

Glauco da Rocha Finholdt

**Estudo da Expressão do Canal para Sódio Dependente de Voltagem Na_v1.6
nas Células Octopus e Multipolares do PVCN no Núcleo Coclear do
Sistema Auditivo**

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

Orientador: Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues

Uberaba - MG
2011

Dedico essa dissertação às minhas filhas, Jade e Agatha minhas fontes de inspiração para continuar em frente, apesar das adversidades do caminho...



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

Glauco da Rocha Finholdt

Estudo da Expressão do Canal para Sódio Dependente de Voltagem $Na_v1.6$ nas
Células Octopus e Multipolares do PVCN no Núcleo Coclear do Sistema
Auditivo

Uberaba - MG
2011

AGRADECIMENTOS

Às minhas queridas filhas Jade e Agatha, minhas fontes de inspiração, amor e carinho que renovam minhas energias todos os dias. A minha esposa Claudia por sua dedicação como mãe à nossas filhas.

Ao meu orientador Prof. Aldo R. A. Rodrigues pela presença constante nas atividades experimentais, confiança no desenvolvimento do projeto e na grande ajuda e disposição na realização do trabalho proposto.

Ao Professor Valdo José dias pelo apoio dado ao projeto e a sua grande dedicação ao crescimento da pós graduação.

À UFU pelo acesso ao microscópio confocal, e ao trabalho do Prof. Marcelo Belletti na coordenação do uso do mesmo, ao grande trabalho realizado pela técnica Mariane Borges Franco durante sua operação.

Aos colegas do laboratório e do curso de Pós-Graduação:, Carolina Salomão, Geruza, Carolina Capitelli, Otávio, Marcos Paulo, Angélica, Leonardo Almeida, Leonardo Baesse, pelo convívio diário e troca de experiências.

Agradeço a funcionária Elisabete Ambrósio, bibliotecária e secretária do curso de Pós-Graduação, pela qual tenho grande admiração, pelo empenho e dedicação a seu trabalho, além de ser uma pessoa de grande caráter e muita competência.

Agradeço aos grandes amigos técnicos da Fisiologia, Ana Maria, Donizete, Lucas Felipe, ,Marco Aurélio e Fausto pelo apoio e amizade de todos.

Às disciplinas de Bioquímica e Farmacologia pela ajuda, sempre que possível em especial aos técnicos e amigos Douglas, Januário, Marco Túlio, Geraldo e Flávio.

À FAPEMIG e FUNEPU pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização desse trabalho.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar quais subunidades de canais para sódio voltagem dependentes estão presentes em subpopulações neuronais da região póstero-ventral do núcleo coclear (PVCN). Reações de imunofluorescência de simples ou dupla marcação em fatias parassagitais do núcleo coclear revelaram a expressão do canal $Na_v1.6$ no segmento inicial do axônio (AIS) tanto das células octopus quanto das multipolares. Células octopus, cuja área de silhueta somática média foi de $499 \pm 9 \mu m^2$ apresentou uma extensão de marcação anti- $Na_v1.6$ no AIS de $38,1 \pm 2,6 \mu m$, enquanto que nas células multipolares essas medidas foram $271 \pm 11 \mu m^2$ e $16,3 \pm 2,5 \mu m$, respectivamente. A definição que a estrutura marcada com o anticorpo anti- $Na_v1.6$ corresponde ao AIS, foi baseada na colocalização com a marcação anti-anquirina-G. A intensidade de marcação anti- $Na_v1.6$ aumenta com a distância a partir do soma ao longo do AIS. Já a ausência da colocalização da marcação anti- $Na_v1.6$ e anti-MAP-2 sugere a ausência da expressão do canal nos dendritos. Do mesmo modo, a marcação de terminais sinápticos com um anticorpo SV2 e análise de colocalização com esse canal, mostrou que o mesmo não está presente em terminais nervosos que fazem sinapse com neurônios do PVCN. Os resultados obtidos sugerem que o canal para sódio $Na_v1.6$ está expresso nos neurônios já no oitavo dia pós-natal e que sua expressão acompanha o desenvolvimento neuronal permanecendo após sua maturação. Nossos experimentos também revelaram uma intensa marcação dos canais $Na_v1.6$ em nodos de Ranvier e uma discreta marcação no citoplasma somático mas, que aparentemente não está presente na membrana somática. No AIS, as subunidades $Na_v1.1$ e 1.2 não foram encontradas. A alta densidade de canais $Na_v1.6$ no AIS sugere que esse canal é o responsável pela geração do potencial de ação nessas células. A marcação anti- $Na_v1.2$ foi observada em fibras amielinizadas. De um modo geral, nossos dados sugerem que o canal $Na_v1.6$ é a principal subunidade expressa pelas células multipolares e octopus do PVCN onde eles podem estar envolvidos com a geração de potenciais de ação rápidos e em altas frequências que são característicos dessas células.

Palavras-chave: $Na_v1.6$, canais para sódio, segmento inicial do axônio, núcleo coclear, sistema auditivo, células multipolares, células octopus.

ABSTRACT

The present work aimed to evaluate which voltage-dependent sodium channel subunits are expressed in different neuronal subpopulations of the posterior ventral cochlear nucleus (PVCN). Immunofluorescence reactions of the type simple or dual labelling in parasagittal slices of cochlear nucleus revealed the expression of $\text{Na}_v1.6$ channel at the axon initial segments (AIS) in octopus or multipolar cells. Octopus cells, whose average silhouette area were $499 \pm 9 \mu\text{m}^2$ presented an extension of $\text{Na}_v1.6$ labelling at the AIS of $38,1 \pm 2,6 \mu\text{m}$, whereas multipolar cell these measurements were $271 \pm 11 \mu\text{m}^2$ and $16,3 \pm 2,5 \mu\text{m}$, respectively. The definition that the structure labelled with the anti- $\text{Na}_v1.6$ antibody corresponds to the AIS was based in the colocalization with anti-ankyrin-G labelling. The intensity of anti- $\text{Na}_v1.6$ labelling increases with the distance from the soma. The lack of colocalization of anti- $\text{Na}_v1.6$ and anti-MAP-2 labelling suggests the absence of this sodium channel at the dendrites. Similarly, the labeling of synaptic terminals with synaptic vesicle protein 2 antibody (anti-SV2) and colocalization analysis, showed that this channel is not expressed at synaptic terminals on PVCN neurons. The results suggest that $\text{Na}_v1.6$ is present in PVCN neurons at postnatal day eight and that its expression follows the neuronal development being maintained after maturation. Our experimental results also revealed an intense $\text{Na}_v1.6$ labeling at nodes of Ranvier and a weak somatic staining that apparently does not include the somatic membrane. At the AIS, the $\text{Na}_v1.1$ and 1.2 subunits were not detected. The high density of $\text{Na}_v1.6$ channel at the AIS suggests that this channel is responsible for the action potential generation at these cells. $\text{Na}_v1.2$ labeling was observed at unmyelinated fibers. Overall, our data suggest that $\text{Na}_v1.6$ is the main subunit expressed at multipolar and octopus cells of PVCN where it may be involved with the generation of action potentials at high frequency that is a characteristic of these cells.

Keywords: $\text{Na}_v1.6$, sodium channels, axon initial segment, cochlear nucleus, auditory system, multipolar cells, octopus cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 Padrão de inervação do núcleo coclear pelas fibras auditivas primárias	14
Fig. 2 Células stelletes (multipolares) desenhadas em câmera lúcida	17
Fig. 3 Progressão lateromedial de um corte parassagital do núcleo coclear corado pelo método de Nissl	27
Fig. 4 Visão panorâmica do núcleo coclear pelo padrão de imunomarcção para proteína de microtúbulo Map-2, morfologia e localização das células multipolares e octopus da região pósterio-ventral do núcleo coclear PVCN	28
Fig. 5 Expressão do canal $Na_v1.6$ na parte posteroventral do núcleo coclear de ratos de trinta dias da região das células octopus	30
Fig. 6 Expressão de canais para sódio do subtipo $Na_v1.6$ nas células octopus da região pósterio-ventral do núcleo coclear (PVCN) em um rato de 15 dias	31
Fig. 7 Expressão do canal $Na_v1.6$ na parte posteroventral do núcleo coclear de ratos de 15 dias na região das células octopus	33
Fig. 8 Co-localização de anquirina-G e do canal $Na_v1.6$ no AIS de neurônios do PVCN de ratos de 15 dias	34
Fig. 9 Co-localização de anquirina-G e do canal $Na_v1.6$ no AIS de neurônios do PVCN e de ratos de 8 dias	35
Fig. 10 Análise da extensão da marcação anti- $Na_v1.6$ ao longo dos segmentos iniciais de axônios (AISs) das células octopus do PVCN	37
Fig. 11 Expressão do canal $Na_v1.6$ nas células de Purkinje do cerebelo em ratos de 15 dias	38
Fig. 12 Colocalização do canal $Na_v1.6$ e anquirina-G nas células de Purkinje	39
Fig. 13 Bloqueio da reação de imunofluorescência para $Na_v1.6$ pela pré-incubação do anticorpo com o peptídeo antigênico em secções parassagittais adjacentes do cerebelo	41

Fig. 14 Expressão do canal Na _v 1.6 em possíveis células de multipolares do PVCN	42
Fig. 16 Análise da extensão da marcação anti-Na _v 1.6 ao longo dos segmentos iniciais de axônios (AISs) de prováveis células multipolares do PVCN	43
Fig. 17 Ausência da expressão do canal Na _v 1.6 em terminais que fazem sinapse com neurônios do PVCN (área das células multipolares, rato de 30 dias)	45
Fig. 18 Ausência da expressão do canal Na _v 1.6 em terminais que fazem sinapse com neurônios do PVCN (área das células multipolares, corte parassagital, rato de 15 dias)	47
Fig. 19 Marcação do anticorpo anti-Na _v 1.2 no PVCN de ratos de 30 dias	49
Fig. 20 Expressão do canal Na _v 1.2 em neurônios do PVCN do núcleo coclear de ratos de 15 dias	50
Fig 21- Análise da expressão de canais para sódio no PVCN utilizando um anticorpo que reconhece diferentes subunidades formadoras de canais para sódio (PAN)	51

LISTA DE ABREVIATURAS

1. 8cn	Ramo coclear do nervo vestibulo-coclear
2. 8vn	Ramo vestibular do nervo vestibulo-coclear
3. AIS	Segmento inicial do axônio
4. Ank-G	Anquirina-G
5. CAMs	Moléculas de adesão celular
6. PVCN	Núcleo coclear posteroventral
7. DCN	Núcleo coclear dorsal
8. DRG	Gânglio da raiz dorsal
9. GBCs	Células globulares em arbusto
10. ICP	Pedúnculo cerebelar inferior
11. IgG	Imunoglobulina
12. Kv	Canal para potássio dependente de voltagem
13. LSO	Oliva superior lateral
14. M	Molar
15. MAP-2	Proteína associada aos microtúbulos
16. MCA	Área das células multipolares
17. MCP	Pedúnculo cerebelar médio
18. MNTB	Núcleo medial do corpo trapezoidal
19. MSO	Oliva superior medial
20. Na ⁺	Sódio
21. Na _v	Canal para sódio dependente de voltagem
22. NR	Raiz nervosa
23. OCA	Area das células octopus
24. Pn	Dia pós-natal
25. PAN	Anticorpo Pan
26. PBS	Solução de salina tamponada com fosfato
27. PFA	Paraformaldeído
28. PLP	Paraformaldeído-lisina-periodato
29. PVCN	Núcleo coclear póstero-ventral
30. SV2	Proteína 2 de vesícula sináptica
31. TE5	Trato espinhal trigeminal
32. TTX	Tetrodotoxina
33. Tz	Corpo trapezoidal
34. VCN	Núcleo coclear ventral
35. VNLL	Núcleo ventral do lemenisco lateral

INTRODUÇÃO

1.1- Anatomia e fisiologia da parte periférica do sistema auditivo

O sistema auditivo é capaz de detectar e analisar sons de uma ampla faixa de frequência espectral e intensidades. Humanos podem ouvir sons de frequência entre 20 e 20 kHz e outros mamíferos frequências até 100 kHz (Nobles E Ruggero, 2001). O ouvido externo de humanos é constituído pelo pavilhão auricular, concha e meato acústico externo. O pavilhão auricular é formado por um esqueleto de cartilagem elástica recoberto por pele, de forma afunilada, com saliências e depressões, sendo a maior depressão denominada de concha auricular. A sua parte inferior, denominada lóbulo é desprovida de cartilagem. Uma região saliente na parte anterior é denominada trágus e protege a entrada do meato acústico externo (Brodal, 1993). O pavilhão auricular e a concha são responsáveis por coletarem a energia sonora e afunilá-la em direção ao tímpano através do meato acústico externo. Além disso, filtram de maneira seletiva diferentes frequências sonoras a fim de fornecer informações sobre a localização da fonte sonora no plano vertical. A assimetria vertical das convoluções da orelha confere um formato que permite ao ouvido externo transmitir mais componentes de alta frequência a partir de uma fonte posicionada em altura maior do que uma que esteja no mesmo nível dela (Brodal, 1993).

A membrana timpânica ou tímpano está localizado no ouvido médio e consiste em uma membrana delgada, côncava e levemente em forma de cone, cujo ápice está voltado para o interior do ouvido médio. A energia mecânica do som faz vibrar esta membrana levando a movimentação dos ossículos do ouvido médio (Dallas, 1992 ; Brownell, 1997). Há três ossículos no ouvido médio, o martelo, a bigorna e o estribo. O martelo adere-se à membrana timpânica pelo manúbrio e através da cabeça se articula com o corpo da bigorna, a bigorna articula-se com o estribo e a base deste adere-se à janela oval. Quando a pressão do ar no meato acústico externo e no ouvido médio está equilibrada, a membrana timpânica vibra à medida que as ondas sonoras a atingem (Dallas, 1992)

A energia mecânica das ondas sonoras ao alcançarem a membrana timpânica é transmitida através dos ossículos do ouvido médio para fluídos do ouvido interno pela base do estribo. A ação tipo êmbolo do estribo transmite a energia das ondas sonoras para a perilinfa na escala vestibular através da janela oval. A área do tímpano é maior que a área da membrana da janela oval, o que leva a um aumento da pressão na membrana da janela oval, considerando que pressão igual a força dividida pela área. Os ossículos do ouvido médio

também atuam como alavancas, aumentando a pressão na entrada da cóclea e maximizando a energia do som que alcança os fluídos do ouvido interno (Brownell, 1997).

A energia transmitida para a perilínfa produz ondas progressivas na membrana basilar, que se propagam da base da cóclea para o seu ápice. O deslocamento da membrana basilar atua como um analisador de frequência mecânica na distribuição do estímulo, provocando a inclinação das células ciliadas do órgão de Corti em contato com a membrana tectorial (Dallas, 1992). Quando a membrana basilar vibra, em consequência da energia mecânica, a membrana tectorial não vibra no mesmo intervalo de tempo, resultando numa deformação dos cílios a cada nova onda vibratória. Esse deslocamento periódico provoca alterações de permeabilidades iônicas que causam alterações na voltagem transmembrana da célula ciliar. Existem estudos que indicam que a abertura e o fechamento do fluxo iônico são regulados por um canal da família TRPA1 (Corey et al., 2004). O deslocamento dos estereocílios em uma direção (na direção do cílio maior) aumenta a tensão sobre as conexões nas pontas dos estereocílios, o que leva ao aumento no influxo de K^+ e a geração de um potencial receptor. Por outro lado, o deslocamento dos estereocílios na direção oposta alivia a tensão sobre as conexões das pontas dos estereocílios permitindo o fechamento do canal e do influxo de K^+ . A entrada de K^+ na célula ciliada provoca despolarização, que abre canais para cálcio e produz a liberação do transmissor na sinapse com os prolongamentos periféricos dos neurônios bipolares do gânglio espiral, desencadeando potenciais pós-sinápticos excitatórios.

As células ciliadas localizadas no ápice da cóclea são estimuladas por sons de baixa frequência e as situadas na base por sons de alta frequência, criando uma tonotopia ao longo da cóclea. As células ciliadas internas (cerca de 3500) são as principais células receptoras auditivas e formam a coluna mais interna ao longo do Órgão de Corti. As células ciliadas externas formam as três fileiras mais externas e são em número maior (12000 a 16000). A informação acústica, codificada na forma de potenciais de ação, é conduzida pelo nervo coclear, formado pelos prolongamentos centrais dos neurônios do gânglio espiral, para o tronco encefálico, mais especificamente, no núcleo coclear (Young, 2004; Hudspeth, 2000; Lent, 2004).

O nervo auditivo possui entre 30000 a 50000 fibras que podem ser mielinizadas e amielinizadas. A maioria destas fibras é do tipo I mielinizadas, cerca de 90 a 95%. Uma única fibra do tipo I inerva uma ou duas células ciliadas internas e iniciam a análise da frequência e da intensidade do estímulo sonoro (Young, 2004). As fibras amielinizadas (tipo II) realizam sinapses com até 10 células ciliadas externas. As células ciliadas externas, observadas na cóclea, estão dispostas em três camadas e fazem sinapse com os neurônios do tipo II do

ganglio espiral (fibras eferentes auditivas amielinizadas). Essas células apresentam motilidade e participam no ajuste da micromecânica do Órgão de Corti (Nobili et al., 1998). As fibras aferentes auditivas (mielinizadas e amielinizadas) formam a divisão coclear do nervo vestibulo-coclear (VIII par craniano) e terminam tanto na parte ventral quanto na dorsal do núcleo coclear do tronco encefálico (Smith & Spirou, 2002).

1.2- Núcleo coclear: O primeiro centro de decodificação da informação acústica

Os núcleos cocleares formam o primeiro centro de transmissão da via auditiva no sistema nervoso central, onde se encontram os neurônios chamados “secundários” e que recebem informações ascendentes das fibras do nervo coclear. A informação acústica que chega ao tronco encefálico dos mamíferos é carreada, na sua maior parte, por grandes fibras mielinizadas do nervo auditivo e que estão organizadas tonotopicamente (Brawer et al., 1974). Essas fibras auditivas atravessam o meato acústico interno do osso temporal atingindo os núcleos cocleares na região caudal da ponte, lateralmente às fibras do pedúnculo cerebelar inferior (Musiek & Baran, 1986). O desenvolvimento de técnicas de registro eletrofisiológico e de preenchimento de neurônios com marcadores celulares (e.g. peroxidase), permitiram traçar as projeções neuronais e monitorar a atividade elétrica em resposta a estímulos acústicos possibilitando a correlação direta entre a morfologia e fisiologia neuronal (Caspary et al., 1972).

O núcleo coclear pode ser dividido numa parte dorsal (DCN) e ventral (VCN). Esse último é subdividido numa porção anterior (AVCN), posterior (PVCN) e uma região da raiz nervosa (NR) (Brawer et al., 1974), como indicado na Figura 1A. Os axônios do nervo coclear adentram pela raiz do nervo e dividem-se nos segmentos ascendente e descendente. A subdivisão do núcleo ventral em anterior e posterior leva em consideração o ponto de entrada do nervo ou seja, a raiz nervosa. Os ramos ascendentes projetam pelo AVCN e os ramos descendentes pelo PVCN, em direção ao DCN (Figura 1A). A organização das projeções das fibras do nervo coclear no núcleo coclear origina uma representação cocleotópica (tonotópica) e permite uma distribuição precisa de frequências dentro do núcleo. As fibras nervosas advindas dos neurônios em posição basal na cóclea (alta frequência) se dirigem para regiões mais dorsais dos NC, já as fibras de regiões apicais (baixa frequência) projetam para as posições ventrais (Brawer et al., 1972), como pode ser observado na figura 1A.

O núcleo coclear inicia a codificação e a integração de mensagens auditivas, não devendo ser considerado somente uma simples estação de passagem da informação acústica

(Osen et al., 1969). A organização tonotópica do núcleo coclear faz com que neurônios localizados na região dorsal respondam a frequências mais agudas (altas) e os localizados mais ventralmente respondam a frequências mais graves (baixas) (Brodal, 1993, Ryugo e Parks, 2003) (ver figura 1A).

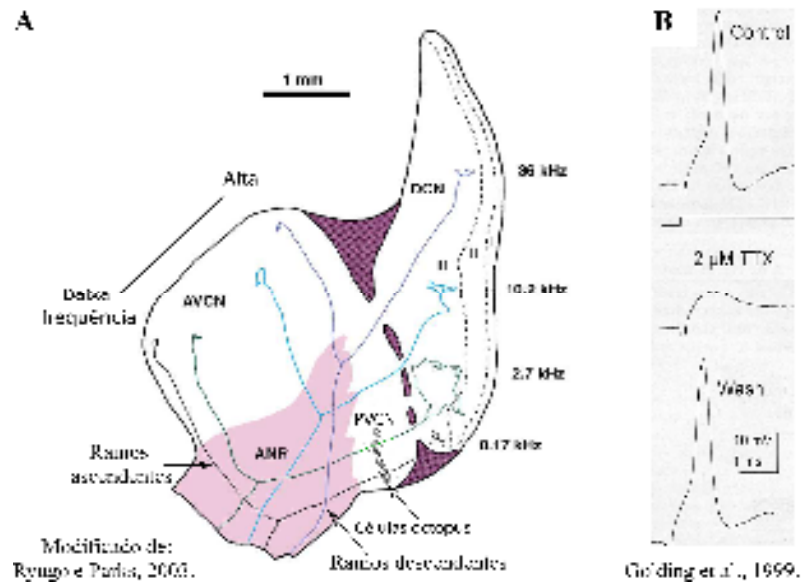


Figura 1- Padrão de inervação do núcleo coclear pelas fibras auditivas primárias. A, Uma única fibra auditiva primária ao adentrar o núcleo se divide formando o ramo ascendente e o descendente. As células octopus do PVCN possuem dendritos que recebem a aferência de um grande número de fibras. As fibras de baixa frequência fazem sinapse próximo ao soma e continuam para inervar células de regiões mais ventrais do DCN. As fibras de alta frequência fazem sinapse nas pontas dos dendritos e terminam em regiões mais dorsais do DCN. No AVCN também é observado uma distribuição tonotópica, com sua parte mais dorsal recebendo a aferência de fibras auditivas que inervam a base da cóclea (alta frequência). B, Potencial de ação de uma célula octopus e sua sensibilidade à tetrodotóxina (TTX).

Em 1969 desenvolveram-se critérios para a definição de tipos de células nos núcleos cocleares de ratos e gatos. Usando técnicas histológicas que permitem a visualização da morfologia neuronal, os estudos revelaram um grande número de diferentes tipos celulares que estão distribuídos diferencialmente no núcleo coclear ventral e dorsal. Na literatura atual as populações de células são distintas e geralmente nomeadas de acordo com Osen et al 1969 (ratos), com modificações com base em Brawer et al., 1972 (gatos).

Um dos tipos neuronais encontrados no PVCN é a célula octopus. Elas foram observadas, por exemplo, em gatos (Osen, 1969; Adams, 1997) humanos (Adams, 1997), ratos (Harrison & Irving, 1966) e camundongos (Webster & Trune, 1982; Oertel et al., 1990; Golding et al., 1995). Essas células possuem propriedades morfológicas e biofísicas particulares e ocupam a região caudal do PVCN. Seus dendritos estão orientados na direção

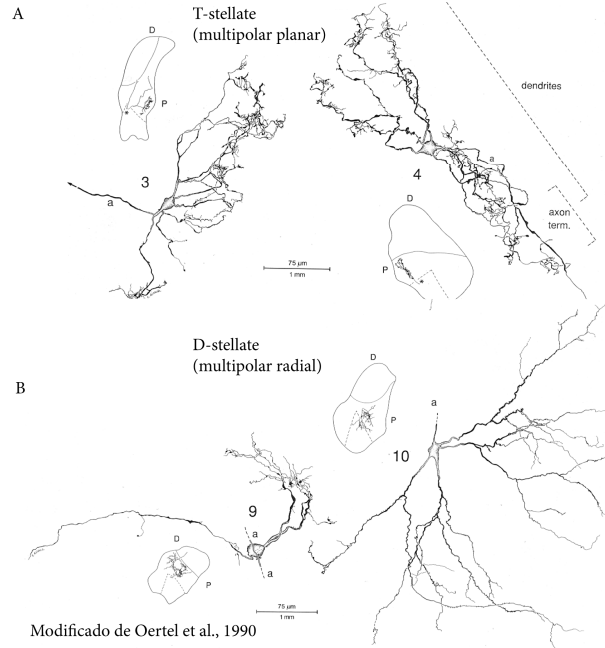
dos ramos descendentes das fibras auditivas (Figura 1A). Osen (1969) nomeou essas células de octopus devido aos dendritos de grossos e que emergem de um único lado do corpo celular, lembrando os tentáculos de um polvo. As células octopus representam um dos tipos celulares mais distintos do núcleo coclear e são encontradas em pequeno número (Willott & Bross, 1990). Em camundongos observa-se cerca de 200 células *octopus* por núcleo coclear (Willott & Bross, 1990). Registros de sua atividade em resposta a estímulos sonoros *in vivo*, indicam que uma célula octopus recebe aferências de um grande número de fibras, que cobrem uma ampla área de frequências características (Godfrey et al., 1975; Rhode & Smith, 1986). Estudos anatômicos indicam que os dendritos das células octopus cruzam os feixes das fibras auditivas descendentes no PVCN (Osen, 1969; Golding et al., 1995). As fibras auditivas excitam as células octopus através de receptores glutamatérgicos do subtipo AMPA, de condutância alta e de cinética rápida (Gardner et al., 1999). A baixa resistência de *input* e a rápida constante de tempo dessas células permitem que as correntes sinápticas glutamatérgicas, quando supralimiares (devido à somação), produzam um rápido potencial de ação, geralmente de cerca de 1 ms de duração (Golding et al., 1999; Ferragano & Oertel, 2002), como pode ser observado na Figura 1B. De acordo com Young (2004), os diferentes neurônios do núcleo coclear projetam para diferentes núcleos do sistema auditivo. As células octopus projetam contralateralmente para o núcleo ventral do lemnisco lateral (VNLL) (Smith et al., 1993, Adams 1997). A projeção das células octopus para o VNLL é via grandes terminais em cálix (Adams, 1997; Vater et al., 1997). O núcleo periolivar superior também é um dos alvos das células octopus (Schofield, 1995).

Um outro tipo comum de células encontradas no núcleo coclear é as células multipolares. A terminologia multipolar foi originalmente usada para descrever células coradas pelo método de violeta de cresila, cujos múltiplos dendritos lhe davam a forma de um polígono (ou multipolar) (Osen, 1969). Em ratos, as células multipolares do núcleo coclear foram subdivididas em planares e radiais com base na área somática, morfologia e orientação dendrítica e projeção axonal (Cant, 1981; Cant & Gaston, 1982). Em camundongos foram chamadas de *T-stellate* ou *D-stellate*, respectivamente (Oertel et al., 1990) e em gatos, baseado no padrão de resposta a estímulos sonoros, foram denominadas *sustained choppers* (Cs; disparam tonicamente) e *onset choppers* (Oc, de resposta transiente), respectivamente (Smith & Rhode, 1989; Blackburn & Sachs, 1989). De uma maneira geral o corpo deste tipo celular tende a ser arredondado, com 2 ou 3 processos celulares visíveis. O núcleo celular, em geral, está localizado centralmente (Osen, 1969).

As células planares são mais numerosas, cerca de 90% da população de células multipolares, e estão espalhadas pelo PVCN e região da raiz nervosa medindo de 266 a 300 μm^2 em média. Essas células produzem neurotransmissor excitatório (glutamato) e possuem um número relativamente menor de terminais sinápticos envolvendo seus corpos celulares, quando comparado às células multipolares radiais. As células multipolares planares projetam através do corpo trapezoidal para o colículo inferior contralateral (Adams & Warr, 1976; Adams, 1979). Essas células também projetam para o DCN (Adams, 1979; Doucet & Ryugo, 1997) do mesmo modo como as células *T-stellate* de camundongos (Oertel et al., 1990; Ferragano e Oertel, 1999; Fujino & Oertel, 2001), ou as células Cs de gatos (Smith & Rhode, 1989). As células *T-stellate* também fazem contatos sináptico entre si (Ferragano & Oertel, 1998). Além desses diferentes nomes descrevendo as células multipolares em diferentes espécies, Cant (1981), baseando-se na quantidade de *inputs* somáticos em estudos de microscopia eletrônica, nomeou os neurônios planares e radiais em tipo 1 e tipo 2, respectivamente.

Os neurônios *T-stellate* formam a principal via ascendente excitatória para o colículo inferior contralateral, e também participam de circuitos de retroalimentação para a cóclea (Smith et al., 1993). A principal via de excitação para as células *T-stellate* é pelas fibras aferentes auditivas glutamatérgicas, mas neurônios do núcleo coclear ventral (VCN) são também inervados por neurônios eferentes do núcleo ventral do corpo trapezoidal (VNTB) (Sherriff & Henderson, 1994). O VNTB (um dos núcleos periolivares) é uma coleção heterogênea de tipos celulares embebida dentro de axônios do corpo trapezoidal, localizada ventral e medial ao MSO e abaixo do MNTB (Smith & Spirou, 2002). Neurônios colinérgicos nesse núcleo formam um importante componente eferente (sistema MOC) (Smith & Spirou, 2002) para a cóclea e para o VCN (Winter et al., 1989).

As células multipolares radiais são menos numerosas, em torno de 10% da população, podem medir em média de 400 a 500 μm^2 e produzem o neurotransmissor inibitório (glicina), sendo ricas em terminais sinápticos envolvendo seus corpos celulares (Doucet & Ryugo, 2008). As células multipolares radiais de ratos, projetam seus axônios via estria acústica intermediária para o DCN (Smith & Rhode, 1989, Oertel et al., 1990). Elas são a fonte inibitória para as células *T-stellate* do VCN (Ferragano et al., 1998). Muitas células *D-stellate*, mas provavelmente não todas, projetam para o núcleo coclear contralateral (Cant & Gaston, 1982; Needham & Paolini, 2003).



Modificado de Oertel et al., 1990

Figura 2- Morfologia, orientação dendrítica e localização das células multipolares planares (*T-stellate*) e radiais (*D-stellate*) do núcleo coclear ventral. A, Desenho utilizando câmera lúcida de duas células multipolares planares ilustrando a localização no PVCN e a orientação dos dendritos (próxima ao paralelismo com os ramos das fibras auditivas) em cortes parassagitais. B, dendritos de uma célula multipolar radial ocupando uma grande área no sentido rostro-caudal (perpendicular as fibras auditivas).

1.3- Canais para sódio voltagem dependentes

Diferentes tipos de canais para sódio foram identificados por métodos eletrofisiológicos, bioquímicos e de clonagem (Goldin, 2001). A expressão desses canais para sódio pode ser apreciada em nervos, músculos e algumas células neuroendócrinas (Catterall, 2005). Os canais para sódio são membros da superfamília de canais iônicos, que incluem canais para potássio e cálcio dependentes de voltagem (Yu & Catterall, 2004).

Os canais para sódio são constituídos pelas subunidades α e β . A subunidade α é formada por quatro domínios de seis segmentos transmembrana cada, sendo que no quarto segmento de cada domínio existe a presença de cargas positivas funcionando como o sensor de voltagem do canal, os segmentos 5 e 6 de cada domínio contribuem para formar o filtro de seletividade do canal e a pequena alça intracelular, entre os domínios 3 e 4, atua como portão de inativação quando se dobra para o interior do canal e bloqueia a parte interna do poro durante uma despolarização prolongada da membrana (Catterall et al., 2005). As subunidades β são descritas como moduladoras da atividade da subunidade α (Goldin et al., 2000).

Chandy e Gutman (1993) utilizaram um sistema numérico para definir as subfamílias e subtipos de canais para potássio baseado na homologia da sequência de aminoácidos dos canais. Golding et al. (2000) utilizaram esse sistema de nomenclatura para classificar os subtipos de canais para sódio. A nomenclatura utiliza o nome do íon que permeia o poro do canal (Na) junto com o principal regulador fisiológico (voltagem) indicado em subscrito (Na_v). O primeiro número subscrito indica a subfamília do gene e o número que segue, após o ponto, indica o subtipo específico (e.g. $\text{Na}_v1.1$). Existem nove isoformas distintas de canais para sódio identificadas em mamíferos e que exibem uma homologia da sequência de aminoácidos superior a 50%. Por esses critérios, todas as nove isoformas de canais para sódio são consideradas membros de uma única subfamília (Goldin et al., 2001).

A distribuição dos nove subtipos de canais para sódio nos tecidos é variada. Na musculatura cardíaca é expressa principalmente a subunidade $\text{Na}_v1.5$ e na musculatura esquelética a subunidade $\text{Na}_v1.4$. As subunidades $\text{Na}_v1.8$ e $\text{Na}_v1.9$ parecem estar restritas aos neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula (Akopian et al., 1996). Em relação à farmacologia, as subunidades $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.8$ e $\text{Na}_v1.9$ são resistentes à Tetrodotoxina (TTX), sendo as demais subunidades sensíveis a essa toxina (Narahashi, 1960, Waxman et al., 1999, Matsutomi et al., 2006). A TTX é uma ferramenta farmacológica muito utilizada em estudos neurofisiológicos, principalmente quando o objetivo é bloquear canais para sódio. Seu mecanismo de ação ocorre pelo bloqueio do filtro de seletividade do canal, bloqueando o influxo do íon Na^+ com alta afinidade e seletividade, sem qualquer efeito em outros receptores ou canais iônicos (Narahashi, 2008, Catterall et al., 2005).

Caldwell et al. (2000) descreveram que o canal $\text{Na}_v1.6$ é o canal para sódio predominante em nodos de Ranvier de fibras mielinizadas do sistema nervoso periférico e central. Em camundongos nocautes para essa subunidade é possível registrar potenciais de ação em axônios mielinizados do sistema nervoso periférico, sugerindo que outras isoformas compensam a ausência dessa subunidade, porém essa compensação parece não ocorrer de maneira adequada visto que esses animais morrem entre a terceira e quarta semana de vida.

Boiko et al., 2003 estudaram a localização dos canais $\text{Na}_v1.2$ e $\text{Na}_v1.6$ nas células ganglionares da retina. Neste estudo observou-se que os canais $\text{Na}_v1.2$ estão agrupados nos segmentos iniciais do axônio (AISs) dessas células e em nodos de Ranvier, ao longo das fibras nervosas no início do desenvolvimento embrionário. Durante o desenvolvimento pós-natal a subunidade $\text{Na}_v1.6$ tem sua expressão aumentada (em P2 é observada em 2,6% dos AISs, em P9 40% e em P14 80%) enquanto a subunidade $\text{Na}_v1.2$ se reduz, mas ainda permanece no AIS e nos nodos de Ranvier de animais adultos. Assim, a subunidade $\text{Na}_v1.2$

persiste numa menor densidade no AIS mas, é a principal subunidade ao longo da parte não mielinizada do axônio, que segue ao AIS das células ganglionares adultas. Esse mesmo grupo de pesquisa em outro trabalho, demonstrou que a subunidade $Na_v 1.6$ estaria segregada numa região mais distal do AIS, enquanto $Na_v 1.1$ seria encontrado em uma região do AIS mais próxima do soma (Van Wart et al., 2007).

A hipótese que o AIS é o sítio de geração do potencial de ação foi feita é de longa data conhecida na literatura. Palay et al. (1968) demonstraram por microscopia eletrônica que no AIS e, apenas nessa região do neurônio, os microtúbulos estão organizados em fascículos. Esses autores também demonstraram que abaixo da membrana plasmática do AIS existe uma modificação estrutural que consiste de uma camada de material granular denso. Segundo os autores, essa especialização poderia estar envolvida com a excitabilidade do neurônio. Mais recentemente, vários grupos de pesquisa têm estudado as proteínas que participam na organização do AIS e que, provavelmente, são a fonte de material granular denso descrita por Palay e colaboradores. O AIS parece funcionar como uma barreira difusional entre o soma/dendritos e o axônio, selecionando a passagem de determinadas substâncias para o próprio AIS e para partes mais distais do axônio (Winckler et al., 1999; Hedstrom et al., 2007, Rasband MN, 2008; Bréchet et al., 2008, Ogawa & Rasband, 2008). Zhou e colaboradores (1998) apontaram a anquirina-G (Ank-G) como a principal responsável pela ancoragem e manutenção dos canais para sódio nos subdomínios do axônio. Estudos atuais sugerem que essa proteína é responsável pela montagem estrutural do AIS (Hedstrom et al., 2007, Rasband, 2008). Essa seria a primeira proteína a se acumular no AIS durante o desenvolvimento, sendo acompanhada pela βIV espectrina, e os canais para sódio (Jenkins & Bennett, 2001, Boiko et al., 2007), sendo fundamental na localização, ancoramento e recrutamento de canais voltagem dependentes (sódio e potássio).

Neurônios do gânglio espiral da cóclea que formam as fibras tipo I (mielinizadas) do nervo auditivo exibem um corpo celular mielinizado. Nesses neurônios os canais $Na_v 1.6$ foram localizados nos nodos de Ranvier próximos ao corpo celular e na parte distal amielinizada do processo periférico, dentro do órgão de Corti, no ponto onde os mesmos fazem sinapse com as células ciliadas internas tipo I (Houssain et al., 2005). Os neurônios do gânglio espiral que formam as fibras tipo II (amielinizadas), e que não exibem um soma mielinizado, expressam $Na_v 1.6$ nos segmentos iniciais do axônio dos processos centrais e periféricos e também na parte distal do processo periférico, no ponto onde os mesmos fazem sinapse com as células ciliadas externas. Sugerem os autores que o canal $Na_v 1.2$ está presente também ao longo do axônio das fibras tipo II. Os autores descrevem o canal $Na_v 1.2$ nas fibras

eferentes que projetam para a cóclea (e que também inervam alguns neurônios do núcleo coclear (Houssain et al., 2005a).

Nos neurônios principais do núcleo medial do corpo trapezoidal (MNTB) do sistema auditivo, a subunidade $Na_v1.6$ é expressa em camundongos em P7, mas não em camundongos em P14. Nos camundongos (P14), a subunidade $Na_v1.1$ é expressa nesses neurônios enquanto $Nav1.2$ não foi detectada (Leão et al., 2006). Segundo esses autores, a subunidade $Na_v1.6$ é expressa apenas em camundongos P14 surdos. Em outro trabalho esses autores descrevem a presença de canais de sódio nos dendritos das células principais do MNTB, embora não tenham identificado a subunidade presente nesses dendritos (Leão et al., 2008).

No sistema auditivo, a expressão dos canais para sódio $Na_v1.6$ foi também identificada no heminodo terminal do axônio das células globulares em arbusto da raiz nervosa do VCN que fazem a sinapse calix de Held com as células principais do MNTB (Leão et al. 2005). Diferentemente ao descrito acima para as células do MNTB, estes autores observaram que a expressão da subunidade $Na_v1.6$ nesse heminodo terminal aumenta consideravelmente com o desenvolvimento dos ratos (entre P6 e P13); a subunidade $Na_v1.2$ não foi detectada (em P6 ou P13). Esses autores discutem que a subunidade $Na_v1.6$ possibilita frequências mais altas de disparos de potenciais de ação. De fato, Zhou & Goldin, (2004) demonstraram que a subunidade $Na_v1.6$ exibe propriedades biofísicas adequadas para descarga repetitiva de alta frequência.

Nas células *octopus* do núcleo coclear em resposta à injeção de corrente em experimentos de *current-clamp*, observa-se uma resposta transiente, ou seja, apenas um ou dois potenciais de ação no início do pulso despolarizante (Oertel et al., 2000; Bal & Oertel, 2000). As células *octopus* do núcleo coclear apresentam um potencial de ação rápido (≈ 1 ms) e de baixa amplitude. Tal observação se refere aos registros de células *octopus* de camundongos de idade entre 15 a 18 dias (Bal & Oertel, 2000). Considerando que o início da audição em camundongos ocorre por volta do décimo segundo dia pós-natal, tal observação é referente às células *octopus* maduras. O potencial de ação nas células *octopus* é bloqueado por $1.0 \mu\text{M}$ de TTX, o que indica ser gerado, pelo menos em grande parte, por canais para Na^+ (Ferragano & Oertel, 2002), embora canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem também estejam presentes nessa célula (Golding et al., 1999). Nas células T e D *stellate*, em resposta à injeção de corrente observa-se potenciais de ação repetidos (Rodrigues & Oertel, 2006), o que contrasta com o observado nas células *octopus*. Experimentos de imunomarcção de canais para sódio em neurônios da parte posterior do núcleo coclear ventral poderiam indicar quais

são as subunidades presentes nas células octopus e nas células multipolares e indicar a localização preferencial desses canais.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Caracterizar a expressão dos canais para sódio dependentes de voltagem em neurônios maduros da parte posterior do núcleo coclear ventral (PVCN) do sistema auditivo.

2.2- Objetivos específicos

- Avaliar a expressão da subunidade Nav1.1, 1.2 e 1.6 nas células octopus e multipolares do PVCN em ratos de 30 dias;
- Avaliar se o canal Nav1.6 está presente nos dendritos proximais e soma desses neurônios através da análise de colocalização com a proteína 2 associada a microtúbulos (MAP-2);
 - Determinar se o canal Nav1.6 está presente em terminais sinápticos do PVCN;
 - Determinar se o canal Nav1.6 está presente ao longo do AIS através da análise de colocalização com a proteína anquirina-G (ank-G), quantificar a extensão da marcação e se existe mudança aparente na expressão ao longo do AIS;
 - Determinar se o canal Na_v1.6 está presente nesses neurônios no 15^o e 8^o dia do desenvolvimento pós-natal.

3- METODOLOGIA

3.1- Animais utilizados

Os procedimentos com animais e a coleta de material realizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA-UFTM) de acordo com o protocolo 61 (vide anexo I). Foram utilizados ratos machos e fêmeas Wistar provenientes do biotério da Disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os animais eram mantidos em condições fixas de temperatura (24 ± 1 °C) e luz (ciclo de doze horas) em caixas plásticas (40 x 34 x 17 cm) e com livre acesso à ração balanceada (Nuvilab) e água filtrada. As caixas eram limpas 3 vezes/semana com detergente e água e forradas com maravalha não autoclavada. Os animais utilizados foram mantidos junto com outros animais da ninhada até o seu uso. A data de nascimento dos mesmos foi sempre anotada. Todo esforço foi feito para reduzir ao máximo o número de animais utilizados.

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de tiopental (100 mg/Kg) anteriormente aos procedimentos cirúrgicos descritos abaixo. A profundidade da anestesia foi avaliada pelo pinçamento da cauda e ausência do reflexo de retirada. Quando foi observado o reflexo uma dose adicional de anestésico correspondente a 30% da dose inicial foi suplementada. A suplementação raramente ocorreu visto que foi utilizada uma alta dose inicial.

3.2- Preparação do tecido para imunofluorescência em lâminas

Ratos Wistar de 15 e 30 dias foram perfundidos transcardiacamente com uma solução salina (PBS) por cinco minutos da seguinte composição: 142 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 8,06 mM NaHPO_4 , pH 7.4, a 24 °C. Em seguida, foi feita a perfusão transcardíaca da solução fixadora que consistiu de: paraformaldeído a 1% (Sigma P6148) (peso/volume), 75 mM de lisina (L-lysine monohydrochloride; Sigma L5626) e 10 mM de metaperiodato de sódio (Sigma, S1878) em tampão fosfato de sódio 37 mM, sempre preparada à fresco e perfundida à baixa temperatura (≈ 4 °C). Em um pequeno grupo de experimentos essa solução consistiu de paraformaldeído a 4% (peso/volume) em PBS. A perfusão foi feita durante 30 minutos num fluxo aproximado de 8 mL/min. com uma bomba peristáltica (Incibrás BP-100).

Após a decaptação, a calota craniana foi aberta rapidamente para obtenção do acesso à cavidade craniana, onde o nervo auditivo foi cuidadosamente seccionado, no ponto onde esse emerge do meato acústico interno do osso temporal, com auxílio de um estereomicroscópio (D.F. Vasconcellos M90). Em seguida, um bloco de tecido contendo o núcleo coclear foi

cortado, de forma parasagital, imerso em solução de sacarose 30% em PBS. Após a submersão do tecido (36 a 48 horas), o bloco do tecido foi acondicionado em cápsula plástica de remédio embebida em Tissue-Tek (Sakura Finetek, Japan) em uma cápsula de remédio e congelado pela imersão em metilbutano (isopentano, 99% P.A. Vetec) resfriado em nitrogênio líquido. O bloco congelado foi seccionado em criostato Leica (CM1850 UV), em fatias parasagittais de 30 ou 40 μm , montadas em lâminas tratadas com solução de poli-D-lisina 0,1% (Sigma, P1274). Após uma hora de secagem (24° C) o experimento de imunomarcção foi iniciado.

3.3- Preparação de fatias de 200 μm no vibrátomo para imunofluorescência (ratos 8 dias)

Ratos Wistar de 8 dias foram rapidamente decapitados e a calota craniana removida. Sob o estereomicroscópio, o nervo auditivo foi cortado apenas de um lado e procedeu-se a remoção da parte do tronco encefálico contendo o núcleo coclear. Um bloco de tecido que possibilita seções parasagittais do núcleo coclear foi isolado. Durante essa etapa o tecido estava submerso em uma solução salina fisiológica gelada (4 °C) da seguinte composição (mM): 87 NaCl, 25 NaHCO₃, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄ x H₂O, 7 MgCl₂, 0,5 CaCl₂, 25 glicose, 75 sacarose equilibrado com 95% O₂ e 5% de CO₂. Após a obtenção do bloco de tecido este foi transferido com o auxílio de uma espátula para um vibrátomo (Vibratome 1000 Plus, Vibratome, EUA) onde fatias de aproximadamente 200 μm foram obtidas. As fatias foram em seguida fixadas *overnight* na solução fixadora de de PLP a 1%, descrita acima.

3.4- Imunomarcção

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

- Anticorpo monoclonal de camundongo contra a subunidade Nav1.1 (clone K74/71, Neuromab, USA).
- - Anticorpo monoclonal de camundongo contra a subunidade Nav1.2 (clone K69/3, Neuromab, USA).

- Anticorpo policlonal de coelho anti subunidade Nav1.6 de rato (1:100) da Alomone (Israel) que reconhece o epítoto (CIANH TGVDI HRNGD FQKNG) correspondente aos resíduos de aminoácido 1042-1061 localizados na alça intracelular entre os domínios II-III da proteína Nav1.6. A concentração do anticorpo após a reconstituição foi de 0,8 mg/ml.
- Anticorpo policlonal de coelho que reconhece todos canais para sódio (PAN) de rato (várias diluições) (Millipore, AB5210);
- Anticorpo monoclonal de camundongo contra a proteína associada a microtúbulos (1:1000 a 1:500) (MAP-2 Millipore, MAB378);
- Anticorpo monoclonal de camundongo anti-anquirina-G de rato (1:400, Invitrogen, 33-8800);
- Anticorpo monoclonal de camundongo anti-proteína de vesícula sináptica de rato (SV2, 1:1000) Developmental Studies, Hybridoma Bank, Department of Biological Sciences (University of Iowa, Iowa city, EUA).

No dia seguinte, após a incubação com um ou dois anticorpos primários, as secções/fatias foram lavadas com PBS (três vezes por 15 min) e incubadas por duas horas à temperatura ambiente no tampão de bloqueio contendo um ou ambos dos seguintes anticorpos secundários fluorescentes (Invitrogen - Molecular Probes, EUA), previamente centrifugados:

- IgG de cabra anti-coelho conjugada a Alexa 568 (1:500) (Invitrogen, A11011)
- IgG de cabra anti-camundongo conjugada a Alexa 488 (1:500) (Invitrogen, A11001)

O excesso de anticorpo secundário não ligado foi lavado das secções/fatias com PBS (três vezes de 15 min). As secções foram montadas em meio protetor contra perda de emissão de fluorescência (Vectashield; Vector Laboratories, CA, EUA) ou (Fluoro-gel W/ Anti Fading Agent, Electron Microscopy Sciences) em seguida fotografadas utilizando microscopia de fluorescência confocal Zeiss LSM (Universidade Federal de Uberlândia). As figuras foram processadas e montadas usando o software ImageJ ou Fiji-Win32 e Adobe Illustrator (Adobe System, EUA). O controle da imunomarcção foi feito pela omissão do anticorpo primário e pelo uso do peptídeo antigênico.

3.5- Coloração pelo método de Nissl

Lâminas gelatinizadas foram deixadas sobre uma placa quente (40°C) por 10 minutos para garantir a aderência dos cortes. Depois foram colocadas dentro do copo de Coplen (cuba) para passar por uma bateria de soluções para desengordurar e hidratar os cortes (Xilol, álcool absoluto 100%, álcool 100% e clorofórmio 1:1, álcool 95% e por último álcool 70%, cada uma delas por 3 minutos) dentro da capela. Depois o copo de coplen, com as lâminas, foi deixado em gotejamento com água corrente, para depois receber a solução de violeta de

cresila filtrada (0, 25% em água destilada) por até dois minutos. Após a retirada da coloração, o copo de coplen foi deixado sobre gotejamento em água corrente por dez minutos. Fora da capela, as lâminas passaram rapidamente (mergulho breve) por uma bateria de soluções para a desidratação dos cortes (álcool 70%, álcool 95%, álcool e clorofórmio 1:1 e álcool absoluto). Dentro da capela novamente, as lâminas passaram por uma solução de álcool e xilol 1:1 e depois por xilol puro para a montagem das lâminas com lamínulas de vidro (Kinittel Glaser) e ENTELLAN NEW (Rapid mounting for microscopy, Electron Microscopy Sciences). As lâminas foram fotografadas por microscopia comum para a análise anatômica e morfológica das subdivisões do núcleo coclear (Leica DM 6000 - software LAS).

4- Resultados

A Figura 3B apresenta secções parasagittais do núcleo coclear do tronco encefálico localizado na parte caudal da ponte e rostral do bulbo (junção ponto-bulbar). Essas secções foram coradas pelo método de Nissl e fotografadas por microscopia comum. Nessa figura, pode-se observar a morfologia do núcleo e das estruturas anatômicas próximas do mesmo. O núcleo coclear ventral (VCN) pode ser subdividido em três regiões que são a região da raiz nervosa (NR, *nerve root*), a região anterior (AVCN) e a posterior (PVCN). A figura A é de uma seção mais lateral e a figura B uma seção mais medial do núcleo. Tanto em A como em B é possível observar o domínio (ou camada) das células granulares (GL) que divide o VCN do DCN e também recobre parte do AVCN e do PVCN. O cerebelo aparece na parte inferior dessas figuras, com a camada periférica (molecular) que apresenta poucos corpos celulares e uma camada mais profunda, notavelmente corada pelo método de Nissl, que representa a camada de células granulares. Pode ser também observado o plexo coróide do quarto ventrículo que está envolvido com a produção do líquido cefalorraquidiano. Nas figuras seguintes, serão ilustrados os resultados da imunofluorescência em cortes parasagittais do PVCN.

A figura 4 apresenta o resultado da marcação para MAP-2 em neurônios do PVCN que, além de ser observada nos dendritos, é também observada no soma desses neurônios. A morfologia dendrítica pode ser usada para a diferenciação dos neurônios do núcleo coclear, incluindo aqueles que são observados no PVCN (Osen, 1969). Dessa forma, no PVCN pode ser definida uma área mais ventral que contém principalmente neurônios chamados de multipolares. Na figura 4A, parte dessa área, que será chamada de área das células multipolares, está delimitada pela linha pontilhada e mostrada em maior resolução em 4B. Os neurônios multipolares apresentam um corpo celular mais ovóide e dendritos que projetam de diferentes partes do soma como pode ser observado em C (magnificação da área delimitada em 4B). No PVCN pode ser também definida uma região mais dorsal, indicada pelo retângulo de linha pontilhada em A e mostrada em maior resolução em D, e que contém as células octopus. Essas células apresentam um corpo celular mais alongado e que apresentam dendritos calibrosos e longos que emergem de um lado do soma, como pode ser observado na Figura 4E (magnificação da área delimitada em 4D).

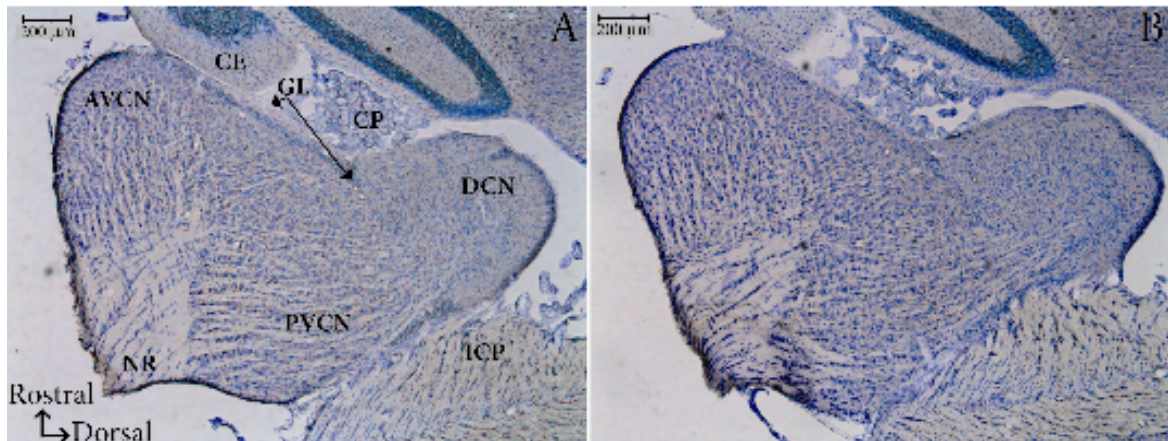


Figura 3- Cortes parassagitais do núcleo coclear corado pelo método de Nissl. (A) Seção parassagital mais lateral mostra a subdivisão do núcleo coclear em parte dorsal (DCN), ântero-ventral (AVCN) e póstero-ventral (PVCN), assim como as estruturas anatômicas que o envolve: cerebelo (CE), plexo coróide (CP) e o pedúnculo cerebelar inferior ou corpo restiforme (RB). A raiz nervosa (NR) representa a porção coclear do nervo vestibulo-coclear seccionada durante a cirurgia de dissecação do tronco. GL representa a camada das células granulares presente no AVCN, PVCN e formando uma camada que divide o VCN do DCN.

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

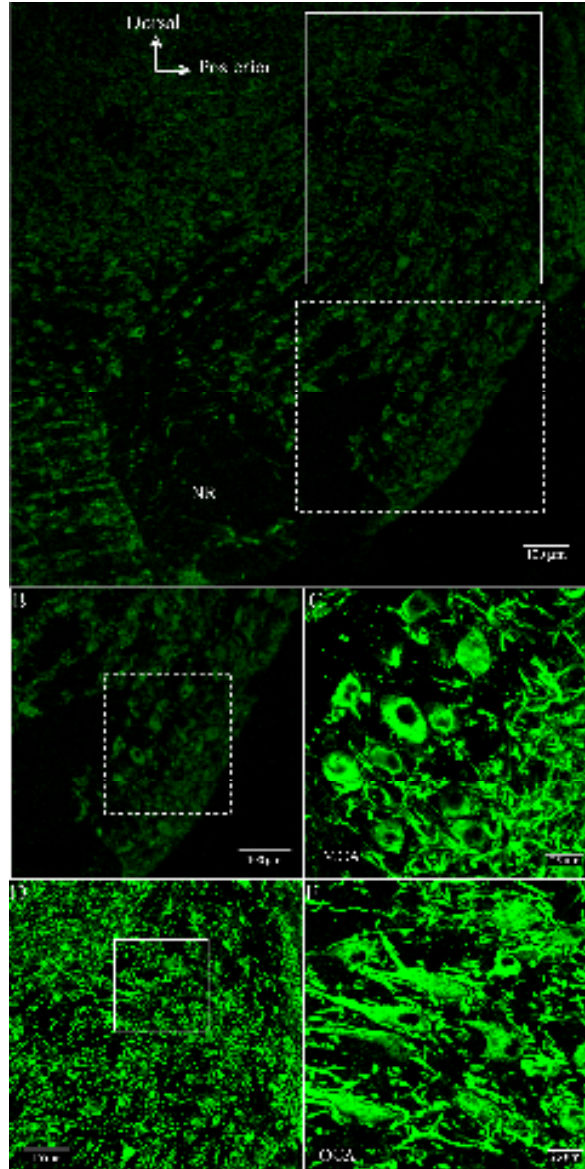


Figura 4- Morfologia e localização das células multipolares e octopus da região póstero-ventral do núcleo coclear (PVCN). A, Visão panorâmica da marcação para a proteína 2 associada a microtúbulos (MAP-2) em uma área de uma secção parassagital do núcleo coclear que inclui tanto o PVCN como a raiz nervosa (NR). B, representa a área delimitada por linha pontilhada em A. C, área correspondente aquela delimitada em B. D, Magnificação da área delimitada por linha contínua em A. E, área correspondente aquela delimitada em D. *Lâmina 4 do experimento do dia 26/05/2011 (rato de 30 dias e perfusão com PLP) e aquisição no dia 10/06/11 (UFU).*

A descrição dos resultados da expressão do canal de sódio Nav1.6 se inicia pelos resultados obtidos na área das células octopus em ratos de 30 dias e segue com os resultados em animais de 15 e 8 dias. Na sequência, serão apresentados os resultados da área das células multipolares nas mesmas idades.

A figura 5 apresenta o resultado da análise da expressão do canal $Na_v1.6$ na parte dorsal do PVCN em um rato de 30 dias. A marcação anti-Map-2 na figura 5A permite a observação de neurônios de corpos celulares alongados e dendritos calibrosos e extensos que são característicos das células octopus. Na figura 5B a marcação anti-Nav1.6 pode ser observada no soma desses neurônios e em estruturas longas e finas próximas ao soma (setas) que provavelmente se tratam de segmentos iniciais do axônio (AISs). Nodos de Ranvier aparecem marcados intensamente pelo anticorpo anti- $Na_v1.6$ (marcação puntiforme). A figura 5C mostra que a marcação anti-Map-2 (verde) e anti- $Na_v1.6$ (vermelha) colocaliza nos corpos celulares das células octopus (coloração amarela) mas, não nos dendritos que aparecem apenas marcados em verde. No painel inferior (D, E e F) a área delimitada em A (linhas pontilhadas) é mostrada em maior magnificação. Em D pode ser observado os dendritos calibrosos das células octopus. Em E as setas indicam prováveis AISs e também os respectivos corpos celulares dos quais tais AISs são derivados evidenciados durante a análise de múltiplas secções confocais no eixo Z. Em F, pode ser observado que a marcação anti- $Na_v1.6$ não está presente nos dendritos. A maior resolução também permite observar que os nodos de Ranvier são marcados apenas pelo anticorpo anti- $Na_v1.6$.

A análise da imunofluorescência anti- $Na_v1.6$ na área das células octopus do PVCN, avaliada em outro rato de 30 dias é apresentada na figura 6. A marcação anti-Map-2 (A, B e C) ilustra a morfologia típica das células octopus. Seus longos dendritos e a geometria do soma, aliado a uma localização neuroanatômica específica permite a identificação dessas células. Nos painéis centrais (D, E e F) a marcação anti- $Na_v1.6$ é evidente nas mesmas estruturas longas mostradas na figura 3 que, como descrito, supõe-se tratar dos AISs. A sobreposição da marcação (G, H e I) permite verificar que os canais $Na_v1.6$ não estão expressos nos dendritos (marcados pelo anti-Map-2) mas, estão presentes no soma e nos AISs neuronais e nodos de Ranvier de fibras mielizadas que passam pelo PVCN (provavelmente se tratam dos ramos descendentes das fibras auditivas em projeção para o PVCN e DCN). A análise da intensidade de fluorescência anti- $Na_v1.6$ ao longo dos AIS é indicada pela seta em D, E e F, é mostrada nos gráficos em J, L e M. Nota-se um aumento da intensidade de fluorescência anti- $Na_v1.6$ ao longo do AIS, sugerindo que a densidade desse canal de sódio é maior na parte final do AIS.

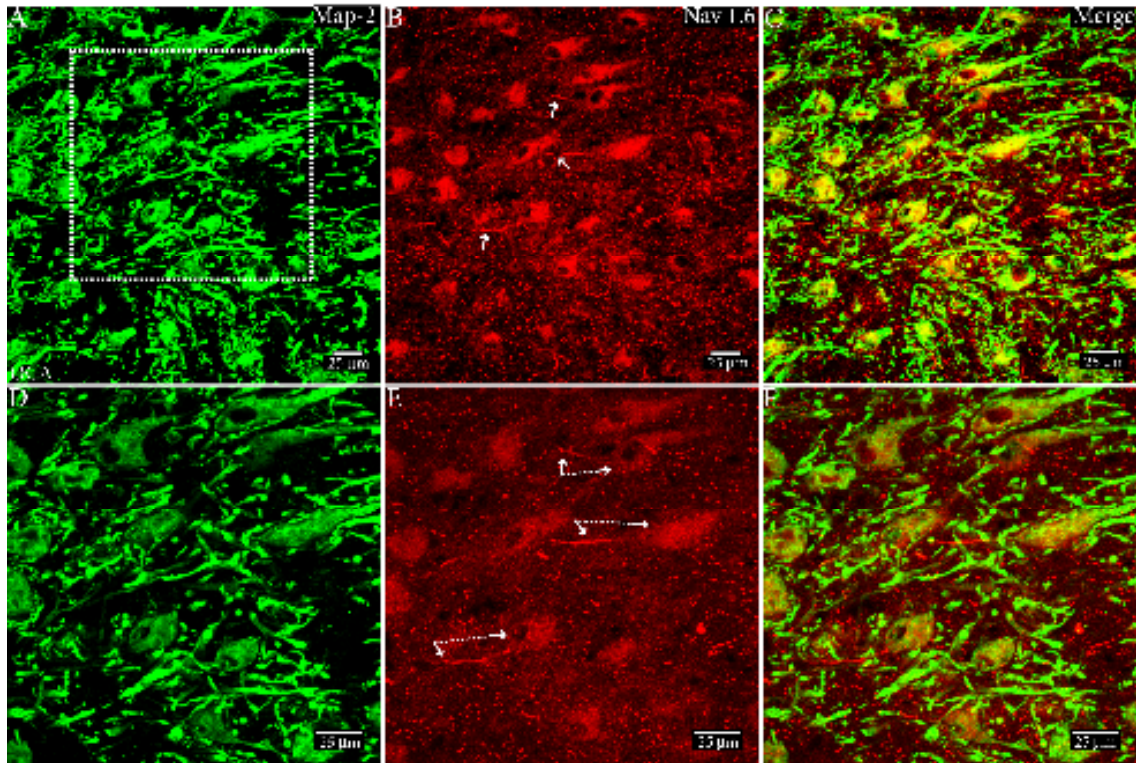


Figura 5- Expressão de canais para sódio do subtipo $Na_v1.6$ nas células octopus do núcleo coclear póstero-ventral (PVCN) em um rato de 30 dias. Projeção do tipo máxima intensidade de fluorescência de seções confocais no eixo Z da marcação para Map-2 (Alexa 488,) em A e para $Na_v1.6$ (B) em células octopus do PVCN em um corte parassagital. C, Sobreposição da marcação anti-MAP-2 e anti- $Na_v1.6$. A área delimitada em A pela linha pontilhada é apresentada em maior magnificação em D, E e F.

Lâmina 4 do experimento do dia 26/05/2011 (rato de 30 dias e perfusão com PLP) e aquisição no dia 10/06/11 (UFU). *Tecido fixado em PLP 1% (Paraformaldeído, lisina e periodato).*

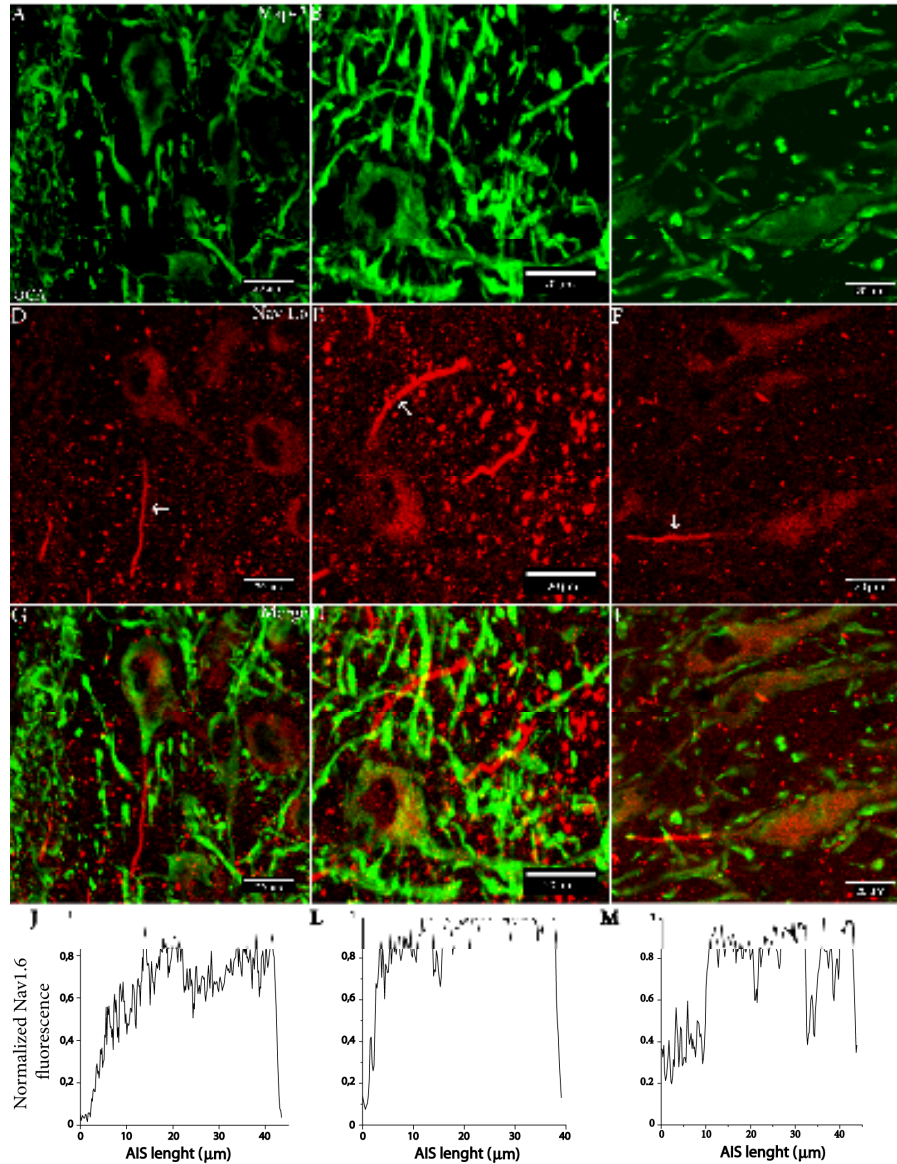


Figura 6- Expressão de canais para sódio do subtipo $Na_v1.6$ nas células octopus da região póstero-ventral do núcleo coclear (PVCN) em um rato de 30 dias. Projeção do tipo máxima intensidade de fluorescência de secções confocais no eixo Z da marcação para Map-2 (Alexa 488,) em A, B e C e para $Na_v1.6$ em D, E e F (Alexa 568) em células octopus do PVCN em um corte parassagital. G, H e I mostram a sobreposição da marcação anti-MAP-2 e anti- $Na_v1.6$. J, L e M apresentam a relação entre as intensidades de fluorescência para $Na_v1.6$, normalizada pela máxima fluorescência, versus a distância ao longo do AIS.

Cortes de 40 μm no criostato no dia: 26/05/2011 Lâmina 3 corte 2. Documentação: 10/06/2011 (A e C) e 06/06/11 (B). Tecido fixado em PLP 1% (Paraformaldeído, lisina e periodato).

Experimentos de marcação para o $\text{Na}_v1.6$ foram também realizados em ratos de 15 dias e o resultado da marcação é ilustrado pela figura 7. De modo semelhante ao observado em ratos de 30 dias, a marcação para o $\text{Na}_v1.6$ esta expressa em prováveis AISs das células octopus (Fig 7 B e E). Uma marcação puntiforme sugere a marcação de nodos de Ranvier. A análise da colocalização com a marcação anti-MAP-2 (Fig 7 C e F) indica que o canal não está presente nos dendritos.

A figura 8 ilustra o resultado de experimentos da marcação para a proteína anquirina-G e anti- $\text{Na}_v1.6$ em um rato de 15 dias. Essa proteína tem sido usada como um marcador do segmento inicial do axônio (AIS) (Bréchet et al., 2008; Hedstrom et al., 2007). Como pode ser observado na figura 8 A, D e G a marcação anti-ank-G se restringe a segmentos de fibras nervosas de passagem (possivelmente ramos descendentes das fibras auditivas). Praticamente não é observada a marcação somática e nos dendritos, de forma que a identificação do tipo celular marcado torna-se difícil. Assim, é mais apropriado apenas indicar a área em estudo que, na figura 6 é o PVCN. Na figura 6 B, E e H é apresentada a marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ na mesma área. Em ratos de 15 dias, do mesmo modo como em ratos de 30 dias, também se observa segmentos intensamente marcados para esse canal (setas). Como pode ser visto na figura 8 C, F e I a análise da colocalização da marcação anti-ank-G e anti- $\text{Na}_v1.6$ mostra que os segmentos indicados por setas apresentam-se marcados para ank-G, sugerindo que se tratam dos AISs de neurônios do PVCN. A marcação puntiforme anti- $\text{Na}_v1.6$ (B, E e H) provavelmente oriunda de nodos de Ranvier não colocaliza com a marcação anti-ank-G, como pode ser observado na figura 8 C, F e I. Experimentos em animais de 30 dias, demonstraram um padrão de colocalização similar ao observado em animais de 15 dias (resultados não apresentados).

A figura 9 ilustra a marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ e anti-ank-G em um rato de 8 dias. Esse experimento foi feito em cortes a fresco de 200 μm preparados no vibrátomo e fixados posteriormente ao corte. Do mesmo modo que em animais de 30 e 15 dias, neurônios do PVCN apresentam AISs marcados pelo anticorpo anti- $\text{Na}_v1.6$ (Fig 7 B e E, setas). A análise da colocalização com a marcação anti-ank-G (Fig. C e F) revela que tais segmentos que expressam $\text{Na}_v1.6$ apresentam-se marcados para ank-G, indicando que se tratam realmente de AISs (setas).

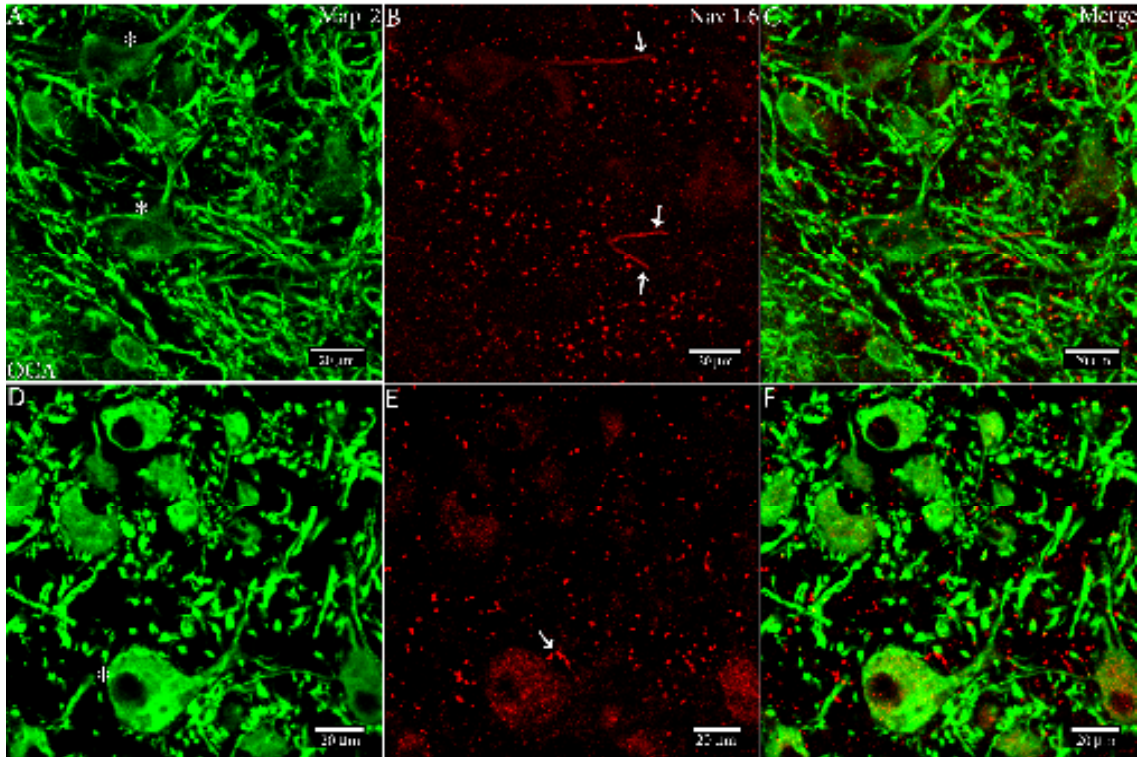


Figura 7- Expressão de canais para sódio do subtipo $Na_v1.6$ nas células octopus da região póstero-ventral do núcleo coclear (PVCN) em um rato de 15 dias. Projeção do tipo máxima intensidade de fluorescência de seções confocais no eixo Z da marcação para Map-2 (Alexa 488,) em A e D e para $Na_v1.6$ em B e E (Alexa 568) em células octopus do PVCN de um corte parassagital. C e F mostra a sobreposição da marcação anti-MAP-2 e anti- $Na_v1.6$.

Cortes de 40 μ m no criostato no dia:26/05/2011 Lâmina 2 corte1 Documentação: 03/06/2011 (A, B e C).

Cortes de 40 μ m no criostato no dia:22/11/2010 Lâmina 2 corte1 Documentação: 26/11/2010 (D, E e F).

Tecido fixado em PLP 1% (Paraformaldeído, lisina e periodato).

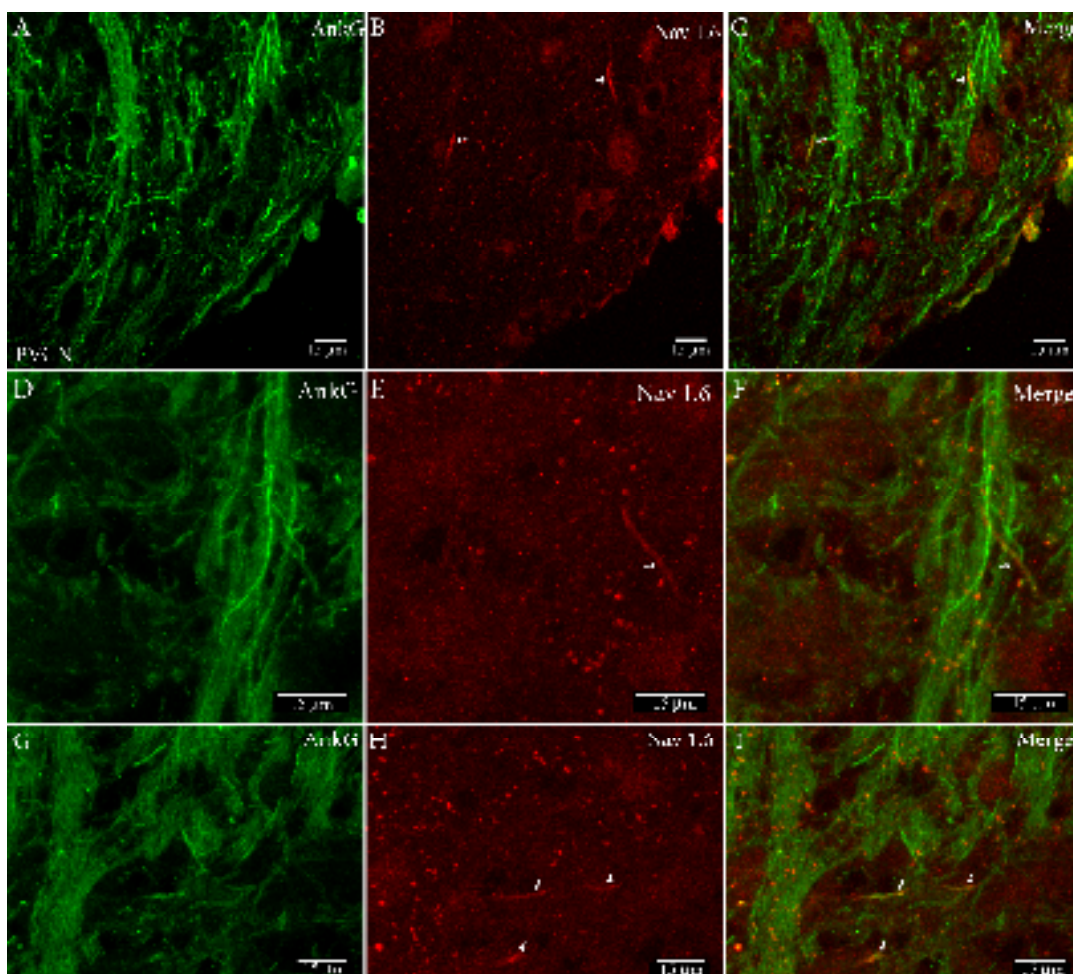


Figura 8- Colocalização de Anquirina-G e o canal $Na_v1.6$ no segmento inicial do axônio (AIS) de neurônios do PVCN de ratos de 15 dias. Padrão de marcação para anquirina-G na região do PVCN mostrando os ramos descendentes das fibras auditivas intensamente marcados (A, D e G) e para $Na_v 1.6$ (B, E e H). C, F e I ilustra a sobreposição das duas marcações e a colocalização da expressão de anquirina-G e $Na_v1.6$ nos AISs (indicados pelas setas).

Cortes de 20 μm no criostato no dia: 22/11/2010 Lâmina 3 corte único. Documentação: 26/11/2010 Tecido fixado em PLP 1% (Paraformaldeído, lisina e periodato).

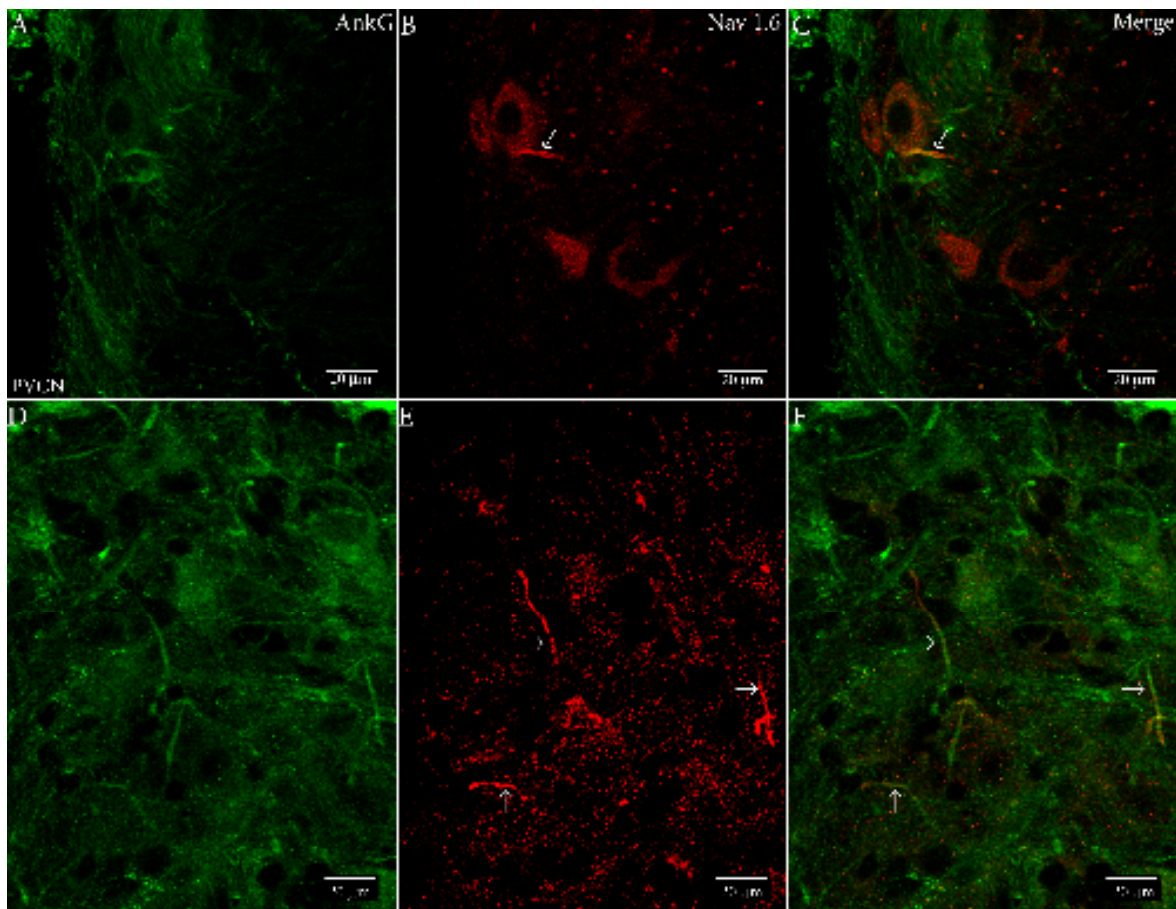


Figura 9- Colocalização de Anquirina-G e o canal $Na_v1.6$ em segmentos iniciais de axônios (AISs) de neurônios do PVCN de ratos de 8 dias. A e D, Marcação anti-anquirina-G no PVCN observada principalmente nos ramos descendentes das fibras auditivas. B e E, Marcação anti-Nav1.6 em AISs (setas) e nodos de Ranvier (marcação puntiforme). C e F, Sobreposição das imagens que mostra a colocalização da marcação anti-anquirina-G e anti- $Na_v1.6$ nos AISs (setas).

Cortes parassagitais de 200 μm (vibrátomo) de rato de 8 dias de 16/12/2010 Corte 1; Documentação: 29/12/2010.

A figura 10 apresenta o resultado da análise da extensão da marcação anti-Na_v1.6 ao longo dos AISs das células octopus do PVCN. Os painéis A, B e C indicam como essas medidas foram feitas. A delimitação da área somática das células octopus foi realizada utilizando a marcação anti-MAP-2 (A). A extensão da marcação anti-Na_v1.6 foi documentada em imagens adquiridas apenas no canal que detectou tal marcação (B). A sobreposição das duas marcações (C) possibilitou determinar o início do AIS (barra vertical à direita em B). O término do AIS, indicado pela barra vertical à esquerda (B) foi estabelecido pelo término da marcação anti-Na_v1.6. A análise descrita acima foi realizada em sete células octopus claramente identificadas morfológicamente e cujos AIS apresentavam bem marcados e podiam ser correlacionados a corpos celulares específicos. Os resultados indicaram uma área somática média de $499 \pm 9 \mu\text{m}^2$ e uma extensão da marcação anti-Na_v1.6 média de $38,1 \pm 2,6 \mu\text{m}$.

Os cortes parassagitais do tronco encefálico utilizados nos experimentos de imunomarcação, continham além do núcleo coclear, uma grande extensão do cerebelo. A expressão do canal Na_v1.6 nas células de Purkinje foi demonstrada em experimentos eletrofisiológicos (Khaliq et al., 2003) e de imunohistoquímica (Jenkins et al., 2001). Desse modo, utilizamos a marcação anti-Na_v1.6 nessas células como controle positivo endógeno das reações de imunofluorescência. A figura 11A e D ilustra o padrão de marcação anti-MAP-2 nas células de Purkinje. Os dendritos da célula de Purkinje, exibindo uma proeminente marcação anti-MAP-2, projetam para a camada molecular (ML) e o axônio dessa célula para a camada granular (GL). Em B e E é apresentado a marcação anti-Na_v1.6 que se mostrou bastante evidente nos AISs (setas) e, em menor extensão, também no soma dessas células. As sobreposições das imagens A e B (C) e D e E (F) indicam que as marcações colocalizam apenas no soma dessas células, enquanto os dendritos são marcados apenas pelo anticorpo anti-MAP-2 e os AISs apenas pelo anti-Na_v1.6. Esse padrão de marcação é coincidente com o descrito na literatura. Em nossos resultados, tanto em animais de 30 (P30, em A B e C) como de 15 dias (P15 em D, E e F) foi encontrado o mesmo padrão de marcação para ambos anticorpos. Do mesmo modo como ilustrado nas figuras 8 e 9 para os neurônios do PVCN, as células de Purkinje também exibem uma marcação intensa para anquirina-G no AIS (Figura 12 A) e, que também colocaliza com a marcação anti-Na_v1.6 (Fig. 12 B e C). Na emergência dendrítica também foi observada uma marcação anti-anquirina-G (setas em 12A) mas, que não será discutido no presente trabalho.

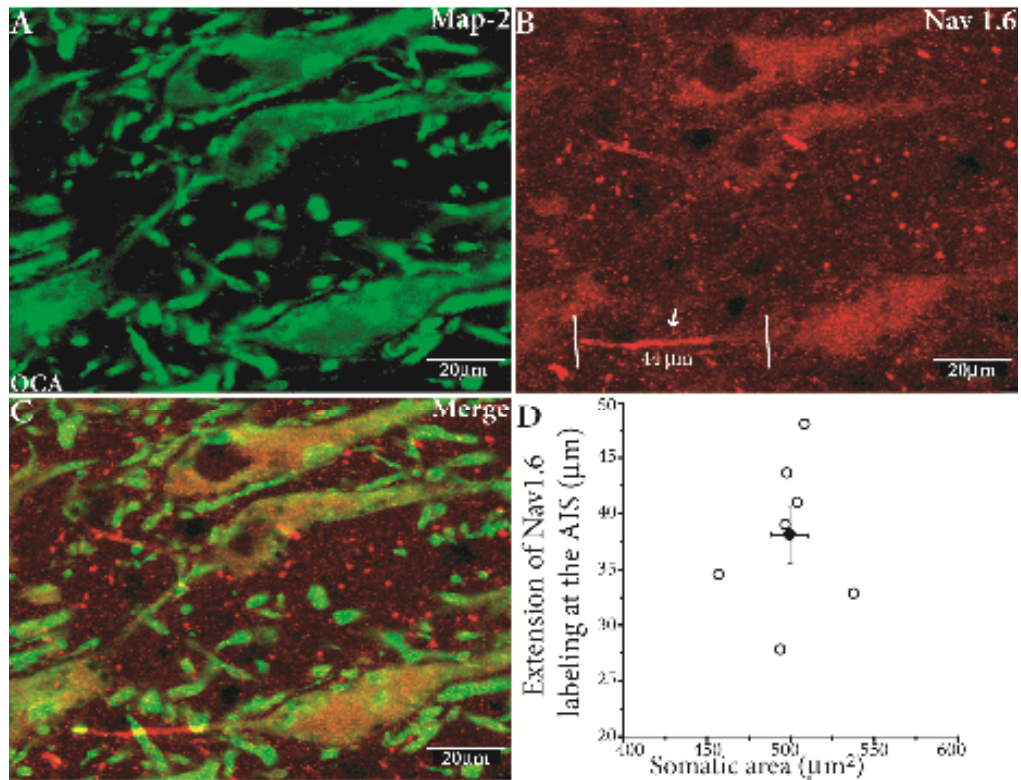


Figura 10- Análise da extensão da marcação anti-Nav_v1.6 ao longo dos segmentos iniciais de axônios (AISs) das células octopus do PVCN. A, Uma única seção confocal no eixo z da marcação anti-Map-2 em células octopus do PVCN. Sobreposição do tipo máxima intensidade de fluorescência de 4 seções confocais consecutivas no eixo z da marcação anti-Nav_v 1.6 no AIS de uma célula octopus. As barras verticais indicam o início do AIS (direita) e término do AIS (esquerda). C, sobreposição das imagens A e B. D, gráfico que demonstra a relação entre a extensão da marcação anti-Nav_v1.6 no AIS e a área somática das células octopus (círculos vazios, n=7). A média da extensão da marcação anti-Nav_v1.6 no AIS foi de $38,1 \pm 2,6 \mu\text{m}$ e a média da área somática foi de $499 \pm 9 \mu\text{m}^2$ (círculo cheio).

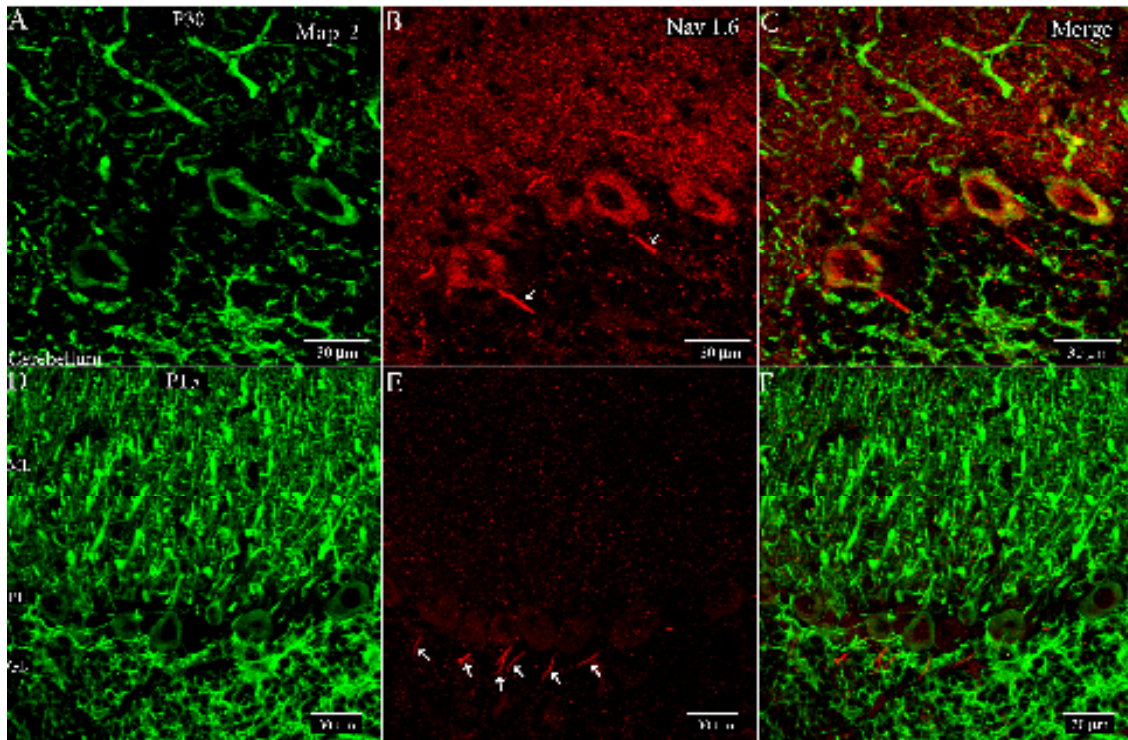


Figura 11- Expressão do canal Na_v1.6 nas células de Purkinje do cerebelo em ratos de 15 dias. A e D, projeção do tipo máxima intensidade de fluorescência de seções confocais no eixo z de cortes parasagittais marcados com anticorpo anti-MAP-2. Em D as diferentes camadas do córtex cerebelar são indicadas (GL, camada das células granulares; PL, camada das células de Purkinje; ML, camada molecular. B e B, máxima intensidade de fluorescência de múltiplas seções confocais no eixo z da marcação anti-Na_v1.6. As setas indicam os AISs das células de Purkinje. C e F, Sobreposição das imagens A e B e D e F, respectivamente, indicando uma localização restrita da marcação anti-Na_v1.6 nos AIS das células de Purkinje.

Cortes parasagittais de 40 μm (criostato) de: A, B e C: 26/05/2011 (rato de 30 dias) Lâmina 3 corte 1, Documentação: 10/06/201; D, E e F: 19/11/2010 (15 dias) Lâmina 3 corte único. Documentação: 03/12/2010. Tecido fixado em PLP 1% (Paraformaldeído, lisina e periodato).

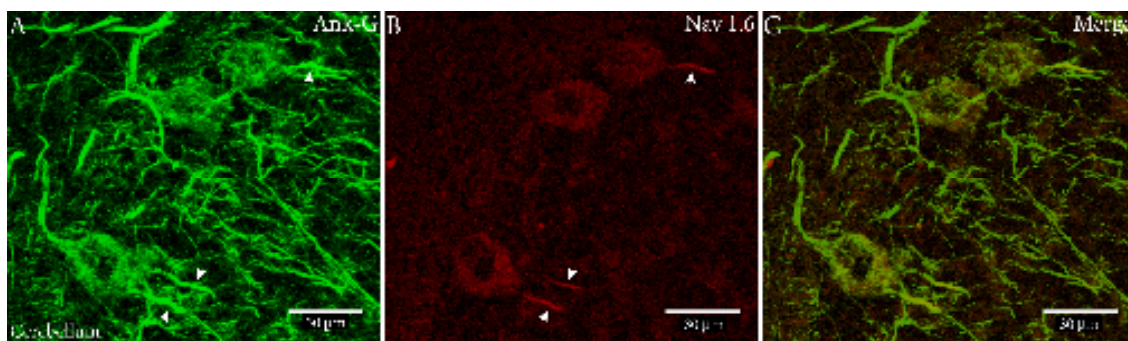


Figura 12- Colocalização do canal $Na_v1.6$ e anquirina-G nas células de Purkinje. A, Projeção de múltiplas seções confocais no eixo Z da marcação anti-anquirina-G. B, Projeção de múltiplas seções confocais no eixo Z (mesmas que em A) da marcação anti- $Na_v1.6$. As setas indicam segmentos iniciais de axônios (AISs) das células de purkinje marcados pelo anticorpo anti-anquirina-G (A) e anti- $Na_v1.6$ (B). C, Sobreposição das imagens A e B que ilustra a colocalização de ambas marcações no AISs.

Cortes de 20 μm no criostato no dia: 22/11/2010 lâmina 3 corte único. Documentação: 19/08/2011 Tecido fixado em PLP 1% (Paraformaldeído, lisina e periodato).

A Figura 13 ilustra o resultado de experimentos feitos com o intuito de verificar a especificidade da reação de imunofluorescência do anticorpo anti-Nav1.6. Experimentos nos quais o anticorpo foi omitido durante a etapa de incubação com o anticorpo primário, mas preservando o anticorpo secundário, deixaram de apresentar a imunomarcação anti-Nav1.6 característica tanto em neurônios do PVCN quanto em células de Purkinje do cerebelo (resultados não apresentados). Além disso, foram feitos experimentos nos quais o anticorpo anti-Nav1.6 foi pré-incubado com excesso de peptídeo antigênico previamente à sua aplicação no corte durante a etapa de incubação (Figura 13). Em secções adjacentes montadas na mesma lâmina, o anticorpo anti-Nav1.6 exibiu seu padrão característico de marcação coincidente com nossos resultados e aos descritos na literatura (Figura 13 B), entretanto sua marcação foi abolida quando pré-incubado com o peptídeo imunogênico fornecido pelo fabricante (Figura 13D).

A figura 14 apresenta a análise da expressão de canais para sódio do subtipo Nav1.6 em prováveis células multipolares do núcleo coclear póstero-ventral (PVCN) em cortes parassagittais de um rato de 30 dias. As células denominadas multipolares formam um grupo celular heterogêneo em termos de tamanho do corpo celular, projeção axonal e principal neurotransmissor utilizado mas, que possuem dendritos que emergem de diferentes pólos do soma (Olsen, 1969; Oertel et al., 1990; Doucet e Ryugo, 1997). A parte ventral do PVCN é definida como área das células multipolares (Olsen, 1969). A marcação anti-Map-2 (A, D e G) ilustra a morfologia de prováveis células multipolares, observadas na parte ventral do PVCN. B, E e H pode ser observado a expressão do canal Nav1.6 nesses neurônios, presente nos AISs (setas), corpos celulares e nodos de Ranvier dos ramos descendentes das fibras auditivas (marcação puntiforme). Em C, F e I observamos a sobreposição das imagens. O anticorpo anti-Nav1.6 não marca os dendritos (marcados apenas pelo anti-Map-2) mas, a colocalização é observada no soma desses neurônios.

A figura 15 apresenta o resultado da análise da extensão da marcação anti-Nav1.6 ao longo dos AIS das células do PVCN ventral definidas como multipolares. Os painéis A, B e C ilustram como essas medidas foram feitas. A delimitação da área somática das células multipolares foi realizada utilizando a marcação anti-map-2 (A). A extensão da marcação anti-Nav1.6 foi analisada em imagens adquiridas apenas onde o canal fora detectado em (B). A sobreposição das duas marcações (C) possibilita determinar o início e término do AIS (barras horizontais em B). Os resultados indicaram uma área somática média de $271 \pm 11 \mu\text{m}^2$ e uma extensão da marcação anti-Nav1.6 média no AIS de $16,3 \pm 2,5 \mu\text{m}$.

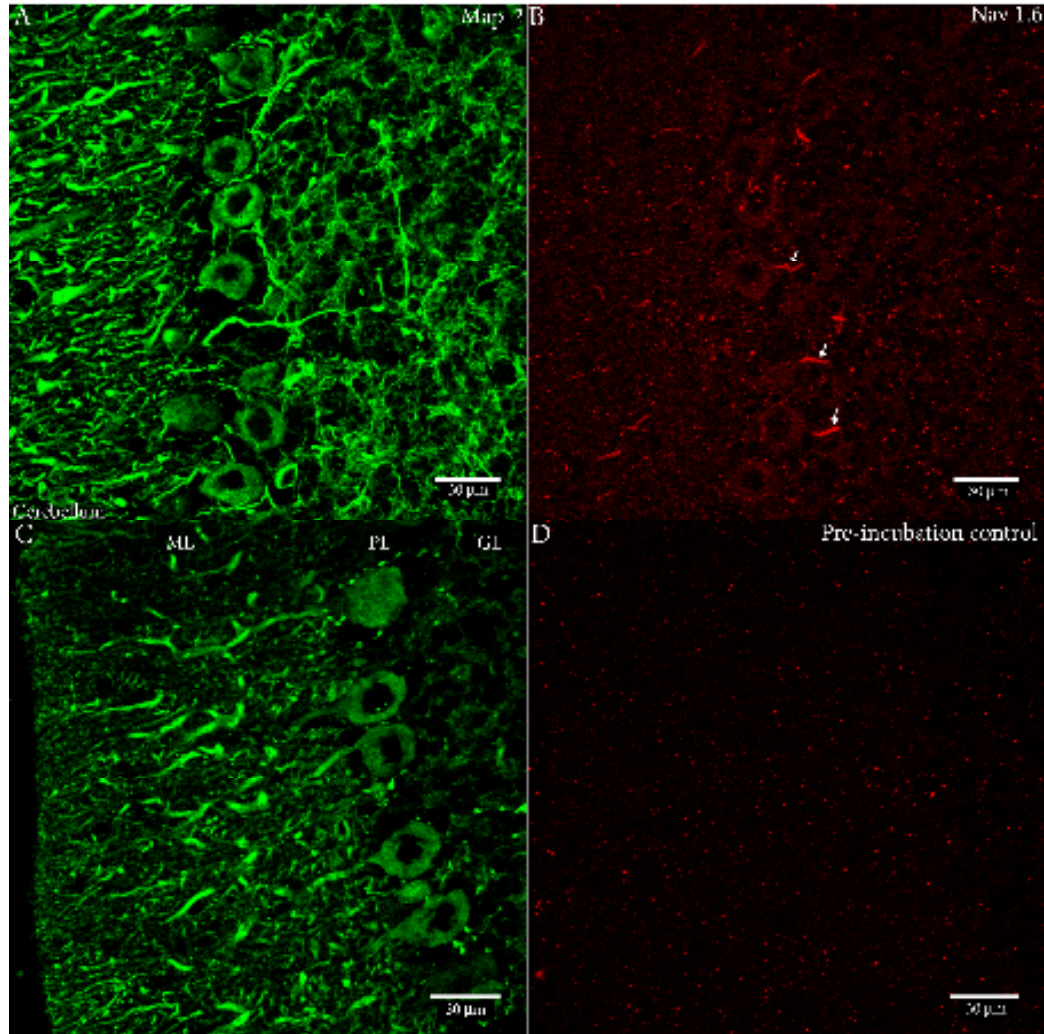


Figura 13- Bloqueio da reação de imunofluorescência para Na_v1.6 pela pré-incubação do anticorpo com o peptídeo antigênico em seções parassagitais adjacentes do cerebelo. Projeções do tipo máxima intensidade de fluorescência de seções confocais no eixo z de cortes marcados com anticorpo anti-MAP-2 (A e C) ou anti-Na_v1.6 (B). As setas em B indicam segmentos iniciais de axônios (AISs) das células de purkinje marcados pelo anti-Na_v1.6. C, Projeção do tipo máxima intensidade de fluorescência de seções confocais no eixo z (mesmo número que em C) onde o anticorpo anti-Na_v1.6 foi pré-incubado com excesso de peptídeo antigênico previamente à sua aplicação no corte durante a etapa de incubação.

Cortes de 40 μm no criostato no dia: 25/07/2011 lâmina 5 corte 1. documentação: 19/08/2011

Tecido fixado em PLP 1% (Paraformaldeído, lisina e periodato).

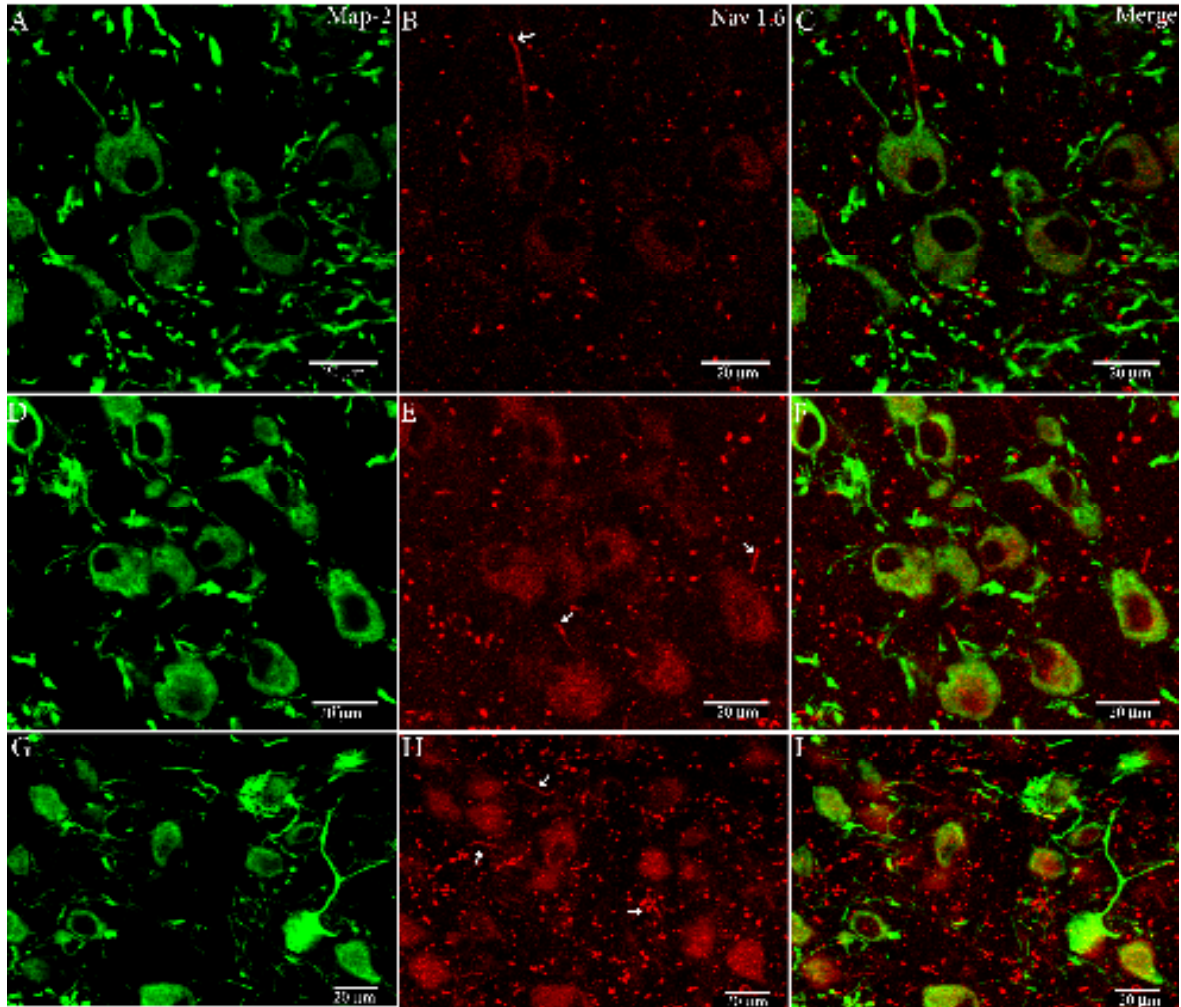


Figura 14- Expressão do canal para sódio $Na_v1.6$ em prováveis células multipolares do núcleo coclear póstero-ventral (PVCN) em cortes parassagitais em um rato de 30 dias. Projeção do tipo máxima intensidade de fluorescência de secções confocais no eixo Z da marcação anti-Map-2 (A, D e G) e anti-Nav1.6 (B, E e H). Nos painéis centrais, as setas indicam segmentos iniciais de axônios intensamente marcados pelo anticorpo anti- $Na_v1.6$. A marcação pode ser também observada em nodos de Ranvier (puntiforme) e no soma. C, F e I a Sobreposição da marcação anti-MAP-2 e anti- $Na_v1.6$ que indica uma colocação apenas no soma. Dendritos aparecem marcados apenas pelo anti-Map-2.

(A à F) Cortes de 40 μm no criostato no dia: 25/07/2011 lâmina 5 corte 2 documentação: 19/08/2011.

(G à I) Cortes de 40 μm no criostato no dia: 25/07/2011 lâmina 4 corte 2 documentação: 19/08/2011.

Tecido fixado em PLP 1% (Paraformaldeído, lisina e periodato).

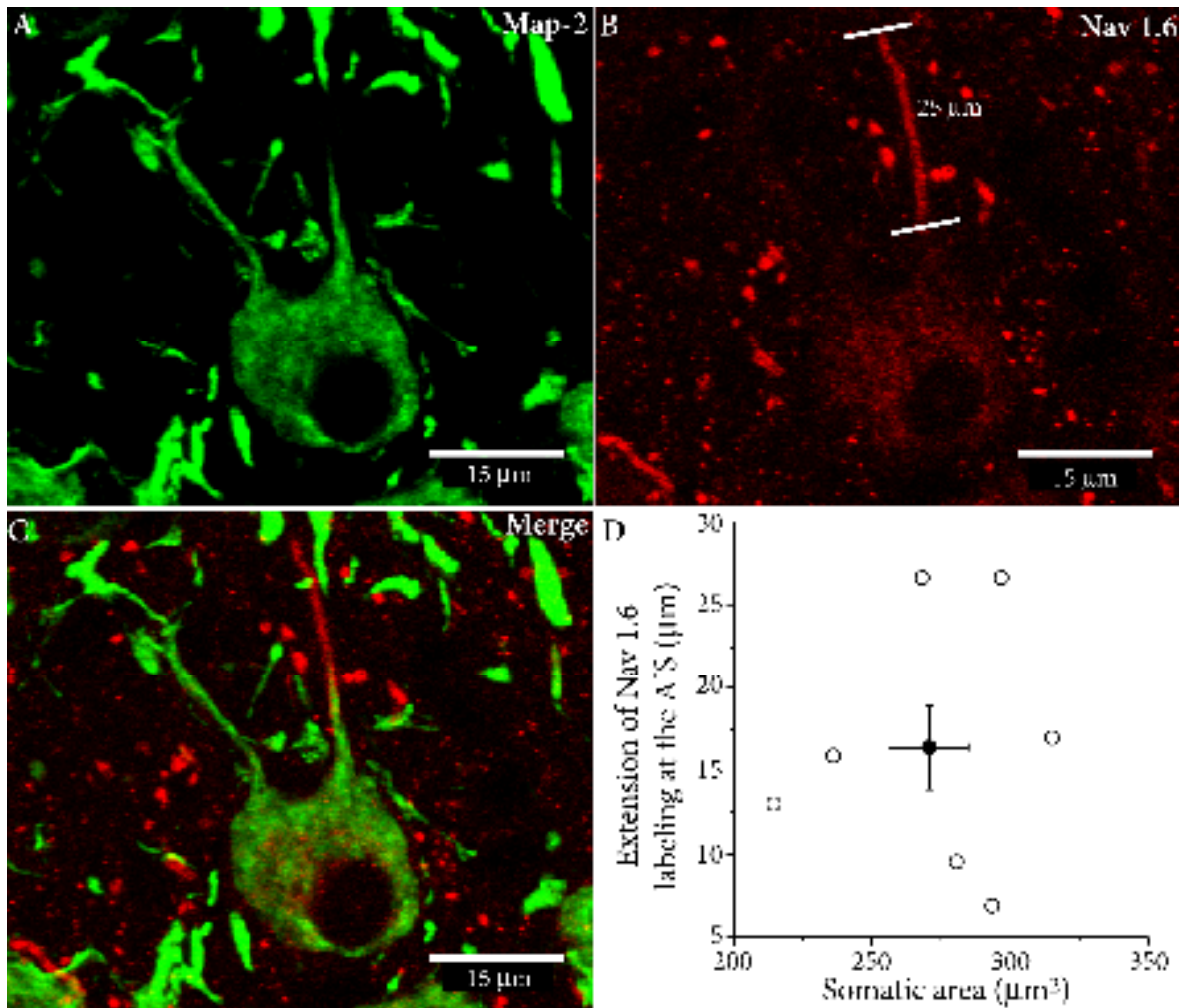


Figura 15- Análise da extensão da marcação anti-Nav_v1.6 ao longo dos segmentos iniciais de axônios (AISs) de prováveis células multipolares do PVCN. Sobreposição do tipo máxima intensidade de fluorescência de 3 seções confocais no eixo z da marcação anti-Map-2 (A) ou anti-Nav_v1.6 (B) em uma única célula do PVCN. As barras horizontais em B indicam o início do AIS e término do AIS. C, sobreposição das imagens A e B. D, relação entre a extensão da marcação anti-Nav_v1.6 no AIS e a área somática de diferentes células multipolares (círculos vazios, n=7). A média da extensão da marcação anti-Nav_v1.6 no AIS foi de $16,3 \pm 2,5$ µm e da área somática de 271 ± 11 µm² (círculo cheio).

Cortes de 40 µm no criostato no dia: 25/07/2011 lâmina 5 corte 2 documentação: 19/08/2011.

A figura 16 ilustra o resultado dos experimentos de dupla-marcação utilizando o anticorpo contra proteína 2 de vesículas sinápticas (SV2; *synaptic vesicle protein 2*) e anti- Na_v 1.6. Terminais sinápticos foram observados em todo o soma dos neurônios do PVCN (A) de um rato de 30 dias. Em B (menor) e em D (maior magnificação) pode ser observado uma marcação somática anti- Na_v 1.6 e também nos AISs (setas). A sobreposição das imagens (C e E) demonstra que nesses terminais sinápticos (verde) não é observado a expressão do canal para sódio Na_v 1.6 (vermelho) visto que não ocorre a colocalização das duas marcações.

Experimentos essencialmente idênticos foram feitos em ratos de 15 dias. A figura 17A mostra, numa visão panorâmica, o resultado da marcação anti-SV2. Em praticamente todos os neurônios do PVCN foram observados terminais sinápticos somáticos. A área delimitada na figura 17 A demarca o local no qual foram registradas as células mostradas em BCD e em EFG.

A figura B e E apresenta a marcação anti-SV2 de subtipos celulares do PVCN, onde a marcação do anticorpo pode ser observada em torno do corpo celular. As Figuras em C e F apresentam a marcação do canal para sódio que pode ser vista no soma e nos AIS dos subtipos celulares. Em D e G apreciamos a sobreposição das imagens, onde não há expressão de Na_v 1.6 nos terminais sinápticos de animais de 15 dias.

A figura 18 apresenta em (A) uma vista panorâmica de um corte parasagital do núcleo coclear onde podemos ver o retângulo ao centro delimitando a região do PVCN. As figuras a seguir B e C apresentam a marcação da proteína de terminais sinápticos *synaptic vesicle 2* (SV2) que contorna todo o corpo celular de 2 subtipos neuronais do PVCN. Em D e E apreciamos o canal para sódio expresso fracamente no soma celular e altamente concentrado nos AIS (Já presente em animais de 8 dias) dos subtipos celulares. Em F e G foi feita a sobreposição das imagens, onde é possível observar que não há expressão de Na_v 1.6 nos terminais sinápticos, de animais de 8 dias.

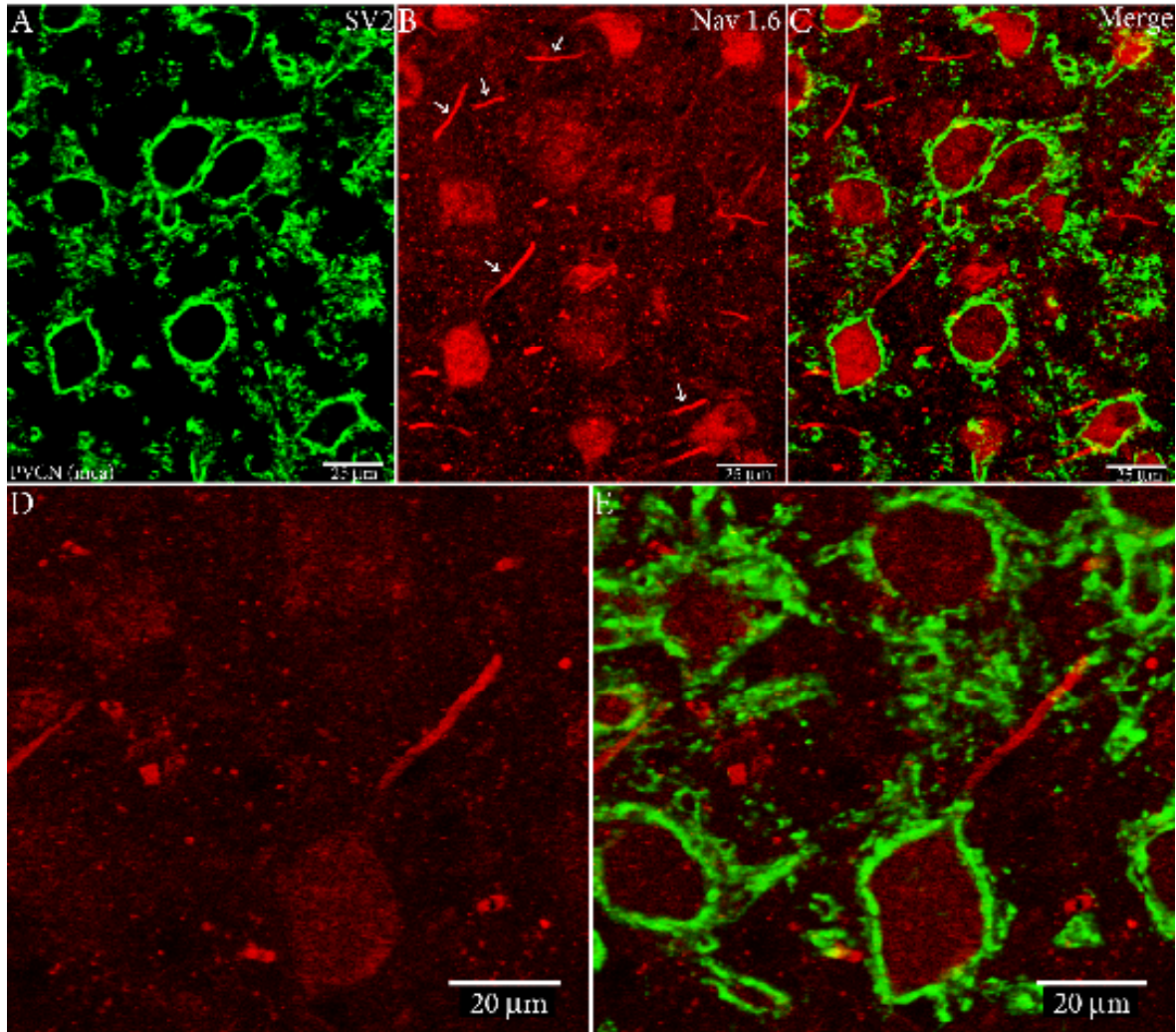


Figura 16- Ausência da expressão do canal $Na_v1.6$ em terminais que fazem sinapse com neurônios do PVCN (área das células multipolares, rato de 30 dias). Projeção do tipo máxima intensidade de múltiplas seções confocais no eixo Z de um corte parassagital do PVCN, marcado com anticorpo anti-SV2 (A) e anti-Nav1.6 (B). Em B (menor) e em D (maior magnificação) pode ser observada a marcação para Nav 1.6 nos corpos celulares, nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e em segmentos iniciais do axônios (setas). A sobreposição das imagens ilustra a ausência da expressão de $Na_v1.6$ nos terminais sinápticos do PVCN, que pode ser observada em menor (C) ou maior magnificação (E).

Cortes de 40 μm no criostato no dia: 07/02/2011 Lâmina 4 corte 1. Documentação: 15/02/2011 Tecido fixado em PLP 1% (Paraformaldeído, lisina e periodato).

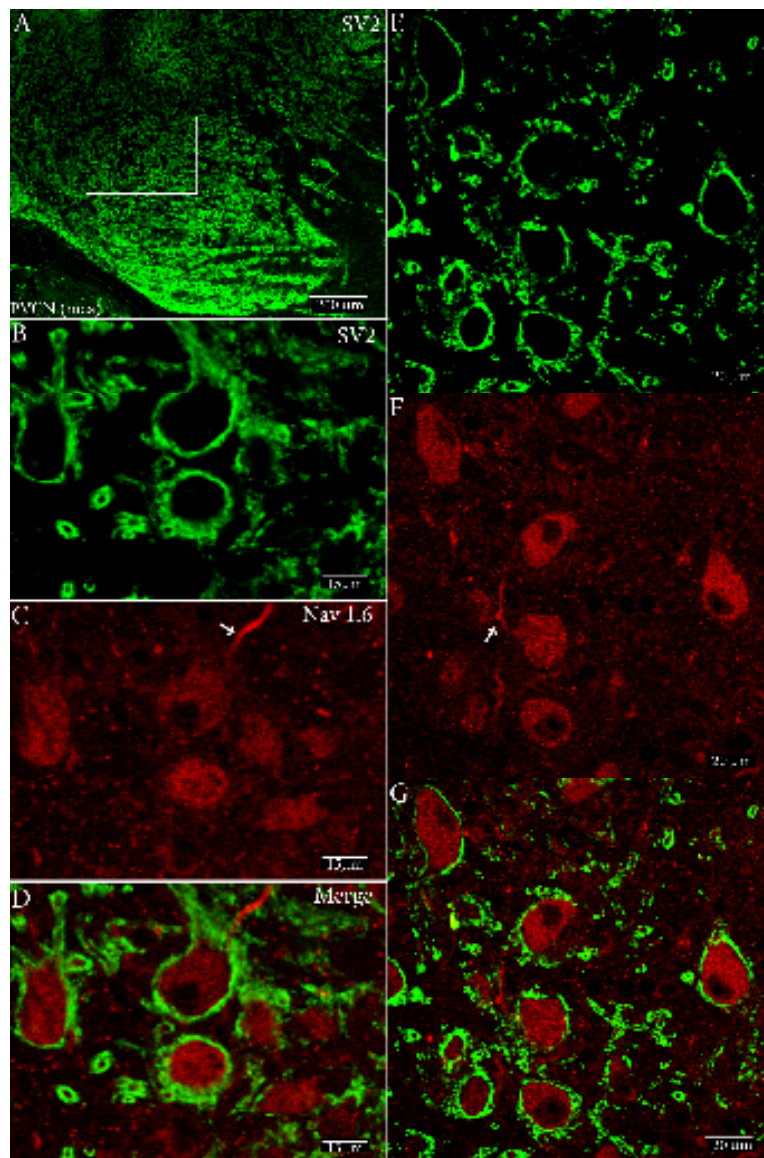


Figura 17- Ausência da expressão do canal $Na_v1.6$ em terminais que fazem sinapse com neurônios do PVCN (área das células multipolares, corte parassagital, rato de 15 dias).

A, Visão panorâmica da marcação anti-SV-2 no PVCN. As áreas mostradas em BCD e EFG estão delimitadas pelo retângulo em A. Projeção do tipo máxima intensidade de fluorescência de múltiplas seções confocais no eixo Z da marcação anti-SV2 (B e E) e anti-Nav1.6 (C e F). Em C e F pode ser observada a marcação anti- $Na_v1.6$ nos corpos celulares, nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e em segmentos iniciais do axônios (setas). A sobreposição das imagens ilustra a ausência da expressão de $Na_v1.6$ nos terminais sinápticos do PVCN (D e G).

Cortes de 40 μ m no criostato no dia: 14/02/2011 Lâmina 4 corte 1. Documentação: 16/02/2011

Tecido fixado em PLP 1% (Paraformaldeído, lisina e periodato).

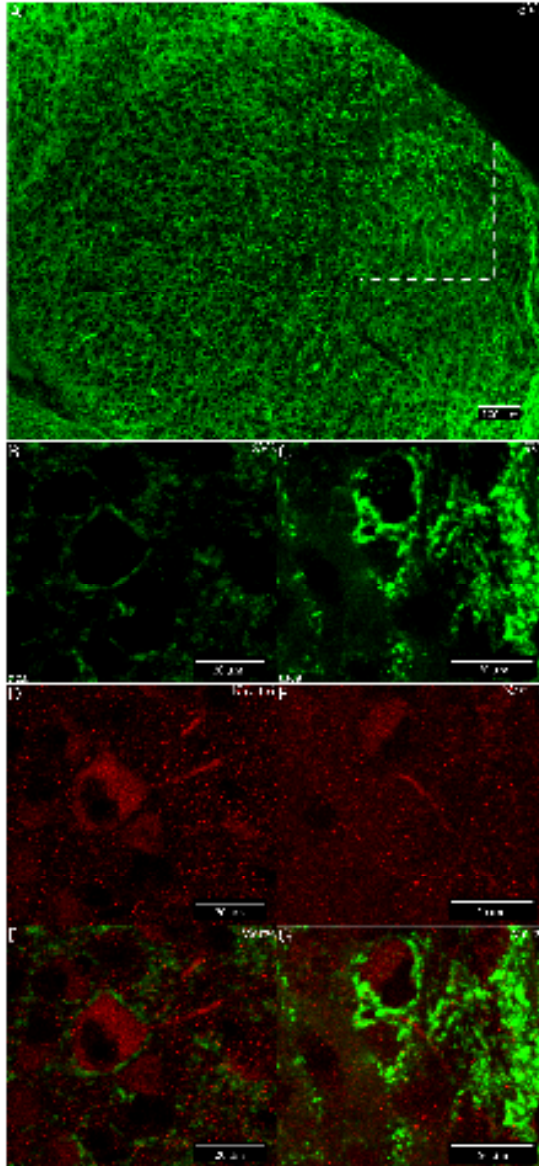


Figura 18- Ausência da expressão do canal $Na_v1.6$ em terminais que fazem sinapse com neurônios do PVCN (área das células multipolares, corte parassagital, rato de 8 dias). A, Visão panorâmica da marcação anti-SV-2 no PVCN. As células mostradas em BDF e CEG em maior magnificação estão compreendidas na área delimitada pelo retângulo em A. Projeção do tipo máxima intensidade de fluorescência de múltiplas seções confocais no eixo Z da marcação anti-SV2 (B e C) e anti- $Na_v1.6$ (D e E). Em D e E pode ser observada a marcação anti- $Na_v1.6$ nos corpos celulares, nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e em segmentos iniciais do axônios (setas). A sobreposição das imagens ilustra a ausência da expressão de $Na_v1.6$ nos terminais sinápticos do PVCN (D e G).

Cortes de 40 μm no criostato no dia: 16/03/2011 Lâmina 4 corte 1. Documentação: 25/03/2011 Tecido fixado em PLP 1% (Paraformaldeído, lisina e periodato).

A subunidade $Na_v1.2$ foi detectada em axônios amielinizados que projetam para a cóclea mas, não foi observada no corpo celular, no segmento inicial do axônio ou no axônio dos neurônios tipo I (fibras mielinizadas) (Houssain et al., 2005). Nos neurônios do núcleo magnocelular de aves, estrutura análoga ao AVCN de mamíferos, a subunidade $Na_v1.2$ também não foi detectada (Kuba et al., 2010). No MNTB de camundongos a subunidade $Na_v1.2$ também não foi expressa (Leão et al., 2006; Leão et al., 2005). Entretanto, em diferentes neurônios do sistema nervoso central, incluindo o cerebelo, essa subunidade está presente e desempenha papel fundamental na geração do potencial de ação (Schaller et al., 2003). Os resultados obtidos no presente trabalho quanto a expressão da subunidade $Na_v1.2$ estão ilustrados pela figura 19 e 20. A figura 19 (A) indica a expressão do canal no corpo celular de neurônios do PVCN ventral (área das células multipolares) e uma fraca expressão do mesmo ao longo do AIS que pode ser observado em maior magnificação na figura 19B. Fibras finas amielinizadas também aparecem marcadas. O painel em C apresenta o controle positivo endógeno da reação de imunofluorescência para o $Na_v1.2$ pela sua demonstração nas fibras paralelas que emergem das células granulares do cerebelo, conforme descrito na literatura (Schaller et al., 2003).

O núcleo coclear dorsal (DCN) é descrito como uma estrutura análoga ao cerebelo tanto em aspectos anatômicos como fisiológicos (Oertel & Young, 2004). A figura 20 A mostra que, à semelhança ao que foi observado na camada molecular do cerebelo (20 C), a camada molecular do DCN, que também apresenta uma marcação anti- $Na_v1.2$. Essa marcação parece derivar dos axônios das células granulares. Neurônios do PVCN dorsal, na área das células octopus, apresentaram uma marcação somática para o $Na_v1.2$ (Figura 20 B e C).

Experimentos de imunofluorescência foram também realizados com um anticorpo monoclonal específico para a subunidade $Na_v1.1$ (Neuromab). Os resultados sugerem uma ausência da expressão dessa subunidade (resultados não apresentados) no núcleo coclear. Experimentos utilizando um anticorpo policlonal Pan que reconhece todas as subunidades formadoras de canais para sódio (Millipore) não foram efetivos em marcar canais para sódio como seria esperado frente aos resultados encontrados com o anti- $Na_v1.6$. A figura 21 ilustra o melhor resultado obtido com esse anticorpo. Em A observa-se uma marcação em alguns AIS (setas) e nodos de Ranvier na região do PVCN. Em maior magnificação (B) nota-se também a marcação ao longo de prováveis axônios amielinizados.

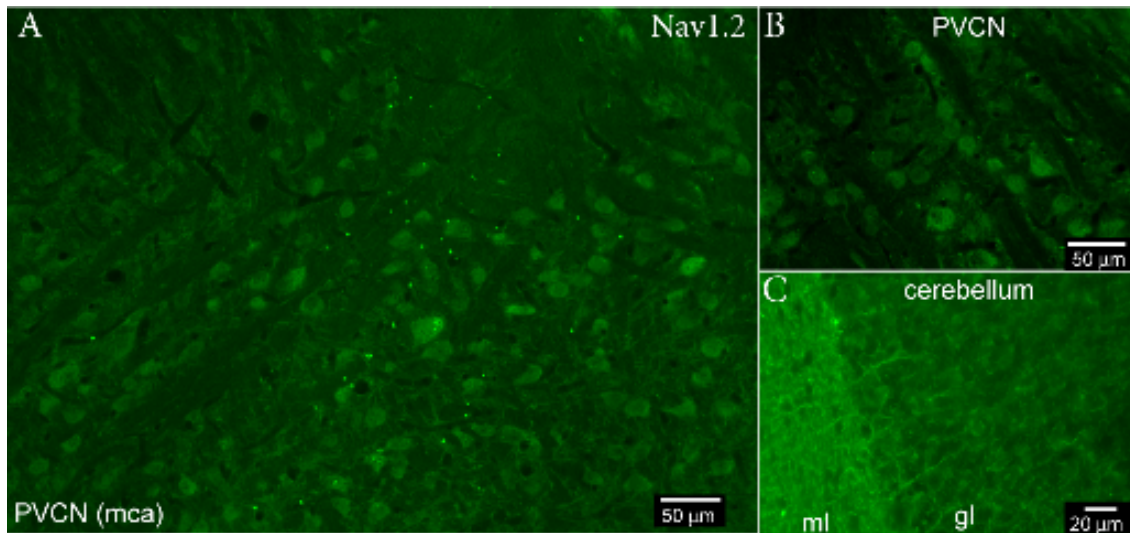


Figura 19- Marcação do anticorpo anti- Na_v 1.2 no PVCN de ratos de 30 dias. A, microscopia de fluorescência comum mostrando uma visão panorâmica da marcação anti- Na_v 1.2 no PVCN próximo à raiz nervosa e no local onde ocorre a bifurcação das fibras auditivas. Em (B) podemos observar a marcação somática do anti Na_v 1.2 em neurônios do PVCN. C, Marcação anti- Na_v 1.2 no cerebelo em prováveis axônios das células granulares (gl) projetando para a camada molecular (ml) usado como controle positivo endógeno da reação.

Cortes parassagitais de 30 µm de rato de 30 dias no criostato no dia: 12/05/2010 corte 1; documentação:

Tecido fixado em PFA 4 % (Paraformaldeído).

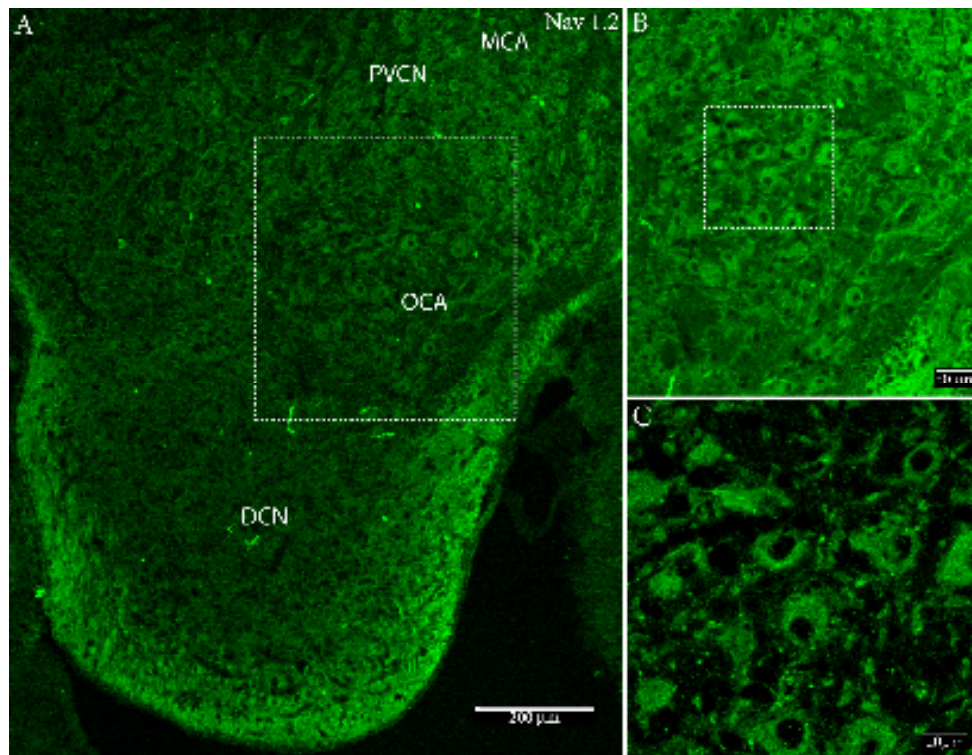


Figura 20- Expressão do canal $Na_v1.2$ em neurônios do PVCN do núcleo coclear de ratos de 15 dias. A, Fotografia panorâmica que ilustra a marcação para o $Na_v1.2$ tanto na região do PVCN quanto no DCN (setas). Nessa figura o quadrado delimita uma área que é mostrada em maior magnificação em B que, também apresenta um quadrado que delimita uma área exibida em maior magnificação em C. Em C observa-se prováveis células *octopus* marcadas pelo anti- $Na_v1.2$ (expressão somática).

Cortes parassagittais de 40 μm no criostato no dia 22/11/2010 Lâmina 2; Documentação: 23/12/2010. Tecido fixado em PFA 4 % (Paraformaldeído).

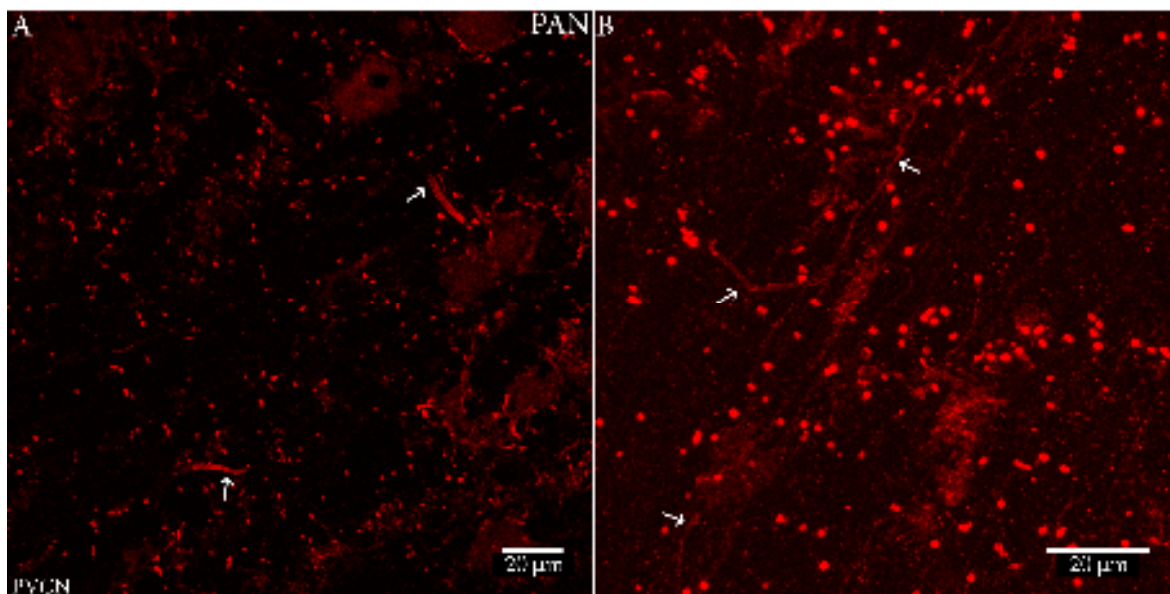


Figura 21- Análise da expressão de canais para sódio no PVCN utilizando um anticorpo que reconhece diferentes subunidades formadoras de canais para sódio (PAN). A, alguns AISs e diversos nodos de Ranvier do PVCN marcados pelo anticorpo anti-PAN. B, em maior magnificação também se observa no PVCN axônios mielinizados marcados pelo anticorpo. *Cortes parassagitais de 40 µm no criostato no dia 27/09/2010 Lâmina 2; Documentação: 29/11/2010. Tecido fixado em PFA 4 % (Paraformaldeído).*

5- Discussão

Os canais para sódio voltagem dependentes iniciam a fase de despolarização do potencial de ação na maioria das células excitáveis bem como participam, em alguns neurônios, de respostas subliminares que podem levar ao início do potencial de ação. Existem nove subunidades de canais para sódio identificadas em mamíferos (Goldin et al., 2000) e destas, três são encontradas predominantemente no sistema nervoso central ($Na_v1.1$, 1.2 e 1.6) (Gong et al., 1999). Em nosso trabalho, essas três subunidades foram estudadas através de experimentos de imunofluorescência em neurônios do núcleo coclear do sistema auditivo. Esse núcleo pode ser subdividido em 4 regiões anatômicas (região da raiz nervosa, região anteroventral (AVCN), região posteroventral (PVCN) e região dorsal (DCN)). O presente trabalho teve como foco o estudo desses canais nas células do PVCN, mais especificamente nas células octopus e multipolares.

Golding et al. (1995) utilizando registros eletrofisiológicos na presença de Tetrodotoxina (TTX), demonstraram a sensibilidade da corrente de sódio das células octopus do PVCN a esse bloqueador, o que traz a sugestão que os mesmos sejam compostos pelas subunidades $Na_v 1.1$, $Na_v 1.2$ ou $Na_v 1.6$, baseado nas evidências que essas são as principais subunidades presentes no SNC (Gong et al., 1999) e as que apresentam sensibilidade a essa toxina (Blair e Bean, 2002). Nas células multipolares do PVCN, a corrente de sódio também é sensível à TTX (Rodrigues et al., 2006).

Nas células octopus, nossos dados sugerem que a subunidade $Na_v1.6$ é a principal subunidade presente e que se encontra localizada no segmento inicial do axônio (AIS) (Figura 5). Nessas células, cuja área de silhueta somática foi de $499 \mu m^2$, a extensão média da marcação anti- $Na_v1.6$ no AIS foi de $38 \mu m$ e a intensidade aumenta com a distância ao longo do AIS (Figura 6). A maior densidade de canais $Na_v1.6$ num sítio relativamente distante do soma pode ser responsável pelo potencial de ação característico dessas células descrito na literatura. Golding et al. (1999) demonstraram que o potencial de ação registrado no soma dessas células é de baixa amplitude e de rápida duração. Essa forma do potencial de ação pode ser explicada não apenas pela ativação de uma corrente de potássio de baixo limiar (I_{KL}) (Oertel et al., 2000) mas, também pela localização do sítio onde ocorre o potencial de ação. O decaimento do pico do potencial de ação, da parte distal do AIS até o soma onde é registrado, seria proporcional à resistência de *input* dessa célula que é descrita na literatura como sendo de um valor muito baixo ($2,4 M\Omega$)(Golding et al., 1999). Dessa forma, nossos dados permitem a sugestão que o maior influxo de Na^+ durante a fase de despolarização nas células

octopus ocorre num ponto distante do soma, o que está de acordo com a forma do potencial de ação dessas células descrita na literatura.

As células octopus estão localizadas em uma região anatomicamente definida como área das células octopus (Osen et al., 1969), uma discreta fronteira entre a região mais caudal e mais dorsal do PVCN de mamíferos (Oertel et al., 1990.) As fibras do nervo auditivo excitam as células octopus via receptores glutamatérgicos do subtipo AMPA de cinética rápida (Gardner et al., 2001). Existem poucas células octopus no núcleo coclear, cerca de 200 em camundongos. Morfologicamente estas células podem ser identificadas por seus longos e calibrosos dendritos primários que saem de um único lado do corpo celular (Figura 5) e que projetam todos na direção dos ramos descendentes das fibras auditivas (Osen et al., 1969). Seus axônios projetam através da estria acústica intermediária para terminar contralateralmente no núcleo periolivar dorsomedial e no núcleo ventral do leminisco lateral (Adams & Warr, 1976; Smith et al., 1993; Oertel et al., 1999).

O arranjo tonotópico das fibras nervosas auditivas leva para o núcleo coclear uma representação espectral do som. As células octopus detectam características do som que são fundamentais para o reconhecimento de sons naturais incluindo a fala (Oertel et al., 2000). Os dendritos das células octopus atravessam os ramos descendentes das fibras auditivas e são acessíveis à entrada de muitas fibras. É necessário a somação do estímulo de inúmeras fibras nervosas auditivas para levar uma célula octopus a atingir seu limiar de disparo. Essas células detectam a entrada de pulsos coincidentes ou sincrônicos pelas fibras do nervo auditivo, podendo disparar em taxas próximas a 800 Hz (Golding et al. 1995).

As células multipolares apresentam ao contrário dos outros tipos celulares, consideráveis variações quanto ao número, ramificações, comprimento e espessura dos dendritos. Elas também apresentam variações no tamanho do soma (Osen, 1969; Doucet & Ryugo, 2008). Essas células, em ratos, podem ser subdivididas em duas populações distintas: Neurônios multipolares planares e radiais (Cant, 1981; Cant & Gaston, 1982). No presente trabalho, não foi possível fazer a distinção entre os dois subtipos de células multipolares. Entretanto, devido à localização na qual focamos nossa avaliação das células multipolares (PVCN ventral) e do fato que maior porcentagem da população de células multipolares é do tipo planar, pode ser sugerido que a maioria delas correspondam às planares. Além disso, as células multipolares do presente estudo apresentaram uma área somática média de $271 \mu\text{m}^2$, próxima aquela descrita para as células planares, enquanto as radiais apresentam uma área somática maior ($400\text{-}500 \mu\text{m}^2$) (Doucet & Ryugo, 2008). Em experimentos futuros, a injeção de marcadores celulares transportados retrogradamente no núcleo coclear contralateral

poderia propiciar uma marcação exclusiva das células multipolares radiais, enquanto a injeção do mesmo no colículo inferior marcaria as células multipolares planares.

De acordo com Smith & Rhode (1989) uma característica marcante das células multipolares radiais, por eles chamadas de O_C (*Onset-chopper*) é o grande número de terminais sinápticos no soma, enquanto as células multipolares planares (C_S , *Sustained chopper*) recebem pouco contato sináptico no soma. Esses dados foram obtidos em microscopia eletrônica. Em nossos experimentos, utilizamos o marcador anti-SV2, que marca os terminais sinápticos, com o intuito de separar essas duas populações de células. Esse anticorpo produziu uma intensa marcação no contorno somático da maioria das células do PVCN (figuras 16, 17 e 18). Enquanto tal marcação foi bastante útil para podermos observar que não ocorre a expressão de canais para sódio nos terminais somáticos, visto que não observamos a colocalização da marcação anti-SV2 e anti- $Na_v1.6$, a marcação anti-SV2 não permitiu uma separação desses dois subtipos neuronais.

O anticorpo utilizado para a marcação do canal $Na_v1.6$ é proveniente da Alomone Labs. (Israel). Esse anticorpo não produziu uma marcação quando o tecido foi fixado com PFA a 4%, porém produziu uma marcação intensa quando foi utilizado o fixador PLP a 1% (Paraformaldeído, Lisina e Periodato de sódio). A metodologia de fixação do tecido com PLP foi descrita por Mclean e Nakane (1974) como um fixador que estabiliza estruturas de carboidratos em proteínas preservando a antigenicidade. Os canais para sódio são proteínas conhecidas por apresentarem sítios de glicosilação (Marban et al., 1998). Uma importante modificação experimental realizada foi o aumento da concentração de detergente (Triton) de 0,3 para 1,5 % durante a etapa de bloqueio da marcação inespecífica. Sem esse aumento, os AISs das células octopus não são marcados pelo anticorpo anti- $Na_v1.6$. Anatomicamente as células octopus estão localizadas entre os ramos descendentes mielinizados das fibras auditivas e a ação detergente parece fundamental para a penetração do anticorpo.

O anticorpo anti- $Na_v1.6$ da Alomone foi utilizado anteriormente para estudar a contribuição do canal $Na_v1.6$ na geração do potencial de ação em neurônios corticais piramidais (Hu et al., 2009), em células granulares do cerebelo (Osorio et al., 2010), em nodos de Ranvier do nervo ótico (Jenkins & Bennett, 2002), em axônios da coluna dorsal da medula (Black, Waxman, Smith, 2006) e outras preparações. Em nossos resultados, esse anticorpo apresentou sempre o mesmo padrão de marcação. Essa marcação para o canal $Na_v1.6$ ficou evidente em uma estrutura neuronal que acreditamos se tratar do segmento inicial do axônio (AIS), tanto em células octopus de 30 dias (Fig. 5 e 6) e 15 dias (Fig. 7), quanto em células multipolares de 30 dias (Fig. 14 e 16) e 15 dias (Fig. 17). Essa subunidade do canal para sódio

foi detectada também no AIS de neurônios do PVCN de ratos de 8 dias, como pode ser observado nas figuras 9 e 18.

Um controle positivo intrínseco das reações anti- $\text{Na}_v1.6$ nas seções parasagittais do núcleo coclear foi a marcação nas células de purkinje do cerebelo que também estava presente nas seções. Foi possível visualizar uma exuberante marcação pelo anti- $\text{Na}_v1.6$ nos AIS dessa célula (ver figuras 11B e 11E). Jenkins & Bennett (2001) relataram a presença desse canal nas células de purkinje do cerebelo. A marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ com esse anticorpo foi também observada em células granulares do cerebelo (Osorio et al., 2010) e em neurônios do córtex piramidal (Hu et al., 2009). Para testar a especificidade do anticorpo anti- $\text{Na}_v1.6$, realizamos experimentos de pré-incubação com o peptídeo antigênico fornecido pelo fabricante (Fig. 13D). O resultado indicou que o anticorpo reconhece um epítipo específico que está presente nos canais para sódio $\text{Na}_v1.6$ dos neurônios do núcleo coclear. A omissão desse anticorpo durante a etapa de incubação também resultou na ausência de marcação (dados não apresentados), sugerindo que a marcação é devida à ligação do anticorpo primário ao canal e não por ligação inespecífica do anticorpo secundário fluorescente. Experimentos de western-blot realizados pelo produtor desse anticorpo indicaram que o mesmo reconhece uma banda única de aproximadamente 250 kDa de membrana neuronal purificada (www.alomone.com/system/uploads/attach_data/data_file/gallery/docs/asc-009.pdf).

Devido ao fato que na literatura científica a anquirina-G (ank-G) é descrita como um marcador do AIS, foram realizados experimentos onde se buscou demonstrar a colocalização desse marcador com o canal $\text{Na}_v1.6$ na região do AIS nas células objeto de nosso estudo. Zhou e colaboradores (1998) apontaram a Ank-G como a principal responsável pela ancoragem e manutenção dos canais para sódio nos subdomínios do axônio. Estudos atuais sugerem que essa proteína é responsável pela montagem estrutural do AIS (Hedstrom et al., 2007, Rasband, 2008). Essa seria a primeira proteína a se acumular no AIS durante o desenvolvimento, sendo acompanhada pela β IV espectrina, e os canais para sódio (Jenkins & Bennett, 2001, Boiko et al., 2007), sendo fundamental na localização, ancoramento e recrutamento de canais voltagem dependentes (sódio e potássio). Bréchet et al. (2008) demonstrou que a afinidade do canal de sódio $\text{Na}_v1.2$ pela Ank-G é dependente de resíduos de glutamato (E1111) e de serina (1112, 1124 e 1126). A fosforilação desses resíduos de serina pela proteína quinase CK2 regula a afinidade com que o canal interage com a ank-G. A presença de CK2 no AIS e nos nodos de Ranvier é um mecanismo importante para regular a segregação dos canais para Na^+ nesses compartimentos neuronais.

Hedstrom e colaboradores (2008) realizaram um estudo através da técnica de RNA de interferência, onde procuraram observar os fenômenos ocorridos após o silenciamento de determinadas proteínas encontradas no AIS de neurônios hipocampais em cultura como neurofascina-186, canais para sódio, β IV espectrina e ank-G. Nestes experimentos foi observado que somente a perda da ank-G foi capaz de interferir na montagem molecular do AIS, levando ao bloqueio de toda a aglomeração de outras proteínas como β IV espectrina, neurofascina e canais para sódio. A perda da ank-G gerou uma desestruturação do AIS e fez com que proteínas normalmente distribuídas no compartimento somatodendrítico, como MAP-2, redistribuísssem para o axônio e este assumisse características de dendritos (espinhos dendríticos e regiões de densidade pós-sináptica). Estes experimentos sugerem que a ank-G é a principal proteína necessária a formação do AIS e essencial na manutenção da polaridade neuronal.

Schafer et al. (2009) realizaram experimentos para avaliar os efeitos de uma lesão neuronal sobre o AIS e suas prováveis consequências. Utilizando um modelo de hipóxia *in vivo* (supressão do fluxo sanguíneo, por oclusão da artéria cerebral média) e *in vitro* (redução da oferta de O₂ e glicose para neurônios corticais de cultura). Os testes foram avaliados por experimentos de imunohistoquímica e *immunoblots* onde foi observado uma grande redução da expressão de β IVespectrina, ank-G e do canal para sódio voltagem-dependente em neurônios corticais, ou seja, uma perda da organização molecular do AIS. Tal efeito não foi observado nos nodos de Ranvier. Os autores relataram ainda que a compressão do nervo óptico também levou a perda de AIS das células ganglionares. Os autores utilizaram inibidores de calpaína, uma cisteína protease dependente de cálcio e observaram uma redução da proteólise de ank-G e de β IVespectrina que foi dependente da concentração do inibidor. Os autores sugeriram que a perda de proteínas do citoesqueleto (*scaffolding proteins linkers*) como a β IVespectrina e ankG e também do canal de sódio no AIS de neurônios lesados é mediada pela calpaína ativada pelo influxo de cálcio leva a perda da polaridade neuronal e é um importante fator para a disfunção neuronal. Tais achados devem ser considerados quando se busca avaliar a expressão de canais de sódio (ou outras proteínas do AIS) visto que o mesmo pode “desaparecer” do AIS devido à falta de cuidado experimental (e.g. hipóxia prolongada).

Os nossos resultados com dupla marcação anti-Na_v1.6 e anti-Ank-G, evidenciaram vários segmentos intensamente marcados por ambos anticorpos. Diante desse resultado, acreditamos que estas estruturas sejam os segmentos iniciais do axônio (AISs). Diversos trabalhos demonstraram a colocação de canais para sódio dependentes de voltagem

com a AnkG no segmento inicial do axônio (Boiko et al., 2003; Van Wart, Trimmer, Matthews, 2007; Lorincz, Nusser, 2008;; Hu et al., 2009; Osorio et al., 2010). Nesse sentido, a marcação do canal $Na_v1.6$ no AIS dos neurônios do PVCN contrasta com a localização dos mesmos em heminodos terminais no MNTB (Leão et al., 2005). Além disso, a dupla-marcação anti-MAP-2 e anti- $Na_v1.6$ de neurônios do PVCN permitiu observar uma continuidade do cone de implantação (região anti-MAP-2 positiva) e a estrutura marcada pelo $Na_v1.6$, como pode visto mais claramente na figura 6 A, D e G. Esse resultado também sugere que a estrutura marcada é o AIS.

Diversos estudos indicam haver outras subunidades de canal para sódio ao longo do AIS. Boiko e colaboradores (2003) realizaram um estudo da ontogênese nos neurônios ganglionares da retina, onde puderam observar que nos estágios iniciais do desenvolvimento a subunidade $Na_v1.2$ é a predominante, sendo que após um período de maturação a subunidade $Na_v1.6$ é a mais encontrada. Van Wart et al., (2007) mostraram que o $Na_v1.1$ pode ser também encontrado na parte proximal do AIS dessas células e decai ao longo do AIS de um modo oposto à expressão de $Na_v1.6$. Nas células piramidais da camada 5 do córtex o $Na_v1.2$ é encontrado na parte inicial do AIS e sua expressão decai com a distância enquanto a expressão do $Na_v1.6$ aumenta com a distância ao longo do AIS (Hu et al., 2009). Estudos realizados por Lorincz & Nusser, (2008) sugerem que existe uma variação na composição molecular do AIS dependente do tipo celular.

Em nossos trabalhos foram realizados experimentos com os anticorpos anti- $Na_v1.1$ (Neuromab, USA). A subunidade $Na_v1.1$ não foi detectada, mesmo frente a diversas mudanças nos protocolos. A subunidade $Na_v1.2$ foi detectada em axônios amielinizados que projetam para a cóclea mas, não foi observada no corpo celular, no segmento inicial do axônio ou no axônio dos neurônios do gânglio espiral que possuem fibras mielinizadas (Houssain et al., 2005). Nos neurônios do núcleo magnocelular de aves, estrutura análoga ao AVCN de mamíferos, a subunidade $Na_v1.2$ também não foi detectada (Kuba et al., 2010). No MNTB de camundongos a subunidade $Na_v1.2$ também não é expressa (Leão et al., 2006; Leão et al., 2005). Entretanto, em diferentes neurônios do sistema nervoso central, incluindo o cerebelo, essa subunidade está presente e desempenha papel fundamental na geração do potencial de ação (Schaller et al., 2003). Nas células ganglionares da retina, ocorre uma mudança da subunidade prevalente durante o desenvolvimento pós-natal, passando a $Na_v1.6$ ser mais abundante em estágios finais enquanto a $Na_v1.2$ é mais abundante em estágios iniciais do desenvolvimento pós-natal (Boiko et al., 2003). Em nossos resultados a marcação anti- $Na_v1.2$ (Neuromab) revelou corpos celulares no PVCN intensamente marcados e uma marcação fraca

no AIS (Figura 19). Fibras finas aparentemente amielinizadas apresentando marcação ao longo de sua extensão foram marcadas (Figura 19). No DCN, embora não sendo o foco do estudo, processos na camada molecular são marcados também (Figura 20). Considerando que a literatura aponta várias semelhanças entre o DCN e o cerebelo e que o canal $Na_v1.2$ é descrito na camada molecular do cerebelo (Osorio et al., 2010), tal achado deverá ser reavaliados em experimentos futuros com a utilização de um outro anticorpo anti-Nav1.2.

Experimentos foram feitos com um anticorpo anti-Pan com o intuito de revelar se a extensão da marcação anti-Nav1.6 coincide com a marcação anti-Pan. Se não for coincidente e, por exemplo, o anticorpo Pan marcar uma extensão maior do AIS, tal resultado sugeriria que existe uma outra subunidade ao longo do AIS de neurônios do PVCN. A figura 21 ilustra o melhor resultado obtido, mostrando a expressão de canais de sódio no AIS, nos nodos de Ranvier (marcação puntiforme) e em longas fibras amielinizadas. Tais fibras amielinizadas aparentemente são também marcadas pelo anti-Nav1.2 (Figura 19). Entretanto, de um modo geral, os resultados obtidos com o anticorpo anti-Pan (Millipore) não foram satisfatórios, no sentido que AIS longos e em grande número, como normalmente encontrados marcados pelo Nav1.6, não foram encontrados com consistência. Ajustes experimentais para obter uma marcação que se aproxima aquela obtida com o anticorpo anti-Nav1.6 são necessários. Desta forma, até o presente momento, nossos dados sugerem que o canal $Na_v1.6$ é a única subunidade presente no AIS de neurônios do PVCN.

6- CONCLUSÃO

Os resultados de nossos experimentos de imunofluorescência de simples ou dupla-marcação, possibilitam sugerir que o canal para sódio $Na_v1.6$ está expresso nos neurônios do PVCN (núcleo coclear pósterio ventral) desde estágios iniciais do desenvolvimento pós natal (P8) até a sua maturidade (P30). As subpopulações neuronais foco de nosso estudo, células octopus e multipolares, apresentaram marcação de segmentos os quais acreditamos ser os segmentos iniciais do axônio (AISs) devido a colocalização da marcação anti-Nav1.6 e anti-anquirina-G. A densidade da marcação anti- $Na_v1.6$ aumenta com a distância do soma, apresentando um pico de fluorescência na região distal desse domínio axonal. Células octopus, cuja área de silhueta somática foi de $499 \mu m^2$ apresentou uma extensão de marcação anti-Nav1.6 no AIS de $38 \mu m$, enquanto nas células multipolares essas medidas foram $271 \mu m^2$ e $16 \mu m$, respectivamente. A alta concentração desse canal para sódio no segmento inicial do axônio é um indício de que o $Na_v1.6$ é o responsável pela geração do potencial de ação nesses neurônios. Não observamos a expressão do canal em terminais sinápticos do PVCN. Experimentos adicionais poderão elucidar se existem outras subunidades envolvidas no disparo do potencial de ação desses neurônios ou se a subunidade $Na_v1.6$ desempenha este papel de maneira isolada como nossos dados sugerem.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams JC, Warr WB. Origins of axons in the cat's acoustic striae determined by injection of horseradish peroxidase into severed tracts. *J Comp Neurol* 1976, 170: 107-22.

Adams JC. Projections from octopus cells of the posteroventral cochlear nucleus to the ventral nucleus of the lateral lemniscus in cat and human. *Auditory Neurosci* 1997, 3: 335-50.

Afshari FS, Ptak K, Khaliq ZM, Grieco TM, Slater NT, McCrimmom DR, Raman IM. Resurgent Na⁺ Currents in Four Classes of Neurons of the Cerebellum. *J Neurophysiol* 2004, 92: 2831-43.

Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature*. 1996, 379:257-262,

Arimura N.,and Kaibuchi K.. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007, 8:194-205

Bal R, Oertel D. Hyperpolarization-activated, mixed-cation current (I_h) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J Neurophysiol.* 2000, 84: 806-17.

Bal R, Oertel D. Potassium currents in octopus cells of the mammalian cochlear nuclei. *J Neurophysiol.* 2001, 86: 2299-311.

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.

Blackburn CC, Sachs MB. Classification of unit types in the anteroventral cochlear nucleus, 1989, 62(6):1303-29

Black JA, Waxman SG, Smith KJ. Remyelination of dorsal column axons by endogenous Schwann cells restores the normal pattern of Na_v1.6 and Na_v1.2 at nodes of Ranvier. *Brain* 2006, 129: 1319-29.

Blair NT, Bean BP. Roles of Tetrodotoxin (TTX)-Sensitive Na⁺ current, TTX-Resistant Na⁺ current, and Ca²⁺ current in the Action Potentials of Nociceptive sensory Neurons. *J Neurosci* 2002, 22(23): 10277-90.

Boiko T, Vakulenko M, Ewers H, Yap CC, Norden C, Winckler B. Ankyrin-dependent and -independent mechanisms orchestrate axonal compartmentalization of L1 family members neurofascin and L1/neuron-glia cell adhesion molecule. *J Neurosci*. 2007, 1727(3):590-603.

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.

Brawer JR, Morest DK, Kane EC. *J Comp Neurol*. The Neuronal architecture of the cochlear nucleus of the cat. 1974 1,155(3):251-300.

Bréchet A, Fache MP, Bhasin N, Brachet A, Ferracci G, Baude A, Irondelle M, Pereira S, Letierrier 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.

Brodal A. The auditory system. in: *neurological anatomy in relation to clinical medicine*, 3rd ed New York: Oxford Univ. Press 1992.

Brownell W E., ph.d. Bobby R. Alford *How the ear works - nature's solutions for listening* Department of otorhinolaryngology and communicative sciences, Baylor college Of medicine *Volta Rev.* 1997, 99(5): 9-28.

Cant NB, Gaston KC. Pathways connecting the right and left cochlear nuclei. *J Comp Neurol* 1982, 212: 313-26.

Cant NB. The fine structure of two types of stellate cells in the anterior division of the anteroventral cochlear nucleus of the cat. *Neurosci* 1981, 6: 2643-55.

Cant NB, Benson CG. Parallel auditory pathways: projection patterns of different neuronal populations in the dorsal and ventral cochlear nuclei. *Brain Research Bulletin* 2003, 60: 457-4.

Caspary D. Classification of subpopulations of neurons in the cochlear nuclei of the kangaroo rat. 1972, 37(1):131-51

Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. Sodium channel Nav1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses. PNAS 2000, 97 (10): 5616-20

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

Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG, Irest M. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. Pharmacology Reviews 2005, 57: 397-409.

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

Corey DP, Añoveros GJ, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Géléoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells Nature. 2004, 9;432 (7018):723-30.13.

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.

Dallas P .The Active Cochlea Auditory Physiology Laboratory (The Hugh Knowles center) and Department of Neurobiology and Physiology, Northwestern University, Evanston, Illinois 1993-60208

Doucet J R, Ryugo D K. Structural and Functional Classes of Multipolar Cells in the Ventral Cochlear Nucleus. 2006 288(4): 331-344.

Ferragano MJ, Golding NL, Oertel D. Synaptic inputs to stellate cells in the ventral cochlear nucleus. J Neurophysiol 1998, 79: 51-63.

Ferragano MJ, Oertel D. Octopus cells of the mammalian ventral cochlear nucleus sense the rate of depolarization. J Neurophysiol 2002, 87: 2262-70.

Fujino K, Oertel D. Cholinergic modulation of stellate cells in the mammalian ventral cochlear nucleus. *J Neurosci* 2001, 21: 7372-83.

Gardner SM, Trussell LO, Oertel D. Time course of miniature EPSCs in cochlear nuclear neurons that share common inputs. *J Neurosci* 1999, 19: 2897-905.

Garver TD, Ren Q, Tuvia S, Bennett V: Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J Cell Biol* 1997, 137:703-714

Godfrey DA, Kiang NYS, Norris BE. Single unit activity in the posteroventral cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 1975, 162: 247-68.

Goldin AL Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol*.2001, 63:871-894

Golding AL, Barchi RL, Cadwel JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN and Catterall WA .Nomenclature of voltage-gated sodium channels.*neuron*. 2000, 28, 365-368

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

Golding NL, Ferragano M, Oertel, D. Role of intrinsic conductances underlying transient responses of octopus cells of the cochlear nucleus. *J Neurosci* 1999, 19: 2897-905.

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

Gong B, Rhodes KJ, Bekele-Arcuri Z, Trimmer JS. Type I and type II Na¹ channel alpha-subunit polypeptides exhibit distinct spatial and temporal patterning, and association with auxiliary subunits in rat brain. *J Comp Neurol* 1999, 412: 342-52.

Harrison JM, Irving R. The organization of the posterior ventral cochlear nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 1966, 126: 391-402.

Hedstrom K.L., Ogawa Xu ,Frischknecht R, Seidenbecher C.I., Shrager P., and. Rasband. M.N Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *J. Cell biol.* 2007, 178:875-886

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

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

Hudspeth A. J. and Masakazu Konishi Howard Hughes Medical Institute and Laboratory of Sensory Neuroscience.PNAS, 2000, 11690-11691vol. 97 22

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

Inda MC, DeFelipe J, Muñoz A. Voltage-gated ion channels in the axon initial segment of human cortical pyramidal cells and their relationship with chandelier cells. *PNAS*, 2006, , 103(8): 2920-5.

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

Jenkins, S.M., and Bennett V. Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and 11 CAMs at purkinje neuron initial segments. *J. Cell biol.*2001, 155:739-746.

Jiang D, Palmer AR, Winter IM. Frequency extent of two-tone facilitation in onset units in the ventral cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 1996, 75: 380-95.

Khaliq Z M, Gouwens N W, and Indira M. The Contribution of Resurgent Sodium Current to High-Frequency Firing in Purkinje Neurons: An Experimental and Modeling Study *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23:(12):4899–4912 • 4899

Khaliq, Z.M., and. Raman. I.M Relative contributions of axonal and somatic Na channels to action potential initiation in cerebellar purkinje neurons. *J. Neurosci.* 2006, 26:1935-1944,

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

Kossel M, Vater M. Noradrenaline enhances temporal auditory contrast and neuronal timing precision in the cochlear nucleus of the mustached bat. *J Neurosci* 1989, 9: 4169-78.

Krzemien DM, Schaller KL, Levinson SR, Caldwell JH. Immunolocalization of sodium channels isoform NaCh6 in the nervous system. *J Comp Neurol*. 2000, 420:70-83.

Kuwabara N, DiCaprio RA, Zook JM. Afferents to the medial nucleus of the trapezoid body and their collateral projections. *J Comp Neurol* 1991, 314: 707-20.

Lai, HC, Jan LY. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nature Reviews Neuroscience* 2006, 7: 548-62.

Leão RM, Kushmerick C, Pinaud R, Renden R, Li GL, Taschenberger H, Spirou G, Levinson SR, Von Gersdorff H. Presynaptic Na⁺ channels: locus, development, and recovery from inactivation at a high-fidelity synapse. *J Neurosci* 2005, 25: 3724-38.

Leão RN, Naves MM, Leão KE, Walmsley B. Altered sodium currents in auditory neurons of congenitally deaf mice. *Eur J Neurosci* 2006, 24: 1137-46.

Lee A, Goldin AL. Role of the terminal domains in sodium channel localization. *Channels* 2009, 3(3): 171-80.

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

Lowe JS, Palygin O, Bhasin N, Hund, TJ, Boyden PA, Shibata E, Anderson ME, Mohler PJ. Voltage-gated Na_v channel targeting in the heart requires an ankyrin-G-dependent cellular pathway. *J Cell Biol*. 2008, 180(1): 173-88.

Manis PB, Marx SO. Outward currents in isolated ventral cochlear nucleus neurons. *J Neurosci* 1991, 11: 2865-80.

Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF. Structure and function of voltage-gated sodium

channels. *J Physiol* 1998, 508 (3): 647-57.

McLean IW, Nakane PK. Periodate-Lysine-Paraformaldehyde fixative a new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochemistry and Cytochemistry*.1974, (12): 1077-83

Musiek FE, Baran JA. Ear Hear Neuroanatomy, neurophysiology, and central auditory assessment. Part I: Brain stem. 1986, 7(4):207-19

Narahashi, T., Deguchi, T., Urakawa, N. and Ohkubo, Y. 1960 *Amer. J. Physiol.* 198, 934-938.

Narahashi, T. Tetrodotoxin: A brief history. *Proc. Jpn. Acad.* 84: 147-154, 2008.

Needham K, Paolini AG. Fast inhibition underlies the transmission of auditory information between cochlear nuclei. *J Neurosci* 2003, 23: 6357-61.

Nelken I, Young ED. Two separate inhibitory mechanisms shape the responses of dorsal cochlear nucleus type IV units to narrowband and wideband stimuli. *J Neurophysiol* 1994, 71: 2446-62.

Nobili R, Mammano F, Ashmore J. How well do we understand the cochlea? *TINS* 1998, 21: 159-67.

Nobles I, Rugero AJ *Physiol.Rev.Mechanics of the mammalian cochlea.* UL; 2001, 81(3):1305-2

Oertel D, Bal R, Gardner SM, Smith PH, Joris PX. Detection of synchrony in the activity of auditory nerve fibers by octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000, 97: 11773-9.

Oertel D, Wu SH, Garb MW, Dizack C. Morphology and physiology of cells in slice preparations of the posteroventral cochlear nucleus of mice. *J Comp Neurol* 1990, 295: 136-54.

Ogawa Y, Rasband MN. The functional organization and assembly of the axon initial segment. *Current Opinion in Neurobiology* 2008, 18: 307-13.

Osen K. Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in cat. *J Comp Neurol* 1969, 136: 453-84.

Osorio N, Cathala L, Meisler MH, Magistretti J, Delmas P. Persistent Nav1.6 current at axon initial segments tunes spike timing of cerebellar granule cells. *Journal Physiology* 2010, 588.4: 651-69.

Palmer AR, Jiang D, Marshall DH. Responses of ventral cochlear nucleus onset and chopper units as a function of signal bandwidth. *J Neurophysiol* 1996, 75: 780-94.

Palmer AR, Winter IM. The temporal window of two-tone facilitation in onset units of the ventral cochlear nucleus. *Audiol Neurootol* 1996, 1: 12-30.

Palmer, L.M., and Stuart G.J. Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 26:1854-1863., 2006.

Raman IM, Bean BP. Inactivation and recovery of sodium currents in cerebellar Purkinje neurons: evidence for two mechanisms. *Biophys J* 2001, 80: 729-37.

Rasband M N, Na⁺ channels get anchored ... with a little help J. *Cell Biol.* Vol. 2008, 183 No. 6 975-977

Rasband MN, review-The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity 2010, 10-1038.

Rhode WS, Smith PH. Encoding timing and intensity in the ventral cochlear nucleus of the cat. *J Neurophysiol* 1986, 56: 261-86.

Rodrigues AR, Oertel D. Hyperpolarization-activated currents regulate excitability in stellate cells of the mammalian ventral cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 2006, 95: 76-87.

Rouiller EM, Cronin-Schreiber R, Fekete DM, Ryugo DK. The central projections of intracellularly labeled auditory nerve fibers in cats: an analysis of terminal morphology. *J Comp Neurol* 1986, 249: 261-78.

Royeck M, Horstmann MT, Remy S, Reitze M, Yaari Y, Beck H. Role of axonal Nav1.6 sodium channels in action potential initiation of CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology* 2008, 100: 2361-80.

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, Na_v 1.1 and Na_v 1.6, expressed in mouse spinal sensory neurons. *J Physiol* 2005, 564: 803-15.

Schafer DP, Jha S, Liu F, Akella T, Mccullough LD, Rasband J Neurosci. Disruption of the axon initial segment cytoskeleton is a new mechanism for neuronal injury. 2009, 21;29(42): 13242-54.

Schaller KL, Caldwell J. Expression and distribution of voltage-gated sodium channels in the cerebellum. *Healthsciences* 2003,2:2-9

Schofield BR. Projections fro the cochlear nucleus to the superior paraolivary nucleus in guinea pigs. *J Comp Neurol* 1995, 360: 135-149,

Scott LL, Mathews PJ, Golding NL. Posthearing developmental refinement of temporal processing in principal neurons of the medial superior olive. *J Neurosci* 2005, 25:7887-95.

Sherriff FE, Henderson Z. Cholinergic neurons in the ventral trapezoid nucleus project to the cochlear nuclei in the rat. *Neuroscience* 1994, 58: 627-33.

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

Siegelbaum SA, Koester J. Ion Channels In: KANDEL, ER, Schwartz, JH, Jessel TM. *Principles of Neural Science*, 4a ed, MAcGraw Hill. 2000, 105-124,.

Smith PH, Joris PX, Banks MI, Yin TCT. Responses of cochlear nucleus cells and projections of their axons. In: *The mammalian cochlear nuclei: organization and function* (Merchan MA, Juiz JM, Godfrey Dam Mugnaini E, Eds) 349-360. New York: Plenum, 1993.

Smith PH, Massie A, Joris PX. Acoustic stria: anatomy of physiologically characterized cells and their axonal projection patterns. *J Comp Neurol* 2005, 482: 349-71.

Smith PH, Rhode WS. Structural and functional properties distinguish two types of multipolar cells in the ventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 1989, 282: 595-616.

Smith PH, Spirou GA. From cochlea to the cortex and back. In: *Integrative functions in the mammalian auditory pathway*. 1 ed., Springer-Verlag Inc, New York, cap. 2, p. 6-71, 2002.

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

Taschenberger H, Von Gersdorff H. Fine-tuning an auditory synapse for speed and fidelity: developmental changes in presynaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. *J Neurosci* 2000, 20: 9162-73.

Trussell LO. Cellular mechanisms for information coding in auditory brainstem nuclei. In: *Integrative functions in the mammalian auditory pathway*. 1 ed., Springer-Verlag Inc, New York, cap. 3, p. 72-98, 2002.

Van Wart A, Matthews G. Impaired Firing and Cell-Specific Compensation in Neurons Lacking Nav1.6 Sodium Channels. *J Neurosci* 2006, 26(27): 7172-71803.

Van Wart A, Trimmer JS, Matthews G. Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *The journal of comparative neurology* 2007, 500: 339-52.

Vater M, Covey E, Casseday JH. The columnar region of the ventral nucleus of the lateral lemniscus in the big brown bat (*Eptesicus fuscus*): synaptic arrangements and structural correlates of feedforward inhibitory function. *Cell & Tiss Res* 1997, 289: 223-33.

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.

Waxman SG, Cummins TR, Dib-Hajj S, Fjell J, Black JA (1999) Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain. *Muscle Nerve* 22:1177–1187.

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.

Webster DB, Trune DR. Cochlear nuclear complex of mice. *Am J Anat* 1982, 163: 103-30.

Wickesberg RE, Whitlon D, Oertel D. Tuberculoventral neurons project to the multipolar cell area but not to the octopus cell area of the posteroventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 1991, 313: 457-68.

Willot J F, Bross LS. Morphology of the octopus cell area of the cochlear nucleus in young and aging C57BL/6J and CBA/J mice. *J Comp Neurol* 1990, 300: 61-81.

Winckler B, Mellman I. Neuronal polarity: controlling the sorting and diffusion of membrane components Department of cell biology, Yale University school of medicine, New Haven, Connecticut 06520, USA 1999 *Neuron*. 1999 Aug;23(4):641-4.

Winter IM, Robertson D, Cole KS. Descending projections from auditory brainstem nuclei to the cochlea and cochlear nucleus of the guinea pig. *J Comp Neurol* 1989, 280: 143-57.

Wu SH, Kelly JB. Physiological evidence for ipsilateral inhibition in the lateral superior olive: synaptic responses in mouse brain slice. *Hear Res* 1994, 73: 57-64.

Wu SH, Oertel D. Inhibitory circuitry in the ventral cochlear nucleus is probably mediated by glycine. *J Neurosci* 1986, 6: 2691-706.

Yin TCT. Neural mechanisms of encoding binaural localization cues in the auditory brainstem. In: *Integrative functions in the mammalian auditory pathway*. 1 ed., Springer-Verlag Inc, New York, cap. 3, p. 99-159, 2002.

Young ED. Cochlear nucleus. In: *The synaptic organization of the brain*. 5^a ed., Oxford University Press, New York, EUA, p. 121-157, 2004.

Yu FH, Catterall WA (2004) The VGL-kanome: a protein superfamily specialized

Zhou W, Goldin AL. Use-dependent potentiation of Na_v1.6 sodium channel. *Biophys J* 2004, 87: 3862-72.

Anexo I



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG/UFMG - Av. Antônio José de Almeida - CEUA

Parecer Consubstanciado

PROFUCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Estudo da eficiência e do estresse de currais para ardeões dependentes de ração em condições de núcleo celular de sistema híbrido.
PEQUISA (ORÇÃO) RESPONSÁVEL: Adriano Aguiar de Sá
INSSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM: 26/07/2010
PROFUCOLO CEEA/UFMG: 61

4/1/2010

11. ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS

Mencionado nos itens 1 e 5.

12. COMENTÁRIOS DO RELATÓRIO QUANTO À ESTRUTURA DO PROJETO

O protocolo está de acordo a resolução UFTM 005/2001 e o projeto foi bem fundamentado e a metodologia utilizada é adequada aos objetivos propostos.

O projeto de trabalho foi realizado entre 08 e 10-15 dias fora de casa devido ao trabalho.

As instalações e a manipulação dos animais realizada com inoculação de 140 cm^2 e pela administração intraperitoneal e intravenosa por descelegata foram consideradas adequadas.

PARECER DA CEEA: APROVADO

(O relatório anual do fluxo de trabalho será submetido pelo Pesquisador aos atos após o término do processo.)

DATA DA REUNIÃO: 17/09/2010

Prof. Guilherme Vanucchi Portari
Coordenador da CEEA