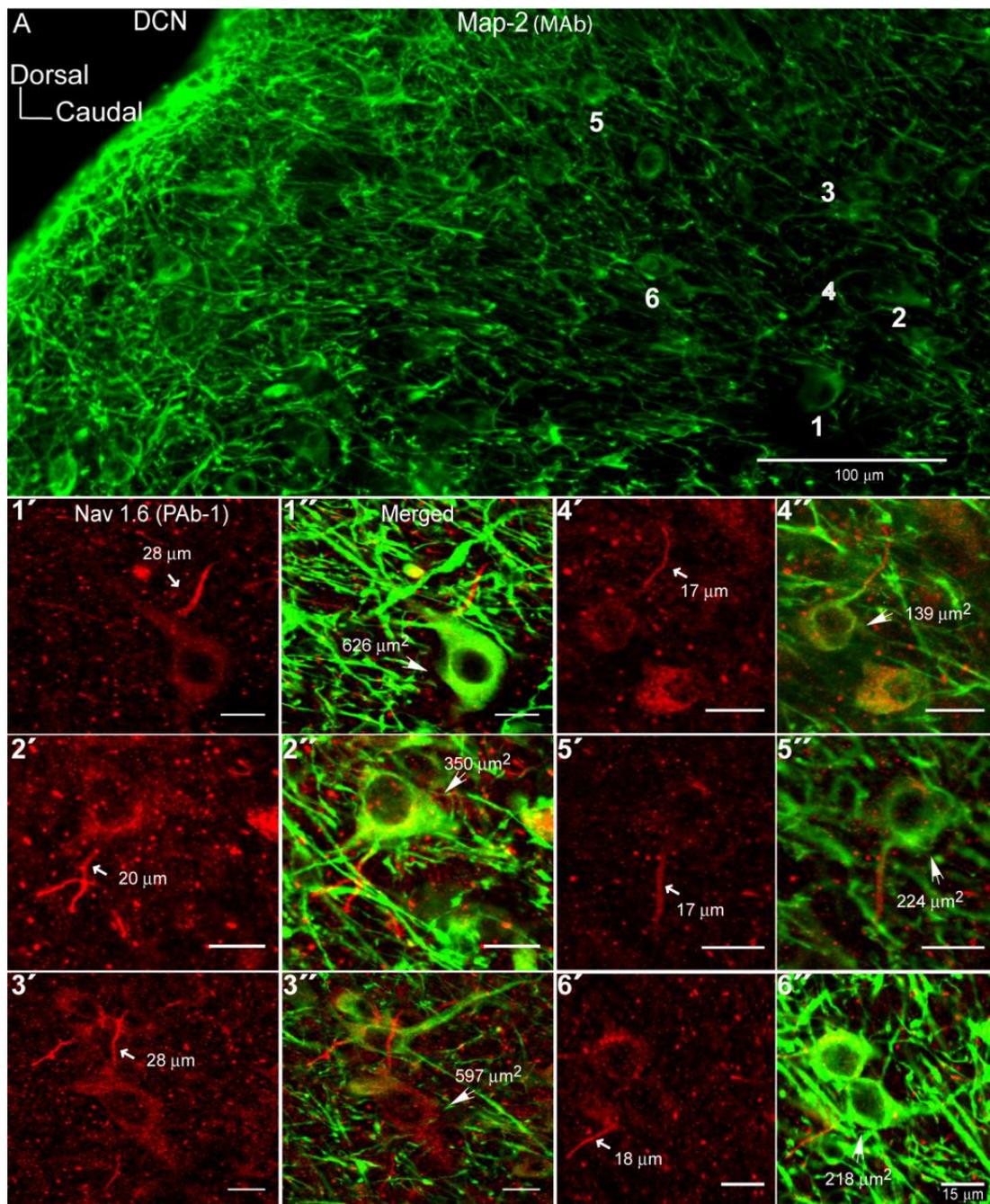


Figura 9- Análise da expressão do canal $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) nas células fusiformes e *cartwheel* do DCN utilizando cortes espessos no vibrátomo ($150 \mu\text{m}$). A, uma única secção confocal no eixo Z ilustrando a marcação somato-dendrítica anti-Map-2 em uma área do DCN. Os números indicam os neurônios que foram avaliados quanto a morfologia, localização e expressão do canal. 1', 2' e 3', marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) e indicação da extensão da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) ao longo dos AIS avaliados (setas). 1'', 2'' e 3'' superposição das marcações anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) e anti-Map-2. As setas indicam as células identificadas como fusiformes cujas áreas de silhueta somáticas são indicadas (setas). 4', 5' e 6', marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) e indicação dos AIS avaliados (setas). 4'', 5'' e 6'', superposição das marcações anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) e anti-MAP-2. As setas indicam as células identificadas como *cartwheel* cujas áreas de silhueta somáticas são indicadas (setas). 1'- 6': projeções do tipo MIF de 4 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$), respectivamente.

Além das células fusiformes e *cartwheel*, este trabalho também buscou avaliar se as células gigantes do DCN também expressam a isoforma $\text{Na}_v1.6$ de canais de sódio. À semelhança dos experimentos mostrados, utilizou-se de dupla-marcação em cortes espessos no vibrátomo, não apenas para preservar a morfologia e caracterizar a localização dessa célula, mas também, para aumentar a chance de se conseguir encontrar esse raro subtipo celular do DCN. A figura 10 ilustra os resultados dessas reações de imunofluorescência anti-Map-2 e anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1). Em 10A tem-se a marcação somático-dendrítica obtida com Map-2 de uma única secção confocal, que evidencia uma célula gigante (retângulo) entre uma população de possíveis células tuberculoventrais. Em 1 tem-se a maior magnificação da célula delimitada pelo retângulo em A, cujo extensão da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ no AIS foi de 45 μm (seta). Nenhuma marcação somática foi evidenciada nessa célula. Em 1' é mostrado a superposição das marcações com a indicação da área de silhueta somática. Os painéis 10B e 10C ilustram essas marcações em uma célula gigante de outro animal. A extensão da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ no AIS foi semelhante (43 μm) e está indicada pela seta em 10B. Esse AIS pode ser identificado como derivado do soma da célula gigante indicada em 10C, cuja área somática foi de 1046 μm^2 .

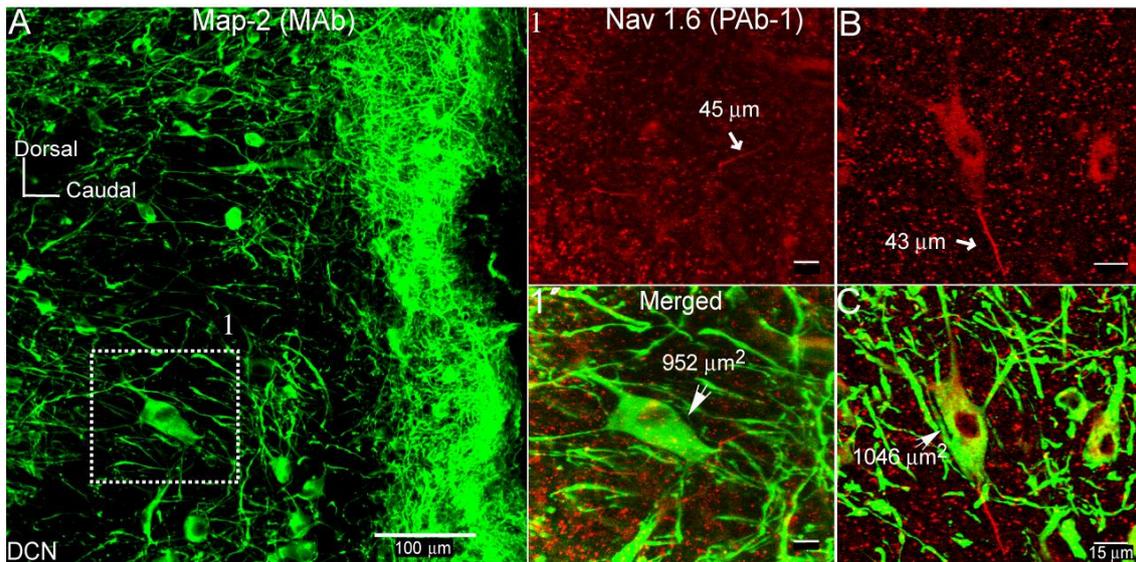


Figura 10- Análise da expressão do canal $Na_v1.6$ (PAB-1) nas células gigantes do DCN utilizando cortes espessos no vibrátomo ($150 \mu\text{m}$). A, uma única secção confocal no eixo Z da marcação anti-Map-2 no DCN observado em menor magnificação. 1, maior aumento da área delimitada em A marcada com o anticorpo anti- $Na_v1.6$ (PAB-1) onde a seta indica a expressão do canal ao longo do AIS ($45 \mu\text{m}$). 1', sobreposição da marcação anti-Nav1.6 (PAB-1) e anti-Map-2 mostrando a conexão soma-cone de implantação-AIS. A área de silhueta somática medida dessa célula gigante foi de $952 \mu\text{m}^2$. 1 e 1': projeções do MIF de 4 secções confocais no eixo Z ($0,72 \mu\text{m}$). B, imunomarcacção anti- $Na_v1.6$ (PAB-1) em uma célula gigante (área de silhueta somática de $1406 \mu\text{m}^2$) de outro corte, com seta indicando o AIS intensamente marcado ($43 \mu\text{m}$). C, sobreposição da marcação anti- $Na_v1.6$ e anti-Map-2. B e C: projeções do tipo MIF de 4 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$).

A Tabela 2 ilustra a média da área de silhueta somática e da extensão de marcação anti-Na_v1.6 (PAb-1) ao longo do AIS de três populações de células analisadas do DCN (fusiformes, *cartwheel* e gigantes). As células fusiformes (FC) apresentaram uma área de silhueta somática média em torno de $423,9 \pm 43,6 \mu\text{m}^2$; *cartwheel* (CWC), em torno de $181,5 \pm 16,3 \mu\text{m}^2$ e gigantes (GC), $1119,3 \pm 123,4 \mu\text{m}^2$, sendo estas últimas raramente encontradas em nossos experimentos. A análise estatística entre esses valores foi significativa: entre FC e CWC, $p= 0,00015$; entre FC e GC, $p= 0,00007$; entre CWC e GC, $p= 0,000001$. A média da extensão da marcação anti-Na_v1.6 (PAb-1) ao longo dos AIS também foi calculada, onde se encontrou $22,5 \pm 1,8 \mu\text{m}$ nas FC; $17,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$ nas CWC e $45,3 \pm 1,5 \mu\text{m}$ nas GC. A análise estatística entre os valores da marcação anti-Na_v1.6 (PAb-1) ao longo do AIS também se mostrou significativa entre FC e CWC, com $p= 0,02234$; entre FC e GC, com $p= 0,00006$ e entre CWC e GC, com $p= 0,000001$.

Não houve uma correlação significativa entre as áreas de silhuetas somáticas e a extensão da marcação anti-Na_v1.6 (PAb-1) no AIS das FC, com $p= 0,21$ e $r= 0,50$, como também não houve uma correlação significativa entre as área de silhueta somática e a extensão de marcação anti-Na_v1.6 (PAb-1) ao longo do AIS das CWC, com $p= 0,48$ e $r= 0,29$; sendo $p \leq 0,05$. Não realizamos a correlação entre a extensão de marcação ao longo dos AIS e da área de silhueta somática em GC, uma vez que foram encontradas somente 3 células dessa população.

CÉLULAS FUSIFORMES		CÉLULAS CARTWHEEL		CÉLULAS GIGANTES	
ÁREA DE SILHUETA SOMÁTICA (μm^2)	EXTENSÃO DA MARCAÇÃO NA _v 1.6 (μm)	ÁREA DE SILHUETA SOMÁTICA (μm^2)	EXTENSÃO DA MARCAÇÃO NA _v 1.6 (μm)	ÁREA DE SILHUETA SOMÁTICA (μm^2)	EXTENSÃO DA MARCAÇÃO NA _v 1.6 (μm)
308	25	123	18	952	45
310	26	134	18	1.046	43
312	15	139	17	1.360	48
350	20	168	15		
435	20	205	19		
453	17	218	18		
597	28	224	17		
626	28	241	19		
Média ± EPM $423,9 \pm 43,6$ (n=8)	Média ± EPM $22,5 \pm 1,8$	Média±EPM $181,5 \pm 16,3$ (n=8)	Média ± EPM $17,6 \pm 0,5$	Média ± EPM $1.119,3 \pm 123,4$ (n=3)	Média ± EPM $45,3 \pm 1,5$

Tabela 2- Análise da área de silhueta somática e da extensão da marcação anti-Na_v 1.6 (PAb-1) ao longo do AIS em neurônios do DCN.

Em cultura de neurônios, alguns relatos da literatura indicam que a proteína anquirina-G exerce papel fundamental na formação e manutenção do AIS, incluindo a ancoragem de canais de sódio nesse domínio celular (Hedstrom et al., 2007; Susuki, Rasband, 2008). A figura 11 demonstra os resultados de reações de imunofluorescência utilizando anticorpos anti-anquirina-G (AnK-G) e anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1). Em 11A tem-se a marcação anti-AnK-G no DCN. Pode ser observada uma marcação de um grande número de processos neuronais. Na figura 11B é mostrada a marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) nessa mesma região e onde as setas indicam os AIS de neurônios do DCN. Na sobreposição dessas imagens em 11C, observa-se a colocalização das marcações em alguns dos processos que provavelmente se tratam de AIS. Os painéis 11D, 11E e 11F, um único AIS de outro corte do DCN com essas duas marcações. Nos experimentos realizados com o anticorpo anti-AnK-G e anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) também usamos como controle positivo endógeno da reação a marcação nas células de Purkinje do cerebelo, conhecida por expressar os canais $\text{Na}_v1.6$ nos seus AIS (Raman, Bean, 2001; Afshari et al., 2004). Marcação anti-AnK-G, anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) e sobreposição das imagens pode ser vista nos painéis 11G, 11H e 11I, respectivamente. Observe na figura 11I a colocalização (amarelo) da marcação nos AIS das células da camada de Purkinje (FCL).

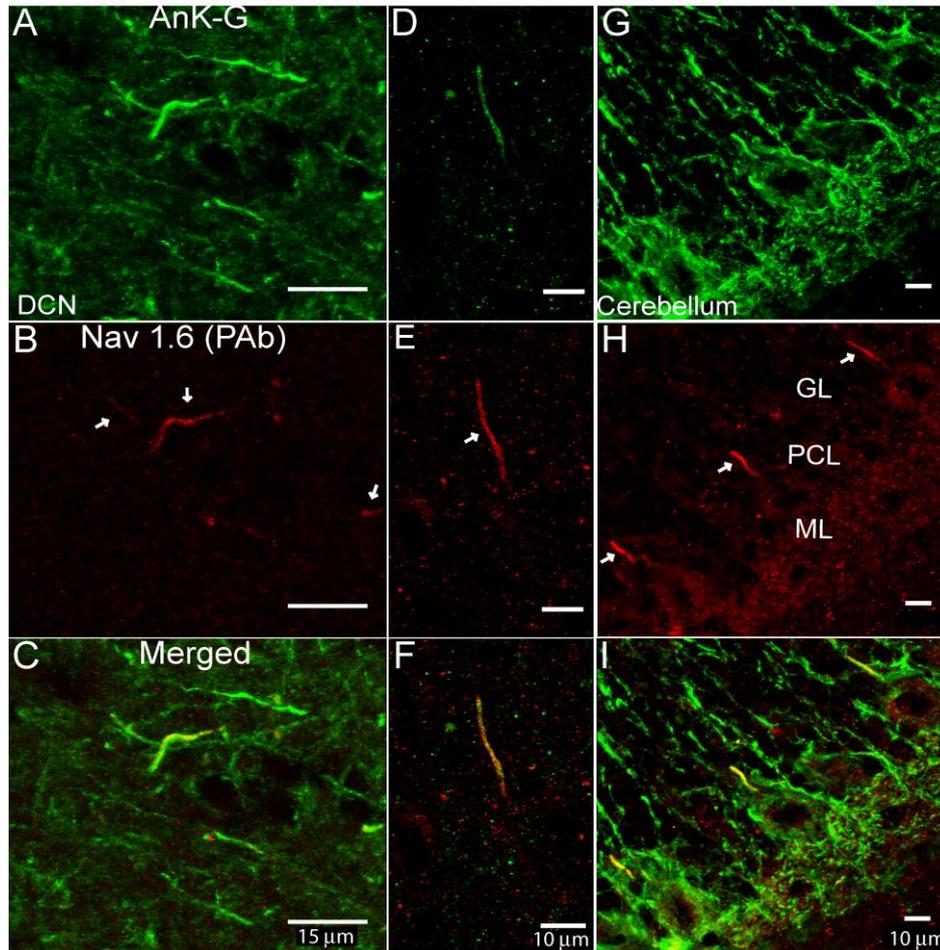


Figura 11– Colocalização de AnK-G e do canal $Na_v1.6$ no AIS de neurônios do DCN. Imunofluorescência anti-AnK-G (A), anti- $Na_v1.6$ (B) e sobreposição das marcações (C). A e B: projeção de uma única secção confocal no eixo Z. D-F, imunofluorescência anti-AnK-G, anti- $Na_v1.6$ (PAb-1) e sobreposição dessas marcações em um único AIS de um neurônio de outro corte do DCN. G-I, marcação anti AnK-G, anti- $Na_v1.6$ (PAb-1) e sobreposição das marcações, respectivamente no córtex cerebelar usado como controle positivo interno das reações. Setas em B e E indicam a marcação dos AIS dos neurônios do DCN e em H nas células de Purkinje. ML-camada molecular; GL-camada granular; FCL-camada de células de Purkinje. D e E; G e H: projeções do tipo MIF de 2 secções confocais ($Z=1,05 \mu m$) e de 5 secções confocais ($Z=1,05 \mu m$), respectivamente.

Bender & Trussell (2009), demonstraram a presença de transientes de Ca^{2+} voltagem dependentes nas CWC do DCN. Embora esses autores não tenham demonstrado a isoforma de canais de Ca^{2+} presente, eles demonstraram que o influxo de Ca^{2+} está presente tanto no soma quanto no AIS dessas células. Para os autores, uma das isoformas de canais de Ca^{2+} que pode ser expressa no DCN é a $\text{Ca}_v3.2$, conhecida por mediar correntes de Ca^{2+} transientes de baixo limiar. MacKey et al., (2006) observaram a presença dessa isoforma em neurônios piramidais, cuja marcação se estendeu por todo soma e dendritos apicais. Na figura 12A tem-se uma única secção confocal no eixo Z que ilustra a marcação anti-Map-2 na extremidade dorsal do DCN em corte coronal. Em 12A' tem-se a marcação para o canal $\text{Ca}_v3.2$, onde se observa uma marcação somática de algumas células dessa região. Em 12A'', tem-se a superposição das imagens, onde se observa a colocalização dessas marcações em células localizadas na camada molecular (ML) e na camada das células fusiformes (FCL). A localização dessas células é compatível com a descrita para as CWC. A análise da área de silhueta somática dessas células $\text{Ca}_v3.2$ positivas indicou uma média de $165 \pm 2 \mu\text{m}^2$, $n=11$. A comparação estatística dos valores da área de silhueta somática dos experimentos usando anti-Map-2 e anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) ($181,5 \pm 6,1$; vide tabela 2) e daqueles que utilizaram anti-Map-2 e anti- $\text{Ca}_v3.2$ não revelou diferença estatisticamente significativa. As áreas delimitadas em A' são mostradas nos painéis 1 e 2 em maior magnificação e ilustram a marcação somática anti- $\text{Ca}_v3.2$. Podem ser observados, próximos a algumas células CWC, alguns processos finos e de pequena extensão marcados com anti- $\text{Ca}_v3.2$ (setas). Os painéis 11B a 11B'' são representativos de outro experimento, realizado sob as mesmas condições, onde foi observado o mesmo padrão de marcação anti- $\text{Ca}_v3.2$, ou seja, colocalização somática com Map-2 das CWC e a marcação de alguns processos (setas).

Após a evidenciação do canal $\text{Ca}_v3.2$ no soma das CWC e em processos neuronais próximos à essas células, foram feitos experimentos usando anti- $\text{Ca}_v3.2$ e anti- $\text{Na}_v1.6$ (MAb) com o objetivo de verificar se esses processos próximos às CWC ($\text{Ca}_v3.2$ positivos) são parte do AIS dessas células e se colocalizam com a marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (MAb) característica, encontrada no AIS dessas células (Figura 7 e 9). Nos painéis 12C e 12C' tem-se a imunofluorescência anti- $\text{Na}_v1.6$ (MAb-1) e anti- $\text{Ca}_v3.2$ na ML do DCN. Observa-se a marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (MAb) (verde) ao longo dos AIS e a marcação anti- $\text{Ca}_v3.2$ (vermelha) no soma e em processos neuronais (setas). No painel 12C'', que representa a sobreposição das marcações, observa-se uma ausência de colocalização das marcações. Os AIS marcados são de calibre maior que os processos $\text{Ca}_v3.2$ positivos.

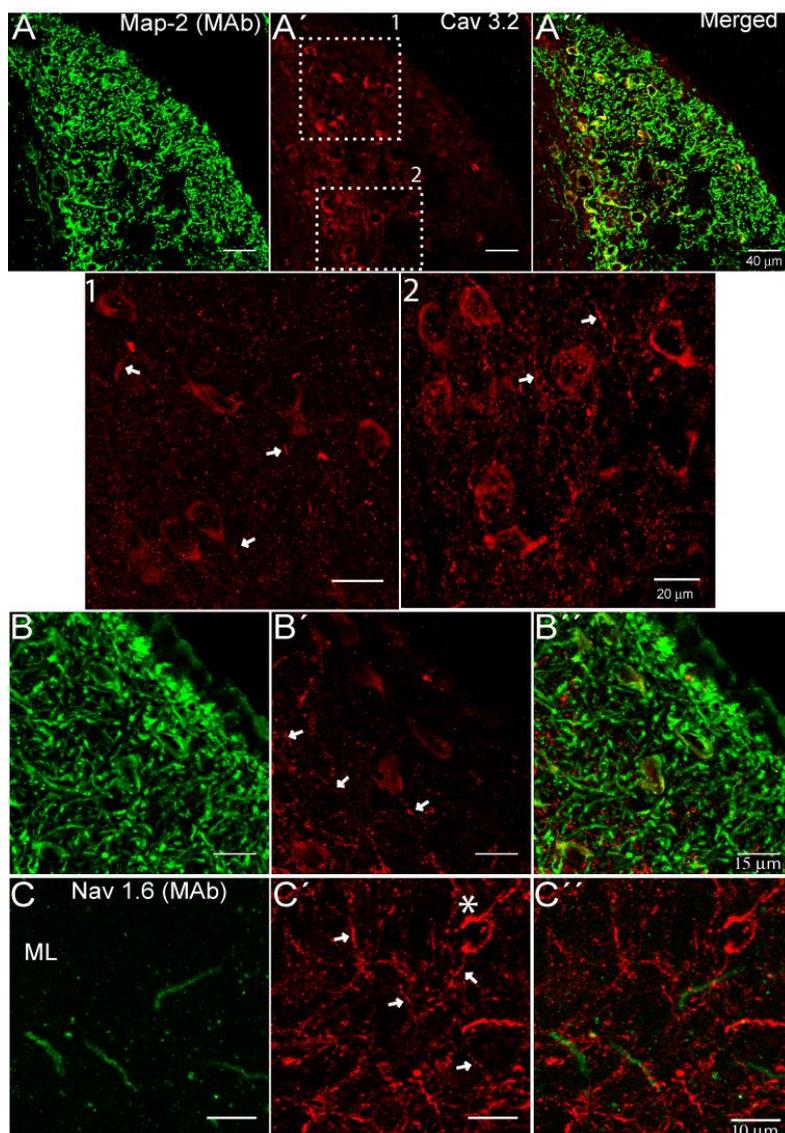


Figura 12- Ausência de colocalização dos canais $\text{Na}_v1.6$ (MAB) e $\text{Ca}_v3.2$ nos AIS de neurônios do DCN. A, uma única secção confocal no eixo Z ilustrando a marcação somático-dendrítica para a proteína Map-2 na extremidade dorsal do DCN em corte coronal. A', ilustra a marcação para o canal de cálcio $\text{Ca}_v3.2$ em neurônios do DCN. A'', superposição das marcações anti-Map-2 (verde) e anti- $\text{Ca}_v3.2$ (vermelho). 1 e 2, maior magnificação das áreas delimitadas em A' com indicação das áreas de silhueta somáticas. 1 e 2: projeções do tipo MIF de 10 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$) e de 5 secções confocais ($Z=1,22 \mu\text{m}$), respectivamente. B-B'', imunofluorescência anti-Map-2 e anti- $\text{Ca}_v 3.2$ (com indicação de área somática no DCN) e sobreposição das imagens de outro corte coronal realizado sob as mesmas condições. B e B': projeções do tipo MIF de 4 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$). C e C', projeções do tipo MIF de 2 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$) ilustrando a imunofluorescência anti- $\text{Na}_v1.6$ (verde; MAB) e anti- $\text{Ca}_v3.2$ (vermelho), respectivamente, onde se observa a marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (MAB) ao longo dos AIS e anti- $\text{Ca}_v3.2$ em outros distintos processos neuronais (setas). Em C'' sobreposição das marcações mostrando uma ausência de colocalização. Setas em 1, 2, B' e C' indicam finos processos neuronais marcados com anti- $\text{Ca}_v3.2$ e * indica uma provável CWC.

5.3 ESTUDO DA EXPRESSÃO DE CANAIS PARA SÓDIO NO MNTB

Os experimentos de imuno-deteção de canais de sódio voltagem-dependentes no MNTB foram iniciados com um anticorpo PAN- Na_v que reconhece as diferentes isoformas já descritas na literatura por se ligar a um epítipo comum a elas. Em 13A tem-se uma visão panorâmica das células principais do MNTB marcadas com anticorpos anti-Map-2 policlonal (PAb) mostrando uma população relativamente homogênea e que não apresenta um arborização dendrítica extensa. Os retângulos numerados 1 e 2 são mostrados à direita em maior resolução e ilustram os resultados de dupla marcação com anti-PAN- Na_v (painéis 1 e 2) e a superposição com anti-Map-2 (1' e 2'), onde se pode notar a marcação intensa com anti-PAN- Na_v nos AIS (setas), possíveis heminodos terminais seccionados (cabeça de seta) e marcação puntiforme nos nodos de Ranvier. A marcação anti-Map-2 é observada nos corpos celulares e dendritos de neurônios do MNTB (e.g. painel 1' e 2') e se estende ao longo de um processo somático que dá origem ao axônio, mas decai ao longo do AIS. Em nossos experimentos observou-se que em 100% dos neurônios, os processos somáticos dos quais os AIS derivam, apresentaram-se Map-2 (PAb) positivos.

Em 13B tem-se a relação entre a silhueta de área somática de cada neurônio e a extensão da marcação anti-PAN- Na_v ao longo de seu respectivo AIS. Durante a análise desses dados, utilizando-se o teste de *Grubbs* ($p \leq 0,05$), nenhuma célula foi retirada do “pool” ($n = 11$) analisado, devido a desvio significativo da média, tanto para área somática quanto para a extensão da marcação anti-PAN- Na_v ao longo do AIS. A média das medidas da área de silhueta somática dos neurônios do MNTB, baseada na marcação anti-Map-2, foi de $275 \pm 13 \mu\text{m}^2$ ($n=11$) e da marcação anti-PAN- Na_v ao longo do AIS foi de $19 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ($n=11$). Não foi observada uma correlação significativa entre as medidas das áreas de silhueta somática e a extensão da marcação anti-PAN- Na_v ao longo do AIS das células analisadas, com $P=0,11$ e $r=0,51$.

Após a obtenção de uma marcação anti- Na_v não seletiva às diferentes isoformas utilizando o anticorpo anti-PAN- Na_v , iniciamos o estudo da isoforma Na_v prevalente no MNTB, utilizando um anticorpo anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1), baseado nos achados de Leão et al. (2005) que demonstraram a presença dessa isoforma nos heminodos axonais pré-Cálices de Held. Em neurônios do gânglio espiral da cóclea Hossain et al., (2005) também demonstraram a presença dessa isoforma, indicando ser essa uma isoforma importante para a atividade elétrica de neurônios do sistema auditivo. Na figura 13, os

painéis 13C e 13F e 13D e 13G, ilustram a marcação anti-PAN- Na_v e anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) no MNTB, respectivamente. Em 13C e 13F, pode ser observada a marcação anti-PAN- Na_v (cinza) nos AIS (setas), assim como ao longo de uma estrutura em forma de cone que se projeta para o soma de uma célula principal e que morfológicamente se assemelha ao heminodo terminal do Cálix de Held (ponta de seta). A marcação anti-PAN- Na_v é mais intensa nos AIS que naqueles aparentes heminodos terminais. Em 13D e 13G tem-se um AIS bem marcado com o anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) (setas). Diferentemente da marcação intensa observada nos AIS, não podemos apreciar, com precisão, a marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) no provável heminodo terminal. Em 13E e 13H, a superposição das imagens mostra uma colocalização evidente da marcação anti-PAN- Na_v e anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) nos AIS enquanto que, nos provável heminodo terminal, não foi possível observa colocalização semelhante. A estrutura apontada (cabeça de seta) visualizada em um formato semelhante a um cone, que “chega” ao soma, no painel em 13C (anti-PAN- Na_v), apresentou uma medida em torno de 3,6 μm em seu maior diâmetro, enquanto que o AIS desse neurônio, 2,1 μm . Estrutura semelhante visualizada no painel em 12F, apresentou uma medida em torno de 2,8 μm em seu maior diâmetro, enquanto que o AIS desse neurônio, 1,2 μm . Semelhante proporção também foi encontrada em demais células principais do MNTB que apresentaram essa estrutura à qual denominamos provável heminodo-terminal de terminais axonais das GBC do AVCN.

Em 14A tem-se uma visão panorâmica do MNTB marcado com anti-Map-2 monoclonal (MAb). Os números 1 e 2 enumeram as células delimitadas em 14A que podem ser apreciadas em maior resolução nos painéis 1-2 e 1'- 2', ilustrando os resultados da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) isolada (1 e 2) ou em combinação com a marcação anti-Map-2 (1' e 2'). Em 1 e 2 as setas indicam que os AIS exibem uma intensa marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1). Em 1' e 2' pode ser observado que o AIS dessas células deriva de um processo somático que exibe uma marcação anti-Map-2 que se estende até a parte proximal do AIS. Dessa forma, ao longo do AIS, observa-se uma queda na marcação anti-Map-2 e um aparente aumento da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1). Em nossos experimentos observou-se que em 100% dos neurônios, os processos somáticos dos quais os AIS derivam, apresentaram-se Map-2 (MAb) positivos (e.g. painel 1' e 2' Fig 12).

Na figura 14B tem-se a relação entre a área de silhueta somática e a extensão da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) no AIS. Durante a análise desses dados, utilizando-se o teste de *Grubbs* ($p \leq 0,05$), nenhuma célula foi retirada do “*pool*” ($n = 13$) analisado, devido a desvio significativo da média, tanto para área somática quanto para a extensão da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) no AIS. A população de células principais marcadas com anti-Map-2 apresentou média de silhueta de área somática em torno de $314 \pm 17 \mu\text{m}^2$ ($n=13$) e extensão de marcação ao longo do AIS com anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) de $19 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ($n=13$). Não foi observada uma correlação significativa entre a área de silhueta somática e a extensão da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) ao longo do AIS nesses neurônios, com $p=0,40$ e $r=0,26$.

Com o objetivo de comprovar a expressão da isoforma $\text{Na}_v1.6$ ao longo do AIS das células principais do MNTB foram feitos experimentos de dupla marcação usando dois anticorpos anti- $\text{Na}_v1.6$, sendo um monoclonal (Mab) e outro policlonal (PAb-1). Na figura 14C e 14F tem-se a marcação obtida com Mab anti- $\text{Na}_v1.6$ (verde), onde se observa AIS bem marcados (setas), além de uma marcação puntiforme (nodos de Ranvier) e uma ausência de marcação somática. Em 14D e 14G tem-se a marcação com o anti- $\text{Na}_v1.6$ (Pab-1) (vermelho) que demonstrou um padrão de marcação muito semelhante àquele obtido com o Mab. Em 14E e 14H tem-se a superposição das imagens CD e FG, ilustrando a colocalização (amarelo) nos AIS (setas) e nodos de Ranvier. Dessa forma, a marcação obtida com os dois anticorpos contra a proteína $\text{Na}_v1.6$, foi semelhante nas células principais do MNTB. A extensão da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (Mab) ao longo do AIS foi de $17,13 \pm 1,1$ ($n=3$) e não estatisticamente diferente daquela obtida com o PAb-1: $17,9 \pm 1,01$ ($n=3$).

Experimentos foram feitos para pesquisar se outras isoformas de canais de sódio estão presentes em neurônios do MNTB. As outras isoformas pesquisadas foram $\text{Na}_v1.1$ e 1.2 , devido ao fato que essas isoformas são referidas como aquelas expressas em neurônios centrais (Boiko et al., 2003; Van Wart et al., 2007). Os resultados desses experimentos foram negativos, ou seja, não foi detectada a presença dessas isoformas nesse núcleo (dados não apresentados).

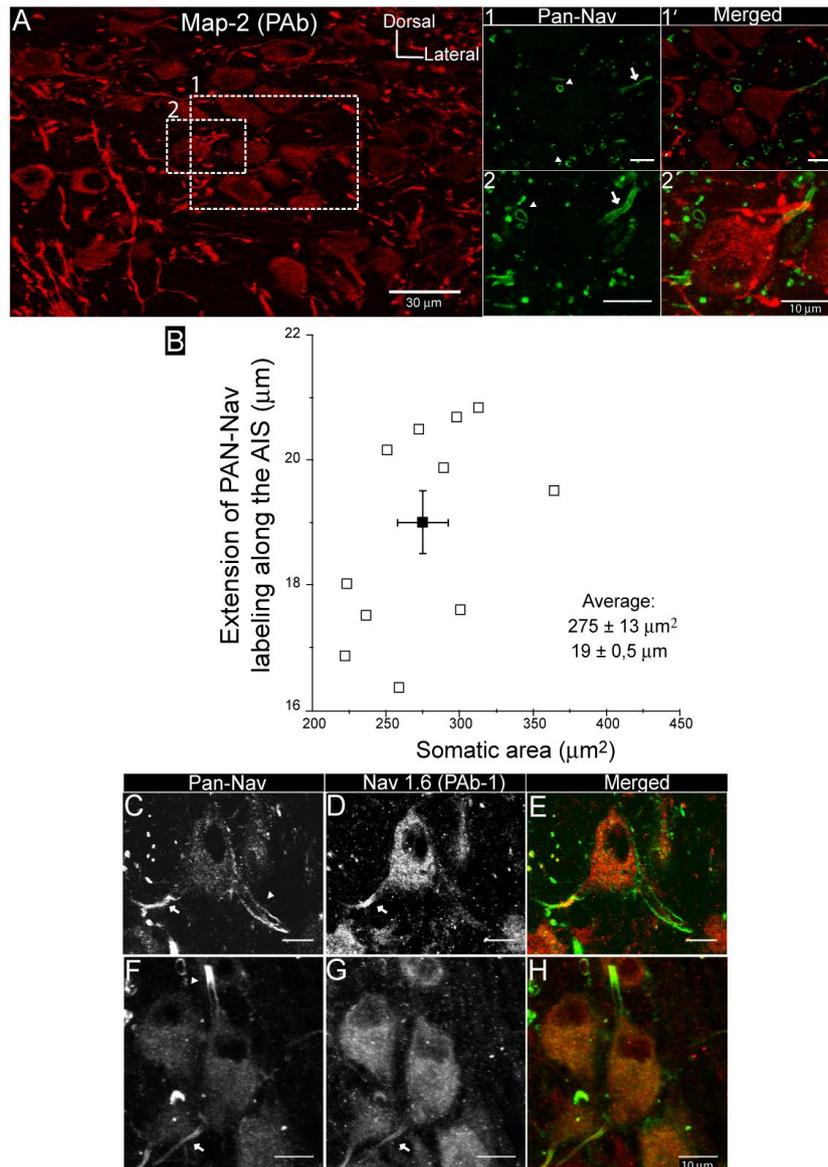


Figura 13- Distribuição de canais Na_v no MNTB. **A**, visão panorâmica das células principais do MNTB derivada da marcação anti-Map-2 (PAb, vermelho). As áreas delimitadas (1 e 2) são mostradas à direita em maior resolução e ilustram a marcação anti-PAN- Na_v (painéis 1 e 2) e a sobreposição com a marcação anti-Map-2 (1' e 2'). Em 1 e 2 os AIS aparecem intensamente marcados com anticorpo anti-PAN- Na_v (setas), assim como prováveis heminodos terminais pré-calices de Held seccionados (pontas de setas) derivados de axônios das GBC do AVCN. Em 1-1' e 2-2' nota-se que os AIS apontados estão ligados ao soma por um processo Map-2 positivo. 1 e 1'; 2 e 2': projeção do tipo MIF de 3 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$) e de 6 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$), respectivamente. **B**, relação entre a área de silhueta somática e extensão da marcação anti-PAN ao longo do AIS ($n=11$). **C** e **F**, imunomarcação anti-PAN- Na_v (cinza) no MNTB é evidente nos AIS (setas), assim como ao longo de prováveis heminodos terminais (ponta de seta). **D** e **G**, marcação anti- $Na_v1.6$ (cinza) é evidente ao longo dos AIS, enquanto que, no provável heminodo terminal, não foi possível apreciar mesma marcação. **E** e **H** superposição das imagens mostrando a colocalização evidente da marcação anti-PAN e anti- $Na_v1.6$ nos AIS e nodos de Ranvier (marcação pontiforme). **C** e **D**; **F** e **G**: projeções do tipo MIF de 1 secção confocal ($Z=0,72 \mu\text{m}$) e de 5 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$), respectivamente.

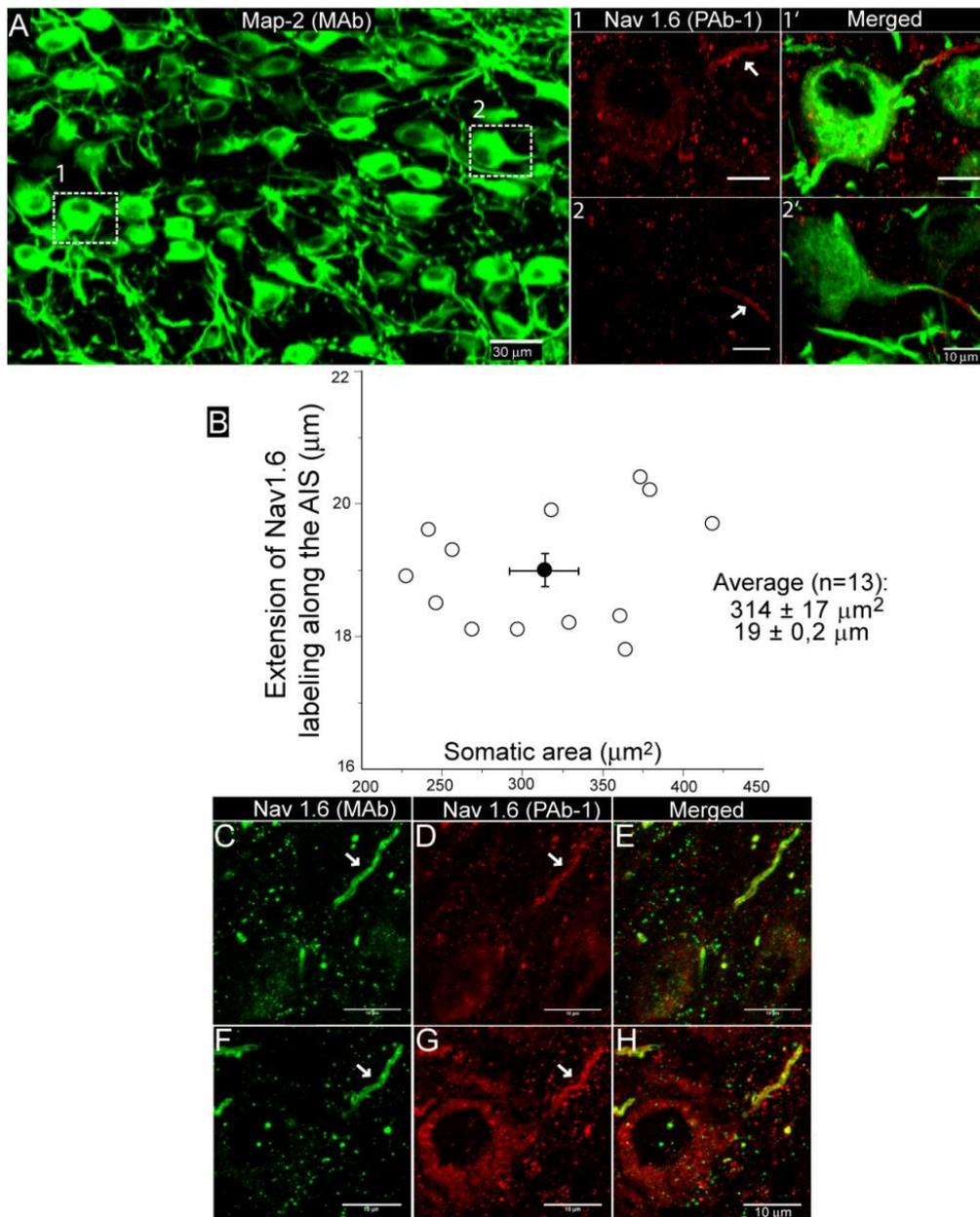


Figura 14- $\text{Na}_v1.6$ como a isoforma prevalente e análise de correlação entre a extensão de sua marcação no AIS e a área somática nas células principais do MNTB. **A**, visão panorâmica das células principais do MNTB e marcação anti-Map-2 (MAb, verde). As áreas delimitadas (1 e 2) são mostradas à direita em maior resolução e ilustram a marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) (painéis 1 e 2) e a sobreposição com a marcação anti-Map-2 (1' e 2'). Em 1 e 1' e em 2 e 2' os AIS (setas) estão ligados ao soma por um processo Map-2 positivo. 1 e 1'; 2 e 2': projeções do tipo MIF de 5 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$) e de 2 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$), respectivamente. **B**, relação entre a área de silhueta somática e a extensão da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) no AIS (n=13). **C** e **F**, marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) obtida com o anticorpo monoclonal (MAb, verde) e **D** e **G**, com um policlonal (PAb-2, vermelho) evidente nos AIS (setas). **E** e **H**, superposição das imagens revela uma colocalização das marcações nos AIS (setas). **C** e **D**; **F** e **G**: projeções do tipo MIF de 5 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$) e de 3 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$), respectivamente.

Os resultados obtidos sugerem que a isoforma $\text{Na}_v1.6$ é a prevalente no AIS das células principais do MNTB. Entretanto, uma questão importante é se essa é a única isoforma presente no AIS desses neurônios. Na figura 15 tem-se a comparação da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (Pab-1) e anti-PAN- Na_v ao longo do AIS de neurônios do MNTB. Em 15A, 15E e 15I, observa-se a marcação anti-PAN- Na_v (verde) nos AIS e ausência de marcação somática. Em 15B, 15F e 15J pode ser observado que os AIS são intensamente marcados com anti- $\text{Na}_v1.6$ (Pab-1) (vermelho). Os painéis 15C, 15G e 15K mostram uma aparente colocalização das marcações anti-Pan- Na_v e anti- $\text{Na}_v1.6$ (Pab-1) nos AIS (amarelo) nesse compartimento celular. Os gráficos 15D, 15H e 15L mostram os resultados da quantificação da intensidade de fluorescência de ambas marcações ao longo do AIS. A intensidade de fluorescência, medida numa escala de 0 a 256 em unidades arbitrárias no *Fiji/ImageJ 1.47*, foi normalizada pela fluorescência máxima de cada marcação. No geral, a marcação anti-Pan- Na_v inicia-se num ponto muito próximo ou às vezes coincidente que a marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ mas, a marcação anti-PAN- Na_v tende a alcançar valores maiores em partes mais proximais enquanto a anti- $\text{Na}_v1.6$ (Pab-1) alcança seu pico em partes mais distais do AIS.

A figura 16 demonstra os resultados de reações de imunofluorescência para o anticorpo anti-AnK-G e anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) em secções coronais de tronco cerebral obtidas de ratos de 30 dias. Em 16A tem-se a marcação de uma região do MNTB pelo anticorpo anti-AnK-G em que se observa a exuberante marcação de fibras de passagem e dos AIS (setas). Os painéis 16D e 16G apresentam imunorreação de duas células principais em que observa a nítida marcação para o anticorpo anti-AnK-G nos AIS (setas), de experimentos realizados em outra ocasião e sob as mesmas condições. Em 16D, particularmente, pode-se notar a presença de uma estrutura sugestiva de um heminodo terminal (cabeça de seta). Em 16B, 16E e 16H tem-se a marcação sutil dos corpos celulares de células principais e excelente marcação com anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) dos AIS (setas) e nodos de Ranvier (pontilhado). Em 16E, também se pode notar a marcação pelo anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) da mesma estrutura marcada em 16D por anti-AnK-G, sugestiva de um heminodo terminal (cabeça de seta). Em 16C, 16F e 16I aprecia-se a colocalização, quando realizamos a superposição das imagens, onde anti-AnK-G colocaliza-se (amarelo/alaranjado) com anti- $\text{Na}_v1.6$ (PAb-1) nos AIS desses neurônios e também nas estruturas sugestivas do heminodo terminal (16D e 16E).

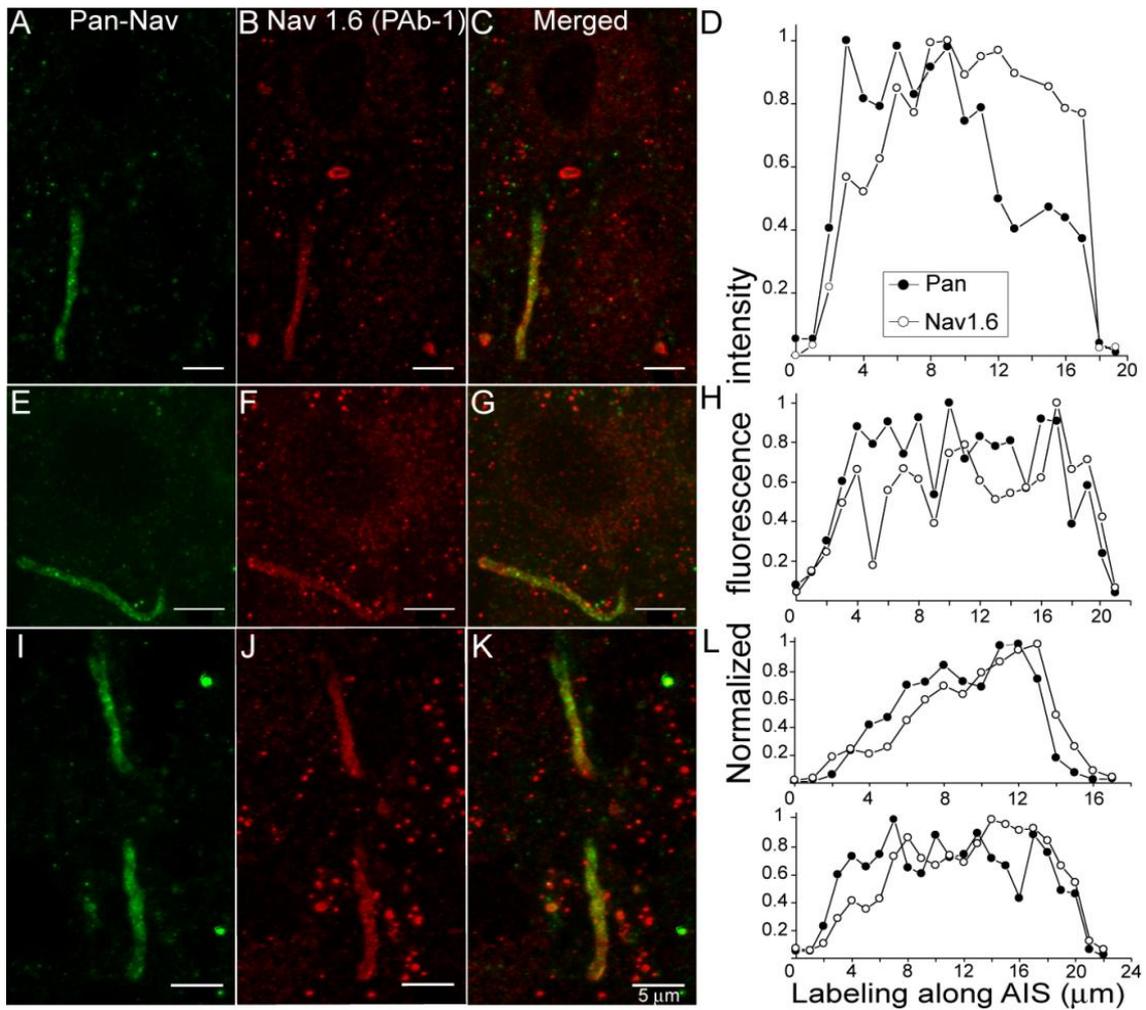


Figura 15- Análise da intensidade de marcação anti-Nav_v1.6 (PAb-1) e anti-PAN-Nav_v ao longo do AIS de neurônios principais do MNTB. Os painéis A, E e I, ilustram marcação anti-PAN-Nav_v (verde) nos AIS e B, F e J anti-Nav_v1.6 (PAb-1) (vermelho). C, G e K, representam a sobreposição de AB, EF e IJ, respectivamente. D, H e L, *plot* da intensidade de fluorescência normalizada anti-Nav_v1.6 (PAb-1) (círculos vazios) e anti-PAN (círculos cheios) ao longo do AIS. A e B; E e F; I e J: projeções do tipo MIF de 4 secções confocais ($Z=0,72\ \mu\text{m}$); de 16 secções confocais ($Z=0,29\ \mu\text{m}$) e de 4 secções confocais ($Z=0,72\ \mu\text{m}$), respectivamente.

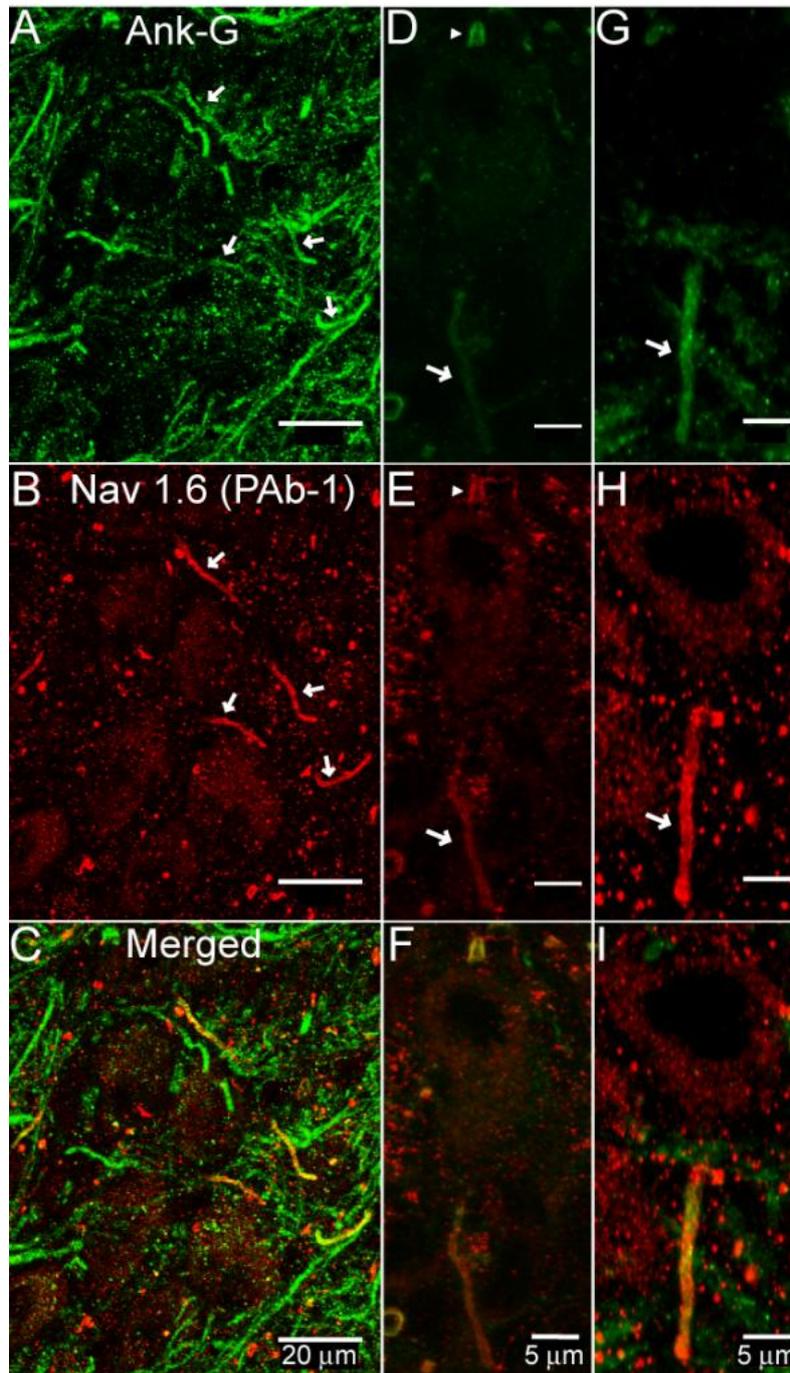


Figure 16- Expressão proeminente de AnK-G no MNTB e colocalização com Na_v 1.6 no AIS. A-C, marcação anti-AnK-G (verde) e anti- Na_v 1.6 (PAb-1) (vermelho) e sobreposição de ambas marcações (C) no MNTB em menor magnificação onde as setas indicam AIS marcados pelos dois anticorpos. Os painéis **D-F** e **G-I** ilustram neurônios isolados (maior magnificação) com os AIS (setas) apresentando uma colocalização de ambas as marcações. Cabeça de seta nos painéis **D-F** indica um provável heminodo terminal também apresentando ambas as marcações. A e B; D e E; G e H: projeções do tipo MIF de 6 secções confocais ($Z=1,05 \mu\text{m}$); de 6 secções confocais ($Z=0,59 \mu\text{m}$) e de 3 secções confocais ($Z=0,72 \mu\text{m}$), respectivamente.

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados possibilitaram identificar e caracterizar a expressão do canal $\text{Na}_v1.6$ nas células fusiformes, *cartwheel* e gigantes do DCN e também nas células principais do MNTB de ratos *Wistar* de 30 dias. De um modo geral, tanto no DCN quanto no MNTB observou-se presença dessa isoforma nos AIS e em nodos de Ranvier. A alta concentração do canal $\text{Na}_v1.6$ no AIS sugere que essa isoforma esteja envolvida na geração do potencial de ação nesses neurônios.

Os nossos dados mostraram vários segmentos marcados tanto pelo anticorpo anti- $\text{Na}_v1.6$ como anti-AnK-G (figuras 11-DCN e figura 16-MNTB) o que nos permitiu inferir que tais segmentos correspondam aos AIS das células do DCN e do MNTB. Outros relatos da literatura também demonstram a colocalização de canais para sódio voltagem-dependentes com a AnK-G no AIS (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). A organização de proteínas da membrana no AIS parece ser dependente de citoesqueleto e de proteínas de ancoragem como a AnK-G e espectrina βIV (Hedstrom et al., 2007; Ogawa, Rasband, 2008). Essa organização é importante para o direcionamento e manutenção de outras proteínas como os canais iônicos voltagem-dependentes (Susuki, Rasband, 2008). AnK-G e espectrina βIV apresentam-se primeiro que moléculas de adesão neuronal (CAM) e que o canal $\text{Na}_v1.6$, durante a formação do AIS, em neurônios de Purkinje (Jenkins, Bennett, 2001). Esses autores acreditam que a AnK-G seja a responsável pela coordenação da formação do AIS, uma vez que observaram que em células de Purkinje adultas, as quais não expressavam essa proteína (*knockout* para AnK-G), outras proteínas, como a espectrina βIV e o canal $\text{Na}_v1.6$, não se aglomeram no AIS. De acordo com Garrido e cols (2003) canal $\text{Na}_v1.2$ possui uma sequência de 27 aminoácidos (1102-1128) em uma alça intracelular que conecta os domínios II e III, exibindo alta afinidade pela AnK-G, sendo que a super-expressão dessa sequência, em neurônios hipocâmpais, restringe a concentração do canal para sódio endógeno no AIS. Essa sequência de aminoácidos também está presente no canal $\text{Na}_v1.6$ (Caldwell et al., 2000). Bréchet et al., (2008) mostraram que a afinidade da AnK-G pelo canal para sódio $\text{Na}_v1.2$, que é determinante para sua concentração no AIS, é dependente dos resíduos de glutamato (E1111), de serina (S1112, S1124 e S1126) e da fosforilação dessas serinas realizada pela proteína

quinase CK2, encontrada em níveis elevados no AIS e nodos de Ranvier *in vivo*, regulando a afinidade de interação entre o canal para sódio e ank-G.

No DCN, a expressão do canal $Na_v1.6$ foi avaliada pela utilização de três anticorpos distintos sendo dois deles disponíveis comercialmente (PAb-1, Alomone Labs, Israel; MAb, Neuromab, USA) e um terceiro gentilmente doado pelo Dr. Rock Levinson da University of Colorado (PAb-2). No MNTB foram utilizados apenas os dois primeiros citados, devido à maior facilidade de aquisição e imunomarcação adequada também alcançada com esses anticorpos. O anticorpo mais utilizado nos experimentos foi o PAb-1 e, para esse anticorpo, foi possível fazer o controle da reação tanto pela omissão do primário quanto pela pré-incubação com peptídeo antigênico (figura 8). Para os demais anticorpos apenas o controle da omissão do anticorpo primário é que foi feita (resultados não mostrados). Não foram observados indícios de marcação inespecífica com os anticorpos primários ou secundários.

Esses anticorpos foram utilizados previamente para a evidência desse canal, em diferentes preparações experimentais. O Pab-2 anti-Nav1.6 (Dr. Rock) foi utilizado para demonstrar a presença dessa isoforma no bulbo olfatório, hipocampo, cerebelo, retina, núcleo supraóptico, gânglio da raiz dorsal, junção neuromuscular e em nodos de Ranvier do nervo isquiático (Krzemien et al., 2000). Posteriormente, novos estudos, utilizando-se desse anticorpo, verificaram a presença de $Na_v1.6$ em células ganglionares da retina (Boiko et al., 2003; Van Wart, Trimmer e Matthews, 2007), no MNTB (Leão et al., 2005) e nos neurônios do gânglio espiral do sistema auditivo (Hossain et al., 2005). Estudos mais recentes, utilizaram-se do anti- $Na_v1.6$ (PAb-1), para verificar a contribuição desse canal na geração do AP, em neurônios corticais piramidais (Royeck et al., 2008; Hu et al., 2009), nas células granulares do cerebelo (Osorio et al., 2005; Osorio et al., 2010), nos nodos de Ranvier do nervo ótico (Jenkins, Bennett, 2002), como também, nos axônios da coluna dorsal da medula (Black, Waxman, Smith, 2006). O anticorpo Mab anti- $Na_v1.6$ (Neuromab) foi utilizado para verificar a presença dessa isoforma em culturas de neurônios do hipocampo (Pan et al., 2008). Em nossos experimentos, esses três anticorpos anti- $Na_v1.6$ marcaram o AIS de células de Purkinje do cerebelo similarmente ao descrito por Jenkins & Bennett (2001) e, dessa forma, essa marcação cerebelar foi utilizada como controle positivo endógeno das reações de imunofluorescência. O padrão de marcação obtido com os dois anticorpos policlonais anti- $Na_v1.6$ no DCN e no MNTB foi similar entre eles e também semelhante àquele obtido com o anticorpo monoclonal. Torna-se necessário ressaltar que esse último

anticorpo e o PAb-2 (Dr. Rock) reconhecem epítomos quase idênticos (um aminoácido a menos) (tabela 1). Para todos esses anticorpos foi utilizada a fixação do tecido com fixador PLP (periodato-lisina-paraformaldeído) a 1%. Canais para sódio são proteínas conhecidas por apresentarem sítios de glicosilação (Marban, Yamagishi, Tomaselli, 1998), sendo assim, a fixação com o tampão PLP preserva a antigenicidade, permitindo a estabilização principalmente de carboidratos, sendo os hidratos de carbono oxidados pelo periodato e reticulados pela lisina (McClean, Nakane, 1974).

A grande maioria dos neurônios possui uma alta densidade de canais para sódio voltagem-dependentes no AIS, local onde se inicia o AP (Khaliq, Raman, 2006; Palmer, Stuart, 2006; Shu et al., 2007; Kole et al., 2008). Esses últimos autores, utilizando-se de métodos eletrofisiológicos e imunomarcação, concluíram que a densidade de canais para sódio no AIS de neurônios piramidais da camada cortical 5 é alta, em média cerca de 50 vezes maior que aquela encontrada no soma e dendritos proximais. Esses autores encontraram um aumento da fluorescência anti- $Na_v1.6$ ao longo do AIS, alcançando um valor máximo em torno de 10 μm e que se manteve constante até o término do AIS. Em nossos experimentos, a análise da intensidade de fluorescência anti- $Na_v1.6$ ao longo do AIS revelou que esse canal parece estar presente numa densidade maior na porção mais distal do AIS de células do DCN (dados não mostrados) e do MNTB (figura 15) de ratos de 30 dias, diferindo da porção inicial do AIS, onde é observada uma região de baixa expressão do canal $Na_v1.6$. Por conseguinte, tanto no córtex quanto nos neurônios do sistema auditivo, a distribuição desses canais parece seguir o mesmo padrão. Os mecanismos bioquímicos que medeiam tal distribuição não-uniforme permanecem por serem elucidados. A análise da imunofluorescência anti-anquirina-G, em nossos dados, não seguiu esse mesmo padrão, de modo que não podemos aventar a possibilidade que seja essa proteína de ligação canal-citoesqueleto como a responsável pela distribuição descrita para o $Na_v1.6$.

Os canais $Na_v1.6$ substituem a isoforma $Na_v1.2$, tornando-se a isoforma predominante, em neurônios da retina de células ganglionares, após o desenvolvimento embrionário (Boiko et al., 2003), esse fato é coincidente com o desenvolvimento da capacidade para disparos repetitivos nestas células (Wang et al., 1997). No sistema auditivo, Leão et al., (2005) avaliaram a expressão dos canais para sódio $Na_v1.6$ no terminal Cálice de Held do MNTB, observando que a expressão dessa isoforma aumenta com o desenvolvimento dos ratos entre P=6 e P=13 o que é coincidente com a capacidade desse terminal de gerar disparos repetidos em frequências mais altas. Os

canais $Na_v1.2$ inativam-se mais rapidamente que a subunidade $Na_v1.6$, durante estímulos repetidos próximos a 20 Hz, o que poderia explicar porque os neurônios que disparam em altas frequências, como os do sistema auditivo, utilizam principalmente da isoforma $Na_v1.6$ para gerarem potenciais de ação (Rush, Dib-Hajj, Waxman, 2005).

Com o intuito de verificar se a isoforma $Na_v1.6$ é a única presente no AIS dos neurônios do MNTB, um anticorpo PAN- Na_v (Sigma), que reconhece todas as isoformas de canais para sódio foi utilizada. Os AIS de células principais do MNTB marcados com anti-PAN- Na_v e anti- $Na_v1.6$ tiveram a intensidade de ambas fluorescências analisadas e plotadas ao longo da distância (figura 15). A marcação anti-Pan- Na_v tende a iniciar-se em um ponto coincidente com a marcação anti- $Na_v1.6$ (6 de 8). Naquelas células onde a marcação anti-PAN- Na_v inicia-se em um pouco mais proximal ao soma (2 de 8) relativo ao $Na_v1.6$ a diferença entre as distâncias de início de cada marcação é muito pequena (1 a 2 μm). De um modo geral, esses dados não sugerem, de uma forma consistente, que no AIS das células principais do MNTB, uma outra isoforma Na_v possa estar presente, pelo menos em valores de densidade na membrana próximos aqueles observados para o $Na_v1.6$. Corroborando com os dados dessa análise, a pesquisa pela presença de outras isoformas como a $Na_v1.1$ (Mab, Neuromab), ou 1.2 (Mab, Neuromab e Pab Alomone) não revelou a presença dessas isoformas. Entretanto, diferentemente do que encontramos nas células principais do MNTB, Van Wart et al. (2007) demonstraram a presença da isoforma $Na_v1.1$ na parte inicial do AIS das células ganglionares da retina. Os autores também observaram que a AnK-G está presente tanto na parte inicial, onde eles observaram a presença do $Na_v1.1$, quanto na parte distal, onde o $Na_v1.6$ é encontrado em alta densidade. Dessa forma, AnK-G não parece ser a responsável pela segregação específica dessas isoformas nessas diferentes áreas do AIS. O anticorpo anti- $Na_v1.1$ utilizado por esses autores (clone K74/71, Neuromab) foi o mesmo utilizado em nosso trabalho.

Os dados obtidos sugerem uma baixa ou ausência de expressão do canal $Na_v1.6$ no soma dos neurônios avaliados. Esses dados são semelhantes aos observados com a marcação anti-PAN- Na_v de modo que outras isoformas aparentemente não estão presentes no soma. Registros eletrofisiológicos em *patches* da membrana somática poderiam confirmar ou não tais observações. Nesse sentido, Leão et al. (2006) não observaram a presença de canais para sódio no soma das células principais do MNTB (camundongo, P14 e P28) em experimentos de imunohistoquímica e sugeriram que os canais poderiam estar concentrados no cone de implantação ou no AIS dessas células.

Nossos dados, portanto, vão de acordo com a hipótese sugerida por esses autores visto que demonstram uma ausência da expressão somática e uma alta densidade do $\text{Na}_v1.6$ no AIS dessas células.

Bem descrito na literatura a presença de canais de cálcio em células de Purkinje do cerebelo onde geram AP chamados de *complex-spikes* (Davie, Clark, Michael Hausser, 2008; Palmer et al., 2010). O circuito neuronal do DCN guarda semelhanças com o cerebelar, bem como, existem propriedades elétricas comuns aos neurônios de ambos os circuitos (Oertel, Young, 2004). Nesse sentido, as propriedades elétricas das CWC são semelhantes àquelas das células de Purkinje (Molitor, Manis, 2003). Essas células do DCN também apresentam *complex-spikes*, que nos casos das células de Purkinje são em parte mediados por canais de cálcio voltagem-dependentes (Molineaux et al., 2006). Assim, em nosso trabalho, utilizamos um marcador para canais de cálcio do tipo T (anti- $\text{Ca}_v3.2$) para avaliar a possibilidade da presença desse canal em CWC e, especialmente, se existe colocalização desse canal com o canal $\text{Na}_v1.6$ no AIS dessas células. A marcação anti- $\text{Ca}_v3.2$ foi visualizada nos somas de células do DCN, com área, localização e morfologia característicos de CWC, e ainda uma marcação de finos processos próximos a essas células (figura 12), mas não foi observado colocalização com anti- $\text{Na}_v1.6$ nos AIS. Bender & Trussell (2009), encontraram transientes de Ca^{2+} no soma e no AIS de CWC. Os autores sugerem que, nesse compartimento axonal, estão concentrados canais de Na^+ e de Ca^{2+} responsáveis pelos *complex spikes*. Molineaux et al., (2006) ao correlacionar o padrão de expressão com o perfil eletrofisiológico de células do cerebelo verificaram que a classe de canais do tipo T, Ca_v3 , é do tipo baixa voltagem de ativação expressa em combinações específicas em uma ampla gama desses neurônios. Nossos dados, mostrando a expressão somática de $\text{Ca}_v3.2$, estão de acordo com o encontrado nesses artigos acima citados; porém, não encontramos colocalização dos canais $\text{Ca}_v3.2$ e $\text{Na}_v1.6$ no AIS de CWC. Sugerimos, dessa forma, que outras isoformas de Ca_v3 possam estar presentes nesse domínio celular.

A capacitância da membrana é uma propriedade elétrica passiva da célula que, juntamente com a resistência de entrada e a resistência axial do intracelular, determinam a amplitude e o decurso temporal de alterações do potencial de membrana celular induzidas por correntes elétricas. Para alterar a voltagem em um capacitor é necessário remover ou adicionar carga a esse capacitor. A membrana plasmática de diferentes células é composta por uma bicamada lipídica com propriedades isolantes similares, sendo que a capacitância específica, por unidade de área, é aproximadamente $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

A capacitância aumenta com o tamanho da célula e assim, mais carga (mais corrente), é necessário para produzir a mesma mudança na V_m (voltagem) em uma célula maior que em uma menor (Hill, 2000), inferindo-se que células maiores exigiriam um AIS proporcionalmente maior para despolarização somática, considerando-se densidades similares de canais (injetores de carga) no AIS. Considerando o acima exposto e que os valores da extensão de marcação ao longo do AIS entre as diferentes populações. A análise estatística entre a média da extensão da marcação anti- $Na_v1.6$ ao longo do AIS também se mostrou significativa entre os grupos celulares: FC e CWC com $p= 0,02234$; FC e GC, com $p= 0,00006$ e entre CWC e GC, com $p= 0,000001$. Podemos sugerir que populações neuronais que apresentam maiores áreas de silhueta somática, tendem a possuir uma maior extensão da marcação anti- $Na_v1.6$. Entretanto, dentro de cada população não foi observado correlação significativa entre a área de silhueta somática e a extensão da marcação anti- $Na_v1.6$ ao longo do AIS (tabela 2). Pode ser aventada a possibilidade que o método de avaliação utilizado não detecte diferenças pequenas de área somática e de sua relação com o AIS que são observadas dentro de um mesmo grupo neuronal. O método utilizado também não permite avaliar, inequivocamente, se existe diferença entre densidade de canais para sódio no AIS de diferentes tipos neuronais, o que seria de extrema importância para a compreensão de como os neurônios ajustam o sítio gerador do potencial de ação às suas necessidades elétricas.

7. CONCLUSÃO

Através dos nossos resultados, baseados em experimentos de dupla marcação, foi possível concluir que o canal para sódio $Na_v1.6$ está presente nas células fusiformes, *cartwheel* e gigantes do DCN e também nas células principais do MNTB de ratos *Wistar*, sendo esta expressão intensa nos AIS e nodos de Ranvier de neurônios de ambos os núcleos. Essa alta concentração de canal $Na_v1.6$, nesse compartimento axonal, sugere que essa isoforma geraria o AP nesses neurônios. Os nodos de Ranvier, responsáveis pela condução saltatória do AP, também se apresentaram intensamente marcados pelo anti- $Na_v1.6$ em axônios presentes no DCN e entre as células principais do MNTB. Pode-se pensar que tais axônios sejam oriundos das células destes núcleos como, também, de neurônios cujos axônios atravessam esses núcleos, o que traz a sugestão que a isoforma $Na_v1.6$ seja bastante comum em neurônios auditivos. A reação de imunofluorescência para o anticorpo que reconhece todas as isoformas de canais para sódio PAN- Na_v no MNTB possibilitou a visualização de uma estrutura em forma de cone que projeta para o soma da célula principal, sugerindo ser o heminodo terminal pré-Cálix de Held. A marcação dessa estrutura pelo anti- $Na_v1.6$ não foi detectada.

Através de nossas análises de intensidade de imunofluorescência podemos concluir que o canal $Na_v1.6$ parece estar presente numa densidade maior na porção mais distal do AIS de células do DCN e do MNTB de ratos *Wistar*, diferindo da porção inicial do AIS, onde se observou uma região de baixa expressão desse canal. Na mesma análise de imunofluorescência realizada para anti-anquirina-G observamos que a marcação para essa proteína de ligação canal-citoesqueleto não segue o mesmo padrão que o canal de sódio $Na_v1.6$, onde não podemos aventar a possibilidade que esta seja a proteína responsável pela distribuição descrita para essa isoforma de canal para sódio. Os dados não sugerem que, no AIS das células principais do MNTB, uma outra isoforma Na_v , como a $Na_v1.1$ e 1.2 , possa estar presente, pelo menos em valores de densidade na membrana próximos aqueles observados para o $Na_v1.6$.

REFERÊNCIAS

- Abbas PA, Miller CA. Physiology of the Auditory System. In Cummings, Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 1993, vol 4, 2831-2867.
- 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.
- Araki T, Otani T. Response of single motoneurons to direct stimulation in toad's spinal cord. *J. Neurophysiol* 1955, 18:472-85
- Arnott RH, Wallace MN, Shackleton T, Palmer AR. Onset Neurons in the Anteroventral Cochlear Nucleus Project to the Dorsal Cochlear Nucleus. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2004 June; 5(2): 153-170.
- Attias J, Furman V, Shemesh Z, Bresloff I. Address Impaired brain processing in noise-induced tinnitus patients as measured by auditory and visual event-related potentials. *Ear Hear*, 17(4):327-33 1996 Aug.
- 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.
- Barnes-Davies M, Owens S, Forsythe ID. Calcium channels triggering transmitter release in the rat medial superior olive. *Hear Res.* 2001 Dec;162(1-2):134-45.
- Black JA, Waxman SG, Smith KJ. Remyelination of dorsal column axons by endogenous Schwann cells restores the normal pattern of Nav1.6 and Kv1.2 at nodes of Ranvier. *Brain*, (2006, 129(5), 1319 - 1329. doi:10.1093/brain/awl057.
- Bender KJ, Trussell LO. Axon Initial Segment Ca²⁺ Channels Influence Action Potential Generation and Timing. *Neuron*, Volume 61, Issue 2, 259-271, 29 January 2009 doi:10.1016/j.neuron.2008.12.004.
- Berrebi, AS, Mugnaini E. Effects of the murine mutation 'nervous' on neurons in cerebellum and dorsal cochlear nucleus. *J. Neurocytol* 1988, 17, 465-484.
- 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 MP, 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.
- Brawer JR, Morest DK, Kane EC. *J Comp Neurol.* The Neuronal architecture of the cochlear nucleus of the cat. 1974 JUN 1;155 (3):251-300.

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.

Brozoski TJ, Bauer CA, Caspary DM. Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical evidence of tinnitus. *J Neurosci.* 2002, 22:2383–2390.

Brown MC, Berglund AM, Kiang NYS, and Ryugo DK . Central trajectories of type II spiral ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* 1988, 278, 581–590.

Burian M, Gstoettner W. Projection of primary vestibular afferent fibres to the cochlear nucleus in the guinea pig. *Neurosci* 2006, Lett 84, 13–17.

Caicedo A, Herbert H. Topography of descending projections from the inferior colliculus to auditory brainstem nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1993, 328, 377–392.

Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 97:5616 –5620.

Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000, 26:13–25.

Cant NB, Bneson CG. Parallel auditory pathways: projection patterns of the different neuronal populations in the dorsal and ventral cochlear nuclei. *Brain Research Bulletin* Volume 60, Issues 5-6, 15 June 2003, Pages 457-474.

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.

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005 Dec; 57(4):411-25.

Celesia GG. Clinical Disorders of membrane channels or channelopathies. *Neurophysiol* 2001, 112: 2-18.

Coombs J, Curtis D, Eccles J. The interpretation of spike potentials of motoneurons. *The Journal of Physiology* 1957, 139 (2), 198-231.

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.

Davie JT, Clark BA, Michael Hausser M. The origin of the complex spike in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 2008, 28, 7599–7609.

- Ding J, Benson TE, Voigt HF. Acoustic and current-pulse responses of identified neurons in the dorsal cochlear nucleus of unanesthetized, decerebrate gerbils. *J Neurophysiol* 82: 3434–3457, 1999.
- Do MTH, Bean BP. Sodium currents in subthalamic nucleus neurons from Nav1.6-null mice. *J Neurophysiol* 2004, 92: 726-33.
- Duflocq A; Chareyre F, Giovannini M, Couraud F, Davenne M. Characterization of the axon initial segment (AIS) of motor neurons and identification of a para-AIS and a juxtapara-AIS, organized by protein 4.1B. *BMC Biology* 2011, 9:66.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000, 28:533–535.
- Edwards C, Ottoson D. The site of impulse initiation in a nerve cell of a crustacean stretch receptor. *J. Physiol* 1958, 143:138–48.
- Feliciano M, Saldaña E, Mugnaini E. Direct projections from the rat primary auditory neocortex to nucleus sagulum, paralemniscal regions, superior olivary complex and cochlear nucleus. *Aud. Neurosci.* 1995, 1:287-308.
- Ferragamo MJ, Golding NL, Oertel, D. Synaptic inputs to stellate cells in the ventral cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.* 1998a, 79:51-63.
- Ferragamo MJ, Golding NL, Gardner SM, Oertel D. Golgi cells in the superficial granule cell domain overlying the ventral cochlear nucleus: Morphology and electrophysiology in slices. *J. Comp. Neurol.* 1998b, 400:519-528.
- Forsythe ID. Direct patch recording from identified presynaptic terminals mediating glutamatergic EPSCs in the rat CNS, in vitro. *J Physiol* 1994, 479: 381-7.
- Funfschilling U, Reichardt LF. Cre-mediated recombination in rhombic lip derivatives. *Genesis* 2002, 33, 160–169.
- 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, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Berwald Netter Y, et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000, 28: 365-368.
- Goldin AL. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* 63:871 894 (2001).

- Goldin AL. Mechanisms of sodium channel inactivation. *Current Opinion in Neurobiology* 2003, 13: 284-90.
- Golding NL, Oertel D. Physiological identification of the targets of cartwheel cells in the dorsal cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.* 1997, 78, 248–260.
- Hancock KE, Voigt HF. Intracellularly Labeled Fusiform Cells in Dorsal Cochlear Nucleus of the Gerbil. I. Physiological Response Properties. *AJP - JN Physiol* May 2002 vol. 87 no. 5 2505-2519.
- 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, 178:875–886.
- Hertitz S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall, WA. Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits, *Nature* 1996, 380:258–262.
- Hille, Bertil. *Ion channels of excitable membranes* (3rd ed.). Sunderland, mass: sinauer associates 2001. Isbn 0-87893-321-2.
- Hill, Mc Graw. Local signaling: Passive electrical properties of the neuron. In: *Principles of neural science*. 2000. 4a edição, capítulo 8, pp 140-149.
- 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, 25:6857-68 .
- 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 Neurosc* 2009, 12 (8): 996-1002.
- Irvine, DRF. *Progress in Sensory Physiology. Vol. 7: The Auditory Brainstem* 1986, Springer, Berlin.
- 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, 739–746.
- Jenkins SM, Bennett V. Developing nodes of Ranvier are defined by ankyrin-G clustering and are independent of paranodal axoglial adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:2303–2308.
- Johnston J, Griffin SJ, Baker C, Skrzypiec A, Chernova T, Forsythe ID. Initial segment Kv2.2 channels mediate a slow delayed rectifier and maintain high frequency action potential firing in medial nucleus of the trapezoid body neurons. *J Physiol* 2008a, 586, 3493–3509.
- Khaliq ZM, Raman IM. Relative contributions of axonal and somatic Na channels to action potential initiation in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 2006, 26, 1935-1944.

Kaltenbach JA, Rachel JD, Mathog AT, Zhang J, Falzarano PR, Lewandowski M. Cisplatin-induced hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus and its relations to outer hair cell loss: Implications for an understanding of tinnitus. *J. Neurophysiol.* 2002, 88: 699-714.

Kaltenbach JA, Zacharek MA, Zhang J, Frederick S. Activity in the dorsal cochlear nucleus of hamsters previously tested for tinnitus following intense tone exposure. *Neurosci Lett* 2004, 355:121–125.

Kaltenbach JA. The dorsal cochlear nucleus as a contributor to tinnitus: mechanisms underlying the induction of hyperactivity. *Prog Brain Res* 2007, 166:89–106.

Kane EC. Synaptic organization in the dorsal cochlear nucleus of the cat: A light and electron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology.* 1974, Volume 155, Issue 3, pages 301–329.

Kane ES, Puglisi SG, Gordon BS. Neuronal types in the deep dorsal cochlear nucleus of the cat: I. Giant neurons. *The Journal of Comparative Neurology.* 1981, Volume 198, Issue 3, pages 483–513.

Kanold PO, Young ED. Proprioceptive information from the pinna provides somatosensory input to cat dorsal cochlear nucleus. *J Neurosci.* 2001 Oct 1;21(19):7848-58.

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

Kopp-Scheinflug C, Lippe WR, Dorrscheidt GJ, and Rubsamen R. The medial nucleus of the trapezoid body in the gerbil is more than a relay: comparison of pre- and postsynaptic activity. *J Assoc Res Otolaryngol* 4: 1–23, 2003.

Krzemien DM, Schaller KL, Levinson, SR et al., (2000). Immunolocalization of sodium channel isoform NaCh6 in the nervous system. *Journal of Comparative Neurology* 420: p.70.

Kuba H, Oichi Y, Ohmori H. Presynaptic activity regulates Na(+) channel distribution at the axon initial segment. 2010. *Nature.* Jun 24;465(7301):1075-8. doi: 10.1038/nature09087. Epub 2010 Jun 13.

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.

Kuwabara N, Zook JM. Classification of the principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body. *J Comp Neurol.* 1991 Dec 22;314(4):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.

Lorincz A, Nusser Z. Cell-type-dependent molecular composition of the axon the *Journal of Neuroscience*, December 31, 2008 • 28(53):14329 –14340.

Manis PB, Spirou GA, Wright DD, Paydar S, Ryugo DK. Physiology and morphology of complex spiking neurons in the guinea pig dorsal cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 1994, 348, 261–276.

Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF. Structure and function of voltage-gated sodium channels. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.647bp.x May 1, 1998 *The Journal of Physiology*, 508, 647-657.

McLean IW, Nakane PK. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1974 Dec; 22(12):1077-83.

Molineux ML, McRory JE, McKay BE, Hamid J, Mehaffey WH, Rehak R, Snutch TP, Zamponi GW, Turner RW. Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons. *PNAS*, April 4, 2006, vol. 103 no. 14, 5555–5560.

Molitor SC, Manis PB. Voltage-Gated Ca²⁺ Conductances in Acutely Isolated Guinea Pig Dorsal Cochlear Nucleus Neurons. *J Neurophysiol* 81:985-998, 1999.

Molitor SC, Manis PB. Dendritic Ca²⁺ transients evoked by action potentials in rat dorsal cochlear nucleus pyramidal and cartwheel neurons. *Journal of neurophysiology*, Volume 89, Issue 4, p.2225-37 (2003).

Morest DK. The collateral system of the medial nucleus of the trapezoid body of the cat, its neuronal architecture and relation to the olivo-cochlear bundle. *Brain Res* 9: 288–311, 1968a.

Morest DK. The growth of synaptic endings in the mammalian brain: a study of the calyces of the trapezoid body. *Z Anat Entwicklungsgesch* 127: 201–220, 1968b.

Mugnaini E, Warr WB, Osen KK (1980) Distribution and light microscopic features of granule cells in the cochlear nuclei of cat, rat, and mouse. *J. Comp.Neurol.* 191, 581–606.

Mugnaini E, Diño MR, Jaarsma D. The unipolar brush cells of the mammalian cerebellum and cochlear nucleus: cytology and microcircuitry. *Prog. Brain Res.* 1997, 114, 131–150.

Musiek, FE. *Central Auditory Assessment: Its Neuroanatomical and Physiological Bases.* American Speech-Language-Hearing Association, Washington, DC, November 24, 1985.

- 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, 295:136-154.
- Oertel D, Young ED. What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? *TRENDS in Neurosciences* Vol.27 No.2 February 2004.
- Ogawa Y, Rasband MN. The functional organization and assembly of the axon initial segment. *Current Opinion in Neurobiology* 2008, 18: 307-13.
- Ohlrogge M, Doucet JR, Ryugo DK. Projections of the pontine nuclei to the cochlear nucleus in rats. *J. Comp. Neurol.* 436, 290–303.
- Oliver DL, Beckius GE, Bishop DC, Kuwada S. Simultaneous anterograde labeling of axonal layers from lateral superior olive and dorsal cochlear nucleus in the inferior colliculus of cat." *J Comp Neurol* 1997, 382(2): 215-29.
- Osen, KK. Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *J. Comp. Neurol.* 1969, 136:453-482.
- Osen, KK. Course and termination of the primary afferents in the cochlear nuclei of the cat. *Arch. Ital. Biol.* 1970, 108, 21–51.
- Osorio N, Alcaraz G, Padilla F, Coste B, Delmas P, Crest M. Differential targeting and functional specialization of sodium channels in cultured cerebellar granule cells. *J Physiol* 2005, 569, 801–816.
- Osorio N, Cathala L, Meisler MH, Crest M, Magistretti J, Delmas P. Persistent Nav1.6 current at axon initial segments tunes spike timing of cerebellar granule cells. *J Physiol* 2010, 588.4 pp 651–669 651.
- Ostapoff, EM, Feng, JJ, Morest, DK. A physiological and structural study of neuron types in the cochlear nucleus. II. Neuron types and their structural correlation with response properties. *J. Comp. Neurol.* 1994, 346:19-42.
- Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM. The axon hillock and the initial segment. *J Cell Biol* 1968, 38:193-200.
- Palmer LM, Clark BA, Gründemann J, Roth A, Stuart GJ, Häusser M. Initiation of simple and complex spikes in cerebellar Purkinje cells. *J Physiol.* 2010 May 15;588(Pt 10):1709-17. Epub 2010 Mar 29.
- Palmer LM, Stuart GJ. Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci* 2006, 26, 1854-1863.
- Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul J-Y, Cranstoun SD, Bennett MV, 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, 2599-2613.

- 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. *J Neurophysiol*, 2008.
- Rubio ME, Gudsnuk KA, Smith Y, Ryugo K. Revealing the molecular layer of the primate dorsal cochlear nucleus. *Neuroscience*. 2008, junho; 154(1): 99–113.
- 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.
- 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.
- Ryugo DK, Wright DD, Spirou GA. Frequency organization of the dorsal cochlear nucleus in cats. *Journal of Comparative Neurology* 1993. Volume: 329, Issue: 1, Pages: 36-52.
- Ryugo DK, Parks TN. Innervation of the cochlear nucleus in birds and mammals. *Brain Res. Bull.* 2003, 60:435-456.
- Ryugo DK, Willard FH. The dorsal cochlear nucleus of the mouse: a light microscopic analysis of neurons that project to the inferior colliculus. *Journal of Comparative Neurology* 1985, 292:381-391.
- Ryugo DK, Pongstaporn T, Wright DD, Sharp AH. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: Immunocytochemical localization in the dorsal cochlear nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*.1995, Volume 358, Issue 1, pages 102–118, 17 July 1995.
- Shemesh Z, Attias J, Ornan M, Shapira N, Shahar A. Vitamin B12 deficiency in patients with chronic-tinnitus and noise-induced hearing loss. *Am J Otolaryngol*. 1993 Mar-Apr; 14(2):94-9.
- Shemesh Z, Pratt H, Reshef I, Bresloff I, Horowitz G, Polyakov A. Detailed analysis of auditory brainstem responses in patients with noise-induced tinnitus. *Audiology*. 1996 Sep-Oct; 35(5):259-70
- Shofner, WP, Young ED. "Excitatory/inhibitory response types in the cochlear nucleus: relationships to discharge patterns and responses to electrical stimulation of the auditory nerve." *J Neurophysiol* 1985, 54(4): 917-39.
- Schnupp JWH, Nelken I, King AJ. *Auditory Neuroscience - Making Sense of Sound*, MIT Press.2011.
- 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.

Shore SE, Zhou J. Trigeminal influence on the cochlear nucleus and beyond. *Hearing Research*, 216-7, 90-99, 2006.

Shu Y, Duque A, Yu Y, Haider B, McCormick DA. Properties of action-potential initiation in neocortical pyramidal cells: evidence from whole-cell axon recording. *J Neurophysiol* 2007a, 97, 746-760.

Shu Y, Yu Y, Jang J, McCormick DA.. Selective control of cortical axonal spikes by a slowly inactivating K⁺ current. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007b, 104, 11453-11458.

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.

Slee SJ, Higgs MH, Fairhall AL, Spain WJ. Tonotopic tuning in a sound localization circuit. *J Neurophysiol* 2010, 103, 2857-2875.

Smith PH, Joris PX, Carney LH, Yin TCT. Projections of physiologically characterized globular em arbustoyy cell axons from the cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 1991, 304: 387-407.

Smith PH, Joris PX, Yin TC. Anatomy and physiology of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) of the cat. *J Neurophysiol* 79: 3127–3142, 1998.

Sommer I, Lingenhohl K, Friauf E. Principal cells of the rat medial nucleus of the trapezoid body: an intracellular in vivo study of their physiology and morphology. *Exp Brain Res* 95: 223–239, 1993.

Snutch TP, Leonard JP, Gilbert MM, Lester HA , Davidson N. Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.*1990, USA 87: 3391-95.

Susuki K, Rasband MN. Spectrin and Ankyrin-Based Cytoskeletons at Polarized Domains in Myelinated Axons. *Society for Experimental Biology and Medicine*, Minireview, 2008.

Tsuchitani C."Input from the medial nucleus of trapezoid body to an interaural level detector." *Hear Res* 1997, 105(1-2): 211-24.

Tsien RW, Lipscombe D, Madison D, Bley K, Fox A. Reflections on calcium channel diversity, 1988–1994. *Trends Neurosci* 1995, 18:52–54.

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.

Weinberg RJ, Rustioni A. A cuneo-cochlear pathway in the rat. *Neuroscience*. 1987, 20, 209-219.

Wouterlood, F.G. and Mugnaini, E. Cartwheel neurons of the dorsal cochlear nucleus: a Golgi-electron microscopic study in rat. *J. Comp. Neurol.* 1984, 227, 136–157.

Wu LG, Westenbroek RE, Borst JG, Catterall WA, Sakmann B. Calcium Channel Types with Distinct Presynaptic Localization Couple Differentially to Transmitter Release in Single Calyx-Type Synapses. *The Journal of Neuroscience*, January 15, 1999, 19(2):726–736.

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.

Xavier, GF. Técnicas para o estudo do sistema nervoso. São Paulo: Editora Plêide, 1999, p.93-104.

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, Spirou GA, Rice JJ, Voigt HF. Neural organization and responses to complex stimuli in the dorsal cochlear nucleus". *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 336 (1278): 407–13. doi:10.1098/rstb.1992.0076. PMID 1354382.

Young ED, Nelken I, Conley RA. Somatosensory effects on neurons in dorsal cochlear nucleus. *J Neurophysiol*. 1995.

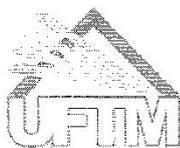
Zhang S, Oertel D. Cartwheel and superficial stellate cells of the dorsal cochlear nucleus of mice: intracellular recordings in slices. *J. Neurophysiol*. 1993, 69, 1384–1397.

Zhang S, Oertel D. Tuberculoventral cells of the dorsal cochlear nucleus of mice: intracellular recordings in slices. *AJP - JN Physiol* May 1993 vol. 69 no. 5 1409-1421.

Zhang S, Oertel D. Giant cells of the dorsal cochlear nucleus of mice: intracellular recordings in slices. *AJP - JN Physiol* May 1993 vol. 69 no. 5 1398-1408.

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

REFERÊNCIAS DAS FIGURAS

FIG. 6 Cortes coronais de 40 µm no criostato, lâminas 3, 4, 8, 10,11 e 15, animal de 30 dias. Coloração de Nissl, Documentação: 05/11/2012, microscopia comum (Nikon Eclipse E 200). Tecido fixado em PLP 1%.

FIG.7 Cortes parassagitais de 40 µm no criostato, lâmina 2, animal (30 dias). Documentação em 26/11/2010, microscopia confocal (Leica SP5). Tecido fixado em PLP 1%.

Cortes parassagitais de 40 µm no criostato, lâmina 11, animal (30 dias). Documentação em 12/12/2011, microscopia confocal (Leica SP5). Tecido fixado em PLP 1%.

Cortes parassagitais de 40 µm no criostato, lâmina 1, animal (30 dias). Documentação em 27/08/2012, microscopia confocal (Leica SP5). Tecido fixado em PLP 1%.

FIG. 8 Cortes coronais de 40 µm no criostato, lâmina 1, cortes 1 e 2, lâmina 2, cortes 1 e 2, animal (30 dias). Documentação em 08/05/2013, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 1%.

FIG. 9 Corte parassagital de 150 µm no vibrátomo, lâmina 1, corte 1, animal (30 dias). Documentação em 04/07/2012 microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 1%.

FIG. 10 Corte parassagital de 150 µm no vibrátomo, lâmina 1, corte 2, animal (30 dias). Documentação em 04/07/2012 microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 1%.

Corte parassagital de 40 µm no criostato, lâmina 3, corte 1, animal (30 dias). Documentação em 10/06/2011, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 1%.

FIG. 11 Corte parassagital de 40 µm no criostato, lâmina 3, animal (30 dias). Documentação em 22/11/2010 microscopia confocal (Zeiss LSM) Tecido fixado em PLP 1%.

Corte parassagital de 40 µm no criostato, lâmina 6, animal (30 dias). Documentação em 21/02/2011, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 1%.

Corte parassagital de 40 µm no criostato, lâmina 9, animal (30 dias). Documentação em 14/10/2011, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 1%.

FIG. 12 Corte coronal de 40 µm no criostato, lâmina 22, corte 3, animal (30 dias). Documentação em 05/04/2012, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 1%.

Corte coronal de 40 µm no criostato, lâmina 8, corte 1, animal (30 dias). Documentação em 22/08/2012, microscopia confocal (Zeiss LSM). Tecido fixado em PLP 1%.

Corte coronal de 40 µm no criostato, lâmina 6, corte 2, animal (30 dias). Documentação em 27/08/2012, microscopia confocal (Leica SP5). Tecido em PLP 1%.

FIG. 13 Corte coronal de 40 μm no criostato, lâmina 1, corte 2, animal (30 dias). Documentação em 05/10/2012, microscopia confocal (Zeiss LSM) Tecido fixado em PLP 1%.

Corte coronal de 40 μm no criostato, lâmina 24, corte 1, animal (30 dias). Documentação em 22/08/2012, microscopia confocal (Zeiss LSM) Tecido fixado em PLP 1%.

FIG. 14 Corte coronal de 40 μm no criostato, lâmina 10, corte 1, animal (30 dias). Documentação em 02/05/2012, microscopia confocal (Zeiss LSM) Tecido fixado em PLP 1%.

Corte coronal de 40 μm no criostato, lâmina 6, corte 2, animal (30 dias). Documentação em 24/05/2012, microscopia confocal (Zeiss LSM) Tecido fixado em PLP 1%.

FIG. 15 Corte coronal de 40 μm no criostato, lâmina 10, corte 3, animal (30 dias). Documentação em 18/05/2012, microscopia confocal (Leica SP5) Tecido fixado em PLP 1%.

Corte coronal de 40 μm no criostato, lâmina 9, corte 2, animal (30 dias). Documentação em 02/05/2012, microscopia confocal (Zeiss LSM) Tecido fixado em PLP 1%.

FIG. 16 Corte coronal de 40 μm no criostato, lâmina 20, corte 3, animal (30 dias). Documentação em 11/10/2011, microscopia confocal (Zeiss LSM) Tecido fixado em PLP 1%.

Corte coronal de 40 μm no criostato, lâmina 9, corte 2, animal (30 dias). Documentação em 02/05/2012, microscopia confocal (Zeiss LSM) Tecido fixado em PLP 1%.

Corte coronal de 40 μm no criostato, lâmina 10, corte 3, animal (30 dias). Documentação em 18/05/2012, microscopia confocal (Leica SP5) Tecido fixado em PLP 1%.