



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

**Imunolocalização de Canais para Sódio Voltagem-Dependentes em
Neurônios dos Núcleos Ambíguo e Dorsal Motor do Vago**

Lívia Alves Martins

Uberaba
2014

Imunolocalização de Canais para Sódio Voltagem-Dependentes em Neurônios dos Núcleos Ambíguo e Dorsal Motor do Vago

Lívia Alves Martins

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

Orientador: Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues.

Uberaba
2014

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sérgio e Donatil, e ao meu irmão, Leonardo, pelo exemplo, incentivo e apoio que foram imprescindíveis para que eu conseguisse iniciar e concluir essa etapa.

Ao orientador Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues, que me permitiu conhecer a pesquisa científica ainda na graduação, pela convivência, pelos ensinamentos e auxílio durante toda a realização deste projeto, e principalmente pela paciência a cada fim de semana passado no laboratório.

Aos Professores Dr. Luis Carlos dos Reis e Dr. Valdo José Dias da Silva pela colaboração nos experimentos e convivência no departamento de fisiologia.

Aos amigos Liciane Mateus da Silva, Eduardo Henrique Tavares e Glauco da Rocha Finholdt pelo companheirismo e auxílio durante a realização deste trabalho.

A todos os demais professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (CPGCF) que trabalham pelo crescimento desta.

À secretária do CPGCF, Elizabete Perez Caramori Ambrósio, por comemorar cada vitória, acolher e aconselhar em cada momento difícil dessa etapa e principalmente pelo empenho dedicado no crescimento do programa, realizando trabalho imprescindível.

Aos funcionários do departamento de Fisiologia: Angélica Cristina Alves, Donizete Ponciano da Silva, Fausto dos Reis Silva e Lucas Felipe de Oliveira pelos cuidados com o biotério da disciplina de fisiologia, organização do laboratório, auxílio e convivência a cada dia de trabalho.

Aos profissionais da Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. Marcelo Belletti e à técnica Mariane Borges Franco por permitirem o uso do microscópio confocal para aquisição de nossas imagens.

Aos técnicos da disciplina de Bioquímica Geraldo Garcia de Freitas Júnior, Marco Túlio Parolini e Flávio Henrique Oliveira Carvalho pelo auxílio.

À professora Maria Laura, pela compreensão em relação ao tempo por mim dispendido na finalização da dissertação e pelo incentivo nessa etapa.

À CAPES-REUNI pelo incentivo à pesquisa.

RESUMO

O núcleo ambíguo (NA) é uma coleção de neurônios motores distribuídos ventrolateralmente na formação reticular do bulbo que projetam fibras eferentes viscerais especiais para faringe, laringe, esôfago e via fibras eferentes viscerais gerais para pulmão e coração. O núcleo dorsal motor do vago (DMV) contém neurônios autonômicos situados dorsomedialmente no bulbo que enviam fibras viscerais gerais principalmente para as vísceras abdominais como estômago, fígado, pâncreas e intestino. O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão de canais para sódio dependentes de voltagem (Na_v) e sua localização subcelular nos neurônios das diferentes formações do NA e no DMV. Ratos Wistar de 30 dias foram perfundidos transcardiacamente e reações de imunofluorescência de dupla ou tripla marcação foram realizadas em fatias coronais de 25 a 40 μm do bulbo. A identificação do NA e suas formações foi feita através de marcação anti-colina acetiltransferase (ChAT). Experimentos com o traçador retrógrado toxina colérica conjugada ao Alexa Fluor 488 (CTb) injetado no parênquima pulmonar ou a expressão do marcador de lesão neuronal ATF-3, após a ressecção do nervo laríngeo recorrente (RLN), foram também usados para identificação de neurônios no NA. Neurônios da formação *loose* (NAL, $n=8$), semi-compacta (NAsc, $n=8$) e compacta (NAC, $n=168$) apresentaram maior diâmetro de $33 \pm 1,6$; $36 \pm 0,4$ e $22 \pm 0,3$ μm , e ASS (área de silhueta somática) média de $462 \pm 39,6$; $503 \pm 28,7$ e $248 \pm 7,3$ μm^2 , respectivamente. Na formação NAC foi observada ampla heterogeneidade de neurônios. O traçador CTb identificou neurônios autonômicos da NAC que apresentaram marcação anti- $\text{Na}_v1.7$ somática e em prováveis segmentos iniciais do axônio (AIS). Foi observada expressão de $\text{Na}_v1.6$ em AIS de neurônios das NAC, NAsc e NAL, e tanto na NAL quanto na NAC foi observada correlação positiva entre a ASS e a extensão de marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ no AIS. Entre os neurônios $\text{Na}_v1.6$ positivos, estão incluídos os motoneurônios que inervam a laringe, visto que também expressaram o fator ATF-3 após a ressecção do RLN. Foi observada também a expressão do canal $\text{Na}_v1.2$ em prováveis dendritos de neurônios situados na NAC. Nos neurônios do DMV foi observada apenas a expressão do canal $\text{Na}_v1.7$ no soma e possíveis AIS. Os resultados sugerem que neurônios motores do NA que inervam músculos branquioméricos utilizam o canal $\text{Na}_v1.6$ para geração do potencial de ação, enquanto neurônios motores autonômicos parecem depender da atividade do canal $\text{Na}_v1.7$.

ABSTRACT

The nucleus ambiguus (NA) is a collection of neurons distributed ventrolaterally in the reticular formation of medulla that projects through special visceral efferent fibers to pharynx, larynx, esophagus or through general visceral efferent fibers to lung and heart. Dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) contains autonomic neurons located dorsomedially in the medulla that send general visceral fibers mainly to abdominal viscera such as the stomach, liver, pancreas and intestines. The aim of this study was to evaluate the expression of voltage-gated sodium channels (Na_v) and their subcellular location in neurons of different formations of NA and DMV. Wistar rats of 30 days were perfused transcardially and double or triple immunofluorescence staining was performed in 25 to 40 μm coronal section of medulla. The identification of the NA formations was made through the analysis of immunofluorescence against choline acetyltransferase (ChAT). Experiments with retrograde tracer cholera toxin conjugated to Alexa Fluor 488 (CTb) applied to the lung parenchyma or the expression of neuronal injury marker ATF-3, after recurrent laryngeal nerve resection (RLN), were also used to identify neurons in the NA. Neurons in the loose formation (NAL, $n=8$), semi-compact (NAsc, $n=8$) and compact (NAc, $n=168$) had major diameter of 33 ± 1.6 ; 36 ± 0.4 and $22 \pm 0.3 \mu\text{m}$, and somatic silhouette area (SSA) average of 462 ± 39.6 ; 503 ± 28.7 and $248 \pm 7.3 \mu\text{m}^2$, respectively. Within NAc formation was observed extensive heterogeneity of neurons. The retrograde tracer CTb identified autonomic neurons in the NAc that showed anti- $\text{Na}_v1.7$ staining at soma and presumed axon initial segments (AIS). $\text{Na}_v1.6$ expression was observed in AIS of neurons within NAc, NAsc and NAL, and both NAL and NAc showed positive correlation between SSA and the extent of anti- $\text{Na}_v1.6$ labeling along the AIS. Among the $\text{Na}_v1.6$ positive neurons those that innervate the larynx are included, based on ATF-3 expression after resection of RLN. We also observed $\text{Na}_v1.2$ staining in presumed dendrites of NAc neurons. At the neurons of the DMV an anti- $\text{Na}_v1.7$ staining was observed at the soma and AIS. The results suggest that motoneurons of NA that innervate branchiomic muscles use $\text{Na}_v1.6$ channel isoform to generate the action potential whereas autonomic motoneurons seems to depend on the activity of $\text{Na}_v1.7$ channels.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Colunas longitudinais do NA ao longo do eixo rostrocaudal do bulbo.
- Figura 2-** Localização do NA e suas subdivisões em secções coronais do bulbo.
- Figura 3-** Extensão rostrocaudal do DMV no bulbo.
- Figura 4-** Estrutura e organização das subunidades do canal para sódio dependente de voltagem.
- Figura 5-** Isoformas da subfamília canal para sódio voltagem dependentes.
- Figura 6-** Distribuição topográfica de neurônios do NA imunorreativos para ChAT.
- Figura 7-** Análise morfológica dos neurônios da formação compacta do NA.
- Figura 8-** Expressão do canal para sódio $Na_v1.7$ em neurônios autonômicos pulmonares da formação compacta do NA.
- Figura 9-** Colocalização somática da marcação anti- $Na_v1.7$ e anti-ChAT em neurônios da formação compacta do núcleo ambíguo (NAC).
- Figura 10-** Análise da expressão do canal para sódio $Na_v1.7$ em neurônios da formação compacta do NA.
- Figura 11-** Expressão do canal para sódio $Na_v1.6$ em neurônios da formação compacta do NA.
- Figura 12-** Expressão do canal para sódio $Na_v1.6$ em neurônios da formação semi-compacta do NA.
- Figura 13-** Expressão do canal para sódio $Na_v1.6$ em neurônios da formação *loose* do NA.
- Figura 14-** Experimentos de tripla marcação revelam que neurônios da formação *loose* do NA (NAL), que projetam pelo nervo laríngeo recorrente, expressam o canal $Na_v1.6$.
- Figura 15-** Expressão do canal para sódio $Na_v1.2$ na formação compacta do NA.
- Figura 16-** Expressão do canal para sódio $Na_v1.7$ em neurônios do DMV.
- Figura 17-** Ausência de marcação para $Na_v1.6$ (PAb) no núcleo Dorsal Motor do Vago (DMV).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Anticorpos primários utilizados nos experimentos de imunomarcação.
- Tabela 2-** Anticorpos secundários utilizados nos experimentos de imunomarcação.
- Tabela 3-** Análise morfológica dos neurônios do NA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

12, XII ou HN	Núcleo hipoglosso
AIS	Segmento inicial do axônio
Ank-G	Anquirina-G
ChAT	Colina acetiltransferase
CC	Canal central
CVL	Bulbo caudal ventrolateral
CTb	Toxina colérica subunidade β
CTb-HRP	Toxina colérica subunidade β associada a peroxidase
DCN	Núcleo coclear dorsal
DMV ou DMNV	Núcleo dorsal motor do vago
DRG	Gânglio da raiz dorsal
FN	Núcleo facial
IgG	Imunoglobulina
MAb	Anticorpo monoclonal
MAP-2	Proteína associada a microtúbulos 2
NA	Núcleo ambíguo
NAc	Formação compacta do núcleo ambíguo
NAe	Formação externa do núcleo ambíguo
NAI	Formação <i>loose</i> do núcleo ambíguo
NAsc	Formação semi-compacta do núcleo ambíguo
Na _v	Canal para sódio dependente de voltagem
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Potencial de ação
PAb	Anticorpo policlonal
PFA	Paraformaldeído
PLP	Paraformaldeído lisina-periodato
RVL	Bulbo rostral ventrolateral
TTx	Tetrodotoxina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
1.1 NÚCLEO AMBÍGUO.....	09
1.2 NÚCLEO DORSAL MOTOR DO VAGO	13
1.4 CANAIS PARA SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM	15
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. METODOLOGIA.....	21
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS	21
4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	21
4.2.1 MARCAÇÃO RETRÓGRADA DE NEURÔNIOS VAGAI AUTONÔMICOS.....	21
4.2.2 LESÃO DO NERVO LARÍNGEO RECORRENTE	22
4.3 PREPARO DO TECIDO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA	22
4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA	23
4.5 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS	26
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5. RESULTADOS	28
5.1 TOPOGRAFIA E MORFOLOGIA DOS NEURÔNIOS DO NÚCLEO AMBÍGUO	28
5.2 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL $NA_v1.7$ EM NEURÔNIOS DA FORMAÇÃO COMPACTA DO NÚCLEO AMBÍGUO	31
5.3 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL $NA_v1.6$ EM NEURÔNIOS DA FORMAÇÃO COMPACTA DO NÚCLEO AMBÍGUO	37
5.4 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL $NA_v1.6$ EM NEURÔNIOS DA FORMAÇÃO SEMI-COMPACTA DO NÚCLEO AMBÍGUO	39
5.5 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL $NA_v1.6$ EM NEURÔNIOS DA FORMAÇÃO LOOSE DO NÚCLEO AMBÍGUO	39
5.6 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL PARA SÓDIO APÓS RESSECÇÃO DO NERVO LARÍNGEO	42
5.7 ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS CANAIS $NA_v1.1$ E $NA_v1.2$ EM NEURÔNIOS DO NÚCLEO AMBÍGUO	44
5.8 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL PARA SÓDIO EM NEURÔNIOS DO NÚCLEO DORSAL MOTOR DO VAGO.....	46
6. DISCUSSÃO	50

7. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A	70
APÊNDICE B.....	71
APÊNDICE C	72
APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS Nº61 PELO CEUA-UFTM.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 NÚCLEO AMBÍGUO

Neurônios que formam a eferência vagal são encontrados em três locais no sistema nervoso central, no núcleo ambíguo, no núcleo dorsal motor do vago e na região do bulbo entre eles, chamada zona intermediária. Esses neurônios distinguem-se de tantos outros encontrados também na formação reticular pela presença de acetilcolina no soma neuronal (Geis & Wurster, 1980; Kalia, 1981; Kalia e Mesulam, 1980; Kalia & Sullivan, 1982; McAllen & Spyer, 1975; 1976; Nosaka et al., 1979; Ruggiero et al., 1990; Lee et al., 1992).

O núcleo ambíguo (NA) é uma coleção de neurônios localizados na formação reticular do bulbo (Figura 1), começando no nível do primeiro segmento espinhal cervical e tendo o núcleo facial (FN) como limite rostral. Esse núcleo possui duas colunas longitudinais de neurônios ao longo do eixo rostrocaudal do bulbo que em ratos adultos possui quase três milímetros de extensão. As duas colunas mencionadas compreendem as divisões ventral, ou formação externa (NA_{ex}), e a dorsal. Essa última possui ainda três subdivisões, chamadas de formações loose (NA_l), semi-compacta (NA_{sc}) e compacta (NA_c).

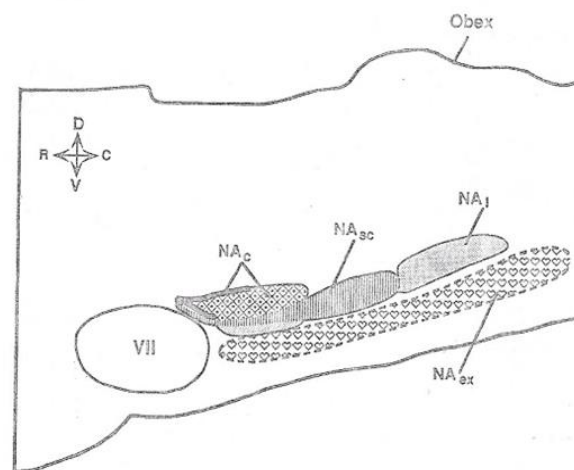


Figura 1- Colunas longitudinais do núcleo ambíguo (NA) ao longo do eixo rostrocaudal do bulbo de ratos. NA, ilustrado em um corte sagital, com suas formações e seu limite rostral, o núcleo facial (VII). A formação externa (NA_{ex}) localizada ventralmente e as formações loose (NA_l), semi-compacta (NA_{sc}) e compacta (NA_c), localizadas dorsalmente (Lee et al., 1992).

Em secções coronais do bulbo, como mostra a figura 2, o NA está localizado ventrolateralmente e possui neurônios distribuídos nas formações mencionadas, que são observadas de acordo com o nível do corte coronal ao longo do bulbo. A formação NAl observada em c da figura 2 é a mais caudal, encontrando-se dorsal ao núcleo reticular lateral (LRN) e próxima do calamus scriptorius, marco anatômico encontrado no limite rostral da área postrema (AP) e caudal do quarto ventrículo (4V) em ratos. Na figura 2E, a formação NAsc é vista dorsal ao bulbo rostral ventrolateral (RVL ou RVLM). Mais rostral, é observada a formação NAc, também dorsal ao RVL juntamente à NAe, que apesar de aparecer somente nesta secção da figura 2 acompanha toda a divisão dorsal do núcleo e localizada ventrolateral à esta (Bieger & Hopkins, 1987; Paxinos & Watson, 2005; Ruggiero et al., 1990).

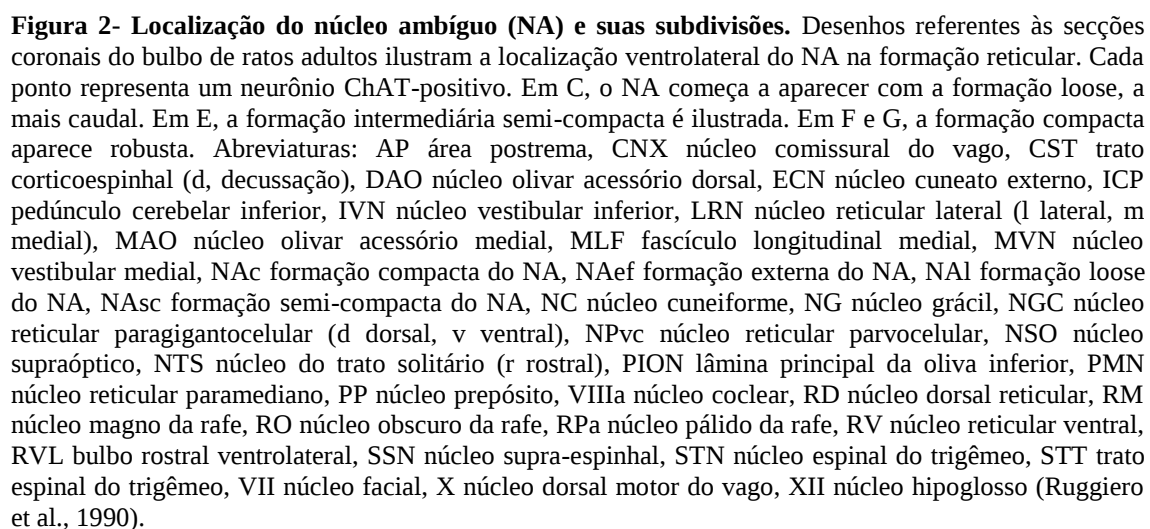
O NA possui uma grande diversidade de neurônios que projetam para diferentes alvos e utilizando diferentes tipos de fibras. Existem, nesse núcleo, neurônios que inervam musculatura branquiomérica (faringe, laringe e esôfago) através de fibras eferentes viscerais especiais e neurônios que participam do controle autonômico de traquéia, pulmão e coração através de fibras eferentes viscerais gerais (Bieger & Hopkins, 1987; Lee et al., 1992; McAllen & Spyer, 1975; 1976; Nosaka et al., 1979; Paxinos & Watson, 2005; Ruggiero et al., 1990).

A divisão ventral ou formação externa (NAe) é constituída de neurônios que participam do sistema nervoso autonômico parassimpático e, portanto, enviam fibras eferentes viscerais gerais que inervam o coração (Figuras 1, 2f) (Bieger & Hopkins, 1987; Lee et al., 1992). Estudos realizados com traçadores retrógrados injetados no coração de ratos adultos permitiram observar que essa subdivisão é composta por 100-200 neurônios pequenos localizados ventrolateralmente à divisão dorsal (Bieger & Hopkins, 1987; Cheng e Powley, 2000). Ruggiero et al. (1990) observaram um grupo celular localizado lateralmente à formação compacta e ventralmente ao NPVC (Figura 2), constituído de neurônios pequenos com diâmetro de 16-25 μm , e sugerem que este grupo pertence à formação externa. Izzo et al. (1993) também encontraram neurônios vagais cardíacos com 20-30 μm de diâmetro na região ventrolateral do bulbo. Haxhiu et al. (1993) e Hadziefendic e Haxhiu (1999) observaram marcação de neurônios ventrais à NAc, além da marcação encontrada nesta formação, após injeção de traçador retrógrado na traquéia e parênquima pulmonar. Embora esses autores não se refiram a esse grupo celular como pertencente à NAe, outros autores afirmam que neurônios

preganglionares parassimpáticos que inervam as vias aéreas são encontrados tanto na NAc quanto na NAe apresentando neurônios grandes multipolares em sua maioria e neurônios menores fusiformes em menor número (Haxhiu & Loewy, 1996; Jordan, 2001).

Hadziefendic e Haxhiu (1999) mostraram, através de injeção de traçador retrógrado toxina colérica subunidade β (CTb), que neurônios ventrais à formação compacta do NA, além desta própria, inervam o parênquima pulmonar de ratos. A parte mais rostral da divisão dorsal do NA é a formação compacta (Figuras 1, 2f, 2g), situada dorsalmente ao RVL da borda do limite caudal do núcleo facial até 1,5 mm caudal e contém densa população de neurônios (n=450). Essa subdivisão dorsal do NA é a mais complexa, uma vez que contém neurônios eferentes que projetam fibras eferentes viscerais gerais para traquéia e pulmão como também outros que projetam fibras eferentes viscerais especiais para todos os níveis do esôfago (Haxhiu et al., 1993; Hadziefendic & Haxhiu, 1999; Broussard et al., 2000). Neurônios que projetam para o esôfago torácico e subdiafragmático possuem diâmetro máximo de 31 μ m no plano coronal, rodeados por um emaranhado de dendritos curtos restritos a essa formação (Altschuler et al., 1991; Bieger & Hopkins, 1990; Ruggiero et al., 1987; Fryscak et al., 1984; Shapiro & Miselis, 1985). Altschuler et al. (1991) encontraram maior concentração de neurônios a 900-1500 μ m rostrais ao óbex após injeção de CTb conjugada à peroxidase (CTb-HRP) no esôfago.

A formação NAsc (Figuras 1, 2e) contém neurônios que inervam a faringe e o músculo cricotireóide (Altschuler et al., 1991; Bieger & Hopkins, 1987; Lee et al., 1990). Altschuler et al. (1991) localizaram neurônios a uma distância rostrocaudal de 400 a 1700 μ m rostral ao óbex após injeção de CTb conjugada a peroxidase na faringe. Essa formação possui, portanto, pouco mais de 1 mm de extensão rostrocaudal e está localizada ventrocaudal à NAc, caracterizada por menor densidade de células (n=170 em ratos adultos) que se apresentam desorganizadamente quando comparada à NAc. Foi observado diâmetro de 35-45 μ m para esses neurônios e dendritos longos (Altschuler et al., 1991; Bao et al., 1995; Bieger & Hopkins, 1990; Ruggiero et al., 1987; Fryscak et al., 1984; Shapiro & Miselis, 1985).



A NAI (Figura 1, 2c) é a subdivisão mais caudal, com menor número de células (n=140) e a mais desorganizada do NA, sendo constituída por neurônios médios multipolares que inervam a laringe, situados dorsalmente ao grupo de neurônios noradrenérgicos A1 do bulbo caudal ventrolateral (CVL ou CVLM). Caudalmente e contígua à NAsc, essa formação contém neurônios com diâmetro variando entre 25 e 35 μ m apresentando dendritos longos, chegando até a superfície ventrolateral do bulbo (Altschuler et al., 1991; Bieger & Hopkins, 1987; Lee et al., 1990; Shapiro & Miselis, 1985). Corpos celulares de neurônios que projetam pelo nervo laríngeo recorrente (RLN) de ratos foram avaliados e observaram que este nervo possui exclusivamente fibras eferentes viscerais especiais que projetam a partir do NA ipsilateralmente (Pascual Font et al., 2011).

1.2 NÚCLEO DORSAL MOTOR DO VAGO

O núcleo dorsal motor do vago (DMV, DMNV ou X) está localizado dorsomedialmente na formação reticular do bulbo, encontrando-se ventral ao núcleo do trato solitário (NTS) e área postrema (AP), dorsal ao núcleo hipoglosso (XII, 12 ou HN) e tendo seus lados mediais separados pelo canal central (CC), como mostra figura 2 (Dennison et al., 1980; Paxinos & Watson, 2005).

O DMV contém corpos celulares de neurônios preganglionares parassimpáticos, que é uma população heterogênea quanto à morfologia, e interneurônios (McClean & Hopkins, 1981; Jarvinen and Powley, 1999). Assim como o NA, esse núcleo possui grande extensão rostrocaudal, encontrando-se desde C5-C6 na medula espinhal até o nível do núcleo coclear dorsal no bulbo, como mostra a figura 3 (Kandel et al., 2000; Paxinos & Watson, 2005).

Os neurônios do DMV enviam fibras eferentes viscerais gerais para inúmeras vísceras torácicas e abdominais como coração (Nosaka et al., 1979; Geis e Wurster, 1980), estômago (Shapiro e Miselis, 1985; Holst et al., 1997), intestino (Altschuler et al., 1991) e pâncreas (Fox e Powley, 1985; Lowey et al., 1994). No entanto, no que diz respeito à inervação parassimpática cardíaca, o DMV contém apenas aproximadamente 10% dos neurônios responsáveis, fato observado após injeção de traçador retrógrado toxina CTb-HRP no miocárdio, enquanto 75% foram observados no NA (Izzo et al., 1993). No que diz respeito à inervação pulmonar pelo DMV em ratos, existem relatos controversos. Sugitani et al. (1991) injetaram o traçador retrógrado Fluorogold nos

pulmões de ratos e não observaram marcação no DMV, enquanto Fontán et al. (2000) injetaram CTB e observaram marcação principalmente no NA, mas também no DMV.

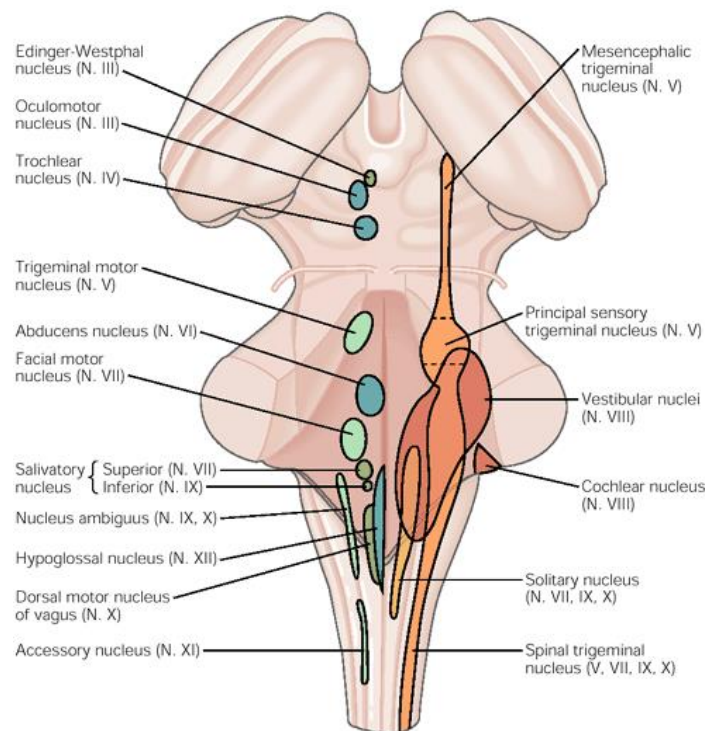


Figura 3- Ilustração da extensão rostrocaudal do núcleo dorsal motor do vago (DMV), núcleo ambíguo (NA) e de outros núcleos dos nervos cranianos no tronco encefálico. A esquerda nessa visão posterior estão os núcleos motores de Edinger-Westphal (N. III), oculomotor (N. III), troclear (N. IV), trigeminal (N. V), abducente (N. VI), facial (N. VII), salivatório superior (N. VII) e inferior (N. IX), ambíguo (N. IX, X), hipoglosso (N. XII) e acessório (N. XI), e a direita os sensoriais trigeminal mesencefálico (N. V), trigeminal principal (N. V), vestibular (N. VIII), coclear (N. VIII), do trato solitário (N. II, IX, X) e espinal trigeminal (V, VII, IX, X) (Kandel et al., 2000).

1.4 CANAIS PARA SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM

Neurônios são células excitáveis, característica atribuída principalmente à existência de proteínas integrais de membrana chamadas canais para sódio dependentes de voltagem. Esses canais permitem o influxo rápido de íons sódio e a iniciação do potencial de ação (PA) em células excitáveis (Hille, 2001). Canais para sódio são proteínas complexas constituídas por uma subunidade α , de aproximadamente 260 kDa, e uma subunidade β auxiliar de 30-40 kDa (Figura 4). A subunidade α é a formadora do poro central condutor de íon do canal e possui quatro domínios homólogos (I-IV) com seis segmentos transmembrana (S1-S6) em cada domínio. A ativação do canal ocorre devido à existência do sensor de voltagem em S4 enquanto a região entre S5 e S6 contribui para a formação do poro condutor. Entre os domínios III e IV está a comporta de inativação do canal, juntamente com possíveis sítios de fosforilação. A subunidade β realiza a modulação das propriedades funcionais do canal (Catteral, 2000; Goldin et al. 2001).

O canal para sódio pertence à superfamília de canais iônicos juntamente com os canais para potássio e cálcio dependentes de voltagem. Essas proteínas foram nomeadas de acordo com o símbolo do elemento químico permeante à membrana e logo em seguida subscrita, a forma como são reguladas. Os canais para sódio em discussão são dependentes de voltagem, o que caracteriza a voltagem como principal regulador, nomeadas então Na_v . O número que segue a nomenclatura é referente à subfamília do gene e o número seguinte a este indica a isoforma da proteína, por exemplo, $Na_v1.1$. Foram catalogadas nove isoformas de canal para sódio dependentes de voltagem, pertencentes à mesma subfamília devido à alta similaridade (Figura 5) na sequência de aminoácidos (Goldin, 2000; Yu e Catteral, 2004; Catteral et al., 2005).

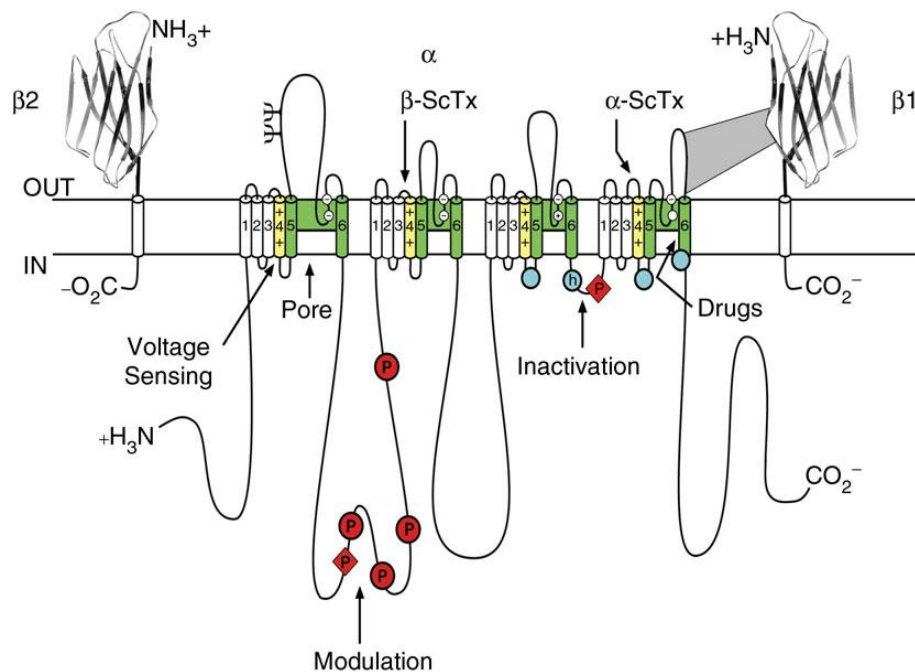


Figura 4- Estrutura e organização das subunidades do canal para sódio dependente de voltagem. Diagramas transmembranares ilustram as estruturas secundárias das subunidades dos canais iônicos voltagem-dependentes. Os cilindros representam segmentos transmembrana. Linhas em negrito representam as cadeias polipeptídicas de cada subunidade, com comprimento aproximadamente proporcional ao número de resíduos de aminoácidos dos subtipos de canais para sódio presentes no cérebro. Os domínios extracelulares das subunidades β1 e β2 são ilustrados como semelhantes a dobras de imunoglobulina. Ψ, são locais de provável glicosilação. P, são sítios de fosforilação pela proteína quinase A (círculos) e proteína cinase C (losangos). Sombreados são revestimentos de poros em segmentos S5-P-S6. Círculos brancos, do exterior (EEDD) e do interior (DEKA), anéis de resíduos de aminoácidos que formam o filtro de seletividade iônica e sítio vinculado à tetrodotoxina. ++, sensores de tensão S4; h em círculo sombreado, partícula de inativação na alça de inativação. Círculos abertos sombreados, locais envolvidos com a formação do receptor do portão de inativação. Sítios de ligação de α- e β-toxinas de escorpião e um sítio de interação entre subunidade α e β-1 são também visualizados (Catterall et al., 2005).

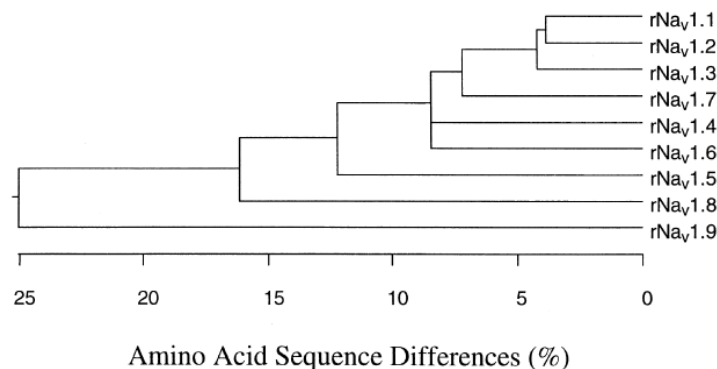


Figura 5- Comparação na sequência de aminoácidos revela uma alta similaridade entre as nove isoformas descritas de Na_v em mamíferos (Goldin, 2001).

Filogeneticamente, as isoformas 1.1, 1.2, 1.3 e 1.7 estão intimamente relacionadas e os genes que as codificam estão localizados no mesmo cromossomo, 2q23-34. O $\text{Na}_v1.6$ tem seu gene no cromossomo 12q13, apresentando maior diferença de sequência de aminoácido e, portanto, pertencendo à outro grupo, juntamente com o $\text{Na}_v1.4$, que é expresso em músculo esquelético enquanto a isoforma 1.6 é expressa no SNC. As isoformas 1.1, 1.2 e 1.3 também são encontradas em neurônios do SNC, enquanto o $\text{Na}_v1.7$ em neurônios do SNP (Felts et al., 1997; Goldin, 2001; Fukuoka e Noguchi, 2011). Já o $\text{Na}_v1.3$ é geralmente expresso em neurônios ainda em desenvolvimento (Beckh et al., 1989; Felts et al., 1997; Blankenship et al., 2013). Essas seis isoformas de Na_v apresentam uma característica em comum, a sensibilidade à tetrodotoxina (TTx), neurotoxina que bloqueia canais para sódio (Narahashi, 2008).

Os genes que codificam as isoformas 1.5, 1.8 e 1.9 se encontram no cromossomo 2 e todas três são resistentes à TTx, mas são expressas em diferentes tecidos. Embora Baroni e Moran (2011) tenham mostrado expressão do $\text{Na}_v1.5$ no SNC de ratos, esta isoforma é conhecida por sua expressão no miocárdio (Gellens et al., 1992). $\text{Na}_v1.8$ e 1.9 são expressos em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG), sendo 1.8 expresso ainda em neurônios vagais gastrointestinais (Fukuoka e Noguchi, 2011; Akopian et al., 1999; Gautron et al., 2011).

Krzemien et al. (2000) demonstraram através de reações de imunocitoquímica, imunofluorescência, hibridização *in situ* e imunoblotting que o canal para sódio $\text{Na}_v1.6$ é amplamente distribuído no SNC, sendo expresso tanto em neurônios motores quanto em neurônios sensoriais e com localização subcelular variada, como soma, axônio e dendritos. Alguns autores observaram que existe o acúmulo do canal $\text{Na}_v1.6$ em nodos de Ranvier de neurônios mielinizados do SNC e SNP e no segmento inicial do axônio (AIS). Essa alta densidade desse canal seria importante na característica saltatória do PA e na iniciação deste no AIS de fibras mielinizadas, e portanto, é a isoforma predominante nesse último local em neurônios motores somáticos (Caldwell et al., 2000; Jenkins e Bennet, 2001; Van Wart et al., 2007; Kole et al., 2008; Lorincz e Nusser, 2008).

A isoforma 1.7 do canal para sódio é, geralmente, associada à neuropatia dolorosa causada por mutações genéticas que levam à disfunção desta proteína. Enquanto indivíduos que possuem redução da atividade desse canal não são capazes de sentir dor, o aumento da função pode levar à disautonomias (Cox et al., 2006; Ahmad et

al., 2007; Goldberg et al., 2007; Dib-Hajj et al., 2007). Wang et al. (2010) observaram que mutação no gene *Nf1* causa aumento da corrente para sódio em neurônios do DRG de camundongos e mais tarde Hodgdon et al. (2012) mostraram que o resultado observado pode ser causado devido ao aumento de densidade de canais para sódio $Na_v1.7$, 1.8 e talvez 1.1 nesses camundongos geneticamente modificados. A expressão dessa isoforma foi observada no soma e processos de neurônios do DRG e também em neurônios sensoriais olfatórios (Toledo-aral et al., 1997; Felts et al., 1997; Ahn et al., 2011; Ho e O'Leary, 2011; Black et al., 2012).

Relatos da literatura indicam a existência de correntes para sódio dependentes de voltagem sensíveis à tetrodotoxina (TTX) nos neurônios do NA e DMV (Irnatén et al., 2001; Jiang et al., 1994; Mendelowitz & Kunze, 1991; Mendelowitz et al., 1996; Sah e McLachlan, 1992). Considerando as isoformas de canais para sódio TTX-sensíveis comumente expressas em neurônios, possivelmente tais correntes seriam mediadas pelas isoformas $Na_v1.1$, 1.2 , 1.6 ou 1.7 (Felts et al., 1997), uma vez que a isoforma $Na_v1.3$ parece ser restrita a neurônios imaturos (Beckh et al., 1989; Blankenship et al., 2013; Felts et al., 1997).

Nesse sentido, Morinville et al. (2007) demonstraram a presença da isoforma $Na_v1.7$ em neurônios do NA e DMV tanto por hibridização *in situ* quanto imunohistoquímica. No entanto, não foram avaliadas nesse trabalho quais formações do NA expressam essa isoforma, já que é conhecida a existência de diferentes subpopulações neuronais nesse núcleo (Bieger & Hopkins, 1987; Lee et al., 1992; Ruggiero et al., 1990). Além disso, não foi avaliada a possível expressão de outras isoformas de canais para sódio ou a localização subcelular em neurônios desses núcleos.

2 JUSTIFICATIVA

A determinação da principal isoforma de canais para sódio presente nos neurônios dos núcleos ambíguo e dorsal motor do vago permite criar inferências sobre os efeitos fisiológicos de mutações que afetem a função desse canal, mutações essas que podem envolver tanto um ganho como uma perda da função do canal iônico envolvido e que podem ou não gerar grandes modificações na atividade elétrica nas células em que são expressos. Permite também a compreensão dos efeitos de fármacos que afetem canais para sódio. Por fim, esse estudo é importante também para compreender e contrastar os mecanismos envolvidos com a geração de atividade elétrica em neurônios que participam da eferência vagal cujos papéis fisiológicos são bastante distintos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de canais para sódio dependentes de voltagem em neurônios das diferentes subdivisões do núcleo ambíguo e no núcleo dorsal motor do vago.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a isoforma prevalente (Na_v 1.1, 1.2, 1.6 ou 1.7) em neurônios de diferentes subdivisões do NA, como aqueles responsáveis pela eferência visceral especial para laringe (que projetam via nervo laríngeo recorrente) ou neurônios responsáveis pela eferência visceral geral (fibras pré-ganglionares parassimpáticas vagais para o pulmão) e contrastar essas expressões.

- Determinar a isoforma Nav prevalente em neurônios que formam a eferência visceral geral vagal que projetam a partir do núcleo dorsal motor do nervo vago.

- Nos neurônios avaliados, caracterizar a localização subcelular (soma, dendritos, segmento inicial do axônio) da principal isoforma formadora dos canais para sódio dependentes de voltagem, além de caracterizar a morfologia e localização do neurônio avaliado.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Os procedimentos na manipulação de animais e coleta de materiais realizados foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA-UFTM), com base no protocolo de nº 234 (em anexo). Foram utilizados 50 ratos Wistar machos ou fêmeas com idade de 28 a 32 dias, sob os cuidados do Biotério da disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os animais foram mantidos em ambiente com controle de temperatura (23 ± 1 °C), ciclo de claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7:00 horas) e com livre acesso a água e ração balanceada (Nuvilab). Após o desmame aos 21 dias, os animais eram separados e mantidos em um número de 3 animais/caixa até a idade de uso (30 dias). As caixas plásticas (40 x 34 x 17 cm) eram limpas três vezes por semana e forradas com maravalha autoclavada. Todo esforço foi feito para reduzir ao mínimo o número de animais utilizados.

4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Todo o material utilizado no procedimento cirúrgico foi previamente esterilizado e a cirurgia foi realizada em condições de assepsia (local de cirurgia e pesquisador que realizou a cirurgia). Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina/xilazina (60 e 5 mg/Kg, respectivamente) e complementos de anestesia foram dados de acordo com a necessidade durante o procedimento cirúrgico. Após verificação do efeito anestésico pelo pinçamento da cauda, o animal foi imobilizado em decúbito dorsal em cama cirúrgica com os membros em abdução.

4.2.1 Marcação retrógrada de neurônios vagais autonômicos

Após a anestesia como descrito acima, os animais foram submetidos à tricotomia e assepsia (álcool iodado) da parte anterior do tórax direito, na região do 2º espaço intercostal. Foi realizada incisão transversal na pele entre a segunda e terceira costelas, divulsão dos músculos peitoral e transversos, e injeção de 2 µl do traçador retrógrado toxina colérica subunidade β conjugado ao Alexa 488 a 1% no lobo superior do pulmão direito através de seringa Hamilton de 1 µl através do 2º espaço intercostal. A incisão foi fechada por sutura e, após recuperação da anestesia, o animal foi levado de volta ao

biotério onde permaneceu isolado em uma caixa por 3 dias. Após esse período, os animais foram submetidos à eutanásia e perfusão transcardíaca para retirada do bulbo.

4.2.2 Lesão do nervo laríngeo recorrente

Após a anestesia como descrito acima, os animais foram submetidos à tricotomia e assepsia (álcool iodado) da linha média da região do pescoço. Foi realizada incisão vertical na pele, divulsão de gorduras subcutâneas, glândula submandibular e musculatura para exposição da traquéia. O nervo laríngeo recorrente foi isolado no nível do quinto anel traqueal e realizada ressecção deste, retirando uma extensão de aproximadamente 2 mm. A incisão foi fechada por sutura e, após recuperação da anestesia, o animal foi levado de volta para o biotério e mantido isolado por 3 dias, até o momento da eutanásia e perfusão transcardíaca para retirada do bulbo.

4.3 PREPARO DO TECIDO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA

Todo o material usado no procedimento cirúrgico foi previamente esterilizado e a cirurgia foi realizada em condições de assepsia. Os animais foram anestesiados com uma overdose de Tiopental (100 mg/Kg, intraperitoneal) e perfundidos transcardiacamente. Para isto, os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica, com os quatro membros fixados em abdução. Dentro de uma capela de exaustão de gases, foi realizada uma incisão mediana longitudinal da parede abdominal até a caixa torácica, o músculo diafragma foi cortado para a realização do pneumotórax e, logo em seguida, uma agulha ligada ao sistema de perfusão foi introduzida pelo ventrículo esquerdo até a aorta ascendente e clampeada com uma pinça, enquanto o átrio direito foi perfurado para o escoamento do sangue e solução de perfusão. A perfusão foi realizada com uma bomba peristáltica (Milan BP-200) com fluxo de 9/10 ml/min. Inicialmente, para a lavagem do sangue, os animais foram perfundidos com solução salina (PBS) a 24 °C por quatro minutos, com a seguinte composição (mM): 142 NaCl, 2,68 KCl, 1,47 KH₂PO₄, 8,06 NaHPO₄, pH 7.4. Em seguida, foi realizada a perfusão de paraformaldeído-lisina-periodato a 1% (peso/volume) em PBS durante 30 minutos, cuja composição é: 0,01 Molar de metaperiodato de sódio (Sigma S1878), 0,075 Molar de lisina (L-lysine monohydrochloride, Sigma L5626), 0,037 Molar de fosfato de sódio e 1% de paraformaldeído (Sigma, P6148). Após o término da perfusão, os animais foram decaptados com uma tesoura para a realização da dissecação cirúrgica.

Após a decaptação, a calota craniana foi aberta para acesso à cavidade craniana e o tronco encefálico foi cuidadosamente retirado, seccionando os nervos ao seu redor sem comprometer a integridade do tecido, com auxílio de um estereomicroscópio (D.F. Vasconcellos M90) e de uma tesoura oftálmica (Roboz, RS-5600). Em seguida, um bloco de tecido contendo parte de tronco encefálico (ponte e bulbo) foi cortado, de forma coronal, crioprotegido em solução de sacarose a 30% em PBS *overnight* até o tecido absorver completamente a solução e submergir. Após a crioproteção, o tecido foi retirado da sacarose e imerso em uma solução própria ao congelamento (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Japan) em um molde de plástico (cápsula de remédio) e congelado pela imersão em metilbutano (isopentano, Vetec) ou N-hexano (Sigma) resfriado em nitrogênio líquido. O bloco congelado foi seccionado em criostato Leica (CM1850 UV), em fatias coronais de 25 a 40 µm. As secções foram montadas em lâminas tratadas com solução contendo gelatina (Sigma-Aldrich) e sulfato de cromo-potássio (Sigma-Aldrich). Após secagem por uma hora, as lâminas foram colocadas sobre placa aquecida (Histotemp-3, Leica) a 40°C durante 30 minutos e a imunomarcção foi iniciada.

4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As secções nas lâminas foram lavadas (três lavagens de 15 min), sob agitação suave em agitador (BIOMIXER TS-2000A-VDRL SHAKER), com tampão fosfato de sódio 0,1 Molar, pH 7,4 (tampão PB). Em seguida, as fatias foram incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente (24°C) em solução de permeabilização/bloqueio de ligação inespecífica composta por 1,5% (vol/vol) de Triton X-100 e 10% (vol/vol) de soro de cabra (Sigma) ou soro de burro (Sigma), dependendo do anticorpo secundário utilizado, em tampão fosfato de sódio (PB) 0,1 Molar, pH: 7,4. Logo após, as secções foram incubadas por 21-24 horas, em câmara úmida a 4 °C, com solução de bloqueio (mesma composição da solução de bloqueio/permeabilização com ajuste do Triton para 0,3%) contendo anticorpos primários (Tabela 2), previamente centrifugados por 10 minutos à temperatura de 4 °C (Rotanta 460R-Hettich Zentrifugen) a 12.000 rpm. Todas as soluções foram filtradas com sistema a vácuo (DIA PUMP-FANEM LTDA), utilizando-se filtro de nitrocelulose de 0,45 µm de diâmetro (Millipore, HAWPO4700).

Após a incubação de anticorpos primários, as secções foram lavadas com PB (três vezes por 15 min) e incubadas por duas horas à temperatura ambiente (24 °C) em

tampão de bloqueio contendo anticorpos secundários fluorescentes (Tabela 2), previamente centrifugados.

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 Fluoromount-G (SouthernBiotech, EUA). O controle negativo das imunomarcações foi feito pela omissão do anticorpo primário e pelo uso do peptídeo antigênico quando disponível.

ANTICORPO PRIMÁRIO	ESPÉCIE PRODUÇÃO ISOTIPO	EPÍTOPO	CONCENTRAÇÃO DILUIÇÃO	ORIGEM
ChAT (*MAb)	Camundongo IgG1	Inoculação da enzima recombinante completa	1 mg/ml 1:100	Millipore MAb305
ChAT (PAb)	Cabra	Inoculação da enzima recombinante completa	1 mg/ml 1:400	Millipore AB144
MAP-2 (MAb)	Camundongo IgG1	Reconhece MAP2A e B	1 mg/ml 1:300	Millipore MAB378
MAP-2 (PAb)	Coelho	Isoformas MAP2A, MAP2B, MAP2C e MAP2D (maior imunorreatividade contra MAP2A e MAP2B)	1 mg/ml 1:400	Millipore AB5622
Nav1.1 (MAb)	Camundongo IgG1	aa 1929-2009 (término citoplasmático do canal de ratos)	1 mg/ml 1:100	Neuromab K74/71
Nav1.2 (PAb)	Coelho	ASAESRDFSGAGGIGVFSE (aa 467-485 da alça intracelular que liga os domínios II-III)	0,8 mg/ml 1:200	Alomone ASC-002
Nav1.6 (MAb)	Camundongo IgG1	SEDAIEEEGEDGVGSPRS (aa 459-476 da alça intracelular entre os domínios I-II do canal de ratos)	Quando purificado 1 mg/ml 1:100 Na forma de sobrenadante ≈ 0,02-0,04 mg/ml 1:4	Neuromab K87A/10
Nav 1.6 (PAb)	Coelho	CIANHTGVDIHRNGDFQKNG (aa 1042-1061 da alça intracelular entre os domínios II-III do canal de ratos)	0,8 mg/ml 1:100	Alomone ASC-009
Nav1.7 (MAb)	Camundongo IgG1	aa 1751-1946 (C-terminal citoplasmático) do canal de humanos	1 mg/ml 1:100	Neuromab N68/6
Nav1.7 (PAb)	Coelho	aa 446-460	0,8 mg/ml 1:100	Millipore AB5390
Nav1.7 (PAb)	Coelho	EFTSGRSRIMGLSE (aa 446-460 da alça intracelular entre os domínios I-II do canal de ratos)	0,8 mg/ml 1:100	Alomone ASC-008
Pan-Nav	Camundongo IgG1	CTEEQKKYYNAMKKLGSKK (da alça intracelular entre os domínios III e IV de canais Nav)	1 mg/ml 1:200	Sigma, S8809
ATF3	Coelho	C-terminal	0,2 mg/ml 1:300	Santa Cruz SC-188

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados nos experimentos de imunomarcação.

ANTICORPOS SECUNDÁRIOS	ORIGEM	ANTI	CONC. ORIGINAL E DILUIÇÃO	FABRICANTE CÓDIGO
Alexa405	Burro	Coelho	500 µg-2 mg/ml 1:500	Abcam Ab175651
Alexa488	Burro	Cabra	2 mg/ml 1:500	Invitrogen A11055
Alexa488	Cabra	Camundongo	2 mg/ml 1:500	Invitrogen A11001
Alexa568	Burro	Camundongo	2 mg/ml 1:500	Invitrogen A10037
Alexa568	Cabra	Coelho	2 mg/ml 1:500	Invitrogen A11011

Tabela 2: Anticorpos secundários utilizados nos experimentos de imunomarcção.

4.5 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS

As imagens foram obtidas utilizando microscopia confocal por varredura a laser (LSM-510 Meta e LSM-710, Zeiss) e objetivas de 20x EC Plan-Neofluar, abertura numérica (NA: 0.5), 40x de imersão em óleo (EC Plan-Neofluar NA: 1.3) e 63x de imersão em óleo (Plan-Apochromat NA: 1.4). Para obter imagens bidimensionais, múltiplas seções confocais no eixo Z foram projetadas em um plano único. Em alguns casos, secções confocais únicas foram também utilizadas para ilustração. Para ambos os casos, nas legendas das figuras, foi descrito o número de seções ópticas no eixo Z utilizadas na projeção e a espessura aproximada (em micrômetros) de cada seção. Essas projeções foram do tipo máxima intensidade de fluorescência (MIF). As imagens são apresentadas em código de cor (verde, vermelho e azul). As análises foram feitas utilizando os *softwares* Fiji/ImageJ 1.47 e Origin 7.5, e os painéis montados com o Adobe Illustrator CS (Adobe System, EUA).

A localização dos neurônios avaliados ao longo do eixo rostrocaudal foi analisada utilizando marco anatômico visível em secções do bulbo. Em ratos, o óbex está situado no limite caudal da área postrema enquanto o *calamus scriptorius*. encontra-se no limite rostral da mesma (Hamilton & Norgren, 1984; Paxinos & Watson, 2005). Esse último é mais facilmente observado nas secções coronais obtidas após a criosecção e foi utilizado como marco anatômico nos experimentos. A localização dos

cortes foi definida de acordo com a distância, expressa em micrômetros, a partir do mesmo.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas das extensões dos AIS/processos e das áreas somáticas dos neurônios avaliados foram submetidas ao teste de *Grubbs*, para a detecção de valores que desviam substancialmente da média, utilizando-se o *software GraphPad* (disponível em: www.graphpad.com/quickcalcs/ContMenu/). Em seguida, foi avaliada a normalidade de distribuição dos dados e homogeneidade das variâncias pelos testes de *Shapiro-Wilk* ($p \geq 0,05$) e *Kolmogorov-Smirnov* ($p \geq 0,05$), respectivamente, utilizando o *software Origin 8.0* (Microcal,USA). O teste de correlação linear de *Pearson* (r de -1 a $+1$) foi realizado para verificar a existência de correlação e significância entre a extensão da marcação ao longo do processo e a área de silhueta somática dos neurônios (*Origin 8.0*).

5 RESULTADOS

5.1 TOPOGRAFIA E MORFOLOGIA DOS NEURÔNIOS DA DIVISÃO DORSAL DO NÚCLEO AMBÍGUO

A figura 6 ilustra neurônios colinérgicos do NA imunomarcados com ChAT (PAb) em secções coronais do bulbo de 40 μm , onde o NA é observado de 80 a 1480 μm rostrais ao *calamus scriptorius* (limite rostral da área postrema). 6 A-C, observamos neurônios dispersos, com dendritos longos e em pequeno número, próximos ao *calamus scriptorius*, podendo representar tanto neurônios da formação *loose* (NAI) quanto da semi-compacta (NAsc). Em 6 D-F maior número de neurônios e menos dispersos pertencentes à formação NAsc. Em 6G, é possível observar o limite caudal da formação compacta (NAc) com a presença de neurônios menores, localizados dorsalmente no NA. Os painéis H a J ilustram tanto a NAc, com neurônios de menor diâmetro localizados dorsalmente, quanto a NAsc, com neurônios de maior diâmetro. No extremo rostral do NA, localizado a aproximadamente a 1480 μm do *calamus scriptorius* nesses animais de 30 dias, observa-se apenas a formação NAc (Figura 6K). Esse limite rostral do NA coincide com o limite caudal do núcleo facial (VII), um marco neuro-anatômico facilmente identificável. Os neurônios de cada formação estudada apresentaram área de silhueta somática (ASS) pouco diversa (Tabela 3), com exceção da NAc.

A figura 7 apresenta os resultados da análise morfológica realizada nos neurônios apenas da formação compacta do NA. Em 7A, a secção a 900 μm rostral ao *calamus scriptorius*, após imunomarcagem com anti-ChAT (PAb), com neurônios de menor e maior tamanho. Em 7B, o histograma ilustra a heterogeneidade da análise da área de silhueta somática (ASS) onde a menor área foi de 82 e a maior de 529 μm^2 e a média de $249 \pm 94 \mu\text{m}^2$. O painel C ilustra especificamente neurônios autonômicos que projetam para pulmão, marcados com traçador retrógrado toxina colérica conjugada ao Alexa 488 (CTb), encontrados a 825 μm rostral ao *calamus scriptorius*. Esses neurônios foram encontrados dispersos em secções entre 700 a 1200 μm rostrais ao *calamus scriptorius* e exibiram uma média de ASS de $124 \pm 27 \mu\text{m}^2$. Análise específica dessa população indica homogeneidade, como mostra o histograma em D, juntamente com a curva de Gauss ajustada aos dados com coeficiente de determinação (R^2) de 0,93 e $p \leq 0,001$.

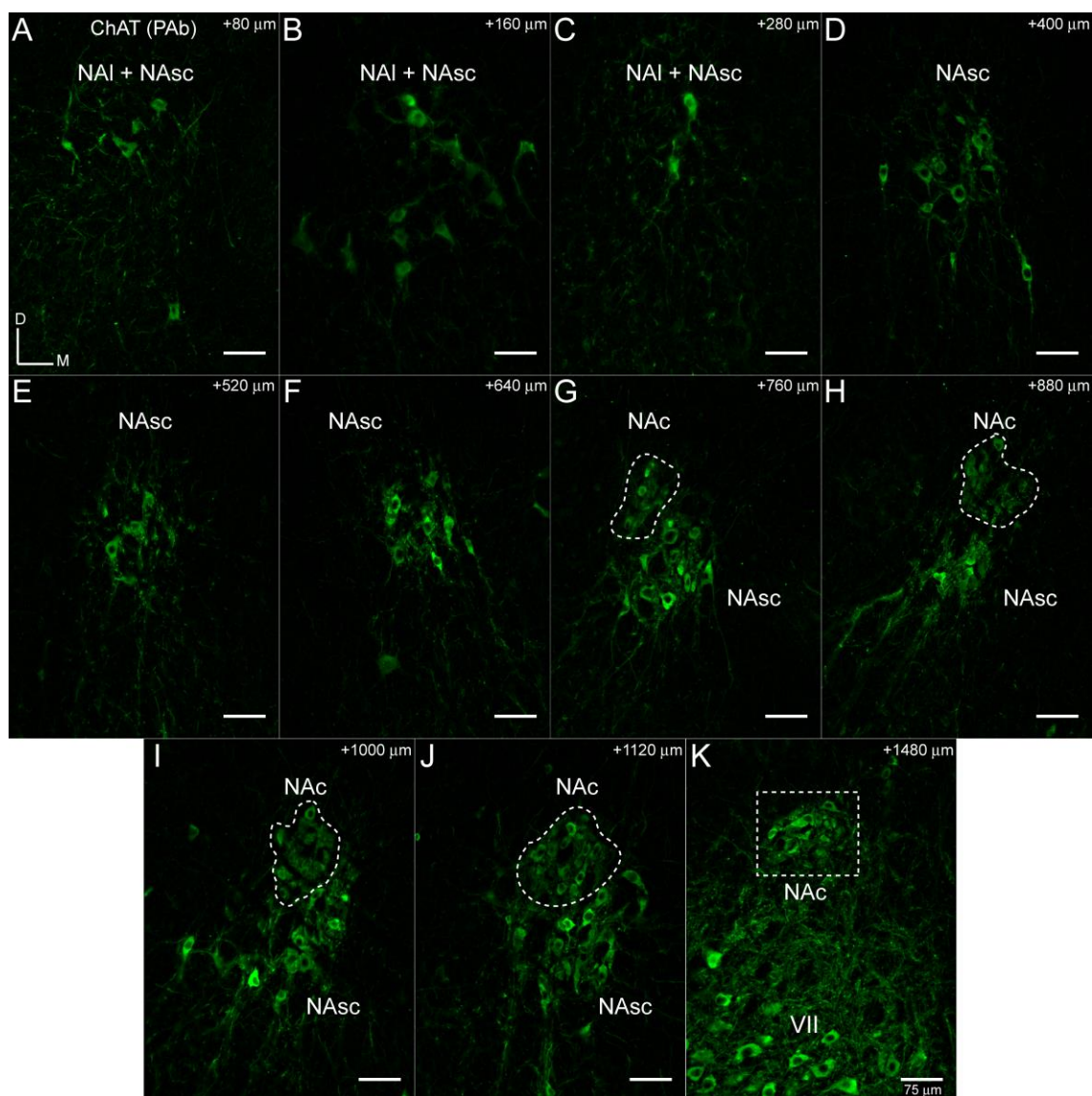


Figura 6- Imunomarcção anti-ChAT em cortes coronais ao longo do eixo rostro-caudal do bulbo ilustra a distribuição topográfica dos neurônios do NA. A-F, secções de 40 μm do bulbo, entre +80 e 520 μm rostrais ao *calamus scriptorius*, que ilustram neurônios pertencentes à formação *loose* (NAI) caudalmente ou semi-compacta (NAsc) mais rostralmente. F, ilustra o limite caudal da formação compacta (NAc) do NA (+640 μm) juntamente com a extensão rostral da semi-compacta. G-J, neurônios da formação compacta e semi-compacta. K, limite rostral do NA, coincidente com o extremo caudal do núcleo facial (VII), ilustrando unicamente a formação compacta do NA.

	NAI (n=8)	NAsc (n=8)	NAc (n=168)
Diâmetro maior (Média ± DP)	33 ± 4,5 μm	36 ± 1 μm	22 ± 4,5 μm
Área de silhueta somática	462 ± 112 μm ²	503 ± 81,3 μm ²	248 ± 94,3 μm ²

Tabela 3- Análise do maior diâmetro e área de silhueta somática dos neurônios das diferentes formações do NA dorsal.

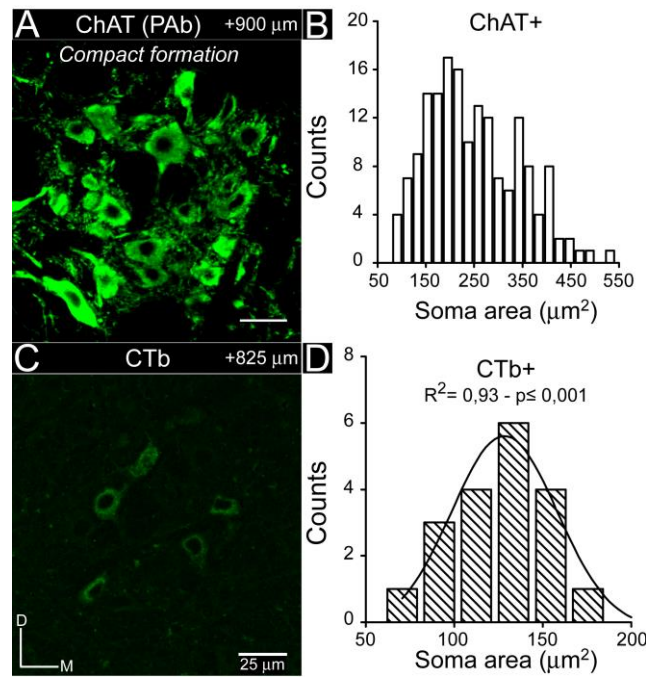


Figura 7- Análise morfológica dos neurônios da formação NAc do núcleo ambíguo. **A**, secção coronal do bulbo imunomarcada para ChAT ilustrando a formação compacta do NA e os diferentes neurônios desta a 900 μm do *calamus scriptorius*. **B**, histograma de frequência de distribuição da área de silhueta somática (ASS) ilustrando uma heterogeneidade da população neuronal encontrada na NAc. **C**, neurônios autonômicos da formação NAc marcados retrogradamente após injeção de CTb-A488 no parênquima pulmonar, observados a 825 μm do *calamus scriptorius*. **D**, histograma de frequência de distribuição da ASS desses neurônios autonômicos pulmonares com coeficiente de determinação (R^2) de 0,93 e $p \leq 0,001$, refletindo uma homogeneidade na ASS. Foi encontrada média de 249 ± 94 para ChAT+ e de 124 ± 27 para CTb+. A e C, projeções do tipo MIF de 4 secções confocais ($Z = 1 \mu\text{m}$).

5.2 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL $Na_v1.7$ EM NEURÔNIOS DA FORMAÇÃO COMPACTA DO NÚCLEO AMBÍGUO

A figura 8 apresenta o resultado da análise de expressão do canal para sódio $Na_v1.7$ em neurônios autonômicos pulmonares da NAc, identificados com o traçador retrógrado toxina colérica subunidade beta (CTb) conjugada ao Alexa-488. Em 8A, observamos a marcação retrógrada com CTb. Em 8B é ilustrada a imunorreatividade anti- $Na_v1.7$ onde as cabeças de setas indicam os processos marcados. Inset em 8B representa o controle positivo dessa reação, ilustrando a marcação em neurônios sensoriais do gânglio da raiz (DRG), já bem estabelecida na literatura. Em 8C, a sobreposição das imagens ilustra uma colocalização somática (setas). Em 8D é ilustrada, em maior magnificação, a área delimitada em 8A, evidenciando parte de um soma neuronal com marcação CTb, escaneado em maior resolução. Em 8E, observamos um processo imunorreativo para $Na_v1.7$ (cabeça de seta) que deriva do neurônio autonômico pulmonar ilustrado em 8D. A sobreposição dessas imagens (8E) permite uma melhor visualização do processo $Na_v1.7$ positivo emergindo do soma neuronal.

Secções adjacentes às utilizadas para imunomarcação anti- $Na_v1.7$ foram também processadas para marcação anti- $Na_v1.6$. Apesar de termos repetido esse experimentos algumas vezes (n=5) não foi observada marcação anti- $Na_v1.6$ nesses neurônios autonômicos pulmonares identificados com CTb. A ausência de marcação anti- $Na_v1.6$ nesses neurônios foi observada em cortes que apresentaram uma exuberante marcação em outras áreas anatômicas (e.g. células de Purkinje do cerebelo e no núcleo do hipoglosso). Dados não ilustrados.

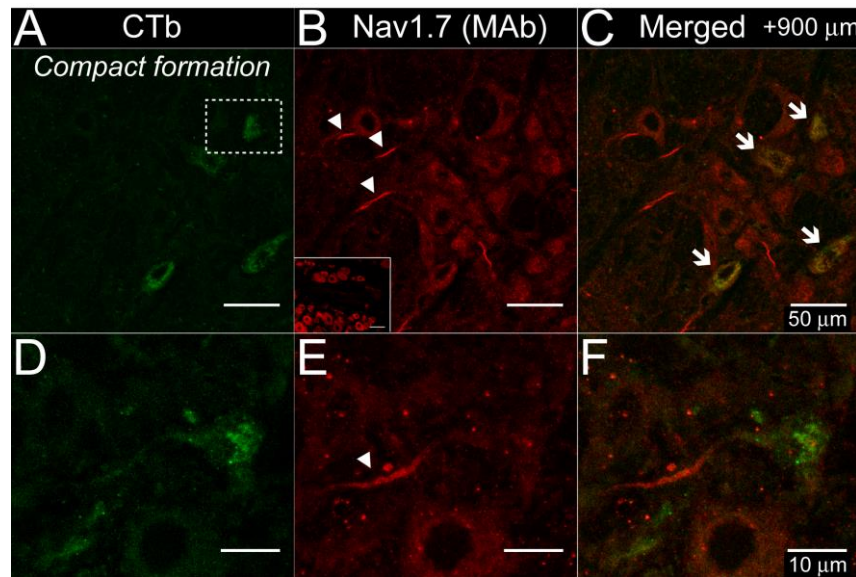


Figura 8- Expressão do canal para sódio $\text{Na}_v1.7$ em neurônios autonômicos pulmonares da formação compacta do NA. **A**, neurônios da região rostral (900 μm do *calamus scriptorius*) da formação compacta do NA, que projetam para o pulmão, identificados pela marcação retrógrada com CTb. **B**, marcação anti- $\text{Na}_v1.7$ (MAb) ilustrando processos imunorreativos (cabeças de setas). *Inset*: controle positivo endógeno da marcação anti- $\text{Na}_v1.7$ em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG). **C**, sobreposição das imagens A e B, onde as setas indicam colocalização. A e B, projeções do tipo MIF de 4 secções confocais ($Z=1 \mu\text{m}$). **D e E**, área delimitada em A escaneada em maior aumento e em diferentes planos confocais. Em **E**, marcação anti- $\text{Na}_v1.7$ em um processo (cabeça de seta) derivado do soma ilustrado em D. **F**, sobreposição das marcações retrógrada e anti- $\text{Na}_v1.7$. D e E, projeções do tipo MIF de 3 secções confocais ($Z=1 \mu\text{m}$).

Com o objetivo de avaliar se os neurônios que expressam o canal Na_v1.7 são neurônios vagais colinérgicos, foram feitos experimentos de dupla-marcação anti-ChAT e anti-Na_v1.7. A figura 9 ilustra o padrão de marcação anti-Na_v1.7 obtida com a utilização de dois anticorpos anti-Na_v1.7, um monoclonal (Neuromab) e outro policlonal (Millipore). Observamos, em 9A, que a maioria dos neurônios ChAT-positivos (900 µm do *calamus scriptorius*) são de pequeno tamanho, como esperado para neurônios da formação compacta. Entretanto, ventralmente a essa formação pode ser observado um neurônio de maior tamanho (seta), com maior diâmetro de 36 µm e ASS de 600 µm², provavelmente pertencente à formação semi-compacta do NA (NAsc). Em 9B observa-se a imunomarcação anti-Na_v1.7 (MAb) e, em 9C, a sobreposição das imagens. Observa-se uma localização somática do canal Na_v1.7 nos neurônios da NAc. Em contraste, o neurônio da NAsc, indicado pela seta em 9A, não apresentou marcação anti-Na_v1.7.

Com o objetivo de comprovar a expressão do canal Na_v1.7 na formação compacta do núcleo ambíguo, foi utilizado um segundo anticorpo anti-Na_v1.7 (policlonal, PAb). O painel D da figura 9 ilustra a marcação anti-ChAT (PAb) nessa formação (também a 900 µm do *calamus scriptorius*). Similarmente à marcação anti-Na_v1.7 obtida com o anticorpo monoclonal, foi observada uma marcação somática com o uso do anticorpo anti-Na_v1.7 policlonal (Figura 9E). A sobreposição dessas imagens (Figura 9F) confirma a colocalização somática dessas marcações.

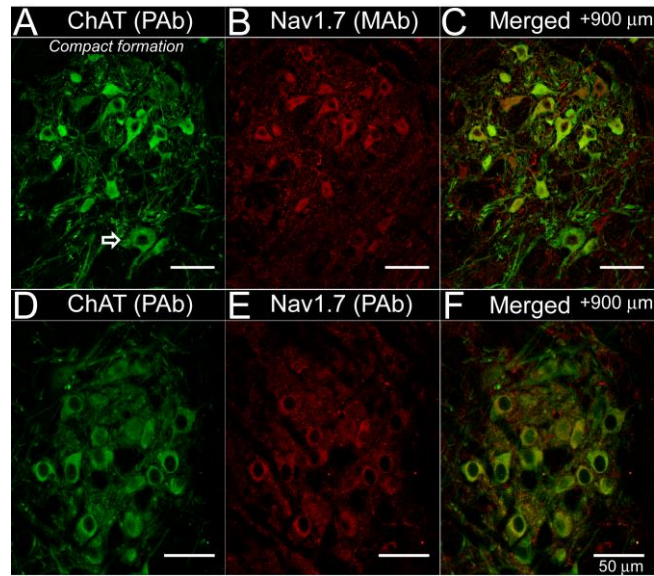


Figura 9- Colocalização somática da marcação anti-Nav1.7 e anti-ChAT em neurônios da formação compacta do núcleo ambíguo (NAc). **A**, marcação anti-ChAT (PAb) em neurônios da região rostral da NAc (900 μ m do *calamus scriptorius*). A seta indica um neurônio maior, provavelmente da formação semi-compacta. **B**, marcação somática anti-Nav1.7 obtida com anticorpo monoclonal (MAb). **C**, sobreposição das imagens A e B, e colocalização somática das marcações anti-ChAT e anti-Nav1.7. A e B, projeções do tipo MIF de 3 secções confocais ($Z=1$ μ m). **D**, marcação anti-ChAT. **E**, marcação anti-Nav1.7 obtida com anticorpo policlonal (PAb). **F**, sobreposição das marcações anti-ChAT e anti-Nav1.7. D e E, projeções do tipo MIF de 2 secções confocais ($Z=1$ μ m).

O escaneamento em maior resolução, tanto em xy quanto em z, confirmou que a marcação anti- $\text{Na}_v1.7$ em neurônios da formação compacta não se restringe somente ao soma, mas pode ser evidenciada também em processos, à semelhança dos resultados apresentados na figura 8. A figura 10A apresenta uma imagem que ilustra a marcação anti- $\text{Na}_v1.7$ somática e em processos derivados do soma (cabeças de setas) na formação compacta, obtida com o anticorpo monoclonal (MAb). A área delimitada em A é apresentada em maior aumento em B, onde são indicados dois corpos celulares (asteriscos), com suas respectivas áreas somáticas, bem como processos derivados dos mesmos cuja extensão da marcação anti- $\text{Na}_v1.7$ é indicada para cada um deles. Em 10C, apresentamos o gráfico da análise de correlação entre a área de silhueta somática (ASS) e a extensão da marcação anti- $\text{Na}_v1.7$ dos processos. Foi observada uma correlação positiva significativa com coeficiente de correlação (r) de 0,9 e $p \leq 0,01$ ($n=7$).

Um terceiro anticorpo anti- $\text{Na}_v1.7$ (policlonal, Alomone) foi utilizado para analisar a expressão desse canal no NA. Nesse núcleo não foi observada marcação com esse anticorpo, embora neurônios do gânglio da raiz dorsal tenham apresentado marcação positiva. Em outras áreas neuroanatômicas, esse anticorpo apresentou indícios de marcação inespecífica (e.g. células da glia). Essa marcação não apresentou colocalização com a marcação de um anticorpo anti-Pan- Na_v (reconhece todas as isoformas de canal para sódio). Esses resultados são mostrados no apêndice A.

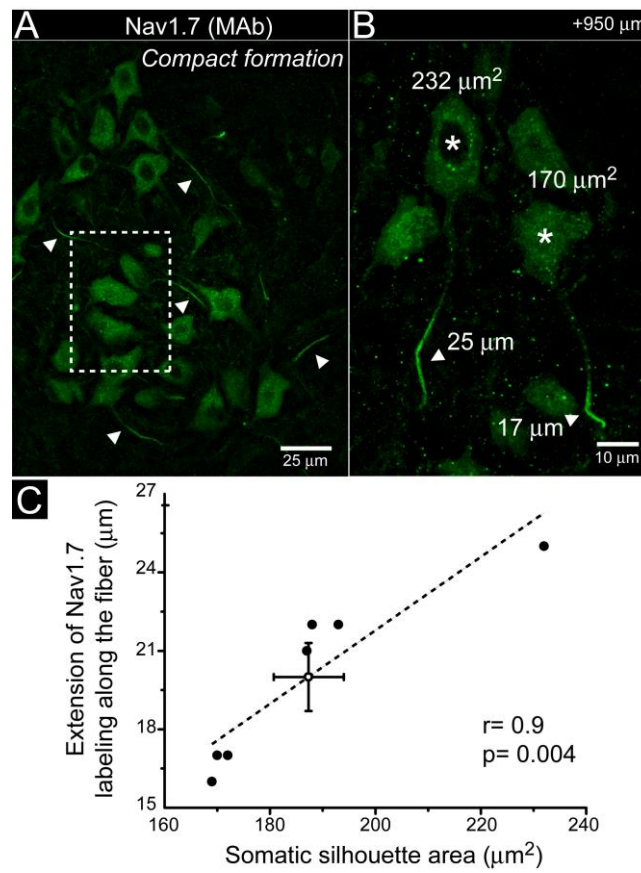


Figura 10- Análise da expressão do canal para sódio $\text{Na}_v1.7$ em neurônios da formação compacta do NA. **A**, marcação anti- $\text{Na}_v1.7$ na região rostrocaudal da formação compacta do NA, com indicação das fibras marcadas pela isoforma em questão. **A**, projeções do tipo MIF de 7 secções confocais ($Z = 1 \mu\text{m}$). **B**, maior magnificação da área delimitada em **A** com indicação da área de silhueta somática dos neurônios avaliados (asteriscos) e da extensão da marcação ao longo da fibra (seta) destes. **B**, projeções do tipo MIF de 4 secções confocais ($Z = 1 \mu\text{m}$). **C**, relação entre a área de silhueta somática e extensão de marcação anti- $\text{Na}_v1.7$ ao longo da fibra ($n=7$).

5.3 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL $\text{Na}_v1.6$ EM NEURÔNIOS DA FORMAÇÃO COMPACTA DO NÚCLEO AMBÍGUO

A isoforma 1.6 do canal para sódio dependente de voltagem também foi encontrada em neurônios do núcleo ambíguo. A figura 11 ilustra os resultados encontrados referentes à expressão dessa isoforma na formação compacta do NA. Em 11A, a marcação anti-ChAT mostra um neurônio típico da NAc encontrado (725 μm do *calamus scriptorius*) com ASS de 307 μm^2 e em 11B a marcação anti- $\text{Na}_v1.6$. Pode ser observada uma marcação intensa em um processo derivado do soma, como o indicado pela seta, e cuja extensão foi de 12 μm . É possível visualizar também nodos de Ranvier intensamente marcados no entorno e dentro dessa formação. Em 11C, a sobreposição das imagens A e B permitem visualizar que o processo deriva do neurônio indicado em 11A. Em 11D é ilustrado outro neurônio colinérgico dessa formação com ASS de 256 μm^2 . Em 12E, outro processo aparece imunomarcado (seta) com anticorpo anti- $\text{Na}_v1.6$, cuja extensão é de 11 μm . Da mesma forma como em 11B, nodos de Ranvier aparecem bem marcados nessa secção. O painel F ilustra a sobreposição das imagens D e E, permitindo observar que o processo marcado em 11E pertence ao neurônio ilustrado em 11D. O gráfico em 11G mostra a análise de correlação realizada entre área somática e extensão da marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ ao longo dos processos derivados do soma de seis neurônios dessa formação analisados, onde o coeficiente de correlação (r) foi de 0,93 e $p \leq 0,01$, indicando correlação positiva significativa entre as variáveis.

Nas formação compacta a expressão do canal $\text{Na}_v1.6$ foi avaliada por um segundo anticorpo anti- $\text{Na}_v1.6$ (policlonal, Alomone) sendo obtido um mesmo padrão de marcação encontrado para o anticorpo anti- $\text{Na}_v1.6$ monoclonal acima descrito. Entretanto, tais experimentos foram de dupla marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ e anti-ChAT (monoclonal Millipore), resultado ilustrado no apêndice B.

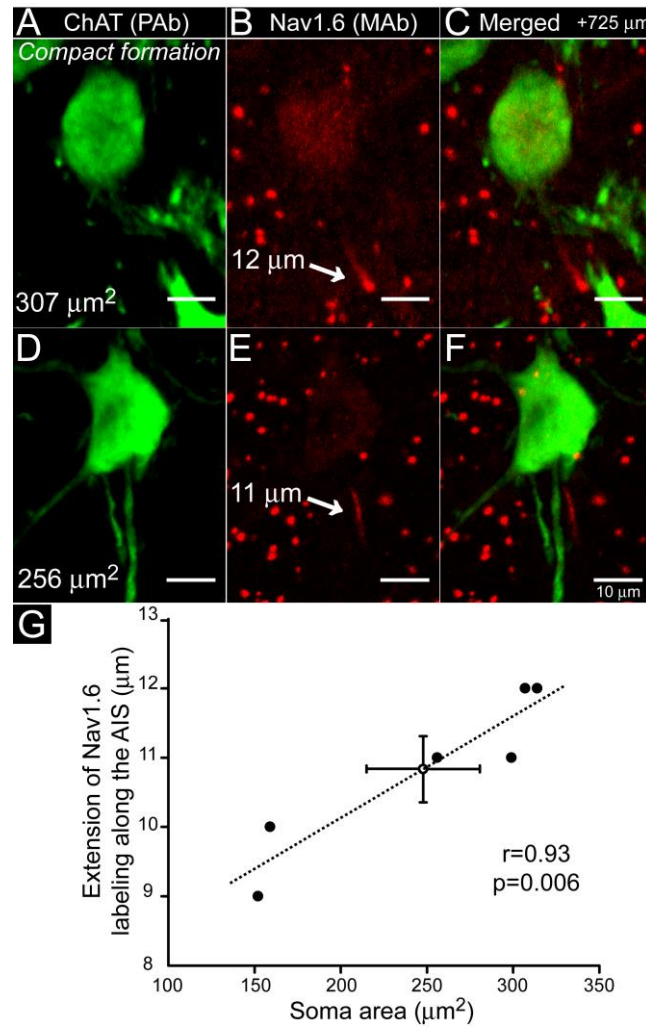


Figura 11- Expressão do canal para sódio $\text{Na}_v1.6$ em neurônios da formação compacta do NA. A e D, marcação anti-ChAT (PAb) em neurônio da região rostral do NA, a $725 \mu\text{m}$ do *calamus scriptorius*, pertencente à formação compacta com indicação da área de silhueta somática. B e E, marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ (MAb) com indicação da extensão de marcação ao longo do AIS (setas) dos neurônios avaliados. C e F, sobreposição das marcações anti-ChAT e anti- $\text{Na}_v1.6$. A e B, projeções do tipo MIF de 7 secções confocais ($Z=1 \mu\text{m}$). D e E, projeções do tipo MIF de 7 secções confocais ($Z=1 \mu\text{m}$). G, relação entre a área de silhueta somática e extensão de marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ ao longo do AIS ($n=6$).

5.4 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL $\text{Na}_v1.6$ EM NEURÔNIOS DA FORMAÇÃO SEMI-COMPACTA DO NÚCLEO AMBÍGUO

A figura 12 mostra a expressão do canal $\text{Na}_v1.6$ nos neurônios da formação semi-compacta (NAsc). Em 12A e D, ilustramos neurônios colinérgicos pertencentes à NAsc a 25 μm rostrais do *calamus scriptorius* e suas respectivas ASS, 542 e 486 μm^2 . Em 12B e E, é ilustrada a expressão da proteína $\text{Na}_v1.6$ na NAsc, onde é possível a visualização de processos marcados (setas) de 20 e 18 μm de extensão, respectivamente. Nodos de Ranvier são também bem marcados. A sobreposição das imagens em 12C e F, mostram que os processos são derivados dos somas indicados.

5.5 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL $\text{Na}_v1.6$ EM NEURÔNIOS DA FORMAÇÃO LOOSE DO NÚCLEO AMBÍGUO

A expressão do canal $\text{Nav}1.6$ foi também avaliada na formação *loose* do NA, onde se encontram os neurônios laríngeos (Figura 13). Os painéis A e D da figura 13 ilustram neurônios colinérgicos encontrados em secções distintas, mas ambos a 25 μm rostrais ao *calamus scriptorius*. Em 13A, o neurônio possui 434 μm^2 de ASS e em 13D de 467 μm^2 . Em 13B e E, são observados processos $\text{Na}_v1.6$ positivos (setas) que apresentam 16 e 18 μm de extensão de marcação, respectivamente. Nos painéis C e F, observa-se que os processos $\text{Nav}1.6$ positivos derivam do soma de neurônios ChAT-positivos.

Foi observada uma correlação entre a extensão de marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ e a ASS dos neurônios dessa formação, ilustrada no gráfico em 13G. O coeficiente de correlação de 0,83 indica positividade, enquanto o $p \leq 0,05$ indica resultado significativo nas células avaliadas ($n=5$).

Na formação *loose* do NA, da mesma forma como descrito anteriormente para a formação compacta, a expressão do canal $\text{Na}_v1.6$ foi avaliada por um segundo anticorpo anti- $\text{Na}_v1.6$ (policlonal, Alomone) sendo obtido um mesmo padrão de marcação encontrado para o anticorpo anti- $\text{Na}_v1.6$ monoclonal acima descrito. Esses resultados, bem como aqueles obtidos na formação compacta, são também mostrados no apêndice B.

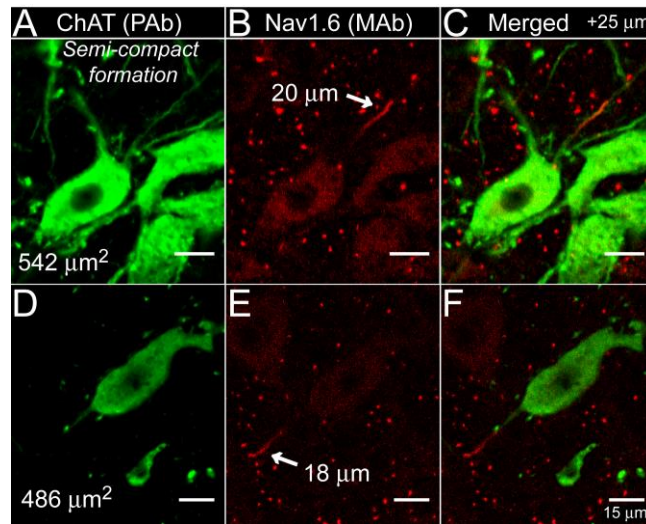


Figura 12- Expressão do canal para sódio $\text{Na}_v1.6$ em neurônios da formação semi-compacta do NA. A e D, marcação anti-ChAT (PAb) neuronal com indicação da área de silhueta somática. B e E, marcação anti-Nav1.6 (MAb) em processos (setas) e nodos de Ranvier (marcação puntiforme). C e F, sobreposição das marcações anti-ChAT e anti-Nav1.6 evidenciando que os processos $\text{Na}_v1.6$ positivos são derivados do soma. A e B, projeções do tipo MIF de 4 secções confocais ($Z=1 \mu\text{m}$). D e E, projeções do tipo MIF de 3 secções confocais ($Z=1 \mu\text{m}$).

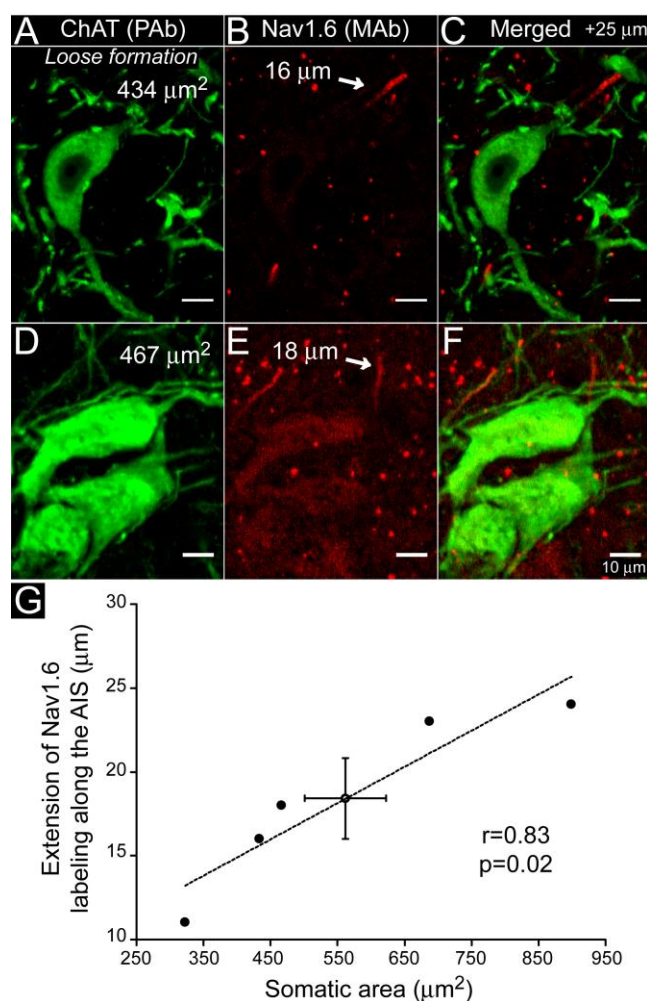


Figura 13- Expressão do canal para sódio Nav1.6 em neurônios da formação *loose* do NA. A e D, marcação anti-ChAT (PAb) com indicação da área de silhueta somática. B e E, marcação anti-Nav1.6 (MAb) em processos cujos comprimentos são indicados (setas) e em nodos de Ranvier (marcação puntiforme). C e F, sobreposição das marcações anti-ChAT e anti-Nav1.6 evidenciando que os processos são derivados do soma. A e B, projeções do tipo MIF de 3 secções confocais ($Z=1 \mu\text{m}$). D e E, projeções do tipo MIF de 7 secções confocais ($Z=1 \mu\text{m}$). G, relação entre a área de silhueta somática e a extensão da marcação anti-Nav1.6 ao longo dos processos derivados do soma ($n=5$).

5.6 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL PARA SÓDIO APÓS RESSECÇÃO DO NERVO LARÍNGEO RECORRENTE

Com o objetivo de identificar, dentro da formação NAl, aqueles neurônios que projetam pelo nervo laríngeo recorrente, foram realizados experimentos de ressecção desse nervo na tentativa de induzir a expressão do marcador nuclear de lesão neuronal ATF-3 no neurônio axotomizado. A figura 14 ilustra o resultado dos experimentos de imunofluorescência de tripla marcação anti-ChAT, -ATF-3 e -Na_v1.6. A figura 14A apresenta uma visão panorâmica da formação *loose* do NA (60 µm rostral ao *calamus scriptorius*). Nos painéis 1 e 2 é mostrada em maior aumento a marcação anti-Na_v1.6 nas áreas delimitadas em 14A. Em ambos painéis podem ser observados processos Na_v1.6 positivos (setas). Em 1' e 2' a marcação anti-ATF-3 indica o núcleo dos neurônios axotomizados (cabeças de setas). A sobreposição das marcações em 1" e 2" permite visualizar que os processos Na_v1.6 positivos e os núcleos ATF-3 positivos pertencem aos neurônios colinérgicos delimitados em 14A.

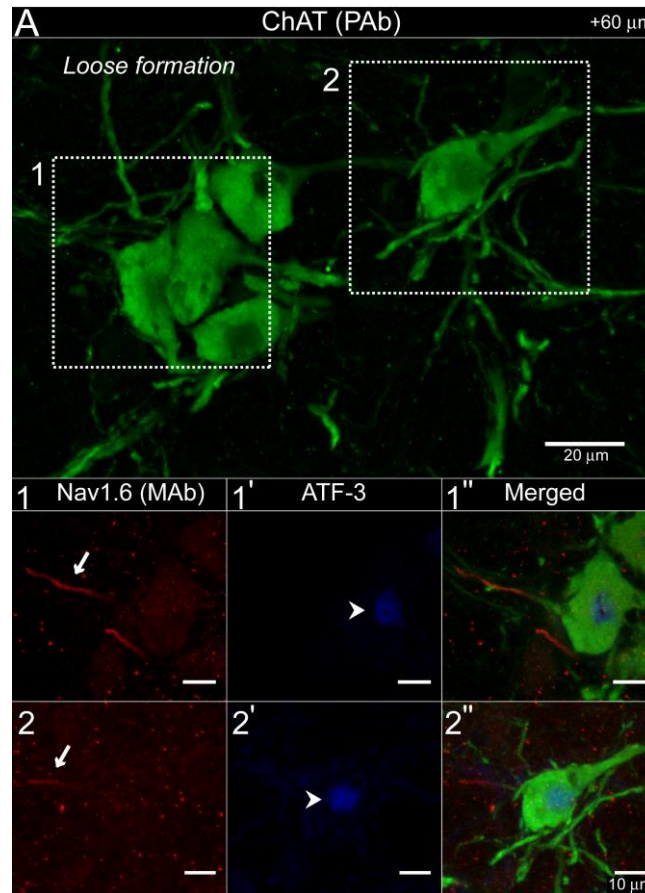


Figura 14- Neurônios da formação *loose* do NA (NAL), que projetam pelo nervo laríngeo recorrente, expressam o canal $\text{Na}_v1.6$. A, secção coronal do bulbo ao nível da NAL imunomarcada para ChAT (60 μm do *calamus scriptorius*). 1 e 2, neurônios das áreas delimitadas em A1 e A2, respectivamente, com expressão de $\text{Na}_v1.6$ em processos. 1' e 2', núcleos celulares imunorreativos para ATF-3 (cabeça de seta) dos neurônios delimitados em A1 e A2, respectivamente. 1'' e 2'' sobreposição das imagens ilustrando que o processos $\text{Na}_v1.6$ positivos derivam de neurônios colinérgicos e ATF-3 positivos. A, projeções do tipo MIF de 7 secções confocais ($Z = 1 \mu\text{m}$). 1: 5 secções confocais ($Z = 1 \mu\text{m}$). 1': 4 secções confocais ($Z = 1 \mu\text{m}$). 2: 6 secções confocais ($Z = 1 \mu\text{m}$). 2': 2 secções confocais ($Z = 1 \mu\text{m}$).

5.7 ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS CANAIS $Na_v1.1$ E $Na_v1.2$ EM NEURÔNIOS DO NÚCLEO AMBÍGUO

Foram realizados, em todos os níveis do NA, experimentos de imunofluorescência para as isoformas 1.1 e 1.2 do canal para sódio, uma vez que também são encontradas no sistema nervoso central. Para o canal $Na_v1.1$ foi usado um anticorpo monoclonal (Neuromab), mas não foi observada expressão desse canal nesse núcleo (dados não ilustrados), apesar de termos testado várias diluições para o anticorpo. A expressão do canal $Na_v1.2$ foi, sobretudo, observada na formação compacta com o uso do anticorpo policlonal (Alomone), como mostra a figura 15. Em 15A, é possível observar neurônios colinérgicos do NA rostral, onde estão presentes tanto a formação NAc quanto NAsc. No painel B é apresentada a marcação anti- $Na_v1.2$ na formação compacta do NA (área delimitada em A) evidenciando processos curtos imunopositivos. Em 15C, a sobreposição das marcações anti-ChAT e anti- $Na_v1.2$ permite observar claramente que os corpos celulares não foram marcados pelo anticorpo anti- $Na_v1.2$. Em 15D, o cerebelo, do mesmo corte ilustrado em A, apresenta expressão do canal $Na_v1.2$ em dendritos das células de Purkinje (PL) situados na camada molecular (ML) do cerebelo e em finas fibras, possivelmente fibras paralelas.

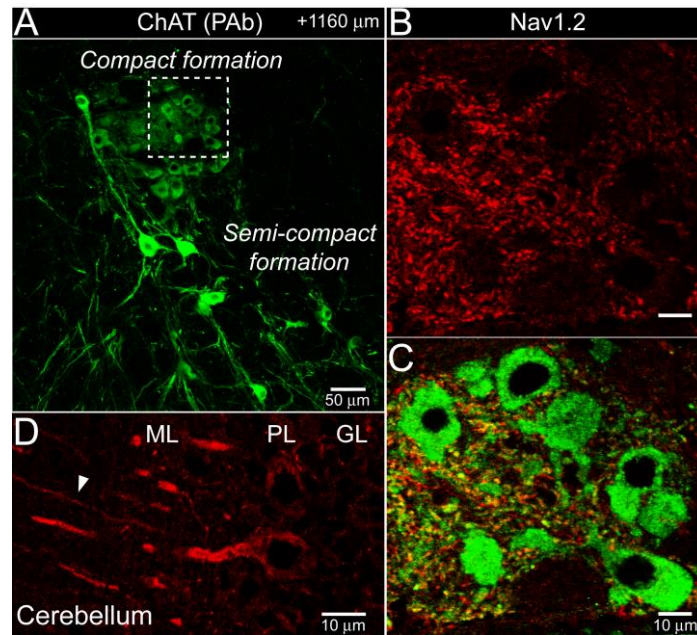


Figura 15- Expressão do canal para sódio $\text{Na}_v1.2$ na formação compacta do NA. **A**, visão panorâmica do NA ilustrando as formações compacta e semi-compacta a 1160 μm do *calamus scriptorius*. **B**, marcação anti- $\text{Na}_v1.2$ na formação compacta, correspondente à área delimitada em A (quadrado), em processos curtos, possivelmente dendritos. **C**, sobreposição das marcações anti- $\text{Na}_v1.2$ e ChAT, ilustrando colocalização. **D**, marcação anti- $\text{Na}_v1.2$ em dendritos da célula de Purkinje e fibras finas (provavelmente fibras paralelas, cabeça de seta). Marcação utilizada como controle positivo endógeno. ML camada molecular, PL camada de células de Purkinje, GL camada granular.

5.8 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO CANAL PARA SÓDIO NO NÚCLEO DORSAL MOTOR DO VAGO

Até o momento, foram observados padrões distintos de marcação anti-canais para sódio ao longo do núcleo ambíguo. Neurônios autonômicos desse núcleo apresentaram marcação anti-Nav1.7 enquanto neurônios da eferência visceral especial apresentaram marcação anti-Nav1.6. Considerando que o núcleo dorsal motor do vago (DMV) consiste basicamente de neurônios da eferência visceral geral (autonômicos), foram feitos experimentos buscando comprovar se, de fato, essa isoforma é expressa nesse tipo de neurônio, além de excluir a expressão de outras isoformas.

A figura 16 ilustra o resultado da expressão do canal Nav1.7 nos neurônios do DMV (25 µm rostral ao *calamus scriptorius*). Neurônios do DMV apresentaram uma marcação dendrítica, mas uma fraca marcação somática com o anticorpo policlonal anti-MAP-2 (16A). A marcação anti-Nav1.7 (MAb) foi detectada no corpo celular e também em processos de neurônios do DMV (e também no núcleo do trato solitário, NTS), como pode ser observado em 16B. A sobreposição dessas imagens é mostrada em 16C, onde se observa que processos Nav1.7 positivos não apresentaram marcação anti-MAP-2. Em 1', maior magnificação do neurônio delimitado em 16B, ilustra uma intensa marcação somática anti-Nav1.7 que se estende a um processo também imunorreativo. Em 1'', sobreposição da marcação anti-MAP-2 e anti-Nav1.7, é evidenciada com maior clareza a ausência de colocalização dessas marcações no processo neuronal Nav1.7 positivo.

O mesmo experimento foi repetido com anticorpos anti-MAP-2 monoclonal (Millipore) e anti-Nav1.7 policlonal (Millipore). Em D, a marcação anti-MAP-2 (MAb) permite observar neurônios do DMV e seus dendritos imunomarcados (50 µm rostral ao *calamus scriptorius*). Como nos experimentos realizados com o anticorpo anti-Nav1.7 monoclonal, foi observada novamente a expressão do Nav1.7 (PAb) no corpo celular de neurônios, como mostra 16E. A sobreposição das imagens indica colocalização das marcações anti-MAP-2 e anti-Nav1.7 no corpo celular de neurônios do DMV.

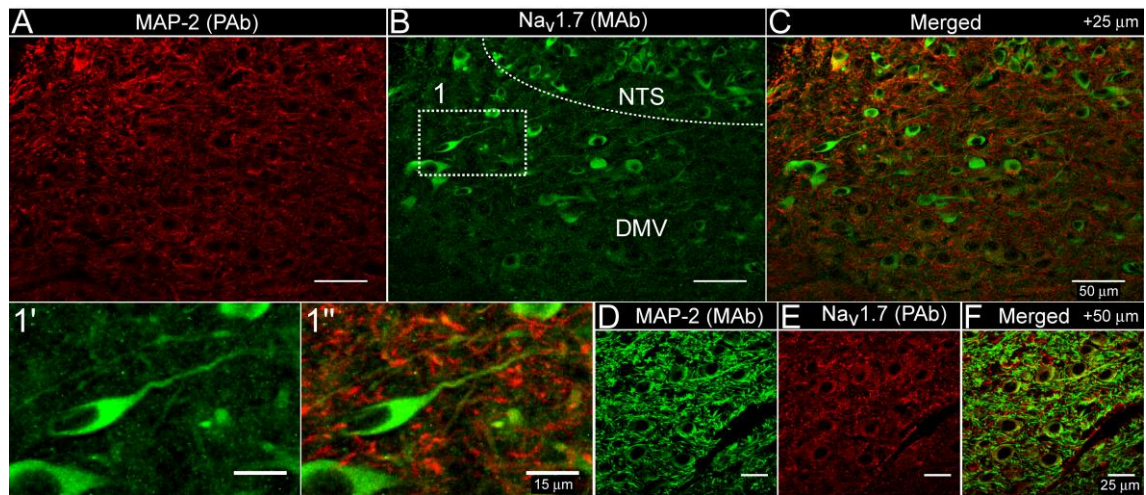


Figura 16- Expressão do canal para sódio $\text{Na}_v1.7$ em neurônios do DMV. **A**, marcação anti-MAP-2 (PAb) no DMV (25 μm do *calamus scriptorius*). **B**, marcação anti- $\text{Na}_v1.7$ (MAb) no DMV e NTS. **C**, sobreposição das marcações anti-MAP-2 e anti- $\text{Na}_v1.7$. A e B, projeções do tipo MIF de 3 secções confocais no eixo Z (1 μm). **1'**, neurônio $\text{Na}_v1.7$ -positivo delimitado em B. **1''**, sobreposição das marcações anti-MAP-2 e anti- $\text{Na}_v1.7$. **D**, marcação anti-MAP-2 (MAb) no DMV (50 μm do *calamus scriptorius*). **E**, marcação anti- $\text{Na}_v1.7$ (PAb) em neurônios do DMV. **F**, sobreposição das marcações anti-MAP-2 e anti- $\text{Na}_v1.7$. D e E, projeções do tipo MIF de 2 secções confocais no eixo Z (1 μm).

A figura 17 ilustra os resultados obtidos após experimentos de imunofluorescência de dupla marcação no núcleo dorsal motor do vago (DMV) utilizando os anticorpos anti-ChAT (MAb) e anti-Na_v1.6 (PAb). Em 16A, visão panorâmica da área dorsal de secção coronal do bulbo (25 µm rostral ao *calamus scriptorius*), na qual é possível observar neurônios ChAT-positivos do DMV e do núcleo hipoglosso (HN), e ainda o quarto ventrículo (4V). Em 17-1, dois neurônios pertencentes ao DMV (delimitados em 16A) imunorreativos para ChAT apresentando 185 e 207 µm² de ASS são mostrados em maior aumento. Em 17-1', está ilustrada uma clara ausência do canal Na_v1.6 nos neurônios do DMV. Observa-se também a ausência de nodos de Ranvier Na_v1.6 positivos nessa região. A sobreposição das imagens é ilustrada em 17-1'', onde só é vista a marcação anti-ChAT. 2 e 3, ilustram dois neurônios ChAT-positivos do HN, delimitados em 17A, apresentando 315 e 252 µm², respectivamente. O HN foi utilizado como controle positivo endógeno, juntamente como o cerebelo (dado não ilustrado) para os experimentos do Na_v1.6 no DMV. Em 17-2', um AIS imunorreativo para Na_v1.6 de 18 µm de extensão é ilustrado e em 2'', a sobreposição das imagens mostra que o AIS ilustrado pertence ao neurônio em 2. Outro AIS Na_v1.6-positivo é ilustrado em 3', apresentando 15 µm de extensão de marcação. Em 16-3'', a sobreposição das imagens anteriores mostra que o AIS ilustrado pertence ao neurônio ilustrado.

A expressão do canal Na_v1.6 no DMV foi também avaliada com o anticorpo monoclonal (Neuromab). Embora apresente uma marcação em neurônios do hipoglosso, neurônios do DMV também não apresentaram marcação anti-Na_v1.6 (Apêndice C). Assim como no núcleo ambíguo, foram realizados experimentos de imunofluorescência para as isoformas 1.1 e 1.2 do canal para sódio, mas não encontramos marcação para essas isoformas no DMV (resultados não ilustrados).

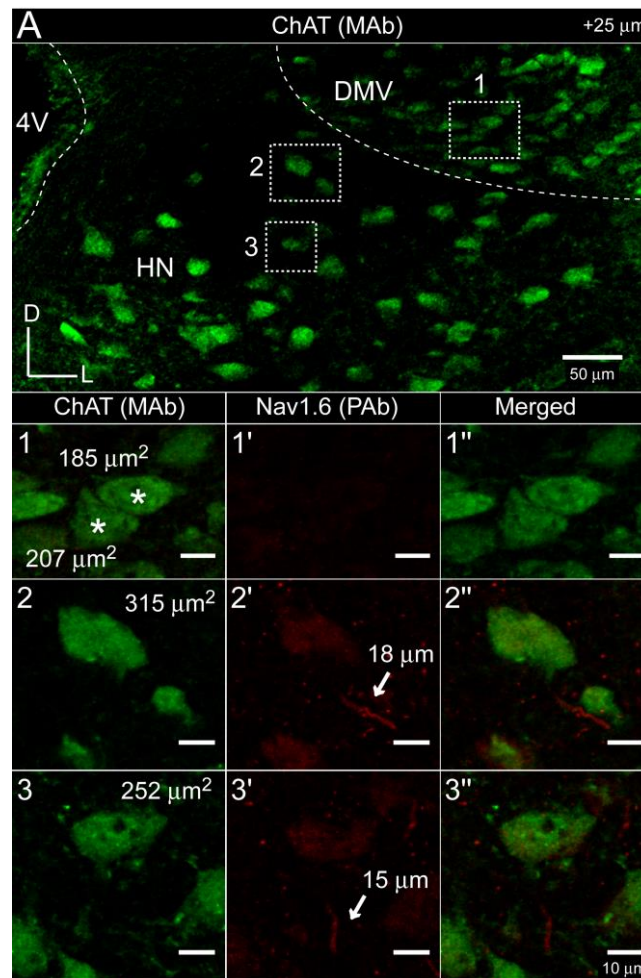


Figura 17- Ausência de marcação para $\text{Na}_v1.6$ (PAB) no núcleo Dorsal Motor do Vago (DMV). A, visão panorâmica da parte dorsal do bulbo imediatamente lateral e ventral ao quarto ventrículo marcada com anticorpo anti-ChAT (monoclonal) onde se observa os núcleos DMV e HN (25 μm do *calamus scriptorius*). 1, maior magnificação da área 1 delimitada em A com indicação da área de silhueta somática dos dois neurônios pertencentes ao núcleo DMV. 1', ausência de marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ no DMV. 1'', sobreposição das marcações anti-ChAT e anti- $\text{Na}_v1.6$. 1 e 1': projeções do tipo MIF de 3 secções confocais no eixo Z (0,8 μm). 2 e 3, maior magnificação das áreas 2 e 3 delimitadas em A com indicação das áreas de silhueta somáticas de neurônios colinérgicos pertencentes ao HN. 2' e 3', marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ positiva nos neurônios do HN em processos (setas) cujas extensões são indicadas. 2'' e 3'', sobreposição das marcações anti-ChAT e anti- $\text{Na}_v1.6$. 2 e 2': projeções do tipo MIF de 3 secções confocais no eixo Z (0,8 μm). 3 e 3': projeções do tipo MIF de 4 secções confocais no eixo Z (0,8 μm).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram uma identificação das isoformas de canais para sódio expressas em neurônios do núcleo ambíguo (NA) e do núcleo dorsal motor do vago (DMV) de ratos Wistar de 30 dias. Foi observada uma imunorreatividade anti-Nav1.7 somática que se estende a um processo deste derivado em neurônios da eferência visceral geral tanto do NA como do DMV (Figura 9, 10 e 16). Neurônios autonômicos pulmonares do NA, identificados pelo traçador retrógrado toxina colérica, exibiram uma marcação anti-Nav1.7 (Figura 8) corroborando a sugestão que neurônios autonômicos do NA expressam principalmente essa isoforma. Por outro lado, aqueles motoneurônios da eferência visceral especial do NA, que inervam músculos branquioméricos envolvidos com fonação e deglutição, apresentaram uma intensa marcação anti-Nav1.6 em processos derivados do soma (Figura 11, 12, 13). A comprovação de que neurônios Nav1.6 positivos do NA inervam a musculatura branquiomérica deriva dos experimentos de lesão de axônios no nervo laríngeo recorrente e imunopositividade para ATF-3, ChAT e Nav1.6 em experimentos de tripla marcação (Figura 14). A expressão do canal Nav1.6 não foi detectada, mesmo com o uso de diferentes anticorpos, em neurônios autonômicos do NA que inervam o pulmão ou do DMV. Ainda, na formação compacta do NA, foi detectada imunorreatividade anti-Nav1.2 em vários processos curtos da neurópila envolvendo o soma (Figura 15).

Ruggiero et al. (1990) mostraram que o anticorpo contra a enzima que sintetiza a acetilcolina, colina acetiltransferase (ChAT), delimita os núcleos NA e DMV e localiza os neurônios destes em secções do bulbo. Bieger & Hopkins (1987) realizaram experimentos em secções transversais, sagitais e coronais de ratos adultos e observaram que o maior diâmetro dos neurônios de todas as subdivisões foi encontrado no plano coronal. Jarvinen e Powley (1999) analisaram o número de neurônios presentes no NA em cortes do bulbo seccionados nos três planos possíveis e descreveram que o menor número de células foi encontrado em secções sagitais. Ademais, a maioria dos dendritos dos neurônios do NA da subdivisão dorsal são direcionados dorsomedial ou ventrolateralmente, à semelhança dos processos axonais (Ruggiero et al., 1990; Pascual-Font et al., 2011). Devido a essas descrições da literatura, optamos por realizar, em nossos experimentos cortes coronais do bulbo.

De acordo com a literatura, neurônios de cada formação possuem um maior diâmetro característico e estão localizados a distâncias específicas no eixo rostrocaudal de marcos anatômicos como o *calamus scriptorius* ou obex. Em ratos, a formação compacta, cujos neurônios inervam o esôfago e possuem cerca de 31 μm de maior diâmetro, se estende caudalmente (cerca de 1,5 mm) a partir do limite rostral do NA, próximo ao término caudal do núcleo facial. A formação semi-compacta, possui neurônios que inervam a faringe e o músculo cricotireóide. Os neurônios dessa formação se encontram entre 400 e 1700 μm rostral ao óbex e possuem de 35 a 45 μm de maior diâmetro. A formação *loose* é a subdivisão do NA que possui menor quantidade de neurônios e se estende entre -960 e +960 do óbex e projetam para a laringe. Esses neurônios possuem maior diâmetro entre 25 e 35 μm (Ruggiero et al., 1987; Lee et al., 1990; Haxhiu et al., 1993; Hadziefendic & Haxhiu, 1999; Broussard et al., 2000; Pascual-Font et al., 2011). Os neurônios imunomarcados com anti-ChAT foram divididos entre as formações de acordo com o maior diâmetro apresentado e distância rostrocaudal encontrados no bulbo.

Em nossos resultados, foi encontrada a expressão do canal $\text{Na}_v1.7$ tanto em neurônios pulmonares do NA, identificados com o traçador retrógrado, quanto em neurônios do DMV. Nos neurônios do DMV foi observada uma marcação somática que se estende ao longo de um processo (Figura 16), sem uma aparente mudança no sinal de imureatividade entre esses dois compartimentos neuronais. Alguns desses processos, como no neurônio mostrado em maior magnificação na figura 16-1 apresentam um rápido afunilamento. Um estudo sobre a morfologia axonal feito em neurônios autonômicos parassimpáticos da medula sacral (Morgan CW, 2002) mostrou que em alguns desses neurônios o axônio surge diretamente do soma (3 de 24 neurônios), mas na maioria dos neurônios (21 de 24) o axônio surge de um dendrito. Para ambos os tipos de derivação, o segmento que apresenta um rápido afunilamento foi definido pelos autores como o segmento inicial do axônio (AIS). Após o término desse AIS, cuja extensão variou de 15 a 40 μm (média de 26,8 μm), segue o axônio. Nesses neurônios mielinização axonal parece se iniciar em distâncias variáveis, ou seja, após o AIS, o axônio segue amielinizado por distâncias entre 59 e 630 μm . Poder-se-à sugerir que, em neurônios do DMV, como mostrado na Figura 16-1, que o segmento $\text{Na}_v1.7$ positivo derivado do soma e que se afunila rapidamente, seja um AIS. Para esses neurônios do

DMV, ocorreria a expressão do canal Na_v1.7 tanto no soma quanto no segmento inicial, sem uma diferença na densidade do canal nesses dois compartimentos.

Naqueles neurônios Na_v1.7 positivos do NA (Figuras 9 e 10), especialmente naqueles identificados como autonômicos pulmonares (Figura 8) foram observados segmentos Na_v1.7 positivos derivados do soma, mas com uma aparente maior expressão desse canal nesse segmento quando comparado ao soma (Figura 10). Verifica-se no início desse processo, próximo ao soma, uma relativa baixa imunorreatividade comparada à parte distal desse segmento. Assim, parece existir nesses neurônios autonômicos do NA uma compartimentalização da expressão do canal Na_v1.7. Nesse processo, foi observada correlação positiva significativa entre a área de silhueta somática e a extensão da marcação anti-Na_v1.7 (Figura 10). Nesses segmentos, a marcação anti-Na_v1.7 termina abruptamente em sua extremidade distal, como se a partir de um certo ponto iniciasse a mielinização. Essas características guardam semelhanças àquelas descritas para os segmentos iniciais de axônios (Kole et al., 2008; Hu et al., 2009; Kole & Stuart, 2012).

Tal segregação do canal Na_v1.7 ao AIS não está descrita na literatura, embora exista para o canal Na_v1.6. Naqueles AIS nos quais o canal Na_v1.6 encontra-se em alta densidade, o acúmulo desse canal na membrana plasmática parece depender de interações com proteínas que formam uma ligação ao citoesqueleto, entre elas a anquirina-G (Hedstrom et al., 2007; Ogawa, Rasband, 2008). Experimentos objetivando detectar essa proteína nesse processo axonal de neurônios autonômicos do NA (e.g. tripla marcação anti-ChAT, -Na_v1.7 e -anquirina-G) não foram realizados até o presente momento devido ao fato que, tanto o anticorpo anti-Na_v1.7 que marcou tais segmentos quanto o anticorpo anti-anquirina-G (Ank-G), disponível no laboratório, são monoclonais e ainda do mesmo isotipo (IgG1). Caso isto seja confirmado, trata-se de dado inédito na literatura, mas não inesperado, considerando que a provável sequência de interação entre Ank-G e canais para sódio está presente também no canal Na_v1.7 (Gasser et al., 2012).

Dessa forma, os dados sugerem que os neurônios autonômicos do DMV e aqueles do NA apresentam padrão diferente de distribuição do canal Na_v1.7 nos diferentes compartimentos neuronais (soma e AIS), mas ambos expressam esse canal. É importante salientar que Morinville et al., (2007) mostraram a expressão do canal Na_v1.7 no núcleo ambíguo e no núcleo dorsal motor do vago. Tais autores não

avaliaram quais neurônios desses núcleos expressam esse canal, tampouco estudaram a localização subcelular ou a presença de outras isoformas (e.g. $\text{Na}_v1.6$) nesses neurônios.

Em relação à mielinização McAllen e Spyer (1978) mostraram que em gatos uma população de neurônios do NA apresenta axônios com pouca mielina, correspondentes às fibras do tipo B, e que esses neurônios estão relacionados à inervação pulmonar. Nos neurônios do DMV dessa mesma espécie, foi observado que os axônios não possuem mielina, sendo fibras do tipo C (Ford et al., 1990). É importante salientar que esses autores mostraram que neurônios do DMV não projetam apenas pelo vago subdiafragmático para inervar vísceras abdominais, mas também enviam fibras amielinizadas que inervam o pulmão e também o coração. Em ratos, Cheng e Powley (1999, 2000) mostraram que neurônios pré-ganglionares vagais cardíacos do NA enviam fibras mais calibrosas do que as fibras enviadas pelos neurônios do DMV. Esses autores sugerem que as fibras autonômicas cardíacas oriundas do NA sejam mielinizadas do tipo B e as do DMV do tipo C, o que vai de acordo com os resultados de Jones et al. (1995; 1998). Assim, pode ser sugerido que o término abrupto da imunorreatividade anti- $\text{Na}_v1.7$ na parte distal do AIS de neurônios do NA seja devido ao início da mielinização.

Vários estudos fizeram uso de traçadores retrógrados para localização das células de interesse no sistema nervoso central. Os neurônios dos núcleos avaliados nesse estudo inervam diversos órgãos. Além disso, o NA possui neurônios eferentes viscerais especiais e gerais próximos, numa mesma formação, e, dessa forma, faz-se necessário o uso de traçador retrógrado para localizar com exatidão o neurônio a ser estudado. Alguns traçadores foram muito utilizados nos últimos tempos, como DiI Fluorogold e CTb (Corbett et al., 2003). No entanto, o traçador CTb é mais eficiente quando seguido de reações de imunofluorescência do que o traçador DiI, pois seu transporte ocorre mais rapidamente e sua marcação não é perdida quando realizada a permeabilização de secções histológicas utilizando soluções que contêm detergente, como o Triton utilizado em nossos experimentos (Corbett et al., 2003). Os dados obtidos reforçam a CTb como uma importante ferramenta na identificação neuronal por transporte retrógrado, visto que, foi obtido um forte sinal no soma três dias após a injeção intrapulmonar que permaneceu após o término da reação de imunofluorescência.

Após a injeção de traçador retrógrado no lobo superior do pulmão foram encontrados neurônios marcados no DMV, além do NA, tanto em gatos (Kalia e

Mesulam, 1980) quanto em ratos (Pérez Fontán et al., 2000). Em nossos experimentos só encontramos marcação no NA, corroborando resultados dos experimentos realizados em ratos por Hadziefendic & Haxhiu (1999). Além disso, Hadziefendic e Haxhiu (1999) encontraram também neurônios no NA ventral, referindo-se à formação externa, após injeção de traçador CTb no pulmão. No entanto, em nossos experimentos foram observados neurônios CTb positivos somente na formação compacta (NAc). Essa última variação pode ser consequência de diferenças tanto no volume de traçador aplicado como local exato de aplicação no pulmão.

Em nossos experimentos, foi observada marcação de CTb tanto ipsilateral quanto contralateral no bulbo, mas este último apresentou número consideravelmente menor de células (dado não ilustrado). Pérez Fontán et al. (2000) também encontraram marcação bilateral após injeção de CTb no pulmão de ratos e também com menor número de células no NA do lado contralateral, corroborando os dados obtidos no presente trabalho. Os autores sugerem que algumas fibras decussam a nível torácico. Nesse trabalho foi realizada toracotomia para aplicação de CTb, enquanto em nossos experimentos optamos por não utilizar o método cirúrgico. Os dados obtidos em ambos os experimentos foram semelhantes, sugerindo que o método utilizado em nosso trabalho é tão eficaz quanto o utilizado pelos outros autores. Importante salientar que todos os neurônios eferentes do NA marcados com CTb após injeção no pulmão foram positivos para ChAT (Kohn et al., 2009).

Estudos utilizaram vagotomia como modelo de degeneração já que o nervo vago é de fácil acesso e tem ramos bem caracterizados (Flumerfelt et al., 1986). Esse procedimento foi também utilizado para localização de corpos celulares de neurônios no NA e DMV (Lawn, 1966; Lewis et al., 1970). Em nosso trabalho, tentou-se fazer um resgate da utilização de lesão periférica de nervo para localização neuronal empregando marcadores de lesão neuronal. Nesse sentido, Tsujino et al. (2000) mostraram em ratos que neurônios do DRG expressam o fator de transcrição ATF-3 após a axotomia. ATF-3 é um fator de transcrição expresso em neurônios após lesão nervosa que parece estar envolvido com a regeneração de axonal.

Outros marcadores de lesão neuronal foram também utilizados. Por exemplo, Uno et al. (2003) transeccionaram o nervo laríngeo recorrente de ratos e observaram que neurônios do NA expressam a proteína associada ao crescimento 43 (GAP-43), que tem papel importante no crescimento do axônio e modula formação de novas sinapses

(Benowitz & Routtenberg, 1997; Console-Bram et al., 1996). Hydman et al. (2005) resseccionaram o nervo laríngeo recorrente de ratos e observaram que não existe morte neuronal até um mês após a ressecção. Takaoka et al. (2009) realizaram estudos lesionando o nervo vago de ratos e observaram que neurônios do NA ipsilateral expressam nestina, proteína encontrada em neurônios imaturos (Hockfield and McKay, 1985; Beech et al., 2004; Zhao et al., 2014). Os resultados desses estudos sugerem que a axotomia leva o neurônio de volta a um estado imaturo, expressando proteínas encontradas em neurônios em desenvolvimento. Essa alteração na expressão gênica após a axotomia pode envolver também canais iônicos, como foi demonstrado em neurônios sensoriais do DRG (Flake et al., 2004; Abdulla e Fuad, 2002). Entretanto, acreditamos que no decurso temporal de três dias ocorram apenas pequenas mudanças plásticas, de modo que a presença do canal $Na_v1.6$ no AIS dos motoneurônios axotomizados deva refletir a condição normal.

A laringe desempenha papel importante na respiração e na fonação. É innervada pelos ramos vagais laríngeo recorrente (RLN) e laríngeo superior (SLN) (Sasaki, 2006; Morrison, 1952). O SLN contém fibras eferentes viscerais especiais, eferentes viscerais gerais e aferentes viscerais gerais, enquanto o RLN contém exclusivamente fibras eferentes viscerais especiais que projetam a partir do ambíguo. Portanto, os motoneurônios laríngeos cujas fibras constituem o SLN são as responsáveis pela innervação da mucosa e do músculo cricotireóide, sendo encontrados na formação semi-compacta do NA. O RLN contém fibras oriundas de neurônios localizados na formação loose do NA, responsáveis pela innervação da musculatura intrínseca da laringe (Pascual-Font et al., 2011). Esses autores mostraram que após aplicação de traçador retrógrado no RLN seccionado foram encontrados neurônios marcados ipsilateralmente, resultado que corrobora os encontrados nesse trabalho, uma vez que neurônios ATF-3 positivos foram encontrados somente do mesmo lado do nervo que sofreu a ressecção.

Além de neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal, a expressão do canal $Na_v1.7$ canal foi mostrada também em neurônios pós-ganglionares do simpático no gânglio cervical superior (SCG) (Toledo-Aral et al., 1997; Rush et al., 2006; Morinville et al., 2007). Corroborando os experimentos bioquímicos que indicam a localização desses neurônios no DRG e SCG, diversos dados da literatura indicam uma relação entre mutações no gene codificador do canal $Na_v1.7$ e neuropatias periféricas (Cox et al., 2006, Goldberg et al., 2007; Ahmad et al., 2007; Dib-Hajj et al., 2007). Nesse

sentido, Yuan et al. (2013) mostraram uma mutação desse gene que causa neuropatia sensorial, com perda da percepção de temperatura e dor e disautonomia (hipoidrose) entre outros sintomas como hiposmia, perda auditiva e hipogeusia. Faber et al. (2012) mostraram que pacientes com mutações nesse canal podem apresentar palpitação, hipotensão ortostática, boca e olhos secos, alterações visuais, constipação alternada com diarreia e hiperidrose. Dessa forma, é possível estabelecer uma ligação entre a localização do canal $Na_v1.7$ no DRG e SCG, mutações genéticas (com ganho ou perda da função do canal) e alguns sintomas observados em pacientes. Entretanto, não encontramos nos relatos pesquisados, sintomas que associem, de um modo inequívoco, mutações no canal $Na_v1.7$ e disfunção autonômica mediada pela alteração da função de neurônios do NA e DMV.

No que diz respeito às propriedades elétricas das isoformas estudadas do canal de sódio dependente de voltagem, sabe-se que a não expressão do $Na_v1.7$ acarreta em redução da excitabilidade neuronal e bloqueio de condução da corrente (Muroi et al., 2011) enquanto a não expressão do canal 1.6 não é compatível com a vida (Meisler et al., 2001). Existem ainda relatos de que o $Na_v1.6$ possui ativação rápida e o $Na_v1.7$ possui ativação lenta, do tipo rampa, onde existe uma somação espacial de potenciais pós-sinápticos excitatórios para que o limiar seja atingido e o potencial de ação seja disparado (Cummins et al., 1998; Herzog et al., 2003). Em relação ao desenvolvimento da inativação, as isoformas 1.7 e 1.6 também diferem, uma vez que a inativação da isoforma 1.7 ocorre de forma lenta e a 1.6 de forma rápida (Cummins et al., 1998; Herzog et al., 2003). Sendo assim, é possível elucidar a hipótese de que o $Na_v1.7$ existiria em neurônios cuja integração com outros sistemas é vasta, já que necessita de mais de um estímulo para gerar o potencial de ação, e que não dependa de funcionamento rápido já que possui ativação e inativação lentas, caso dos neurônios autonômicos encontrados no NA e DMV e corrobora o resultado encontrado. O $Na_v1.6$ existiria então em neurônios de funcionamento rápido e sua ausência impossibilitaria a sobrevivência, caso dos neurônios da eferência visceral especial do NA que são responsáveis inclusive pela deglutição e também corrobora com o resultado encontrado no presente trabalho.

A expressão do canal $Na_v1.7$ no NA e DMV foi comprovada utilizando dois anticorpos distintos: monoclonal (MAb, Neuromab) e policlonal (PAb, Millipore). Para esses anticorpos foi feito o controle da reação pela omissão do anticorpo primário

(resultados não mostrados). Não foram observados indícios de marcação inespecífica com o uso desses anticorpos. Um terceiro anticorpo utilizado, anti-Nav1.7 policlonal (Alomone), apresentou indícios de marcação inespecífica (apêndice A). Amostras de um lote diferente não foram obtidas e testadas até o presente momento. Essa última experimentação sugerida é de grande importância dado que esse anticorpo marcou neurônios do DRG de ratos (Qu et al., 2013; Mukai et al., 2014; Sadamasu et al., 2014) e camundongos (Amaya et al., 2006).

Em relação à utilização do anticorpo anti-Nav1.7 monoclonal (MAb, Neuromab), a expressão do canal Nav1.7 foi ilustrada em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos (Yan et al., 2012; Ho et al., 2012; Dustrude et al., 2013; Liang et al., 2013) e células cancerígenas do pulmão de humanos (Campbell et al., 2013). O anticorpo anti-Nav1.7 policlonal (PAb, Millipore) foi utilizado na marcação de neurônios do DRG de ratos (Toledo-Aral et al., 1997).

Os nossos dados mostraram vários segmentos derivados do soma Nav1.6 positivos em neurônios colinérgicos do NA e uma baixa ou ausência de expressão desse canal Nav1.6 no soma. Esse padrão de marcação foi obtido tanto com o anticorpo anti-Nav1.6 MAb quanto pelo PAb. Essa marcação foi observada nas formações compacta (Figura 11), semi-compacta (Figura 12) e *loose* (Figura 13). Foi observada uma relativa baixa imunorreatividade no início desse processo comparada à parte distal desse segmento, e é observado ainda que, neste local, a marcação anti-Nav1.6 termina abruptamente. Nas formações compacta e *loose* foi observado que existe correlação positiva significativa entre a área de silhueta somática e a extensão da marcação anti-Nav1.6 (Figuras 11 e 13). Acreditamos que essa correlação também exista na formação semi-compacta, em se tratando também de neurônios da eferência visceral especial, mas ainda não foi obtido n de células com processos Nav1.6 positivos suficientes para realização desta análise. Esse processo derivado do soma e Nav1.6 positivo corresponde, à luz da literatura, ao segmento inicial do axônio (AIS). Para confirmação dessa hipótese, serão realizados experimentos de imunofluorescência de dupla marcação utilizando anticorpos anti-Nav1.6 e anti-Ank-G.

O AIS é uma estrutura localizada na parte proximal do axônio, entre o cone de implantação e a bainha de mielina que apresenta microtúbulos arranjados em fascículos originados do cone de implantação (Palay et al., 1968; Clark et al., 2009). De acordo com alguns autores, a organização de proteínas na membrana do AIS depende

especificamente do citoesqueleto axonal e de proteínas de ancoragem como a Ank-G e espectrina β IV (Hedstrom et al., 2007; Ogawa e Rasband, 2008). Essas proteínas do citoesqueleto no AIS são importantes para o direcionamento e manutenção de proteínas como canais iônicos dependentes de voltagem no AIS (Susuki e Rasband, 2008). Foi demonstrada a presença de Ank-G e espectrina β IV durante a maturação do AIS neuronal e acredita-se que a ank-G seja a responsável pela coordenação da formação do AIS (Jenkins e Bennett, 2001).

A expressão do canal $\text{Nav}1.6$ no NA e DMV foi avaliada utilizando dois anticorpos distintos, o anti- $\text{Nav}1.6$ policlonal (PAb, Alomone) e - $\text{Nav}1.6$ monoclonal (MAb, Neuromab). O anticorpo mais utilizado nos experimentos foi o MAb devido à quantidade disponível e melhor imunomarcação junto ao anticorpo anti-ChAT (PAb). Para esse anticorpo, foi possível fazer o controle da reação apenas pela omissão do anticorpo primário, enquanto para o anti- $\text{Nav}1.6$ (PAb) foi realizada tanto a omissão do primário quanto a pré-incubação com peptídeo antigênico (resultados não mostrados). Não foram observados indícios de marcação inespecífica com os anticorpos primários ou secundários.

A marcação dos canais $\text{Nav}1.6$ utilizando os anticorpos acima descritos foi observada em vários tipos celulares. O anticorpo policlonal (PAb, Alomone) foi utilizado em neurônios corticais piramidais (Royeck et al., 2008; Hu et al., 2009), células granulares do cerebelo (Osorio et al., 2005; Osorio et al., 2010), nodos de Ranvier do nervo ótico (Jenkins e Bennett, 2002) e também nos axônios encontrados na coluna dorsal da medula (Black et al., 2006). O segundo anticorpo anti- $\text{Nav}1.6$ (MAb, Neuromab) foi utilizado em culturas de neurônios do hipocampo (Pan et al., 2008) e do cerebelo (Osorio et al., 2010). Em nossos experimentos, ambos anticorpos marcaram o AIS de células de Purkinje do cerebelo similarmente ao descrito por outros autores (Jenkins e Bennett, 2001; Osorio et al., 2010) e, dessa forma, essa marcação cerebelar foi utilizada como controle positivo endógeno das reações de imunofluorescência. O padrão de marcação obtido com os dois anticorpos foi semelhante. Os anticorpos mencionados reconhecem epítomos distintos no canal $\text{Nav}1.6$ (tabela 1).

O canal para sódio $\text{Nav}1.2$ é encontrado em fibras amielinizadas como, por exemplo, no axônio das células granulares do cerebelo (Schaller e Caldwell, 2003). Interessantemente, Osorio et al. (2010) mostraram que a expressão do canal $\text{Nav}1.2$ no AIS das células granulares reduz com o desenvolvimento pós-natal, ao passo que o

canal Na_v1.6 aumenta. No AIS das células ganglionares da retina, o Na_v1.2 é expresso durante o desenvolvimento embrionário, sendo substituído pelo canal Na_v1.6 quando atingem a maturação (Boiko et al., 2003). Assim, a expressão do canal Na_v1.2 no AIS e fibras amielinizadas é descrito na literatura enquanto sua presença em dendritos é pouco conhecida.

Nesse sentido, experimentos de imunofluorescência revelaram uma expressão de Na_v1.2 em processos curtos na formação compacta do NA (Figura 15). Nesses experimentos, utilizamos o cerebelo como controle endógeno positivo da reação, visto que esse canal está presente no AIS das células granulares, especialmente em animais mais jovens (Osorio et al., 2010). Até o presente momento não identificamos a origem desses processos, os quais poderiam ser dendritos, parte do AIS ou mesmo fibras de projeção para neurônios da formação compacta. Entretanto, os dendritos dos neurônios da NAc são processos curtos e confinados a ela (Altschuler et al., 1991; Bieger & Hopkins, 1990; Ruggiero et al., 1987; Fryszak et al., 1984; Shapiro & Miselis, 1985). Baseado nessa morfologia, pode-se sugerir que os processos curtos Na_v1.2 positivos encontrados na NAc sejam dendritos. Esse resultado poderá ser confirmado realizando reação de imunofluorescência com os anticorpos anti-Na_v1.2, anti-MAP-2 e anti-ChAT, experimento a ser realizado posteriormente, para publicação dos dados. Adicionalmente, será utilizado um segundo anticorpo anti-Na_v1.2 (MAb, Neuromab). Para o anticorpo PAb, utilizado em nossos experimentos, foram realizadas a omissão do anticorpo primário e a pré-incubação com peptídeo antigênico (resultados não mostrados). Não foram observados indícios de marcação inespecífica com o anticorpo primário ou secundário.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que existem pelo menos duas isoformas de canal para sódio dependente de voltagem (Na_v) na população neuronal heterogênea do NA de ratos de 30 dias, $\text{Na}_v1.6$ e $\text{Na}_v1.7$, e que as duas não coexistem em um mesmo neurônio. O canal $\text{Na}_v1.6$ foi encontrado no AIS de neurônios que apresentaram maior área de silhueta somática, enquanto o $\text{Na}_v1.7$ foi encontrado no soma e processos de neurônios de área de silhueta somática menor. O traçador retrógrado injetado no pulmão mostrou que os neurônios autonômicos possuem pequena área de silhueta somática e expressam a isoforma $\text{Na}_v1.7$. Os processos imunorreativos para essa isoforma não são imunorreativos para o marcador neuronal MAP-2 e a sua extensão mostrou correlação positiva com a área somática, sugerindo que sejam segmentos iniciais de axônios. Neurônios motores do nervo laríngeo recorrente apresentaram unicamente a expressão da isoforma $\text{Na}_v1.6$. O DMV apresentou expressão somente do $\text{Na}_v1.7$ no soma e processos de seus neurônios autonômicos, e assim como visto no NA, não colocalizaram com MAP-2 nas reações de imunofluorescência.

Os resultados encontrados sugerem que neurônios eferentes viscerais gerais do NA e DMV utilizam a isoforma $\text{Na}_v1.7$ como principal geradora de PA, enquanto neurônios viscerais especiais do NA expressam $\text{Na}_v1.6$.

REFERÊNCIAS

- Abdulla FA, Smith PA. Changes in Na(+) channel currents of rat dorsal root ganglion neurons following axotomy and axotomy-induced autotomy. *J Neurophysiol* 88(5):2518-29, 2002.
- Ahmad S, Dahllund L, Eriksson AB, Hellgren D, Karlsson U, Lund PE, Meijer IA, Meury L, Mills T, Moody A, Morinville A, Morten J, O'Donnell D, Raynoschek C, Salter H, Rouleau GA, Krupp JJ. A stop codon mutation in SCN9A causes lack of pain sensation. *Hum Mol Genet* 16(17):2114-21, 2007.
- Ahn H, Black JA, Zhao P, Tyrrell L, Waxman SG, Dib-Hajj SD. Nav1.7 is the predominant sodium channel in rodent olfactory sensory neurons. *Mol Pain* 7:32, 2011.
- Amaya F, Wang H, Costigan M, Allchorne AJ, Hatcher JP, Egerton J, Stean T, Morisset V, Grose D, Gunthorpe MJ, Chessell IP, Tate S, Green PJ, Woolf CJ. The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 26(50):12852-60, 2006.
- Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J, Smith A, Kerr BJ, McMahon SB, Boyce S, Hill R, Stanfa LC, Dickenson AH, Wood JN. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat Neurosci* 2(6):541-8, 1999.
- Altschuler SM, Bao XM, Miselis RR. Dendritic architecture of nucleus ambiguous motoneurons projecting to the upper alimentary tract in the rat. *J Comp Neurol* 309(3):402-14, 1991.
- Altschuler SM, Ferenci DA, Lynn RB, Miselis RR. Representation of the cecum in the lateral dorsal motor nucleus of the vagus nerve and commissural subnucleus of the nucleus tractus solitarius in rat. *J Comp Neurol* 304(2):261-74, 1991.
- Bao X, Wiedner EB, Altschuler SM. Transsynaptic localization of pharyngeal premotor neurons in rat. *Brain Research* 696(1-2):246-9, 1995.
- Baroni D, Moran O. Molecular differential expression of voltage-gated sodium channel α and β subunit mRNAs in five different mammalian cell lines. *J Bioenerg Biomembr* 43(6):729-38, 2011.
- Beckh S, Noda M, Lübbert H, Numa S. Differential regulation of three sodium channel Messenger RNAs in the rat central nervous system during development. *EMBO J* 8(12):3611-6, 1989.
- Beech RD, Cleary MA, Treolar HB, Eisch AJ, Harrist AV, Zhong W, Greer CA, Duman RS, Picciotto MR. Nestin promoter/enhancer directs transgene expression to precursors of adult generated periglomerular neurons. *J Comp Neurol* 475(1):128-41, 2004.

Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20(2):84-91, 1997.

Bieger D, Hopkins DA. Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. *J Comp Neurol* 262(4):546-62, 1987.

Black JA, Waxman SG, Smith KJ. Remyelination of dorsal column axons by endogenous Schwann cells restores the normal pattern of Nav1.6 and Nav1.2 at nodes of Ranvier. *Brain* 129: 1319-29, 2006.

Blankenship ML, Coyle DE, Baccei ML. Transcriptional expression of voltage-gated Na⁺ and voltage-independent K⁺ channels in the developing rat superficial dorsal horn. *Neuroscience* 231:305-14, 2013.

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.

Broussard DL, Altschuler SM. Brainstem viscerotopic organization of afferents and efferents involved in the control of swallowing. *Am J Med* 108(Suppl 4a):79S-86S, 2000.

Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10):5616-20, 2000.

Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26(1):13-25, 2000.

Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57(4):397-409, 2005.

Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, Doyle FJ III. Projections of the dorsal motor nucleus of the vagus to cardiac ganglia of rat atria: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol* 410:320-41, 1999.

Cheng Z, Powley TL. Nucleus ambiguous projections to cardiac ganglia rat atria: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol* 424:588-606, 2000.

Clark BD, Goldberg EM, Rudy B. Electrogenic tuning of the axon initial segment. *Neuroscientist* 15(6): 651-68, 2009.

Corbett EKA, Saha S, Deuchars J, McWilliam PN, Batten TFC. Ionotropic glutamate receptor subunit immunoreactivity of vagal preganglionic neurons projecting to the rat heart. *Autonomic Neurosci* 105(2):105-117 2003

Console-Bram LM, Fitzpatrick-McElligott SG, Mc-Elligott JG. Distribution of GAP-43 mRNA in the immature and adult cerebellum: a role for GAP-43 in cerebellar development and neuroplasticity. *Brain Research* 95(1):97-106, 1996.

Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444(7121):894-8, 2006.

Cummins TR, Howe JR, Waxman SG. Slow closed-state inactivation: a novel mechanism underlying ramp currents in cells expressing the hNE/PN1 sodium channel. *J Neurosci* 18(23):9607-19, 1998.

Dennison SJ, Merritt VE, Aprison MH, Felten DL. Redefinition of the location of the dorsal (motor) nucleus of the vagus in the rat. *Brain Res Bull* 6(1):77-81, 1981.

Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG. From genes to pain: Nav1.7 and human pain disorders. *Trends Neurosci* 30(11):555-63, 2007.

Dustrude ET, Wilson SM, Ju W, Xiao Y, Khanna R. CRMP2 protein SUMOylation modulates Nav1.7 channel trafficking. *J Biol Chem* 288(34):24316-31, 2013.

Estacion M, Yang Y, Dib-Hajj SD, Tyrrel L, Lin Z, Yang Y, Waxman SG. A new Nav1.7 mutation in an erythromelalgia patient. *Biochem Biophys Res Commun* 432(1):99-104, 2013.

Faber CG, Hoejimaekers JG, Ahn HS, Cheng X, Han C, Choi S, Estacion M, Lauria G, Vanhoutte EK, Gerrits MM, Dib-Hajj S, Drenth JP, Waxman SG, Merkies IS. Gain of function Nav1.7 mutations in idiopathic small fiber neuropathy. *Ann Neurol* 71(1):26-39, 2012.

Felts PA, Yokohama S, Dib-Hajj S, Black JA, Waxman SG. Sodium channel α -subunit mRNAs I, II, III, NaG, Na6 and hNE (PN1) different expression patterns in developing rat nervous system. *Mol Brain Res* 45(1):71-82, 1997.

Flake NM, Lancaster E, Weinreich D, Gold MS. Absence of an association between axotomy-induced changes in sodium currents and excitability in DRG neurons from the adult rat. *Pain* 109(3):471-80.

Flumerfelt BA, Kiernan JA, Krcek JP, Sholdice J. Reinnervation of skeletal muscle in the tongue by preganglionic parasympathetic vagal neurons. *J Anat* 146:117-30, 1986.

Fontán JJ, Diec CT, Velloff CR. Bilateral distribution of vagal motor and sensory nerve fibers in the rat's lungs and airways. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(2):R713-28, 2000.

Ford TW, Bennett JA, Kidd C, McWilliam PN. Neurones in the dorsal motor vagal nucleus of the cat with non-myelinated axons projecting to the heart and lungs. *Exp Physiol* 75(4):459-73, 1990.

Fox EA, Powley TL. Longitudinal columnar organization within the dorsal motor nucleus represents separate branches of the abdominal vagus. *Brain Research* 341(2):269-282, 1985.

Fryszak T, Zenker W, Kantner D. Afferent and efferent innervation of the rat esophagus. *Anat Embryol* 170(1):63-70, 1984.

Fukuoka T, Noguchi K. Comparative study of voltage-gated sodium channel α -subunits in non-overlapping four neuronal populations in the rat dorsal root ganglion. *Neurosci Res* 70(2):164-71, 2011.

Gasser A, Ho TS, Cheng X, Chang KJ, Waxman SG, Rasband MN, Dib-Hajj SD. An ankyrin-G-binding motif is necessary and sufficient for targeting Nav1.6 sodium channels to axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Neurosci* 32(21):7232-43, 2012.

Gautron L, Sakata I, Udit S, Zigman JM, Wood JN, Elmquist JK. Genetic tracing of Nav1.8-expressing vagal afferents in the mouse. *J Comp Neurol* 519(15):3085-101, 2011.

Geis GS, Wurster RD. Horseradish peroxidase localization of cardiac vagal preganglionic somata. *Brain Research* 182(1):19-30, 1980.

Gellens ME, George AL Jr, Chen LQ, Chanine M, Horn R, Barchi RL, Kallen RG. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(2):554-8, 1992.

Goldberg YP, MacFarlane J, MacDonald ML, Thompson J, Dube MP, Mattice M, Fraser R, Young C, Hossain S, Pape T, Payne B, Radomski C, Donaldson G, Cox J, Younghusband HB, Green R, Duff A, Boltshauser E, Grinspan GA, Dimon JH, Sibley BG, Andria G, Toscano E, Kerdraon J, Bowsher D, Pimstone SN, Samuels ME, Sherrington R, Hayden MR. *Clin Genet* 71(4):311-9, 2007.

Goldin AL, BArch RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28(2):365-8, 2000.

Hille B. Ion channels of excitable membranes 3^a ed. Sunderland: Sinauer associates 2001.

Hadziefendic S, Haxhiu MA. CNS innervation of vagal preganglionic neurons controlling peripheral airways: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus. *J Auton Nerv Syst* 76(2-3):135-45, 1999.

Hamilton RB, Norgren R. Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol* 222:560-577, 1984.

- Haxhiu MA, Jansen ASP, Cherniack NS, Lowey AD. CNS innervation of airway-related parasympathetic preganglionic neurons: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus. *Brain Research* 618(1):115-34, 1993.
- Haxhiu MA, Loewy AD. Central connections of the motor and sensory vagal systems innervating the trachea. *J Auton Nerv Syst* 57(1-2):49-56, 1996.
- Hedstrom KL, Ogawa Y, Rasband MN. Ankyrin-G is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J Cell Biol* 183(4):635-40, 2007.
- Herzog RI, Cummins TR, Ghassemi F, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Distinct repriming and closed-state inactivation kinetics of Nav1.6 and Nav1.7 sodium channels in mouse spinal sensory neurons. *J Physiol* 551(Pt 3):741-50, 2003.
- Ho C, O'Leary ME. Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci* 46(1):159-66, 2011.
- Ho C, Zhao J, Malinowski S, Chahine M, O'Leary ME. Differential expression of sodium channel β subunits in dorsal root ganglion sensory neurons. *J Biol Chem* 287(18):15044-53, 2012.
- Hockfield S, McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5(12):3310-28, 1985.
- Hodgdon KE, Hingtgen CM, Nicol GD. Dorsal root ganglia isolated from Nf1+/- mice exhibit increased levels of mRNA expression of voltage-dependent sodium channels. *Neuroscience* 206:237-44, 2012
- Holst MC, Kelly JB, Powley TL. Vagal preganglionic projections to the enteric nervous system characterized with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 381(1):81-100, 1997.
- Hydman J, Svensson M, Kuylensstierna R, Ohlsson M, Mattsson P. Neuronal survival and glial reactions after recurrent laryngeal nerve resection in the rat. *Laryngoscope* 115(4):619-24, 2005.
- Hu W, Tian C, Li T, Yang M, Hou H, Shu Y. Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci* 12(8):99-1002, 2009.
- Irnatén M, Wang J, Mendelowitz D. Firing properties of superior laryngeal neurons in the nucleus ambiguus in the rat. *Neurosci Lett* 303(1):1-4, 2001.
- Izzo PN, Deuchars J, Spyer KM. Localization of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the rat: immunocytochemical evidence of synaptic inputs containing 5-hydroxytryptamine. *J Comp Neurol* 327(4):572-83, 1993.

Jarnot M, Corbett AM. Immunolocalization of Nav1.2 channel subtypes in rat and cat brain and spinal cord with high affinity antibodies. *Brain Research* 1107(1):1-12, 2006.

Jarvinen MK, Powley TL. Dorsal motor nucleus of the vagus neurons: a multivariate taxonomy. *J Comp Neurol* 403(3):359-77, 1999.

Jenkins SM, Bennet V. Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *J Cell Biol* 155(5):739-46, 2001.

Jenkins SM, Bennett V. Developing nodes of Ranvier are defined by ankyrin-G clustering and are independent of paranodal axoglial adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4):2303-8, 2002.

Jiang C, Cummins TR, Haddad GG. Membrane ionic currents and properties of freshly dissociated rat brainstem neurons. *Exp Brain Res* 100(3):407-20.

Jones JFX, Wang Y, Jordan D. Heart rate responses to selective stimulation of cardiac vagal C fibres in anaesthetized cats, rats and rabbits. *J Physiol* 489:203-214, 1995.

Jones JFX, Wang Y, Jordan D. Activity of C fibre cardiac vagal efferents in anaesthetized cats and rats. *J Physiol* 507(3):869-880, 1998.

Jordan D. Central nervous pathways and control of the airways. *Respir Physiol* 125(1-2):67-81, 2001.

Kalia M, Mesulam MM. Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches. *J Comp Neurol* 193(2):467-508, 1980

Kalia M. Brain stem localization of vagal preganglionic neurons. *J Auton Nerv Syst* 3(2-4):451-81, 1981.

Kalia M, Sullivan JM. Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *J Comp Neurol* 211(3):248-65, 1982.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of neural science: Brain stem, reflexive behavior, and cranial nerves. 4^a ed. New York City: McGraw-Hill Companies, 2000.

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

Kole MH, Stuart GJ. Signal processing in the axon initial segment. *Neuron* 73(2):235-47, 2012.

Kohn AZ, Hoxha KV, Martin RJ, Haxhiu MA, Wilson CG, Mayer CA, Kc P. Developmental changes in the brainstem neurons regulating lower airway caliber. *Pediatr Res* 65(5):509-13, 2009.

Krzemien DM, Schaller KL, Levinson SR, Caldwell JH. Immunolocalization of sodium channel isoform NaCh6 in the nervous system. *J Comp Neurol* 420(1):70-83, 2000.

Lawn AM. The localization, in the nucleus ambiguus of the rabbit, of the cells of origin of motor nerve fibers in the glossopharyngeal nerve and various branches of the vagus nerve by means of retrograde degeneration. *J Comp Neurol* 127(2):293-306, 1966.

Lee BH, Lynn RB, Lee HS, Miselis RR, Altchuler SM. Calcitonin gene-related peptide in nucleus ambiguus motoneurons in rat: viscerotopic organization. *J Comp Neurol* 320(4):531-43, 1992.

Lewis PR, Scott JA, Navaratnam V. Localization in the dorsal motor nucleus of the vagus in the rat. *J Anat* 107(Pt2):197-208, 1970.

Liang L, Fan L, Tao B, Yaster M, Tao YX. Protein kinase C/Akt is required for complete Freund's adjuvant-induced upregulation of Nav1.7 and Nav1.8 in primary sensory neurons. *J Pain* 14(6):638-47, 2013.

Liao Z, Li ZS, Lu Y, Wang WZ. Microinjection of exogenous somatostatin in the dorsal vagal complex inhibits pancreatic secretion via somatostatin receptor-2 in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(3):G746-52, 2007.

Lorincz A, Nusser Z. Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci* 28(53):14329-40, 2008.

Loewy AD, Franklin MF, Haxhiu MA. CNS monoamine cell groups projecting to pancreatic vagal motor neurons: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus. *Brain Res* 638(1-2):248-60, 1994.

McAllen RM, Spyer KM. The origin of cardiac vagal efferent neurons in the medulla of the cat. *J Physiol* 244(1):82P-83P, 1975.

McAllen RM, Spyer KM. The location of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the medulla of the cat. *J Physiol* 258(1):187-204, 1978.

McLean JH, Hopkins DA. A light and electron microscopic study of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in the cat. *J Comp Neurol* 195(1):157-75, 1981.

Meisler MH, Kearney J, Escayg A, MacDonald BT, Sprunger LK. Sodium channel and neurological disease: insights from Scn8a mutations in the mouse. *Neuroscientist* 7(2):136-45, 2001.

Mendelowitz D. Firing properties of identified parasympathetic cardiac neurons in nucleus ambiguus. *Am J Physiol* 271(6 Pt 2):H2609-14, 1996.

- Mihalevich M, Neff RA, Mendelowitz D. Voltage-gated currents in identified parasympathetic cardiac neurons in the nucleus ambiguus. *Brain Research* 739(1-2):258-62, 1996.
- Morgan CW. Axons of sacral preganglionic neurons in the cat: I. Origin, initial segment, and myelination. *J Neurocytol* 30(6):523-44.
- Morrison LF. Recurrent laryngeal nerve paralysis: a revised conception based on the dissection of one hundred cadavers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 61(2):567-92, 1952.
- Morinville A, Fundin B, Meury L, Juréus A, Sandberg K, Krupp J, Ahmad S, O'Donnel D. Distribution of the voltage-gated sodium channel Na(v)1.7 in the rat: expression in the autonomic and endocrine systems. *J Comp Neurol* 504(6):680-9, 2007.
- Mukai M, Sakuma Y, Suzuki M, Orita S, Yamauchi K, Inoue G, Aoki Y, Ishikawa T, Miyagi M, Kamoda H, Kubota G, Oikawa Y, Inage K, Sainoh T, Sato J, Nakamura J, Takaso M, Toyone T, Takahashi K, Ohtori S. Evaluation of behavior and expression of Nav1.7 in dorsal root ganglia after sciatic nerve compression and application of nucleus pulposus in rats. *Eur Spine J* 23(2):463-8, 2014.
- Muroi Y, Ru F, Kollarik M, Canning BJ, Hughes SA, Walsh S, Sigg M, Carr MJ, Undem BJ. Selective silencing of Na(v)1.7 decreases excitability and conduction in vagal sensory neurons. *J Physiol* 589(Pt 23):5663-76, 2011.
- Narahashi T. Tetrodotoxin: a brief history. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 84(5):147-54, 2008.
- Nosaka S, Yamamoto T, Yasunaga K. Localization of vagal cardioinhibitory preganglionic neurons with rat brain stem. *J Comp Neurol* 186(1):79-92, 1979.
- Ogawa Y, Rasband MN. The functional organization and assembly of the axon initial segment. *Curr Opin Neurobiol* 18(3):307-13, 2008.
- Osorio N, Alcaraz G, Padilla F, Coste B, Delmas P, Crest M. Differential targeting and functional specialization of sodium channels in cultured cerebellar granule cells. *J Physiol* 569, 801–816, 2005.
- Osorio N, Cathala L, Meisler MH, Crest M, Magistretti J, Delmas P. Persistent Nav1.6 current at axon initial segments tunes spike timing of cerebellar granule cells. *J Physiol* 588.4 pp 651–669, 2010.
- Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM. The axon hillock and the initial segment. *J Cell Biol* 38:193-200, 1968.
- Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul J-Y, Cranstoun SD, Bennett MV, Scherer SS & Cooper EC. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and Nav channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 2006, 26, 2599-2613.

Pascual-Font A, Hernández-Morato I, McHanwell S, Vázquez T, Marañillo E, Sañudo J, Valderrama-Canales J. The central projections of the laryngeal nerves in the rat. *J Anat* 219(2):217-228, 2011.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5^a ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.

Pérez Fontán JJ, Diec CT, Velloff R. Bilateral distribution of vagal motor and sensory nerve fibers in the rat's lungs and airways. *Am J Physiol* 279:713-28, 2000.

Qu R, Tao J, Wang Y, Zhou Y, Wu G, Xiao Y, Hu CY, Jiang X, Xu GY. Neonatal colonic inflammation sensitizes voltage-gated Na(+) channels via upregulation of cystathionine b-synthetase expression in rat primary sensory neurons. *Am J Physiol* 304(9):G763-72, 2013.

Royeck M, Horstmann MT, Remy S, Reitze M, Yaari Y, Beck H. Role of Axonal Nav1.6 Sodium Channels in Action Potential Initiation of CA1 Pyramidal Neurons. *J Neurophysiol* 100(4):2361-80, 2008.

Ruggiero DA, Giuliano R, Anwar M, Stornetta R, Reis DJ. Anatomical substrates of cholinergic-autonomic regulation in the rat. *J Comp Neurol* 292(1):1-53, 1990.

Sadamasu A, Sakuma Y, Orita S, Yamauchi K, Inoue G, Aoki Y, Ishikawa T, Myiagi M, Kamoda H, Kubota G, Oikawa Y, Inage K, Sainoh T, Sato J, Nakamura J, Toyone T, Takahashi K, Ohtori S. Upregulation of Nav1.7 in dorsal root ganglia after intervertebral disc injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 39(7):E421-6, 2014.

Sah P, MacLachlan EM. Potassium currents contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons. *J Neurophysiol* 68(5):1834-41, 1992.

Sasaki CT (2006) Anatomy and development and physiology of the larynx. [Online]. Raj Goyal and Reza Shaker: GI Motility online. Available at: <http://www.nature.com/gimo/contents/pt1/full/gimo7.html>

Schaller KL, Caldwell JH. Expression and distribution of voltage-gated sodium channels in the cerebellum. *Cerebellum* 2(1):2-9, 2003.

Shapiro RE, Miselis RR. The central organization of the vagus nerve innervating the stomach of the rat. *J Comp Neurol* 238(4):473-88, 1985.

Takaoka T, Shiotani A, Saito K, Tomifuji M, Mori Y, Fujimine T, Okano H, Ogawa K. Neuronal re-juvenilization in the nucleus ambiguus after vagal nerve injury. *Neurosci Res* 65(4):353-9, 2009.

Toledo-Aral JJ, Moss BL, He ZJ, Koszowski AG, Whisenand T, Levinson SR, Wolf JJ, Silos-Santiago I, Halegoua S, Mandel G. Identification of PN1, a predominant voltage-gated sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(4):1527-32, 1997.

Van Wart A, Trimmer JS, Matthews G. Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol* 500(2):339-52, 2007.

Wang Y, Duan JH, Hingtgen CM, Nicol GD. Augmented sodium currents contribute to the enhanced excitability of small diameter capsaicin-sensitive sensory neurons isolated from Nf1^{+/-} mice. *J Neurophysiol* 103(4):2085-94, 2010.

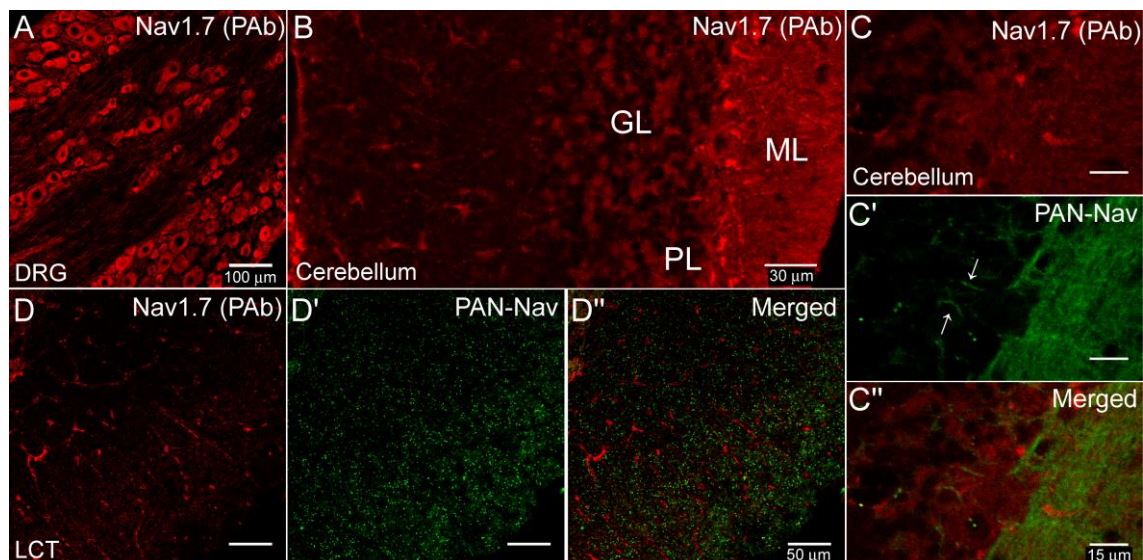
Yarom Y, Sugimori M, Llinás R. Ionic currents and firing patterns of mammalian vagal motoneurons in vitro. *Neuroscience* 16(4):358-62, 1985.

Yu FH, Catterall WA. The VGL-Chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* 253: re15, 2004.

Yuan J, Matsuura E, Higuchi Y, Nakamura T, Nozuma S, Sakiyama Y, Yoshimura A, Izumo S, Takashima H. Hereditary sensory and autonomic neuropathy type IID caused by a SCN9A mutation. *Neurology* 80(18):1641-9, 2013.

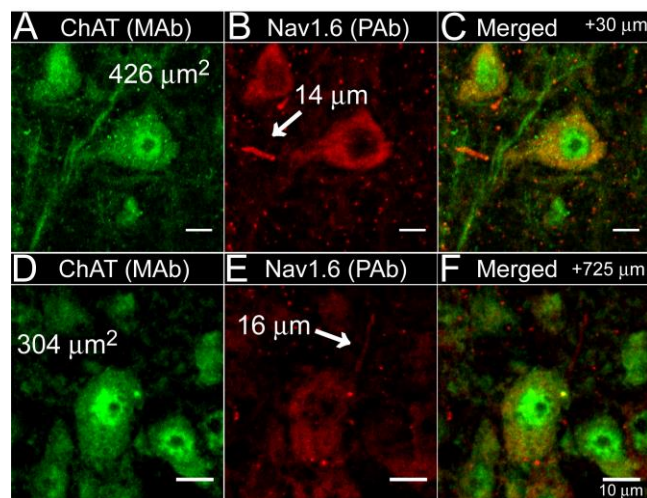
APÊNDICES

APÊNDICE A – IMUNOMARCAÇÃO OBTIDA COM O ANTICORPO ANTI-NAV1.7 (POLICLONAL, ALOMONE).



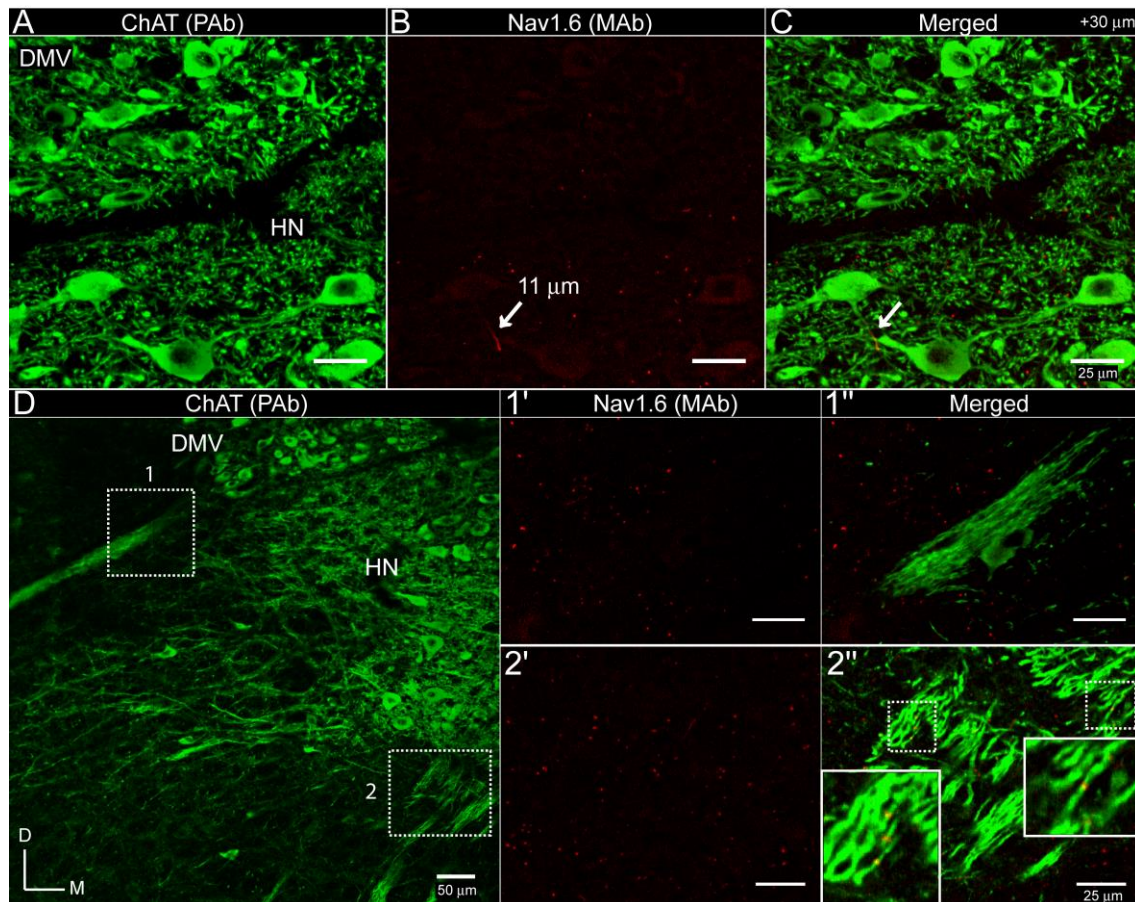
Ausência de colocalização das marcações anti-Nav1.7 (PAb) e anti-PAN-Nav. **A**, uma única secção confocal no eixo Z ilustrando a marcação para a proteína Nav1.7 no gânglio da raiz dorsal. **B**, ilustra a marcação anti-Nav1.7 encontrada no cerebelo, na camada molecular (ML), onde logo ao lado esquerdo observa-se a camada de células de Purkinje (PL) e mais à esquerda a camada granular (GL). **B**: projeção do tipo MIF de 4 secções confocais ($Z=0,8 \mu\text{m}$). **C**, uma maior magnificação da marcação anti-Nav1.7 no cerebelo de outro corte. **C'**: marcação anti-PAN-Nav, onde as setas indicam AIS de células de Purkinje. **C''**: sobreposição das marcações anti-Nav1.7 e anti-PAN-Nav, e ausência de colocalização. **C** e **C'**: projeções do tipo MIF de 2 secções confocais ($Z=0,8 \mu\text{m}$). **D**, marcação anti-Nav1.7 encontrada no trato corticoespinal lateral (LCT). **D'**: marcação anti-PAN-Nav no LCT. **D''**: sobreposição das marcações anti-Nav1.7 e anti-PAN-Nav, e ausência de colocalização. **D** e **D'**: projeções do tipo MIF de 2 secções confocais ($Z=0,8 \mu\text{m}$).

APÊNDICE B – ILUSTRAÇÃO DO RESULTADO DE EXPERIMENTOS REALIZADOS COM ANTICORPO $Na_v1.6$ (POLICLONAL, ALOMONE) EM NEURÔNIOS DO NÚCLEO AMBÍGUO



Análise da expressão do canal $Nav1.6$ (PAb) em neurônios do núcleo ambíguo. A e D, marcação anti-ChAT (MAB) de neurônios das formações loose e compacta, respectivamente. B e E, marcação anti- $Nav1.6$ (PAb) em processos (setas) com indicação da extensão de marcação e em nodos de Ranvier. C e F, sobreposição das marcações anti-ChAT e anti- $Nav1.6$ evidenciando que os processos $Nav1.6$ positivos são derivados do soma. A e B, projeções do tipo MIF de 5 secções confocais ($Z=1 \mu m$). D e E, projeções do tipo MIF de 5 secções confocais ($Z=0,8 \mu m$).

APÊNDICE C – ILUSTRAÇÃO DO RESULTADO DE EXPERIMENTOS REALIZADOS COM ANTICORPO $\text{Na}_v1.6$ (MONOCLONAL, NEUROMAB) EM NEURÔNIOS DO NÚCLEO DORSAL MOTOR DO VAGO



Análise da expressão do canal $\text{Nav}1.6$ (MAb) em neurônios do núcleo dorsal motor do vago (DMV). **A**, marcação anti-ChAT (PAb) no DMV e no HN. **B**, marcação anti- $\text{Na}_v1.6$ de processo no HN e nodos de Ranvier. **C**, sobreposição das marcações anti-ChAT e anti- $\text{Na}_v1.6$ (MAb). **A** e **B**, projeções do tipo MIF de X secções confocais ($Z=1,5 \mu\text{m}$). **D**, visão panorâmica da região dorsal do bulbo onde estão situados o DMV e o HN e seus tratos nas áreas delimitadas 1 e 2, respectivamente. **1'** e **2'**, maior aumento das áreas delimitadas em **D** marcadas com anti- $\text{Na}_v1.6$. **1''** e **2''**, sobreposição das marcações anti-ChAT e anti- $\text{Na}_v1.6$. *Insets*: em maior aumento, a sobreposição das marcações anti-ChAT e anti- $\text{Na}_v1.6$ mostra nodos de Ranvier nas fibras que emergem do HN, resultado não observado nas fibras do DMV.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROTOCOLO Nº 234 PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS – UFTM



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

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

Parecer Consubstanciado PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Caracterização dos canais para sódio voltagem dependentes em neurônios das distintas subdivisões do núcleo ambíguo.

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM: 25/05/2012

PROTOCOLO CEUA/UFTM: 234

de lágrimas vermelhas ao redor dos olhos e nariz podem ser observados (Manual de referência para reconhecimento e a lúvia de dor em animais de laboratório, 2009). Será administrado analgésico/antiinflamatório não esteroide (Meloxicam) no pré e pós-operatório e os sinais acima descritos observados. Será administrado também antibiótico (pentabiotico veterinário de pequeno porte) no pós-operatório para prevenção de infecção além dos cuidados de assepsia (Manual de referência para sobrevivência de animais submetidos à cirurgia).

6.DESCRICÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA AS PESSOAS ENVOLVIDAS NA PESQUISA

Risco de mordidas e de contaminação acidental com substâncias utilizadas nos procedimentos *in vivo*. Para evitar tais situações serão empregados equipamentos de proteção pessoal, tais como avental, luvas, máscara e óculos de proteção.

7.COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO

Bem escrito e bem fundamentado a pesquisa

PARECER DA CEUA: Aprovado em 24/05/2013

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

Prof. Guilherme Vannucchi Portari
Coordenador da CEUA