



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

Eduardo Henrique Tavares

**ATF-3 como marcador de lesão e de padrões topográficos em neurônios
autônômicos do núcleo dorsal motor do nervo vago após axotomia
periférica.**

Uberaba

2016

Eduardo Henrique Tavares

ATF-3 como marcador de lesão e de padrões topográficos em neurônios autonômicos do núcleo dorsal motor do nervo vago após axotomia periférica.

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

2016

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

T229a Tavares, Eduardo Henrique
ATF-3 como marcador de lesão e de padrões topográficos em neurônios
autônômicos do núcleo dorsal motor do nervo vago após axotomia periférica
/ Eduardo Henrique Tavares. -- 2016.
55 f. : il., fig., graf.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2016
Orientador: Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues

1. Sistema nervoso. 2. Nervo vago. 3. Núcleo mediodorsal do tálamo. 4.
Axotomia. 5. Fator 3 ativador da transcrição. I. Rodrigues, Aldo Rogelis
Aquiles. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 612.8

EDUARDO HENRIQUE TAVARES

ATF-3 como marcador de lesão e de padrões topográficos em neurônios autonômicos do núcleo dorsal motor do nervo vago após axotomia periférica.

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

Aprovado em: 21 de novembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues – Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Prof.^a Dr.^a Renata Graciele Zanon
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Prof. Dr. André Schwambach Vieira
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e abrir as oportunidades em minha vida.

Aos meus pais, Vardeci e Lucimar, pelo carinho, incentivo e apoio que foram imprescindíveis para que eu conseguisse iniciar e concluir essa etapa.

As minhas avós que já se foram, mas que sempre orgulhosamente me incentivaram.

A minha namorada Lara Lassi, por me encorajar e apoiar nos momentos mais difíceis.

Ao orientador Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues, pelos ensinamentos, discussões, e pelo companheirismo que foi dado ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva pela ajuda e suporte ao projeto.

Aos amigos Amanda Damasceno Brasileiro e Lívia Alves Martins pela ajuda e companheirismo durante a realização deste trabalho.

A todos os professores da Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, pelo esforço e comprometimento com a pesquisa.

À secretária Elizabete Perez Caramori Ambrósio, pelo carinho e principalmente pelo empenho dedicado no crescimento do programa.

Aos funcionários do departamento de Fisiologia: Angélica Cristina Alves, Glauco da Rocha Finholdt, Donizete Ponciano da Silva, Fausto dos Reis Silva e Lucas Felipe de Oliveira pelos cuidados com o biotério da disciplina de fisiologia e organização do laboratório.

Ao professor do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci por nos ceder um dos anticorpos utilizados (anti-nNOS).

A CAPES-Demanda Social pelo incentivo à pesquisa.

RESUMO

A distribuição topográfica dos neurônios eferentes vagais vem sendo estudada principalmente pelo uso de traçadores retrógrados aplicados aos segmentos específicos de órgãos ou parte proximal de nervos seccionados. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a expressão induzida de marcadores de lesão pode ser usada no estudo da distribuição e código químico no núcleo dorsal motor do nervo vago (DMV). Para este fim, ratos foram submetidos à secção de um dos três ramos do vago subdiafragmático anterior. Cinco dias após a axotomia os ratos foram perfundidos e reações de imunofluorescência realizadas para os marcadores de lesão: fator 3 ativador da transcrição (ATF-3), nestina e proteína 43 associada ao crescimento (GAP-43), bem como para marcadores neuronais: colina acetiltransferase (ChAT), tirosina hidroxilase (TH), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). A vagotomia periférica resultou em um rápido aumento na expressão de ATF-3, mas não de nestina ou GAP-43. Usando o traçador retrógrado toxina colérica subunidade β , foi estimado que $95,2 \pm 0,7\%$ dos neurônios do DMV respondem à vagotomia com um aumento na marcação anti-ATF-3. O número de neurônios que projetam pelos ramos gástrico anterior, hepático e acessório celíaco alcança um máximo nos níveis -33 , -3 e -121 μm , respectivamente. O ramo gástrico anterior está representado medialmente, o acessório celíaco lateralmente e o ramo hepático homogeneamente no DMV. A marcação anti-TH ocorreu exclusivamente em neurônios que projetam pelo ramo gástrico anterior. Foi observado um aumento significativo na porcentagem de neurônios nNOS positivos após axotomia. Dessa forma, a expressão induzida do ATF-3 é uma ferramenta útil na análise da distribuição de neurônios autonômicos não mielinizados.

Palavras-Chave: Núcleo dorsal motor do nervo vago; ATF-3; Axotomia

ABSTRACT

The topographical distribution of vagal efferent neurons has been studied mainly by the use of retrograde tracers applied to specific segments of organs or proximal part of severed nerves. The aim of this study was to evaluate whether the induced expression of lesion markers can be used to study the distribution and the chemical code of dorsal motor nucleus of vagus nerve (DMV). To this end, rats were submitted to section of one of the three branches of the anterior subdiaphragmatic vagus. Five days after axotomy, rats were perfused and immunofluorescence reactions performed for lesions markers: activating transcriptional factor 3 (ATF-3), nestin and Growth associated proteins 43 (GAP-43), as well as for neuronal markers: choline acetyltransferase (ChAT), tyrosine hydroxylase (TH) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Peripheral vagotomy resulted in a rapid increase in ATF-3 expression but not for nestin or GAP-43. Using the retrograde tracer choleric toxin β subunit it was estimated that $95.2 \pm 0.7\%$ of DMV neurons respond to vagotomy with an increase in anti-ATF-3 labeling. The anterior gastric, hepatic and accessory celiac branch neurons reached a maximum number at the level -33 , -3 and $-121 \mu\text{m}$, respectively. The anterior gastric branch is represented medially, the accessory celiac laterally and the hepatic branch homogeneously at DMV. The anti-TH labeling occurred exclusively in anterior gastric projecting neurons. It was observed a significant increase in the percentage of positive nNOS neurons after axotomy. Therefore, the induced expression of ATF-3 is a useful tool for analysis of distribution of unmyelinated autonomic neurons.

Keywords: Dorsal motor nucleus of vagus nerve; ATF-3; Axotomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação esquemática da distribuição anatômica geral do nervo vago em ratos.

Figura 2- Representação esquemática da distribuição anatômica subdiafragmática do nervo vago.

Figura 3- Diferentes modelos de sinalização retrógrada após lesão axonal.

Figura 4 – Imunomarcção para os marcadores de lesão neuronal após axotomia do ramo gástrico anterior.

Figura 5- Experimentos de dupla intervenção cirúrgica revelam uma robusta expressão de ATF-3 em neurônios do DMV após a axotomia do ramo vagal gástrico.

Figura 6- Distribuição de neurônios do ramo gástrico anterior baseado na imunomarcção anti-ATF-3.

Figura 7- Distribuição de neurônios do ramo acessório celíaco.

Figura 8- Distribuição de neurônios do ramo hepático.

Figura 9- Representação ipsi e contra-lateral no DMV de neurônios que projetam pelos ramos gástrico, hepático e acessório-celíaco.

Figura 10- Imunomarcção para tirosina hidroxilase no DMV após axotomia do ramo gástrico anterior.

Figura 11- Aumento substancial do número de neurônios nitrérgicos no DMV após axotomia vagal subdiafragmática.

Armstrong - Imunomarcção dos neurônios nitrérgicos no DMV em experimentos controle.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NV	Nervo Vago
NTS	Núcleo do trato solitário
NA	Núcleo Ambíguo
DMV	Núcleo dorsal motor do nervo vago
ATF-3	Fator 3 ativador da transcrição
GAP-43	Proteína 43 associada ao crescimento
CTb	Toxina Colérica Subunidade β
ChAT	Colina Acetiltransferase
TH	Tirosina Hidroxilase
nNOS	Óxido nítrico-sintase neuronal
MAPKs	Proteína quinase ativada por mitógeno
IEG	Genes de ativação imediata
LRF-1	Fator 1 regenerador do fígado
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CREB	Proteína de ligação responsiva ao elemento AMPC
bZIP	Zíper de Leucina Básica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervosos periférico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 ANATOMIA DO NERVO VAGO	8
1.2 NÚCLEOS DO NERVO VAGO.....	10
1.3 ORGANIZAÇÃO VICEROTÓPICA	14
1.4 MARCADORES DE LESÃO NEURONAL	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 E MARCAÇÃO RETRÓGRADA	21
4.3 PERFUSÃO E COLETA DE TECIDO.....	22
4.4 EXPERIMENTOS DE IMUNOMARCAÇÃO	23
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS A	51
APROVAÇÃO DO PROJETO NO CEUA–UFTM/346	51
ANEXOS B	52
APROVAÇÃO DO PROJETO NO CEUA–UFTM/303	52
.....	52
.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 ANATOMIA DO NERVO VAGO

O nervo vago (NV) deixa o crânio através do forame jugular e é formado por fibras eferentes e aferentes, com dominância próxima a 80% para o segundo tipo (Browning; Travagli, 2014). Imediatamente após passar por este forame o NV concentra grande quantidade de corpos celulares sensoriais localizados em dois gânglios (Berthoud; Neuhuber, 2000). O primeiro e mais proximal é denominado gânglio jugular, do qual saem os ramos cervicais: auricular e meníngeo. Estes ramos são responsáveis pela inervação sensorial da pele do meato acústico externo (ramo auricular) e da dura-máter da fossa craniana posterior (ramo meníngeo). O segundo é conhecido como gânglio nodoso e concentra a maior quantidade de corpos sensoriais e se localiza um pouco mais distal quando comparado ao primeiro gânglio. Nas proximidades desse gânglio, o vago emite o ramo faríngeo e um pouco mais abaixo o ramo laríngeo superior, como pode ser observado na figura 1 (Berthoud; Neuhuber, 2000).

O ramo cardíaco cervical se desprende do tronco principal também em sua região cervical, assim como o nervo depressor aórtico que contém principalmente fibras envolvidas com o barorreflexo. Já o nervo laríngeo recorrente deixa o tronco vagal no nível da artéria subclávia no lado direito e do arco aórtico no lado esquerdo, percorrendo uma grande distância até inervar o esôfago e a traquéia. Ainda na região torácica, o NV dá origem a fibras responsáveis pela inervação do pulmão e coração (Berthoud; Neuhuber, 2000).

Durante o desenvolvimento, o estômago sofre uma leve rotação que resulta em um cruzamento parcial entre os nervos vagos logo abaixo do diafragma, o que levou as diferentes nomenclaturas do vago subdiafragmático, sendo no abdômen o vago originado do lado esquerdo do crânio chamado de ventral, anterior ou vago subdiafragmático direito e o nervo derivado do lado direito chamado de dorsal, posterior ou vago subdiafragmático esquerdo (Norgren; Smith, 1988; Takayama; Ishikawa; Miura, 1982).

Durante seu trajeto sobre a superfície ventral do esôfago (Figura 2), o tronco vagal anterior dá origem a três ramos principais: hepático comum, acessório celíaco e a ao ramo gástrico anterior, que se divide e se distribui sobre a superfície ventral do estômago (Berthoud; Neuhuber, 2000; Legros; Charles; Griffith, 1969; Nanobashvili et al., 1994; Norgren; Smith, 1988; Powley et al., 1983; Precht; Powley, 1985; Smith; Jerome, 1983).

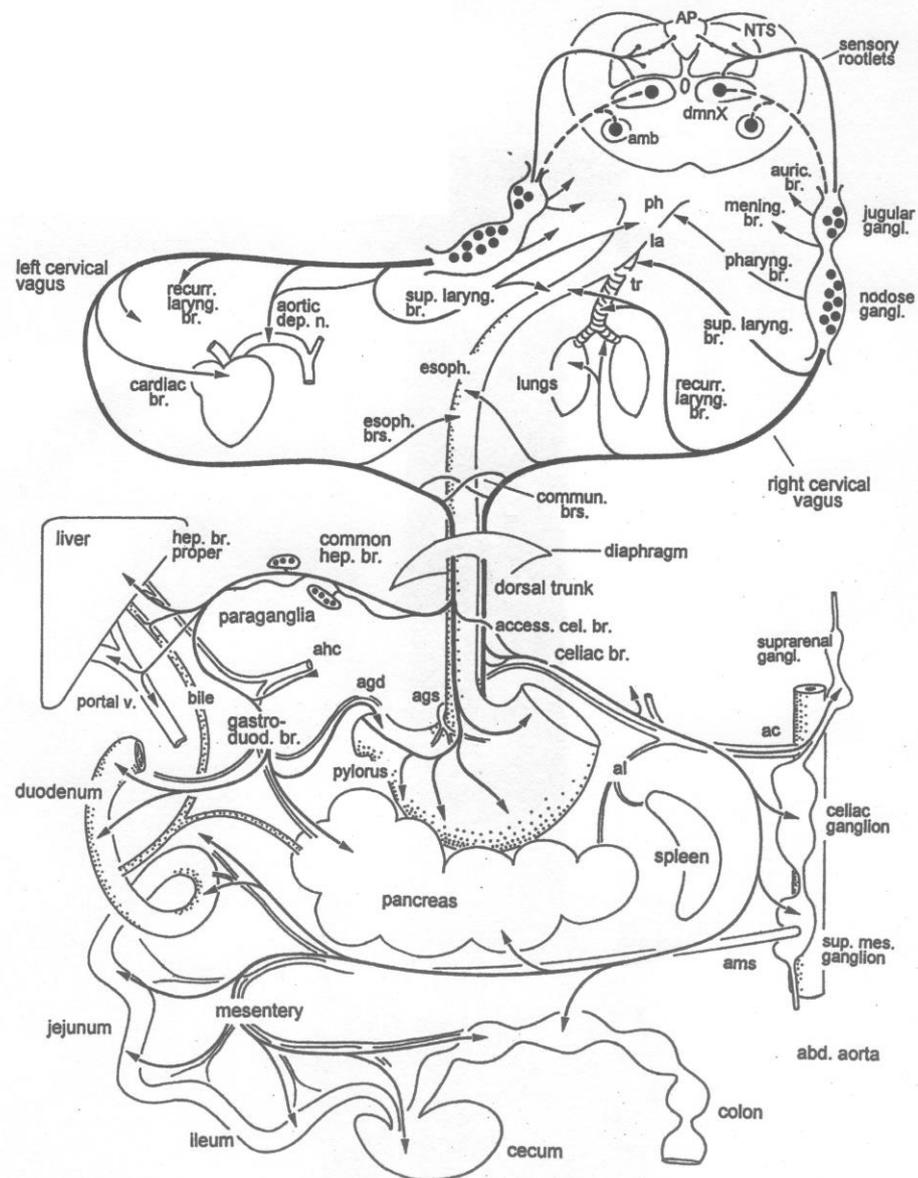


Figura 1 - Representação esquemática da distribuição anatômica geral do nervo vago em ratos. Abreviações sistema nervoso periférico: ac, artéria celíaca; agd, artéria gástrica direita; ags, artéria gástrica esquerda; ahc, artéria hepática comum; al, artéria esplênica; ams, artéria mesentérica superior; la, laringe; ph, faringe; tr, traquéia; Abreviações sistema nervoso central; Amb, núcleo ambíguo; AP, área postrema; NTS, núcleo do tracto solitário; dmnX, núcleo dorsal motor do NV (Berthoud; Neuhuber, 2000).

Dentre os três principais ramos do NV anterior a divisão hepática é o primeiro ramo a se desprender do tronco vagal (Berthoud; Carlson; Powley, 1991; Legros; Charles; Griffith, 1969; Powley et al., 1983; Precht; Powley, 1985; Smith; Jerome, 1983), sendo que, a ramificação em 63% dos casos ocorre entre 37% a 47% da distância entre o hiato esofágico e a cárdia, podendo existir variações em 31% dos casos, no qual o tronco vagal se trifurca envolvendo os ramos hepáticos e celíacos (Powley et al., 1983). Após se ramificar o nervo

hepático comum forma um ângulo entre 45° e 60° com o tronco vagal (Powley et al., 1983; Smith; Jerome; 1983), seguindo então dentro do omento menor em direção ao fígado (Legros; Charles; Griffith, 1969; Powley et al., 1983; Prechtl; Powley, 1985; Prechtl; Powley, 1987). Entretanto a maior parte dos axônios deste nervo não supre o fígado, uma vez que este nervo se divide em ramo hepático próprio e ramo gastroduodenal. Este último possui fibras que projetam para antro gástrico, esfíncter pilórico e porção proximal do duodeno inervando assim além do fígado outros órgãos da cavidade abdominal (Berthoud; Carlson; Powley, 1991; Wang; Young; Kao, 2012).

O ramo acessório celíaco cursa junto ao tronco vagal subdiafragmático por uma distância um pouco maior a do ramo hepático que não é encontrado em todos os ratos (Nanobashvili et al., 1994; Powley et al., 1983; Smith; Jerome, 1983). Na maioria dos casos, após se separar do tronco anterior o ramo acessório celíaco segue em direção ao lado esquerdo dando à volta por trás do esôfago e passando dorsalmente ao tronco vagal posterior, onde se divide em dois feixes discretos que seguem em direção ao ramo celíaco até o ponto em que ele se estende medialmente em direção à artéria gástrica esquerda (Powley et al., 1983; Prechtl; Powley, 1985). Justamente neste ponto o ramo acessório celíaco se junta ao ramo celíaco na parte posterior do esôfago descendo junto à artéria celíaca e distribuindo seus ramos para as diversas regiões dos intestinos delgado e grosso (Berthoud; Neuhuber, 2000).

Após dar origem ao ramo hepático comum e acessório celíaco o tronco vagal anterior desce pelo esôfago e dá origem a três ou cinco ramos gástricos (Legros; Charles; Griffith, 1969; Nanobashvili et al., 1994; Powley et al., 1983; Prechtl; Powley, 1985), formando um arranjo em forma de coleira (Smith; Jerome, 1983) e enviando seus ramos para inervar toda parede anterior do estômago (Legros; Charles; Griffith, 1969) e também a porção proximal do duodeno através de pequenos fascículos dentro do músculo circular do esfíncter pilórico (Berthoud; Neuhuber, 2000).

1.2 NÚCLEOS DO NERVO VAGO

O NV entra no bulbo por múltiplos fascículos que abrangem o completo aspecto lateral do mesmo, estendendo por 1,5 mm rostral a 1 mm caudal ao Obex (Kalia; Sullivan, 1982). Esse nervo transporta axônios efetores para o controle do trato alimentar superior, trato respiratório, gastrointestinal e também para a regulação das funções cardíacas (Hopkins et al.,

1996). É considerado o principal nervo parassimpático com suas fibras localizadas em três núcleos: núcleo do trato solitário (NTS), núcleo ambíguo (NA) e núcleo dorsal motor do

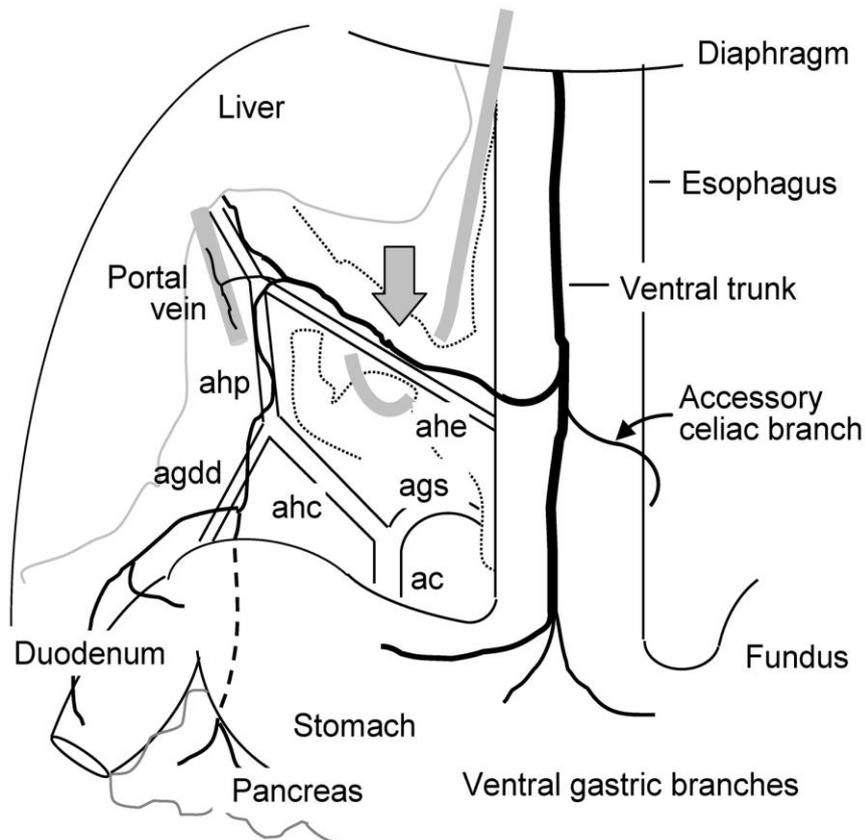


Figura 2 - Representação esquemática da distribuição anatômica subdiafragmática do nervo vago. Tronco vagal subdiafragmático anterior repousando sobre a superfície anterior do esôfago e subdividindo-se em ramo hepático (seta cinza), acessório celiaco e gástrico (continuação do tronco vagal após as ramificações anteriores). Abreviações: ahp, artéria hepática própria; agdd, artéria gastroduodenal; ahc, artéria hepática comum; ahe, artéria hepato-esofágica; ags, artéria gástrica esquerda; ac, artéria celiaca (Shin; Zheng; Berthoud, 2012).

nervo vago (DMV) (Gil et al., 2010).

Neurônios do NTS, apesar de não projetarem seus axônios via NV, recebem informações sensoriais vagais cardiorrespiratórias e de órgãos subdiafragmáticos do trato gastrointestinal. Compreende muitos tipos celulares misturados, abrangendo uma vasta gama de fenótipos neuroquímicos espalhados por todos os vários subnúcleos do NTS (Travagli, 2007). Este núcleo se estende longitudinalmente dos níveis mais altos da medula cervical, a cerca de 4 mm caudal ao obex, até alcançar os níveis mais rostrais, próximo ao polo caudal do núcleo do nervo facial, tendo aproximadamente 8 mm de comprimento (Kalia; Sullivan, 1982). Considerando as diferenças de tamanho, forma, orientação e marcação características

os neurônios do NTS foram divididos em subnúcleos medial, ventral, intermediário, ventrolateral, interstício, dorsolateral e comissural, com a distribuição das células de origem vagal representada principalmente na parte média do NTS (incluindo a área postrema) durante os dois terços caudais do núcleo (Kalia; Sullivan, 1982).

De forma diferente, o NA reside próximo à superfície ventral do bulbo (Lewis; Scott; Navaratnam, 1970), com projeções eferentes para a periferia por meio dos nervos vagos e glossofaríngeo (Hopkins et al., 1996). O NA possui aproximadamente 2 mm de comprimento e sua extremidade rostral é substancialmente mais espessa que a extremidade caudal, possui neurônios com forma estrelada e com tamanhos moderados de aproximadamente 30-40 μm de diâmetro, sendo dividido em dorsal e ventral (Lewis; Scott; Navaratnam, 1970). A porção dorsal contém motoneurônios eferentes viscerais especiais e são formadas por três subdivisões arranjadas longitudinalmente denominadas por formação compacta, semi-compacta e *loose* (Hopkins et al., 1996). Estas divisões são compostas de neurônios multipolares de tamanho médio e com um formato fusiforme (Bieger; Hopkins, 1987) e que projetam para diferentes áreas: a formação compacta contém neurônios motores que inervam principalmente o esôfago, a porção semi-compacta possui motoneurônios constritores da faringe e a região mais caudal conhecida como *loose* possui fibras motoras que projetam para a laringe (Bieger; Hopkins, 1987). A divisão ventral denominada formação externa é composta por uma grande coluna de pequenas células localizadas ventral e lateral à divisão dorsal (Bieger; Hopkins, 1987), contendo neurônios pré-ganglionares eferentes gerais que projetam para o coração, pulmão e vísceras supradiafragmáticas que são inervadas pelos nervos glossofaríngeo, laríngeo e vago (Hopkins et al., 1996).

Já o DMV está situado perto do assoalho do quarto ventrículo (Ellison; Clark, 1975; Lewis; Scott; Navaratnam, 1970), sendo primeiramente identificado como um núcleo de formato fusiforme e apresentando uma extensa coluna de neurônios percorrendo de rostral para caudal por aproximadamente 3 mm em um aspecto dorso-lateral ao núcleo hipoglosso (Lewis; Scott; Navaratnam, 1970). Além desta coluna, células do DMV são encontradas dentro da porção cervical da medula espinhal através do núcleo comisuralis, formando uma extensa coluna de neurônios entre a medula e o tronco cerebral (Contreras; Gomez; Norgren, 1980; Dennison et. al., 1981a; Hoover; Barron, 1982; Sterner; Fox; Powley, 1985). Apresentando então um comprimento aproximado de 4,6 mm, sendo que aproximadamente 1,7 mm se localizam rostralmente e 2,9 mm caudalmente ao polo rostral da área postrema (rAP) (Sterner; Fox; Powley, 1985).

As células localizadas nas extremidades rostrais do núcleo são poucas em número, formando um pequeno aglomerado de células localizadas medialmente ao NTS e lateral ao quarto ventrículo. Os neurônios da porção mais caudal estão localizados em uma fina faixa dorsolateral ao canal central entre o NTS e o Hipoglosso (Contreras; Gomez; Norgren, 1980; Dennison et. al., 1981a). Em sua porção média o núcleo possui uma grande coluna de células dorsal e lateral ao hipoglosso com formato oblongo, e achatado nas extremidades, (Contreras, Gomez, Norgren, 1980; Dennison et al., 1981a) sendo também a região do núcleo que possui a maior densidade de células (Contreras, Gomez, Norgren, 1980; Dennison et. al., 1981a; Hoover, Barron, 1982).

Dois tipos celulares são encontrados neste núcleo, o primeiro possui uma forma oval com seus longos eixos no plano transversal e um tamanho uniforme, o segundo tipo com tamanho reduzido é encontrado espalhado entre as células ovaladas com um perfil um pouco mais arredondado (Lewis; Scott; Navaratnam, 1970; McLean; Hopkins, 1981; McLean, Hopkins, 1982). Estes neurônios possuem uma orientação dendrítica extremamente diversificada. Muitas células enviam processos em direção ao NTS, outros se ramificam até as vizinhanças do canal central e IV ventrículo. Algumas se restringem às delimitações do próprio DMV (Fogel; Zhang; Renehan, 1996; Fox; Powley, 1992; Jarvinen; Powley, 1999; Zhang; Fogel; Renehan, 1992) ou se estendem até o núcleo do hipoglosso (Fox; Powley, 1992; Jarvinen; Powley, 1999), havendo ainda processos que cruzam a linha média do bulbo entrando assim no núcleo do lado oposto (Fogel; Zhang; Renehan, 1996; Fox; Powley, 1992; Jarvinen; Powley, 1999).

A grande maioria das entradas sinápticas do DMV é fornecida por neurônios de segunda ordem localizados no NTS e em menor número de contatos monossinápticos vindos de neurônios de primeira ordem que chegam através do NV (Beckstead; Morse; Norgren 1980; Morest, 1967; Norgren, 1978). Entretanto os neurônios do DMV podem receber fibras advindas de neurônios de áreas superiores do SNC, tais como: córtex somatosensorial (M'hamed et al., 1993), hipotálamo (Misher; Brooks, 1966; ter Horst; Luiten; Kuipers, 1984) e amígdala (Schwaber; Kapp; Higgins, 1980; Takeuchi et al., 1983).

Os axônios do DMV projetam para o trato eferente localizado no aspecto ventrolateral do tronco cerebral se juntando às fibras que se somarão ao NV (Fogel; Zhang; Renehan, 1996; Gao et al., 2009; Zhang; Fogel; Renehan, 1992), as demais células possuem seus axônios terminando dentro do DMV, NTS (Gao et al., 2009) ou terminam ventrolateralmente dentro do tronco cerebral (Zhang; Fogel; Renehan, 1992), sendo os neurônios pós-ganglionares localizados dentro do DMV constituídos predominantemente por fibras do tipo C (Fogel;

Zhang; Renehan, 1996; Nosaka, 1986). Em cerca de 99% casos os axônios subdiafragmáticos são constituídos por fibras não mielinizadas (Gabella; Pease, 1973; Prechtl, Powley, 1983) com diâmetros médios entre 0,25 e 1 μm (Champagnat et al., 1986; Gabella; Pease, 1973; Prechtl; Powley, 1987; Prechtl, Powley, 1983) e em uma minoria por fibras mielinizadas com diâmetro axonal inferior as 2,8 μm (Prechtl; Powley, 1987; Prechtl, Powley, 1983).

1.3 ORGANIZAÇÃO VICEROTÓPICA

Com relação à organização viscerotópica subdiafragmática, o DMV pode ser dividido em colunas longitudinais (Fox; Powley, 1985; Powley; Fox; Berthoud, 1987), que se estendeu por todo o comprimento do núcleo e está relacionado aos diversos ramos vagais, entretanto, em suas extremidades rostral e caudal o DMV se estreita e suas colunas se sobrepõem tornando difícil à identificação e distinção destas colunas (Hopkins et al., 1996; Powley; Berthoud, 1987).

O ramo gástrico anterior é representado por uma grande coluna em formato fusiforme com neurônios estreitamente agrupados que ocupam os dois terços mediais do núcleo, apresentando em seu terço lateral uma organização de células mais espalhadas ou completa ausência destas, percorrendo longitudinalmente cerca de três quartos do DMV esquerdo em sua extensão rostro-caudal (Fox; Powley, 1985; Norgren; Smith, 1988; Powley; Fox; Berthoud, 1987) ou em menor quantidade no DMV direito em seu nível médio-caudal (Fox; Powley, 1985; Norgren; Smith, 1988; Sugitani et. al., 1991).

Em sua porção mais rostral é caracterizado pela distribuição dos neurônios em toda a extensão médio-lateral do núcleo (Fox; Powley, 1985; Norgren; Smith, 1988; Powley; Fox; Berthoud, 1987), Em sua extremidade caudal (muitas vezes adentrando a medula espinal por mais que 2 mm) a distribuição é mantida, porém uma diminuição na densidade destas células é presenciada (Norgen; Smith, 1988). Okumura e Namiki (1990), demonstraram que além de uma organização colunar entre os ramos existe também uma organização órgão específica, de forma que a coluna gástrica pode ser dividida em duas: uma região medial com células que inervam o corpo e antro e uma coluna lateral onde estão localizados os neurônios que dirigem seus axônios para o fundo do estômago.

De maneira similar, o ramo acessório celíaco também apresenta uma organização colunar, formando uma densa coluna de células no DMV esquerdo (Fox; Powley, 1985;

Norgren; Smith, 1988; Powley; Fox; Berthoud, 1987), com ausência de marcação no DMV direito (Fox, Powley, 1985; Norgren, Smith, 1988). Esta coluna se localiza no polo lateral do núcleo, se iniciando imediatamente mais lateral à coluna de células que representa o ramo gástrico (Berthoud, 1987; Fox; Powley; 1985; Norgren; Smith, 1988), com algumas células sendo ocasionalmente encontradas na porção mais medial e se sobrepondo à coluna gástrica (Fox; Powley, 1985; Norgren; Smith, 1988). A maior quantidade de células ocorre nos dois terços caudais do DMV, onde esta organização colunar é mais bem definida (Fox; Powley, 1985). Nos níveis mais rostrais estas células são encontradas em menor número, se alinhando de maneira mais difusa e se misturando constantemente às demais colunas (Fox; Powley, 1985; Norgren; Smith, 1988).

Diferentemente dos outros dois ramos originados do NV anterior, o ramo hepático é o que apresenta menor quantidade de corpos celulares no DMV, com uma distribuição difusa dentro da coluna gástrica e ocorrendo em toda a extensão do núcleo (Fox; Powley, 1985; Norgren; Smith, 1988). A grande maioria das células marcadas nesse ramo foi encontrada entre a área postrema e o obex, apresentando total ausência de marcação contralateral (Norgren; Smith, 1988) ou sendo raramente encontradas dentro da coluna gástrica posterior ou na coluna celíaca (Fox; Powley, 1985).

Fora do DMV as células que projetam por estes ramos podem ser encontradas na formação reticular ou no NA. Para todos os três ramos os neurônios existentes no NA são encontrados de ambos os lados tronco cerebral, havendo maior predominância de células no lado esquerdo (Fox; Powley; 1985; Norgren; Smith, 1988; Sugitani et. al., 1991), sendo as células gástricas encontradas no NA responsáveis por dois terços de toda a marcação subdiafragmática encontrada neste núcleo (Norgren; Smith, 1988).

1.4 MARCADORES DE LESÃO NEURONAL

Degeneração retrógrada foi o primeiro método experimental utilizado para estudo da organização viscerotrópica do NV e suas células de origem, sendo os primeiros resultados inconclusivos (Hopkins et al., 1996). Assim que o axônio é lesado uma série de alterações na sinalização celular (Figura 3), transcrição, tradução e modificações pós-traducionais acontecem (Aldskogius; Barron; Regal, 1980; Aldskogius; Barron; Regal, 1984; Hanz; Fainzilber, 2006), essas mudanças são críticas para uma resposta regenerativa efetiva ou para indução a morte celular programada (Herdegen; Skene; Bähr, 1997).

Dentre os mecanismos envolvidos na sinalização da lesão, três modelos têm sido estabelecidos: o primeiro e mais rápido, envolve a geração de potenciais de ação no local da lesão que viajam de volta ao soma desencadeando uma despolarização sustentada e produzindo forte influxo de cálcio em ambos, soma e axônio (painel superior, figura 3) (Abe; Cavalli, 2008; Mandolesi et al., 2004), o segundo envolve o interrupção do transporte retrógrado de proteínas entre o alvo e o corpo celular (figura 3, painel central) (Abe; Cavalli, 2008) e o terceiro está relacionado às proteínas pertencentes à família de proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs), que são ativadas no sitio da lesão e transportadas retrogradamente até o núcleo (painel inferior, figura 3) (Abe; Cavalli, 2008).

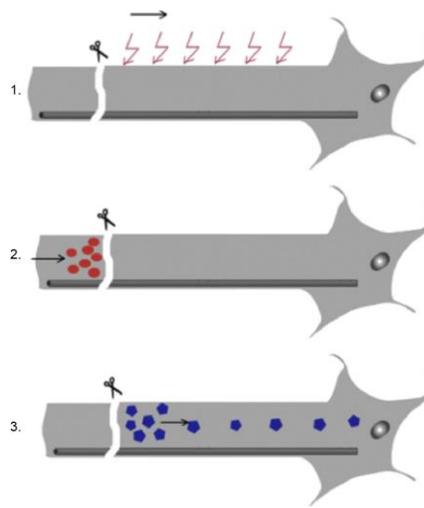


Figura 3 - Diferentes modelos de sinalização retrógrada após lesão axonal. 1: a lesão gera potenciais de ação que se propagam retrogradamente em direção ao soma. **2:** Interrupção do transporte retrógrado de proteínas entre o alvo e o corpo celular. **3:** Transporte retrógrado de proteínas ativas no sítio da lesão (modificado de Rishal; Fainzilber, 2010).

Quando neurônios periféricos são lesionados uma maior taxa de recuperação é alcançada (Skene; Willard, 1981), em contrapartida, neurônios localizados no SNC frequentemente falham em seu processo de regeneração (Aldskogius; Barron; Regal, 1980; Aldskogius; Barron; Regal, 1984; Barron et al., 1985). Correspondentemente os neurônios do DMV experimentam um leve alargamento citoplasmático associado ao deslocamento nuclear e acentuada perda de células após um longo período que se segue à axotomia (Aldskogius; Barron; Regal, 1980).

Dentre as mudanças transcricionais associadas à axotomia está o aumento ou diminuição da expressão de uma grande quantidade de genes (Abankwa; Kury; Muller, 2002; Boeshore et al., 2004). Entre os genes que são induzidos estão os genes de ativação imediata (IEG) (Haas; Donath; Kreutzberg, 1993; Jenkins; Hunt, 1991; Jenkins; Tetzlaff; Hunt, 1993)

que estão relacionados a uma variada gama de repostas adaptativas relacionadas à plasticidade neural, crescimento celular, proliferação (Curran; Mogan, 1987; Greenberg; Ziff, 1984; Lau; Nathans, 1987; Sheng; Greenberg, 1990), morte celular programada ou as vias de sobrevivência e regeneração quando estimulados por axotomia (Herdegen; Skene; Bähr, 1997).

Na ausência de um estímulo estes IEGs são levemente expressos, entretanto após axotomia vários desses genes têm sua transcrição intensificada, dentre eles, uma proteína conhecida como fator 3 ativador da transcrição (ATF-3) (Tsujino et al., 2000). O ATF-3 também conhecido como LRF-1 (Fator 1 regenerador do fígado) (Hunt; Raivich; Anderson, 2012), pertence a uma grande família de fatores de transcrição/proteínas de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) (ATF/CREB) (Hunt; Raivich; Anderson, 2012; Liang et al., 2010). Membros desta família se ligam a uma sequência consenso do ácido desoxirribonucléico (DNA), TGACGTCA (Hunt; Raivich; Anderson, 2012; Liang et al., 1996) e se caracterizam por uma região básica/ zíper de leucina (bZip) e apresentam em seu domínio de ligação ao DNA uma sequência conservada de 30 aminoácidos rica em resíduos básicos (Lalli; Corsi, 1994).

O ATF-3 é uma proteína de aproximadamente 21 kilodaltons (Hsu; Bravo; Taub, 1992; Hsu et al., 1991; Chen et al., 1994) constituída de 181 aminoácidos (Hsu; Bravo; Taub, 1992) sendo a região compreendida entre os aminoácidos 40 a 84 (conhecida com domínio R) a principal responsável pela atividade de inibição da transcrição (Hsu; Bravo; Taub, 1992). Esta proteína é rapidamente super-regulada em quase todos os neurônios axotomizados após lesão neural periférica (Liang et al., 2010) e pode ser induzido em uma variedade de tecidos submetidos a estresse, tais como: lesão mecânica e tóxica do fígado, privação de fluxo sanguíneo para o coração e após convulsão cerebral (Chen; Wolfgang; Hai, 1996).

Além do ATF-3 e de uma grande quantidade de proteínas que tem sua tradução aumentada após axotomia outras duas proteínas tem sido demonstradas para serem superreguladas após lesão axonal, são elas: nestina e GAP-43. A nestina é uma proteína de filamento intermediário de classe VI presente no citoesqueleto da célula (Lendahl; Zimmerman; McKay, 1990) e foi demonstrado para ter sua expressão re-induzida em motoneurônios do NA após secção proximal do NV (Takaoka et al., 2009). A expressão desta proteína tem sido utilizada como marcador de células tronco no SNC, uma vez que é expressa em diversas regiões no cérebro em desenvolvimento (Lendahl; Zimmerman; McKay, 1990), no entanto, com o término da diferenciação as células do SNC param de produzir nestina e

expressam filamentos intermediários de classes III ou IV, típicos do seu tipo celular diferenciado (Lendahl; Zimmerman; McKay, 1990).

GAP-43 é uma proteína neuronal amplamente expressa nos períodos de crescimento axonal que ocorrem durante desenvolvimento (Skene, Willard, 1981c), entretanto no animal adulto esta proteína tem seus níveis diminuídos em quase todo o SNC mantendo sua expressão em um restrito grupo de células localizadas no córtex, hipocampo e bulbo olfatório (De la Monte et al., 1989). Baseado em sua velocidade de carregamento no interior do axônio ela foi classificada como uma proteína de classe I, na qual se enquadram proteínas que atingem altas velocidades de transporte, chegando a percorrerem 240 mm por dia (Levine, Skene, Willard, 1981; Lorenz, Willard, 1978; Skene, Willard, 1981a; Skene, Willard, 1981b) possuindo também algumas propriedades de solubilidade que podem caracteriza-la como uma proteína integral de membrana com forte tendência a se acumular nas pontas do axônio (Skene, Willard, 1981d). Esta proteína também tem sua expressão aumentada em neurônios do sistema nervoso periférico após a lesão axonal (Woolf et al., 1990), sendo de grande importância para o crescimento axonal durante o desenvolvimento e também no processo de regeneração axonal após lesão, tendo um papel fundamental no processo de re-inervação do tecido alvo (Levine; Skene; Willard, 1981).

2. JUSTIFICATIVA

A expressão de marcadores de lesão neuronal foi observada em alguns trabalhos após a lesão de nervos sensoriais e motores somáticos. Poucos relatos da literatura avaliaram a expressão desses marcadores após a axotomia de nervos autonômicos, sobretudo quando a axotomia é realizada em segmentos distais desses nervos. Além disso, quando um neurônio é axotomizado e tem a expressão de uma dada proteína aumentada no corpo celular, esta pode ser útil na localização neuronal e servir como ferramenta no estudo da distribuição de neurônios em um núcleo ou gânglio do Sistema Nervoso. Para estudar a inervação de órgãos por ramos nervosos específicos, a maioria dos artigos utiliza traçadores retrógrados aplicados em órgãos ou em segmentos proximais de nervos seccionados. Embora este método tenha contribuído muito com o avanço do conhecimento das populações neuronais ele ainda possui algumas limitações, podendo sobrestimar o número de neurônios, como acontece em casos no qual ocorre vazamentos do traçador ou uma redução do número real deles por dificuldade de transporte do traçador por algumas fibras nervosas. Dessa forma, o presente projeto propõe de uma forma inédita pesquisar por um fator indicador de lesão axonal periférica e utilizá-lo na análise da distribuição de neurônios do DMV, em especial, aqueles que projetam pelos ramos vagais subdiafragmáticos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a expressão dos marcadores de lesão neuronal nestina, GAP-43 e ATF-3 em neurônios do DMV após a axotomia de ramos específicos do NV subdiafragmático e utilizar o melhor marcador na análise topográfica desses ramos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a porcentagem de neurônios reativos para o marcador de lesão axonal após axotomia do ramo gástrico anterior.
- Analisar a distribuição de neurônios do DMV que projetam via ramos específicos: ramo gástrico anterior, hepático e acessório celíaco.
- Utilizar o marcador de lesão axonal para avaliar a distribuição de neurônios que expressam diferentes enzimas envolvidas com a síntese de neurotransmissores e que definem o código químico de neurônios do DMV.

4. METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Os procedimentos experimentais que envolveram o uso de animais foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA-UFTM), com base nos protocolos nº 346 (anexo A) e nº 303 (anexo B) que são complementares e exclusivos desse projeto de pesquisa. Foram utilizadas 35 ratas Wistar com idade entre 28 a 32 dias. Os animais foram mantidos em ambiente com controle de temperatura (23 ± 1 °C) e ciclo de claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7:00 horas) e com livre acesso a água filtrada e ração balanceada (Nuvilab). Após o desmame aos 21 dias, os animais foram separados e mantidos em um número máximo de 5 animais/caixa até a idade de uso. 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 o número de animais utilizados.

4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E MARCAÇÃO RETRÓGRADA

Uma solução anestésica contendo quetamina/xilazina (75 e 5 mg/Kg) foi administrada intraperitonealmente e após a confirmação do estado anestésico os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica, com os quatro membros fixados em abdução. Foi realizada a laparotomia mediana para exposição do esôfago. Com o auxílio de um estereomicroscópio (D.F. Vasconcellos M90) foi feita identificação dos ramos vagais subdiafragmáticos.

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais com n amostral variando de 4 a 9 animais. Em três destes grupos foi realizado axotomia por dupla transecção e retirada de um pequeno segmento em um dos três ramos vagais (figura 1): **grupo 1-** axotomia do ramo gástrico (n=8), **grupo 2-** axotomia do ramo hepático (n=9), **grupo 3-** axotomia do ramo acessório-celíaco (n=8). Nos grupos 4 e 5 foi realizada aplicação (3 µL) de toxina colérica subunidade beta (CTb) conjugada a alexa 488 (ThermoFisher, C34775) ou alexa 647 (ThermoFisher, C34778): **grupo 4-** aplicação de toxina colérica na superfície ventral do antro e corpo gástrico e posterior (após 5 dias) axotomia do ramo gástrico anterior (n=4), **grupo 5-** aplicação de CTb no corpo e antro gástrico sem axotomia (n=6). A aplicação do traçador retrógrado foi realizada em três pontos distintos com uma seringa Hamilton de 1 µl. Após o

término dos procedimentos cirúrgicos os animais receberam uma dose de 2 mg/Kg de anti-inflamatório/analgésico (Meloxicam) e foram monitorados até a completa recuperação do efeito do anestésico e recolocados no biotério, onde foram mantidos por 5 dias até a eutanásia e coleta de tecidos.

4.3 PERFUSÃO E COLETA DE TECIDO

Os animais receberam uma overdose de Tiopental sódico (100 mg/Kg, intraperitoneal) e colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica dentro de uma capela de exaustão de gases. Após a confirmação da anestesia foi realizada uma incisão mediana longitudinal ao longo da parede abdominal e torácica. O músculo diafragma foi cortado, para a realização do pneumotórax e, logo em seguida, uma agulha ligada ao sistema de perfusão, foi introduzida pelo ventrículo esquerdo até a aorta ascendente e clampeada com uma pinça e o átrio direito foi perfurado para o escoamento do sangue e da solução perfusora.

A lavagem de sangue dos tecidos foi feita durante quatro minutos com tampão fosfato salino (PBS) na seguinte composição (mM): 137 NaCl, 2,68 KCl, 1,47 KH₂PO₄, 1,435 NaHPO₄, pH 7,4. Em seguida, foi feita a perfusão com solução fixadora gelada com a seguinte composição: 0,01 M de metaperiodato de sódio (Sigma S1878), 0,075 M lisina (L-lysine monohydrochloride, Sigma L5626), 0,037 M de fosfato de sódio e 2% de paraformaldeído (Sigma, P6148) durante 30 minutos. As perfusões foram realizadas com uma bomba peristáltica (202, Milan) com fluxo de 9-10 ml/min. Após o término da perfusão, os animais foram decapitados para a realização da dissecação cirúrgica do tronco cerebral.

A calota craniana foi aberta para obtenção do acesso à cavidade craniana, as raízes do NV foram cuidadosamente seccionadas no ponto onde esse emerge do forame jugular do osso temporal, com auxílio do estereomicroscópio e uma tesoura oftálmica (501839, WPI, USA) e uma pinça Dumont N° 5 (WPI, USA). Em seguida, um bloco do tronco encefálico contendo o DMV foi cortado no plano coronal e transferido para um vibrátomo (1000 Plus, Vibratome, USA) onde o tecido foi cortado em secções de 100 µm abrangendo uma área de -700 µm a +600 µm (14 cortes) tendo o extremo rostral da área postrema como marco zero.

Para a execução de corte do tecido no vibrátomo, o bloco foi colado ao substrato metálico recoberto com teflon com cola de cianoacrilato. Durante o corte, as fatias obtidas sucessivamente foram colocadas em uma placa de 24 poços e mantidas na solução fixadora descrita acima, totalizando um tempo médio de pós-fixação de uma hora. Em seguida, as

fatias foram transferidas para outra placa de 24 poços contendo PBS para serem lavadas e imunomarcadas.

4.4 EXPERIMENTOS DE IMUNOMARCAÇÃO

As fatias em cada poço foram lavadas com PBS três vezes de 15 min, sob agitação suave em um agitador (BIOMIXER TS-2000A-VDRL SHAKER). Em seguida, as fatias foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente (24°C), em solução de bloqueio/permeabilização composto por 1,5% (vol/vol) de Triton X-100, 10% (vol/vol) de soro de burro (Invitrogen) em tampão fosfato (PB). Na seqüência, as fatias foram incubadas por 24 horas a 4 °C, com solução de bloqueio (Triton X-100 reduzido para 0,3%) contendo anticorpos primários diluídos na proporção de 1:400: anti-colina acetiltransferase (ChAT) (cabra, AB144P, Millipore), tirosina hidroxilase (TH) (Mab318, camundongo, Millipore), NO sintase neuronal (nNOS) (SC5302, camundongo, Santa Cruz), ATF-3 (coelho, C19, Santa Cruz), nestina (camundongo, MAB 353, Millipore) e GAP-43 (coelho, AB5220, Millipore). Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS e incubadas por duas horas à temperatura ambiente (24 °C) em tampão de bloqueio com anticorpos secundários diluídos na proporção de 1:500: burro anti-cabra Alexa 488, burro anti-coelho 568, burro anti-camundongo 568 e burro anti-coelho Alexa-405 (Invitrogen). Na maioria dos experimentos foram feitas triplas marcações numa mesma fatia. O excesso de anticorpo secundário não ligado foi lavado das fatias com PBS e as mesmas foram montadas em lâminas e lamínulas usando um meio protetor contra perda de emissão de fluorescência (Fluoromount-G, SouthernBiotech, USA).

Imagens das marcações foram adquiridas por microscopia confocal de varredura a laser (LSM 710, Zeiss). As objetivas 20x/0,5 EC Plan-Neofluar e 40x/1,3 de imersão em óleo EC Plan-Neofluar foram utilizadas para adquirir imagens sequenciais de 1024x1024 pixels. Uma única secção confocal do eixo Z foi utilizada para contagem de neurônios em um dado nível rostro-caudal para evitar que um mesmo neurônio fosse contado duas vezes, sendo utilizado como critério na escolha da secção a fatia com a maior área de campo no mesmo plano focal, resultando em uma contagem relativa de neurônios. Nas ilustrações, projeções de múltiplas secções do eixo Z foram sobrepostas em um plano único, utilizando o pixel de maior intensidade de fluorescência (projeções do tipo MIP: máxima intensidade de fluorescência). As imagens foram processadas utilizando o software ImageJ 1.49t e montadas no Adobe Illustrator CS (Adobe System, USA).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste estatístico e gráficos foram feitos com o software OriginPro 2015 (Microcal, USA). A distribuição rostro-caudal dos neurônios do DMV e dos ramos axotomizados (gástrico, acessório celíaco e hepático) foi analisada pelo ajuste de uma equação de Gauss aos pontos experimentais: $y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} \times e^{-2\frac{(x-x_c)^2}{w^2}}$, onde y_0 : ajuste, x_c : valor de x no centro do pico, w : largura do pico, A : área. A qualidade do ajuste foi definida pelo valor de R^2 : coeficiente de determinação. Os testes de Friedman e Mann Whitney foram utilizados para determinar diferenças significativas entre os grupos. Os dados são apresentados com média e \pm erro padrão da média (SEM). Foi considerado estatisticamente significativo $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Inicialmente, foram feitos experimentos objetivando identificar entre os possíveis marcadores de lesão neuronal, aquele que apresentava uma maior marcação por imunofluorescência após vagotomia periférica. Dessa forma, foi avaliada a expressão de GAP-43, visto que sua transcrição é aumentada após lesões de neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal, motoneurônios medulares (Woolf et al., 1990; Chong et al., 1992), motoneurônios vagais do NA (Uno et al., 2003) e neurônios do SNC com projeção periférica (Tetzlaff et al., 1991). Também foi testada a marcação para nestina, sendo que foi demonstrado que esta proteína tem sua expressão aumentada em motoneurônios do NA após secção proximal do NV (Takaoka et al., 2009), bem como em neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal (Kuo et al., 2005). Nossos resultados não indicaram um aumento na expressão somática de GAP-43 ou nestina após a axotomia periférica dos ramos do NV subdiafragmático. Observou-se uma ausência de marcação anti-GAP-43 enquanto a marcação anti-nestina foi detectada em vasos sanguíneos, tanto em experimentos controle como em animais axotomizados (Figura 4).

Diferentemente ao observado para GAP-43 e nestina, a axotomia vagal periférica resultou em um substancial aumento na expressão de ATF-3 em neurônios do DMV. Para analisar a eficiência da marcação anti-ATF-3 foram realizados experimentos de dupla intervenção cirúrgica, sendo inicialmente injetado o traçador retrógrado CTb conjugada ao Alexa-488 no antro e corpo do estômago, sendo posteriormente realizada a axotomia do ramo gástrico anterior (Figura 5). O painel A ilustra a marcação retrógrada com CTb e o painel B a imunorreatividade anti-ATF-3 onde observa-se que CTb marca muito bem o citoplasma, principalmente próximo ao núcleo, enquanto o ATF-3 é observado sobretudo no núcleo neuronal. Sobreposição de A e B é mostrada no painel C, mostrando vários neurônios CTb⁺/ATF-3⁺ com algumas células CTb⁻ (seta) e ATF-3⁻ (cabeça de seta). No gráfico em D é mostrado o resultado do percentual de neurônios CTb⁺ que apresentam ou não colocalização com ATF-3. Pode ser observado que axotomia do ramo gástrico induz a expressão de ATF-3 em 95,2% do total de neurônios que foram marcados retrogradamente pela injeção de CTb no antro e corpo gástrico.

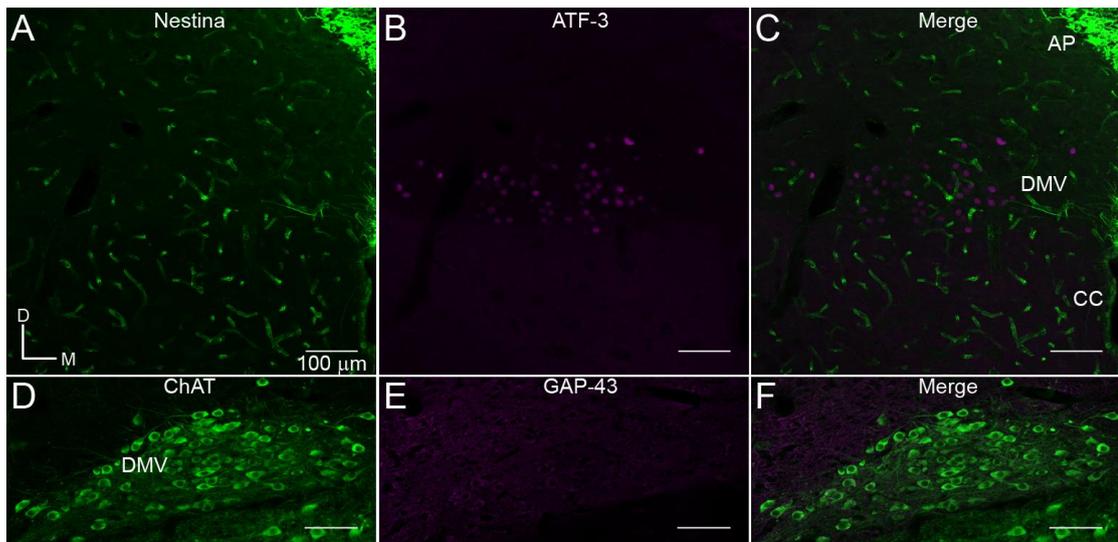


Figura 4 – Imunomarcção para os marcadores de lesão neuronal após axotomia do ramo gástrico anterior. A-C, imunomarcção para nestina (A), ATF-3 (B) e colocalização das marcações (C) na região do DMV. D-F, marcação anti-ChAT (D), anti-GAP-43 (E) e sobreposição das marcações (F).

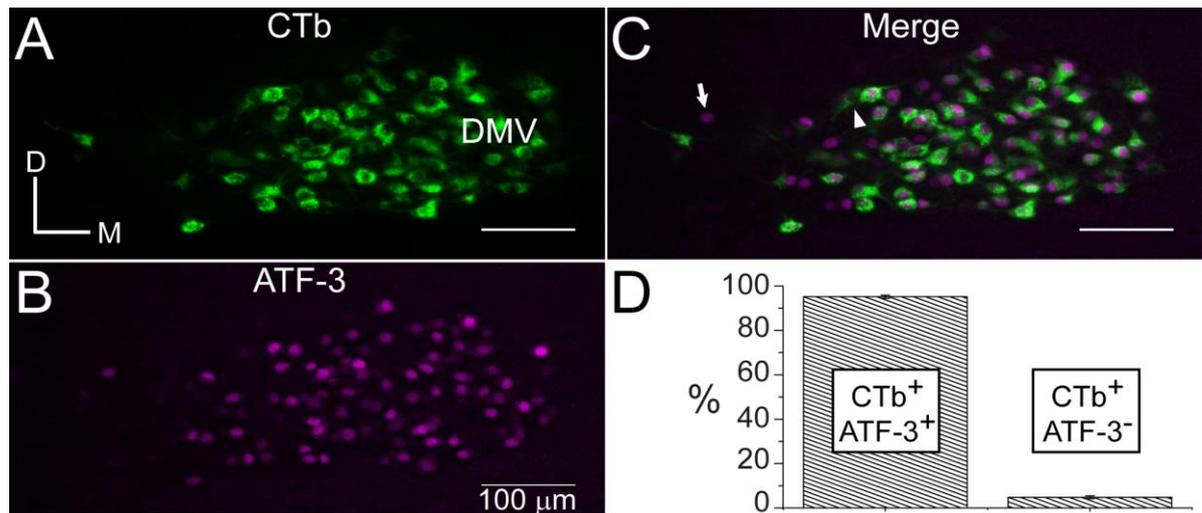


Figura 5 – Experimentos de dupla intervenção cirúrgica revelam uma robusta expressão de ATF-3 em neurônios do DMV após a axotomia do ramo vagal gástrico. A: Localização do traçador retrógrado toxina colérica (CTb) em neurônios do DMV após a administração no antro e corpo gástrico. **B:** Intensa imunomarcagem anti-ATF-3 seguindo à axotomia do ramo gástrico. **C:** Abundante colocalização das marcações. A seta mostra neurônio do DMV ATF-3⁺/CTb⁻ e a cabeça de seta mostra neurônio do DMV ATF-3⁻/CTb⁺. **D:** Porcentagem de neurônios CTb⁺ apresentando ou não marcação anti-ATF-3. Nível +200 μ m.

A figura 6 ilustra os resultados obtidos da análise da expressão de ATF-3 nos neurônios do DMV esquerdo após a axotomia do ramo gástrico anterior. A grande maioria dos neurônios do DMV exibe imunoreatividade anti-ChAT, como pode ser observado no painel A. Um grande número de neurônios exibe marcação anti-ATF-3 (painel B). Sobreposição das marcações em C indica um grande número de neurônios ChAT⁺/ATF-3⁺, os quais, subentende-se projetar pelo ramo gástrico. A subdivisão do DMV de medial para lateral em quatro quadrantes (linhas pontilhadas C) indica que tais neurônios são mais observados no 3º quadrante com pequena redução em direção à porção medial e poucas células no quarto quadrante. A média percentual da distribuição médio-lateral dos neurônios que projetam por esse ramo vagal é mostrada no painel D. Tais neurônios também são observados no NA como ilustra o painel F (setas).

Utilizando a marcação anti-ChAT como indicadora do número total de neurônios pertencentes ao DMV e a marcação anti-ATF-3 como indicadora daqueles neurônios que projetam pelo ramo gástrico, procedeu-se à análise da distribuição rostro-caudal desses neurônios. A contagem do número absoluto de neurônios a cada 100 µm, entre os níveis -700 e +600 µm, indica que tanto o número total de neurônios do DMV quanto daqueles que projetam pelo ramo gástrico tem seus picos na porção média dos níveis analisados (painel G). O painel H mostra a distribuição normalizada desses neurônios. Considerando que os dados seguem uma distribuição Gaussiana, o nível rostro-caudal estimado com maior quantidade de neurônios do DMV seria -29 µm e do ramo gástrico anterior em -33 µm. Apesar do fato que, o número total de neurônios do DMV ou daqueles que projetam pelo ramo gástrico anterior apresentem um pico na distribuição rostro-caudal, a porcentagem do número total de neurônios em cada nível que projeta pelo ramo gástrico anterior apresenta-se constante (painel I).

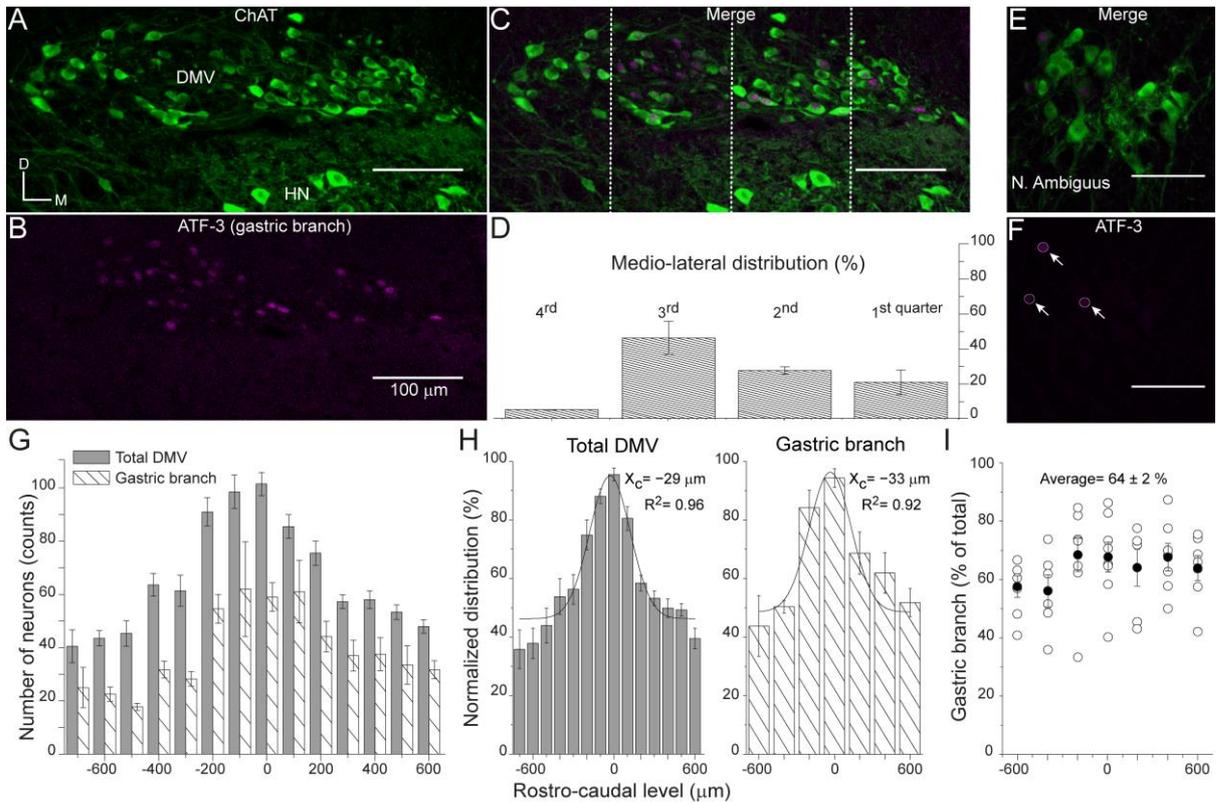


Figura 6 – Distribuição de neurônios do ramo gástrico anterior baseada na imunomarcção anti-ATF-3. A-C: Imagens de uma única secção confocal da imunomarcção para ChAT (A), ATF-3 (B) e sobreposição das marcações (C) registradas no DMV após axotomia do ramo gástrico. Linhas pontilhadas em C representam subdivisões médio-laterais do DMV. D: Média do percentual relativo dos neurônios imunopositivos para ATF-3 em cada subdivisão no nível +100 μm. E-F: Sobreposição das marcações anti-ChAT e anti-ATF-3 (E) e anti-ATF-3 (F) no NA após axotomia do ramo gástrico. G: Número de neurônios totais do DMV (imunopositivos para ChAT, ATF-3 ou ambas marcações) e do ramo gástrico (ATF-3⁺) nos diferentes níveis rostro-caudais. Nível 0 μm indica o extremo rostral da área postrema. H: Porcentagem relativa do número de neurônios totais (esquerda) e do ramo gástrico (direita) nos diferentes níveis rostro-caudais. Linha indica o ajuste aos pontos experimentais de uma função gaussiana, onde x_c indica o nível com maior percentual relativo de neurônios. I: Percentual de neurônios ATF-3⁺ em relação ao total ao longo do DMV. ○ indicam valores individuais e ● as médias ± SEM.

Na figura 7A é ilustrada a marcação anti-ChAT no DMV de animais que sofreram axotomia do ramo acessório celíaco. Neurônios que projetam por esse ramo, ou seja, expressam ATF-3 (painel 7B) aparentemente são observados mais lateralmente no DMV, como ilustra o painel 7C (sobreposição dessas marcações). A figura 7D apresenta a média da distribuição médio-lateral, confirmando a localização mais lateral dos neurônios que projetam por esse ramo. Imunorreatividade para ATF-3 também foi encontrada no NA (setas painel F). A contagem total de neurônios pertencentes ao DMV e dos neurônios que projetam pelo ramo acessório celíaco a cada 100 μm entre os níveis -700 e $+600$ μm (painel G) demonstra que o pico de neurônios deste ramo ocorre ao nível de -121 μm (painel H) e com uma distribuição constante de neurônios ao longo do eixo rostro-caudal do DMV quando analisada em relação ao percentual total de células do núcleo (painel I).

A figura 8 mostra que o ramo hepático tem uma organização mais difusa em relação à disposição médio-lateral (painel B, C) apresentando pouca diferença entre o número de neurônios distribuídos entre os quatro quadrantes do núcleo (painel D). Imunorreatividade para ATF-3 também foi encontrada no NA (seta painel F) indicando que neurônios que projetam pelo ramo hepático também são encontrados nesse núcleo. Em relação à distribuição rostro-caudal, foi estimado que a maior porcentagem relativa é observada ao nível -3 μm (painel H). De maneira semelhante aos outros dois ramos analisados, a porcentagem do número total de neurônios em cada nível que projeta pelo ramo hepático apresenta-se constante (painel I).

A distribuição dos neurônios que projetam pelos ramos vagais subdiafragmáticos no DMV ipsi (esquerdo) ou contra-lateral (direito) é ilustrada na Figura 9. No painel A é ilustrado uma imagem de ambos os núcleos, esquerdo e direito, em um animal que sofreu axotomia do ramo gástrico. Observa-se que a maioria dos neurônios ATF-3⁺ são encontrados ipsilateralmente. A tabela em B, apresenta o número absoluto de neurônios ATF-3⁺ em ambos os núcleos e ao longo do eixo rostro-caudal nos diferentes ramos do vago subdiafragmático analisados, sendo mantida, para todos esses ramos uma representação, sobretudo ipsilateral.

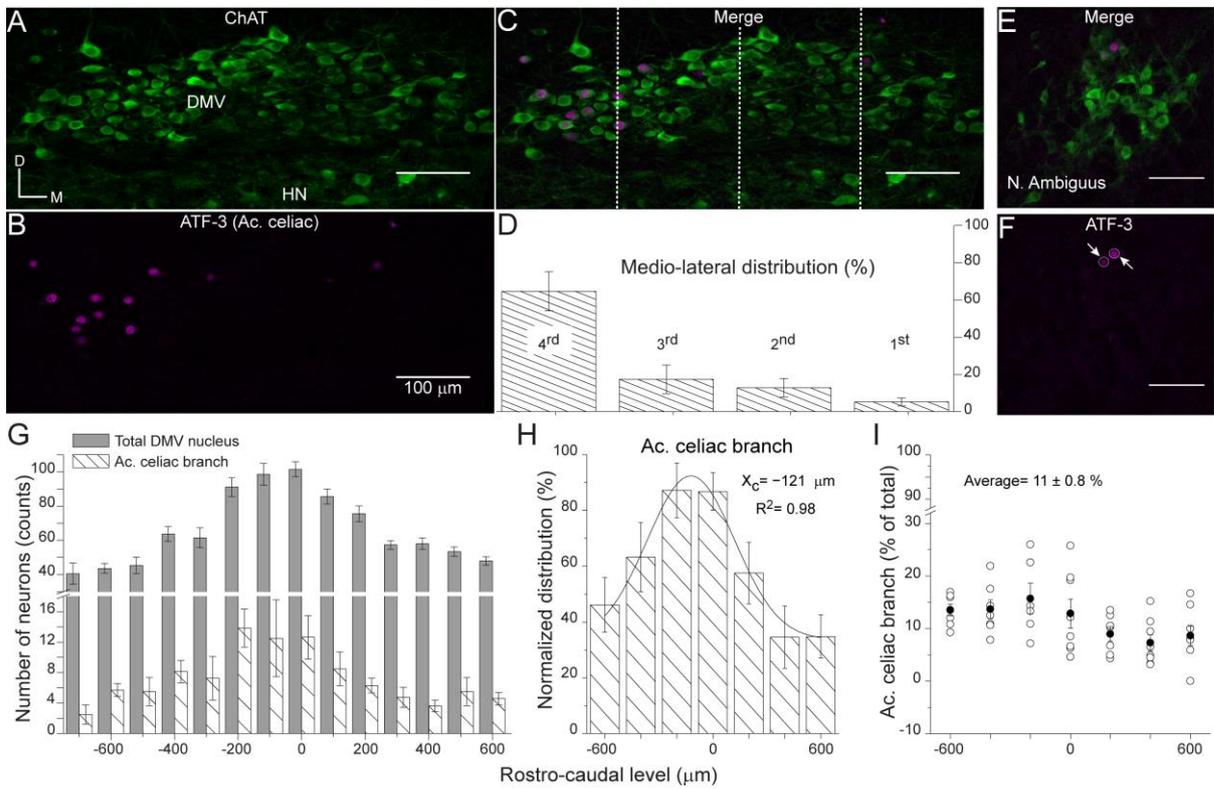


Figura 7 – Distribuição de neurônios do ramo acessório celíaco. A-C: Imagens de única secção confocal da imunomarcagem para ChAT (A), ATF-3 (B) e sobreposição das marcações (C) do DMV após axotomia do ramo acessório celíaco. Linha pontilhada em C representa subdivisões médio-laterais do DMV. **D:** Média do percentual relativo dos neurônios imunopositivos para ATF-3 em cada subdivisão no nível +100 μm . **E-F:** Sobreposição das marcações anti-ChAT e anti-ATF-3 (E) e anti-ATF-3 (F) no NA após axotomia do ramo acessório-celíaco. **G:** Número de neurônios totais do DMV (imunopositivos para ChAT, ATF-3 ou ambas marcações) e do ramo acessório-celíaco (ATF-3⁺) nos diferentes níveis rostro-caudais. Nível 0 μm indica o extremo rostral da área postrema. **H:** Porcentagem relativa do número de neurônios do ramo acessório-celíaco nos diferentes níveis rostro-caudais. Linha indica o ajuste aos dados experimentais de uma função gaussiana, onde x_c indica o nível com maior percentual relativo de neurônios. **I:** Percentual de neurônios ATF-3⁺ em relação ao total ao longo do DMV. \circ indicam valores individuais e \bullet as médias \pm SEM.

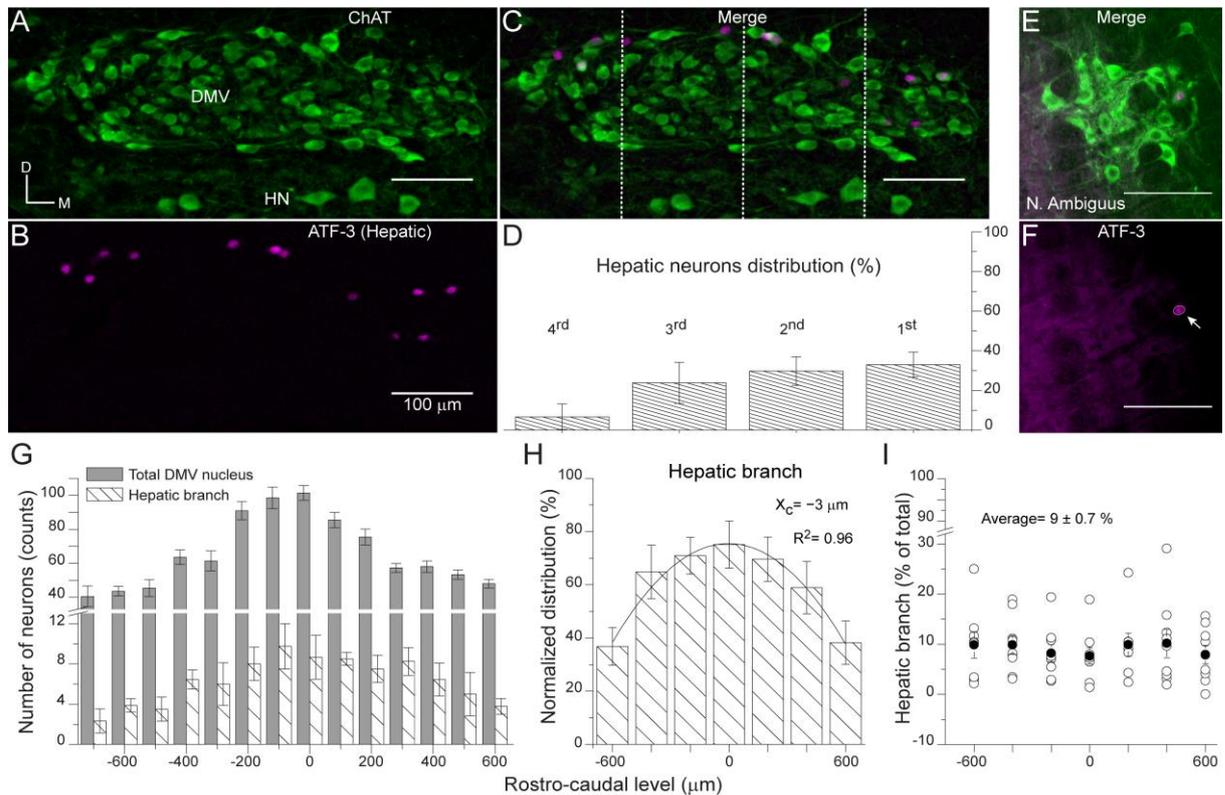


Figura 8 – Distribuição de neurônios do ramo hepático. A-C: Imagens de única secção confocal da imunomarcagem para ChAT (A), ATF-3 (B) e sobreposição das marcações (C) do DMV após axotomia do ramo hepático. Linha pontilhada em C representa subdivisões médio-laterais do DMV. **D:** Média do percentual relativo dos neurônios imunopositivos para ATF-3 em cada subdivisão no nível +100 μm . **E-F:** Sobreposição das marcações anti-ChAT e anti-ATF-3 (E) e anti-ATF-3 (F) no NA após axotomia do ramo hepático. **G:** Número de neurônios totais do DMV (imunopositivos para ChAT, ATF-3 ou ambas marcações) e do ramo hepático (ATF-3⁺) nos diferentes níveis rostro-caudais. Nível 0 μm indica o extremo rostral da área postrema. **H:** Porcentagem relativa do número de neurônios do ramo hepático nos diferentes níveis rostro-caudais. Linha indica o ajuste aos dados experimentais de uma função gaussiana, onde x_c indica o nível com maior percentual relativo de neurônios. **I:** Percentual de neurônios ATF-3⁺ em relação ao total ao longo do DMV. \circ indicam valores individuais e \bullet as médias \pm SEM.

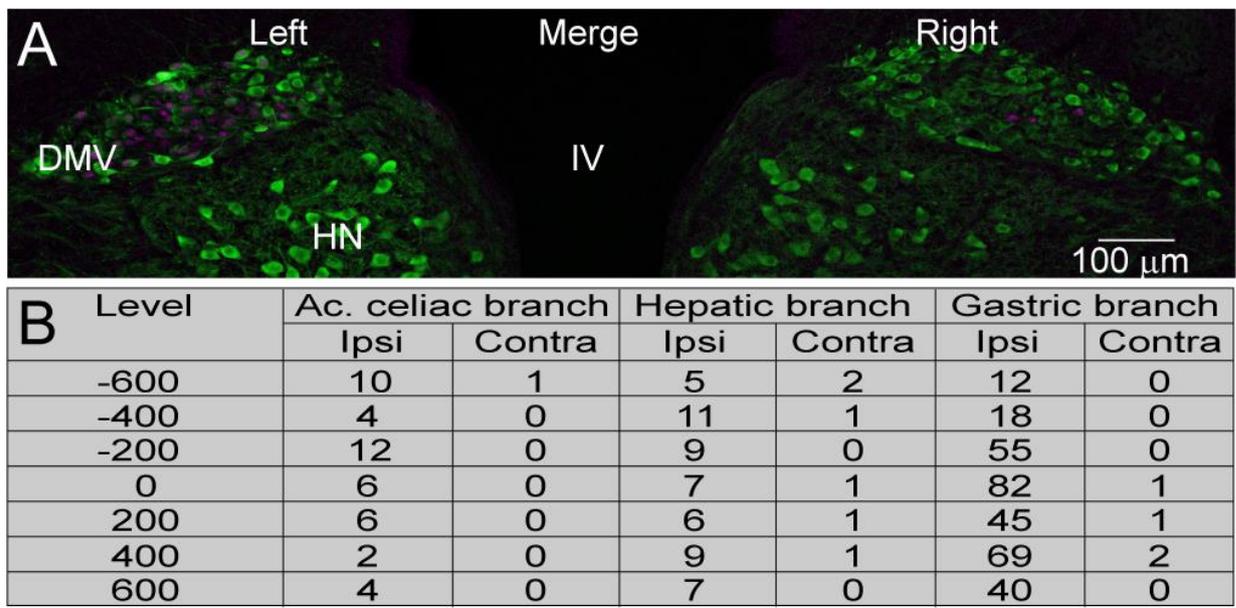


Figura 9 – Representação ipsi e contra-lateral no DMV de neurônios que projetam pelos ramos gástrico, hepático e acessório-celíaco. A: Sobreposição de imagens do tipo única secção confocal da imunomarcção para ChAT (verde) e ATF-3 (magenta) após axotomia do ramo gástrico anterior ao nível 0 μm . **B:** Número de neurônios ATF-3⁺ observados no DMV ipsi e contralateral nos diferentes níveis rostro-caudais após axotomia de um dos três ramos do vago subdiafragmático esquerdo em três experimentos representativos. HN, núcleo do nervo hipoglosso. IV, quarto ventrículo.

Experimentos de tripla-marcação foram realizados para analisar a expressão de tirosina hidroxilase nos neurônios do DMV que projetam pelos ramos do vago subdiafragmático. A figura 10A ilustra a sobreposição das marcações anti-ChAT, anti-TH e anti-ATF-3 no DMV e também no NTS (dorsalmente). Foram observados neurônios ATF-3 positivos que exibiram ambas as marcações (anti-TH e anti-ChAT, setas) ou apenas anti-ChAT. Neurônios positivos apenas para TH também foram observados (cabeça de seta) na área do DMV. No geral, neurônios somente ATF-3⁺/TH⁺ não foram observados.

A figura 11 resume os experimentos que analisaram a co-expressão de ChAT e nNOS em neurônios axotomizados que projetam pelos ramos gástrico, hepático e acessório-celíaco. No painel A é mostrada a sobreposição das três marcações e nos painéis B, C e D as marcações isoladas para ATF-3, ChAT e nNOS, respectivamente, na área delimitada em A. Neurônios axotomizados imunopositivos para ChAT e nNOS (setas em A) foram observados no DMV. A figura 11E apresenta a contagem do número de neurônios ao longo do eixo rostro-caudal do DMV estratificados de acordo com a expressão desses marcadores em um animal que sofreu axotomia do ramo gástrico. Observa-se que neurônios que coexpressam os três marcadores (Chat⁺/ATF-3⁺/nNOS⁺) são a grande maioria. Para analisar se de fato o grande número de neurônios que coexpressam esses marcadores é intrínseca ao DMV ou resulta da indução promovida pela secção do ramo gástrico, procedeu-se à mesma análise em animais que sofreram axotomia do ramo acessório-celíaco (Figura 11 F) ou do ramo hepático (Figura 11 G). A axotomia de tais ramos, cujo número de neurônios no DMV é bastante inferior ao do ramo gástrico, mostrou um número menor de neurônios Chat⁺/ATF-3⁺/nNOS⁺.

Dessa forma, a coexpressão de ChAT e nNOS em neurônios do DMV foi adicionalmente avaliada em experimentos controle. A figura 12 ilustra as marcações CTb (A), ChAT (B) e nNOS (C) no DMV esquerdo e direito de um rato que não foi submetido à axotomia mas, que recebeu apenas a administração de CTb na parte ventral do antro e corpo do estômago. A maior parte da marcação anti-CTb é observada no DMV esquerdo (12A). Poucos neurônios Chat⁺/nNOS⁺ são observados no DMV (12C) e alguns desses são ilustrados no painel D em maior magnificação. A contagem do número desses neurônios (painel E) em animais controle ou axotomizados revela um aumento significativo no número de neurônios Chat⁺/nNOS⁺.

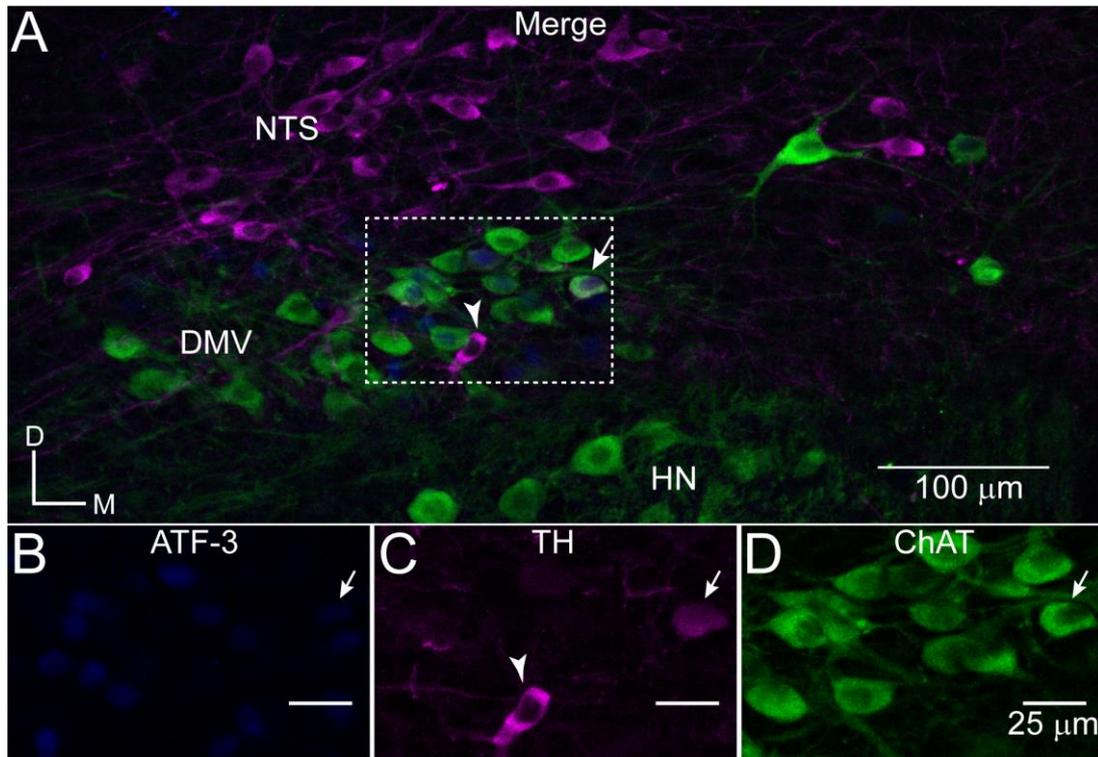


Figura 10 – Imunomarcção para tirosina hidroxilase no DMV após axotomia do ramo gástrico anterior. **A:** Imagem representativa da sobreposição das marcações anti-ATF-3 (azul), anti-TH (magenta) e anti-ChAT (verde) no DMV. A seta indica um neurônio imunopositivo para as três marcações e cabeça de seta ilustra um neurônio imunomarcado apenas com TH na área delimitada do DMV. **B-D:** Marcações isoladas e em maior aumento da área demarcada em A.

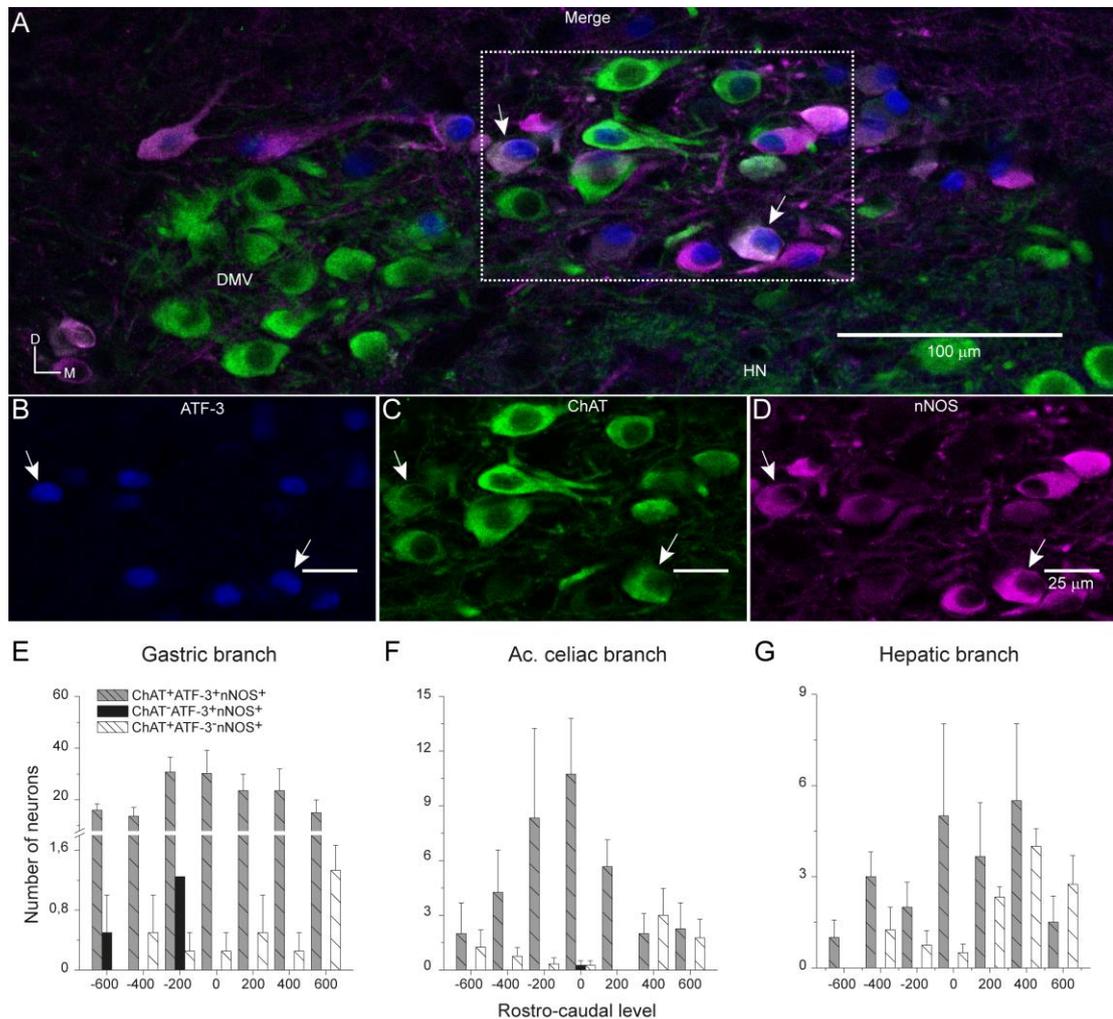


Figura 11 – Aumento substancial do número de neurônios nitrérgicos no DMV após axotomia vagal subdiafragmática. A: Imagem ilustrativa da sobreposição das marcações anti-ATF-3, anti-NOS e anti-ChAT no DMV após a axotomia do ramo gástrico. A área delimitada em A é mostrada abaixo em maior magnificação para cada uma das imunomarcações (B, C e D). Setas indicam neurônios que exibiram tripla marcação. **E-G:** Média da distribuição rostro-caudal de quatro tipos de imunomarcação neuronal observadas após a secção do ramo vagal subdiafragmático indicado.

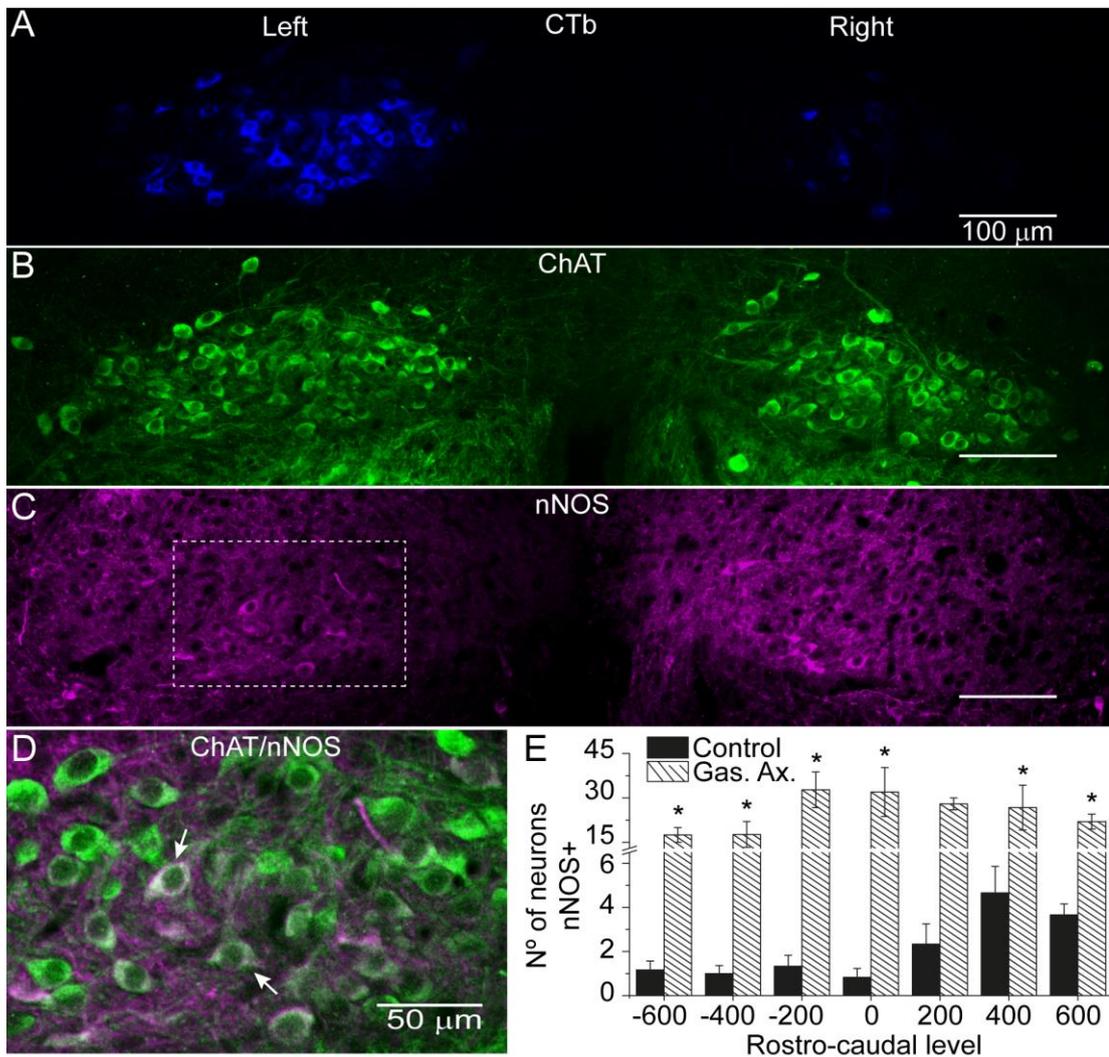


Figura 12 – Imunomarcção dos neurônios nitrérgicos no DMV em experimentos controle. **A:** Imagens de reconstrução do DMV esquerdo e direito, mostrando o rastreamento neuronal com traçador CTb (A) e as marcações anti-ChAT (B) e anti-nNOS (C). **D:** Sobreposição das imunomarcações anti-ChAT e anti-nNOS na área delimitada em C. Setas indicam colocalização para ChAT e nNOS. **E:** Plote do número médio de neurônios ChAT⁺/nNOS⁺ ao longo do eixo rostro-caudal do DMV em animais controle ou que sofreram axotomia do ramo gástrico.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, por meio das técnicas de imunofluorescência e microscopia confocal, foi avaliada a expressão do ATF-3 em neurônios autonômicos vagais após axotomia subdiafragmática seletiva e sua utilidade em reproduzir uma organização topográfica ramo específica. A marcação para ATF-3 foi presenciada majoritariamente no núcleo das células (Figura 5), um padrão já verificado por outros grupos (Shokouhi et al., 2010; Stimpson et al., 2011; Tsujino et al., 2000), com exceção de algumas raras ocasiões nas quais uma marcação citoplasmática foi detectada juntamente com uma marcação nuclear (dados não mostrados). Nossos resultados mostram que 95,2% dos neurônios marcados retrogradamente com CTb injetada no antro/corpo gástrico em animais com o ramo gástrico anterior axotomizado, também expressam ATF-3. Nesses animais, um grande número de neurônios que expressam ATF-3, mas que não são marcados por CTb, foram encontrados (Figura 5), isso se deve ao fato de que a representação do ramo gástrico no DMV é maior que a representação da área de aplicação do traçador (Berthoud; Carlson; Powley, 1991), uma vez que CTb foi aplicada restritamente no corpo e antro gástrico. Entretanto, alguns neurônios que foram marcados pelo traçador retrógrado não foram imunomarcados para ATF-3 (4,8%). Esta pequena quantidade de células não marcadas pode ser proveniente de outro ramo, uma vez que parte do antro é innervada pela divisão hepática do vago subdiafragmático (Berthoud; Carlson; Powley, 1991) ou ainda de neurônios contralaterais do ramo gástrico posterior (Fox; Powley, 1985). Os presentes resultados indicam que o ATF-3 funciona como um excelente marcador de lesão em neurônios autonômicos do DMV, mesmo quando a axotomia é realizada em um ponto distante do soma, sendo admitido que sua expressão é induzida em praticamente todos os neurônios axotomizados. Esses achados estão de acordo com aqueles encontrados em neurônios do gânglio da raiz dorsal e em motoneurônios da medula espinal (Tsujino et al., 2000).

Para testar a capacidade da expressão induzida do ATF-3 de reproduzir a organização topográfica dos distintos ramos subdiafragmáticos, cada um dos ramos foi seccionado isoladamente. De acordo com trabalhos anteriores, neurônios do DMV são organizados em colunas longitudinais (Fox; Powley, 1985; Hopkins et al., 1996; Powley; Fox; Berthoud, 1987). Após axotomia do ramo gástrico anterior, uma grande quantidade de células imunorreativas foi observada no terceiro quarto da divisão médio-lateral do DMV, ocorrendo em menor número nos dois quartos mediais e praticamente ausentes no quarto lateral,

confirmando resultados de estudos anteriores (Fox; Powley, 1985; Norgren; Smith, 1988; Powley; Fox; Berthoud, 1987). Dentre os três ramos analisados o gástrico é o ramo que apresenta maior quantidade de células em números absolutos e relativos, alcançando um pico de células em $-33 \mu\text{m}$ em relação ao extremo rostral da área postrema, correspondendo a 64% da eferência do DMV. Okumura e Namiki (1990) demonstraram que além de uma organização colunar entre os órgãos subdiafragmáticos, existe também uma organização órgão específica, de forma que a coluna gástrica apresenta uma subdivisão medial, com células que inervam o corpo e antro, e outra lateral, onde estão localizados os neurônios que dirigem seus axônios para o fundo do estômago. Este padrão de distribuição não foi avaliado no presente estudo.

O ramo acessório celíaco também apresenta uma organização colunar no DMV esquerdo. Esta coluna se localiza no polo lateral do núcleo (Fox; Powley, 1985; Norgren; Smith, 1988; Powley; Fox; Berthoud, 1987), com algumas células sendo ocasionalmente encontradas na porção mais medial e sobrepondo à coluna gástrica (Fox; Powley, 1985; Norgren; Smith, 1988). No presente trabalho também confirmamos esta observação. Em nossos resultados, 60% das células que projetam por esse ramo foram localizadas lateralmente à coluna de células representadas pelo ramo gástrico. Esta coluna é bem definida e atinge o pico de células um pouco mais caudal ($-121 \mu\text{m}$) quando comparada àquela que representa o ramo gástrico. Fox e Powley (1985), afirmaram que a maior quantidade de células ocorre nos dois terços caudais do DMV, onde esta organização colunar é mais bem definida. Nos níveis mais rostrais estas células são encontradas em menor número e dispersas (Fox; Powley, 1985; Norgren, Smith; 1988).

Em relação ao ramo hepático, foi estimado que o maior número de células encontra-se a $-3 \mu\text{m}$ (Figura 8), apresentando uma distribuição difusa em seu eixo médio-lateral com células se sobrepondo a coluna gástrica. Foi o ramo com menor número de células, correspondendo a 14,57% do número observado no ramo gástrico e 62,31% do ramo acessório celíaco, quando comparado o nível de máxima representação no DMV. Uma tendência desses neurônios em ocupar uma posição mais dorsal no núcleo foi verificada, entretanto, um padrão de distribuição médio-lateral não foi estabelecido. Essa organização difusa, com seus neurônios se sobrepondo às demais colunas, se assemelha aos padrões descritos anteriormente (Fox; Powley, 1985; Norgren, Smith; 1988).

Em nossos resultados, a axotomia de qualquer dos ramos vagais analisados resultou na marcação anti-ATF-3 no NA. Essa marcação foi observada em um pequeno número de

neurônios que se localizaram dorsalmente no núcleo e apenas nas porções rostrais (rostral a 400 μm). Em experimentos com aplicação de traçadores no estômago (Takayama; Ishikawa; Miura, 1981) também demonstraram a marcação no NA, sobretudo quando a administração ocorreu na cárdia e curvatura menor. O papel fisiológico dos neurônios do NA que projetam para estruturas subdiafragmáticas ainda não é bem conhecido, no entanto, alguns estudos eletrofisiológicos demonstraram um aumento da secreção de bicarbonato após estimulação destes neurônios (Zhang; Ai; Cui, 2006).

Após a axotomia, todos os três ramos analisados exibiram marcação também no lado oposto à lesão (Figura 9), sugerindo um cruzamento de fibras entre os dois nervos vagos. Esses neurônios foram poucos em número e não foram encontrados em todos os níveis analisados. Em oposição a esse resultado, nenhuma marcação contralateral foi verificada quando traçadores foram captados pelo ramo acessório celíaco (Fox; Powley, 1985; Norgren; Smith, 1988). Como estes neurônios são poucos em número (Figura 9, painel B) talvez suas fibras não tenham tido contato com o traçador ou representam um pequeno percentual de fibras que não são capazes de conduzir retrogradamente estes traçadores após lesão axonal.

Em resumo os resultados demonstram que a expressão induzida do ATF-3 reproduz padrões topográficos com extrema eficiência, sendo seus resultados consistentes e em acordo com os padrões previamente demonstrados na literatura. A partir dessa análise, foi observado que aproximadamente 85% dos neurônios eferentes no DMV projetam para as estruturas subdiafragmáticas, sendo que 64% desta eferência projeta via ramo gástrico, 11% via acessório celíaco e 9% através do ramo hepático.

A expressão de ATF-3 foi também utilizada para avaliar a expressão de enzimas envolvidas com a síntese de neurotransmissores e que definem o código químico de neurônios do DMV como colinérgicos, catecolaminérgicos ou nitrérgicos. No presente trabalho ChAT foi utilizada como marcador de neurônios do DMV. Após axotomia esses neurônios ATF-3⁺ apresentaram três padrões de marcação em relação à enzima ChAT: o primeiro tipo apresenta substancial marcação anti-ChAT, o segundo apresenta uma redução na intensidade da marcação e o terceiro uma completa ausência. Estudos que utilizaram a vagotomia cervical descrevem resultados conflitantes em relação à expressão desta enzima após lesão axonal. Helke, Handelmann e Jacobowitz (1983), não verificaram mudanças na expressão dessa enzima 7 a 8 dias após a vagotomia. Em contrapartida, Hoover, Hancock e DePorter (1985), descreveram uma redução de 36% na imunoreatividade para ChAT duas semanas após vagotomia. Lams, Isacson e Sofroniew (1988), concluíram que após 7 dias de axotomia cervical esquerda, os neurônios permanecem vivos, pois preservam a marcação intracelular do

traçador retrógrado True Blue, mas a expressão de ChAT reduz drasticamente em relação ao DMV contralateral. Consistente com estes dados foi observado em nosso trabalho que mesmo se tratando de uma população localizada dentro de um mesmo núcleo estes neurônios parecem responder de maneira diferente à lesão. Verificamos ainda que os neurônios que não apresentam marcação para ChAT são facilmente identificados pela expressão induzida do ATF-3, indicando que o pequeno número de neurônios que apresentam completa ausência de expressão da enzima após axotomia ainda estão presentes dentro do DMV, em concordância com os dados encontrados por Lams, Isacson e Sofroniew (1988), que possibilita a conclusão que no tempo avaliado da axotomia, não ocorra a redução do número de neurônios e sim alteração na expressão dessa enzima.

A figura 10A ilustra experimento conduzido para identificar a expressão de TH em neurônios do DMV após axotomia ramo específico. Essa enzima foi observada nas delimitações do DMV (Chong et al., 1982; Guo et al., 2001; Sjaud et al., 1990; Yang; Zhao; Miselis, 1999) e associada principalmente à inervação gástrica (Guo et al., 2001; Helke et al., 2004). Os presentes resultados indicam que dentre os três ramos subdiafragmáticos analisados somente o ramo gástrico apresentou dupla marcação para ATF-3/TH (Figura 10), indicando que neurônios catecolaminérgicos do DMV não projetam via ramo hepático ou acessório celíaco. Estas células, pouco abundantes, foram mais frequentemente encontradas em níveis mais caudais do DMV. Tsukamoto et al. (2005), afirmaram que menos de 10% dos neurônios que projetam para o trato gastrointestinal são positivos para TH. Dentre este pequeno número de neurônios catecolaminérgicos do DMV, 88% são dopaminérgicos e 12% noradrenérgicos de acordo com Yang, Zhao e Miselis (1999). Na grande maioria dos neurônios TH positivos do DMV, observou-se também a marcação anti-ChAT. Não foi observada a marcação anti-ATF-3 em neurônios unicamente TH positivos. Entretanto, algumas células marcadas apenas para TH (Figura 10, painel C, cabeça de seta) foram observadas no DMV e as mesmas se assemelham morfológicamente aos neurônios do NTS. Esses achados sugerem que tais neurônios pertençam ao NTS, embora presentes nos limites do DMV.

Neurônios do DMV também são capazes de ativar processos adaptativos e reparativos em resposta a estímulos fisiológicos e patológicos. A axotomia é um dos modelos descritos na literatura para estudar a resposta neuronal à injúria e plasticidade neuronal (Koliatsos; Price, 1996). Nossos resultados indicam um aumento significativo do número de neurônios do DMV imunorreativos para a nNOS cinco dias após a axotomia vagal (Figura 11) quando

comparados com animais controle (Figura 12). É descrito na literatura que o aumento da expressão de nNOS após a axotomia depende da distância da secção ao soma, da idade do desenvolvimento neuronal e do trato ou nervo envolvido. Lee et al. (2003), descreveram o aumento na expressão da nNOS em células ganglionares da retina, que normalmente não expressam essa enzima, após a secção do nervo óptico em ratos adultos. Segundo os autores o pico da expressão de nNOS acontece cinco dias após a axotomia, mesmo tempo utilizado no presente trabalho, e sugerem uma relação entre a expressão de nNOS e a ativação de processos neurodegenerativos. Resultados diferentes foram observados na retina de ratos de idade pós-natal P7. A axotomia do nervo óptico nessa idade, causa a morte da maioria das células da retina, entretanto, o aumento da expressão de nNOS não é observado, trazendo a sugestão que o NO não está envolvido na neurodegeneração nessa etapa do desenvolvimento (Patel; Gentleman; Garey, 1997). Também verificamos em nosso trabalho que nem todos os neurônios axotomizados expressam nNOS (dados não mostrados) e que alguns neurônios positivos para nNOS/ATF-3 não expressam ChAT (Figura 11), cinco dias após axotomia. Assim sugerimos que alguns neurônios respondem a axotomia de maneiras diferentes, apresentando uma mudança tempo dependente no padrão de expressão enzimático que varia de célula para célula no DMV. Em última análise, a expressão induzida do ATF-3 identifica com precisão os neurônios axotomizados, entretanto, como a lesão induz uma série de mudanças nos padrões enzimáticos, este método deve ser utilizado com cautela.

7. CONCLUSÃO

Dentre os marcadores utilizados no presente trabalho somente o ATF-3 foi induzido após lesão axonal, uma vez que, nestina e GAP-43 não apresentaram marcação em neurônios do DMV. A nestina apresentou apenas uma intensa marcação em vasos sanguíneos dentro do tronco cerebral. Os presentes resultados indicam que o ATF-3 possui uma eficiência de marcação acima de 95% após axotomia, mesmo quando a lesão é realizada em um ponto distante do corpo celular, reproduzindo padrões topográficos com extrema eficiência, sendo seus resultados consistentes e em acordo com os padrões previamente demonstrados na literatura, por meio do uso de outras técnicas.

Assim sugerimos que a identificação da projeção dos neurônios através da expressão induzida do ATF-3 é um excelente meio para estudos topográficos, no entanto, como a lesão induz uma série de mudanças nos padrões de expressão enzimáticos destes neurônios, este método deve ser utilizado com cautela quando o objetivo principal do estudo depender da integridade destes códigos químicos.

REFERÊNCIAS

- Abankwa D, Küry P, Müller HW. Dynamic changes in gene expression profiles following axotomy of projection fibres in the Mammalian CNS. *Mol Cell Neurosci* 21(3):421-435, 2002.
- Abe N, Cavalli V. Nerve injury signaling. *Curr Opin Neurobiol* 18(3):276-83, 2008.
- Aldskogius H, Barron KD, Regal R. Axon reaction in dorsal motor vagal and hypoglossal neurons of the adult rat. Light microscopy and RNA-cytochemistry. *J Comp Neurol* 193(1):165-177, 1980.
- Aldskogius H, Barron KD, Regal R. Axon reaction in hypoglossal and dorsal motor vagal neurons of adult rat: incorporation of [³H]leucine. *Exp Neurol* 85(1):139-151, 1984.
- Armstrong DM, Ross CA, Pickel VM, Joh TH, Reis DJ. Distribution of dopamine-, noradrenaline-, and adrenaline-containing cell bodies in the rat medulla oblongata: demonstrated by the immunocytochemical localization of catecholamine biosynthetic enzymes. *J Comp Neurol* 212(2):173-187, 1982.
- Barron KD, McGuinness CM, Misantone LJ, Zanakis MF, Grafstein B, Murray M. RNA content of normal and axotomized retinal ganglion cells of rat and goldfish. *J Comp Neurol* 236(2):265-73, 1985.
- Beckstead RM, Morse JR, Norgren R. The nucleus of the solitary tract in the monkey: projections to the thalamus and brain stem nuclei. *J Comp Neurol* 190(2):259-82, 1980.
- Berthoud HR, Carlson NR, Powley TL. Topography of efferent vagal innervation of the rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 260(1):200-207, 1991.
- Berthoud HR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci* 85(1-3):1-17, 2000.
- Boeshore KL, Schreiber RC, Vaccariello SA, Sachs HH, Salazar R, Lee J, Ratan RR, Leahy P, Zigmond RE. Novel changes in gene expression following axotomy of a sympathetic ganglion: a microarray analysis. *J Neurobiol* 59(2):216-235, 2004.
- Browning KN, Travagli RA. Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. *Compr Physiol* 4(4):1339-68, 2014.
- Champagnat J, Denavit-Saubié M, Grant K, Shen KF. Organization of synaptic transmission in the mammalian solitary complex, studied in vitro. *J Physiol* 381(1):551-573, 1986.
- Chen BP, Liang G, Whelan J, Hai T. ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* 269(22):15819-15826, 1994.

- Chen BP, Wolfgang CD, Hai T. Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol Cell Biol* 16(3):1157-1168, 1996.
- Chong MS, Fitzgerald M, Winter J, Hu-Tsai M, Emson PC, Wiese U, Woolf CJ. GAP-43 mRNA in Rat Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia Neurons: Developmental Changes and Re-expression Following Peripheral Nerve Injury. *Eur J Neurosci* 4(10):883-895, 1992.
- Contreras RJ, Gomez MM, Norgren R. Central origins of cranial nerve parasympathetic neurons in the rat. *J Comp Neurol* 190(2):373-394, 1980
- Curran T, Morgan JJ. Memories of fos. *Bioessays* 7(6):255-258, 1987.
- De la Monte SM, Federoff HJ, Ng SC, Grabczyk E, Fishman MC. GAP-43 gene expression during development: persistence in a distinctive set of neurons in the mature central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 46(2):161-168, 1989.
- 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, 1981a.
- Ellison JP, Clark GM. Retrograde Axonal Transport of Horseradish Peroxidase in Peripheral Autonomic Nerves. *J Comp Neurol* 161(1):103-13, 1975.
- Fogel R, Zhang X, Renehan WE. Relationships between the morphology and function of gastric and intestinal distention-sensitive neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Comp Neurol* 364(1):78-91, 1996.
- Fox EA, Powley TL. Longitudinal columnar organization within the dorsal motor nucleus represents separate branches of the abdominal vagus. *Brain Res* 341(2):269-282, 1985.
- Fox EA, Powley TL. Morphology of identified preganglionic neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Comp Neurol* 322(1):79-98, 1992.
- Gabella G, Pease HL. Number of axons in the abdominal vagus of the rat. *Brain Research* 58(2): 465-469, 1973.
- Gao H, Glatzer NR, Williams KW, Derbenev AV, Liu D, Smith BN. Morphological and electrophysiological features of motor neurons and putative interneurons in the dorsal vagal complex of rats and mice. *Brain Res* 1291:40-52, 2009.
- Greenberg ME, Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311(5985):433-438, 1984.
- Guo JJ, Browning KN, Rogers RC, Travagli RA. Catecholaminergic neurons in rat dorsal motor nucleus of vagus project selectively to gastric corpus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280(3):361-367, 2001.
- Haas CA, Donath C, Kreutzberg GW. Differential expression of immediate early genes after transection of the facial nerve. *Neuroscience* 53(1):91-99, 1993.

- Hanz S, Fainzilber M. Retrograde signaling in injured nerve--the axon reaction revisited. *J Neurochem* 99(1):13-19, 2006.
- Hayakawa T, Takanaga A, Tanaka K, Maeda S, Seki M. Distribution and ultrastructure of dopaminergic neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus projecting to the stomach of the rat. *Brain Res* 1006(1):66-73, 2004.
- Helke CJ, Handelmann GE, Jacobowitz DM. Choline acetyltransferase activity in the nucleus tractus solitarius: regulation by the afferent vagus nerve. *Brain Res Bull* 10(4):433-436, 1983.
- Herdegen T, Skene P, Bähr M. The c-Jun transcription factor--bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci* 20(5):227-31, 1997.
- Hoover DB, Barron SE. Localization and Acetylcholinesterase Content of Vagal Efferent Neurons. *Brain Res Bull* 8(3):279-284, 1982.
- Hoover DB, Hancock JC, DePorter TE. Effect of vagotomy on cholinergic parameters in nuclei of rat medulla oblongata. *Brain Res Bull* 15(1):5-11, 1985.
- Hopkins DA, Bieger D, deVente J, Steinbusch WM. Vagal efferent projections: viscerotopy, neurochemistry and effects of vagotomy. *Prog Brain Res* 107:79-96, 1996.
- Hsu JC, Bravo R, Taub R. Interactions among LRF-1, JunB, c-Jun, and c-Fos define a regulatory program in the G1 phase of liver regeneration. *Mol Cell Biol* 12(10):4654-4665, 1992.
- Hsu JC, Laz T, Mohn KL, Taub R. Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(9):3511-3515, 1991.
- Hunt D, Raivich G, Anderson PN. Activating transcription factor 3 and the nervous system. *Front Mol Neurosci* 5:7, 2012.
- Jarvinen MK, Powley TL. Dorsal motor nucleus of the vagus neurons: a multivariate taxonomy. *J Comp Neurol* 403(3):359-377, 1999.
- Jenkins R, Hunt SP. Long-term increase in the levels of c-jun mRNA and jun protein-like immunoreactivity in motor and sensory neurons following axon damage. *Neurosci Lett* 129(1):107-110, 1991.
- Jenkins R, Tetzlaff W, Hunt SP. Differential expression of immediate early genes in rubrospinal neurons following axotomy in rat. *Eur J Neurosci* 5(3):203-9, 1993.
- 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.
- Koliatsos VE, Price DL. Axotomy as an experimental model of neuronal injury and cell death. *Brain Pathol* 6(4):447-465, 1996.

- Kuo LT, Simpson A, Schänzer A, Tse J, An SF, Scaravilli F, Groves MJ. Effects of systemically administered NT-3 on sensory neuron loss and nestin expression following axotomy. *J Comp Neurol* 482(4):320-332, 2005.
- Lalli E, Sassone-Corsi P. Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* 269(26):17359-17362, 1994.
- Lams BE, Isacson O, Sofroniew MV. Loss of transmitter-associated enzyme staining following axotomy does not indicate death of brainstem cholinergic neurons. *Brain Res* 475(2):401-406, 1988.
- Lau LF, Nathans D. Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(5): 1182–1186, 1987.
- Lee EJ, Kim KY, Gu TH, Moon JI, Kim IB, Lee MY, Oh SJ, Chun MH. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in the axotomized ganglion cells of the rat retina. *Brain Res* 986(1-2):174-180, 2003.
- Legros G, Griffith CA. The abdominal vagal system in rats. An anatomical study with emphasis upon the distribution of the gastric vagi to the stomach. *J Surg Res* 9(3):183-6, 1969.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60(4):585-595, 1990.
- Levine J; Skene P; Willard M. GAPs and fodrin: Novel axonally transported proteins. *Trends in Neurosciences* 4:273–277, 1981.
- Lewis PR, Scott JA, Navaratnam V. Localization in the dorsal motor nucleus of the vagus in the rat. *J Anat* 107(2): 197-208, 1970.
- Liang L, Wang Z, Lü N, Yang J, Zhang Y, Zhao Z. Involvement of nerve injury and activation of peripheral glial cells in tetanic sciatic stimulation-induced persistent pain in rats. *J Neurosci Res* 88(13):2899-28910, 2010.
- Liang G, Wolfgang CD, Chen BP, Chen TH, Hai T. ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation. *J Biol Chem* 271(3):1695-701, 1996.
- Lorenz T, Willard M. Subcellular fractionation of intra-axonally transport polypeptides in the rabbit visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(1):505-9, 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):157-175, 1981.
- McLean JH, Hopkins DA. Ultrastructural identification of labeled neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve following injections of horseradish peroxidase into the vagus nerve and brainstem. *J Comp Neurol* 206(3):243-252, 1982.

- M'hamed SB, Sequeira H, Poulain P, Bennis M, Roy JC. Sensorimotor cortex projections to the ventrolateral and the dorsomedial medulla oblongata in the rat. *Neurosci Lett* 164(1-2):195-198, 1993.
- Misher A, Brooks FP. Electrical stimulation of hypothalamus and gastric secretion in the albino rat. *Am J Physiol* 211: 403-406, 1966.
- Morest DK. Experimental study of the projections of the nucleus of the tractus solitarius and the area postrema in the cat. *J Comp Neurol* 130(4):277-300, 1967.
- Nanobashvili JD, Stacher G, Windberger U, Dudczak R, Liegl C, Gorgadze V, Losert U, Heinzl H, Neumayer C. Regenerative potential of abdominal vagal nerves in rats. *Am J Physiol* 266(1):G140-G146, 1994.
- Norgren R. Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience* 3(2):207-218, 1978.
- Norgren R, Smith GP. Central distribution of subdiaphragmatic vagal branches in the rat. *J Comp Neurol* 273(2):207-223, 1988.
- Nosaka S. Electrophysiologic identification of preganglionic neurons in rat dorsal motor nucleus and analysis of vagus afferent projections. *Exp Neurol* 91(2): 366-381, 1986.
- Okumura T, Namiki M. Vagal motor neurons innervating the stomach are site-specifically organized in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in rats. *J Auton Nerv Syst* 29(2):157-162, 1990.
- Patel JI, Gentleman SM, Jen LS, Garey LJ. Nitric oxide synthase in developing retinas and after optic tract section. *Brain Res* 761(1):156-160, 1997.
- Prechtl JC, Powley TL. A light and electron microscopic examination of the vagal hepatic branch of the rat. *Anat Embryol* 176, (1): 115–126, 1987.
- Prechtl JC, Powley TL. Organization and distribution of the rat subdiaphragmatic vagus and associated paraganglia. *J Comp Neurol* 235(2):182-195, 1985.
- Powley TL, Fox EA, Berthoud HR. Retrograde tracer technique for assessment of selective and total subdiaphragmatic vagotomies. *Am J Physiol* 253(2):361-370, 1987.
- Powley TL, Prechtl JC, Fox EA, Berthoud HR. Anatomical considerations for surgery of the rat abdominal vagus: distribution, paraganglia and regeneration. *J Auton Nerv Syst* 9(1):79-97, 1983.
- Rishal I, Fainzilber M. Retrograde signaling in axonal regeneration. *Exp Neurol* 223(1):5-10, 2010.
- Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4(4):477-485, 1990.

Shin AC, Zheng H, Berthoud HR. Vagal innervation of the hepatic portal vein and liver is not necessary for Roux-en-Y gastric bypass surgery-induced hypophagia, weight loss, and hypermetabolism. *Ann Surg* 255(2):294-301, 2012.

Shokouhi BN, Wong BZ, Siddiqui S, Lieberman AR, Campbell G, Tohyama K, Anderson PN. Microglial responses around intrinsic CNS neurons are correlated with axonal regeneration. *BMC Neurosci* 11:13, 2010.

Siaud P, Puech R, Assenmacher I, Alonso G. Adrenergic innervation of the dorsal vagal motor nucleus: possible involvement in inhibitory control of gastric acid and pancreatic insulin secretion. *Cell Tissue Res* 259(3):535-542, 1990.

Skene JH, Willard M. Electrophoretic analysis of axonally transported proteins in toad retinal ganglion cells. *J Neurochem* 37(1):79-87, 1981a.

Skene JH, Willard M. Changes in axonally transported proteins during axon regeneration in toad retinal ganglion cells. *J Cell Biol* 89(1):86-95, 1981b.

Skene JH, Willard M. Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems. *J Cell Biol* 89(1):96-103, 1981c.

Skene JH, Willard M. Characteristics of growth-associated polypeptides in regenerating toad retinal ganglion cell axons. *J Neurosci* 1(4):419-426, 1981d.

Smith GP, Jerome C. Effects of total and selective abdominal vagotomies on water intake in rats. *J Auton Nerv Syst* 9(1):259-271, 1983.

Sterner MR, Fox EA, Powley TL. A retrograde tracer strategy using True Blue to label the preganglionic parasympathetic innervation of the abdominal viscera. *J Neurosci Methods* 14(4):273-280, 1985.

Stimpson CD, Tetreault NA, Allman JM, Jacobs B, Butti C, Hof PR, Sherwood CC. Biochemical specificity of von Economo neurons in hominoids. *Am J Hum Biol* 23(1):22-8, 2011.

Sugitani A, Yoshida J, Nyhus LM, Donahue PE. Viscerotopic representation of preganglionic efferent vagus nerve in the brainstem of the rat: a Fluoro-Gold study. *J Auton Nerv Syst* 34(2-3):211-219, 1991.

Schwaber JS, Kapp BS, Higgins G. The origin and extent of direct amygdala projections to the region of the dorsal motor nucleus of the vagus and the nucleus of the solitary tract. *Neurosci Lett* 20(1):15-20, 1980.

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):353-359, 2009.

Takeuchi Y, Matsushima S, Matsushima R, Hopkins DA. Direct amygdaloid projections to the dorsal motor nucleus of the vagus nerve: a light and electron microscopic study in the rat. *Brain Res* 280(1):143-7, 1983.

Takayama K, Ishikawa N, Miura M. Sites of origin and termination of gastric vagus preganglionic neurons: an HRP study in the rat. *J Auton Nerv Syst* 6(2):211-223, 1982.

ter Horst GJ, Luiten PG, Kuipers F. Descending pathways from hypothalamus to dorsal motor vagus and ambiguus nuclei in the rat. *J Auton Nerv Syst* 11(1):59-75, 1984.

Tetzlaff W, Alexander SW, Miller FD, Bisby MA. Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43. *J Neurosci* 11(8):2528-2544, 1991.

Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K. Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci* 15(2):170-182, 2000.

Tsukamoto K, Hayakawa T, Maeda S, Tanaka K, Seki M, Yamamura T. Projections to the alimentary canal from the dopaminergic neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus of the rat. *Auton Neurosci* 123(1-2):12-18, 2005.

Uno T, Shogaki K, Bamba H, Koike S, Naruse Y, Ijima N, Tanaka M, Hisa Y. Growth associated protein-43 mRNA expression in nucleus ambiguus motoneurons after recurrent laryngeal nerve injury in the rat. *Acta Otolaryngol* 123(2):292-296, 2003.

Wang FB, Young YK, Kao CK. Abdominal vagal afferent pathways and their distributions of intraganglionic laminar endings in the rat duodenum. *J Comp Neurol* 520(5):1098-1113, 2012.

Woolf CJ, Reynolds ML, Molander C, O'Brien C, Lindsay RM, Benowitz LI. The growth-associated protein GAP-43 appears in dorsal root ganglion cells and in the dorsal horn of the rat spinal cord following peripheral nerve injury. *Neuroscience* 34(2):465-478, 1990.

Yang M, Zhao X, Miselis RR. The origin of catecholaminergic nerve fibers in the subdiaphragmatic vagus nerve of rat. *J Auton Nerv Syst* 76(2-3):108-117, 1999.

Zhang X, Fogel R, Renehan WE. Physiology and morphology of neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus and the nucleus of the solitary tract that are sensitive to distension of the small intestine. *J Comp Neurol* 323(3):432-448, 1992.

Zhang XY, Ai HB, Cui XY. Effects of nuclei ambiguus and dorsal motor nuclei of vagus on gastric H⁺ and HCO₃⁻ secretion in rats. *World J Gastroenterol* 12(20): 3271-3274, 2006.

ANEXOS A

APROVAÇÃO DO PROJETO NO CEUA–UFTM/346



Ministério da Educação
 Universidade Federal do Triângulo Mineiro
 CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Rua Madre Maria José, nº122 – Unidade Administrativa Temporária II - Bairro Abadia
 CEP: 38025-100 – Uberaba - MG - Telefone: (034) 3318 5764 - E-mail: ceua@pesqpg.uftm.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Vagotomia subdiafragmática e análise da expressão dos marcadores de lesão neuronal nestina, GAP-43 e ATF-3 no núcleo dorsal motor do nervo vago**”, protocolo nº 346, sob a responsabilidade de Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em reunião de 03/07/2015.

Vigência do projeto	03/07/2015 à 02/07/2019
Espécie/Linhagem	Ratos Heterogênicos Wistar
Nº de animais	30
Peso/idade	70 à 100 gramas / 28 à 32 dias
Gênero	Fêmeas
Origem	Biotério da disciplina de Fisiologia da UFTM

Profª. Drª. Rosângela Soares Chriguer
 Coordenadora da CEUA

ANEXOS B

APROVAÇÃO DO PROJETO NO CEUA–UFTM/303



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: Análise da expressão de marcadores de lesão neuronal no núcleo dorsal motor do nervo vago após axotomia de ramos específicos do vago subdiafragmático
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM: 22/11/2013
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 303

SUMÁRIO DO PROJETO

1. OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)

Objetivo geral: determinar a expressão de marcadores de lesão neuronal (nestina, GAP-43, ATF-3) em neurônios do núcleo dorsal motor do nervo vago (DMNV) após a axotomia de ramos específicos do nervo vago subdiafragmático em ratos.

Objetivos específicos:

- 1) Identificar a distribuição e características morfológicas de neurônios do DMNV que projetam via ramos específicos: ramo gástrico anterior, hepático e celíaco.
- 2) Determinar a porcentagem de neurônios reativos para cada marcador em seções adjacentes após axotomia de cada ramo do vago subdiafragmático.
- 3) Determinar a possível colocalização e porcentagem de colocalização da expressão de: ATF-3/nestina e GAP-43/nestina.

2. JUSTIFICATIVA

O presente projeto explora a hipótese que a lesão de fibras autonômicas vagas específicas e a expressão de marcadores de lesão neuronal podem ser utilizados no estudo da localização neuronal. Os eventos celulares que ocorrem após lesão do nervo e que visam a regeneração axonal são complexos e envolvem mudanças na expressão gênica. Entre os genes que sofrem modificação na expressão após lesão axonal estão incluídos os que codificam a proteína associada ao crescimento de 43 kDa (GAP-43), nestina e fator 3 ativador da transcrição (ATF-3). O presente trabalho visa avaliar a expressão desses marcadores em neurônios autonômicos parassimpáticos após o seccionamento (axotomia) de ramos específicos do nervo vago subdiafragmático e experimentos de imunofluorescência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

1 Cirurgia para a indução de lesão do nervo vago subdiafragmático:

Os ratos serão anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina/xilazina (80/10 mg/Kg). O animal será imobilizado em decúbito dorsal em cama cirúrgica e submetido à tricotomia e assepsia (álcool iodado) do abdômen. Para o seccionamento de um dos ramos do vago subdiafragmático, será feita uma incisão ao longo da linha média do abdômen (laporotomia mediana). Após a exposição das vísceras abdominais as mesmas serão ligeiramente deslocadas para a exposição do esôfago abdominal e músculo diafragma. A parede do esôfago será inspecionada para a localização do ramo vaginal anterior (avt).



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: Análise da expressão de marcadores de lesão neuronal no núcleo dorsal motor do nervo vago após axotomia de ramos específicos do vago subdiafragmático
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM: 22/11/2013
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 303

Após a identificação do ramo vagal anterior o mesmo será seguido distalmente para se observar a emergência do ramo celíaco (acb), hepático (hb) e gástrico anterior (agb). Após a identificação de cada um desses ramos, um deles será escolhido para o seccionamento de acordo com o grupo experimental. Para garantir uma axotomia completa de um dos ramos do nervo vago escolhido, será feita uma transecção proximal e outra distal, com uma distância de 4 a 5 mm entre elas. O fragmento do ramo seccionado será removido, fixado em paraformaldeído a 4%, e armazenado para análise morfológica de suas fibras. Dessa forma, os animais a serem utilizados serão subdivididos em 3 grupos experimentais sendo que cada grupo corresponde ao estudo da axotomia de um dos ramos do nervo vago. Cada grupo será composto por 10 ratos sendo que 5 serão axotomizados e 5 serão controle (cirurgia sem seccionamento do nervo).

Após o seccionamento de um dos ramos do vago subdiafragmático, será feita a lavagem com soro fisiológico e a incisão será fechada por sutura (agulha Wundnadeln e linha de algodão) em massa com pontos separados. Os animais serão recolocados no biotério para recuperação pós-cirúrgica em caixas individuais. Para os diferentes marcadores de lesão neuronal que serão utilizados (ver abaixo) deverá ser definida uma janela temporal ideal entre a lesão axonal e a expressão desses marcadores no soma desses neurônios no bulbo. De início, baseado em dados da literatura (Tsuji et al., 2000; Takaoka et al., 2009; Zigmond e Vaccariello, 2007; Chong et al., 1994; Sachs et al., 2007), um intervalo de 5 dias entre lesão do nervo e coleta dos tecidos para a imunomarcagem será utilizado. Será feita antibioticoterapia pós-operatória (0,1 ml/100 gramas, intramuscular; pentabiótico veterinário de pequeno porte) administrada com dose única imediatamente após o término da cirurgia a fim de evitar infecções decorrentes dos procedimentos realizados. Os animais também receberão ao final da cirurgia e antes da recuperação da anestesia uma injeção intraperitoneal do anti-inflamatório/analgésico não esteroide Meloxicam (2 mg/kg).

2 Cirurgia para a coleta de tecido, criosecção e montagem das lâminas:

Decorrido os cinco dias após cirurgia de vagotomia, os animais serão anestesiados com uma overdose de tiopental sódico (100 mg/Kg) administrado pela via intraperitoneal. A confirmação da anestesia será feita pelo pinçamento da cauda e ausência do reflexo de retirada. Em seguida, os animais serão perfundidos transcardiacamente para a lavagem de sangue dos tecidos, por cinco minutos com uma solução salina (PBS) da seguinte composição: 142 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 8,06 mM Na₂HPO₄, pH 7,4. Para isto, os animais serão colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica, com os quatro membros fixados em abdução. Dentro de uma capela de exaustão de gases, será realizada uma incisão mediana longitudinal da parede abdominal até a caixa torácica. O músculo diafragma será cortado, para a realização do pneumotórax, e logo em seguida uma agulha ligada ao sistema de perfusão, será introduzida pelo ventrículo esquerdo até a aorta ascendente e clampeada com uma pinça e o átrio direito será perfurado para o escoamento do sangue e solução perfusora. A perfusão será realizada com uma bomba peristáltica (Incibrás BP-100) com fluxo de 10 ml/min. A solução de PBS será perfundida a 24 °C. Em seguida, será feita a perfusão com solução fixadora



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: Análise da expressão de marcadores de lesão neuronal no núcleo dorsal motor do nervo vago após axotomia de ramos específicos do vago subdiafragmático
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM: 22/11/2013
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 303

gelada constituída de paraformaldeído-lisina-periodato (PLP) com a seguinte composição: 0,01 M de metaperiodato de sódio (Sigma S1878), 0,075 M lisina (L-lysine monohydrochloride, Sigma L5626), 0,037 M de fosfato de sódio e 1% de PFA (Sigma, P6148) durante 30 minutos.

Após a perfusão do agente fixador, será realizada a dissecação cirúrgica do tronco encefálico. A calota craniana será aberta rapidamente para obtenção do acesso à cavidade craniana, onde o nervo vago será cuidadosamente seccionado, nos pontos onde esse emerge do tronco encefálico com auxílio de um estereomicroscópio (D.F. Vasconcellos M90). Em seguida, o bulbo e parte da ponte serão cortados e coletados. Os gânglios nodoso direito e esquerdo também serão coletados. Esses tecidos serão pós-fixados na solução fixadora acima descrita por quatro horas a 4° C. O bloco de tecido será retirado da pós-fixação e crioprotetido em solução de sacarose 30% em tampão fosfato de sódio 0,1 M até o tecido absorver a solução e submergir. Em seguida, o tecido será imerso em uma solução própria para congelamento Tissue-Tek (Sakura Finetek, Japan) em *blisters* de comprimidos e congelados pela imersão em n-hexano (32293-2, Sigma, USA) resfriado em nitrogênio líquido. O bloco congelado será seccionado em criostato Leica (CM1850 UV), em fatias coronais de 20 µm, montadas em lâminas gelatinizadas com sulfato de cromopotássio (Sigma-Aldrich). Devido a extensão rostro-caudal relativamente grande do núcleo dorsal motor do nervo vagal, nesse projeto será avaliada a marcação dos neurônios vagais numa extensão rostro-caudal de 800 µm, tendo como secção inicial o extremo caudal da área postrema. Será sistematizado a coleta de 1 corte a cada 10 cortes, de modo que 8 cortes serão necessários para cobrir a extensão pretendida. Esta sistematização será feita para cada marcador de lesão neuronal que será avaliado, de modo que 8 cortes serão coletados dessa região para cada marcador. Os gânglios nodosos direito e esquerdo serão congelados e cortados juntos (também a 20 µm) e colocados ao lado das secções do tronco na lâmina. Isto possibilitará que a reação de imuno seja desenvolvida em conjunto, no mesmo poço de reação. Após uma hora de secagem em temperatura ambiente controlada (24° C) o experimento de imunomarcação será iniciado. As secções montadas em lâminas, não utilizadas no mesmo dia, serão congeladas e mantidas em freezer (-80 °C) para experimentos posteriores.

4. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE PARA O USO DE ANIMAIS

O pesquisador justifica o uso de animais em ciência e educação pelos avanços do conhecimento científico promovidos por essa prática e principalmente na cura de doenças. Vários métodos alternativos ao uso de animais já estão sendo utilizados com sucesso em diversos projetos, como é o caso de estudos com células tumorais, tecidos coletados após cirurgia e que seriam normalmente descartados. Entretanto para o estudo de secção de nervo para análise das células de origem localizadas no sistema nervoso central o uso de animais é imprescindível.



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: Análise da expressão de marcadores de lesão neuronal no núcleo dorsal motor do nervo vago após axotomia de ramos específicos do vago subdiafragmático
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM: 22/11/2013
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 303

5. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA OS ANIMAIS E DESCRIÇÃO DAS RESPECTIVAS MEDIDAS PREVENTIVAS E CURATIVAS QUANDO NECESSÁRIO.

Durante o procedimento de anestesia há o risco de insuficiência da dose do anestésico utilizado previamente ao procedimento de laporotomia ou toracotomia para perfusão transcardíaca. A fim de evitar tal situação, o efeito adequado de anestesia será verificado previamente ao início do procedimento, sendo a dose de anestésico suplementada quando necessário. Será administrado analgésico/antiinflamatório não esteroide (Meloxicam) no pós-operatório. Será administrado também antibiótico (pentabiótico veterinário de pequeno porte) no pós-operatório para prevenção de infecção além dos cuidados de assepsia.

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

Risco de mordidas, perfurações 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, óculos de proteção, bem como o treinamento devido do aluno no manuseio de animais e nas práticas cirúrgicas.

7. COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO

Este protocolo foi avaliado e após correções obedece aos princípios éticos para experimentação animal.

PARECER DA CEUA: Aprovado em 21/02/2014.

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

Prof.ª Dr.ª Rosângela Soares Chriguer

Coordenadora da CEUA