SUZANA SOUZA SOUTO

**REFERÊNCIAS DO NÚCLEO
LATERAL SUPERIOR DA OLIVA NO RATO (*rattus
norvegicus*)**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.**

**São Paulo
2007**

SUZANA SOUZA SOUTO

**EFERÊNCIAS DO NUCLEO
LATERAL SUPERIOR DA OLIVA NO RATO (*rattus
norvegicus*)**

**Tese (Doutorado) apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.**

**Área de concentração:
Ciências Morfofuncionais**

**Orientador:
Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt**

**São Paulo
2007**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Suzana Souza Souto

Tese: Eferências do núcleo lateral superior do
rato (*rattus norvegicus*).

Orientador: Jackson Cioni Bittencourt.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em
sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Presidente Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

“Ainda que eu falasse línguas, as dos homens e dos anjos, se eu não tivesse o amor, seria como sino ruidoso ou címbalo estridente. Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda ciência; ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se eu não tivesse o amor, eu não seria nada”.

I Coríntios 13:1-2

DEDICATÓRIA

Ofereço este trabalho a algumas pessoas maravilhosas, doutores na arte prática da doação.

*Assim, dedico esta tese aos meus pais **Manoel Fernandes Souto e Josefa Souza Souto**, que me apoiaram e deram condições de seguir com meus estudos nestes incontáveis anos, pelos “cabelos brancos”, mas, sobretudo pelo amor e dedicação!*

*Ao meu querido e amado esposo **Alexandre de Oliveira**, meu complemento, com quem tenho o prazer de dividir a vida. Você é co-autor deste trabalho. Pelo amor, paciência, dedicação incondicional, paciência, incentivo e mais paciência e por todo o incentivo.*

*Aos meus queridos irmãos **Adriana e Márcio** e meus cunhados **Samuel e Kátia**, cientes de que meus momentos de ausência em nada abalam nosso amor fraternal. Obrigada pelo apoio.*

A todos vocês minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*A DEUS, pelo dom da vida! A ti toda honra, toda glória e todo louvor.
Agradeço por conceder-me condições para concluir este trabalho, pela força
física para enfrentar minha estrada e pelos amigos maravilhosos que colocou
no meu caminho nestes anos.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, amigo e profissional exemplar, **Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt** (“Chefe”) que me honrou, desde o ingresso no mestrado, com sua preciosa orientação. Por sua generosidade, seu incentivo, e sua confiança, demonstrando que sabedoria e humildade caminham juntas. Não se esqueça da frase: “Meu orientador, me oriente!”.

A **Prof. Dra. Carol Fuzeti Elias**, pela co-orientação em vários momentos nesta jornada. Por não ter permitido que eu desistisse no meio do caminho. Por ter feito minha matrícula, mesmo contra minha vontade e ensinar que “todo erro pode servir de controle”. E que na vida tudo pode melhorar.

A **Dra. Luciane Valéria Sita**, pela disposição que tem em ajudar e ensinar o que aprendeu pelo caminho das pedras: Endnote, Illustrator, Photoshop, Canvas, Image Pro Plus, pelas infinitas consultorias nos diversos assuntos do laboratório, pela “caixinha azul”, mas sobre tudo pelo apoio nos momentos difíceis, pela amizade. Eu sei que você é chata e você também sabe, mas é uma chata muito legal! Aproveito e agradeço também ao **Dr. Maurício**, pelas inúmeras amostras grátis e pelas consultas à distância.

A **Dra. Luciana Gonçalves** que tem me ajudado a ficar o mais “estável” possível.

Aos professores, que gentilmente participaram do exame de Qualificação deste trabalho, **Dr. Newton Sabino Canteras, Dra. Patrícia Castelucci e Dra. Renata Mota Mamede Carvalho**, pelas valiosas contribuições ao encaminhamento do estudo.

A **Profa. Dra. Ida Lichtig** pela iniciação em pesquisa e a **Profa. Dra. Eliane Schochat**, que apontou a pesquisa básica como um caminho a ser conquistado pela fonoaudiologia.

A **Cristina Ferraz Borges**, por ouvir os “desabafos”, histórias, por tentar me ensinar a fazer “cronogramas” e afinal pela nossa amizade.

Ao **Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez**, pela colaboração e disponibilidade com as inúmeras tentativas em nossos estudos em microscopia eletrônica.

A todos amigos do LNQ: Marisa, Gasquez, Fernando, Pavão, Paulo, Luciana, Luciane, Vivian, Tatiane, Bruno, Judney, Edmilson, Anne, Isabel, Anchieta, André, Viviane, Jô, Amanda, Tiago, Júnior, Marcelo e tantas outras personalidades que passaram por aqui. Obrigada pelos momentos de lazer “entre uma lavagem e outra”.

A Jô e Amanda, técnicas do LNQ, pelo auxílio nos experimentos.

Ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP, pela oportunidade oferecida para a realização do Curso de Pós-Graduação.

A todos os funcionários do biotério central e do Departamento de Anatomia da USP, por toda atenção, e pelos cuidados com os animais.

Aos funcionários do bloco didático de Anatomia da USP, pelo auxílio, atenção, competência e amizade. A todos os funcionários do Departamento de Anatomia e do ICB pela agradável convivência durante o curso. Aos funcionários da biblioteca do ICB da USP, pela gentileza e colaboração.

A Dra. Joan Vaughan e ao Dr. Wyllie Vale, do Salk Institute, pelo anticorpo anti-UCN 1.

A FAPESP que através dos processos de números 01/11464-0 e 04/00584-3 facultou a Bolsa de Estudos e os recursos materiais necessários à pesquisa.

A CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior, pela bolsa de estudo concedida.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, e que o estresse me fez esquecer, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
2. PROPOSIÇÃO	25
3. MATERIAL E MÉTODO	27
3.1. Animais	28
3.2. Perfusão dos animais	28
3.3. Estudo anterógrado	29
4. RESULTADOS	35
4.1. Estudo anterógrado	36
4.1.1. Local de injeção W766	39
4.1.2. Projeções do LSO	39
4.2. Casos controles	52
4.2.1. Local de injeção W736	52
4.2.2. Projeções do MVPO	52
4.2.7. Local de injeção W 731	60
4.2.8. Projeções do SPO	60
4.3. Dupla fluorescência UCN 1 e BDA	63
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE ABREVIACÕES

3V	terceiro ventrículo
4V	quarto ventrículo
7	núcleo facial
7n	nervo facial
8cn	via coclear do VIII par
8vn	via vestibular do VIII par
Aq	aqueduto
ATg	núcleo tegmental anterior
bas	artéria basilar
BIC	braço do colículo inferior
bic	braço do colículo inferior
bsc	braço do colículo superior
CE	células ciliadas externas
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
ChAT	colina acetiltransferase
CIC	núcleo central do colículo inferior
cic	comissura do colículo inferior
CLi	núcleo linear caudal da rafe
cll	comissura do lemnisco lateral
CPO	núcleo periolivar caudal
CPu	caudado putamen
CRF	fator liberador de corticotrofina

CRF1	receptor 1 de CRF
CRF2	receptor 2 de CRF
CRF-BP	proteína de ligação para CRF
CRFh	fator liberador de corticotrofina de humano
CRFo	fator liberador de corticotrofina de ovelha
CRFr	fator liberador de corticotrofina de rato
csc	comissura do colículo superior
D3v	terceiro ventrículo, parte dorsal
DC	núcleo coclear dorsal
DCIC	núcleo dorsal do colículo inferior
DLL	núcleo dorsal do leminisco lateral
DLPAG	substância cinzenta periaquedutal, parte dorsolateral
DMPAG	substância cinzenta periaquedutal, parte dorsomedial
DMTg	área tegmental, parte dorsomedial
DpG	camada cinzenta profunda do colículo superior
DpMe	núcleo mesencefálico profundo
DPO	região periolivar rostral
DpWh	camada branca profunda do colículo superior
ECIC	córtex externo do colículo inferior
eml	lâmina medular externa
EW	núcleo de Edinger-Westphal
F	campos de Forel
FG	fluorogold
fr	fascículo retroflexus

GABA	ácido γ -aminobutírico
GE	gânglio espiral
GrC	camada granular coclear
HDB	núcleo da banda diagonal de Broca
I8	núcleo intersticial do VIII par
ic	cápsula interna
icp	pedúnculo cerebelar inferior
ILL	núcleo intermédio do lemnisco lateral
InG	camada cinza intermédia do colículo superior
InWh	camada branca intermédia do colículo superior
LE	limbo espiral
lfp	fascículo longitudinal da ponte
LHA	área hipotalâmica lateral
ll	lemnisco lateral
LO	lâmina espiral óssea
LPAG	substância cinzenta periaquedutal, parte lateral
LPLR	núcleo do tálamo pósterolateral, parte laterorostral
LPMC	núcleo do tálamo pósterolateral, parte médiocaudal
LPMR	núcleo do tálamo pósterolateral, parte mediorostral
LSO	núcleo lateral superior da oliva
LVPO	núcleo lateroventral periolivar
MB	membrana basilar
MG	núcleo geniculado medial

MGD	núcleo geniculado medial do tálamo, parte dorsal
MGM	núcleo geniculado medial do tálamo, parte medial
MGV	núcleo geniculado medial do tálamo, parte ventral
MiTg	núcleo tegmental microcelular do pedúnculo cerebelar
ml	lemnisco medial
mlf	fascículo longitudinal medial
MM	núcleo mamilar medial, parte medial
MSO	núcleo medial superior da oliva
MT	membrana tectória
MV	membrana vestibular
MVPO	núcleo medioventral periolivar
NPY	neuropeptídeo Y
OC	órgão de corti
Op	camada óptica do colículo superior
PAG	substância cinzenta periaquedutal
pc	comissura posterior
PCGS	substância glial paracoclear
PL	núcleo paraleminiscal
PLi	núcleo talâmico limitante posterior
PPt	núcleo pretectal posterior
PVH	núcleo paraventricular do hipotálamo
py	pirâmide
RIP	núcleo interpósito da rafe
RPO	região periolivar rostral

rs	trato rubroespinal
RT	rampa timpânica
RV	rampa vestibular
SG	núcleo suprageniculado do tálamo
SGI	núcleo da concha da zona glial superficial
SNC	sistema nervoso central
SNR	substância negra, parte reticular
sp5	trato espinal trigeminal
SPO	núcleo paraolivar superior
SPTg	núcleo tegmental subpeduncular
str	radiação talâmica superior
SubB	núcleo subbraquial
SubCD	núcleo subceruleus, parte dorsal
SubCV	núcleo subceruleus, parte dorsal
SuG	camada cinza superficial do colículo superior
Svg	Sauvagina
TC	túnel de Corti
Tz	núcleo do corpo trapezóide
tz	corpo trapezóide
UCN 1	Urocortina 1
Uro-I	Urotensina - I
VCA	núcleo coclear ventral, parte anterior
VCP	núcleo coclear ventral posterior

VIII	fibras da porção coclear do nervo vestibulococlear
VLPAG	substância cinzenta periaquedutal, parte ventrolateral
VLL	núcleo ventral do lemnisco lateral
VPL	núcleo ventral póstero-lateral
VPM	núcleo ventral póstero-medial
vsc	trato espinocerebelar, parte ventral
xscp	decussação do pedúnculo cerebelar superior
ZID	zona incerta, parte dorsal
ZIV	zona incerta, parte ventral
Zo	camada zonal do colículo superior

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Citoarquitetura e imunorreatividade à UCN 1 na cóclea.....	5
Figura 2.	Células duplamente marcadas no núcleo lateral superior da oliva.....	6
Figura 3.	Demonstração da via olivococlear.....	24
Figura 4.	Representação esquemática dos sítios de injeção de traçador anterógrado BDA no LSO.....	37
Figura 5.	Exemplos de quantificação subjetiva da densidade das fibras anterogradamente marcadas após injeção de BDA.....	38
Figura 6.	Representação esquemática das projeções do núcleo lateral superior da oliva caso (W766).....	45-47
Figura 7.	Representação esquemática das vias de projeção do LSO.....	49
Figura 8.	Eferências do LSO (caso W766).....	50
Figura 9.	Eferências do LSO (caso W766).....	51
Figura 10.	Eferências do MVPO (caso W736).....	57
Figura 11.	Eferências do MVPO (caso W736).....	59
Figura 12.	Eferências do SPO (caso W731).....	62

1. INTRODUÇÃO

Recentemente estudos descreveram a ocorrência de um neuropeptídeo denominado Urocortina-1 (UCN 1), cujo local dominante de células imunorreativas à UCN 1 (UCN 1-ir) foi o núcleo de Edinger-Westphal (EW), seguido do núcleo lateral superior da oliva (LSO) (BITTENCOURT et al., 1999 e VAUGHAN *et al.*, 1995).

Até o momento, julgava-se conhecidas as projeções do EW, no entanto, a descrição das fibras UCN 1-ir revelou projeções prosencefálicas deste núcleo ainda não descritas, dentre elas o núcleo septal lateral. Através de injeção de traçador retrógrado no núcleo septal lateral Bittencourt e colaboradores (1999) demonstraram que as fibras UCN 1-ir aí localizadas originavam-se no EW.

Fibras UCN 1-ir foram descritas na via olivococlear, provenientes do LSO (BITTENCOURT et al, 1999). Algumas projeções do LSO foram descritas através de estudos que utilizaram, por exemplo, traçadores neuronais retrógrados em alguns núcleos, ou ainda o estudo das projeções olivococleares do LSO em uma população de ratos com hipotireoidismo (LOPEZ DE., 2003).

Porém, até o momento, nenhum estudo sistemático das projeções do LSO com traçadores anterógrados modernos foi realizado.

1.1 . Hodologia do LSO

O complexo olivar superior do rato (COS) é formado pelos núcleos medial superior da oliva (MSO) e lateral superior da oliva (LSO) e pelos núcleos medial e ventral do corpo trapezóide (NMTB e NVTB, respectivamente), além de grupos celulares periolivares (PAXINOS & WATSON, 1998). Sua principal função é o processamento de informações

auditivas binaurais para a localização sonora e a modulação da aferência no órgão espiral. (HELFERT et al., 1991, WEBSTER WR, WR. 1995).

Em 1942, Rasmussen descreveu um feixe de fibras que partia do COS e projetava-se para a cóclea, o qual chamou de feixe olivococlear. Desde então, diversos autores descreveram o trajeto destas fibras e propuseram seu mecanismo de ação na cóclea (RASMUSSEN, 1953; WHITE & WARR, 1983; ASCHOFF & OSTWALD, 1987; BROW, 1987).

Sabe-se que a via olivococlear do rato, assim como em muitos mamíferos, pode ser dividida em um componente lateral e outro medial. O componente lateral no rato origina-se no LSO e projeta-se para a cóclea ipsilateral, enquanto o componente eferente medial localiza-se no NVTB e projeta-se para ambas as cócleas (ASCHOFF & OSTWALD, 1987).

As fibras cruzadas do feixe olivococlear provenientes do núcleo ventral do corpo trapezóide no seu trajeto em direção à cóclea, caminham dorsomedialmente em direção ao assoalho do 4º ventrículo atravessando a formação reticular e cruzando a linha média após contornar o joelho do nervo facial (RASMUSSEN, 1953; WHITE & WARR, 1983). Os componentes lateral e medial ipsilaterais unem-se ao feixe cruzado no nível do joelho do nervo facial e formam o feixe olivococlear (RASMUSSEN, 1953) ou feixe de Rasmussen. Este se une à parte vestibular do VIII par e na fusão vestibulo-coclear une-se à parte coclear deste nervo para penetrar na cóclea (RASMUSSEN, 1953; WHITE & WARR, 1983).

O nervo coclear e o gânglio espiral, este último formado por neurônios do tipo I e II, são encontrados no modíolo (GRAY, 1995). Os neurônios do tipo I são bipolares, representam de 90 a 95% dos neurônios espirais e seus prolongamentos formam o feixe de fibras radiais que se projeta exclusivamente para as células ciliadas internas (BERGLUND & RYUGO, 1987; SPOENDLIN & SCHROTT, 1988). Estas fibras são mielinizadas e

estreitam-se ao passar pela lâmina espiral óssea (BERGLUND & RYUGO, 1987; BROWN, 1987). Cada fibra radial termina em regiões basais e laterais de uma única célula ciliada interna (BROWN, 1987). Os neurônios do tipo II inervam somente as células ciliadas externas (BERGLUND & RYUGO, 1987).

Em seu trajeto rumo ao VIII par, os axônios olivococleares mediais emitem colaterais que terminam no núcleo coclear (GUINAN et al., 1983). Estes colaterais fazem contatos com prolongamentos de neurônios do tipo II em regiões tonotópicas correspondente as de seus alvos cocleares (GUINAN et al., 1983; WHITE & WARR, 1983).

A via eferente lateral termina nas fibras aferentes que se conectam as células ciliadas internas (CCI) na cóclea, enquanto o componente medial termina diretamente na base das células ciliadas externas (CCE) (BROWN, 1987; WARR et al., 1997). Vetter e colaboradores (2002) demonstraram um aglomerado de terminais UCN 1-ir em região abaixo das CCI. Sugerindo uma possível conexão direta com as CCI. A imunorreatividade à UCN 1 na cóclea também foi demonstrada por nós (Figura 1) e demonstramos ainda, através de implante de traçador neuronal retrógrado FG na cóclea, que estes terminais UCN 1-ir são da via olivococlear originados no LSO e que 95% das células retrogradamente marcadas são duplamente marcadas com UCN 1 (Figura 2), dados não publicados. Porém, estudos com ultra-estrutura serão necessários para confirmar a possível conexão direta da via olivococlear com as CCI.

FIGURA 1. Citoarquitetura e Imunorreatividade à UCN na cóclea. Fotomicrografias de campo claro da cóclea coradas pelo método da hematoxila-eosina na coluna da esquerda e cortes adjacentes submetidos ao método da imunoperoxidase na coluna da direita. **A e B,** segunda espira coclear; **C e D,** mesma secção anterior em maior aumento mostrando fibra UCN-ir passando pela lâmina espiral óssea (seta em D) e terminais UCN-ir na região das células ciliadas internas; **E e F,** órgão de Corti. Abreviações: CE, células ciliadas externas; CI, células ciliadas internas; DC, ducto coclear; GE, gânglio espiral; LE, limbo espiral; LO, lâmina espiral óssea; MB, membrana basilar; MT, membrana tectória; MV, membrana vestibular; OC, órgão de Corti; RT, rampa timpânica; RV, rampa vestibular; TC, túnel de Corti; VIII, fibras da porção coclear do nervo vestibulococlear. Aumento original: A-B, 64x, C-D, 128x, E-F, 320x.

FIGURA 2. Células duplamente marcadas no núcleo lateral superior da oliva. **A**, fotomicrografia de fluorescência com filtro de luz verde mostrando células UCN-ir preferencialmente localizadas na porção medial do LSO. **B**, células UCN-ir (setas), detalhe do campo fotográfico mostrado em **A**. **C**, mesmo campo fotográfico, sob filtro de luz ultravioleta, mostrando células retrogradamente marcadas pelo FG (setas). **D**, combinação das fotomicrografias **B** e **C** utilizando software Image-Pro[®] Plus mostrando células duplamente marcadas FG+UCN-ir (setas). Abreviações: FG, fluorogold; LSO, núcleo lateral superior da oliva, UCN, urocortina. Aumento original em **A**: 64x; **B-D**: 128x.

O LSO origina cerca de 65% da via olivococlear no rato (BROWN, 1987). Este núcleo localiza-se ao longo do curso do corpo trapezóide e possui o formato de S em posição transversal visto em secções frontais, sendo composto por três partes: medial, intermédia e lateral, separadas pelos hilos dorsal e ventral (HELFERT et al., 1991; WEBSTER WR, 1995). Em espécies animais com audição centrada em altas frequências este núcleo é bastante desenvolvido (VAN ADEL & KELLY, 1998).

Foram descritas sete classes neuronais no LSO, sendo as células bipolares o tipo predominante (RAMÓN Y CAJAL, 1995; WEBSTER WR, 1995; RIETZEL & FRIAUF, 1998). Estas células são fusiformes, possuem de dois a seis dendritos primários partindo de lados opostos do pericário e estão abundantemente distribuídas nas partes média e intermédia do LSO, porém não são encontradas na região lateral (RIETZEL & FRIAUF, 1998).

Guinan et al. (1983) e Aschoff & Ostwald (1987) descreveram os neurônios olivococleares laterais como fusiformes, pequenos e com axônios amielínicos. Estudos quantitativos demonstraram que 43% dos neurônios olivococleares no rato localizam-se na parte medial, 29% na parte intermédia e 28% na parte lateral (WHITE & WARR, 1983, ROBERTSON et al., 1988; VETTER & MUGNAINI, 1992).

Células multipolares distribuem-se por todo o núcleo e possuem até seis dendritos primários partindo de todas as partes do pericário (RIETZEL & FRIAUF, 1998; HARRISSON & FELDMAN, 1970).

As células unipolares foram observadas na parte medial e intermédia do LSO, mas nunca na sua parte lateral a exemplo do que ocorre com as células bipolares (RIETZEL & FRIAUF, 1998). Foram descritas também as células em formato de banana (“banana-like”) encontradas exclusivamente na parte lateral do núcleo e ainda as células globulares.

Células marginais foram observadas ao longo da borda de todo o núcleo (VETTER & MUGNAINI, 1992; WEBSTER WR, 1995, RIETZEL & FRIAUF, 1998; WARR & BOCHE, 2003). Seus dendritos estendem-se rostrocaudalmente em longas distâncias, porém não se ramificam para fora do núcleo, sendo abundantes particularmente nos hilos dorsal e ventral (RIETZEL & FRIAUF, 1998);

A arborização dendrítica dos neurônios olivares é bastante complexa e seus neurópilos são densos (HARRISON & FELDMAN, 1970; RAMÓN Y CAJAL, 1995). Parte das fibras do corpo trapezóide entra na parte dorsal da oliva superior, porém a maior parte destas entram na parte ventral por meio dos hilos (HARRISON & FELDMAN, 1970). Estas fibras ramificam-se formando uma rede com seis ou até mais neurônios olivares, de maneira que a informação sensorial proveniente de uma única fibra trapezóide é transmitida a vários neurônios olivares (RAMÓN Y CAJAL, 1995).

Neste núcleo é observada uma organização tonotópica, sendo que as células que respondem às frequências mais baixas localizam-se lateralmente enquanto que as de alta frequência localizam-se medialmente (ROBERTSON et al, 1988 e WEBSTER WR, 1995).

Os neurônios do LSO são classificados como excitatórios-inibitórios, pois recebem informação excitatória do núcleo coclear ipsilateral e informação inibitória do núcleo coclear oposto, através de uma sinapse intermediária do núcleo medial do corpo trapezóide (CAIRD & KLINKE, 1983; MOORE & CASPARY, 1983; IRVINE et al., 2001).

O processamento da informação binaural no sistema auditivo permite a localização da fonte sonora e melhora a compreensão da fala em condições ruidosas (GELFAND et al., 1988; HELFERT et al., 1992). A separação de múltiplas fontes sonoras leva a sua localização e esta depende do processamento de disparidades interaurais (FINLAYSON & ADAM, 1997).

Três pistas são utilizadas para fazer a localização sonora sendo a diferença interaural de tempo e intensidade e as características do espectro monoaural. No LSO, o primeiro sítio de convergência da informação auditiva de ambas as orelhas, as células respondem sistematicamente às diferenças de intensidade (TOLLIN, 2003).

Animais que tiveram o complexo olivar superior destruído apresentaram dificuldades na localização sonora, mas ainda foram capazes de fazê-la, demonstrando que esta função auditiva não é exclusiva deste núcleo, mas também de outras estruturas da via auditiva, tais como o colículo inferior e o córtex auditivo primário cujas células também respondem a estímulos binaurais (VAN ADEL & KELLY, 1998).

Os dados na literatura para as aferências e eferências do LSO do rato não são tão detalhadas quanto aos encontrados para o gato, mas algumas considerações podem ser feitas.

No rato foram descritas projeções bilaterais originadas no LSO para o núcleo ventral do colículo inferior utilizando traçador retrógrado peroxidase de raiz-forte (HRP, “horseradish peroxidase”) (BEYERL, 1978; FAYE-LUND, 1986). Estes dados foram confirmados recentemente pela injeção de traçador neuronal retrógrado Fluorogold (FG) no núcleo central do colículo inferior (SCHAEFFER et al., 2003).

Injeções de traçador neuronal anterógrado no MSO evidenciaram projeções olivares para o núcleo ventral do lemnisco lateral, núcleo central e camada externa do colículo inferior bilateralmente e córtex auditivo ipsilateral (MULDES & ROBERTSON, 2000).

Sabe-se que o núcleo coclear ventral projeta-se para o LSO ipsilateral, porém não há neurônios olivares que se projetam para este núcleo. No entanto, boa parte dos neurônios marginais e a maioria dos neurônios olivococleares do componente medial recebem e enviam projeções para o núcleo coclear ventral. Estas observações foram feitas após

injeção de traçador retrógrado FG, “diamidino yellow” e “fast blue” na cóclea e no núcleo coclear ventral no rato (HORVATH et al., 2000). Doucet e Ryugo (2003) observaram após injeção de Biotin-Dextran (BDA) no núcleo coclear dorsal ipsilateral, que o LSO recebe projeções de forma topograficamente organizada (DOUCET & RYUGO, 2003).

O COS do gato é mais complexo que o do rato, apresentando 9 divisões (WEBSTER WR, 1995) e as eferências do LSO foram exaustivamente descritas no gato por Glendenning & Masterton (1983) em uma série de artigos (GLENDENNING et al., 1985; HUTSON et al., 1991; GLENDENNING et al., 1991; GLENDENNING et al., 1992). Nestes animais as projeções mais significativas dos neurônios olivares laterais são para o colículo inferior e seguem uma distribuição semelhante a do quiasma óptico e por isso foram denominadas por estes autores de quiasma acústico. Neste os neurônios olivares laterais que respondem a baixas frequências projetam-se para o colículo inferior ipsilateral, enquanto os neurônios de alta frequência projetam-se para o colículo inferior contralateral. Projeções com o mesmo padrão de distribuição e que também formam um quiasma foram descritas no rato (KUDO et al, 1996).

Os neurônios olivares laterais do gato projetam-se ainda bilateralmente para o núcleo dorsal do lemnisco lateral, ipsilateralmente para o núcleo ventral do lemnisco lateral e os neurônios marginais projetam-se para os núcleos cocleares bilateralmente. Nos felinos não foram descritas projeções do núcleo olivar superior lateral para a medula espinhal, bulbo, cerebelo e colículo superior (GLENDENNING & MASTERTON, 1983).

1.2 . Neuroquímica da via auditiva e do LSO

A via eferente lateral projeta-se para as células ciliadas internas, modulando a entrada da informação auditiva através de alguns neurotransmissores como a acetilcolina, o ácido γ -aminobutírico (GABA), a dopamina e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), podendo alterar a atividade dos neurônios do gânglio espiral, na cóclea, inibindo-os ou excitando-os (EYBALIN, 1993).

O principal neurotransmissor da via auditiva é o glutamato, presente nos neurônios espirais, nos núcleos cocleares e no corpo trapezóide do rato (GODFREY et al., 1978). Outros neurotransmissores coexistem nesta via, como é o caso do ácido γ -aminobutírico (GABA), da substância P e da somatostatina (TAKATSUKI et. al., 1982;, 1985; WYNNE E ROBERTSON 1997). Na cóclea foram descritos ainda a presença da colecistocinina, da substância P e do neuropeptídeo Y (NPY) (YLIKOSKI et al., 1989).

A via auditiva eferente do rato caracteriza-se pela heterogeneidade química dos neurônios olivococleares, estando presentes no complexo olivar superior e na cóclea a colina acetiltransferase (ChAT), o GABA, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a encefalina, a substância P e a somatostatina (TAKEDA et. al., 1987; KUNGEL E FRIAUF, 1995; WYNNE E ROBERTSON, 1997).

Recentemente a UCN 1, um neuropeptídeo da família do fator de liberação da corticotrofina (CRF), foi descrita no LSO (BITTENCOURT et al., 1999; KOZICZ et al. 1998; VAUGHAN et al., 1995).

Vale e colaboradores (1981) isolaram e caracterizaram um peptídeo de 41 aminoácidos a partir de extratos de hipotálamo de ovelhas, chamado fator liberador de

corticotrofina (CRFo)¹. Esse peptídeo desempenha um papel fundamental na regulação do eixo hipófise-adrenal e outros mecanismos neurais ligados ao estresse.

A partir daí, a descrição do CRF de rato (CRFr) e humano (CRFh) demonstrou a existência de uma grande homologia de estrutura destes com o CRFo (RIVIER *et al.*, 1983). Além destes, o CRF também foi isolado e caracterizado em outras espécies como bovinos (ESCH *et al.*, 1984), caprinos (LING *et al.*, 1984), porcos (PATTHY *et al.*, 1985), anfíbios (*Xenopus*) (STENZEL-POORE *et al.*, 1992) e peixes (Sucker – *Catostomus commersoni*) (MORLEY *et al.*, 1991).

Em 1983, as clonagens do gene que codifica o precursor do CRFr (RIVIER *et al.*, 1983), CRFh (SHIBAHARA *et al.*, 1983) e CRFo (FURUTANI *et al.*, 1983), proporcionaram possibilidades para estudos mais detalhados sobre a localização deste peptídeo no sistema nervoso central, permitindo assim, maior conhecimento das vias centrais que regem a resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ao estresse.

A Sauvagina (Svg), peptídeo com 40 aminoácidos, isolada e seqüenciada em 1980 por Montecucchi e seus colaboradores a partir da pele de rã (*Phyllomedusa sauvagei*), apresenta 50% de homologia estrutural com o CRF.

A Urotensina I (Uro-I), peptídeo composto de 41 aminoácidos, foi isolada a partir do sistema magnocelular neurosecretor, chamado urófise, localizado na extremidade caudal da medula espinhal de peixes teleósteos (*Catostomus commersoni*) o qual parece apresentar uma estrutura anatomicamente análoga à neuro-hipófise humana (hipófise posterior) (LEDERIS *et al.*, 1982; 1985 a, b; BERN *et al.*, 1985; MINNITI *et al.*, 1989; BARSYTE *et al.*, 1999). Este peptídeo, sintetizado em 1982 por Lederis e colaboradores e

¹ Utilizaremos, neste trabalho, a nomenclatura proposta pela União Internacional de Farmacologia referente a padronização da nomenclatura de receptores para CRF e seus ligantes (HAUGER *et al.*, 2003).

localizado por métodos imunoistoquímicos no sistema neurosecretor caudal de diversas espécies de teleósteos (YAMADA *et al.*, 1986), apresenta 50% de homologia estrutural com o CRF (LEDERIS *et al.*, 1982; 1985b).

A Uro-I e a Svg apresentam funções similares às desempenhadas pelo CRF em mamíferos. Em peixes, quando secretada pelo sistema neurosecretor caudal ou administrada endovenosamente, a Uro-I parece participar no equilíbrio hidroeletrolítico (BERN *et al.*, 1985; LEDERIS *et al.*, 1985a; 1985b; MINNIT *et al.*, 1989) e na liberação de glicocorticóides e cortisol (LEDERIS *et al.*, 1985b; KELSALL & BALMENT, 1998) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (FRYER *et al.*, 1983; WOO *et al.*, 1985), assim como na atividade cardiovascular (PLATZACH *et al.*, 1998).

Mas, a Uro-I, assim como ocorre com o CFR em mamíferos, não está confinada ao sistema neurosecretor. Ela também foi localizada em outras regiões do encéfalo de peixes (YULIS & LEDERIS, 1986; YULIS *et al.*, 1986), onde parece agir como neuromodulador (MATHIEU *et al.*, 1999). Sugere-se que peptídeos similares ao CRF possam ter funções específicas, como regulação do comportamento alimentar (De PEDRO *et al.*, 1995; 1998), liberação de hormônios tireoideanos (LARSEN *et al.*, 1998; citado em BARSYTE *et al.*, 1999) e locomoção (LOVEJOY & BALMENT, 1999).

Os três peptídeos (CRF, Svg e Uro-I) estimulam a secreção de ACTH *in vitro* e *in vivo* no rato (LEDERIS *et al.*, 1982; RIVIER *et al.*, 1983; LEDERIS *et al.*, 1985b) e ainda neste modelo animal a Uro-I, administrada via endovenosa, induziu um efeito hipotensivo maior e mais duradouro que o CRF (LEDERIS & MEDAKOVIC, 1974). Em cães, os mesmos efeitos hipotensivos intensos foram determinados pela Uro-I e Svg, sendo também maiores do que aqueles apresentados pelo CRF, e decorrentes de um mecanismo de dilatação da artéria mesentérica (MaCCANNELL & LEDERIS, 1977; MaCCANNELL *et*

al., 1982; LEDERIS *et al.*, 1985b). No camundongo, efeitos estimulatórios da Uro-I e Svg sobre a atividade do sistema dopaminérgico no *striatum* foram maior senão tão potentes quanto os do CRF (ONALI & OLIANAS, 1990). O papel funcional desses peptídeos quanto à regulação de diversos comportamentos incluindo o alimentar (GOSNELL *et al.*, 1983; BRITTON *et al.*, 1984) e social (BRITTON *et al.*, 1984) e ainda na regulação do componente simpático do sistema regulatório visceral em mamíferos (BROWN *et al.*, 1982) também foi verificado.

Com base nos conceitos evolutivos dentro da escala filogenética, a Uro-I foi considerada um protótipo da “família do CRF” (LEDERIS, 1984). Porém, pouco é conhecido sobre qual processo evolutivo contribuiu para a existência de peptídeos tão semelhantes em vertebrados tão amplamente divergentes, o que justifica a necessidade de buscar, em outros representantes de vertebrados, ou invertebrados, a presença de peptídeos semelhantes a Uro-I (ou Svg ou CRF), a fim de elaborar com maior precisão, uma possível teoria sobre o modelo de evolução dessa família na escala filogenética (LEDERIS *et al.*, 1985a).

Estudos recentes indicaram a existência de duas classes de receptores de CRF em mamíferos (CHALMERS *et al.*, 1996). O CRF₁, clonado a partir de células tumorais da hipófise anterior humana, é formado de 415 aminoácidos (CHEN *et al.*, 1993), apresentando alto grau de homologia (95% de identidade) entre aqueles identificados no encéfalo de ratos e de camundongos (CHANG *et al.*, 1993; PERRIN *et al.*, 1993; VITA *et al.*, 1993; POTTER *et al.*, 1994; LOVENBERG *et al.*, 1995 a e b; LIAW *et al.*, 1996). Possivelmente um processamento alternativo possa gerar uma forma diferenciada deste receptor na hipófise humana, mas o significado funcional desta mutação ainda permanece obscuro (CHEN *et al.*, 1993; CHALMERS *et al.*, 1996).

Partindo da clonagem do DNA do encéfalo de ratos, o segundo membro, o CRF₂, foi determinado como uma proteína com 411 aminoácidos e possui cerca de 70% de homologia com o CRF₁ (LOVENBERG *et al.*, 1995b), e já também identificado no camundongo (PERRIN *et al.*, 1995) e no homem (LIAW *et al.*, 1996). Duas variantes do processamento desse receptor foram determinadas no rato, aparentemente resultando em dois possíveis receptores protéicos de 411 e 431 aminoácidos, nomeados respectivamente de CRF_{2a} e CRF_{2b} (LOVENBERG *et al.*, 1995 b).

As diferentes classes de receptores de CRF apresentam distinção quanto à sua distribuição e possíveis funções, embora apresentem, como descrito anteriormente, um grau de homologia bastante significativo.

Uma terceira isoforma do receptor CRF₂, o CRF_{2c}, foi recentemente clonada a partir de tecido nervoso humano (KOSTICH *et al.*, 1998).

Observa-se que para alguns sítios de expressão dos receptores de CRF não há correspondência em relação à distribuição de fibras CRF-ir. Tal relação é viável quando se considera a teoria da não congruência ("mismatch"), que prevê um modo alternativo de comunicação interneuronal, nesses casos de não correspondência peptídeo/receptor em áreas do sistema nervoso central (HERKENHAM, 1987; POTTER *et al.*, 1994). Para o sistema do CRF, essas áreas de não congruência poderiam ser atribuídas, em parte, ao transporte axonal de receptores ou a uma baixa sensibilidade dos métodos imunoistoquímicos em detectá-los, por exemplo: no sistema auditivo de ratos (IMAKI *et al.*, 1991) e no neocórtex de primatas (LEWIS *et al.*, 1989), onde a distribuição das projeções CRF-ir só foi determinada a partir da comparação dos dados obtidos na imunoistoquímica com estudos de "binding" e hibridação *in situ* para os receptores de CRF.

Mesmo assim, não se pode excluir a possibilidade da existência de ligantes adicionais para os receptores de CRF. Outro fator que corrobora tal suposição é o diferente grau de afinidade do CRF aos seus receptores. Sabe-se que o CRF apresenta maior afinidade aos receptores CRF₁ quando comparado ao CRF₂ (POTTER *et al.*, 1992; 1994; LOVENBERG *et al.*, 1995 a; b; MUGLIA *et al.*, 1995).

Uma série de estudos descreveu que outros peptídeos similares ao CRF, como a Svg e a Uro-I, têm constantes de ligação similares à do CRF para os receptores CRF₁ e parecem ligar-se mais fortemente ao CRF₂ (VAUGHAN *et al.*, 1995; LOVENBERG *et al.*, 1995 b; DONALDSON *et al.*, 1996; TURNBULL & RIVIER, 1997). Assim, esses peptídeos relacionados ao CRF poderiam ser os representantes de ligantes endógenos alternativos para os receptores de CRF em outros vertebrados.

Uma série de evidências indica que tais peptídeos possam ser ligantes alternativos para os receptores de CRF e para a proteína de ligação para CRF (CRF-BP), sendo molecularmente distintos do CRF hipotalâmico: 1) o fato do CRF coexistir com a Svg e Uro-I em uma mesma classe de vertebrados; 2) a pouca concordância, em mamíferos, da distribuição do segundo membro de receptores de CRF (CRF₂) e da CRF-BP com o CRF; 3) maior afinidade da Svg e Uro-I aos receptores CRF₂ quando comparada ao CRF. Estas evidências levaram a busca de um ou mais ligantes para o receptor CRF₂ em mamíferos.

Buscando o isolamento, caracterização e seqüenciamento de um ou mais ligantes para o receptor CRF₂ em mamíferos, e já tendo a suposição de que tal peptídeo pertenceria à família do CRF, baseado nos dados apresentados acima, Vaughan e colaboradores (1995) utilizaram anticorpo anti Uro-I de salmão para a procura de moléculas relacionadas à Uro-I em ratos, e encontraram células Uro-ir principalmente localizadas nos núcleos EW e LSO. Algumas poucas células foram detectadas na camada plexiforme externa do bulbo olfatório

e área hipotalâmica lateral (VAUGHAN *et al.*, 1995). Interessante notar que esses dois núcleos não apresentavam nem a proteína e nem a expressão de RNAm para o CRF (IMAKI *et al.*, 1991).

No que se refere às projeções axonais, fibras imunorreativas a esta possível molécula homóloga à Uro-I em rato foram encontradas em diversas regiões do encéfalo, destacando-se o núcleo septal lateral dentre tantas outras nas quais há a expressão do receptor CRF₂ (VAUGHAN *et al.*, 1995; LOVENBERG *et al.*, 1995a; PERRIN *et al.*, 1995).

A partir das células marcadas encontradas no núcleo EW, Vaughan e colaboradores (1995) isolaram o RNAm e através de biblioteca de DNA, construíram o DNA complementar, verificando que no terminal carboxila da proteína estava a origem de um possível peptídeo de 40 aminoácidos, o qual, pelas características foi incluído na família de peptídeos ligados ao CRF.

Para representar a relação existente entre tal peptídeo e a Uro-I, com a qual apresenta 63% de identidade, e o CRF, com o qual apresenta 45% de identidade, ele foi chamado Urocortina 1 (UCN 1). A UCN 1 também mantém relações estruturais com a Svg, com cerca de 35% de identidade, principalmente quando se analisa sua porção N-terminal (VAUGHAN *et al.*, 1995).

A UCN 1, portanto, poderia representar o peptídeo homólogo à Uro-I em mamíferos, coexistindo com o CRF nesta classe de vertebrados. Observa-se também que há, de acordo com Vaughan e colaboradores (1995), uma grande concordância entre a distribuição de fibras UCN 1-ir e a de receptores CRF₂ e que a UCN 1 é cerca de 10 vezes mais potente que o CRF em aumentar o AMPc em células que expressam o CRF_{2b}. Assim, pode-se propor que a UCN 1 seja o procurado ligante endógeno para os receptores CRF₂.

Além de interagir com os receptores de CRF, a UCN 1 também liga-se à proteína ligante do CRF (CRF-BP), sendo que o coeficiente de ligação é cerca de duas vezes maior que o do próprio CRF, e ela ainda tem a capacidade de deslocar o CRF da sua ligação com a CRF-BP, levando a um aumento dos níveis de CRF livre do encéfalo (BEHAN *et al.*, 1996; TURNBULL & RIVIER, 1997). A UCN 1 também apresenta menor dissociação da CRF-BP quando comparada ao CRF (HENRIOT *et al.*, 1999). Como visto anteriormente, havia a suposição da existência de ligantes inibitórios para a CRF-BP, dentre os quais, aparentemente podemos encontrar a UCN 1 (BEHAN *et al.*, 1995b; BEHAN *et al.*, 1996).

A partir de sua caracterização em ratos, a UCN 1 também foi clonada em humanos (UCN 1h), a partir de biblioteca de DNA, apresentando 88% de identidade de nucleotídeos e 95% de aminoácidos em relação à UCN 1 de rato (UCN 1r), havendo somente quatro aminoácidos diferentes entre a UCN 1r e a UCN 1h (DONALDSON *et al.*, 1996). De acordo com os autores, as características fisiológicas e a capacidade de ligação com os receptores de CRF e com a CRF-BP, são semelhantes às aquelas primeiramente apresentadas para a UCN 1r por Vaughan e colaboradores (1995). Após tal caracterização, Zhao e colaboradores (1998) isolaram e caracterizaram os genes da UCN 1h e de camundongos, os quais apresentaram estruturas bastante similares entre si.

A consideração de que a UCN 1 seja um peptídeo de ação mais importante periférica do que central vem sendo levantada por alguns autores, devido a sua presença em vísceras como no intestino (BITTENCOURT *et al.*, 1999; HARADA *et al.*, 1999), linfócitos (BAMBERGER *et al.*, 1998), miocárdio (OKOSI *et al.*, 1998), placenta (PETRAGLIA *et al.*, 1996) e pele (SLOMINSKI *et al.*, 2000), além de seus efeitos sobre o sistema cardiovascular (PARKES *et al.*, 1997; IKEDA *et al.*, 1998; LEITCH *et al.*, 1998; SCHILLING *et*

al, 1998) e sobre as funções imunes e inflamatórias (TURNBULL *et al*, 1997; AGNELLO *et al*, 1998; ANDO *et al*, 1998; SINGH *et al*, 1999).

Embora haja a hipótese da participação da UCN 1 no sistema de regulação das respostas do organismo aos chamados estímulos estressantes, outros papéis funcionais do peptídeo podem ser especulados com base na sua localização celular e de suas projeções no sistema nervoso central.

Em ratos, verificou-se que as células UCN 1-ir encontravam-se em núcleos motores do tronco encefálico e em motoneurônios da coluna anterior da medula espinhal, o que poderia sugerir um papel de modulação, ou até mesmo de ação direta, da UCN 1 nas vias motoras (BITTENCOURT *et al*, 1999).

O papel da UCN 1 sobre a atividade motora tem sido alvo de trabalhos em diversas espécies, e os resultados ainda apresentam-se conflitantes, havendo necessidade de estudos adicionais para comprovar sua função neste sistema (JONES *et al*, 1998; PARROT *et al*, 2000; SKELTON *et al*, 2000).

A presença da UCN 1 em estruturas pertencentes às vias auditiva e vestibular do tronco encefálico, como no núcleo LSO, núcleo este ligado ao componente coclear do nervo vestibulo-coclear, pode estar relacionada a uma função de proteção de estruturas auditivas, atuando por meio da conexão olivococlear, observada por Bittencourt e colaboradores (1999) em ratos.

Não existe um acordo na literatura atual a respeito da ação e da presença da UCN 1 na glândula hipófise. Em ratos, Wong e colaboradores (1996) relatam a presença de células UCN 1-ir no lobo anterior e intermédio da glândula hipófise, achado este não confirmado por Bittencourt e colaboradores (1999). Em macacos (*Cebus apella*), Vasconcelos e colaboradores (2003) não localizaram células UCN 1-ir na glândula hipófise, entretanto,

observaram poucas fibras UCN 1-ir na camada interna da eminência mediana bem como no lobo posterior da hipófise.

De acordo com literatura atual, a UCN 1 parece exercer um efeito ansiogênico, gerando comportamentos que são interpretados como representativos de um estado de ansiedade elevada. Após administração central de UCN 1 em teste específico como o labirinto em cruz elevada, aplicados em ratos, alguns autores detectaram uma diminuição nas entradas nos braços abertos do labirinto (JONES et al, 1998; KAKIYA et al, 1998), ou em testes de interação social, verificaram uma diminuição deste comportamento em ratos (SAJDYK et al, 1999), todos estes representativos de um estado de ansiedade elevada. Alguns autores demonstraram que tal efeito é claramente mediado por receptores de CRF, principalmente pelo CRF₂ (MOREAU et al, 1997).

A exposição de animais ao estresse agudo ou crônico leva a uma redução da ingestão de alimentos, a um aumento no apetite para o sódio e a perda de peso. De forma geral, a grande parte dos autores que vêm estudando os efeitos da UCN 1 sobre o comportamento alimentar em ratos e camundongos, concordam que a UCN 1 exerce um efeito “inibitório” sobre o sistema que controla a ingestão alimentar, em animais privados ou não de alimentos (SPINA et al, 1996; JONES et al, 1998; SWIERGIEL e DUNN, 1999; COSTE et al, 2000; SKELTON et al, 2000). A presença de um possível sistema UCN 1 regulatório do comportamento alimentar pode ser sugerido.

Enquanto alguns autores dedicavam seus esforços para entender e caracterizar a UCN 1 em diversas espécies distintas, provendo subsídios para um melhor entendimento do desenvolvimento filogenético deste peptídeo, outros buscavam identificar, no sistema nervoso central de diversas espécies, a existência de células e de distribuição de fibras UCN

1-ir, além daqueles já descritos por Vaughan e seus colaboradores (1995) no encéfalo de rato.

Utilizando-se de dois métodos independentes, a imunoistoquímica e a hibridação *in situ*, Bittencourt e colaboradores (1999) descreveram o mais detalhado mapa da distribuição de células UCN 1-ir e suas projeções no sistema nervoso central de ratos. De acordo com os autores, o local dominante de células UCN 1-ir foi o núcleo EW, seguido do núcleo LSO, além de alguns núcleos motores do tronco encefálico como o facial, ambíguo, hipoglosso e trigêmeo. No hipotálamo, algumas células foram verificadas no núcleo supra-óptico, porção magnocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo supramamilar – parte lateral, área hipotalâmica lateral e área hipotalâmica posterior. Outras células UCN 1-ir ainda foram verificadas em outras regiões do SNC, entretanto, somente em animais pré-tratados com colchicina, por exemplo: na formação hipocampal, núcleo septal medial, núcleo intersticial da estria terminal, substância negra, regiões olfatórias, e na medula espinhal, principalmente na coluna anterior. As projeções UCN 1-ir se apresentavam predominantemente descendentes e de acordo com algumas projeções já descritas dos núcleos de EW e LSO, localizando-se principalmente em estruturas auditivas, pré-cerebelares e ópticas não formadoras de imagem, bem como na coluna intermédio lateral da medula espinhal. Bittencourt e colaboradores (1999) demonstraram utilizando traçador retrógrado injetado no núcleo septal lateral, projeções do núcleo EW para esse núcleo, esclarecendo e justificando assim, a presença das fibras UCN 1-ir neste último.

Cabe observar que a distribuição de fibras UCN 1-ir apresentou-se de acordo com a distribuição de receptores CRF₂ no rato (BITTENCOURT *et al.*, 1999).

No núcleo LSO, local de expressão do mRNA da UCN 1 e de células UCN 1-ir, Bittencourt e colaboradores (1999) descreveram um proeminente grupo de fibras UCN 1-ir

eferentes saindo dorsomedialmente, virando abrupta e lateralmente próximo ao joelho do nervo facial, projetando-se para o nervo coclear que emerge do neuro-eixo para a orelha interna, dados demonstrados por nós no corpo deste trabalho (Figura 3). Esta caracterização corresponde à trajetória da projeção olivococlear lateral descrita por Rasmussen (1946). Grande quantidade de fibras UCN 1-ir foi observada nos núcleos vestibular e coclear. Em outras estruturas auditivas, incluindo o MSO, o núcleo do corpo trapezóide e o lemnisco lateral, também foram descritas esparsas fibras UCN 1-ir.

Segundo Bittencourt e colaboradores (1999) a provável conexão, com alvos periféricos, do núcleo LSO é a cóclea.

Em recente trabalho (VETTER DE et al., 2002), produziram camundongo “knock-out” para UCN 1 (UCN^{-/-}) e verificaram através de testes auditivos como a audiometria de respostas elétricas do tronco cerebral (“[brainstem evoked response audiometry](#)” - BERA) (testa tons puros) e emissões otoacústicas, que o camundongo UCN^{-/-} apresenta limiares mais altos em todas as frequências testadas (todas altas frequências). Essa perda auditiva (aumento dos limiares tonais) pela ausência da UCN 1 é similar a observada por Walsh e colaboradores (1998) após a transsecção do feixe olivococlear em gatos neonatos, que tiveram aumento dos limiares.

Este aumento dos limiares não foi observado quando o feixe olivococlear foi seccionado no gato adulto, especulando-se que algum componente do sistema olivococlear é necessário para o desenvolvimento normal dos limiares auditivos.

Isto poderia sugerir que um componente inicial da via olivococlear para o desenvolvimento normal da sensibilidade dos limiares auditivos seria a presença da UCN 1.

Segundo Webster WR (1995) a via auditiva do rato tem muito das características de uma via típica de mamíferos. A estrutura geral da via é similar a do gato. Existe, entretanto,

várias lacunas em nosso conhecimento sobre a estrutura, função e neurofarmacologia no sistema auditivo do rato. É necessário aplicar técnicas de traçadores modernos para estudar as conexões entre todos os níveis desta via.

FIGURA 3. Demonstração da via olivococlear. Fotomicrografia de campo escuro para evidenciar através do método da imunoperoxidase as células UCN-ir do LSO (seta) e fibras eferentes UCN-ir (cabeça de seta) da via olivococlear em corte parasagital. Abreviações: LSO, núcleo lateral superior da oliva, VII, nervo facial; VIII, saída do nervo vestibulo coclear. Observação: Fotomontagem de 64 fotos. Aumento original de cada foto: 64x.

2. PROPOSIÇÃO

A descrição de um neuropeptídeo denominado UCN 1, onde um dos locais de sua presença é o LSO, chamou-nos a atenção para o conhecimento das conexões deste núcleo.

Em razão das poucas evidências de todas as suas conexões, através das eferências disponíveis na literatura ao nosso alcance, decidimos realizar a sistematização das eferências do LSO, através de injeção de traçador neuronal anterógrado (BDA).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 . Animais

Ratos da linhagem Wistar machos adultos jovens (n=38), pesando entre 250-280 gramas foram utilizados para estudo das eferências do LSO. Os animais foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os ratos foram mantidos em ambiente com condições constantes de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade, com filtragem bacteriológica contínua do ar, com ciclo claro/escuro de 12 horas (dia às 7 horas e noite às 19 horas) e com acesso livre à ração e água.

O protocolo para uso de animais em experimentação está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo sob número 045/03.

3.2 . Perfusão dos animais

Para a perfusão, os animais foram anestesiados por injeção letal intraperitoneal de 1 ml de hidrato de cloral a 35%. Uma vez sob o efeito do anestésico, os animais sofreram uma incisão na pele na linha média da região abdominal. Toda a parede anterior foi divulsionada no plano da tela subcutânea, a fim de expor os planos ósseos e musculares. Após a localização da extremidade do processo xifóide, uma incisão mais profunda foi realizada, permitindo o acesso à cavidade torácica, através do rompimento do músculo diafragma.

Após o rebatimento do plastrão esterno-costal, uma cânula foi colocada na aorta ascendente através do ventrículo esquerdo e perfundido com aproximadamente 100 ml de solução salina isotônica (0,9%) durante aproximadamente um minuto, seguida de 700 - 850 ml de fixador a 4% de formaldeído (a partir de paraformaldeído) e 3,8% de bórax, pH 9,5 a 4°C e pós-fixados na mesma solução fixadora por 2 horas e posteriormente numa solução de tampão potássio-fosfato (KPBS 0,02M, pH 7,4) com sacarose a 20% para crioproteção e mantidos a 4°C por 18 horas.

3.3 . Estudo anterógrado

3.3.1 . Implante de Traçador Neuronal Anterógrado BDA no LSO

O procedimento cirúrgico para implante do traçador foi realizado com animal fixado em estereotáxico, previamente anestesiado com 0,2 mL/100g de peso, por via subcutânea, de uma solução anestésica formada por acepromazina (1 mg/mL), xilazina (5mg/mL) e cetamina (25 mg/mL). Utilizamos a Biotin-Dextran (BDA -Molecular Probes, # D-1956, que possui peso molecular de 10.000 Daltons) como traçador anterógrado. O BDA foi injetado no LSO utilizando 7 μ Amp de corrente positiva alternada durante 20 minutos, através de micropipeta de vidro (OD 1,2mm/ ID 0,6mm), cuja ponta apresentava aproximadamente 20 μ m de diâmetro interno. As micropipetas foram preenchidas com BDA poucos minutos antes da cirurgia por capilaridade pela ponta anterior. Para evitar o aparecimento de “rastros” do traçador, a pipeta foi inserida no encéfalo com a corrente ligada em “modo de retenção”, uma inversão da polaridade da corrente contínua em baixa intensidade (parâmetro fornecido pela fonte de corrente MidgardTM Precision Current

Source, Stoelting Co., Wood Dale, Illinois), a injeção foi seguida de 5 minutos de repouso da pipeta dentro do encéfalo em “modo de retenção” e a retirada foi executada com 7 μ Amp de corrente contínua com polaridade invertida. Para a injeção do traçador no LSO utilizamos as coordenadas fornecidas pelo Atlas de Paxinos & Watson (Paxinos & Watson, 1998) obtidas a partir do bregma (ântero-posterior = 9,5 e médio-lateral = 2,4) e do topo da dura-máter (dorso-ventral = 9,4).

Após um período de 15 dias de sobrevida (tempo necessário de transporte do traçador) os animais foram perfundidos. Seus encéfalos e medulas foram retirados do crânio e coluna colocados em uma solução de pós-fixação (no mesmo fixador acrescido de sacarose a 20%) por 2 horas e posteriormente numa solução de tampão potássio-fosfato (KPBS 0,02M, pH 7,4) com sacarose a 20% para crioproteção e mantidos a 4°C até serem submetidos a microtomia de congelação no plano coronal e na espessura de 30 μ m. Os cortes foram mantidos a -20°C em solução anticongelante tamponada até serem submetidos aos procedimentos histológicos.

3.4 . Histoquímica para revelação do BDA

O traçador foi visualizado através da técnica de histoquímica onde inicialmente os cortes foram lavados em KPBS (2x10 minutos), tratados com 0,3 de peróxido de hidrogênio de Triton X-100 em KPBS (“loaded”) durante 30 minutos para neutralização da peroxidase endógena e novamente lavados em KPBS para serem incubados no complexo Avidina-Biotina (ABC-Vectastain Kit Elite, Vector) por 1 hora. Em seguida, a reação de

peroxidase foi realizada com peróxido de hidrogênio 0,03% e o cromógeno tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) a 0,05%. Ao final, os cortes histológicos foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratadas em álcoois etílicos de concentrações crescentes e deslipidificados em xilol por 7 dias para procedimento de intensificação pela prata.

3.5 . Intensificação pela prata

Para a intensificação pela prata, as lâminas foram desidratadas e deslipidificadas por 4 a 7 dias evitando a deposição da prata sobre a mielina devido à alta afinidade. A seguir, as lâminas foram reidratadas e mergulhadas numa solução de nitrato de prata (LabSynth, Diadema - BR) a 2,5% mantidas em banho a 56°C por 1 hora, lavadas em água corrente e mergulhadas em uma solução de ouro a 0,1% por 10 minutos em temperatura ambiente, em agitação constante e protegidas da luz. Novamente, as lâminas foram lavadas em água corrente e mergulhadas numa solução de tiosulfato a 5% em temperatura ambiente e agitação constante. Após lavagem em água corrente, as lâminas foram desidratadas, deslipidificadas e cobertas com lamínulas usando como meio de montagem o DPX.

3.6 . Técnica de Nissl

Uma série de cada animal foi submetida ao método de coloração de Nissl para fins de referência, que consiste na desidratação dos cortes em concentrações crescentes de álcoois etílicos (50% - 70% - 2 vezes 95% - 3 vezes 100%; 3 minutos cada) sendo

posteriormente deslipidificados em xilol (Merk; 2 vezes de 3 minutos). Os cortes foram, então, reidratados em concentrações decrescentes de álcoois etílicos, colocados por 20 segundos na solução de tionina a 0,25%, mergulhados 10 vezes em água destilada e novamente desidratados e deslipidificados (na mesma seqüência acima descrita), sendo finalmente cobertos com lamínula utilizando como meio de montagem o DPX (Aldrich, Milwaukee - EUA).

3.7 . Dupla Fluorescência UCN 1 e BDA

Realizamos o método de dupla marcação com imunofluorescência para investigar a ocorrência da co-localização entre células UCN 1-ir e células que captaram o traçador anterógrado BDA.

Os cortes foram tratados para neutralização da peroxidase endógena, como já descrito anteriormente e em seguida incubados numa solução com “loaded”, soro normal de cabra (NGS) e streptavidina Cy3 (1:200) para revelação do BDA, após duas lavagens no KPBS foram incubados em solução contendo NGS em “loaded” e pipetado o anticorpo primário anti UCN 1 (gentilmente cedido pelos doutores Wyllie Vale e Joan Vaughan do Laboratório de Biologia de Peptídeos do Instituto Salk, San Diego, Califórnia, EUA) na concentração de 1:1000 feito em coelho por 48 h a 4°C em mesa agitadora. No dia seguinte os cortes foram lavados em KPBS (2x10min) e incubados no anticorpo secundário fluorescente FITC feito em cabra contra coelho na concentração de 1:200. Ao final os cortes foram lavados em KPBS, montados em lâminas gelatinizadas, cobertos com meio

glicerol tamponado e lamínula com meio glicerol tamponado e lamínula e, posteriormente, as lâminas foram acondicionadas sob refrigeração (4°C).

3.8 . Análise e apresentação de fotomicrografias

As lâminas com os cortes histológicos para análise do traçador, foram observadas em microscópio LEICA DMR equipado com campo claro, campo escuro e epifluorescência (filtro de luz ultravioleta N2.I com 365nm de comprimento de onda; filtro de luz azul I3 com 450 nm de comprimento de onda e filtro de luz verde N 21 com 515-560 nm).

As fotomicrografias apresentadas foram adquiridas do microscópio para um computador PC DELL Dimension 4400 (DELL) através de uma câmera digital SPOT RT color (Diagnostics Instruments, Sterling Heights – EUA) e do programa Image - Pro® Plus. As imagens foram trabalhadas com auxílio do programa Adobe Photoshop 6.0, ajustando-se brilho, contraste e foco (SAPER, 1999; SCHENK et al., 1999). Essas fotomicrografias digitais foram organizadas em páginas com auxílio do programa Adobe Illustrator 6.0 em um computador Apple Macintosh Power PC Computer (Apple-EUA) e impressas em impressora Kodak Professional 8670 OS Thermal Printer.

Os esquemas de vias de projeção do LSO e dos locais de injeção foram inicialmente desenhados e a seguir adaptados aos esquemas da versão digital do Atlas de Paxinos & Watson (1998) utilizando o programa Adobe Illustrator 6.0 em um computador G4 Apple Macintosh.

4. RESULTADOS

4.1 . ESTUDO ANTERÓGRADO

Trinta e oito animais foram injetados por iontoforese utilizando 7 μ Amp de corrente positiva alternada durante 20 minutos, através de micropipeta de vidro com diâmetro interno de 20 μ m. Seis animais morreram durante ou após a cirurgia. Três injeções estão localizadas dentro dos limites do LSO, sem contaminação de núcleos adjacentes: casos W766, W997 e W1012 que serão utilizados para estudo das eferências do LSO. Estes três casos apresentam sítios de injeção muito próximos, sempre mais para a parte medial do núcleo (Figura 4) e o padrão de projeção dos três casos foi consistente, não havendo nenhuma diferença significativa na distribuição e densidade de marcação das fibras. Obtivemos uma injeção na parte mais dorsal do núcleo mas, que contaminou a região periolivar dorsal, caso W948 (Figura 4) e, portanto não será utilizado como referência.

Obtivemos injeções em outros núcleos do complexo olivar superior, como por exemplo, no MSO, no núcleo paraolivar superior (SPO), no núcleo periolivar medioventral (MVPO) e também em região periolivar dorsal.

Descreveremos aqui o caso W766, com local de injeção no LSO (Figura 7A) e os casos controles W736, com injeção no MVPO (Figura 9A) e o caso W731, com injeção no SPO (Figura 11A). Os resultados serão descritos seguindo como orientação geral às subdivisões nucleares descritas no Atlas de coordenadas estereotáticas do cérebro do rato de Paxinos & Watson (1998). E utilizaremos como referência para descrição das densidades das fibras o exemplo de quantificação subjetiva demonstrada na Figura 5.

FIGURA 4. Representação esquemática dos sítios de injeção de traçador anterógrado BDA no LSO. Esquemas do LSO modificados a partir do Atlas de Paxinos & Watson (1998). O círculo vermelho mostra o sítio de injeção localizado no LSO nos casos W766, W997 e W1012 e no caso W 948 apesar de parte da injeção estar na parte dorsal do núcleo, houve contaminação da região periolivar dorsal. Abreviações: DPO, região periolivar dorsal; ml, lemnisco medial; LSO, núcleo lateral superior da oliva; py, trato piramidal; rs, trato rubroespinal; TZ, núcleo do corpo trapezóide, tz, corpo trapezóide.

densa

moderada

fraca/pequena

muito fraca/muito pequena

FIGURA 5. Exemplos de quantificação subjetiva da densidade das fibras anterogradamente marcadas após injeção de BDA. Parâmetro utilizado na descrição dos resultados das eferências do caso W766. Todas as figuras foram feitas no mesmo tamanho original: 36x.

4.1.1 . Local de injeção W766

Descreveremos em detalhes o caso W766, que apresentou uma boa injeção, localizada dentro dos limites do LSO, sem contaminação de outros núcleos adjacentes e um transporte bom do traçador (Figura 8A).

4.1.2 . Projeções do LSO

As projeções são principalmente ipsilaterais, embora também sejam encontradas fibras contralaterais à injeção. A figura 4 mostra esquemas com os sítios de injeção de BDA no LSO. A figura 5 mostra exemplo de densidade de marcação utilizada para descrição das projeções. A figura 6 mostra a distribuição de fibras marcadas com BDA em esquemas modificados a partir do Atlas de Paxinos e Watson (1998). A figura 7 mostra um esquema das vias de projeção do LSO modificados a partir do mesmo Atlas e as figuras 8 e 9 ilustram as principais projeções encontradas nesse caso.0

Além das projeções intranucleares e para os outros núcleos do complexo olivar superior (COS) (Figura 7, em verde) as eferências do LSO apresentam quatro vias de projeções principais: duas vias ascendentes, sendo uma ipsi (Figura 7, em azul) e outra contralateral (Figura 7, em amarelo) e duas vias descendentes: ipsi (Figura 7 em roxo) e contralateral (Figura 7 em vermelho). Apresentando alguns cruzamentos comissurais.

4.1.3. Projeções intranucleares

Grande quantidade de fibras e terminais distribui-se por todo o LSO, numa marcação bastante densa (Figura 8A).

4.1.4. Projeções para o COS ipsilateral

Um proeminente feixe de fibras deixa o núcleo ventralmente pelo hilo do LSO ipsilateral e distribui-se para os outros núcleos do COS. Observamos uma marcação densa de fibras e terminais no núcleo paraolivar superior, no medial superior da oliva, e mais densamente marcados, os núcleos periolivar medioventral e núcleo periolivar lateroventral (Figura 6L).

Neste mesmo nível, um grupamento de fibras dirige-se em sentido médio-dorsal em direção ao núcleo do corpo trapezóide onde observamos densa marcação de fibras e terminais. E observamos ainda fibras em regiões periolivares.

4.1.5 . Projeções Ascendentes

4.1.5.1 Via ipsilateral

Um proeminente feixe de fibras dorsais do LSO deixa o núcleo e ascende pelo corpo trapezóide contornando o trato espinhal trigeminal até alcançar o lemnisco lateral passando pelos núcleos pontinos pré-cerebelares e pela região periolivar rostral.

Este feixe segue inervando densamente o núcleo ventral do lemnisco lateral, o núcleo intermédio do lemnisco lateral e o núcleo dorsal do lemnisco lateral respectivamente (Figura 8E). Neste nível um pequeno ramo de fibras deixa o núcleo dorsal do lemnisco lateral em direção à linha média, passa pelo fascículo longitudinal medial cruzando a linha média ventralmente à substância cinzenta periaquedutal e provavelmente participa na inervação do colículo inferior contralateral (Figura 6J).

O feixe de fibras do lemnisco lateral alcança o colículo inferior distribuindo-se densamente por todas as camadas do colículo: núcleo central do colículo inferior, braço do colículo inferior, bem como a camada do córtex externo do colículo inferior e núcleo dorsal do colículo inferior (Figura 8F).

Mais rostralmente, a marcação da região periolivar rostral, do núcleo intermédio do lemnisco lateral, do núcleo ventral do lemnisco lateral e o lemnisco lateral torna-se

moderada. E a distribuição das fibras do colículo inferior que também passa a ser moderada, fica limitada ao córtex externo. Neste nível, um pequeno ramo de fibras deixa o córtex do colículo inferior e cruza a linha média pela camada cinzenta intermédia do colículo superior e pela camada branca intermédia do colículo superior, para participar da inervação do colículo superior contralateral. Observamos também esparsas fibras no braço do colículo inferior e no núcleo do braço do colículo inferior (Figura 6 I).

Neste mesmo nível um ramo de fibras deixa o lemnisco lateral e através da decussação do lemnisco lateral, alcança a substância cinzenta periaquedutal lateral e dorsolateral, com uma distribuição de fibras moderada. Uma fraca marcação é observada na substância cinzenta periaquedutal, dorsomedial e ventrolateral. Outro pequeno feixe de fibras cruza pela decussação do pedúnculo cerebelar superior para juntar-se às fibras contralaterais que irão inervar o colículo inferior.

O feixe ascendente continua com marcação moderada no lemnisco lateral e passa a inervar também o núcleo paraleminiscal. Um ramo de fibras que deixa o lemnisco ascende e forma um aglomerado de fibras no núcleo mesencefálico profundo.

Um feixe de fibras continua rostralmente e marca moderadamente o pedúnculo cerebral, parte basal. Neste nível encontramos esparsas fibras marcadas que saem do colículo inferior passando pelo núcleo intercolicular e atingem algumas camadas do colículo superior, como camada cinzenta profunda, camada branca intermédia, camada cinza intermédia, e pouquíssimas fibras na camada cinza superficial. Neste nível observa-se um cruzamento bastante interessante das fibras na decussação do pedúnculo cerebelar superior (Figura 6H).

Em uma porção mais rostral, na comissura do colículo superior, observamos além das fibras esparsamente distribuídas, um aglomerado de fibras que vem do núcleo supragenicolado do tálamo e desenha um núcleo não delimitado no Atlas de Paxinos e Watson e possivelmente ainda não descrito na literatura (Figura 9D).

Os primeiros núcleos talâmicos a receber inervação do feixe ascendente são: o núcleo supragenicolado e o núcleo geniculado medial, parte medial, ambos com marcação moderada.

Mais rostralmente encontra-se moderadamente marcado o braço do colículo inferior, enquanto que as camadas do colículo superior neste nível, encontram-se marcadas moderadamente na linha média (Figura 6E).

Ao atingir o tálamo, observa-se uma distribuição de fibras bastante interessante no núcleo geniculado medial ventral: quanto mais caudal, as fibras encontram-se distribuídas mais medialmente, à medida que observamos rostralmente, a marcação que não é muito densa, distribui-se por todo o núcleo e bem mais rostral, ela fica mais lateralmente, só contornando os limites do núcleo (Figura 9E).

O núcleo geniculado medial, parte dorsal encontra-se densamente marcado por fibras ao longo de todo o núcleo (Figura 9E). Mais rostralmente, um feixe de fibras deixa dorsalmente o núcleo geniculado medial, parte dorsal, indo em direção àquele aglomerado de fibras que parece compor um núcleo na comissura do colículo superior.

Ainda no tálamo, um núcleo com distribuição de fibras bastante expressiva é o núcleo ventral pósteromedial. E menos densamente marcado o núcleo ventral pósterolateral (Figura 9F). Lateral a este núcleo ascende um feixe de fibras pela radiação acústica.

Poucas fibras foram observadas passando pelo núcleo acessório do oculomotor (EW).

Neste nível observamos ainda poucas fibras passando pela área hipotalâmica lateral.

Encontramos um pequeno número de fibras passando pelo núcleo da banda diagonal de Broca.

Pouquíssimas fibras foram observadas no núcleo talâmico pósterolateral, médio rostral e laterorostral. E mais rostralmente no núcleo talâmico laterodorsal, ventrolateral e núcleo talâmico paraventricular anterior.

Algumas poucas fibras foram encontradas chegando no córtex somatossensorial primário.

4.1.5.2 Via contralateral

Um proeminente feixe de fibras deixa o núcleo ventralmente pelo hilo do LSO ipsilateral e após distribuir-se densamente para os outros núcleos do COS, como já foi

descrito anteriormente, um feixe deixa o COS pelo núcleo periolivar medioventral e pelo núcleo do corpo trapezóide e cruza a linha média: algumas fibras pelo trato piramidal e outras pelo corpo trapezóide (Figura 9A).

Estas fibras unem-se ventralmente ao núcleo periolivar medioventral contralateral e ao contorná-lo, parte deste ramo entra ventralmente pelo LSO contralateral marcando preferencialmente a parte medial do núcleo (Figura 8B) e outra parte destas fibras ascendem pelo corpo trapezóide e mais rostralmente inerva o núcleo dorsal do lemnisco lateral (Figura 6L).

Este ramo ascende e distribui-se esparsamente pelo núcleo ventral do lemnisco lateral, núcleo intermédio do lemnisco lateral e núcleo paraleminiscal de onde partem poucas fibras e atingem o núcleo do braço do colículo inferior, córtex externo do colículo inferior e as camadas do colículo superior: camada cinza intermédia, e camada branca intermédia. Mais rostralmente a camada óptica do colículo superior também recebe uma fraca marcação.

Um pequeno feixe de fibras que deixa o lemnisco lateral chega ao núcleo supragenículado do tálamo e ao núcleo geniculado medial, parte medial, com uma fraca distribuição de fibras. Mais rostralmente marcam fracamente o núcleo geniculado medial, parte dorsal e o núcleo geniculado medial, parte ventral.

4.1.6 . Projeções Descendentes

Toda marcação descendente é considerada de moderada a fraca.

4.1.6.1 Via ipsilateral

A via de projeção descendente do LSO é mais proeminente contralateralmente do que ipsilateralmente.

Um feixe de fibras deixa o núcleo ventralmente pelo hilo do LSO, trafega pelo corpo trapezóide e cruza pelo feixe olivococlear, a raiz vestibular do nervo vestibulococlear e dirige-se ao núcleo coclear ventral anterior. As fibras distribuem-se por todo o núcleo,

bem como poucas células retrogradamente marcadas. Neste nível observa-se ainda fibras passando pelo núcleo intersticial do nervo vestibulococlear, adjacente ao núcleo coclear ventral anterior, o feixe de fibras continua dorsalmente pela substância glial paracoclear. Mais caudalmente as fibras inervam o núcleo coclear dorsal (Figura 8D), a borda medial do núcleo intersticial do VIII par e saem pela raiz do VIII par.

As fibras que deixam o núcleo coclear dorsal inervam mais caudalmente o núcleo coclear ventral, posterior (Figura 8C).

4.1.6.1 Via contralateral

A via de projeção descendente contralateral do LSO é inicialmente formada pela junção de dois ramos de fibras. Um ramo deixa dorsalmente o LSO ipsilateral e cruza obliquamente pela formação reticular (Figura 9C) indo em direção ao núcleo subcoeruleus, parte dorsal (Figura 6N). O outro ramo deixa dorsalmente o LSO contralateral e ascende até juntar-se com àquele ramo de fibras descrito anteriormente (Figura 6N). Este feixe vai inervar respectivamente o núcleo coclear ventral anterior, núcleo intersticial do VIII par, raiz coclear do VIII par e mais caudalmente o núcleo coclear dorsal.

Um pequeno feixe deixa o LSO contralateral ventralmente e ascende pelo corpo trapezóide e atinge os núcleos: coclear ventral anterior e núcleo coclear dorsal.

FIGURA 6. Representação esquemática das projeções do núcleo lateral superior da oliva (caso W766). A distribuição das fibras e terminais com BDA (linhas vermelhas) foi desenhada em uma série de cortes de encéfalo de rato modificados a partir do Atlas de Paxinos & Watson (1998) e organizados no sentido rostro-caudal. O número acima de cada figura indica a posição do corte em relação ao Bregma. Para as abreviações, veja lista de abreviações.

FIGURA 6. Representação esquemática das projeções do núcleo lateral superior da oliva (caso W766). A distribuição das fibras e terminais com BDA (linhas vermelhas) foi desenhada em uma série de cortes de encéfalo de rato modificados a partir do Atlas de Paxinos & Watson (1998) e organizados no sentido rostro-caudal. O número acima de cada figura indica a posição do corte em relação ao Bregma. O círculo vermelho no painel L mostra o sítio de injeção localizado no núcleo lateral superior da oliva. Para as abreviações, veja lista de abreviações.

FIGURA 6. Representação esquemática das projeções do núcleo lateral superior da oliva (caso W766). A distribuição das fibras e terminais com BDA (linhas vermelhas) foi desenhada em uma série de cortes de encéfalo de rato modificados a partir do Atlas de Paxinos & Watson (1998) e organizados no sentido rostro-caudal. O número acima de cada figura indica a posição do corte em relação ao Bregma. Para as abreviações, veja lista de abreviações.

FIGURA 7. Representação esquemática das vias de projeção do LSO. Vias de projeção

ascendentes: ipsilateral, representada em azul e contralateral, representada em amarelo;
Vias de projeção descendentes: ipsilateral, representada em roxo e contralateral,
representada em vermelho. A espessura das linhas representa a densidade de projeção da
via. Para abreviações, vide lista de abreviações.

FIGURA 8. Eferências do LSO (caso W766). Fotomicrografia de campo escuro mostrando fibras marcadas com BDA, pelo método da imunoperoxidase. **A**, sítio de injeção no LSO (cabeça de seta); **B**, LSO, contra-lateral à injeção; **C**, fibras passando pelo corpo trapezóide em direção a parte posterior do núcleo coclear ventral; **D**, núcleo coclear dorsal; **E**, lemnisco lateral; **F**, colículo inferior. Abreviações: CIC, núcleo central do colículo inferior, DC, núcleo coclear dorsal, ll, lemnisco lateral, LSO, núcleo lateral superior da oliva, mcp, pedúnculo cerebelar médio, sp5, trato trigeminal espinal, tz, corpo trapezóide, VCP, núcleo coclear ventral, parte posterior, 7n, nervo facial. Aumento Original: 32x em A, B, C, e D; 16x em E e F.

FIGURA 9. Eferências do LSO (caso W 766). Fotomicrografia de campo escuro mostrando fibras marcadas com BDA, através do método da imunoperoxidase. **A**, fibras cruzando pelo corpo trapezóide; **B**, fibras cruzando ventralmente ao fascículo longitudinal medial; **C**, fibras cruzando obliquamente à formação reticular; **D**, conjunto de fibras na comissura do colículo superior; **E**, núcleo geniculado medial dorsal e núcleo geniculado medial ventral; **F**, núcleo ventral pósterolateral do tálamo e núcleo ventral pósteromedial do tálamo. **Abreviações:** bsc, braço do colículo superior; csc, comissura do colículo superior; DpG, camada cinzenta profunda do colículo superior; MGD, núcleo geniculado medial dorsal do tálamo; MGV, núcleo geniculado medial ventral do tálamo; mlf, fascículo longitudinal medial; py, pirâmide; tz, corpo trapezóide; VPL, núcleo ventral pósterolateral do tálamo; VPM, núcleo ventral pósteromedial do tálamo. **Aumento Original:**32x

4.2. CASOS CONTROLES

4.2.1 . Local de injeção W736

O animal W736 apresenta um sítio de injeção localizado no MVPO mais medial, contaminando pequena porção do núcleo do corpo trapezóide (Figura 10A).

4.2.2 . Projeções do MVPO

As projeções deste núcleo são principalmente ipsilaterais, entretanto em algumas regiões, o transporte contralateral também é bastante expressivo.

4.2.3 . Projeções Intranucleares

Grande quantidade de fibras e terminais distribui-se por todo o MVPO em projeções intranucleares e para o núcleo periolivar lateroventral (Figura 10A).

4.2.4 . Projeções para o COS ipsilateral

Um proeminente feixe de fibras dirige-se dorsalmente para o LSO ipsilateral, e distribui-se densamente por todo o núcleo, onde encontramos grande quantidade de terminais (Figura 10A). A densidade de fibras no interior do LSO é mais intensa na parte medial do núcleo. Um ramo deste feixe projeta-se para o MSO e para o núcleo paraolivar superior (SPO). A marcação de fibras observadas nestes núcleos é densa. Um grupamento

de fibras dirige-se em sentido médio-dorsal em direção ao núcleo do corpo trapezóide, onde observamos fibras e terminais e algumas células retrogradamente marcadas (Figura 10A).

4.2.5 . Projeções Ascendentes

4.2.5.1 . Via ipsilateral

Um feixe de fibras ascendentes do MVPO une-se a algumas fibras que passando pelo LSO saem dorsalmente próximo ao hilo do núcleo, sobem ipsilateralmente pelo corpo trapezóide e rostralmente as fibras passam pelo núcleo pontino e região periolivar rostral atingindo o núcleo ventral do lemnisco lateral, o núcleo intermédio do lemnisco lateral e núcleo dorsal do lemnisco lateral, formando um feixe de fibras que sobe pelo lemnisco lateral, todos moderadamente marcados (Figura 10D e 10E). Este feixe alcança o colículo inferior distribuindo-se densamente por todos os núcleos do colículo: núcleo central, núcleo do braço do colículo inferior, bem como o córtex externo do colículo inferior e córtex dorsal do colículo inferior (Figura 10F). Em uma porção mais rostral na comissura do colículo inferior, observamos além das fibras esparsamente distribuídas, um aglomerado de fibras, desenhando um núcleo na comissura que provavelmente ainda não foi descrito na literatura (Figura 10A). Neste mesmo nível, fibras esparsamente distribuídas, foram observadas subindo pela substância cinzenta periaquedutal principalmente na parte dorsomedial e dorsolateral, embora pequena quantidade de fibras foi observada passando pela substância cinzenta lateral e ventrolateral. Dorsolateralmente a esta observamos pequena quantidade de fibras passando pelo núcleo mesencefálico profundo.

Algumas poucas fibras saem do colículo inferior passando pelo núcleo intercolicular atingem algumas camadas do colículo superior: como a camada cinzenta profunda, camada

branca intermédia, camada cinza intermédia e pouquíssimas fibras na camada cinza superficial.

As fibras seguem rostralmente até atingir núcleos talâmicos onde se observa uma distribuição de fibras bastante interessante e densa no núcleo geniculado medial ventral. Na parte mais caudal do núcleo, as fibras encontram-se distribuídas por todo ele (Figura 11D), à medida que observamos rostralmente, as fibras tornam-se cada vez mais esparsas no centro, e seguem apenas no contorno do núcleo (Figura 11C).

Uma densa distribuição de fibras segue pelo núcleo suprageniculado do tálamo, parte medial e dorsal do geniculado medial do tálamo (Figura 11C). Ainda no tálamo, um núcleo com uma distribuição de fibras bastante expressiva é o núcleo ventral pósteromedial (Figura 11B). Lateral a este núcleo caminha ascendentemente um grupo de fibras pela radiação acústica.

Neste nível observamos ainda poucas fibras passando pela área hipotalâmica lateral (LHA).

Encontramos ainda um pequeno número de fibras passando pelo núcleo da banda diagonal. E outras poucas fibras no caudado putamen.

Algumas poucas fibras foram encontradas chegando no córtex somatosensorial primário.

4.2.5.2 . Via contralateral

As fibras deixam o MVPO em direção medial e atingem o núcleo do corpo trapezóide densamente e células retrogradamente marcadas. Este feixe cruza a linha média pelo corpo trapezóide e trato piramidal e inerva o núcleo do corpo trapezóide contralateral

moderadamente e os outros núcleos do COS e divide-se em dois ramos: um ramo atinge o LSO pelo hilo ventral e apresenta uma distribuição moderada na parte medial do núcleo e fraca na parte lateral (Figura 11E) e outro ramo ascende pelo corpo trapezóide e segue a mesma distribuição que a via ipsilateral, porém com marcação de moderada a fraca.

4.2.6 . Projeções Descendentes

4.2.6.1 . Via ipsilateral

As fibras deixam lateralmente o MVPO passa pelo corpo trapezóide atinge o núcleo intersticial do nervo vestibulococlear, adjacente ao núcleo coclear ventral anterior, onde se observa uma marcação densa. O ramo de fibras continua dorsalmente pela substância glial paracoclear (PCGS).

Um feixe de fibras segue pelo corpo trapezóide mais caudalmente e contornando o trato espinhal trigeminal (Figura 10C) e cruza, pelo feixe olivococlear, a raiz vestibular do nervo vestibulococlear e dirige-se ao núcleo coclear ventral posterior numa densidade moderada (Figura 11G) e essas fibras unem-se a um outro feixe de fibras que veio diretamente do corpo trapezóide contornando o pedúnculo cerebelar inferior e o trato espinhal trigeminal e inervam densamente o núcleo coclear dorsal. Entre o núcleo coclear ventral posterior e o núcleo coclear dorsal há uma região que não apresenta fibras: a camada granular coclear (GrC) (Figura 11H)

Observamos algumas fibras passando pelo núcleo de Edinger-Wesphal. Observamos poucas fibras no núcleo locus coeruleus.

4.2.6.2 . Via contralateral

As projeções contralaterais do MVPO seguem as projeções ipsilaterias, só que em densidade de fibras de moderadas a fracas.

Cruzamentos comissurais: em sentido de caudal para rostral, as fibras cruzam pelo trato piramidal e corpo trapezóide (Figura 10B); cruzam do lemnisco lateral ipsi para o contralateral pelos núcleos pontinos; comissura do colículo inferior (Figura 11A) e comissura do colículo superior.

FIGURA 10. Eferências do MVPO (caso W736). Fotomicrografia de campo escuro mostrando fibras marcadas com BDA. **A**, sítio de injeção no MVPO; **B**, núcleo do corpo trapezóide e fibras cruzando pelo corpo trapezóide; **C**, fibras passando pelo corpo trapezóide em direção ao VCA; **D**, região periolivar rostral, núcleo ventral do lemnisco lateral e lemnisco lateral; **E**, núcleo intermédio do lemnisco lateral; **F**, colículo inferior. Abreviações: Aq, aqueduto; Ifp, fascículo longitudinal da ponte; II, lemnisco lateral; LSO, núcleo lateral superior da oliva; MVPO, núcleo periolivar medioventral; Pn, núcleos pontinos; py, trato piramidal; RPO, região periolivar rostral; SPO, núcleo paraolivar superior; tz, corpo trapezóide; Tz, núcleo do corpo trapezóide; 7n, nervo facial. Aumento original: A, B, C e D 16x e 32x em E e F.

FIGURA 11. Eferências do MVPO (caso W736). Fotomicrografia de campo escuro mostrando fibras marcadas com BDA, pelo método da peroxidase. **A**, comissura do colículo inferior; **B**, núcleo pósteromedial ventral do tálamo; **C**, núcleo geniculado medial do tálamo, parte ventral e parte medial, núcleo supragenicoado do tálamo; **D**, núcleo geniculado medial do tálamo, parte medial em nível mais rostral que **C**; **E**, núcleo lateral superior da oliva; **F**, corpo trapezóide; **G**, núcleo coclear ventral; **H**, núcleo coclear dorsal.

Abreviações: cic, comissura do colículo inferior, DC, núcleo coclear dorsal, eml, lâmina medular externa, GrC, camada coclear granular, icp, pedúnculo cerebelar inferior, LSO, núcleo lateral superior da oliva, MGM, núcleo geniculado medial do tálamo, parte medial, MGv, núcleo geniculado medial do tálamo, parte ventral, py, pirâmide, SG, núcleo supragenicoado do tálamo, SNR, substância negra, parte reticular, sp5, trato espinhal trigeminal, TZ, núcleo do corpo trapezóide, tz, corpo trapezóide, VCP, núcleo coclear ventral posterior, VPM, núcleo pósteromedial ventral do tálamo.

4.2.7 . Local de injeção W731

O animal W731 apresenta um sítio de injeção localizado no SPO (Figura 12A).

4.2.8 . Projeções do SPO

As projeções deste núcleo são principalmente ipsilaterais e apresentam um único cruzamento das fibras, que ocorre dorsalmente na pirâmide e ventralmente ao fascículo longitudinal medial (Figura 12B).

Projeções para o COS: um grande número de fibras projeta-se lateralmente para o LSO ipsilateral que se encontra marcado principalmente na margem medial do núcleo (Figura 12C) e projeta-se medialmente do SPO cruzando a linha média para o LSO contralateral, que se encontra com poucas fibras marcadas esparsamente distribuídas. O MSO apresenta-se moderadamente marcado ipsilateralmente e poucas fibras contralaterais. Ipsilateralmente, no MVPO a marcação do núcleo vai de densidade fraca a moderada em sentido de caudal para rostral e a marcação contralateral surge em densidade fraca apenas num nível mais rostral.

Projeções Ascendentes: Um feixe de fibras sobe pelo núcleo intermédio do lemnisco lateral e pelo núcleo dorsal do lemnisco lateral. Este feixe alcança o colículo inferior com uma marcação fraca e posteriormente o colículo superior, com densidade também fraca. Ambos marcados ipsi e contralateralmente.

Projeções Descendentes: Um feixe de fibras passa pelo corpo trapezóide e cruza o núcleo intersticial do VIII par alcançando os núcleos cocleares ventrais, anterior e posterior respectivamente. Os núcleos cocleares ventrais anterior e posterior (VCP, Figura 12D) encontram-se fracamente marcados ipsi e contralateralmente. Um feixe de fibras projeta-se

para o núcleo coclear dorsal, parte central.

Neste mesmo nível, observamos o núcleo periolivar lateroventral (LVPO) marcado moderadamente ipsilateralmente e com poucas fibras contralaterais.

No núcleo grácil observamos poucas fibras dorsais e laterais.

FIGURA12. Eferências do SPO (caso W731). Fotomicrografia de campo escuro mostrando fibras marcadas com BDA. **A**, sítio de injeção no SPO (cabeça de seta); **B**, fibras cruzando dorsalmente à pirâmide e ventralmente ao fascículo longitudinal medial; **C**, LSO, ipsilateral à injeção; **D**, fibras subindo pelo lemnisco lateral em direção ao núcleo coclear ventral, parte posterior. Abreviações: Imf, fascículo longitudinal medial; LSO, núcleo lateral superior da oliva; py, pirâmide; sp5, trato trigeminal espinal; SPO, núcleo paraolivar superior; tz, corpo trapezóide; VCP, núcleo coclear ventral, parte posterior. Aumento original em A, 16x, em B-D: 32x.

4.3 . DUPLA FLUORESCÊNCIA UCN 1 E BDA

Uma série de cortes do caso W766 foi submetida ao método de dupla marcação com imunofluorescência para investigar a ocorrência da co-localização entre células UCN 1-ir e células que captaram o traçador anterógrado BDA.

Observamos células duplamente marcadas principalmente na parte medial do LSO. Observamos em vermelho as células que captaram o traçador BDA através do filtro de luz verde (comprimento de onda 515-560nm) e em verde as mesmas células que expressam UCN 1 através do filtro de luz azul (comprimento de onda 450-490nm).

5. DISCUSSÃO

5.1. Discussão Metodológica

5.1.1. Estudo Anterógrado

Realizamos injeções de traçador neuronal anterógrado BDA no LSO a fim de estudar as eferências deste núcleo, analisando os cortes desde o bulbo olfatório até a medula espinhal.

As técnicas de mapeamento de vias neurais se baseiam na identificação de certas substâncias em cortes do sistema nervoso, capazes de ser captadas e transportadas pelos neurônios. Os traçadores anterógrados são aqueles que após serem captados pelos dendritos e pelo corpo celular dos neurônios são transportados na mesma direção da condução nervosa, ou seja, do soma em direção aos terminais axônicos.

Utilizamos o BDA (Molecular Probes, # D-1956), que possui peso molecular de 10.000 Daltons. É um traçador neuronal normalmente utilizado para estudar as eferências de uma determinada região visto que é transportado preferencialmente em direção anterógrada. Foi introduzido em experimentos para mapear vias neuronais na década de 90 (VEENMAN et al., 1992; BRANDT & APKARIAN, 1992). Por estar conjugado com biotina, o BDA pode ser identificado facilmente em secções do encéfalo, através da incubação em complexo avidina biotina peroxidase e reação histoquímica com DAB como cromógeno (HSU et al., 1981). Ainda que seja transportado fundamentalmente em direção anterógrada, a própria experiência de nosso laboratório, além do protocolo recentemente publicado pelo fabricante (GREGORY M., 2002), demonstrou que o BDA também é transportado retrogradamente em menor escala. A escolha do BDA para o mapeamento das eferências do LSO se baseou na revisão de trabalhos que haviam empregado este traçador com sucesso para esta finalidade (LEE et al., 1996; LOPEZ DE et al., 1999), além da nossa própria experiência.

Para injeção do traçador no LSO, utilizamos como ponto de partida as coordenadas fornecidas pelo Atlas de Paxinos & Watson (1998) já descritas na metodologia. De acordo com as coordenadas, o trajeto da micropipeta passa exatamente pelo centro de um seio venoso sendo inevitável sua ruptura, aumentando assim, a possibilidade de hemorragia durante ou após o ato cirúrgico, por esta razão, perdemos alguns animais (n=6). Além disso, a presença deste seio alterava muito a coordenada dorso-ventral, reduzindo o número de acertos de injeções. Um ponto essencial em qualquer experimento com traçadores neuronais é delinear o local de captação do traçador para interpretar os resultados obtidos. Assim, consideramos como boa injeção, cuja captação do traçador se restringia aos limites do LSO, três casos: W766, W997 e W1012. Além disto, nestes casos, o transporte do BDA foi adequado e a distribuição das fibras consistentes, não havendo diferenças significativas entre eles. Nos três animais os sítios de injeção são muito semelhantes, ocupando mais a parte medial do núcleo. Estudos quantitativos demonstraram que 43% dos neurônios do LSO localizam-se na parte medial, 29% na parte intermédia e 28% na parte lateral (WHITER & WARR, 1983; ROBERTSON et al., 1988; VETTER & MUGNAININI, 1992). Desta maneira nossas injeções atingiram a parte do núcleo que contém o maior número de células.

Para visualização dos limites do LSO utilizamos a técnica de Nissl empregando o corante tionina, que participa de interações eletrostáticas com estruturas basófilas das células como os ácidos nucléicos e os ribossomos (HOROBIN, 1996; BANCROFT & COOK, 1996), proporcionando boa visualização dos corpos celulares sob microscopia óptica. A intensificação pela prata foi utilizada para melhorar a visualização das fibras marcadas com o traçador. A prata tem alta afinidade pela mielina, portanto são necessárias a desidratação e deslipidificação dos cortes.

5.1.2. Dupla Fluorescência UCN 1 e BDA

Utilizamos a dupla marcação com imunofluorescência para investigar a ocorrência da co-localização entre células UCN 1-ir e células que captaram o traçador anterógrado BDA.

A descrição das fibras UCN 1-ir por Bittencourt e colaboradores (1999) revelou projeções prosencefálicas do EW ainda não descritas, dentre elas a projeção para o núcleo septal lateral, no entanto, julgava-se já conhecidas as projeções deste núcleo. Os autores confirmaram através de injeção de traçador retrógrado no núcleo septal lateral que as fibras UCN 1-ir aí localizadas originavam-se no EW.

Fibras UCN 1-ir foram descritas na via olivococlear provenientes do LSO (BITTENCOURT et al., 1999). Em nossa experiência no laboratório em trabalhos anteriores (não publicados), realizamos a contagem do número de células UCN 1-ir através de imunoistoquímica e observamos que este peptídeo marca aproximadamente de 80 a 90% das células do LSO e que em animal que recebeu 30µL de uma solução de colchicina a 2 % (Sigma Chemical, St. Louis – EUA) no ventrículo lateral, este número chega a atingir 95% das células. A colchicina é um agente antimitótico que inibe a polimerização dos microtúbulos retardando o transporte axoplasmático (DAHLSTRÖM, 1971). Com a interrupção do transporte axoplasmático, o neuropeptídeo permanece concentrado no corpo celular, o que é particularmente importante no estudo da presença de neuropeptídeos em corpos celulares, porque eles são produzidos no corpo celular e rapidamente transportados para as terminações nervosas. Em comparação com outros neurotransmissores expressos no LSO, a UCN 1 poderia ser considerada como “marcador” do núcleo, assim como a serotonina para os núcleos da rafe e o hormônio concentrador de melanina (MCH) para AHL.

Com a descrição das eferências do LSO feitas neste estudo, poderemos comparar com a distribuição de fibras UCN 1-ir descritas por Bittencourt e colaboradores (1999) e inferir algumas funções sobre o papel da UCN 1 na via auditiva.

Observamos que as células que captaram BDA, expressavam a UCN 1 (dados não mostrados).

5.2. Metodologia do LSO

O COS do rato é formado pelos núcleos: MSO, LSO, NMTB, NVTB, além de grupos celulares periolivares (PAXINOS & WATSON, 1998). Sua principal função é o processamento de informações auditivas binaurais para a localização sonora e a modulação no órgão espiral (HELFERT et al., 1991, WEBSTER WR, 1995).

A descrição do neuropeptídeo UCN 1, demonstrou que um dos locais de grande expressão é o LSO, chamando-nos a atenção para o conhecimento das conexões deste núcleo e uma melhor compreensão do papel deste peptídeo na via auditiva. A literatura sobre as eferências deste núcleo no rato é pouca e as informações disponíveis limitam-se ao estudo de projeções específicas, ou só da via olivococlear (ASCHOFF & OSTWALD, 1987), ou só analisando alguns núcleos auditivos do tronco encefálico (DOUCET JR., & RYUGO DK, 2003) ou ainda em população de ratos com hipotireoidismo (CANTOS R. et al., 2003). Outra consideração que pode ser feita em relação ao estudo das projeções do LSO é a escolha do traçador neuronal utilizado. Alguns autores utilizaram, por exemplo, o traçador neuronal retrógrado HRP, injetado em outros núcleos da via auditiva, para observar células retrogradamente marcadas no LSO. O HRP tem algumas limitações: entra

nas células por difusão passiva; portanto, há necessidade de grande quantidade de depósito, que normalmente gera uma grande área de injeção. O depósito de HRP pode se difundir e gerar uma captação por terminais distantes do centro da injeção; o HRP pode ser captado por células da glia. Para que se obtenha uma boa visualização de neurônios marcados com HRP, o material deve ser fixado com misturas que contenham glutaraldeído (0,5 a 2,5%), o que prejudica os estudos da neuroquímica dos neurônios retrogradamente marcados por meio de dupla marcação; a degradação do HRP é muito rápida e o tamanho do local de injeção se altera, dependendo do período de sobrevivência do animal após a injeção (CAVALCANTE J.C & ELIAS C.F, 2007). Há ainda trabalhos que utilizam o traçador neuronal retrógrado Fluorogold (FG) em outros núcleos da via auditiva, para observar células retrogradamente marcadas no LSO. Aparentemente, o FG pode ser captado por fibras de passagem intactas, o que tem que ser visto como desvantagem da técnica (CAVALCANTE J.C. & ELIAS C.F., 2007).

No estudo das eferências do LSO, utilizamos o traçador neuronal anterógrado BDA e observamos os cortes encefálicos do bulbo olfatório até a medula espinhal. Para este estudo utilizamos 3 casos que tiveram injeção de BDA centradas no LSO. Uma vez que o LSO é um núcleo extenso no seu eixo médio-lateral, seria interessante observar se existem diferenças entre as projeções de um animal que teve a parte mais lateral atingida pelo traçador, e outro cuja injeção atingiu a parte mais medial. Doucet e Ryugo (2003) observaram, após injeção de BDA no núcleo coclear dorsal ipsilateral que o LSO recebe projeções de forma topograficamente organizada. No LSO é observada uma organização tonotópica, sendo que as células que respondem as frequências mais baixas localizam-se lateralmente enquanto que as de alta frequência localizam-se medialmente (ROBERTSON et al., 1988; WEBSTER WR,1995). No gato há uma organização tonotópica nas projeções

(GLEDENNING & MASTERTON, 1983). No entanto, nossas injeções estão localizadas em regiões semelhantes do LSO, o que não permitiu este tipo de análise. Como já salientamos, não há diferenças significativas entre as projeções dos 3 animais.

5.2.1. Vias de projeção do LSO

5.2.2. Projeções intranucleares e para o COS

Temos poucos dados na literatura descrevendo as projeções do LSO no rato ao longo de todo encéfalo para podermos comparar com os dados encontrados neste estudo. Este trabalho contribui, portanto, para uma melhor compreensão das eferências deste núcleo no rato, principalmente no que se refere às projeções prosencefálicas, bem como para estruturas não pertencentes à via auditiva.

Observamos que as eferências do LSO no rato podem ser descritas por quatro vias principais de projeção: duas vias ascendentes, sendo uma ipsi e a outra contralateral e duas vias descendentes, sendo uma ipsi e a outra contralateral. A densidade de marcação destas vias é diferente, em ordem decrescente temos: mais densamente marcada a via ascendente ipsilateral, depois moderadamente a ascendente contralateral, seguida das vias descendentes contralateral com marcação de moderada a fraca e ipsilateral fracamente marcada, respectivamente (Figura 7, na seqüência as vias são representadas por: linhas azul, amarela, vermelha e roxa).

O LSO faz parte de uma estação complexa dentro do sistema auditivo, o complexo olivar superior, local onde uma variedade de entradas ipsi e contralaterais fornece ao sistema as bases anatômicas das funções da audição binaural. Como já foi descrito, o LSO

apresenta uma organização tonotópica. Observamos grande quantidade de fibras e terminais em projeções intranucleares. Muito provavelmente, as informações auditivas que chegam em determinada parte do núcleo, seja ela responsável por altas ou baixas frequências, são comunicadas a todo o núcleo antes de ser transmitidas a outros níveis rostrais e/ou caudais da via auditiva.

Harrison & Feldman, 1970 e Ramon Y Cajal, 1995 descreveram através de estudos anatômicos utilizando a técnica de Golgi, que a arborização dendrítica dos neurônios olivares é bastante complexa, e que as fibras deixam o LSO principalmente pelos seus hilos. A descrição da complexidade dendrítica dos neurônios do LSO feita por estes autores e a observação de que as fibras deixam o núcleo principalmente pelos hilos dorsal e ventral, foram confirmadas em nosso estudo após injeção do traçador BDA. Observamos que as fibras BDA ramificam-se formando uma rede com vários neurônios, de forma que a informação sensorial proveniente de uma única fibra, é transmitida a vários outros neurônios. Observamos ainda que as fibras deixam o núcleo preferencialmente pelos hilos.

Um proeminente feixe de fibras deixa o LSO pelo hilo ventral e inerva todos os núcleos do COS ipsilateral. O COS é o primeiro sítio de integração binaural na via auditiva (WEBSTER WR, 1977; MASTERTON et al., 1975). A localização da fonte sonora é sinalizada por diferenças de tempo de chegada (DTC) e de amplitude (DTA) do estímulo das orelhas. Estudos fisiológicos têm mostrado que sons de baixa e alta frequência são localizados baseados na DTC e DTA, respectivamente. Acredita-se que o LSO é responsável por iniciar a decodificação da DTA e o MSO da DTC (TOLLIN, DJ, 2003). Assim sendo, pode-se sugerir um papel conjunto dos núcleos do COS na localização sonora e, portanto, justifica a grande projeção do LSO para estes núcleos (Figura 7, linhas verdes).

5.2.3. Via de projeção ascendente ipsilateral

Esta via é a mais proeminente e inicia-se nas fibras que deixam o LSO pelo hilo dorsal e chega ao córtex somatosensorial primário ipsilateral. Ao deixar o LSO a via ascende via corpo trapezóide até alcançar o lemnisco lateral inervando densamente o núcleo intermédio do lemnisco lateral e o núcleo dorsal do lemnisco lateral respectivamente. Em seguida, o feixe alcança o colículo inferior distribuindo-se densamente por todas as camadas do colículo. Neste nível o núcleo dorsal do lemnisco lateral emite um feixe de fibras colaterais, que segue em direção à linha média passa pelo fascículo longitudinal medial e provavelmente participa na inervação do colículo inferior contralateral. A marcação do lemnisco lateral e dos núcleos torna-se moderada quando observada mais rostralmente.

Bajo e colaboradores (1993), após injeção de traçador anterógrado *Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin* (PHA-L) e biocetina no núcleo dorsal do lemnisco lateral observou que produzia intensa marcação bilateral para o núcleo central do colículo inferior e marcação moderada bilateralmente para o córtex externo do colículo inferior. Os autores especulam que as aferências do núcleo dorsal do lemnisco lateral são inibitórias e estes resultados estão de acordo com Li e Kelly (1992b). Não temos dados que confirmem as projeções do núcleo intermédio do lemnisco lateral no rato. Os núcleos do lemnisco lateral parecem ser um importante “link” de transmissão da atividade auditiva do COS para o CI.

Observamos uma distribuição das fibras do CI bastante densa em todas as camadas: núcleo central, braço do CI, camada do córtex externo e núcleo dorsal do CI. Em um nível mais rostral, a distribuição das fibras passa a ser moderada e fica limitada ao córtex externo. Uma marcação densa também foi observada na comissura do CI atravessando para o CI contralateral.

O colículo inferior é a principal estrutura da via auditiva estando numa posição focal para processar ambos os padrões de informações: centrípeta e centrífuga (COLEMAN J.R. & CLERICI WJ. 1987). Estes autores estudaram as projeções do colículo inferior, através de injeção de peroxidase de raiz forte (HRP) conjugada com aglutinina do germe de trigo (WGA) em ratos. Estudos anteriores sobre as conexões do CI, não o diferenciavam em camadas, estes autores propuseram-se a investigar as projeções do CI considerando a divisão do núcleo em 3 camadas principais: núcleo central, córtex dorsal e externo, propostas por Ramón Y Cajal (1911). Quando estes autores (COLEMAN J.R. & CLERICI WJ. 1987) injetaram no córtex externo, não foram encontrados neurônios marcados no COS, mas encontraram neurônios marcados na camada profunda do colículo superior e uma fonte significativa de células marcadas foi observada em núcleos somatosensoriais no tronco. Foi observada também marcação no núcleo cuneato, núcleo grácil e núcleo trigeminal espinhal. Também se observou marcação no núcleo lateral da substância negra, região parabraquial, núcleo periventricular. Quando injetaram no córtex dorsal, os autores descreveram esparsas marcações no COS, principalmente ipsilateral à injeção, porém sem diferenciar os núcleos. A injeção no núcleo central resultou numa robusta marcação de núcleos da via auditiva, dentre eles o LSO bilateralmente marcado. Estes autores descrevem ainda um sistema de fibras bastante desenvolvido na comissura do colículo. Este dado está de acordo com nossa descrição na comissura. Estudos preliminares no rato mostram que aproximadamente 25% dos neurônios comissurais devem ser gabaérgicos (YANG et al. 2000). As aferências comissurais podem ou ser excitatórias ou inibitórias para o CI contralateral. O colículo inferior no rato mostra distinto padrão de projeções ascendentes e descendentes. O córtex externo recebe aferências do sistema lemniscal somatosensorial e deve estar envolvido em processamento de informação multissensorial envolvido em

reflexo comportamental ou em controle de mecanismos descendentes (COLEMAN J.R. & CLERICI W.J, 1987). De acordo com os nossos dados, o LSO projeta-se densamente para todas as camadas do CI e mais rostralmente esta marcação passa a ser moderada e limitada ao córtex externo, mas de acordo com estes autores, nem todas as camadas do CI projetam-se para o LSO. Vale considerar aqui que a correspondência entre as camadas do CI que utilizamos em nosso trabalho de Paxinos & Watson (1998) e a destes autores não é a mesma.

Coleman JR. & Clerici WJ (1987) descreveram projeção do colículo inferior para a camada profunda do colículo superior. Nosso estudo confirma e estende estes dados. Observamos que as fibras da via ascendente ipsilateral deixam o CI passando pelo núcleo intercolicular e inervam o colículo superior, atingindo, além da camada profunda, as camadas: branca intermédia, cinza intermédia e pouquíssimas fibras na camada cinza superficial. A inervação do colículo superior pelo inferior muito provavelmente deve-se ao fato de que um conjunto de eventos deve corroborar para a localização de uma fonte sonora. A movimentação dos olhos no sentido de direcionar para a fonte sonora seria uma delas e justificaria a pequena marcação observada por nós no EW, núcleo responsável pela acomodação da lente e da pupila (BITTENCOURT et al., 1999) e a movimentação da cabeça em conjunto, justificando uma pequena inervação do núcleo rubro.

A substância cinzenta periaquedutal (PAG) constitui um elemento crucial no circuito de medo no cérebro. Junto com a amígdala basolateral e hipotálamo medial, a PAG representa uma estrutura engajada na resposta de defesa (VIANNA, 2001). Anatomicamente a PAG é dividida em colunas longitudinais (BANDLER, 1994). Encontramos fibras esparsamente distribuídas, principalmente na DMPAG e DLPAG. Estas colunas estão particularmente mobilizadas em resposta ao predador natural, envolvidos

com mecanismos de defesa. Muito provavelmente a informação auditiva que chega nesta região é utilizada pelo animal no comportamento de defesa para localizar o predador. Um pouco mais rostral observamos um cruzamento de fibras na decussação do pedúnculo cerebelar superior.

Em uma parte mais rostral, na comissura do colículo superior, observa-se um aglomerado de fibras que vem do núcleo supragenículado do tálamo (SG) e desenha um núcleo não delimitado no Atlas de Paxinos & Watson (1998) e possivelmente ainda não descrito na literatura. Sabemos, por comunicação pessoal, que um grupo de pesquisadores da Universidade de Salamanca, com quem mantemos colaboração, vem tentando descrever tal núcleo, através do estudo da citoarquitetura, imunoistoquímica e hodologia. Nossos dados podem colaborar com tal descrição, indicando que este núcleo recebe aferências do LSO e que provavelmente participa da via auditiva.

A via ascendente atinge então os primeiros núcleos talâmicos: o núcleo supragenículado e o núcleo genículado medial, parte medial (MGM). O braço do colículo inferior encontra-se moderadamente marcado. Mais rostralmente observa-se uma distribuição de fibras bastante interessante no núcleo genículado medial, parte ventral (MGV): quanto mais caudal, as fibras encontram-se distribuídas mais medialmente, à medida que observamos rostralmente, a marcação que não é muito densa, distribui-se por todo o núcleo e bem mais rostral, ela fica mais lateralmente, só contornando os limites do núcleo. O núcleo genículado medial, parte dorsal (MGD) encontra-se densamente marcado por fibras ao longo de todo o núcleo. O núcleo ventral pósteromedial apresenta uma distribuição bastante expressiva e menos densamente marcado temos o núcleo ventral pósterolateral. Lateral a este ascende um feixe de fibras pela radiação acústica. Esta distribuição diferenciada deve corresponder a divisão tonotópica que está presente em todos

os níveis da via auditiva, desde seus receptores periféricos, a células ciliadas da orelha interna até o córtex auditivo. A grande maioria das fibras termina nos núcleos talâmicos, dando indícios de que no rato, a informação auditiva é processada basicamente no tálamo.

O tálamo auditivo é freqüentemente referido como sendo um centro relé sensorial, sugerindo um papel passivo e limitado do processamento sensorial, ele é atualmente implicado em uma variedade de processos fisiológicos (WINNER et al. 1999b), processamento auditivo puro (HU et al., 1994) e associação de mudanças envolvendo aprendizado e memória (McINTOSH & GONZÁLEZ-LIMA, 1995). Estes papéis complementares conferem ao tálamo uma hierarquia de processador sensorial (WINER et al., 1999b). Alguns autores sugeriram que o MGV tem uma função puramente acústica, enquanto que o MGD está envolvido em atenção acústica e o MGM e núcleo talâmico paralamina posterior estão envolvidos em ativação multisensorial e aprendizado auditivo emocional (LEDOUX et al., 1987; BORDI & LEDOUX, 1994a e 1994b). Estes trabalhos dão suporte aos dados referidos por nós em relação à robusta marcação dos núcleos talâmicos.

Neste nível observamos ainda poucas fibras passando pela área hipotalâmica lateral. De acordo com Risold e colaboradores, 1994, a área hipotalâmica como um todo, integra aferências de diversas regiões prosencefálicas, enviando projeções de volta para essas regiões e para núcleos do tronco encefálico associados à expressão de comportamentos motivados, incluindo respostas autonômicas e somáticas.

Mais rostralmente encontramos pequeno número de fibras passando pelo núcleo da banda diagonal de Broca. Pouquíssimas fibras foram observadas no núcleo talâmico póstero-lateral, médio rostral e latero-rostral. Posteriormente são inervados os núcleos talâmicos laterodorsal, ventrolateral e paraventricular anterior.

E esta via ascendente ipsilateral termina innervando o córtex somatossensorial primário. Mulders & Robertson (2000) injetaram traçador retrógrado no córtex auditivo e localizaram células retrogradamente marcadas ipsilateralmente à injeção no LSO.

5.2.4. Via de projeção ascendente contralateral

As considerações feitas para os núcleos já citados na via ascendente ipsilateral são válidas também para esta via, ressaltaremos apenas as diferenças. Esta via tem densidade de marcação menor que a ipsilateral.

Esta via inicia-se com um proeminente feixe de fibras que deixa o núcleo pelo hilo ventral e após distribuir-se para os outros núcleos do COS. O feixe deixa o COS pelo núcleo periolivar medioventral e pelo núcleo do corpo trapezóide e cruza a linha média: algumas fibras pelo trato piramidal e outras pelo corpo trapezóide.

O núcleo do corpo trapezóide é um grupo de células heterogêneas do COS situada estrategicamente na intersecção das projeções dos núcleos cocleares e projeções descendentes do CI (HUFFMAN & HENSON, 1990). Warr WB e colaboradores (1996) analisaram as projeções centrais do núcleo do corpo trapezóide no rato injetando dois traçadores anterógrados, ^3H leucina e BDA. Dentre os resultados encontrados os autores observaram que as fibras deixam o núcleo do corpo trapezóide atravessam o núcleo periolivar medioventral e innervam o LSO contralateral. Kulesza e colaboradores (2000) demonstraram que as células da parte medial do núcleo do corpo trapezóide, bem como suas fibras e terminais apresentam forte imunorreatividade a glicina. Moore e colaboradores

(1983) mostraram uma sensibilidade a esticnina da parte medial do núcleo do corpo trapezóide com efeito inibitório no LSO ipsilateral.

As fibras que passam pelo trato piramidal e pelo corpo trapezóide e cruzaram a linha média unem-se em um único feixe e contornam o núcleo medioventral contralateral e após contorná-lo divide-se novamente e um feixe entra ventralmente pelo LSO contralateral marcando preferencialmente a parte medial do núcleo e o outro feixe ascende pelo corpo trapezóide e mais rostralmente inerva o núcleo dorsal do lemnisco lateral.

Este ramo ascende e distribui-se esparsamente pelo núcleo ventral do lemnisco lateral, núcleo intermédio do lemnisco lateral e núcleo paraleminiscal de onde partem poucas fibras e atingem o núcleo do braço do colículo inferior, córtex externo do colículo inferior e as camadas do colículo superior: camada cinza intermédia, e camada branca intermédia. Mais rostralmente a camada óptica do colículo superior também recebe uma fraca marcação.

Um pequeno feixe de fibras que deixa o lemnisco lateral chega ao núcleo suprageniculado do tálamo e ao núcleo geniculado medial, parte medial, com uma fraca distribuição de fibras. Mais rostralmente marcam fracamente o núcleo geniculado medial, parte dorsal e o núcleo geniculado medial, parte ventral. Esta via contralateral termina no tálamo, ao contrário da ipsilateral que termina em região cortical.

5.2.5. Via de projeção descendente ipsilateral

A via de projeção descendente do LSO é mais proeminente contralateralmente do que ipsilateralmente.

Esta via inicia-se com um feixe de fibras que deixa o núcleo pelo hilo ventral do LSO, trafega pelo corpo trapezóide e cruza pelo feixe olivococlear, a raiz vestibular do nervo vestibulococlear e dirige-se ao núcleo coclear ventral anterior. As fibras distribuem-se por todo o núcleo bem como poucas células retrogradamente marcadas.

A fim de perceber a diferença de intensidade entre os estímulos recebidos por cada orelha, os neurônios olivares são aferentados pelo núcleo coclear ventral anterior ipsilateral (HELFERT et al., 1991) de forma excitatória e pelo contralateral de forma inibitória (MOORE et al., 1983).

Estas projeções tanto ipsi quanto contralaterais são tonotópicamente organizadas para que as respostas dos neurônios olivares sejam um correlato neural da subtração e a diferença de intensidade entre as orelhas seja percebida (TOLLIN, 2003).

Horvath e colaboradores (2000) injetaram “fast blue” no núcleo coclear ventral do rato para observar células retrogradamente marcadas no COS. Em nossos estudos utilizamos a subdivisão nuclear de Paxinos & Watson (1998), que divide o núcleo coclear ventral em anterior e posterior, estes divididos pelo nervo coclear. Os autores não observaram marcação retrógrada nas células intrínsecas do LSO, porém encontraram células marcadas na borda do núcleo. Estas células são chamadas de células “shell” (VETTER & MUGNAINI, 1992). Estes resultados não concordam com nossos dados. Nossa injeção limitou-se as células intrínsecas do LSO e não atingiu as células “shell”.

O feixe de fibras continua dorsalmente pela substância glial paracoclear. Mais caudalmente as fibras inervam o núcleo coclear dorsal, a borda medial do núcleo intersticial do VIII par e saem pela raiz do VIII par.

O núcleo coclear dorsal no rato contém um grande número de células gabaérgicas e/ou glicinérgicas positivo, presumidamente neurônios inibitórios (OTTERSEN et al.,

1995). Doucet JR e colaboradores (2003) injetaram BDA no núcleo coclear dorsal e observaram marcação em várias estruturas do tronco, incluindo o LSO ipsilateral. Nós verificamos que o núcleo coclear dorsal é inervado ipsi e contralateralmente. No sistema nervoso central esta via termina inervando o núcleo coclear ventral, parte posterior.

Poucas fibras foram encontradas no núcleo “locus coeruleus”. Este núcleo recebe aferências de muitos lugares do neuro-eixo; algumas de suas funções envolvem regulação autonômica, processamento sensorial e orientação comportamental (ASTON-JONES et al., 1991c). Não encontramos na literatura outros trabalhos que demonstrassem eferência do LSO para o “locus coeruleus”.

5.2.6. Via de projeção descendente contralateral

A via de projeção descendente contralateral do LSO é inicialmente formada pela junção de dois ramos de fibras. Um ramo deixa dorsalmente o LSO ipsilateral e cruza obliquamente pela formação reticular indo em direção ao núcleo subcoeruleus, parte dorsal. O outro ramo deixa dorsalmente o LSO contralateral e ascende até juntar-se com o primeiro ramo descrito. Este feixe inerva respectivamente o núcleo coclear ventral anterior, núcleo intersticial do VIII par, raiz coclear do VIII par e mais caudalmente o núcleo coclear dorsal.

Um pequeno feixe deixa o LSO contralateral ventralmente e ascende pelo corpo trapezóide e atinge os núcleos: coclear ventral anterior e núcleo coclear dorsal.

A via auditiva é bastante complexa, como podemos observar pela distribuição das fibras eferentes do LSO e de outros núcleos da via auditiva que utilizamos como controle. A informação auditiva oriunda dos receptores auditivos no órgão periférico, que chega a

um importante centro de integração da informação binaural, o COS pode seguir por vias ascendentes por várias possibilidades de conexões, ipsi ou contralateral, ora inibindo, ora excitando determinado neurônio, utilizando-se de alguns cruzamentos comissurais, passando por vários “relés” integrando informações auditivas ou outras informações sensoriais e emitindo colaterais para outras regiões fora da via auditiva, podendo contribuir para respostas de comportamentos motivados. Identifica-se ainda na via auditiva uma série de alças de “feedback” desde o córtex cerebral até os núcleos cocleares indicando uma modulação cortical das informações periféricas (FAYE-LUND, 1986).

5.3. UCN 1 e eferências do LSO

Neuropeptídeos são encontrados através de todo sistema nervoso central ou periférico. São importantes em funções como nocicepção, comportamento alimentar, resposta ao stress entre outras. O LSO é neuroquimicamente heterogêneo, expressando neurotransmissores clássicos como γ -aminobutírico (GABA) e acetilcolina (AChE), espacialmente segregados dentro do LSO (VETTER DE et al, 1991).

Após o mapeamento da UCN 1 por Bittencourt et al. (1999) e a descrição de células UCN 1-ir no LSO e de fibras na via olivococlear. Decidimos comparar os locais de distribuição de fibras UCN 1-ir descritas pelos autores, com as projeções agora descritas em nosso trabalho, para tentar compreender melhor o papel deste peptídeo que marca tão expressivamente as células do LSO, podendo ser até considerado como o “marcador” deste núcleo, como já detalhado anteriormente por nós.

De acordo com Bittencourt e colaboradores (1999) a projeção UCN 1-ir mais proeminente é a via olivococlear. Nesta região foram observadas grande quantidade de fibras UCN 1-ir nos núcleos vestibulares e cocleares. Sendo que no vestibular medial e no coclear dorsal a projeção foi mais proeminente. Em outras estruturas auditivas como o MSO, o núcleo do corpo trapezóide e o lemnisco lateral, receberam somente esparsas fibras UCN 1-ir. De outros principais campos de projeções do LSO, o colículo inferior recebe uma quantidade moderada de fibras. No tálamo, o núcleo geniculado medial, parte medial recebe uma pouquíssimas fibras. Das camadas do colículo superior: a superficial cinzenta e a camada profunda recebem uma marcação fraca de fibras, a cinzenta intermédia, uma moderada. Todos estes locais descritos, coincidem com as projeções do LSO observados por nós, diferindo em densidade de marcação. As projeções ascendentes do LSO são mais proeminentes, enquanto que como se pode observar as projeções urocortinérgicas mais proeminentes são para as estruturas das vias descendentes.

Como já citamos anteriormente, identifica-se na via auditiva uma série de alças de “feedback”. A via olivococlear seria mais uma destas alças, melhorando a relação sinal-ruído por sua ação direta nas fibras auditivas primárias.

Vetter e colaboradores (2002), produziram camundongo “knock-out” para UCN 1 ($UCN^{-/-}$) e verificaram através de testes auditivos, como a audiometria de respostas elétricas do tronco cerebral (“brainstem evoked response audiometry” – BERA) e emissões otoacústicas, que o camundongo $UCN^{-/-}$ apresenta limiares mais altos em todas as frequências testadas (todas altas frequências). Essa perda auditiva (aumento dos limiares tonais) pela ausência da UCN 1 é similar a observada por Walsh e colaboradores (1998) após a transecção do feixe olivococlear em gatos neonatos, que tiveram aumento dos limiares. Este aumento dos limiares não foi observado quando o feixe olivococlear foi

seccionado no gato adulto, especulando-se que algum componente do sistema olivococlear é necessário para o desenvolvimento normal dos limiares auditivos. Isto poderia sugerir que um componente inicial da via olivococlear para o desenvolvimento normal da sensibilidade dos limiares auditivos seria a presença da UCN 1. E portanto, estaria relacionada com a função auditiva propriamente dita e não desempenhando um papel relacionado ao stress na via auditiva.

Pelas projeções urocortinérgicas serem predominantemente descendentes e de acordo com os dados acima referidos, a UCN 1 parece exercer um papel muito mais relacionado a modulação da eferência do órgão periférico. Pode-se supor que o LSO agiria através da inervação urocortinérgica na região ventral das células ciliadas internas melhorando a relação sinal/ruído, para localização da fonte sonora. E que as projeções ascendentes do LSO, além de levar a informação da integração binaural a centros auditivos mais rostrais, informa ainda através de pequenas projeções, outras estruturas não pertencentes à via auditiva, porém muito importantes para uma resposta global do animal diante da localização da fonte sonora seja ela estressante ou não, por exemplo, localizar um rugido e fugir do predador.

O principal objetivo na pesquisa auditiva é compreender a fisiologia do sistema auditivo humano e identificar as causas e tratamentos para prejuízos auditivos. Comparar a pesquisa auditiva é importante porque o modelo animal pode ser desenvolvido, avaliado, e eventualmente aplicado a problemas clínicos (FAY, 1994).

6. CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados, envolvendo o estudo das eferências do LSO, foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

1. O LSO apresenta densa projeção intranuclear e para o COS ipsilateral.
2. O LSO projeta-se para o LSO contralateral, preferencialmente para a parte medial do núcleo.
3. As principais projeções do LSO podem ser divididas em quatro vias:

- **Duas vias ascendentes:**

ipsilateral: é a via mais proeminente e os principais locais de projeção são :
LSO→tz→ll e seus núcleos→CI→CS→tálamo→córtex.

contralateral: apresenta densidade moderada de marcação e os principais locais de projeção são: LSO→fibras cruzam a linha média pelo tz e py→LSO contra→tz→ll→DLL→CI→CS→tálamo.

- **Duas descendentes:**

ipsilateral: apresenta densidade pequena de marcação e os principais locais de projeção são: LSO→tz→VCA→DC→VCP→8cn

contralateral: densidade de marcação de moderada a fraca e os principais locais de projeção são: LSO ipsi→LSO contra→tz→VCA→DC→VCP→8cn.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNELLO D.; BERTINI R.; SACCO S.; MEAZZA C.; VILLA P.; GHEZZI P.

Corticosteroid-independent inhibition of tumor necrosis factor production by the neuropeptide urocortin. **Am J Physiol.**;275(5 Pt 1):E757-62, 1998.

ANDO T.; RIVIER J.; YANAIHARA H.; ARIMURA A. Peripheral corticotropin-releasing factor mediates the elevation of plasma IL-6 by immobilization stress in rats. **Am J Physiol.** ;275(5 Pt 2):R1461-7, 1998.

ASCHOFF, A. & OSTWALD, J. Different origins of cochlear efferents in some bat species, rats, and guinea pigs. **J Comp Neurol**, 264(1): 56-72, 1987.

ASTON-JONES,G., SHIPLEY, MT., CHOUVET, G., ENNIS, M., VAN BOCKSTAELE, EJ., PIERIBONE, V, SHIEKHATTAR, R, AKAOKA, H., DROLET, G., ASTIER, B., CHARLETY, P., VALENTINO, R. and WILLIAMS, JT., Afferente regulations of locus coeruleus neurons: Anatomy, physiology and pharmacology. **Prog. Brain. Res.** 88, 47-75, 1991c.

BAJO, V.M; MERCHAN, MA., LOPEZ, DE. ROUILLER, EM. Neuronal morphology and efferent projections of the dorsal nucleus of the lateral lemniscus in the rat. **J. Comp. Neurol.** 334, 241-262, 1993.

BAMBERGER CM.; WALD M.; BAMBERGER AM.; ERGUN S.; BEIL FU.; SCHULTE HM. Human lymphocytes produce urocortin, but not corticotropin-releasing hormone. **J Clin Endocrinol Metab.**;83(2):708-11, 1998.

BANDLER R. AND SHIPLEY M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression?, **Trends Neurosci. Res.** 17, pp. 379–389. 1994.

- BARSYTE, D.; TIPPING, DR.; SMART, D.; CONLON, JM.; BAKER, BI.; LOVEJOY, DA. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) urotensin-I: structural differences between urotensins-I and urocortins. **Gen. and Comp. Endocrinol.**, 115: 169-177, 1999.
- BEHAN, DP.; GRIGORIADIS, DE.; LOVENBERG, T.; CHALMERS, D.; HEINRICHS, S.; LIAW, C.; DE SOUZA, EB. Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. **Mol. Psych.**, 1:265-277, 1996.
- BEHAN, DP.; HEINTICHS, SC.; TRONCOSO, C.; LIU, X-J.; KAWAS, CH.; LING, N.; DE SOUZA, EB. Displacement of corticotropin releasing factor from its binding protein as a possible treatment for Alzheimer's disease. **Nature**, 378:284-287, 1995 b.
- BERGLUND, A.M. & RYUGO, D.K. Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. **J Comp Neurol**, 255(4): 560-70, 1987.
- BERN, HÁ.; PEARSON, D.; LARSON, BA.; NISHIOKA, RS. Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Ürophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes. **Recent Prog. in Horm. Res.**, 41: 533-551, 1985.
- BEYERL, B.D. Afferent projections to the central nucleus of the inferior colliculus in the rat. **Brain Res**, 145(2): 209-23, 1978.
- BITTENCOURT, JC.; VAUGHAN, J.; ARIAS, C.; RISSMAN, RA.; VALE, WW.; SAWCHENKO, PE. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. **J. Comp. Neurol.**, 415:285-312, 1999.

- BORDI, F. & LeDOUX J.E. Response properties of single unit areas of rat auditory thalamus that project to the amígdala. I Acoustic discharge patterns and frequency receptive fields. **Exp. Brain Research**. 98, 261-274, 1994a.
- BORDI, F. & LeDOUX J.E. Response properties of single unit areas of rat auditory thalamus that project to the amígdala. II Cells receiving convergent auditory and somatosensory inputs and cells antidromically activated by amygdala stimulation. **Exp Brain Res**. 98, 275-286, 1994b.
- BRANDT, HM, APKARIAN, AV. Biotin-dextran a sensitive anterograde tracer for neuroanatomic studies in rat and monkey. **J. Neurosci Methods**, v. 45, p. 35-40, 1992.
- BRITTON, DR.; HOFFMAN, DK.; LEDERIS, K.; RIVIER, J. A comparison of the behavioral effects of CRF, sauvagine and urotensin I. **Brain Res.**, 304 (2): 201-205, 1984.
- BROWN, M.C. Morphology of labeled efferent fibers in the guinea pig cochlea. **J Comp Neurol**, 260(4): 605-18, 1987.
- BROWN, MR.; FISHER, LA.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; RIVIER, J.; VALE W. Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. **Endocrinol.**, 111 (3): 928-931, 1982.
- CAIRD, D. & KLINKE, R. Processing of binaural stimuli by cat superior olivary complex neurons. **Exp Brain Res**, 52(3): 385-99, 1983.
- CANTOS, R.; LÓPEZ, DE.; MERCHÁN, JA.; RUEDA, J.; Olivocochlear efferent innervation of the organ of corti in hypothyroid rats. **J. Comp. Neurol.** 459:454-467, 2003.

CAVALCANTE JC., ELIAS, CFR., Traçadores Neurais Retrógrados in: **Métodos em Neurociências**. p.115-131. Ed. Rocca., 2007.

CHALMERS, DT.; LOVENBERG, TW.; GRIGORIADIS, DE.; BEHAN, DP.; DE SOUZA, E.; Corticotropin-releasing factor receptors: from molecular biology to drug design. **TIPS**, 17: 166-172, 1996.

CHANG, C-P.; PERASE II, RV.; O'CONNELL, S.; ROSENFELD, MG. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. **Neuron**, 11: 1187-1195, 1993.

CHEN, R.; LEWIS, KA.; PERRIN, MH.; VALE, WW. Expression cloning of a human corticotropin-releasing factor receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, 90: 8967-8971, 1993.

COLEMAN, JR., & CLERICI WJ. Sources of projections to subdivisions of the inferior colliculus in the rat. **J. Comp. Neurol** 262: 215-226, 1987.

COSTE SC.; KESTERSON RA.; HELDWEIN KA.; STEVENS SL.; HEARD AD.; HOLLIS JH.; MURRAY SE.; HILL JK.; PANTELY GA.; HOHIMER AR.; HATTON DC.; PHILLIPS TJ.; FINN DA.; LOW MJ.; RITTENBERG MB.; STENZEL P.; STENZEL-POORE MP. Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. **Nat Genet.**;24(4):403-9, 2000.

DAHLSTROM, A. Effects of vinblastine and colchicine on monoamine containing neurons of the rat, with special regard to the axoplasmic transport of amine granules. **Acta Neuropathol** (Berl), v5, n. Suppl, p. 226-37, 1971.

- DE PEDRO, N.; DELGADO, MJ.; PINILOS, ML.; ALONSO-BEDADE, M. Alpha 1-adrenergic and dopaminergic receptors are involved in the anorectic effect of corticotropin-releasing factor in goldfish. **Life Sci.**, 62 (19): 1801-1808, 1998.
- DE PEDRO, N.; GANCEDO, B.; ALONSO-GOMEZ, AL.; DELGADO, MJ.; ALONSO-BEDATE, M. Alterations in food intake and thyroid tissue content by corticotropin-releasing factor in *Tinca tinca*. **Rev. Esp. Fisiol.**, 51 (2):71-75, 1995.
- DONALDSON, CJ.; SUTTON, SW.; PERRIN, MH.; CORRIGAN, AZ.; LEWIS, KA.; RIVIER, JE.; VAUGHAN, JM.; VALE WW. Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinol*, 137 (6): 2167-2170, 1996.
- DOUCET, J.R. & RYUGO, D.K. Axonal pathways to the lateral superior olive labeled with biotinylated dextran amine injections in the dorsal cochlear nucleus of rats. **J Comp Neurol**, 461(4): 452-65, 2003.
- ESCH, F.; LING, N.; BOHLEN, P.; BAIRD, A.; BENOIT, R.; GUILLEMIN, R. Isolation and characterization of the bovine hypothalamic corticotropin-releasing factor. **Boichem. Biophys. Res. Commun.**, 122:899-905, 1984.
- EYBALIN, M. Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. **Physiol. Rev.** 73, 309-373, 1993.
- FAY, RR., & POPPER, AN. Comparative hearing in mammals. **Springer Handbook of auditory Research. Springer** – Verlag – New York, 1994.
- FAYE-LUND, H. Projection from the inferior colliculus to the superior olivary complex in the albino rat. **Anat Embryol (Berl)**, 175(1): 35-52, 1986.

- FINLAYSON, P.G. & ADAM, T.J. Excitatory and inhibitory response adaptation in the superior olive complex affects binaural acoustic processing. **Hear Res**, 103(1-2): 1-18, 1997.
- FRYER, J.; LEDERIS, K.; RIVIER, J. Urotensin I, a CRF-like neuropeptide, stimulates ACTH release from the teleost pituitary. **Endocrinol.**, 113 (6): 2308-2310, 1983.
- FURUTANI, Y.; MORIMOTO, Y.; SHIBAHARA, S.; NODA, M.; TAKAHASHI, H.; HIROSE, T.; ASAI, M.; INAYAMA, S.; HAYASHIDA, H.; MIYATA, T.; NUMA, S. Cloning and sequence analysis of cDNA for ovine corticotropin-releasing factor precursor. **Nature**, 301: 537-540, 1983.
- GELFAND, S.A.; ROSS, L.; MILLER, S. Sentence reception in noise from one versus two sources: effects of aging and hearing loss. **J Acoust Soc Am**, 83(1): 248-56, 1988.
- GLENDENNING, K.K. & MASTERTON, R.B. Acoustic chiasm: efferent projections of the lateral superior olive. **J Neurosci**, 3(8): 1521-37, 1983.
- GLENDENNING, K.K.; BAKER, B.N.; HUTSON, K.A.; MASTERTON, R.B. Acoustic chiasm V: inhibition and excitation in the ipsilateral and contralateral projections of LSO. **J Comp Neurol**, 319(1): 100-22, 1992.
- GLENDENNING, K.K.; HUTSON, K.A.; NUDO, R.J.; MASTERTON, R.B. Acoustic chiasm II: Anatomical basis of binaurality in lateral superior olive of cat. **J Comp Neurol**, 232(2): 261-85, 1985.
- GLENDENNING, K.K.; MASTERTON, R.B.; BAKER, B.N.; WENTHOLD, R.J. Acoustic chiasm. III: Nature, distribution, and sources of afferents to the lateral superior olive in the cat. **J Comp Neurol**, 310(3): 377-400, 1991.

- GODFREY, DA; CARTER, JA.; LOWRY OH.; MATSCHINSKY FM. Distribution of gamma-aminobutyric acid, glycine, glutamate and aspartate in the cochlear nucleus of the rat, 1978.
- GOSNELL, BA.; MORLEY, JE.; LEVINE, AS. A comparison of the effects of corticotropin releasing factor and sauvagine on food intake. **Pharmacol Biochem Behav.**, 19 (5): 771-775, 1983.
- GRAY, H. Auditory and vestibular apparatus., in WARWICK, R. & WILLIAMMS, P.L., (eds): **Gray's Anatomy**, New York, Chuechill Livingstone, p. 1367-97, 1995.
- GREGORY, M. Handbook of fluorescent Probes and research products. **Eugene: Molecular Probes**, 2002.
- GUINAN, J.J., JR.; WARR, W.B.; NORRIS, B.E. Differential olivocochlear projections from lateral versus medial zones of the superior olivary complex. **J Comp Neurol**, 221(3): 358-70, 1983.
- HARADA S.; IMAKI T.; NARUSE M.; CHIKADA N.; NAKAJIMA K.; DEMURA H. Urocortin mRNA is expressed in the enteric nervous system of the rat. **Neurosci Lett.** 28;267(2):125-8, 1999.
- HARRISON, J.M. & FELDMAN, M.L. Anatomical aspects of the cochlear nucleus and superior olivary complex. **Contrib Sens Physiol**, 4: 95-142, 1970.
- HELFERT, R.H.; JUIZ, J.M.; BLEDSOE, S.C., JR.; BONNEAU, J.M.; WENTHOLD, R.J.; ALTSCHULER, R.A. Patterns of glutamate, glycine, and GABA immunolabeling in four synaptic terminal classes in the lateral superior olive of the guinea pig. **J Comp Neurol**, 323(3): 305-25, 1992.

- HELFERT, R.H.; SNEAD, C.R.; ALTSCHULER, R.A. The ascending auditory pathways., in ALTSCHULER, R.A.; BOBBIN, R.P.; CLOPTON, B.M.; HOFFMAN, D.W., (eds): **Neurobiology of hearing: the central auditory pathways**, New York, Raven Press, p. 1-26, 1991.
- HENRIOT, S; DAUTZENBERG, FM e KILPATRICK, GJ. Urocortin: slower dissociation than corticotropin releasing factor from de CRF binding protein. **Eur. J. Pharm.**, 37693): 321-324, 1999.
- HERKENHAM, M. Mismatches between neurotransmitter and receptor localizations in brain: observations and implications. **Neurosc**, 23 (1) 1-38, 1987.
- HORVATH, M.; KRAUS, K.S.; ILLING, R.B. Olivocochlear neurons sending axon collaterals into the ventral cochlear nucleus of the rat. **J Comp Neurol**, 422(1): 95-105, 2000.
- HSU, SM., RAINE, L., FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in imunoperoxidase techniques: a comparison between ABC AND unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem Cytochem**, v. 29, p. 577-80, 1981.
- HUFFMAN, R.F. AND HENSON, OWJ. The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus. **Brain Res. Rev.** 15, 295-323, 1990.
- HU.B., SENATOROV. V., and MOONEY. D. Lemniscal and non lemniscal synaptic transmission in rat auditory thalamus. **J. Physiol.** 479, 217-231, 1994.
- HUTSON, K.A.; GLENDENNING, K.K.; MASTERTON, R.B. Acoustic chiasm. IV: Eight midbrain decussations of the auditory system in the cat. **J Comp Neurol**, 312(1): 105-31, 1991.

- IKEDA K.; TOJO K.; SATO S.; EBISAWA T.; TOKUDOME G.; HOSOYA T.; HARADA M.; NAKAGAWA O.; NAKAO K. Urocortin, a newly identified corticotropin-releasing factor-related mammalian peptide, stimulates atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide secretions from neonatal rat cardiomyocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 18;250(2):298-304, 1998.
- IMAKI, J.; IMAKI, T.; VALE, W.; SAWCHENKO, PE. Distribution of corticotropin-releasing factor mRNA and immunoreactivity in the central auditory system of the rat. **Brain Res**, 547: 28-36, 1991.
- IRVINE, D.R.; PARK, V.N.; MCCORMICK, L. Mechanisms underlying the sensitivity of neurons in the lateral superior olive to interaural intensity differences. **J Neurophysiol**, 86(6): 2647-66, 2001.
- JONES DN.; KORTEKAAS R.; SLADE PD.; MIDDLEMISS DN.; HAGAN JJ. The behavioural effects of corticotropin-releasing factor-related peptides in rats. **Psychopharmacology (Berl)**.;138(2):124-32, 1998.
- KAKIYA S.; YOKOI H.; ARIMA H.; IWASAKI Y.; OKI Y.; OISO Y. Central administration of urocortin inhibits vasopressin release in conscious rats. **Neurosci Lett.** 29;248(2):144-6, 1998.
- KELSALL, CJ. & BALMENT, RJ. Native urotensin influence cortisol secretion and plasma cortisol concentration in the euryhaline flounder, *platichthys flesus*. **Gen. Comp. Endocrinol**, 112(2): 210-219, 1998.
- KOSTICH, WA.; CHEN, A.; SPERLE, K.; LARGENT, BL. Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF 2γ receptor. **Mol. Endocrinol.**, 12: 1077-1085, 1998.

- KOZICZ, T.; YANAIHARA, H.; ARIMURA, A. Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. **J. Comp. Neurol.** Feb 2; 391(1):1-10, 1998.
- KUDO, M.; KITAO, Y.; OKOYAMA, S.; MORIYA, M.; KAWANO, J. Crossed projection neurons are generated prior to uncrossed projection neurons in the lateral superior olive of the rat. **Brain Res Dev Brain Res**, 95(1): 72-8, 1996.
- KULESZA, RJ., JR, and BERREBI, AS. Superior paraolivary nucleus of the rat is a GABAergic nucleus. **J. Assoc. Res. Otolaryngol.** 1, 255-269, 2000.
- KUNGEL, M. AND FRIAUF, E. Somatostatin and leu-enkephalin in the rat auditory brainstem during fetal and postnatal development, **Anat. Embryol (Berl)**, 191: 425-43, 1995.
- LEDERIS, K. Frontiers of Neuroendocrinology. The fish urotensins: hypophyseal and peripheral actions in fishes and mammals, vol8, cap8, **Raven Press**, New York, pp: 247-263, 1984.
- LEDERIS, K.; FRYER, J.; RIVIER, J.; MacCANNELL, KL.; KOBAYASHI, Y.; WOO, N.; WONG, KL. Neurohormones from fish tails II: actions of urotensin I in mammals and fishes. **Recent Progress in Hormone Res.**, 41: 553-576, 1985a.
- LEDERIS, K.; FRYER, JN.; YULIS, CR. The fish neuropeptide urotensin I: its physiology and pharmacology. **Peptides**, 6 (3): 353-361, 1985b.
- LEDERIS, K.; LETTER, A.; McMASTER, D.; MOORE, G.; SCHLESINGER, D. Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from *Catostomus*. **Science**, 218: 62-164, 1982.

- LEDERIS, KL. & MEDAKOVIC, M. Pharmacological observations on the hypotensive action of extracts of teleost fish Urophyses (urotensin I) in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 51 (3): 315-324, 1974.
- LeDOUX, JE., RUGGIERO, DA., FOREST, R., STORNETTA, R. e REIS, DJ. Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the colliculus and spinal cord in the rat. **J. Comp. Neurol.** 264, 123-146, 1987.
- LEITCH IM.; BOURA AL.; BOTTI C.; READ MA.; WALTERS WA.; SMITH R. Vasodilator actions of urocortin and related peptides in the human perfused placenta in vitro. **J Clin Endocrinol Metab.**;83(12):4510-3, 1998.
- LEWIS, DA.; FOOTE, SL.; CHA, Cl. Corticotropin-releasing factor immunoreactivity in monkey neocortex: an immunohistochemical analysis. **J. Comp. Neurol.**, 290 (4): 599-613, 1989.
- LI, L. & KELLY, JB. A reversible block of neural activity in DNLL alters binaural responses in contralateral inferior colliculus. **ARO. Abstr** 15,62, 1992b.
- LIAN, CW.; LOVENBERG, TW.; BARRY, G.; OLTERSDORF, T.; GRIGORIADIS, DE.; DE SOUZA, EB. Cloning and characterization of the human CRF2 receptor gene and cDNA. **Endocrinol**, 137 (1): 72-77, 1996.
- LING, N.; ESCH, F.; BOHLEN, P.; BAIRD, A.; GUILLEMIN, R. Isolation and characterization of caprine corticotropin-releasing factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 122: 1218-1224, 1984.
- LÓPEZ, DE.; SALDAÑA, E.; NODAL, FR.; MERCHÁN, MA.; WARR, WR. Projections of cochlear root neurons, sentinels of the rat auditory pathway. **J. Comp. Neurol.** 415(2): 160-74, 1999.

LOVEJOY, DA & BALMENT, RJ. Evolution and physiology of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 115: 1-22, 1999.

LOVENBERG, TW.; CHALMERS, DT.; LIU, C.; DE SOUZA, EB. CRF α and CRF 2 β receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. **Endocrinol.**, 136 (9): 4139-4142, 1995a.

LOVENBERG, TW.; LIAW, CW.; GRIGORIADIS, DE.; CLEVINGER, W.; CHALMERS, DT.; DE SOUZA, EB.; OLTERSDORF, T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin releasing factor receptor subtype from rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, 92: 836-840, 1995b.

MacCANNELL, KL & LEDERIS, K. Dilation of the mesenteric vascular bed of the dog produced by a peptide urotensin I. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 203:38-46, 1977.

MacCANNELL, KLK.; LEDERIS, K.; HAMILTON, PC.; RIVIER, J. Amunine (ovine CRF), urotensin I and sauvagine, three structurally-related peptides, produce selective dilation of the mesenteric circulation. **Pharmacology**, 25: 116-120, 1982.

McINTOSH, AR.; GONZALEZ-LIMA, F. Functional network interactions between parallel auditory pathways during Pavlovian conditioned inhibition. **Brain Res.**; jun 19;683(2):228-41, 1995.

MASTERTON, B.; THOMPSON, GC.; BECHTOLD, JK.; ROBARDS, MJ. Neuroanatomical basis of binaural phase-difference analysis for sound

localization: a comparative study. **J. Comp. Physiol Psychol.** Jul; 89(5):379-86, 1975.

MATHIEU, M.; VALLARINO, M.; TRABUCCHI, M.; CHARTREL, N.; VAUDRY, H.; CONLON, JM. Identification of na urotensin I-like peptide in the pituitary of the lungfish *Protopterus annectens*: immunocytochemical localization and biochemical characterization. **Peptides**, 20:1303-1310, 1999.

MINNITI, F.; DONATO, A.; D'ESTE, L.; RENDA, T. Sauvagine/urotensin I-like immunoreactivity in the caudal neurosecretory system of a seawater fish *Diplodus Sargus L.* in normal and hyposmotic milieu. **Peptides**, 10: 383-389, 1989.

MOORE, M.J. & CASPARY, D.M. Strychnine blocks binaural inhibition in lateral superior olivary neurons. **J Neurosci**, 3(1): 237-42, 1983.

MOREAU, JL.;KILPATRICK, G.;JENCK,F.; Urocortin, a novel neuropeptide with anxiogenic-like properties. **Neuroreport**. 8(7):1697-701, 1997

MORLEY, SD.; SCHONROCK, C.; RICHTER, D.; OKAWARA, Y.; LEDERIS, K. Corticotropin-releasing factor (CRF) gene family in the brain of the teleost fish *Catostomus commersoni* (white sucker): molecular analysis predicts distinct precursors for two CRF's and one urotensin I peptide. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol**: 1: 48-57, 1991.

MUGLIA, L.; JACOBSON, L.; DIKKES, P.; MAJZOUB, JA. Corticotrophin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but nor glucocorticoid need. **Nature**, 373: 427-432, 1995.

MULDERS, W.H. & ROBERTSON, D. Evidence for direct cortical innervation of medial olivocochlear neurones in rats. **Hear Res**, 144(1-2): 65-72, 2000.

- OKOSI A.; BRAR BK.; CHAN M.; D'SOUZA L.; SMITH E.; STEPHANOU A.; LATCHMAN DS.; CHOWDREY HS.; KNIGHT RA. Expression and protective effects of urocortin in cardiac myocytes. **Neuropeptides**. 32(2):167-71, 1998.
- ONALI, P & OLIANAS, MC. CRF-like effects of sauvagine and urotensin I on synaptosomal tyrosine hydroxylase activity of mouse striatum. **Brain Res.**, 526: 181-185, 1990.
- OTTERSEN, O.P., HJELLE, O.P, OSEN, K.K. e LAAKE, J.H. Amino acid transmitters. In “**The Rat Nervous System**” (Paxinos, G., Ed.), 2nd ed., pp.1017-1037. Academic Press, San Diego, 1995.
- PARKES DG.; VAUGHAN J.; RIVIER J.; VALE W.; MAY CN. Cardiac inotropic actions of urocortin in conscious sheep. **Am J Physiol.**; 272(5 Pt 2):H2115-22, 1997.
- PARROTT RF.; VELLUCCI SV.; GOODE JÁ. Behavioral and hormonal effects of centrally injected neuropeptides in growing pigs. **Pharmacol Biochem Behav.** 1;65(1):123-9, 2000.
- PATTHY, M.; SCHELESINGER, DH.; HORVATH, J.; MASON-GARCIA, M.; SZOKE, B.; SCHALLY, AV. Purification and characterization of peptides with corticotropin-releasing factor activity from porcine hypothalami. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83: 2969-2973, 1985.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th. ed., San Diego, **Academic Press**, 1998.
- PERRIN, M.; DONALDSON, C.; CHEN, R.; BLOUNT A.; BERGGREN, T.; BILEZIKJIAN, L.; SAWCHENKO, PE.; VALE, W. Identification of a

second CRF receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart.

Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 92: 2969-2973, 1995.

PERRIN, MH.; DONALDSON, CJ.; CHEN, R.; LEWIS, KA.; VALE, WW. Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. **Endocrinol.**, 133(6): 3058-3061, 1993.

PETRAGLIA F.; FLORIO P, GALLO R.; SIMONCINI T.; SAVIOZZI M.; DI BLASIO AM.; VAUGHAN J.; VALE W. Human placenta and fetal membranes express human urocortin mRNA and peptide. **J Clin Endocrinol Metab.**; 81(10):3807-10, 1996.

PLATZACK, B.; SCHAFFERT, C.; HAZON, N.; CONLON, JM. Cardiovascular actions of dogfish urotensin I in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 109(2):269-275, 1998.

POTTER, E.; BEHAN, DP.; LINTON, EA.; LOWRY, PJ.; SAWCHENKO, PE.; VALE, WW. The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 88:4192-4196, 1992.**

POTTER, E.; SUTTON, S.; DONALDSON, C.; CHEN, R.; PERRIN, M.; LEWIS, K.; SAWCHENKO, PE.; VALE, W. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 8777-8781, 1994.**

RAMÓN Y CAJAL The vestibulocochlear nerve: cochlear branch or nerve., in **Histology of the nervous system of man and vertebrates**/by Ramón y Cajal; Translated from the french by Neely Swanson and Larry W Swanson, Oxford, Oxford University Press, 1995.

- RASMUSSEN, G.L. An efferent cochlear bundle. **Anat Rec**, 82: 441, 1942.
- RASMUSSEN, G.L. Further observations of the efferent cochlear bundle. **J Comp Neurol**, 99(1): 61-74, 1953.
- RASMUSSEN, G.L. The olivary peduncle and other fiber projection of the superior olivary complex. **J. Comp. Neurol** 84: 141-219, 1946.
- RIETZEL, H.J. & FRIAUF, E. Neuron types in the rat lateral superior olive and developmental changes in the complexity of their dendritic arbors. **J Comp Neurol**, 390(1): 20-40, 1998.
- RIVIER, J.; RIVIER, C.; VALE, W. Characterization of rat hypothalamic corticotropin-releasing factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 80: 4851-4855, 1983.
- ROBERTSON, D. & WINTER, I.M. Cochlear nucleus inputs to olivocochlear neurones revealed by combined anterograde and retrograde labelling in the guinea pig. **Brain Res**, 462(1): 47-55, 1988.
- SAJDYK TJ.; SCHOBBER DA.; GEHLERT DR.; SHEKHAR A. Role of corticotropin-releasing factor and urocortin within the basolateral amygdala of rats in anxiety and panic responses. **Behav Brain Res.**;100(1-2):207-15, 1999.
- SAPER, CB. Image is everything. **J Comp. Neurol**. Sep 27; 412(3): 381-2, 1999.
- SCHAEFFER, D.F.; REUSS, M.H.; RIEMANN, R.; REUSS, S. A nitrenergic projection from the superior olivary complex to the inferior colliculus of the rat. **Hear Res**, 183(1-2): 67-72, 2003.
- SCHENK, MP.; MANNING, RJ.; PAALMAN, MH. Going digital: image preparation for fiomedical publishing. **Anat. Rec.**; 257(4):128-36,1999.

SCHILLING L.; KANZLER C.; SCHMIEDEK P.; EHRENREICH H.

Characterization of the relaxant action of urocortin, a new peptide related to corticotropin-releasing factor in the rat isolated basilar artery. **Br J Pharmacol.**;125(6):1164-71, 1998.

SHIBAHARA, S.; MORIMOTO, Y.; FURUTANI, Y.; NOTAKE, M.;

TAKAHASHI, H.; SHIMIZU, S.; HORIKAWA, S.; NUMA, S. Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursors gene. **EMBO J.**, 2: 775-776, 1983.

SINGH LK.; PANG X.; ALEXACOS N.; LETOURNEAU R.; THEOHARIDES TC.

Acute immobilization stress triggers skin mast cell degranulation via corticotropin releasing hormone, neurotensin, and substance P: A link to neurogenic skin disorders. **Brain Behav Immun.**;13(3):225-39, 1999.

SKELTON, K.H., OWENS M.J., NEMEROFF C.B. The neurobiology of urocortin.

Regul. Pept. 25;93(1-3):85-92, 2000.

SLOMINSKI, A .; WORTSMAN, J. Neuroendocrinology of the skin. **Endocr. Rev.**,

21(5):457-87, 2000.

SPINA M.; MERLO-PICH E.; CHAN RK.; BASSO AM.; RIVIER J.; VALE W.;

KOOB GF. Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. **Science.** 13;273(5281):1561-4, 1996.

SPOENDLIN, H. & SCHROTT, A. The spiral ganglion and the innervation of the

human organ of Corti. **Acta Otolaryngol**, 105(5-6): 403-10, 1988.

STENZEL-POORE, MP.; HELDWEIN, KE.; STENZEL, P.; VALE, WW.

Characterization of the genomic corticotropin-releasing factor (CRF) gene

from *Xenopus laevis*: two members of the CRF family exist in amphibians.

Mol. Endocrinol., 6: 1716-1724, 1992.

SWIERGIEL AH.; DUNN AJ. CRF-deficient mice respond like wild-type mice to hypophagic stimuli. **Pharmacol Biochem Behav.**;64(1):59-64, 1999.

TAKATSUKI K, SAKANAKA M, SHIOSAKA S, INAGAKI S, TAKAGI H, SENBA E, HARA Y, KAWAI Y, MINAGAWA H, IIDA H, TOHYAMA M. Pathways and terminal fields of the cochlearofugal somatostatin tracts of very rats. **Brain Res.** Apr;255(4):613-26, 1982.

TAKEDA, N.; DOI, N.; MORI, N.; YAMAZAKI, H.; TOHYAMA, M.; MATSUNAGA, T. Localization and fine structure of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactive nerve fibres in the organ of Corti of guinea pigs by immunohistochemistry. **Acta Otolaryngol.** May-Jun; 103(5-6):567-71, 1987.

TOLLIN, D.J. The lateral superior olive: a functional role in sound source localization. **Neuroscientist**, 9(2): 127-43, 2003.

TURNBULL, AV. & RIVIER, C. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein and related peptides. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 215(1): 1-10, 1997.

VALE, W.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; RIVIER, J. Characterization of a 41- residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. **Science**, 213: 1394-1397, 1981.

VAN ADEL, B.A. & KELLY, J.B. Kainic acid lesions of the superior olivary complex: effects on sound localization by the albino rat. **Behav Neurosci**, 112(2): 432-46, 1998.

VASCONCELOS, LAP.; DONALDSON, C; SITA, LV.; CASATTI, CA.; LOTFI, CFP.; WANG, L.; CADINOUCHE, MZA.; FRIGO,L.; ELIAS,CF.; LOVEJOY, DA.; BITTENCOURT, JC.; Urocortin in the central nervous system: of a primate (cebus apella): sequencing, immunohistochemical, and hybridization histochemical characterization. **J Comp Neurol.** 463:157-175, 2003.

VAUGHAN, J.; DONALDSON, C.; BITTENCOURT, J.; PERRIN, MH.; LEWIS, K.; SUTTON, S.; CHAN, R.; TURNBULL, AV.; LOVEJOY, D.; RIVIER, J.; SAWCHENKO, PE.; VALE, W. Urocortin a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotrophin-releasing factor. **Nature**, 378:287-292, 1995.

VEEMANM, CL., REINER, A., HONIG, MF. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single and double-labeling studies. **J. Neurosci Methods**, v. 41, p. 239-54, 1992.

VETTER DE., ADAMS JC. & MUGNAINI, E. Chemically distinct rat olivocochlear neurons. **Synapse** 7, 21-43, 1991.

VETTER, D.E. & MUGNAINI, E. Distribution and dendritic features of three groups of rat olivocochlear neurons. A study with two retrograde cholera toxin tracers. **Anat Embryol** (Berl), 185(1): 1-16, 1992.

VETTER, DE.; LI, C.; ZHAO, L.; CONTARINO, A.; LIBERMAN, MC.; SMITH, GW.; MARCHUK, Y.; KOOB, GF. HEINEMANN, SF.; VALE, W.; LEE, DF. Urocortin-deficient mice show hearing impairment and increased anxiety-like behavior. **Nature Genetics**, 31(4):363-9, 2002

- VIANNA, DML; LANDEIRA-FERNANDEZ J. BRANDÃO ML. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neuroscience and biobehavioral reviews**. 25, 711-719, 2001.
- VITA, N.; LAURENT, P.; LEFORT, S.; CHALON, P.; LELIAS, J-M.; KAGHAD, M.; LE FUR, G.; CAPUT, D.; FERRARA, P. Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. **FEBS**, 355 (1): 1-5, 1993.
- WALSH, E.; McGEE, J., McFADDEN, S.;LIBERMAN, M. Long-term effects of sectioning the olivocochlear bundle in neonatal cats. **J. Neurosci**. 18, 3859-3869, 1998.
- WARR, WB.; BECH, JE. Multiple projections from the ventral nucleus of the trapezoid body in the rat. **Hear Res**. Apr; 93(1-2):83-101, 1996.
- WARR, W..B.; BOCHE, J.B.; NEELY, S.T. Efferent innervation of the inner hair cell region: origins and terminations of two lateral olivocochlear systems. **Hear Res**, 108(1-2) 89-111,1997.
- WARR, W.B & BOCHE, J.E.Diversity of axonal ramifications belonging to single lateral and medial olivocochlear neurons. **Exp Brain Res**, 153(4): 499-513,2003.
- WEBSTER WR, W.R. Auditory System, in PAXINOS, G., (ed): The rat nervous system, **London, Academic Press**, p. 797-827, 1995.
- WEBSTER WR, W.R. Auditory System, in PAXINOS, G., (ed): The rat nervous system, London, **Academic Press**, p. 797-827, 1997.
- WHITE, J.S. & WARR, W.B. The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat. **J Comp Neurol**, 219(2): 203-14, 1983.

- WINNER, JA., LARVE, DT., e KELLY, JB. Neural architecture of the rat medial geniculado body. **Hear. Res.** 130,19-41, 1999b.
- WONG ML.; AL-SHEKHLEE A.; BONGIORNO PB.; ESPOSITO A.; KHATRI P.; STERNBERG EM.; GOLD PW.; LICINIO J. Localization of urocortin messenger RNA in rat brain and pituitary. **Mol Psychiatry.**;1(4):307-12, 1996.
- WOO, NYS.; HONTELA, A.; FRYER, JN.; KOBAYASHI, Y.; LEDERIS, K. Activation of hypothalamo-hypophysial-interrenal system by urophysectomy in goldfish. **Am. J. Physiol.** 248 (17): R197-R201, 1985.
- WYNNE B, ROBERTSON D. Somatostatin and substance P-like immunoreactivity in the auditory brainstem of the adult rat. **J Chem Neuroanat.** May;12(4):259-66, 1997
- YAMADA, C.; YAMADA, S.; ICHIKAWA, T.; KOBAYASHI, H. Immunohistochemical localization of urotensin I and other neuropeptides in the caudal neurosecretory system of three species of teleosts and two species of elasmobranchs. **Cell Tissue Res.** 244:687-690, 1986.
- YLIKOSKI J, PIRVOLA U, HAPPOLA O, PANULA P, VIRTANEN I. Immunohistochemical demonstration of neuroactive substances in the inner ear of rat and guinea pig. **Acta Otolaryngol.** May-Jun;107(5-6):417-23, 1989.
- YULIS, CR & LEDERIS, K. The distribution of "extraurophyseal" urotensin I-immunoreactivity in the central nervous system of *Catostomus commersoni* after urophysectomy. **Neurosci. Lett.**, 70(1): 75-80, 1986.

YULIS, CR.; LEDERIS, K.; WONG, KL.; FISHER, AW. Localization of urotensin I- and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the central nervous system of *Catostomus commersoni*. **Peptides**, 7(1): 79-86, 1986.

ZHAO, L.; DONALDSON, CJ.; SMITH, GW.; VALE, WW. The structures of the mouse and human urocortin genes (Ucn and UCN). 50: 123- 133, 1998.