André Valério da Silva

**Estudo das projeções hipotalâmicas para a região
urocortinérgica do complexo oculomotor**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

André Valério da Silva

**Estudo das projeções hipotalâmicas para a região urocortinérgica
do complexo oculomotor**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientador: Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

da Silva, André Valério.

Estudo das projeções hipotalâmicas para a região urocortinérgica do complexo oculomotor / André Valério da Silva. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Jackson Cioni Bittencourt.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Hodologia.

Versão do título para o inglês: Study of the hypothalamic projections to the urocortinerbic cells in the oculomotor complex.

Descritores: 1. Urocortina-1 2. Núcleo de Edinger-Westphal 3. Estereotaxia 4. Hipotálamo 5. Fluoro-gold 6. Amina-Dextrana-Biotinilada I. Bittencourt, Jackson Cioni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Anatomia. III. Título.

ICB/SBIB0106/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): André Valério da Silva.

Título da Dissertação: Estudo das projeções hipotalâmicas para a região urocortinérgica do complexo oculomotor .

Orientador(a): Jackson Cioni Bittencourt.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **95** nas fls. **49** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Jackson Cioni Bittencourt** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Estudo da sistematização das afências do núcleo acessório do oculomotor**" do qual participou(aram) o(s) alunos **André Valério da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **22.10.2007**.

São Paulo, 23 de outubro de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

A DEUS pela vida

A minha mãe Terezinha Faquim da Silva, meu pai Gérçom Valério da Silva (in memorian), meu pai de criação Sebastião Corrêa e meu irmão Alexandre Valério da Silva (in memorian) que me ensinam que Família é o pedestal de todo cientista;

*A minha amada namorada Kelly Regina Torres e futura senhora da Silva que me mostrou em um ano o que um homem precisa ter por toda sua vida, obrigado pelo
Companheirismo, amizade e acima de tudo Amor;*

Aos membros de minha família (Faquim e Crivilin) que por culpa de nossas obrigações não nos permitem mais tempo juntos e que o pouco de tempo que conseguimos aproveitar me mostra o quão bom é ter vocês ao meu lado;

*A inigualável família Torres que me recebe de braços abertos em seu convívio mesmo
que seja por um final de semana e muitas vezes por um dia;*

*Aos meus grandes amigos Carlos Alexandre, Daniella Batagello, Sílvia Honda, Wilma e Marcus Paulo que me mostraram que em laboratório além de ciência também existe
amizade, felicidade e sinceridade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador e chefe de departamento Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt por ter aberto a porta de seu laboratório e por ter me ensinado sua ciência;

Agradeço ao departamento de anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo;

A chefia da pós-graduação em Ciências morfofuncionais que tem com responsáveis nesta gestão o Prof. Dr. Newton Sabino Canteras e a Profa. Dra. Maria Luíza;

A profa. Dra. Sara Joyce Shamma-Lagnado por sempre estar disposta a tirar uma dúvida “neuroanatomica” e por fazer os apontamentos necessários para a realização deste trabalho;

Aos funcionários da secretaria do departamento de Anatomia por todo apoio prestado;

Aos funcionários do biotério do departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelo trabalho elogiável;

Aos funcionários da segurança do departamento de anatomia (diurno e noturno), obrigado pela amizade e por zelarem por nossa segurança.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas pela excelência no trabalho, pela rapidez em servir e pela paciência em atender;

Aos colegas de laboratório de Neuroanatomia Química que sentirei falta profa. Dra. Izabel e prof. Helder faço votos para que nossos caminhos se cruzem;

Aos colegas do laboratório de Neurociências onde realizei dois anos de iniciação científica Vanderlei Rocha, Prof. Dra. Luciana Pinatto, Prof. Dra. Maria Inês Nogueira e Renné;

Aos colegas do laboratório de Neuroanatomia Funcional da dor Profa. Dra. Marúcia Chacur, Priscila, Joice, Fábio e Milena Fernandez;

Ao excelente técnico do laboratório de Neurobiologia o Sr. Adílson por sempre estar disposto a ajudar e pela competência em realizar seu trabalho;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP por ter financiado o projeto: 07/57020-2.

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

E agradecer a todos que direta ou indiretamente participaram do início, meio e conclusão deste trabalho.

Por aqui não se passa sem que se sofra o calor do fogo!!

(A Divina Comédia, Purgatório canto XXVII-10)

RESUMO

Da Silva AV. Estudo das projeções hipotalâmicas para a região urocortinérgica do complexo oculomotor. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

O neuropeptídeo fator liberador da corticotropina (CRF) é encontrada em várias regiões do sistema nervoso central. No entanto, ele está mais concentrado nos neurônios neurosecretores do núcleo paraventricular do hipotálamo, especialmente na sua subdivisão parvocellular. O seu principal papel no núcleo é atuar na liberação de ACTH da hipófise anterior, portanto, sendo o membro central do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, contribuindo para a resposta ao estresse e doenças relacionadas. Os neuropeptídeos conhecidos como Urocortinas (UCN 1, 2 e UCN 3) são estruturalmente e funcionalmente ligados à CRF e, portanto, considerados como membros da família de peptídeos CRF. Além disso, a UCN 1 tem uma grande afinidade para o receptor CRFR2 CRF. UCN 1 tem como os seus principais locais de expressão no núcleo de Edinger-Westphal (EW) e o núcleo lateral superior da oliva. A literatura após a descoberta da UCN 1 sugeriu que a EW e PVH têm papéis complementares e opostos na resposta ao estresse e pode agir como peptídeos anorexígenos. No entanto, não existem trabalhos que relacionam anatomicamente os núcleos hipotalâmicos e EW. Portanto, a fim de contribuir para esta área foi proposto o mapeamento das aferências das células do hipotálamo para o EW. Temos utilizado o FG, marcador neuronal retrógrado, injetado no EW para pesquisar aferências em núcleos/áreas hipotalâmicas, tais como: o núcleo paraventricular, a área lateral do hipotálamo e o núcleo posterior do hipotálamo. O traçador neuronal anterógrado, amina dextrana biotinilada (BDA), foi utilizado e injetado nos núcleos/áreas e observar fibras no EW apontando possíveis potenciais sinápticos nas células UCN 1. Como resultado da injeção de FG temos encontrado células retrogradamente marcadas no núcleo seguintes órgãos: subfornicial, o núcleo paraventricular do hipotálamo, área hipotalâmica lateral, zona incerta, núcleo hipotalâmico posterior, o núcleo vestibular medial e núcleo interpósito do cerebelo. Após a injeção de BDA em PVH, LHA e PH temos encontrado marcação anterógrada de fibras em uma posição muito próximo ou sobre as células urocortinérgicas em EW. Baseado nestes dados nós estamos sugerindo que tais conexões entre EW e núcleos hipotalâmicos estão em condições de participar no controle da resposta ao estresse, bem como no controle do comportamento alimentar.

Palavras-chave: Urocortina-1. Edinger-Westphal. Hipotálamo. Fator Liberador de corticotrofina. *Fluoro-gold*. Amina-Dextrana-Biotinilada.

ABSTRACT

Da Silva AV. Study of the hypothalamic projections to the urocortinergic cells in the oculomotor complex. [Dissertation (Morfofuncional Science)]. Sao Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; 2010.

The neuropeptide corticotropin-releasing factor (CRF) is found in several regions of the central nervous system. However, it is more concentrated in neurosecretory neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus, particularly in its parvocellular subdivision. Its main role in such nucleus is to act in the release of ACTH from the anterior hypophysis, therefore, being the central member of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis contributing to the stress response and related diseases. The neuropeptides known as urocortins (UCN 1, UCN 2 and UCN 3) are structurally and functionally related to CRF and, therefore, considered as members of the CRF family of peptides. Besides, UCN 1 has a high affinity to the CRF receptor CRFR2. UCN 1 has its main sites of expression at the Edinger-Westphal nucleus (EW) and the lateral superior olivary nucleus. The literature after the discovery of UCN 1 has suggested that EW and PVH have complementary and opposing roles in the stress response and it can act as an anorexigenic peptide. However, there are no works relating anatomically the hypothalamic nuclei and EW. Therefore, in order to contribute to this area we proposed mapping the hypothalamic afferents of the peptidergic cells of EW. We have used the retrograde neuronal tracer FG injected in the EW to search for the afferents in hypothalamic nuclei/areas such as: the paraventricular nucleus, the lateral hypothalamic area and the posterior hypothalamic nucleus. The anterograde neuronal tracer biotinylated dextran amine (BDA) was used and injected in aforementioned nuclei/areas and looked for labeled fibers in the EW with potential synaptic contact at the UCN 1 cells. As a result of FG injection we have found retrogradely labeled cells in the following nuclei: subfornical organ, paraventricular nucleus of the hypothalamus, lateral hypothalamic area, zona incerta, posterior hypothalamic nucleus, medial vestibular nucleus and *interpositus* nucleus of the cerebellum. After BDA injection in PVH, LHA and PH we have found anterogradely labeled fibers in a very close apposition over urocortinergic cells at EW. Based on these data we are suggesting that such connections between EW and hypothalamic nuclei are in position to participate in the control of the stress response as well as in the control of feeding behavior.

Keywords: Urocortin 1. Edinger-Westphal nucleus. Hypothalamus. Corticotropin-releasing factor. Fluoro-gold. Biotinylated Dextran Amine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Demonstração da análise subjetiva das regiões onde foram encontradas células retrógradamente marcadas.....	42
Figura 2. Imunorreatividade à Urocortina 1 (UCN-1ir) na extensão rostro-caudal do núcleo de Edinger-Westphal (EW).....	45
Figura 3. Coloração pela técnica de Nissl da extensão rostro-caudal do núcleo de Edinger-Westphal (EW).....	46
Figura 4. Locais de injeção do traçador neuronal retrogrado Fluoro-Gold no núcleo de Edinger-Westphal (EW) dos casos considerados bons.....	47
Figura 5. Representação dos locais onde foram encontradas células retrógradamente marcadas em um eixo rostro-caudal dos casos de injeção de <i>Fluoro-Gold</i> no núcleo de Edinger-Westphal considerados bons (A).....	50
Figura 6. Representação dos locais onde foram encontradas células retrógradamente marcadas em um eixo rostro-caudal dos casos de injeção de <i>Fluoro-Gold</i> no núcleo de Edinger-Westphal considerados bons (B).....	51
Figura 7. Representação dos locais onde foram encontradas células retrógradamente marcadas em um eixo rostro-caudal dos casos de injeção de <i>Fluoro-Gold</i> no núcleo de Edinger-Westphal considerados bons (C).....	52
Figura 8. Representação dos locais onde foram encontradas células retrógradamente marcadas em um eixo rostro-caudal dos casos de injeção de <i>Fluoro-Gold</i> no núcleo de Edinger-Westphal considerados bons (D).....	56
Figura 9. Representação dos locais onde foram encontradas células retrógradamente marcadas em um eixo rostro-caudal dos casos de injeção de <i>Fluoro-Gold</i> no núcleo de Edinger-Westphal considerados bons (E).....	58

Figura 10. Representação dos locais onde foram encontradas células retrogradamente marcadas em um eixo rostro-caudal dos casos de injeção de <i>Fluoro-Gold</i> no núcleo de Edinger-Westphal considerados bons. (F).....	63
Figura 11. Regiões hipotalâmicas onde foram encontradas células retrogradamente marcadas após injeção de traçador retrogrado <i>Fluoro-Gold</i> no núcleo de Edinger-Westphal (EW).....	64
Figura 12. Regiões hipotalâmicas onde foram encontradas células retrogradamente marcadas após injeção de traçador retrogrado <i>Fluoro-Gold</i> no núcleo de Edinger-Westphal (EW).....	65
Figura 13. Porção media e caudal do núcleo hipotalâmico posterior do hipotálamo onde foram encontradas células retrogradamente marcadas após injeção de traçador retrograda <i>Fluoro-Gold</i> no núcleo de Edinger-Westphal (EW).....	66
Figura 14. Esquemas dos casos utilizados como controle anterógrado em subdivisões do núcleo paraventricular do hipotálamo.....	69
Figura 15. Esquemas dos casos utilizados como controle anterógrado em subdivisões da área hipotalâmica lateral (LHAa e LHAt).....	70
Figura 16. Esquemas dos casos utilizados como controle anterógrado em subdivisões do núcleo hipotalâmico posterior (PH).....	71
Figura 17. Regiões hipotalâmicas onde foram realizados os controle anterógrado com injeção de traçador anterógrado Amina Dextrana Biotinilada.....	72
Figura 18. Resultado do controle anterógrado após injeção de Amina Dextrana Biotinilada no núcleo paraventricular do hipotálamo (LE# 135) nas células urocortinérgicas (UCN-1ir) do núcleo de Edinger-Westphal (EW).....	74

Figura 19. Resultado do controle anterógrado após injeção de Amina Dextrana Biotinilada (BDA) na área hipotalâmica lateral anterior (LE# 148) nas células urocortinérgicas (UCN-1ir) do núcleo de Edinger-Westphal (EW).....	75
Figura 20. Resultado do controle anterógrado após injeção de Amina Dextrana Biotinilada no núcleo posterior do hipotálamo (LE# 142) nas células urocortinérgicas (UCN-1ir) do núcleo de Edinger-Westphal (EW).....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resumo da distribuição das células retrógradamente marcadas.....	62
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3N – Núcleo do Nervo Oculomotor	BSA – Albumina bovina a 1%	DMPAG – Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsomedial
3PC – Núcleo do Nervo Oculomotor parte parvicelular	BSTMA – núcleo da estria terminal divisão medial anterior	DMTg – Área Tegmental Dorsomedial
3V – Terceiro Ventrículo	BSTMPI – núcleo da estria terminal divisão medial parte posterointermedial	DPGi – Núcleo Paragigantocelular Dorsal
4N – Núcleo do Nervo Troclear	BSTMV – núcleo da estria terminal divisão medial ventral	DpMe – Núcleo Mesencefálico Profundo
6N – Núcleo do Nervo Abducente	CART – Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina	DpWh – camada branca do colículo superior
7N – Núcleo do Nervo Facial	CeC – Núcleo central da Amígdala parte Capsular	DRC – Núcleo Dorsal da Rafe parte Caudal
A13 – Células Dopaminérgicas	CeL – núcleo central da amígdala divisão lateral	DRD – Núcleo Dorsal da Rafe parte Dorsal
AA – Área Amigdalóide Anterior	CeM – Núcleo Central da Amígdala	DRV – Núcleo Dorsal da Rafe parte Ventral
AAD – área amigdalóide anterior dorsal	Cg1 – Córtex do Cíngulo Área 1	DRVL – núcleo dorsal da rafe parte ventrolateral
AAV – área amigdalóide anterior ventral	ChAT - Colina Acetiltransferase	DTT – Tênia Tectal Dorsal
ABC – Complexo Avidina-Biotina	Cl – Claustrum	EA – Amígdala estendida
AHP – área hipotalâmica anterior parte posterior	CnF – núcleo cuneiforme	EP – Núcleo Entopeduncular
AID – Córtex Insular Agranular parte Dorsal	CRF-2 – Receptor tipo 2 para o Fator Liberador de Corticotrofina	EW – Núcleo de Edinger-Westphal
AIV – Córtex Insular Agranular parte Ventral	D3V – terceiro ventrículo dorsal	FG-ir – Neurônios Imunorreativos ao fluoro-gold
Aq – Aqueduto Mesencefálico	DA – Área Hipotalâmica Dorsal	fr – fascículo retroflexus
ArcL – Núcleo Hipotalâmico Arqueado parte Lateral	DAB – Tetracloreto de Diaminobenzidina	fx – fórnice
ArcM – núcleo hipotalâmico arqueado medial	Dk – Núcleo de Darkschewitsch	g7 – joelho do nervo facial
Arq LP – Núcleo Hipotalâmico Arqueado Lateroposterior	DLPAG – substância cinzenta periaquedutal dorsolateral	Gi – Núcleo Reticular
Bar – Núcleo de Barrington's		GiA – Núcleo Reticular
BDA – Amina Dextrana Biotilizada		Gigantocelular
BMA – núcleo amigdalóide basomedial parte anterior		Gigantocelular parte Alpha
		GiV – Núcleo Reticular
		Gigantocelular parte Ventral

HRP - <i>Horseradish-Peroxidase</i>	LO – Córtex Orbita Lateral	MnPO – Núcleo Pré-óptico Mediano
IF – núcleo interfascicular	LPAG – Substância Cinzenta Periaquedutal Lateral	MPA – Área Pré-óptica Medial
IL – Córtex Infralímbico	LPBE – Núcleo Parabraquial Lateral parte Externa	MPB – núcleo parabraquial medial
INC – Núcleo Intersticial de Cajal	LPBI – Núcleo Parabraquial Lateral parte Interna	MPBE – Núcleo Parabraquial Medial parte Externa
InG – camada cinzenta intermediária do colículo superior	LPBV – Núcleo Parabraquial Lateral parte Ventral	MPOL – Núcleo Pré-óptico Medial parte Lateral
IntA – Núcleo Cerebelar Interpósito parte anterior.	LPGi – Núcleo Paragigantocelular Lateral	MPT – Núcleo Pré-tectal Medial
IntDL – Núcleo Interpósito do Cerebelo Dorsolateral	LPO – Área Pré-óptica Lateral	MRN – Núcleo Reticular Mesencefálico
IntPPC – Núcleo Interpósito do Cerebelo parte Parvocelular	LSI – Núcleo Septal Lateral parte Intermédia	MT – Núcleo Acessório Medial Terminal do trato Óptico
InWh – Camada Branca Intermediária do Colículo Superior	LSV – Núcleo Septal Lateral parte Ventral	mt – trato mamilotalâmico
KPBS – Tampão Fosfato de Potássio	LV – ventrículo lateral	MVeMC – Núcleo Vestibular Medial parte Magnocelular
Lat – Núcleo Cerebelar Lateral (Denteado)	M1 – Córtex Motor Primário	MVePC – Núcleo Vestibular Medial parte Parvocelular
LatPC - Núcleo Cerebelar Lateral parte Parvocelular	M2 – Córtex Motor Secundário	NEF-1- Nesfatin - 1
LC – Locus Coeruleus	MA3 – Núcleo do Nervo Oculomotor Medial Acessório	NPC – Núcleo da Comissura Posterior
LDTg – núcleo tegmental laterodorsal	MCLH – Núcleo Magnocelular da Área Hipotalâmica Lateral	NPY – Neuropeptídeo Y
LHAa – área hipotalâmica Lateral anterior	mfB – Feixe Prosencefálico Medial	OHSA – Hidroxistilbamidine
LHAp – área hipotalâmica lateral posterior	MGM – Núcleo Geniculado Medial	OPT – núcleo pré-tecetal olivar
LHAt – área hipotalâmica lateral tuberal	MGP – globo pálido medial	PaDC – núcleo hipotalâmico paraventricular dorsal
LHB – Núcleo Habenular Lateral	MHB – Núcleo Habenular Medial	PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal
LHbL – núcleo habenular lateral parte lateral	ml – lemnisco medial	PaLM – Núcleo Hipotalâmico Paraventricular parte Magnocelular Lateral
LHbM – núcleo Habenular lateral parte medial	ML – núcleo mamilar medial lateral	PaMP – Núcleo Hipotalâmico Paraventricular parte Parvocelular Medial
LM – Núcleo Mamilar Lateral	mlf – Fascículo Longitudinal Medial	PaMP – núcleo hipotalâmico paraventricular parvocelular medial
	MM – núcleo mamilar medial	

PaPo – núcleo hipotalâmico paraventricular posterior	RI – Núcleo Intersticial Rostral do Fascículo Longitudinal Medial	SPTg – Núcleo Tegmental Subpeduncular
PaR – Núcleo Pontino da Rafe	RIP – Núcleo Interpósito da Rafe	SpVe – Núcleo Vestibular Espinal
PaV – Núcleo Hipotalâmico Paraventricular parte Ventral	RLi – Núcleo rostral linear da Rafe	STh – núcleo subtalâmico
Pcom – Núcleo da comissura Posterior	ROb – Núcleo Obscuro da Rafe	StHy – núcleo estriohipotalâmico
Pe – Periventricular	RPC – núcleo rubro parvocelular	Su 3 – Núcleo Supra Oculomotor
Pef – Núcleo Perifornicial	RtTg – Núcleo Reticulo Tegmental da Ponte	SuVe –Núcleo Vestibular Superior
PF – Núcleo Talâmico Parafascicular	Slj – Córtex Somatosensorial Primário	TC – túber cinérium
PH – Núcleo Hipotalâmico Posterior	scp – pedúnculo cerebelar superior	UCN-1 – Urocortina-1
PHA-L: <i>Phaseolus-Vulgaris</i> -Leucoagglutinin	SFO – órgão subfornicial	VDB – Núcleo Vertical da Banda Diagonal
PiRe – recesso pineal	SG – Núcleo Talâmico Supragenículado	VeCb – Núcleo Vestibulocerebelar
PMV – núcleo pré-mamilar ventral	Sge – Núcleo Supragenua	VLPAG – Substância Cinzenta Periaquedutal Ventrolateral
PnC – Núcleo Reticular Pontino parte Caudal	SI – substância inonimata	VLPO – Núcleo Pré-óptico Ventrolateral
PnO – Núcleo Reticular Pontino parte Oral	SID – substância inonimata dorsal	VMHA – núcleo hipotalâmico ventromedial anterior
PnR – Núcleo da Rafe Pontino	SIV – substância inonimata ventral	VMHC – núcleo hipotalâmico ventromedial parte central
PPTg – Núcleo Tegmental Pedunculopontino	SNCD – Substância Negra parte Compacta Dorsal	VMHDM – núcleo hipotalâmico ventromedial parte dorsomedial
PR – Campo Pré-Rubral Pr – Núcleo Prepósitos	SNCV – Substância Negra parte Compacta Ventral	VMHVL – Núcleo Hipotalâmico Ventromedial parte ventrolateral
Pr5VL – Núcleo Trigeminal Sensorial Principal	SNR – Substância Negra Reticular	VMPO – Núcleo Pré-óptico Ventromedial
PRC – Núcleo Precomissural	SolVL- Núcleo do Trato Solitário Ventrolateral	VOLT – órgão vascular da lâmina terminal
PrL – Córtex infralímbico	SP – Substância P	VP – pálido ventral
PSTh – núcleo para subtalâmico	Sp5O – Núcleo Trigeminal Espinal parte Oral	VTM – Núcleo Tuberomamilar Ventral
PVP – Núcleo Talâmico Paraventricular Posterior	SPFPC – Núcleo Talâmico Subparafascicular	
PVp – periventricular posterior		
RChl – Área Retroquiasmática parte Lateral		

VTRZ – zona tegumental
visual

WGA – HRP: Germe do Trigo
aglutinado com *Horseradish-
Peroxidase*

ZI – Zona Incerta

ZIC – Zona Incerta Caudal

ZID – Zona Incerta Dorsal

ZIR – Zona Incerta Rostral

ZIV – Zona Incerta Ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	22
1.1 O fator liberador de corticotrofina: distribuição no Sistema Nervoso Central, receptores e funções.....	22
1.2 A Urocortina 1.....	24
<i>1.2.1 Principais funções da Urocortina 1.....</i>	<i>24</i>
2 JUSTIFICATIVA.....	29
3 OBJETIVO.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Considerações sobre a linhagem <i>Long-Evans</i>.....	33
4.2 Método de rastreamento neuronal.....	34
<i>4.2.1 Injeção de traçador neuronal retrogrado Fluoro-Gold por iontoforese.....</i>	<i>34</i>
<i>4.2.2 Perfusão transcardíaca e microtomia.....</i>	<i>35</i>
<i>4.2.3 Procedimentos com os cortes.....</i>	<i>35</i>
<i>4.2.4 Estudo citoarquitetônico pelo método de Nissl.....</i>	<i>36</i>
<i>4.2.5 Visualização do local de injeção de Fluoro-Gold.....</i>	<i>36</i>
<i>4.2.6 Imunoistoquímica (método de imunoperoxidase) para Fluoro-Gold.....</i>	<i>37</i>
4.3 Controle Anterógrado.....	38
<i>4.3.1 Injeção de traçador anterógrado Amina Dextrana Biotinilada.....</i>	<i>38</i>
<i>4.3.2 Histoquímica para o traçador anterógrado Amina Dextrana Biotinilada.....</i>	<i>38</i>
<i>4.3.3 Intensificação pela prata.....</i>	<i>39</i>
<i>4.3.4 Visualização das fibras BDA e células UCN-1ir no núcleo de Edinger-Westphal.....</i>	<i>39</i>
4.4 Análise dos resultados.....	40
4.5 Aquisição e edição de imagens.....	40
5 RESULTADOS.....	44

5.1 Citoarquitetura e locais de injeção de <i>Fluoro-Gold</i> no núcleo de Edinger-Westphal.	44
5.2 Aferências para as células Urocortinérgicas do núcleo de Edinger-Westphal.	44
5.2.1 <i>Telencéfalo.</i>	48
5.2.2 <i>Diencéfalo.</i>	53
5.2.2.1 <i>Tálamo.</i>	53
5.2.2.2 <i>Subtálamo.</i>	53
5.2.2.3 <i>Hipotálamo.</i>	54
5.2.2.3.1 <u><i>Região Pré-óptica.</i></u>	54
5.2.2.3.2 <u><i>Região Supra-óptica (Anterior).</i></u>	54
5.2.2.3.3 <u><i>Região Tuberal.</i></u>	54
5.2.2.3.4 <u><i>Região Mamilar.</i></u>	55
5.2.2.3.5 <u><i>Área hipotalâmica lateral.</i></u>	55
5.2.3 <i>Tronco Encefálico.</i>	57
5.2.3.1 <i>Mesencéfalo.</i>	57
5.2.3.2 <i>Ponte e Bulbo.</i>	60
5.2.3.3 <i>Cerebelo.</i>	61
5.2.3.4 <i>Medula espinal.</i>	61
5.3 Controle Anterógrado.	67
6 DISCUSSÃO.	78
6.1 Considerações Metodológicas.	78
6.1.1 <i>Considerações sobre o traçador neuronal retrogrado <i>Fluoro-Gold</i>.</i>	78
6.2 Considerações Neuroanatômicas.	80
7 CONCLUSÕES.	89
8 REFERÊNCIAS.	91

1 INTRODUÇÃO E RESUMO DA LITERATURA

Todo organismo tem como prioridade a garantia de sua sobrevivência e a propagação de sua espécie e, para isso, desenvolvem estratégias. Nos animais vertebrados essas estratégias se traduzem em modificações endócrinas e comportamentais bem definidas, assim como funções cognitivas como aprendizado e memória. Dentro desse contexto o hipotálamo possui fundamental importância, sendo diretamente responsável por modificações endócrinas, iniciação de comportamentos e integração neural (Simerly, 1995; Swanson, 1987).

Outra função atribuída ao hipotálamo é o controle do estresse (Swanson, 1987). O estresse e seus correlatos neurobiológicos estão substancialmente envolvidos na etiologia e desenvolvimento da depressão e de transtornos de ansiedade. Estresses crônicos e agudos são capazes de acionar um conjunto de fatores responsáveis por desencadear estes distúrbios. Em resposta ao estresse a hipófise anterior libera o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que estimula a córtex adrenal a liberar glicocorticóides. Entretanto, até o começo dos anos 1980 não se sabia como o ACTH era liberado. Alguns trabalhos foram pioneiros na tentativa de resolver essa questão, como o de Guillemin e Rosenberg (1955) e o de Saffran e Schally (1955), que independentemente demonstraram a presença de um fator hipotalâmico que estimula a secreção de ACTH pela parte anterior da glândula hipófise (Yang et al., 2010). Vale et al. (1981) por meio da técnica imunoistoquímica e de radioimunoensaio, foram os primeiros a purificar um polipeptídeo de 41 aminoácidos a partir de extratos hipotalâmicos de ovinos, denominando esse polipeptídeo purificado de Fator Liberador de Corticotrofina (CRF) que seria capaz de liberar o ACTH e a β -endorfina pela hipófise anterior.

1.1 O fator liberador de corticotrofina: distribuição no Sistema Nervoso Central, receptores e funções

Estudos de distribuição do CRF no sistema nervoso central (SNC) verificaram que ele se apresenta em diversas regiões, mas localizado principalmente em neurônios secretores parvocelulares do núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVH). Funcionalmente, tem sido caracterizado como membro central na regulação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (eixo-HPA) (Bale e Vale., 2004). Estudos comprovam que o CRF está envolvido, principalmente, no desenvolvimento de ansiedade e desordens de humor (Geerling., 2010). Evidências clínicas ainda demonstraram que a falha neste sistema (eixo-HPA) pode levar a quadros graves de depressão (Geerling et al., 2010; Mitchell., 1998; Owens et al., 1991; Skelton et al., 2000; Bale e Vale., 2004).

O CRF possui dois receptores o CRF1 e CRF2, sendo que o CRF2 possui duas isoformas em roedores e humanos: CRF2 α e CRF2 β e uma terceira isoforma, CRF2 γ , é encontrado somente em humanos. Quanto à afinidade do CRF aos seus receptores tem sido verificado que o CRF possui alta afinidade ao receptor CRF1 do que para o CRF2. Tanto o CRF1 quanto o CRF2 são encontrados amplamente no SNC sendo que os maiores sítios de expressão do RNAm para CRF1 se localizam em áreas neocorticais, cerebelares e sensoriais, enquanto que o RNAm para CRF2 é expresso em estruturas sub-corticais, principalmente no núcleo Septal Lateral, no núcleo Intersticial da Estria Terminal (BST), nos núcleos do complexo amigdalóide, nos núcleos Hipotalâmicos Ventromedial (VMH), PVH e núcleo Supra Óptico (SO) e, em menor quantidade, na Área Hipotalâmica Lateral (LHA) (Bale e Vale., 2004; Rotzinger et al., 2010; van Pett et al., 2000).

Através de modelos pré-clínicos de depressão em camundongos buscou-se verificar se fármacos que inibissem o receptor de CRF1 possuíam papel antidepressivo. Foi verificado que inibidores do receptor CRF1, em doses agudas, não produzem efeito antidepressivo, porém, os mesmos em doses crônicas apresentam este efeito (Rotzinger et al., 2010). O mesmo resultado antidepressivo para inibidores dos receptores de CRF1 foi encontrado para ratos com depressão submetidos a nado forçado e em outros modelos de estresse (Bale., 2006; Holboer e Ising., 2008; Rotzinger et al., 2010).

Estruturalmente o CRF pode ser comparado com outros peptídeos encontrados em vertebrados não mamíferos como o peptídeo Sauvagina (Svga) que é encontrado na pele de rã e a Urotensina (Uro-I) encontrada na urófise de peixes teleósteos. Estes peptídeos além da similaridade estrutural, acima de 50% com o CRF, apresentam as mesmas funções, tais como: liberação de ACTH, hipotensão e vasodilatação (Vaughan et al., 1995). A semelhança estrutural e funcional desses peptídeos associado à presença, até então, de apenas um ligante (CRF) para vários receptores (CRF1, CRF2 α , CRF2 β e CRF2 γ) sugeriram a possibilidade de existir outros membros da família do CRF no SNC de mamíferos. Motivada por esta dúvida Vaughan et al. (1995), utilizando anticorpo contra Uro-I em cortes de encéfalo de roedor, descreveram o primeiro peptídeo homólogo ao CRF em mamíferos, com 40 aminoácidos e homologia de 63% com a Uro-I e, denominado Urocortina. Posteriormente foi descrito a presença de outras urocortinas como Urocortina 2 e 3 sendo a primeira denominada de Urocortina-1 (UCN-1) (Rotzinger et al., 2010).

1.2 A Urocortina 1

A UCN-1 é um neuropeptídeo relacionado à família do CRF. Apresenta afinidade tanto ao receptor CRF1 quanto ao receptor CRF2, porém, a afinidade ao receptor CRF2 é cerca de dez vezes maior (Vaughan et al., 1995). Quanto a produção de ACTH a UCN-I é 40 vezes mais potente do que o CRF (Vaughan et al., 1995).

Através de técnicas de imunoistoquímica e hibridização *in situ*, Bittencourt e colaboradores em 1999 descreveram a distribuição anatômica deste neuropeptídeo em ratos. De acordo com estes autores, o local dominante de células imunorreativas à UCN-1 no SNC de ratos é o núcleo de Edinger-Westphal (EW)*, o núcleo Lateral Superior da Oliva (LSO) e alguns núcleos motores do tronco encefálico como o Facial, Ambíguo, Hipoglosso e Trigêmeo (Bittencourt et al., 1999; Kozicz et al., 1998). Poucos neurônios imunorreativos foram encontrados no PVH e no SO (Bittencourt et al., 1999). No mesmo trabalho através de injeção de traçador neuronal retrógrado *Fast-Blue* (FB) no núcleo Septal Lateral parte intermédia (NSLI), região que apresenta grande quantidade de fibras imunorreativas a UCN-1 e expressão de RNAm do CRF2, Bittencourt et al. (1999) demonstraram a ocorrência de neurônios retrógradamente marcados e imunorreativos a UCN-1 no EW.

Além do mapeamento em rato foi comprovado por Vasconcelos et al. (2003) o mapeamento neuroanatômico desse neuropeptídeo em macacos da espécie *Cebus apella*. Neste trabalho evidenciou-se que a UCN-1 e a acetilcolina, neurotransmissor clássico do sistema parassimpático, não estavam colocalizados nos neurônios do EW.

Estudos realizados em encéfalos *post-mortem* de humanos de variadas idades mostraram imunorreatividade a UCN-1. Esta imunorreatividade foi descrita em densa população de células não colinérgicas localizadas na porção rostral do núcleo Acessório do Nervo Oculomotor ou EW (Ryabinin et al., 2005; Horn et al., 2009).

* Recentemente foi sugerida uma nova nomenclatura em ratos para o epônimo “Núcleo de Edinger-Westphal” para Células-Urocortinérgicas Peri-oculomotoras (p3u) e para a região que supre a inervação do gânglio ciliar existente no mesmo núcleo para Células Pré-Ganglionares Peri-oculomotoras. Sugestão encontrada em: Kozicz et al., (prelo, 2010).

1.2.1 Principais funções da Urocortina 1

Muitos dos estudos realizados até o momento sugerem que a UCN-1 desempenha um papel fundamental em estados ansiogênicos e de estresse, provavelmente mediados por receptores de CRF, principalmente o CRF2. Desta forma, sugere-se a participação da UCN-1 no eixo-HPA, visto a existência de receptores CRF2 na hipófise anterior de mamíferos (Gászner et al., 2004; Moreau et al., 1997; Ryabinin et al., 2005; van Pett et al., 2000; Weninger et al., 2000). Esta participação foi comprovada em estudos com camundongos nocaute para o gene do CRF e submetidos à modelo comportamental de estresse agudo, no qual foi comprovada a presença de ACTH sérico. Além disso os animais apresentaram o mesmo comportamento frente à situação de estresse quando comparados com os animais controle. Os autores atribuíram este fato a participação da UCN-1, presente no EW, no eixo-HPA (Weninger et al., 2000).

Estudos comportamentais em roedores verificaram que a exposição destes ao estresse agudo induz à diminuição do consumo de alimentos, aumentando o apetite ao sódio e diminuindo o peso corpóreo (Kozicz et al., 2001; Spina et al., 1996). Neste sentido, alguns autores demonstraram que após a administração intracerebroventricular (i.c.v) da UCN-1 ocorre uma ação moderada sobre o controle do comportamento alimentar, diminuindo o consumo de alimentos e do peso corpóreo (Cone et al., 2000; Skelton et al., 2000; Spina et al., 1996). Este efeito é suprimido pela administração prévia de antagonistas dos receptores de CRF (Bradbury et al., 2000; Spina et al., 1996). Benoit et al. (2000) descrevem que o efeito da UCN-1 de induzir a diminuição da ingestão de alimentos, pode ser devido a UCN-1 fazer parte de vias relacionadas ao estresse.

A presença da UCN-1 no EW sugere a participação desse núcleo em funções fisiológicas. Isso foi verificado em um estudo experimental que submeteu roedores ao estresse por contenção, onde após três horas de contenção verificou-se a superexpressão do gene para UCN-1 no EW pela técnica de hibridização *in situ* (Weninger et al., 2000). Em concordância com este fato foi publicado recentemente que a indução do estresse agudo induzida por formalina, ativa o gene *c-fos* em neurônios urocortinérgicos do EW de roedores (Kozicz et al., 2001, 2003), sugerindo assim um papel funcional dos neurônios UCN-1 do EW na modulação da resposta ao estresse. Kozicz et al. (2004) verificaram que animais nocaute para o gene CRF possuem alta expressão de UCN-1 no EW, sugerindo que a relação inversa entre CRF e UCN-1 pode estar envolvida em algum circuito neuronal capaz de atuar na resposta ao

estresse. Okere et al. (2010) confirmam a participação da UCN-1 em modelos de estresse agudo por contenção, sendo verificada a ativação de células UCN-1 no EW colocalizada com o Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina (CART) e Nesfatin-1 (Nef-1). Outros trabalhos discordam sobre o papel da UCN-1 no estresse. Spangler et al. (2009) apud Okere et al. (2010) demonstraram que após a exposição de camundongos a vários modelos de estresse agudo não houve ativação direta do gene para UCN-1 no EW.

Estas contradições sobre o papel da UCN-1 no estresse podem ser resultado da diferença de linhagens de camundongos utilizadas por ambos os autores, assim como, por diferenças entre os modelos experimentais e o protocolo de tratamento do tecido nervoso (Brawner e Thompson, 2008; Weitemier et al., 2005).

Quanto à localização da UCN-1 no LSO existem poucos trabalhos disponíveis na literatura que possa relacioná-la na resposta ao estresse. O que é descrito na literatura até o momento é que a UCN-1 está em células do LSO que originam o trato olivococlear e suas terminações chegam à base das células ciliadas internas. Porém, foi encontrado o RNAm dos CRF, CRF1 e CRF2 nas células ciliadas externas, mostrando que membros da família do CRF como a UCN-1 poderiam estar participando da inervação das células ciliadas externas (Bittencourt et al., 1999; Kozicz et al., 1998; Vetter et al., 2002). Isso foi demonstrado funcionalmente quando camundongos nocaute para o gene da UCN-1 apresentaram rebaixamento da acuidade auditiva, sugerindo o papel desse sistema peptidérgico para o bom desenvolvimento das vias auditivas (Vetter et al., 2002). Outro trabalho especulou sobre a possibilidade da participação da UCN-1 em patologias auditivas relacionadas com o estresse, como o “zumbido crônico”, uma vez que foi encontrado terminais UCN-1 no núcleo coclear nas suas subdivisões posteroventral, anteroventral e área de células esféricas e ainda para o gânglio espiral em camundongos (Brawner et al., 2008),

Desta forma, é constatado que tanto a proteína quanto o RNAm da UCN-1 encontram-se principalmente nos núcleos de EW e LSO (Bittencourt et al., 1999). Esses núcleos estão relacionados às vias visuais e auditivas, respectivamente, mas não são responsáveis nem pela interpretação de imagem e nem de sons, entretanto atuam como estações sinápticas de vias reflexas visuais e auditivas. Classicamente, o EW sempre foi descrito como uma entidade responsável pelo reflexo pupilar (miose), acomodação do cristalino e controle vasomotor (Akert et al., 1980; Balaban, 2003; Benjamim, et al., 1939; Bittencourt et al., 1999; Burde et al., 1982; Burde e Willians, 1988; Chung et al., 1987; Crouch, 1936; Fitzgerald et al., 1990; Gamlin e Reiner., 1991, 1996; Ishikawa et al., 1989; Loewy et al., 1978a,b; Maciewicz et al.,

1983; Maciewicz et al.,1984; Martin et al.,1983; May et al., 2008; Sekiya et al., 1984; Tan e Holstege., 1986; Warwick, 1954; White e Smithwick, 1941) tendo como principal neurotransmissor químico a acetilcolina. Porém, a descoberta da UCN-1 nesse núcleo e que não se localiza com células colinérgicas trouxe muita discussão sobre a pertinência de ainda considerarmos o EW somente como participante do sistema visual não formador de imagem.

A região de células urocortinérgicas, a princípio localizada no EW tem recentemente atraído a atenção de pesquisadores. Apesar de termos tido um acréscimo razoável no conhecimento dessa região nos últimos anos, a literatura que descreve as suas conexões é restrita, especialmente as que dizem respeito às aferências prosencefálicas. Dessa forma, tal substrato anatômico seria fundamental para a compreensão das possíveis funções desta região.

Nosso objetivo é mapear as regiões hipotalâmicas aferentes ao EW por meio de injeção iontoforética de traçador neuronal retrógrado *Fluoro-Gold* (FG) em ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Long-Evans (pigmentados).

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Long-Evans, machos adultos jovens, de aproximadamente 250-270 gramas. Foram utilizados 148 animais sendo, 35 para injeções de traçador retrógrado no EW e 114 para os casos controle. Estes foram agrupados em gaiolas contendo quatro animais por gaiola, com livre acesso à água e ração. O período de claro/escuro foi de 12/12 horas (luzes se apagam às 19hs) e a temperatura controlada ($21^{\circ}\text{C}\pm 2$), no biotério de experimentação do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas, Ed. B-III. O protocolo experimental foi aprovado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA).

4.1 Considerações sobre a linhagem *Long-Evans*

A linhagem Long-Evans foi o resultado do cruzamento entre ratos Wistar (albinos) e ratos selvagens (*norway*), sendo essa nova linhagem desenvolvida desde o ano de 1910 pelos pesquisadores J. E. Long e H. M. Evans. Esta linhagem é conhecida por possuir uma pelagem branca em grande parte do seu corpo e com apenas algumas regiões com pelagem preta, como cabeça e pescoço. Possuem melanina em sua retina, tornando-se este um fator importante na acuidade visual, camuflagem e proteção contra radiação ultravioleta. Estas ações da melanina podem determinar diferenças funcionais entre animais pigmentados e albinos (Allemandi, 2004).

No processo de domesticação do *Rattus Norvegicus* ocorrem efeitos diferenciais em comportamentos cognitivos. Estes incidem de maneira prejudicial sobre o aprendizado e memória, porém em ratos da linhagem Long-Evans observou-se que seu cérebro é o menos afetado (Harker e Whishaw, 2002). Em testes comportamentais, dependendo do tipo de processamento exigido pelo sistema nervoso para realização de tarefas, alguns autores sugerem que a linhagem Long-Evans mostraria melhor desempenho (Allemandi, 2004). Além disso, ratos Long-Evans se apresentam como bons nadadores, semelhante a seus parentes selvagens (Whishaw e Tomie, 1996).

Em estudos comparativos entre linhagens (albinos e pigmentados), a Long-Evans por possuir melanina em sua retina tem-se mostrado superior com respeito à acuidade visual, aprendizado e comportamento. Estudos com o limiar de reflexo de luz na pupila, registrado no colículo superior e nervo óptico por eletroretinografia, evidenciaram que

ratos pigmentados têm maior acuidade visual quando comparados com linhagens albinas (Green et al., 1991), como também apresentam melhor performance em testes comportamentais relacionados ao aprendizado espacial, sendo mais hábeis no reconhecimento de objeto do que os ratos albinos (Andrews et al, 1995).

4.2 Método de rastreamento neuronal

4.2.1 Injeção de traçador neuronal retrogrado Fluoro-Gold por iontoforese

Após os animais adquirirem idade entre 60 e 65 dias e peso corpóreo de 250-270g, eles foram submetidos à cirurgia estereotóxica para injeção do FG por iontoforese.

Os animais foram anestesiados com uma solução anestésica aquosa composta de 5mg/100g de cetamina (Cetamin, SYNTEC), 1mg/100g de xylasina (Xylasin, SYNTEC) e 0,2 mg/100g acepromazina (Acepran, UNIVET S/A), e injetados com 0,2ml/100g de peso corporal dessa solução, por via subcutânea. Uma vez tendo sido comprovado o efeito do anestésico, os animais são fixados em aparelho estereotático (DAVID KOPF®).

Utilizamos o FG a 2% (diluído em solução salina a 0.9%) como traçador retrógrado. O FG foi injetado no EW por iontoforese utilizando uma fonte de corrente alternada de 5 μ Amp durante 5 minutos, através de micropipeta de vidro, cuja ponta é confeccionada por um estirador de pipetas vertical (Kopf, 720) para obtermos um diâmetro interno de 15 μ m. As micropipetas foram preenchidas com FG poucos minutos antes do implante por capilaridade pela ponta anterior. Para a injeção do traçador no EW utilizamos as seguintes coordenadas:

- ântero-posterior: -5,2 (bregma)
- médio-lateral: 0,0
- dorso-ventral: -5,9 (dura-máter)

As coordenadas estereotáticas foram encontradas com auxílio do Atlas de Coordenadas Estereotáticas de Rato Paxinos e Watson (1998, 2008). A coordenada ântero-posterior utilizou como referência o bregma enquanto que a coordenada dorso-ventral usou o topo da dura-máter como referência.

Após o período de 15 dias, para permitir o transporte do FG, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca.

4.2.2 Perfusão transcardíaca e microtomia

Para realizarmos o procedimento de perfusão transcardíaca, os animais foram anestesiados com solução de Hidrato de Cloral a 35% (1ml/animal) injetada intraperitonealmente.

Depois de anestesiados foi realizada incisão na pele desses animais na altura da linha média torácica, próxima ao processo xifóide. Uma incisão mais profunda é realizada permitindo o acesso à cavidade abdominal e torácica. Essa incisão é feita imediatamente abaixo do processo xifóide e parte bilateralmente em direção às margens laterais das costelas.

Após o rompimento do músculo diafragma, o plastrão esterno-costal é rebatido e o músculo cardíaco é exposto para as manobras da perfusão. O ápice do coração é seccionado, permitindo acesso ao ventrículo esquerdo. É introduzida, então, uma cânula de metal que atinge o início da aorta ascendente. A perfusão é feita inicialmente com salina 0,9% (100 ml/1 minuto), seguida de formaldeído 4% (a partir de paraformaldeído aquecido a 60-65⁰C), pH 9,5 ($\pm$ 1000 ml/25min) a 4 ⁰C. Após o término da perfusão os encéfalos foram retirados dos crânios e colocados numa solução fixadora de formaldeído acrescida de sacarose a 20%, permanecendo nessa solução por aproximadamente 18h.

Após esse período, os encéfalos foram colocados em solução salina tamponada com potássio e fosfato (KPBS) 0,02M, pH 7,4 acrescida de sacarose (20%) por aproximadamente 18h mantido a 4 ⁰C para posterior microtomia.

Os encéfalos dos animais foram cortados em micrótomo de congelação (Leika-SM 2000 R) na espessura de 30 μ m, no plano coronal, sendo armazenados em 5 séries em solução anticongelante tamponada.

4.2.3 Procedimentos com os cortes

Os cortes foram mantidos a -20 ⁰C, em solução tamponada anticongelante, até serem submetidos aos procedimentos histológicos.

Por ser o traçador FG autofluorescente, uma das séries de cortes foi montada em lâminas gelatinizadas e cobertas por lamínula, utilizando-se tampão glicerol como meio de montagem para visualizarmos o local de depósito do traçador.

Outra série foi corada pelo método de Nissl (com tionina a 0,25%) para referência de núcleos e tratos, enquanto que outras séries foram tratadas para imunoistoquímica pelos métodos de imunoperoxidase ou fluorescência para UCN-1.

4.2.4 Estudo citoarquitetônico pelo método de Nissl

A coloração de Nissl tem por objetivo corar os corpos celulares de neurônios (e glia), conseqüentemente delimitando núcleos e evidenciando tratos, estes últimos pobremente habitados por corpos celulares. A partir deste princípio, foram utilizados os cortes de encéfalos corados por esta técnica para conhecermos a citoarquitetura e compará-las com as regiões onde encontramos células retrogradamente marcadas, como também para fornecer uma contra coloração após imunoistoquímica nos locais de injeção, facilitando o reconhecimento do local de depósito do traçador.

A coloração de Nissl consiste inicialmente em submetermos lâminas com cortes histológicos à desidratação em uma seqüência de alcoóis de concentrações crescentes, seguidos de deslipidificação em xilol (Merck, USA); hidratação em uma seqüência de alcoóis de concentrações decrescentes; permanência em tionina (corante) por aproximadamente 25 segundos; mergulhos rápidos em dH₂O para retirar o excesso de corante; novamente desidratação em alcoóis de concentrações crescentes, seguidas de deslipidificação em xilol para as lâminas serem cobertas com meio de montagem DPX e lamínula.

4.2.5 Visualização do local de injeção de Fluoro-Gold

Para nos certificarmos de que o local onde houve depósito de FG era o EW, de acordo com o Atlas de Coordenadas Estereotóxica de Rato (Paxinos e Watson, 2008), e o local descrito por Bittencourt et al. (1999) como maior sítio de expressão do RNAm de UCN-1 no SNC de ratos, realizamos uma imunoistoquímica utilizando fluorescência para

UCN-1 e a autofluorescência do FG. Para tanto, utilizamos casos em que a injeção foi considerada como boa, ou seja, injeções que limitavam-se às fronteiras do EW, com o mínimo de contaminação de estruturas vizinhas, principalmente o 3N. Após lavagens em KPBS, incubamos o tecido em uma solução contendo 1g de soro bovino (BSA), 0,0056% de heparina (Heparin, Sodium Salt, Porcine intestinal Mucosa 100KU, CALBIOCHEM®) e anticorpo contra UCN-1 feito em coelho na concentração de 1: 100 (gentilmente cedido pelos doutores Wyllie Vale e Joan Vaughan do Laboratório de Biologia de Peptídeos do Instituto Salk, San Diego, Califórnia, EUA), por 48 horas, na mesa agitadora a 4 °C.

Após as 48 horas, os cortes foram lavados em KPBS (3x10min.) e em seguida incubados por 1 hora em uma solução contendo 1g de BSA, 0,0056% de heparina e anticorpo secundário feito em burro contra coelho na concentração de 1:200, marcado com Cy3 (Jacksons, Laboratories). Os cortes foram então montados em lâminas gelatinizadas e cobertas com lamínulas utilizando como meio de montagem glicerol tamponado e, acondicionadas sob refrigeração ao abrigo da luz.

4.2.6 Imunoistoquímica (método de imunoperoxidase) para Fluoro-Gold

Utilizamos também o anticorpo contra FG (CHEMICON, Int. - anticorpo policlonal de especificidade já testada; vide Chang et al., 1990), para mapeamento das células retrogradamente marcadas em campo claro. O método consiste de um pré-tratamento dos cortes com solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% em tampão KPBS, por 30 min., para eliminarmos a atividade da peroxidase endógena. Depois disto, os cortes foram lavados em tampão KPBS (3x10min.) e incubados em uma solução contendo soro normal de burro (2%) e “loaded” (KPBS + Triton X-100 0,25%) durante uma hora.

Após o período descrito, foi adicionado a esta solução o anticorpo contra FG, na concentração de 1: 60.000, feito em coelho, por 24 horas, em temperatura ambiente, sob constante agitação.

Posteriormente, o tecido foi novamente lavado em KPBS (3x10 min.) e incubado em solução contendo 10 ml de “loaded” e anticorpo secundário biotilado feito em burro contra coelho na proporção 1:200 pelo período de 1 hora e no Complexo Avidina e Biotina

(ABC) (Vectastain Kit Elite, Vector) diluído em KPBS na concentração de 1:500, durante uma hora.

A reação de imunoperoxidase foi realizada com DAB 0,05% acrescido de Sulfato de Níquel com amônia, como cromógeno e peróxido de hidrogênio 0,03%. Posteriormente, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e cobertos com DPX e lamínula.

4.3 Controle Anterógrado

4.3.1 Injeção de traçador neuronal anterógrado Amina Dextrana Biotinilada

Para o controle anterógrado das aferências do EW, um grupo de animais (n= 113) foi submetido à cirurgia de injeção do traçador anterógrado amina dextrana biotinilada (BDA) 10% (10K diluído em água destilada) nas seguintes regiões: núcleo hipotalâmico posterior (PH n= 3), subdivisão anterior e tuberal do hipotálamo lateral (LHAa, LHAt n= 3) segundo Saper et al. (1979) e PVH (n= 3). Para o procedimento cirúrgico de injeção do traçador BDA os animais foram previamente anestesiados através de injeção subcutânea de uma solução anestésica já anteriormente citada. Após a anestesia, os animais sofreram tricotomia na região craniana e fixados em aparelho estereotático. O traçador foi injetado nas regiões descritas acima por iontoforese, utilizando 5µ Amp de corrente alternada durante 10 minutos, através de micropipeta de vidro, com um diâmetro interno entre 10 e 20µm. As micropipetas foram preenchidas com solução de BDA, minutos antes da cirurgia, por capilaridade. Os animais foram perfundidos 10 dias após a cirurgia para permitir o transporte do traçador.

4.3.2 Histoquímica para o traçador anterógrado Amina Dextrana Biotinilada

Uma série de cortes do local de injeção e tronco encefálico de cada animal que recebeu a injeção do traçador anterógrado BDA foi submetida à reação histoquímica para a visualização do local de injeção e das fibras imunorreativas ao BDA (Reiner et al., 2000). Os cortes foram lavados com KPBS (2 x de 10min.) e colocados em uma solução contendo KPBS + Triton X-100 0,3% e peróxido de hidrogênio a 0,3%, por 15 minutos, os cortes foram

lavados em KPBS até serem eliminadas as bolhas. O tecido foi, posteriormente, colocado em solução contendo o complexo ABC na concentração de 1:500. Após lavagens em KPBS, (3 x de 10min.), o tecido foi transferido para outra solução contendo KPBS e o cromógeno DAB a 0,05% e peróxido de hidrogênio a 0,001%. A reação foi finalizada com lavagens de KPBS e desidratados em seqüências crescentes de álcool etílico, deslipidificados em xilol, onde permaneceram por cerca de quatro dias, quando foram reidratados em seqüência decrescentes de álcool etílico para serem submetidos à reação de intensificação pela prata.

4.3.3 Intensificação pela prata

O método de intensificação pela prata nos permite melhor visualização das fibras que transportaram o BDA, facilitando sua localização nas várias regiões do sistema nervoso. De acordo com o protocolo de impregnação pela prata (de Lacalle, 1993), submetemos os cortes à desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico e deslipidificação em xilol por cinco dias para a retirada da mielina. No dia do procedimento os cortes foram reidratados em concentrações decrescentes de alcoóis e incubados em Nitrato de Prata 1% (Synth), a 56 °C, por 45 minutos. Após este período, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos, incubados em Cloreto de Ouro 0,1% (Sigma) por 10 minutos em temperatura ambiente, lavados em água corrente por cerca de 10 minutos, incubados em tio-sulfato de sódio 5% (Fisher) por cinco minutos e lavados em água corrente por 10 minutos. Os cortes foram então desidratados e cobertos com meio de montagem DPX e lamínulas.

4.3.4 Visualização de fibras BDA e células UCN-1-ir no núcleo de Edinger-Westphal

O objetivo desta técnica foi mostrar que, após injeção de traçador anterógrado BDA em núcleos ou regiões hipotalâmicas que foram utilizadas como controle anterógrado, as fibras reativas ao BDA terminam no EW e estabelecem possíveis contatos com células UCN-1. Para isso foi utilizada dupla marcação por imunofluorescência para células imunorreativas a UCN-1 e fibras BDA. Os cortes foram lavados em KPBS (2x de 10 min.) e incubados em solução contendo KPBS+ Triton X-100 com BSA a 1%, heparina e anticorpo primário anti-UCN-1 feito em coelho na concentração de 1:100. Após 48 horas, os cortes foram lavados em

KPBS e incubados em solução contendo KPBS + Triton X-100 com soro albumina bovina a 1%, heparina e anticorpo secundário feito em burro anti IgG de coelho conjugado ao Cy2 (verde) ou Cy3 (vermelho) (Jackson, Laboratories) na concentração de 1:200 por duas horas. Depois desse período os cortes foram lavados em KPBS e incubados em solução contendo KPBS + Triton X-100 com soro albumina bovina, heparina e Streptavidina conjugada ao Cy3 ou Cy2 (Jackson, Laboratories) na concentração de 1:200 por uma hora. Após o período, os cortes foram novamente lavados em KPBS, montados em lâminas gelatinizadas, cobertas com lamínulas utilizando como meio de montagem tampão glicerol e acondicionados a 4 °C.

4.4 Análise dos resultados

A sistematização e o mapeamento das células imunorreativas ao FG (FG-ir) foram realizados através de microscopia em campo claro, escuro e de fluorescência. Os núcleos e/ou regiões do SNC do rato que continham as células FG-ir foram mapeadas, usando como referências de núcleos, tratos e subdivisões regionais o Atlas de Coordenadas Estereotáticas de Rato de Paxinos e Watson (2006, 2008), e o “Atlas Brain Maps Structure of the Rat Brain” Swanson (1992, 2008), assim como as nossas lâminas coradas com tionina.

Neste estudo foi estabelecido para análise das células FG-ir o método comparativo semi-quantitativo. Esse método semi-quantitativo utilizou os seguintes códigos: (+++) muitas células retrogradamente marcadas, (++) razoável número de células retrogradamente marcadas, (+), conforme figura 1 poucas células retrogradamente marcadas este parâmetro foi feito com base na soma de todos os resultados. Alguns resultados foram agrupados em uma tabela de maneira a auxiliar na compreensão dos resultados encontrados para EW.

Quanto às injeções, foram consideradas como boas aquelas que atingiram os limites anatômicos do EW de acordo com as coordenadas estereotáticas estabelecidas para o EW no Atlas de Coordenadas Estereotáticas de Rato de Paxinos e Watson (2008). Nos casos em que o sítio de injeção se mostrou em núcleos próximos, como o MA3 ou 3N, essas foram utilizadas como controle. Vale ser ressaltado que todas as regiões vizinhas ao EW tiveram contaminação pelo halo de FG, principalmente o MA3 e 3N.

4.5 Aquisição e edição de imagens

Os cortes foram analisados em microscopia de luz de campo claro e escuro, para observarmos a distribuição dos corpos neuronais FG-ir, e sítios de injeção para BDA e suas fibras imunorreativas. Em microscópio de epifluorescência visualizamos os locais de injeção de FG e imunofluorescência para UCN-1. O microscópio utilizado para ambas as análises foi o microscópio Leica, Wetzlar, Alemanha, e equipado para análise com epifluorescência Leica EL6000. As imagens foram adquiridas com câmera digital, acoplada ao microscópio, da marca Nikon – *digital sight* DS-Ri1 (Nikon Corporation, Japão), utilizando-se o software de captura de imagens NIS – Elements BR 3.0 (Nikon Corporation, Japão).

Utilizamos para análise das duplas marcações em fluorescência o confocal Zeiss modelo LSM 510 (ZEISS, Carl Zeiss Microscopy, Germany), que nos permitiu um foco de 0,9 μm do tecido.

Para a apresentação dos esquemas dos resultados em todo o neuro-eixo das células retrógradamente marcadas utilizamos o CD “ROM” Atlas de Coordenadas Estereotáticas do Rato de Paxinos e Watson (2006) e o CD “ROM” “Brain Maps” (Swanson, 2010) e para as fotomicrografias contamos com recursos de programas de edição de imagens como Adobe Photoshop CS2 que serviu para apresentação e organização das fotomicrografias e Adobe Illustrator CS para montar as plotagens.

Figura 1. Demonstração da Análise subjetiva das regiões onde foram encontradas células retrógradamente marcadas no sistema nervoso central do rato. Abreviações: PH, núcleo posterior do hipotálamo; PaV, porção parvocelular ventral do núcleo paraventricular do hipotálamo; PMV, núcleo pré-mamilar ventral do hipotálamo.

5.1 Citoarquitetura e locais de injeção de *Fluoro-Gold* no núcleo de Edinger-Westphal

Utilizando a coloração com tionina, pudemos observar que rostralmente as duas fileiras de células que formam o EW se iniciam no nível onde ocorre a transição do 3V para o aqueduto cerebral, na chamada zona meso-diencefálica, citoarquitetonicamente, que é definida como a porção rostral do EW. Em toda sua extensão as duas colunas estão ventrais à substância cinzenta periaquedutal (PAG) e ao aqueduto mesencefálico (Aq). Nas porções mais anteriores, o EW limita-se lateralmente com o núcleo de Darkschewitsch (Dk) e ventralmente com o núcleo rostral linear da rafe (RLi).

Nas porções intermediárias as duas colunas celulares que compõem o EW mantêm os limites ventrais e dorsais, mas com o limite lateral passando a ser o núcleo do nervo oculomotor (3N), formado neste nível pela parte parvicelular e pela parte periaquedutal supraoculomotora (Su3).

Nas porções caudais o EW continua ventralmente ao Aq e, lateralmente, pelas mesmas porções que formam o complexo do oculomotor; no entanto, ventralmente, o núcleo passa a se limitar pela decussação tegmental dorsal e, ventro-lateralmente, com o 3N e com o fascículo longitudinal medial (mlf).

Quanto a sua forma, o EW apresenta-se em forma de duas estreitas colunas de células que são ventrais no seu nível mais rostral e se torna mais dorsal nos níveis intermédios e caudais, o que confere às colunas a forma arqueada sobre o 3N. Em relação à sua citoarquitetura, os níveis rostral e intermediário apresentam neurônios em formato fusiforme, cujo maior eixo se encontra disposto no sentido dorso-ventral. No nível caudal as células do EW apresentam-se em forma mais ovalada, com algumas células dispostas no sentido dorso-ventral e outras dispostas de forma irregular como mostrado nas figuras 2, 3 e 4.

5.2 Aferências para as células Urocortinérgicas do núcleo de Edinger-Westphal

As cirurgias para injeção de FG foram feitas em ratos adultos da linhagem Long-Evans. De um total de 35 cirurgias, obtivemos seis casos com injeções centradas no EW e foram considerados casos bons (Figura 4). No restante dos casos não houve transporte do FG

Figura 2. Imunorreatividade à Urocortina 1 (UCN-1ir) na extensão rostro-caudal do núcleo de Edinger-Westphal (EW). Fotomicrografias em campo claro mostrando em A, B porção rostral do EW, notar as células UCN-1ir sendo margeadas pelo DK e MA3; em C porção intermédia do EW tendo a citoarquitetura das células UCN-1ir em forma de duas colunas de células paralelas e margeadas pelo 3N e SU3; D porção caudal do EW notar a forma pequena e ovalada que as células UCN1ir dão ao EW. Abreviações: DK, núcleo de Dakchevish; MA3, núcleo medial acessório do nervo oculomotor; SU3, núcleo superior do núcleo do nervo oculomotor; 3N, núcleo do nervo oculomotor; mlf, fascículo longitudinal medial. Barra: 500 um.

Figura 3. Coloração pela técnica de Nissl da extensão rostro-caudal do núcleo de Edinger-Westphal (EW). Fotomicrografias em campo claro mostrando em A, B porção rostral do EW, notar as células do EW sendo margeadas pelo DK e MA3; em C porção intermédia do EW tendo a citoarquitetura em forma de duas colunas de células paralelas e margeadas pelo 3N e SU3; D porção caudal do EW- notar a forma pequena e ovalada do EW e as células que o formam. Abreviações: DK, núcleo de Dakchevish; MA3, núcleo medial acessório do coulomotor; SU3, núcleo superior do núcleo de nervo oculomotor; 3N, núcleo do nervo oculomotor; mlf, fascículo longitudinal medial. Barra:500um.

Figura 4. Locais de injeção do traçador neuronal retrogrado *Fluoro-Gold* (FG) após imunoistoquímica para o I contralateralizado pelo método de Nissl no núcleo de Edinger-Westphal (EW) dos casos considerados b. Fotomicrografias em campo claro. Abreviações: DK, núcleo de Dakchevich; MA3, núcleo medial acessório do núcleo do nervo oculomotor; SU3, núcleo superior do núcleo do nervo oculomotor; 3N, núcleo superior do nervo oculomotor; mlf, fascículo longitudinal medial. Barra: 500µm.

ou, quando houve, o local de injeção ficou distante do complexo do oculomotor. A partir dos casos bons, estudamos e descrevemos as marcações retrógradas para o EW.

Foram considerados casos bons aqueles em que houve a injeção de FG em pelo menos uma das colunas celulares do EW, independente do nível rostro-caudal que ela tenha atingido. Dos casos apresentados, pela citoarquitetura e estruturas de referência podemos sugerir que quatro tiveram sítios de injeções que se restringiram ao nível rostral do EW no eixo rostro-caudal (LE#6, LE# 12, LE# 25 e LE# 42), havendo, porém, pouca variação nas coordenadas dorso-ventral e látero-lateral. O depósito de FG abrangeu as duas colunas do EW, com boa quantidade de células captando o traçador. Não obstante, o FG pode ter contaminado áreas próximas do EW como o núcleo do 3N, porém, resultados de injeções que atingiram o MA3 e 3N se mostraram diferenciados em muitas regiões. Os casos restantes (LE# 17 e LE# 26) também foram usados no estudo das aferências, esses tiveram os sítios de injeção em níveis mais intermédios do EW, entretanto, contaminando a região médio-dorsal do 3N. Nesses casos, houve diferença de algumas regiões que revelaram marcação retrógrada.

Considerando que desde o início de sua descrição as células UCN 1 foram tidas como pertencendo à região do EW realizamos uma marcação imunoistoquímica para UCN-1 em um dos casos de depósito de FG considerado bom, para verificarmos se a injeção de traçador realmente atingiu o local pretendido. Dessa maneira, conseguimos visualizar que o local de injeção de FG se localizava sobre as células que são UCN-1-ir, visualizando algumas células duplamente marcadas.

De modo geral, as regiões retrógradamente marcadas se assemelham entre os casos, havendo diferença apenas quanto à quantidade de células visualizadas.

5.2.1 Telencéfalo

No telencéfalo, apesar de sua abrangência, foram encontrados neurônios FG-ir em algumas regiões que serão aqui descritas.

Em um eixo rostro-caudal de todos os casos estudados, observamos algumas células FG-ir marcadas em algumas regiões corticais como córtex motor primário e secundário (M1 e M2) com moderada marcação. Notamos que estas células, em todos os casos, a maior concentração delas, encontra-se na camada de células piramidais ou chamada de camada 5 e

poucas células nas camadas 3 e 4. Tais marcações nestas camadas abrangem outras regiões corticais como córtex do cíngulo área 1 (Cg1), córtex insular agranular parte dorsal (AID) e córtex insular agranular parte ventral (AIV) e pouca marcação no córtex orbital lateral (LO). Pouca marcação é também encontrada no claustrum (Cl), córtex infralímbico (IL), e moderada marcação no córtex pré-límbico (PrL) e somatosensorial primário (S1j) (Figura 5).

Em regiões sub-corticais também foram encontradas algumas marcações, como, poucas no núcleo vertical da banda diagonal (VDB), moderada no núcleo horizontal da banda diagonal (HDB) e poucas no pálido ventral (VP). Poucas células FG-ir na ténia tectal dorsal (DTT), núcleo septal lateral parte intermédia (LSI) e núcleo septal lateral parte ventral (LSV) (Figura 5).

No complexo amigdalóide foi encontrada moderada marcação na porção rostral do núcleo central da amígdala (CeM), enquanto que na sua porção caudal ela aumenta tornando-se uma marcação considerada alta, foi encontrada pouca marcação no núcleo central da amígdala parte capsular (CeC), Extensão da amígdala sublenticular parte central (EAC) e área amigdalóide anterior ventral (AAV) e dorsal (AAD) e pouco no núcleo amigdalóide basomedial parte anterior (BMA) e moderado no basolateral (BMA) (Figuras 6 e 7).

Encontramos moderada marcação na substância inominata ventral (SIV) e dorsal (SID) em toda sua extensão, quando esta em sua porção caudal localizada lateralmente a área hipotalâmica lateral anterior (LHAa) passa a apresentar pouca quantidade de células.

No núcleo intersticial da estria terminal (BST) foi encontrada moderada quantidade de células FG-ir em suas subdivisões medial, parte posterointermedial (BSTMPI), medial, parte ventral (BSTMV) e medial, parte anterior (BSTMA) (Figura 6).

Dentro da Cápsula Interna (CI) lateral, a zona lateral do hipotálamo, conseguiu visualizar uma grande quantidade de células no globo pálido medial (MGP) em toda sua extensão, demonstrando esta marcação ser sempre unilateral e pouca marcação no pálido ventral (VP) (Figuras 6 e 7).

Em regiões como órgão subfornicial (SFO) foram encontradas poucas células FG-ir, apenas nos casos em que julgamos que a injeção tenha caído em uma porção intermédia do EW (Figura 6).

Figura 5. Representação dos locais onde foram encontradas células retrogradamente marcadas em um eixo rostro-caudal dos casos de injeção de Fluoro-Gold no núcleo de Edinger-Westphal (A). Abreviações: vide Lista de Abreviações.

5.2.2 Diencéfalo

De modo geral houve pouca diferença no que corresponde à quantidade de células FG-ir no diencéfalo dos casos estudados sendo todos eles invariavelmente bilaterais.

5.2.2.1 Tálamo

Não foram encontrados muitos resultados de seus núcleos com células retrogradamente marcados, apenas algumas regiões se mostraram constantes em todos os casos e foram descritos.

Foi encontrada pouca marcação no núcleo habenular medial (MHb) e no núcleo habenular lateral (LHb) em sua porção rostral, porém, a mesma aumenta para moderada quando os cortes se tornam mais caudais e o LHb passa a ser subdividido em dois, uma parte medial (LHbM) e uma lateral (LHbL), onde encontramos de moderada a elevada quantidade de células FG-ir (Figuras 6 e 7).

Além das regiões descritas acima também foi encontrada pouca quantidade de células FG-ir no núcleo geniculado medial (MGM), moderada marcação na porção caudal do núcleo talâmico paraventrícular posterior (PVP) e núcleo intersticial rostral do fascículo longitudinal medial (RI). No núcleo talâmico parafascicular (PF) foi encontrada grande quantidade de células FG-ir, e pouca no núcleo talâmico subparafascicular (SPFPC) (Figura 8).

5.2.2.2 Subtálamo

No subtálamo dos casos estudados foi encontrada moderada marcação bilateral em toda extensão da zona Incerta rostral (ZIR) e zona Incerta ventral (ZIV), enquanto que visualizamos alta marcação na zona incerta dorsal (ZID) e zona incerta (ZI). Ainda foi encontrada moderada marcação no campo pré-rubral (PR).

Foi encontrada moderada marcação no nível caudal do núcleo subtalâmico (STh) e parasubtalâmico (PSTh) ao nível do hipotálamo posterior (ou mamilar) onde se visualiza o núcleo hipotalâmico posterior (PH) e se localizam lateral a LHAp e ventral a ZIV (Figuras 6, 7 e 8).

5.2.2.3 Hipotálamo

Para a descrição das células retrogradamente marcadas no hipotálamo, seguiremos a subdivisão do mesmo proposto por Simerly et al. (1995) no eixo rostro-caudal, como seguem: Região Pré-Óptica, Região Supra-Óptica, Região Tuberal e Mamilar.

Visto a alta quantidade de neurônios FG-ir na Área Hipotalâmica Lateral (LHA) descrevemos os resultados encontrados nesta região em um capítulo a parte, para tanto, a mesma foi subdividida em três sub-regiões sendo elas: anterior (LHAa), tuberal (LHA_t), e mamilar (posterior) (LHA_p) sendo essas regiões correspondentes as subdivisões do hipotálamo (Saper et al., 1979; Simerly et al., 1995).

5.2.2.3.1 Região Pré-Óptica

Iniciando pela região pré-óptica, reconhecemos em toda extensão do núcleo pré-óptico mediano (MnPO) moderada concentração de células FG-ir, com maior concentração na porção mais próxima ao terceiro ventrículo (3V), ventralmente a comissura anterior.

Além desta ainda encontramos poucos neurônios FG-ir na Área pré-óptica medial (MPA), núcleo pré-óptico ventromedial (VMPO), Núcleo pré-óptico medial parte lateral (MPOL) e de pouca a moderada no núcleo pré-óptico anterodorsal (ADP) e no núcleo estrio hipotalâmico (StHy). Ainda encontramos alta quantidade de neurônios FG-ir no órgão vascular da lâmina terminal (VOLT) com células muito próximas aos vasos sanguíneos, finalmente, encontramos alta quantidade de neurônios FG-ir na Área pré-óptica lateral (LPO) (Figuras 5, 6, 11A e B).

5.2.2.3.2 Região Supra-Óptica (Anterior)

Alguns resultados para esta região se assemelham aos resultados para a região pré-óptica devido à extensão de alguns núcleos para a região supra-óptica.

Foram encontrados poucos neurônios FG-ir na, MPA, MPOL, alta concentração de neurônios marcados no LPO, e pouca na área retroquiasmática parte lateral (RChl) (Figuras 5 e 6).

5.2.2.3.3 Região Tuberal

Foi encontrada pouca marcação na porção rostral do núcleo hipotalâmico paraventrícular parte parvocelular medial (PaMP) e na subdivisão dorsal (PaD) e moderada

marcação na subdivisão ventral (PaV). Quanto a subdivisão magnocelular do núcleo foram encontrados poucos neurônios FG-ir no magnocelular lateral (PaLM) terminando com poucos neurônios em sua porção posterior (PaPo) (Figuras 6, 11C e D).

No núcleo hipotalâmico ventromedial foi encontrada pouca quantidade de células em suas subdivisões anterior (VMHA), central (VMHC), ventrolateral (VMHVL) e dorsomedial (VMHDM) foram encontradas pouca evidência de neurônios FG-ir no núcleo hipotalâmico arqueado medial (Arq M), enquanto que na área hipotalâmica dorsal (DA) e células dopaminérgicas (A13) foi encontrada de moderada a alta marcação (Figuras 6 e 7).

Na área do túber cinério (TC) foram encontradas células FG-ir em toda sua extensão, em sua porção rostral ao nível do VMHA nota-se uma pequena quantidade de células, ao nível intermédio a quantidade aumenta de moderada a alta concentrando-se muito próximo ao fórnice (fx), esta marcação prossegue até se reconhecer a área perifornical (Pef), nesta altura a marcação torna-se pouca até terminar na região mamilar do hipotálamo (Figura 7).

5.2.2.3.4 Região Mamilar

Na região mamilar, encontramos uma grande quantidade de neurônios FG-ir, principalmente no núcleo hipotalâmico posterior (PH) em todo seu eixo rostro-caudal e no núcleo periventricular posterior (PVp); moderada marcação no núcleo tuberomamilar ventral (VTM), núcleo mamilar lateral (LM) e mamilar medial (MM) e pouca no núcleo mamilar medial lateral (ML) e no núcleo pré-mamilar ventral (PMV) (Figuras 7, 8, 12 C e D e 13).

5.2.2.3.5 Área Hipotalâmica Lateral

Foi encontrada moderada marcação na LHAA logo ao término do LPO na região supra-óptica onde podemos visualizar a SI lateralmente e AAV e AAD. Estas células se concentram dorsais muito próximas ao fx, porém, algumas delas se mostram difusas medialmente a SI. Ao longo da região supra-óptica do Hipotálamo esta marcação torna-se moderada e difusa em toda a LHAA e RChI, mas principalmente próximo ao fx, esta marcação permanece até a altura dos núcleos VMH e VMHVL onde se inicia a região tuberal do Hipotálamo onde encontramos a maior quantidade de células retrógradamente marcadas (Figura 6 e 12A).

Ao nível da porção tuberal Hipotalâmica, onde visualizamos os núcleos Dorsomedial (DMD) e VMH, nota-se que nesta área a concentração de neurônios FG-ir está ainda muito próximo do fx nesta altura da LHAt, podemos distinguir a PeF onde foi encontrada alta

Figura 8. Representação dos locais onde foram encontradas células retrogradamente marcadas em um eixo rostro-caudal dos casos de injeção de Fluoro-Gold no núcleo de Edinger-Westphal (D). Abreviações: vide Lista de Abreviações.

marcação, a mesma intensidade de marcação também foi encontrada em uma parte dorsal chegando até uma área limitante entre a LHAt e a ZI. Muitas células são visíveis próximas ao trato óptico em uma região ventral da LHAt, enquanto que outras passam a ser encontradas no núcleo magnocelular do hipotálamo lateral (MCLH) muito próximo a cápsula interna (IC) (Figuras 7, e 12 B).

Na região mamilar do hipotálamo, próximo ao PH na LHAp, foi encontrado de moderada a alta concentração de células FG-ir muito difusas em toda a região, muitas estão próximos do trato mamilo talâmico (mt) estando próximas das células retrógradas marcadas no PH, enquanto que outras estão localizadas em uma porção ventrolateral próximas ao PSTh, e outras muito próximas da ZI (Figuras 7, 8 e 12 C).

5.2.3 Tronco Encefálico

O tronco encefálico foi à região onde encontramos a maior quantidade de núcleos e regiões com células retrogradamente marcadas em todo SNC; descreveremos os resultados no sentido rostro-caudal.

5.2.3.1 Mesencéfalo

Iniciamos a descrição com a descrição dos neurônios encontrados na região tectal do mesencéfalo com pouca quantidade de neurônios FG-ir no núcleo pré-tectal medial (MPT) e moderada no núcleo pré-tectal olivar (OPT) e muito no núcleo pré-comissural (PrC), ainda foi encontrada pouca marcação no núcleo da comissura posterior (Pcom) (Figura 8).

Na região da substância cinzenta periaquedutal (PAG) foi encontrada marcação nas regiões: muito na lateral (LPAG) e ventrolateral (VLPAG), moderada na dorsomedial (DMPAG) e dorsolateral (DLPAG) (Figuras 8 e 9).

No complexo oculomotor, encontramos alta quantidade de células FG-ir no núcleo de Darkschewitsch (DK), núcleo do nervo oculomotor medial acessório (MA3), núcleo do nervo oculomotor parte parvicelular (3PC), núcleo intersticial do fascículo longitudinal medial (IMLF), núcleo do nervo oculomotor (3N) e no núcleo supra oculomotor (SU3) (Figuras 8 e 9).

Em algumas regiões da substância negra foram encontradas células FG-ir, em quantidade moderada na divisão reticular (SNR) e compacta dorsal (SNCD), ainda encontramos uma alta quantidade de células no lemnisco medial podemos propor que estas células dentro deste trato sejam ou da SNCD ou no núcleo rubro (RPC) (Figuras 8 e 9).

No colículo superior encontramos algumas células FG-ir, de moderada quantidade camada branca profunda (InWh) e camada cinza intermédia (InG).

Figura 9. Representação dos locais onde foram encontradas células retrogradamente marcadas em um eixo rostro-caudal dos casos de injeção de Fluoro-Gold no núcleo de Edinger-Westphal (E). Abreviações: vide Lista de Abreviações.

Na região da Rafe encontramos alta quantidade de marcação no núcleo rostral linear da rafe (Rli), moderada no núcleo dorsal da rafe parte dorsal (DRD), ventral (DRV), e ventrolateral (DRVl) (Figuras 8 e 9).

Nos núcleos do tegmento mesencefálico encontramos muita marcação no núcleo interfascicular (IF), no núcleo tegmental pedunculopontino (PPTg), núcleo mesencefálico profundo (DpMe), núcleo tegmental subpeduncular (SPTg), e área tegmental dorsomedial (DMTg), e moderada quantidade no núcleo tegmental laterodorsal (LDTg).

Ainda foi encontrada alta marcação no núcleo acessório medial terminal do trato óptico (MT), no núcleo cuneiforme (CNF) e pouco no pedúnculo cerebelar superior (scp) (Figuras 8 e 9).

5.2.3.2 Ponte e Bulbo

Iniciando a descrição dos neurônios FG-ir na ponte e no bulbo destacamos a moderada marcação no núcleo parabraquial lateral parte ventral (LPBV), externa (LPBE) e interna (LPBI), muita no núcleo parabraquial medial (MPB) e pouca na divisão medial parte externa (MPBE), medialmente ao complexo parabraquial conseguimos visualizar moderada marcação no núcleo de Barrington's (Bar), *Locus Coeruleus* (LC), e núcleo trigeminal mesencefálico (Me5), núcleo tegmental laterodorsal (LDTg) e muito no área tegmental dorsomedial (DMTg) (Figura 9).

Na rafe pontina encontramos pouca quantidade de neurônios FG-ir nos núcleos dorsal da rafe parte caudal (DRC), núcleo da rafe pontino (PnR), e núcleo obscuro da rafe (ROb).

Nos núcleos trigeminais encontramos pouca quantidade de neurônios FG-ir no núcleo trigeminal sensorial principal (Pr5VL), e no núcleo trigeminal espinal parte oral (Sp5O).

No complexo vestibular foi encontrada grande quantidade de células FG-ir em todo eixo rostro caudal desta região. Alta concentração de células no núcleo vestibular medial parte magnocelular (MVeMC), no núcleo vestibular medial parte parvocelular (MVePC), núcleo vestibular superior (SuVe) e no núcleo vestibular espinal (SpVe) e pouco no núcleo vestibulocerebelar (VeCb) (Figuras 9 e 10).

Moderada marcação no núcleo reticular pontino parte oral (PNO) e no núcleo reticular pontino parte caudal (PNC), moderada à alta em toda extensão do núcleo paragigantocelular dorsal (DPGi) e núcleo paragigantocelular lateral (LPGi), e pouca na núcleo reticular gigantocelular parte alpha (GiA) e marcações esparsas no núcleo reticular dorsal medial (MdD).

Ainda foi encontrada moderada distribuição de neurônios FG-ir no núcleo prepósito (Pr), pouco no núcleo supragenua (Sge), e moderado no núcleo do nervo facial (7N) e pouca no núcleo do nervo abducente (6N). Na porção caudal da ponte foi possível verificar uma quantidade pequena de células retrogradamente marcadas no núcleo do trato solitário, parte ventrolateral (SolVL) (Figura 10).

5.2.3.3 *Cerebelo*

Encontramos grande número de células retrogradamente marcadas em alguns núcleos cerebelares, tais como: nos núcleos cerebelar lateral parte parvocelular (Denteado) (LatPC), interpósito do cerebelo parte parvocelular (IntPPC); moderada marcação no núcleo cerebelar lateral (Denteado) (Lat) e pouca no núcleo cerebelar interposito parte anterior (IntA) (Figura 10).

5.2.3.4 *Medula espinal*

Não foram encontrados neurônios retrogradamente marcados na medula espinal em nenhum dos casos.

Alguns resultados foram resumidos e agrupados na Tabela 1

Tabela 1- Resumo da distribuição das células retrógradamente marcadas

<i>Área</i>	<i>Grau de intensidade</i>
Telencéfalo	
globo pálido medial	+++
central da amígdala	++
Diencéfalo	
paraventricular do tálamo	++
zona incerta rostral	++
zona incerta dorsal	+++
núcleo pré-óptico mediano	++
órgão vascular da lâmina terminal	+++
área hipotalâmica lateral anterior	+++
núcleo paraventricular do hipotálamo parte ventral	++
núcleo posterior do hipotálamo	+++
Tronco encefálico e Cerebelo	
núcleo do nervo troclear	+
núcleo do nervo abducente	+
substância negra reticular	++
núcleo parabraquial lateral parte ventral	++
núcleo parabraquial medial	+++
núcleo cerebelar lateral parte parvocelular	+++
núcleo interpósito do cerebelo parte parvocelular	+++

Figura 11. Regiões hipotalâmicas onde foram encontradas células retrogradamente marcadas após injeção traçador retrogrado *Fluoro-Gold* no núcleo de Edinger-Westphal (EW). Fotomicrografia em campo escuro A (LE# 12), região pré-óptica, notar a alta quantidade de células retrogradamente marcadas no MPOL e VMPO, razoável quantidade na MPA e pouco na LPO; fotomicrografia em campo claro B (LE# 17), de moderada a alta quantidade de células retrogradamente marcadas no VOLT; fotomicrografias em campo escuro em C e D (LE# 25) razoável quantidade de células retrogradamente marcadas em subdivisões do núcleo paraventricular do hipotálamo PaMP, PaPo, PaV e PaLM. Abreviações: 3V, terceiro ventrículo; fx, fórnice; ac, comissura anterior; ox, quiasma óptico; TC, tuber cinéreo; Pe, periventricular; LHAa, área hipotalâmica lateral anterior; PaMP, núcleo hipotalâmico paraventricular parte parvocelular medial; PaPo, núcleo hipotalâmico paraventricular parte parvocelular posterior; PaV, núcleo hipotalâmico paraventricular parte ventral; PaLM, núcleo hipotalâmico paraventricular parte magnocelular lateral; VOLT, órgão vascular da lâmina terminal; VMPO, núcleo pré-óptico ventromedial; MnPO, núcleo pré-óptico mediano; MPOL, núcleo pré-óptico medial parte lateral; MPA, área pré-óptica medial; LPO, área pré-óptica lateral; BSTMV, núcleo da estria terminal, divisão medial parte ventral. Barra: 500µm.

Figura 12. Regiões hipotalâmicas onde foram encontradas células retrogradamente marcadas após injeção do traçador retrogrado *Fluoro-Gold* (FG) no núcleo de Edinger-Westphal (LE# 25). Fotomicrografia em campo escuro mostrando em A-D. A e B células imuneativas ao FG (FG-ir) na LHAa e LHAt; notar que as células FG-ir estão de forma difusa e em toda extensão rostro-caudal da LHA; Em C, células FG-ir em núcleos mamilares e LHAp; Em D, células retrogradamente marcadas em núcleo pré-mamilares e região periventricular posterior. Abreviações: IC, cápsula interna; opt, trato óptico; fx, fórnice; pm, trato mamilar principal; MRe, recesso mamilar do terceiro ventrículo; LHAa, área hipotalâmica lateral anterior; LHAt, área hipotalâmica lateral tuberal; LHAp, área hipotalâmica lateral posterior; SuML, núcleo supramamilar parte lateral; MM, núcleo mamilar medial; ML, núcleo mamilar medial lateral; LM, núcleo mamilar lateral; PMD, núcleo pré-mamilar dorsal; PMV, núcleo pré-mamilar ventral; PVp, núcleo periventricular posterior; VTm, núcleo tuberomamilar ventral. Barra em ABC 500um em D 1000um.

Figura 13. (LE# 25) Núcleo hipotalâmico posterior do hipotálamo (PH) onde foram encontradas células imuneativas ao Fluoro-Gold (FG-ir) após injeção do FG no núcleo de Edinger-Westphal. Fotomicrografias em campo escuro mostrando em A e B a alta quantidade de células FG-ir nas porções média e caudal do PH. Abreviações: 3V, terceiro ventrículo; sumx, decussação supramamilar; mt, trato mamillo talâmico; fr, fascículo retroflexus. Barra 500um.

5.3 Controle Anterógrado

Escolhemos três núcleos hipotalâmicos para realização do controle anterógrado: PH (LE# 141, LE# 142 e LE# 145) (Figura 16 e 17 C), PVN (LE# 122, LE# 135 e LE# 137) (Figura 14 e 17 A) e LHA (LE# 146, LE# 147e LE# 148) (Figura 15 e 17 B). Estes locais foram escolhidos por apresentarem de moderada à alta quantidade de células retrogradamente marcadas após injeção de FG no EW.

Conseguimos delimitar o local de injeção por iontoforese de traçador anterógrado BDA. Foram utilizadas coordenadas estereotáticas baseando-se no Atlas de Coordenadas Estereotáticas (Paxinos e Watson, 2008).

Para PH:

- AP: -3,65

- ML: -0,3

- DV: -7,0

Para PVN:

- AP: -1,7

- ML: -0,6

- DV: -6.6

Para LHA:

- AP: -1,7

- ML: -1,8

- DV: -7,0

Foram utilizados ratos Long-Evans adultos, com idade máxima de 60 dias e um peso corpóreo de 250-270g, sendo que, conseguimos atingir os três locais propostos com grande êxito.

Após injeção no PH no caso LE# 142 reparamos que o sítio de injeção está nos limites do PH em sua porção caudal e ventral ao terceiro ventrículo, região esta em que encontramos uma grande quantidade de células FG-ir, o mesmo aconteceu com os casos LE# 141 e LE#

145, porem estes atingiram uma porção intermédia do HP estando lateral ao 3V. Averiguamos que

Figura 14. Esquemas dos casos utilizados como controle anterógrado em subdivisões do núcleo paraventricular do hipotálamo. Caso LE# 135, sítio de injeção no PaV; casos LE# 122 e LE# 137, sítios de injeção na porção PaMP. Abreviações: fx, fórnice; opt, trato óptico; 3V, terceiro ventrículo; VMH, núcleo ventromedial do hipotálamo; AHN, núcleo anterior do hipotálamo; ARH, núcleo arqueado; ZI, zona incerta; RChL, área retroquiasmática; PaMP, núcleo paraventricular parvocelular medial; PaPo, núcleo paraventricular posterior; PaV, núcleo paraventricular parvocelular ventral; Pe, periventricular; PaLM, núcleo paraventricular magnocelular lateral.

Figura 15. Esquemas dos casos utilizados como controle anterógrado em subdivisões da área hipotalâmica lateral (LHAa e LHAt). Caso LE# 146, sítio de injeção na LHAt em uma região lateral ao fx; casos LE# 147, sítio de injeção na LHAt em uma porção dorso-lateral ao fx e ventral a ZI; caso LE# 148, sítio de injeção na LHAa ventral a ZI. Abreviações: fx, fórnice; opt, trato óptico; 3V, terceiro ventrículo; LHAa, área hipotalâmica lateral anterior; LHAt, área hipotalâmica lateral tuberal; VMH, núcleo ventromedial do hipotálamo; DMH, núcleo dorsomedial; AHN, núcleo anterior do hipotálamo; ZI, zona incerta; PVH, núcleo paraventricular do hipotálamo.

Figura 16. Esquemas dos casos utilizados como controle anterógrado em subdivisões do núcleo hipotalâmico posterior (PH). Caso LE# 141 e 145, sítio de injeção no PH em sua porção rostral, lateral ao 3V e medial ao mt; caso LE# 142, sítio de injeção no PH em sua região caudal em uma porção ventrolateral ao 3V e dorsal ao smd. Abreviações: 3V, terceiro ventrículo; fr, fascículo retroflexus; fx, fórnice; smd decussação supramamilar; mt, trato mamillo talâmico; LHAp, área hipotalâmica lateral posterior; ZI, zona incerta; PMV, núcleo pré-mamilar ventral; VTA, área tegmental ventral; , PAG, substância cinzenta periaquedutal.

Figura 17. Regiões hipotalâmicas onde foram realizados controle anterógrado com injeção de Amina Dextrana Biotinilada. Fotomicrografias em campo claro mostrando em A (LE# 135), sítio de injeção no PaV; em B (LE# 148) sítio de injeção na LHAa; em C (LE# 142), sítio de injeção no PH. Abreviações: 3V, terceiro ventrículo; MRe, recesso mamilar do terceiro ventrículo; fx, fórnice; opt, trato óptico; IC, cápsula interna; fr, fascículo rétroflexus; PH, núcleo hipotalâmico posterior; LHAa, área hipotalâmica lateral anterior; PaV, núcleo paraventricular do hipotálamo parte parvocelular ventral; PaMP, núcleo paraventricular do hipotálamo parte parvocelular medial; PaLM, núcleo paraventricular do hipotálamo parte magnocelular lateral; RChL, área retroquiasmática. Barra 1000 um.

nos três casos apresentados, muitas fibras partem do local de injeção em direção a PAGVL, estas fibras trafegam até chegarem à região mediana e ventral da PAG, ao chegar neste ponto às fibras curvam-se em sentido ventral chegando até as células do EW.

Foi realizada uma dupla marcação fluorescente (vide material e métodos) para se determinar se estas fibras, do caso LE# 142 estariam chegando até células UCN-1ir, o que podemos comprovar por meio dos resultados é que possíveis terminais de BDA (verdes) oriundos do PH são vistos ao redor de células UCN-1 (vermelhas) mostrando um provável contato entre fibras e células (Figura 20).

Nos casos de injeção no PVH podemos comprovar que nos casos LE# 122 e LE# 137 os sítios de injeção atingiram uma região caudal do PVH na porção PaMP, o que nos mostrou uma moderada quantidade de fibras na região do EW, enquanto que no caso LE# 135 a injeção atingiu a porção ventral parvocelular (PaV) sendo um dos casos mais significativos, uma vez que encontramos em nossos resultados uma quantidade moderada de células FG-ir nesta região. Utilizamos este caso (LE# 135) para uma dupla fluorescência (BDA+UCN-1) o resultado deste experimento pode ser visualizado na figura 18 notar que existem possíveis terminais de BDA (verdes) ao redor de células UCN-1ir (vermelhas).

O mesmo resultado pode ser comprovado após a injeção de BDA na LHAA (LE# 146) e LHAt (LE# 147 e LE# 148), notamos que muitas fibras trafegam em direção ao mesencéfalo e que as mesmas entram na região mediana do mesencéfalo tanto pela PAGVL quanto pelo tegmento mesencefálico. Muitas destas fibras vão ao encontro do complexo oculomotor. Utilizamos o caso LE# 148 para uma dupla marcação fluorescente onde podemos visualizar na figura 19 que as fibras BDA (verdes) fazem possível contato com células UCN-1ir (vermelhas).

Figura 18. Resultado do controle anterógrado após injeção de Amina Dextrana Biotinilada no núcleo paraventricular do hipotálamo (LE# 135) nas células urocortinérgicas (UCN-1ir) do núcleo de Edinger-Westphal (EW). De A-D, fotomicrografias em confocal; em A sob filtro para fluoróforo Cy3 (vermelho) demonstrando células UCN-1ir conforme apontado pelas setas; Em B, fotomicrografias em confocal sob filtro para fluoróforo Cy2 (verde) demonstrando fibras imunorreativas ao BDA conforme apontado pelas cabeças de setas; Em C, sobreposição das figuras A e B, nota-se fibras e possíveis terminais BDA ao redor de células UCN-1ir no EW; Em D, menor aumento da figura C. Abreviações: MA3, núcleo medial acessório do núcleo oculomotor; DK, núcleo de Darkschewitsch. Barra em ABC 400um e em D 200um.

Figura 19. Resultado do controle anterógrado após injeção de Amina Dextrana Biotinilada (BDA) na área hipotalâmica lateral anterior (LE# 148) nas células urocortinérgicas (UCN-1ir) do núcleo de Edinger-Westphal (EW). Em A, fotomicrografias em confocal sob filtro para fluoróforo Cy3 (vermelho) demonstrando fibras imunorreativas BDA conforme apontado pelas cabeças de setas; Em B, fotomicrografias em confocal sob filtro para fluoróforo Cy2 (verde) demonstrando células UCN-1ir conforme apontado pelas setas; Em C, sobreposição das figuras A e B, nota-se fibras e possíveis terminais BDA ao redor de células UCN-1ir no EW; Em D, menor aumento da figura C. Abreviações: MA3, núcleo medial acessório do núcleo oculomotor; DK, núcleo de Darkschewitsch. Barra em ABC 400um e em D 200um.

Figura 20. Resultado do controle anterógrado após injeção de Amina Dextrana Biotinilada no núcleo posterior do hipotálamo (LE# 142) nas células urocortinérgicas (UCN-1ir) do núcleo de Edinger-Westphal (EW). Em A, fotomicrografia em confocal sob filtro para fluoróforo Cy3 (vermelho) demonstrando células UCN-1ir conforme apontado pelas setas; Em B, fotomicrografias em confocal sob filtro para fluoróforo Cy2 (verde) demonstrando fibras imunorreativas ao BDA conforme apontado pelas cabeças de setas; Em C, sobreposição das figuras A e B, nota-se fibras e possíveis terminais BDA ao redor de células UCN-1ir no EW; Em D, menor aumento da figura C. Abreviações: MA3, núcleo medial acessório do núcleo oculomotor; DK, núcleo de Darkschewitsch. Barra em ABC 400um e em D 200um.

6.1 Considerações Metodológicas

A técnica de Nissl, que utilizamos para o estudo citoarquitetônico do EW, é uma técnica de rotina dentro da neurociência e uma forma de evidenciar células e tratos permitindo analisar a citoarquitetura de regiões no SNC. Em nosso laboratório, temos utilizado 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 e Cook, 1996; Loewy, 1996). Após serem coradas, estas estruturas proporcionam boa visualização dos corpos celulares sob microscopia óptica. Entretanto, essa técnica não é adequada para a diferenciação desse grupamento celular em particular, uma vez que somente percebemos o EW quando este está formado por duas colunas paralelas de células de tamanho médio e de maior eixo vertical. Nesse nível o EW aparece evidente, entretanto, as células que pertencem a esse grupamento estendem-se, tanto mais rostral como mais caudal, as colunas paralelas de neurônios são usadas como ponto de referência. Algo que auxilia a verificação de todas as partes do EW no eixo rostral-caudal é a imunoistoquímica para UCN-1, nota-se na figura 2 que o EW é o único núcleo da região que contém imunoreatividade para UCN-1, deixando evidente toda sua extensão.

6.1.1 Considerações sobre o traçador neuronal retrógrado *Fluoro-Gold*

Para estudo das aferências do EW, utilizamos injeção de FG. Nos anos 70, os métodos neuroanatômicos usando traçadores neuronais substituíram as técnicas histoquímicas de detecção de degeneração axonal (Köbber et al., 2000).

O FG foi introduzido em 1986, por Schumed e Fallon, que descreveram as principais propriedades deste traçador neuronal, sendo elas: (1) intensa autofluorescência, (2) extenso carregamento por dendritos, (3) alta resistência de sua fluorescência, (4) baixa captação por fibras de passagem intactas, (5) não gera marcação inespecífica, (6) encontrado comercialmente na forma consistente e pura, (7) tem alta permanência de marcação por longos períodos de experimento e (8) compatibilidade com outras técnicas imunoistoquímicas.

O transporte do FG ocorre a partir do telodendro ou fibras de passagem lesionadas pela injeção e percorre todo axônio até chegar ao corpo celular. Apresenta sensibilidade e velocidade de transporte semelhante a outros traçadores como o FB (Bittencourt e Elias, 2007).

O FG é composto de inúmeros componentes que facilitam sua visualização e seu transporte, entre estes, um antibiótico – o Hidroxistilbamidine (OHSA) – que é considerado o componente principal deste traçador. O OHSA, assim como outros traçadores, são “bases” e se acumulam em lisossomos que preenchem o citoplasma e os dendritos, proporcionando uma marcação em grânulos, deixando limpo o núcleo dos neurônios. O transporte para dentro da célula pode ser facilitado ou ocorrer por endocitose nas fibras lesadas pelo sítio de injeção, inclusive fibras de passagem (Dado et al., 1990). Especula-se, ainda, que o FG talvez não seja captado por fibras de passagem intactas visto à baixa afinidade do OHSA por fibras mielinizadas (Wessendorf, 1991).

Em estudos comparativos sobre diferentes traçadores retrógrados, como FB, FG, *Fluoro-Ruby* e *Fluoro-Emerald* em injeções periféricas demonstraram-se diferenças significantes em neurônios marcados retrogradamente por esses traçadores. Entre esses resultados, destacamos que o FG apresentou grande marcação no núcleo do nervo facial (7N) dois dias após injeção do mesmo no nervo facial (7n), porém, oito semanas após a injeção, o FG não produz uma fluorescência satisfatória mostrando a eficácia deste traçador em produzir resultados rápidos e sua dificuldade em sustentar sua fluorescência por longo tempo (Choi e Raisman, 2002; Novikova et al., 1997).

Ainda mais, além de ser visualizado por sua autofluorescência de aspecto dourado sob filtro de luz ultravioleta (banda de 340 a 380 nm), destacamos que alguns fatores podem alterar a fluorescência deste traçador, como o pH tecidual, ou a temperatura ambiente (Bittencourt e Elias, 2007). O FG pode ser visualizado por microscopia de campo claro e isso só é possível devido ao desenvolvimento de anticorpo contra FG, o qual foi utilizado neste estudo.

A injeção de FG pode ocorrer de duas formas: por pressão ou iontoforese. Por pressão, o sítio de injeção apresenta uma pequena zona necrótica e adjacente a esta é encontrado um pequeno halo ao redor bem circundante ao primeiro, que exibe uma brilhante fluorescência, e ao redor destas duas zonas limitadas é encontrada uma zona maior com muitas células marcadas (Schumed e Fallon, 1986). Por iontoforese, que está sendo utilizado neste estudo, o sítio de injeção pode ser alterado por dois fatores: o primeiro se refere ao tempo de injeção, enquanto que o segundo, ao grau de intensidade da voltagem utilizada. Ao exame por microscopia com luz ultra violeta do local de injeção, mostra-se uma pequena esfera, com intensa luz fluorescente, sendo o sítio da injeção muito pequeno e circundado por um halo brilhante marcando neurônios e alguma glia (Schumed e Heimer, 1989). No mesmo trabalho, os autores utilizam de várias voltagens e tempo de injeção diferenciada para demonstrar a

capacidade do FG de ser injetado por iontoforese. Apesar do mesmo proporcionar um halo, os autores reconhecem que apenas o sítio de injeção, ou apenas o local onde houve depósito do traçador, é capaz de ser captado, sendo que o halo não tem a capacidade de ser absorvido por fibras de passagem, apesar de se difundir para células ao redor.

Neste trabalho apesar de considerarmos que todos os sítios de injeção de FG para estudo das aferências que estavam localizados no EW não podem deixar de destacar que sítios vizinhos como o MA3 e 3N, poderiam ter sido contaminados pelo halo produzido pelo FG, porém, lembramos, conforme descrito nos resultados, não existe marcação retrógrada em outros núcleos que participam de função motora extraocular (6N ou 4N) em injeções no EW, ou se existe, é muito pequena demonstrando que a contaminação de áreas vizinhas pode ter sido pequena. Desta forma, deixamos claro que a escolha e a utilização do traçador neuronal retrógrado FG foi de grande importância para este estudo devido à sua eficácia em apresentar uma boa marcação retrógrada.

6.2 Considerações Neuroanatômicas

Para estes resultados utilizamos seis casos que tiveram a injeção de FG no EW. Uma vez que o EW é uma estrutura extensa no seu eixo rostro-caudal, seria interessante observar se existem diferenças entre as projeções de um animal que teve as porções mais rostrais, intermédias e caudais do EW atingidas por traçador. A visualização das três partes, respectivamente, rostral, intermédia e caudal é bem evidente em trabalhos que demonstraram a distribuição de células UCN-1-ir e/ou hibridização *in situ* em cortes parassagitais (Bittencourt et al., 1999). A citoarquitetura, os tipos celulares e a neuroquímica (por exemplo: a UCN1 e o CART), também são evidências que suportam a idéia de três partes diferentes do EW (Bittencourt et al., 1999; Kozicz et al., 1998; Koylu et al., 1998).

O peptídeo CART foi descrito em 1995 por um grupo de pesquisadores que procuravam a indução de novos genes provocados pelo consumo de estimulantes como anfetamina e cocaína (Douglass et al., 1995). Depois de isolado, seqüenciado e clonado, os pesquisadores descreveram por meio de técnicas de imunoistoquímica e hibridização *in situ*, sua distribuição no SNC (Couceyro et al., 1997; Koylu et al., 1997). Várias destas regiões que apresentaram o CART, em especial, núcleos hipotalâmicos, estão relacionadas ao controle autonômico, neuroendócrino e do comportamento alimentar (Elias et al., 1998; Elias et al., 1999). Um estudo mais amplo demonstrou a ocorrência deste neuropeptídeo em outras regiões

do SNC, como o Núcleo Paraventricular do Hipotálamo, Área Hipotalâmica Lateral e Núcleo Arqueado, dentre outros (Koylu et al, 1997), sendo que uma das áreas que apresenta grande quantidade de neurônios imunorreativos e que expressam o mRNA para CART é o EW (Couceyro et al., 1997).

Em relação aos corpos celulares de neurônios UCN-1-ir, nossos resultados confirmam dados já publicados (Bittencourt et al., 1999; Kozics et al., 1998) que demonstram o EW como o principal sítio de localização de UCN-1. No entanto, existe controvérsia em alguns trabalhos recentes de nosso laboratório quando comparados com estudos passados, principalmente quando nos referimos à distribuição das fibras UCN-1 no encéfalo de ratos. Dos Santos Junior (2005) chama a atenção por utilizar modelo experimental diferente do usado por Bittencourt et al. (1999). Embora ambos os experimentos tenham sido feitos em roedores, foram observadas diferenças na distribuição de fibras UCN-1 de ratos Long-Evans e ratos Sprague-Dawley como, por exemplo, segundo o autor ratos pigmentados apresentam maior densidade de fibras imunorreativas a UCN-1 no núcleo intersticial da estria terminal, do que quando comparados com os Sprague-Dawley e ainda, ratos albinos possuem moderada quantidade de fibras imunorreativas a UCN-1 e ratos pigmentados pouca quantidade em núcleos medianos do tálamo (dos Santos Junior, 2005).

Em nosso estudo estamos utilizando o mesmo modelo experimental utilizado por dos Santos Junior (2005), cuja principal razão é a pigmentação retiniana e melhor acuidade visual desses animais (Prusky et al., 2002). Por estarmos estudando um núcleo relacionado ao sistema visual, optamos por essa linhagem.

Em nossa revisão da literatura não encontramos até o momento nenhum trabalho relacionado às aferências hipotalâmicas descritas de maneira sistemática para o EW. Pudemos observar células FG-ir difusas em quase todo sistema nervoso, desde o prosencéfalo até a porção final do tronco encefálico, e não visualizamos, até o momento, nenhuma marcação retrógrada na medula espinal. É descrito que o EW envia projeções para a medula espinal em algumas espécies animais (Burde et al., 1982; Chung et al., 1987; Maciewicz et al., 1983), mas a vi em direção oposta (ME-EW) parece não existir de forma direta.

Sendo nosso principal objetivo, mapear as regiões hipotalâmicas aferentes ao EW, notamos que esta região apresentou de razoável à muita marcação retrógrada em muitos núcleos. Sendo a UCN-1 um peptídeo da família do CRF (neuropeptídeo liberado principalmente por neurônios do PVH) e que atua, entre outras funções, na liberação do hormônio ACTH pela hipófise anterior, participando da regulação do eixo HPA seria

interessante investigar a comunicação entre o EW e regiões hipotalâmicas. Criamos essa suposição baseados em alguns trabalhos que sugerem o envolvimento da UCN-1, na adaptação ao estresse junto com o CRF. Esta intrigante hipótese foi primeiramente sugerida pelos grupos de Majzoub et al. (2000), e Kozicz et al. (2001) que demonstraram que estímulos estressores agudos aumentavam a expressão do RNAm para UCN-1 no EW.

Esta observação inicial motivou muitos outros estudos a explorar a significância biológica dos neurônios urocortinérgicos do EW na resposta e adaptação ao estresse e conseqüentemente em doenças induzidas pelo estresse. Para este efeito é preciso ficar claro que a ativação de neurônios urocortinérgicos depende do tipo de estresse, como por exemplo, muito especificamente um estresse de natureza interoceptiva (Li et al., 1996, Li e Sawchenko, 1998), como uma hemorragia ou hiperosmolaridade não aumentam a expressão de RNAm UCN- 1 no EW, enquanto que um estresse exteroceptivo (Li et al., 1996, Li e Sawchenko, 1998), como a inalação de éter ou forte dor aguda, ativa neurônios urocortinérgicos no EW (Gászner et al., 2004; Cespedes et al., 2010 prelo).

O dinamismo de ativação do eixo HPA e neurônios urocortinérgicos são diferentes. Especificamente, estresse crônico resulta em alta da atividade do eixo HPA, e resultando em uma alta regulação deste sistema (Viau e Sawchenko., 2002; Cespedes et al., 2010 prelo), em contrapartida, neurônios urocortinérgicos, exibem uma baixa atividade em resposta a vários paradigmas de estresse crônico, resultando em uma baixa regulação do sistema urocortinérgico (Korosi et al., 2005; Kozics et al., 2010 prelo). Isso confirma a significância dos neurônios urocortinérgicos na adaptação ao estresse, sendo que o estresse exteroceptivo resulta em ativação crônica do eixo HPA, promovendo uma considerável diferença no número de neurônios urocortinérgicos no EW e CRF no PVH (Kozicz et al., 2008; kozicz et al., 2010 prelo).

Neurônios urocortinérgicos e o sistema HPA possuem um sistema dinâmico e parece que, complementar servindo para a adaptação adequada do SNC na resposta ao estresse, como vimos nos parágrafos precedentes. Enquanto que em um estresse agudo existe alta ativação de UCN-1 no EW existe uma queda da ativação de neurônios CRF, quando o estímulo passa a ser crônico, aumenta-se a ativação de neurônios CRF e uma diminuição da ativação de neurônios urocortinérgicos no EW; portanto isso nos leva a concluir que a comunicação entre esses dois sistemas é necessário para que esse dinamismo possa ocorrer. Dessa maneira, como mostrado em nossos resultados, as regiões hipotalâmicas relacionadas com a adaptação ao estresse como o PVH e suas subdivisões apresentaram moderada quantidade de células FG-ir que estão se

projetando para células UCN-1 no EW, mostrando que o papel funcional que tem sido atribuído aos neurônios urocortinérgicos no EW possui um fundamento neuroanatômico (Geerling et al, 2010; Viau e Sawchenko., 2002; Gaszner et al., 2004; Kozicz et al., 2008)

Dentre todas as regiões hipotalâmicas, observamos de razoável a grande quantidade de neurônios FG-ir na LHA em toda sua extensão rostro-caudal. Descrevemos as células retrogradamente marcadas encontradas na LHA seguindo-se o parcelamento dessa área encontrado no Atlas *Structure of the Rat Brain* (Swanson et al., 1992) e o que foi proposto por Saper et al. (1979). Swanson et al. (2005) e Hahn et al. (2009) vêm propondo que a LHA seja parcelada de forma diferente da que até então vínhamos considerando como LHA, ou seja, eles consideram, baseados na distribuição de células imunorreativas ao MCH e a ORX, que a LHA seja também considerada medialmente ao fórnice (Swanson et al., 2005; Hahn et al., 2009), porém consideramos que o reconhecimento das subdivisões propostas pelos autores ainda é precoce uma vez que não possuímos os seus respectivos territórios de projeção, fundamentais para se estabelecer o parcelamento destas regiões no SNC de roedores.

A conexão da LHA com o EW foi comprovada pelas nossas injeções de traçador anterógrado, que indicaram um possível contato entre as fibras BDA da LHA com células UCN-1ir, e corroboram com outros estudos do nosso laboratório como o de dos Santos Junior (2005), que comprovaram que a LHA recebe projeções do EW, e ainda mostrou que esta conexão acontece em células imunorreativas ao MCH. Com base nessas informações e em nossos resultados podemos sugerir que esta comunicação possivelmente está envolvida com o comportamento alimentar uma vez que a UCN-1 injetada intracerebroventricular diminui o apetite (Spina et al., 1996; Hillebrabd et al., 2002).

Ainda sobre isso, ressaltamos que o hipotálamo possui vários outros núcleos que estão envolvidos no comportamento alimentar, dentre eles o Arc, o PVH, e o VMH, e muitos neuropeptídeos estão envolvidos neste comportamento, e entre esses destacamos a NEF-1, peptídeo envolvido no controle da saciedade e ricamente metabolizado no hipotálamo. Segundo Brailoiu et al. (2001), a NEF-1 é distribuída em todo neuroeixo, inclusive no EW. Os autores mostram ainda co-localização da NEF-1 com outros neuropeptídeos como CART, NPY e MCH no hipotálamo e ChAt no EW, porém, desta última, o autor não mostra nenhuma foto que comprove esta co-localização. Em nossos experimentos pudemos observar que, além da moderada quantidade de neurônios na LHA, e no PVH também encontramos de pequena a moderada quantidade de neurônios no núcleo arqueado em sua porção lateral, sendo possível visualizar estes resultados em todos os casos estudados.

Os órgãos circuventriculares são as únicas estruturas encefálicas que não possuem barreira hemato-encefálica, são altamente vascularizadas e posicionadas estrategicamente na linha mediana do cérebro, tendo suas bordas em íntima relação com o sistema ventricular, sendo eles: VOLT, SFO, eminência mediana, neuro-hipófise, gl. Pineal, órgão sub-comissural, área postrema (Miselis et al., 1979, 1981; Camacho e Philips., 1981; Duvernoy e Risold., 2007). Tem sido atribuída aos órgãos circuventriculares, principalmente ao VOLT e SFO a função de manter equilíbrio do balanço hidro-eletrolítico uma vez que neles temos a presença de osmoreceptores em suas células que por sua vez enviam estas informações para regiões hipotalâmicas como os núcleos pré-ópticos e PVH promovendo contato com células vasopresinérgicas e oxitocinérgicas (Miselis, 1981). Estudos realizados com respeito às projeções destas duas regiões como o de Miselis et al. (1979, 1981) que mapearam as projeções do SFO e Camacho e Philips (1981) que mapearam as aferências e eferências do VOLT não descrevem nenhuma aferência ou projeção para a região do tronco encefálico. O que nos chamou atenção, uma vez que em nossos resultados, encontramos moderada concentração de células FG-ir no VOLT e pouca no SFO. Baseados nesses dados podemos sugerir um possível papel funcional das células UCN-1 do EW no controle hidroelétrico, e também na literatura que nos mostra que funcionalmente a UCN-1 possui um papel no equilíbrio do consumo de água, uma vez que injetada i.c.v provoca aumento do apetite ao sódio (Spina et al., 1996) e inibição da vasopressina em animais submetidos a hiperosmolaridade (Kakiya et al., 1998), porém, essa sugestão poderia ser comprovada anatomicamente se houvesse um estudo que reavaliasse as projeções do VOLT e SFO, em especial para células UCN-1 no EW.

Muitas áreas hipotalâmicas são conhecidas por suas funções integrativas e entre elas o PH, que é conhecida como a zona hipotalâmica com população de células mais caudais e mediais; estudos com estimulação elétrica e química e de eletrofisiologia, sugerem que o PH está envolvido no ciclo sono-vigília, regulação cardiovascular e ainda comportamento agressivo-defensivo (Buccafusco e Brezenoff, 1979; Martin et al., 1989; Sakai et al., 1990; Bland et al., 1995; Abrahanson e Moore, 2001). Em estudos com traçadores retrógrados (FG e traçador viral) e imunoistoquímicos (Abrahanson e Moore, 2001) foi evidenciado como regiões aferentes do PH: sistema límbico, outros núcleos hipotalâmicos, subtálamo, mesencéfalo, ponte e medula espinal. Sua neuroquímica também é definida por alguns tipos de neuropeptídeos e/ou neurotransmissores: glutamato, MCH, orexina, tirosina hidroxilase, ácido gama aminobutírico, NPY, encefalina, serotonina e dopamina. Outro estudo, como o de Vertes et al. (1995), mostra as projeções ascendentes do PH após injeção de PHA-L. O mesmo se projeta

pelo feixe prosencefálico medial (mfb) para muitas regiões/núcleos diencefálicos, núcleos amigdalóides, área septal e regiões relacionadas ao sistema límbico. Outros autores (Buccafusco e Brezenoff, 1979; Martin et al., 1989; Sakai et al., 1990; Bland et al., 1995) ainda discutem o papel deste núcleo (PH) como um importante centro integrador envolvido em respostas cardiovasculares e respiratórias frente a um comportamento motivado e de memória devido as suas conexões com o sistema límbico e ainda como participante do comportamento alimentar. O que ainda nos traz dúvida nestes trabalhos é que os autores também mapearam as projeções para o mesencéfalo rostral e não mostraram nenhum resultado para áreas próximas ao complexo oculomotor ou mesmo para o EW. Como notamos nenhum estudo comprovou a comunicação do HP com células do EW ou mesmo do complexo oculomotor, porém, nossos resultados chamam atenção, pois mostram uma grande quantidade de marcação retrógrada nessa região em todos os casos estudados e as comprovações em nossos controles deixam claro que células do PH de fato se projetam para células UCN-1 no EW indicando um possível contato sináptico.

Apesar de o nosso objetivo ter sido o mapeamento das regiões ou núcleos hipotalâmicos aferentes às células urocortinérgicas do EW, não poderíamos deixar de examinar e/ou descrever as outras regiões aferentes, também motivados pela necessidade de comparação com a literatura e, estudo dos casos controle.

Em nossos resultados encontramos células FG-ir em camadas corticais como as camadas 4 e 5, ou a camada de células piramidais nos córtex M1 e M2, em todos os casos de injeção positiva para EW. Portanto, sugerimos uma possível comunicação destas áreas com o EW devido ao fato destas regiões (M1 e M2) estarem envolvidas no controle motor ocular (Paxinos et al., 2009).

O que ainda nos intriga é o fato de células FG-ir, em quantidade moderada, nas regiões do córtex insular como AIV e AID, e do sistema límbico como Cg1, PrL e IL. Sobre estes dois últimos, nossos dados corroboram com o trabalho de Vertes e colaboradores (2005) que descreveram as projeções do PrL e IL. Apesar de não ter citado o EW como sítio eferente o autor demonstra em suas figuras fibras ou possíveis terminais chegando no EW.

Sobre as células FG-ir encontradas no complexo amigdalóide AA, EAM, EAC, CeC, CeM, até o momento não encontramos na literatura dados que corroborem com esses resultados. Podemos, então, sugerir que as células UCN-1 do EW estariam participando de vias sensoriais recebendo aferências corticais e transmitindo esta informação para outras regiões encefálicas.

Sobre os resultados encontrados no tronco encefálico, destacamos que os mesmos se mostram similares aos estudos já realizados, como o de Breen et al. (1983), que fizeram injeção de traçador retrógrado FB no EW e no 3N de gatos. Neste trabalho, os autores mapearam apenas as aferências do tronco encefálico e encontraram pequenas diferenças no que diz respeito às marcações retrógradas entre EW e 3N, sendo que a única diferença relatada foi a existência de marcação retrógrada no núcleo olivar pré-tectal somente nos casos para EW. Em nosso estudo, apesar de mostrarmos regiões que se assemelham entre os resultados encontrados para EW como o 3N, lembramos a grande diferença existente entre eles e, sugerimos que a justificativa para isto é o uso de um traçador retrógrado moderno com pouco poder de lesão e captação por fibras de passagem, diferente do que foi utilizado por Breen e colaboradores (1983). Outro trabalho que confirma a possível comunicação de regiões do tronco encefálico, especificamente da região pré-tectal para o EW foi o de Canteras e Goto (1999) que descreveram as aferências e eferências do PrC, apesar de não descrever os autores mostram em seus esquemas que fibras oriundas do PrC chegam no EW.

Outro resultado que nos chama atenção é o fato de que, em todos os casos de injeção retrógrada, foi possível perceber a presença de marcação grande e densa em alguns núcleos cerebelares, sendo esta localizada em toda extensão rostrocaudal. Em um trabalho não muito recente, Bissoret-Delmas et al. (1998) mostraram por meio de injeção de traçador anterógrado BDA no núcleo interpósito do cerebelo, a existência de comunicação deste núcleo com regiões do tronco encefálico; entre estas, os autores destacam o INC, DK, PAG, 3N, complexo vestibular, olivar inferior e poucas fibras no EW. Os autores ainda descrevem que fizeram controle retrógrado nestas regiões, porém, sem mostrar fotos dos locais de injeção. Neste trabalho é discutido, a partir destes resultados, a participação do interpósito no reflexo vestibulocular vertical e controle da postura da cabeça e pescoço.

Em outro trabalho utilizando traçador retrógrado WGA-HRP em núcleos e camadas do córtex cerebelar (Rost e Dietrichs, 1988) foi evidenciado que, em gatos, o EW envia densa inervação para os núcleos interpósito, fastigial e denteado, para regiões corticais cerebelares como flóculo, paraflóculo, nódulo, lobo anterior e lobo posterior; porém, o que não fica bem claro neste trabalho e os autores não explicam qual a verdadeira função destas conexões e apenas discutem o fato de que o cerebelo influencia o movimento dos olhos e controle parassimpático de acomodação e constrição da pupila nesta espécie de mamífero.

Considerando aqui todos os nossos dados de aferências hipotalâmicas podemos sugerir um possível envolvimento das células urocortinérgicas do EW com o controle de funções autonômicas e neuroendócrinas.

Com base em nossos resultados e comparados com nossos objetivos, podemos concluir que:

- 1- O núcleo paraventricular do hipotálamo se projeta para células urocortinérgicas no EW;
- 2- A área hipotalâmica lateral em suas subdivisões anterior e tuberal se projetam para células urocortinérgicas no EW;
- 3- O núcleo hipotalâmico posterior se projeta para células urocortinérgicas no EW;
- 4- Outros resultados foram encontrados como células FG-ir em regiões corticais, núcleos do tronco encefálico e cerebelo, a literatura comprovou que alguns desses resultados de fato são aferências do EW mesmo não mencionando as células urocortinérgicas, enquanto que outras regiões necessitam de comprovação.

Abrahamson EE, Moore RY. The posterior hypothalamic area: chemoarchitecture and afferent connections. *Brain Res.* 2001 Jan 19;889(1-2):1-22.

Akert K, Glicksman MA, Lang W, Grob P, Huber A. The Edinger-Westphal nucleus in the monkey. A retrograde tracer study. *Brain Res.* 1980;184:491-498.

Allemandi W. Organização dos neurônios serotoninérgicos nos núcleos do rafe: estudo comparado em *Rattus norvegicus* linhagens Wistar e Long-Evans. [dissertação (Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2004.

Andrews JS, Jansen JH, Linders S, Princen A, Broekkamp CL. Performance of four different rat strains in the autoshaping, two-object discrimination, and swim maze tests of learning and memory. *Physiol Behav.* 1995;57(4):785-90.

Armstrong DM, Saper CB, Levey AI, Wainer BH, Terry RD. Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.* 1983;216:53-68.

Balaban CD. Vestibular nucleus projections to the Edinger-Westphal and anteromedian nuclei of rabbits. *Brain Res.* 2003;963:121-131.

Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: Role in Stress Responsivity and Other Behaviors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004;44:525-557.

Bale TL. Stress sensitivity and the development of affective disorders. *Hormones Behav.* 2006;50:529-533.

Benjamin JW. The nucleus of the oculomotor nerve1. *J. Nerv. Ment Dis.* 1939;39:294-310.

Benoit SC, Thiele TE, Heinrichs SC, Rushing PA, Blake KA, Steeley RJ. Comparison of central administration of corticotropin-releasing hormone and urocortin on food intake, conditioned taste aversion, and c-Fos expression. *Peptides.* 2000;21:345-51.

Bittencourt JC, Elias CF. Traçadores neuronais retrógrados. In: Bittencourt JC, Elias CF. Métodos em neurociências. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 6. p. 124-125.

Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin expression in a rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol.* 1999;415:285-312.

Bland BH, Konopacki J, Kirk IJ, Oddie SD, Dickson CT. Discharge patterns of hippocampus theta-related cells in the caudal diencephalon of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol.* 1995 Jul;74(1):322-33.

Buccafusco JJ, Brezenoff HE. Pharmacological study of a cholinergic mechanism within the rat posterior hypothalamic nucleus which mediates a hypertensive response. *Brain Res.* 1979 Apr 13;165(2):295-310.

Buisseret-Delmas C, Angaut P, Compoin C, Diagne M, Buisseret P. Braistern efferents from the interface between the nucleus medialis and the nucleus interpositus in the rat. *J Comp Neurol.* 1998;402:264-275.

Burd RM, Williams F. Parasympathetic nuclei. *Brain Res* 1989; 498, 371-375. Direct parasympathetic pathway to the eye: revisited. *Brain Res.* 1988;463:158-62.

Burde RM, Parelman JJ, Luskin M. Lack of unity of Edinger-Westphal nucleus projections to the ciliary ganglion and spinal cord: a double-labeling approach. *Brain Res.* 1982 14;249(2):379-82.

Bradbury MJ, McBurnie MI, Denton DA, Lee KF, Vale WW. Modulation of urocortin-induced hypophagia and weight loss by corticotropin-releasing factor receptor 1 deficiency in mice. *Endocrinology.* 2000;141(8):2715-24.

Brailoiu CG, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Nefastin-1: distribution and interaction with G protein-coupled in the rat brain. *Endocrinology.* 2007;148(10):5088-5094.

Brawner JT, Thompson A. Urocortin Expression in Mouse Cochlear Nucleus and Scarpa's Ganglion. *The Laryngoscope* 2008;118:1637-1644.

Breen LA, Burde RM, Loewy AD. Brainstem connections to the Edinger-Westphal nucleus of the cat: a retrograde tracer study. *Brain. Res.* 1983;261:303-306.

Camacho A, Phillips MI. Horseradish peroxidase study in rat of the neural connections of the organum vasculosum of the lamina terminalis. *Neurosci Lett.* 1981 Sep 25;25(3):201-4.

Canteras NS, Goto M. Connections of the Precommissural Nucleus. *The Journal of Comp. Neurol.* 1999;408:23-45.

Chang HT, Kuo H, Whittaker JA, Cooper NG. Light and electron microscopic analysis of projection neurons retrogradely labeled with Fluoro-Gold: notes on the application of antibodies to Fluoro-Gold. 1990 *J Neurosci Methods*;35(1):31-7.

Céspedes IC, Oliveira AR, Silva JM, da Silva AV, Sita LV, Bittencourt, JC. mRNA Expression of Corticotropin-Releasing Factor and Urocortin 1 after Restraint and Foot Shock Together with Alprazolam Administration. 2010; *Peptides* (submitted).

Choi D, Raisman Li G. Fluorescent retrograde neuronal tracer that label the rat facial nucleus: a comparison of Fast-Blue, Fluoro-Ruby, Fluoro-Emerald, Fluoro-Gol and Dil. *J Neurosci Methods*. 2002;117:167-172.

Chung RY, Mason P, Strassman A, Maciewicz R. Edinger-Westphal nucleus: cells that project to spinal cord contain corticotrophin-releasing factor. *Neuroscience Letters.* 1987;83:13-19.

Couceyro PR; Koylu EO; Kuhar MJ. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat.* 1997;12(4):229-41.

Cone RD. Editorial: the corticotropin-releasing hormone system and feeding behavior - a complex web begins to unravel. *Endocrinology.* 2000;141(8):2713-4.

Crouch RL. The efferent fibers of the Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol.* 1936;64:365-373.

Dado RJ, Burstein R, Cliffer KD, Giesle Jr GJ. Evidence that Fluoro-Gold can be transported avidly through fibers of passage. *Brain Research*; 1990;533:329-333.

de Lacalle S, Hersch LB, Saper CB. Cholinergic Inervation of the human cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 1993;328:364-76.

dos Santos Junior ED. Caracterização neuroquímica e estudo das eferências do núcleo acessório do oculomotor [Dissertação(Ciências morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo;2005.

Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci.* 1995;15(3 Pt 2): 2471-81.

Duvernoya HM, Pierre-Yves R. The circum ventricular organs: Atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Research Reviews.* 2007;56:119-147.

Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenas C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhra MJ, Saper CB, Elmquist JK. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron.* 1998; 21:1375-85.

Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. Leptin Differentially Regulates NPY and POMC Neurons Projecting to the Lateral Hypothalamic Area. *Neuron.* 1999; 23:775-86.

Fitzgerald MEC, Vana B, Reiner A. Control of choroidal blood flow by the nucleus of Edinger-Westphal: A laser-Doppler study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:2483-2492.

Gamlin PD, Reiner A. The Edinger-Westphal nucleus: sources of input influencing accommodation, pupilloconstriction, and choroidal blood flow. *J Comp Neurol.* 1991;306 (3): 425-38.

Gaszner B; Csermus V; Kozics T. Urocortineric neurons in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 2004;480:170-179.

Geerling JC, Shin JW, Chimenti PC, Loewy AD. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J Comp. Neurol.* 2010; may. 1;5 18(9):1460-99.

Green DG, Herreros de Tejada P, Glover MJ. Are albino rats night blind?. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1991; 32(8):2366-71.

Guillemin R, Rosenber B. Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures. Endocrinology 1955;57:599–607.

Hahn JD. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin peptide expression patterns in a current parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. Neuroscience Letters. 2010;468:12-17.

Harker KT, Whishaw IQ. Place and matching-to-place spatial learning affected by rat inbreeding (Dark-Agouti, Fischer 344) and albinism (Wistar, Sgasprague-Dawley) but not domestication (wild rat vs. Long-Evans, Fischer-Norway). Behav. Brain Res. 2002; 21;134(1-2):467-77.

Hillebrabd D, Wied C, Adan RAH. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. Peptides. 2002;23: 2283-2306.

Holsboer F, Ising M. central CRH system depression and anxiety-evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. Eur. Jornal of Pharm. 2008;583:350-357.

Horn AKE, Shulze C, Radtke-Schuller S. The Edinger-Westphal nucleus represents different functional cell groups in different species. Ann. N. Y. Acad. Sci, 2009; 1164:45-50.

Ishikawa, S; Sekyia, H; Hondo, Y. The center for controlling the near reflex in the midbrain of the monkey: a double labelling study. Brain Res. 1989;519:217-222.

Kádar A; Wittman G; Liposits Z; Fekete C. Improved method for combination of imunocytochemistry and NissI Staining. J Neurosci Methods. 2009; 184:115-118.

Kakiya S, Yokoi H, Arima H, Iwasaki Y, Oki Y, Oiso Y. Central administration of urocortin inhibits vasopressin release in conscious rats. Neurosci Lett. 1998 May 29;248(2):144-6.

Köbbert C, Apps R, Bechman I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog. Neurobiol.* 2000;62:327-351.

Korosi A, Schotanus S, Olivier B, Roubos EW, and Kozicz T. Chronic ether stress-induced response of urocortin 1 neurons in the Edinger-Westphal nucleus in the mouse. *Brain Res.* 2005;1046:172-179.

Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Ling NC, De Souza EB, Kuhar MJ. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *Journal of Neuroendocrinology.* 1997;9:823-33.

Kozicz T, Yanaihara H, Arimura A. Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol.* 1998;391:1-10.

Kozicz T, Min L, and Arimura A. The activation of urocortin immunoreactive neurons in the Edinger-Westphal nucleus following acute pain stress in rats. *Stress.* 2001; 4:85-90.

Kozicz T. Neurons colocalizing urocortin and cocaine and amphetamine-regulated transcript immunoreactivities are induced by acute lipopolysaccharide stress in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Neuroscience.* 2003; 116(2):315-20.

Kozicz T, Korosi A, Korsman C, Tilburg-Ouwens D, Groenink L, Veening J, van Der Gugten J, Roubos E, Olivier B. Urocortin expression in the Edinger-Westphal nucleus is down-regulated in transgenic mice over-expressing neuronal corticotropin-releasing factor. *Neuroscience.* 2004;123(3):589-94.

Kozicz T, Bordewin LA, Czeh B, Fuchs E, Roubos EW. Chronic psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the tree shrew. *Psychoneuroendocrinology.* 2008. 33:741-754.

Kozics T, Bittencourt JC, May P, Reiner A, Gamlin P, Palkovits M, Horn-Bochtler A, Toledo CA, Ryabinin A. The Edinger-Westphal Nucleus: A Historical, Structural and Functional Perspective on a Dichotomous Terminology. *J Comp Neurol.* 2010 (prelo).

Li HY, Ericsson A, Sawchenko PE. Distinct mechanisms underlie activation of hypothalamic neurosecretory neurons and their medullary catecholaminergic afferents in categorically different stress paradigms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 19;93(6):2359-64.

Li HY, Sawchenko PE. Hypothalamic Effector Neurons and Extended Circuitries Activated in “Neurogenic” Stress: A Comparison of Footshock Effects Exerted Acutely, Chronically, and in Animals With Controlled Glucocorticoid Levels. *The Journal of Comparative Neurology*. 1998; 393:244-266.

Loewy AD, Saper CB. Edinger-Westphal nucleus: projections to the brain stem and spinal cord in the cat. *Brain Res*. 1978a; 150:1-27.

Loewy AD, Saper CB, Yamodis ND. Re-evaluation of the efferent projections of the Edinger-Westphal nucleus in the cat. *Brain Res*. 1978b;141:153-9.

Maciewicz, R; Phipps, BS; Aronin N; DiFiglia M. The distribution of substance P-containing neurons in the cat Edinger-Westphal nucleus: relationship to efferent projection systems. *Brain Res*. 1983 Jul 4;270(2):217-30.

Maciewicz R, Phipps BS, Grenier J, Poletti CE. Edinger-Westphal nucleus: colecystokinin immunocytochemistry and projections to spinal cord and trigeminal nucleus in the cat. *Brain Res* 1984; 29:139-145.

Martin X, Dolivo M. Neuronal and transneuronal tracing in the trigeminal system of the rat using the herpes virus suis. *Brain Research*. 1983; 273:253-76.

Martin JR, Knuepfer MM, Beinfeld MC, Westfall TC. Mechanism of pressor response to posterior hypothalamic injection of neuropeptide y. *Am J Physiol*. 1989 Sep;257 (3 Pt 2):H791-8.

May JP, Reiner AJ, Ryabinin AE. Comparison of the Distributions of Urocortin Containing and Cholinergic Neurons in the Periolomotor Midbrain of the Cat and Macaque. *J. Comp. Neurol*. 2008; Mar 20;507(3):1300-16.

Mitchell AJ. The role of corticotropin releasing factor in depressive illness: a critical review. *Neuros. and Biobehavioral reviews*. 1998; Vol. 22 n.5:635-651.

Miselis RR, Shapiro RE, Hand PJ. Subfornical organ efferents to neural systems for control of body water. *Science* 1979 Sep. 7; 205(4410):1022-5.

Miselis RR. The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res* 1981 Dec 28;230(1-2):1-23.

Moreau JL, Kilpatrick G, Jenck F. Urocortin, a novel neuropeptide with anxiogenic-like properties. *Neuro report*. 1997;8:1697-701.

Muglia LJ, Bethin KE, Jacobson L, Vogt SK, Majzoub JA. Pituitary-adrenal axis regulation in CRH-deficient mice. *Endocr Res*. 2000 Nov;26(4):1057-66.

Novikova L, Novikov L, Kellerth O. Persistent neuronal labeling by retrograde fluorescent tracers a comparison between Fast-Blue, Fluoro-Gold and various dextran conjugates. *J neurosci Methods*. 1997; 74:9-15.

Okere B, Xu L, Roubos EW, Sonetti D, Kozicz T. Restraint stress alters the secretory activity of neurons co-expressing urocortin-1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 in the mouse Edinger-Westphal nucleus. *Brain Research*. 2010; 1317:92-99.

Owens MJ, Vargas MA, Knight DL, Nemerov CB. The effects of alprazolam on corticotropin-releasing factor neurons in the rat brain: acute time course, chronic treatment and abrupt withdrawal. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1991; 258:349–356.

Paxinos G. *The Rat Nervous System*. San Diego: Academic Press; 2008.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press; 1998.

Perea-Sasiaín J. Giemsa stain's 100th year. *Biomedica Rev Span*. 2003 Mar;23(1):5-18.

Prusky GT; Harker KT; Douglas RM; Wishaw, IQ. Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rats strains. *Behav. Brain. Res.* 2002;15, 136 (2):339-48.

Qvist H, Dietrichs E. Afferents to the lateral reticular nucleus from the oculomotor region. *Anat. Embryol.* 1986;175:261-269.

Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods Review.* 2000 Nov 15;103(1):23-37.

Rost GK, Dietrichs E. Cerebellar cortical and nuclear afferents from the Edinger-Westphal nucleus in the cat. *Anat. Embryol.* 1988;178:59-65.

Rotzinger S, Lovejoy DA, Tan LA. Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety. *Peptides* 2010, Apr; 31 (4):736-56.

Ryabinin AE, Tsivkovskaia NO, Ryabinin SA. Urocortin-1 Containing Neurons in the Human Edinger-Westphal Nucleus. *Neuroscience* 2005;134:1317–1323.

Sakai K, Yoshimoto Y, Luppi PH, Fort P, El Mansari M, Salvert D, Jouvet M. Lower brainstem afferents to the cat posterior hypothalamus: A double-labeling study. *Brain Res. Bull.* 1990;24:437-455.

Saper CB, Swanson LW, Cowan WM. An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. *J Comp Neurol.* 1979 Feb 15;183(4):689-706.

Sekiya H, Kawamura K, Ishikawa S. Projections from the Edinger-Westphal complex of monkey as studied by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Arch Ital Biol.* 1984;122:311-9.

Schumed LC; Fallon JH. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Research;* 1986;377:147-154.

Schumed LC; Heimer L. Iontophoretic injections of Fluoro-Gold and others fluorescent tracer. *J Histol and Cyto;* 1990;38(5):721-723.

Simerly RB. Anatomical substrates of Hypothalamic Integration, in Paxinos, G., (ed): The Rat Nervous System. 2. Ed. Academic Press, 1995;353-76.

Skelton KH, Owens MJ, Nemeroff CB. The neurobiology of urocortin. *Regulatory Neuropeptides* 2000;63:85-92.

Spangler E, Cote DM, Anacker AM, Mark GP, Ryabinin AE. Differential sensitivity of the periculomotor urocortin-containing neurons to ethanol, psycho stimulants and stress in mice and rats. *Neuroscience* 2009;160:115–125.

Spina M, Merlo-Pich E, Chan RKW, Basso AM, Rivier J, Vale W, Koob GF. Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related. *Science*. 1996;273:1561-4.

Swanson LW. The hypothalamus, in Björklund A; Hökfelt T; Swanson LW; (eds): *Handbook of Chemical neuroanatomy*. Elsevier Science Publisher, 1987;1-103.

Swanson LW. *Brain Maps: The Structure of the Rat Brain*. 1992, 2008.

Swanson LW, Sanches-Watts G, Watts AG. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neuroscience Letters*. 2005;387:80-84.

Tan J, Holstege G. Anatomical evidence that the lateral tegmental field projects to lamina I of the caudal spinal trigeminal nucleus and spinal cord and to the edinger-westphal nucleus in the cat. *Neurosci. Letters*. 1986; 64:317-322.

Vale WW, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41 residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotrophin and beta-endorphin. *Science* 1981; 213:1394–1397.

Van Pett K, Viau V; Bittencourt JC; Chan RKW; Li HY; Arias, C; Prins, GS; Perrin, M; Vale, W; Sawchenko, PE. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J. Comp. Neurol.* 2000; 428: 191-212.

Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, Rivier J, Sawchenko PE, Vale W. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 1995; 378:287–292.

Vasconcelos LA, Donaldson C, Sita LV, Casatti CA, Lotfi CF, Wang L, Cadinouche MZ, 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*. 2003; 463(2): 157-75.

Vertes RP; Crane AM; Colom LV; Bland BH. Ascending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: PHA – L analysis in the rat. *J of Comp. Neurol*. 1995; 359: 90-116.

Vertes RP. Differential projections of the infralimbic and prelimbic in the rat. *Synapse*, 2004 Jan; 51(1): 32-58.

Vetter DE, Li C, Zhao L, Contarino A, Liberman MC, Smith GW, Marchuk Y, Koob GF, Heinemann SF, Vale W, Lee KF. Urocortin-deficient mice show hearing impairment and increased anxiety-like behavior. *Nat Genet*. 2002 Aug;31(4):363-9.

Viau V, Sawchenko PE. Hypophysiotropic neurons of the paraventricular nucleus respond in spatially, temporally, and phenotypically differentiated manners to acute vs. repeated restraint stress: rapid publication. *J Comp Neurol*. 2002. 445:293-307.

Warwick R. The ocular parasympathetic nerve supply and its mesencephalic sources. *Journal of Anatomy*. 1954; 88: 71-93.

Weitemier AZ, Tsikovskaia NO, Ryabinin AE. Urocortin 1 distribution in mouse brain is strain-dependent. *Neuroscience* 2006;132:729-740.

Weninger SC, Peters LL, Majzoub JA, Urocortin expression in the Edinger–Westphal nucleus is up-regulated by stress and corticotropin-releasing hormone deficiency, *Endocrinology*. 2000;141:256–263.

Wessendorf M. Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake. *Brain Research*. 1991; 553:135-148.

White J C, Smithwick R H, *The Autonomic Nervous System*, the Macmillan Company, NY, 1941.

Whishaw IQ, Tomie JA. Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiol Behav*. 1996; 60(5):1191-7.

Yang, LZ, Tovote P, Rayner M, Kockskamper J, Pieske B, Spiess J. Corticotropin-releasing factor receptors and urocortins, links between the brain and the heart. *Eur. J. Pharmacol* 2010 Feb.; 25, 632 (1-3): 1-6.