FERNANDA KALASSA

ÁREA DEPRESSORA GIGANTOCELULAR (GIDA): EFERÊNCIAS ESPINAIS

São Paulo 2007

1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos neurais de regulação do fluxo sangüíneo em geral e, em especial, do fluxo sangüíneo direcionado à musculatura esquelética tem sido, há vários anos, uma área de interesse de nosso laboratório. Para tanto diversos projetos anteriores tem abordado os ajustes do fluxo sangüíneo muscular como parte dos comportamentos de alerta.

Os comportamentos relacionados com a defesa do organismo sempre receberam especial atenção dos pesquisadores. Além dos ajustes motores, estes comportamentos se caracterizam por um padrão de ajustes vegetativos composto por hipertensão arterial, taquicardia, taquipnéia e hiperventilação, vasoconstrição visceral e vasodilatação muscular. Admite-se que a vasodilatação muscular prepara e suporta a intensa ativação motora que geralmente acompanham estes comportamentos. Todavia, os mecanismos efetores e as vias neurais associadas a esta resposta ainda não são completamente conhecidos.

A regulação do tono vasomotor nos vasos de resistência deriva exclusivamente da divisão simpática do sistema nervoso autônomo e sua atividade depende de aferências excitatórias tônicas de origem supraespinal. Neurônios presentes no núcleo reticular rostroventrolateral (RVL) projetam-se diretamente à coluna IML, onde são responsáveis pela excitação tônica de neurônios pré-ganglionares, que originam a inervação simpática do coração, vasos e da medula adrenal. Diversos estudos demonstraram que o RVL participa dos ajustes cardiovasculares em comportamentos de alerta. A

existência de outras vias neurais capazes de promover a vasodilatação muscular, no entanto, não pode ser descartada.

Há 10 anos Aicher e colaboradores caracterizaram uma nova região depressora no tegmento bulbar de ratos, denominando-a Área Depressora Gigantocelular, daqui por diante denominada GiDA. Estudos funcionais demonstraram que a GiDA possui atividade vasodepressora tônica e pode ser parte das vias envolvidas nos baroceptores arteriais. Evidências anatômicas demonstraram que a GiDA projeta-se diretamente para a coluna intermédiolateral, onde forma sinapses inibitórias com neurônios pré-ganglionares que inervam a medula adrenal.

No entanto, as evidências anatômicas até aqui obtidas não suportam a função vasodepressora/simpatoinibitória da GiDA. Este estudo tem como objetivo determinar se esta nova área possui conexões com neurônios simpáticos pré-ganglionares que originam a inervação simpática do coração e da vasculatura lisa visceral e ainda, seu possível envolvimento com a vasodilatação muscular observada em comportamentos de defesa, decorrente da estimulação algesiógena.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais

A perfusão do leito vascular capilar constitui um elemento essencial da homeostasia. É através do fluxo sangüíneo que percorre este território e das trocas que aí se realizam, que o interstício pode ser renovado, mantendo-se nas condições ideais para a homeostasia celular. Desta maneira não é surpresa se verificar que todos os leitos vasculares exibam, ainda que em graus variáveis, o fenômeno da auto-regulação. Embora a auto-regulação constitua um mecanismo valioso da homeostasia local, ajustando a perfusão sangüínea ao metabolismo celular, ela obviamente não pode atender às necessidades do organismo como um todo. Assim, os ajustes da auto-regulação são freqüentemente sobrepujados por ajustes neuro humorais do fluxo sangüíneo que, visam a atender a regulação homeostática do sistema circulatório como um todo e/ou fornecer o suporte metabólico para a emissão de comportamentos.

A perfusão dos músculos esqueléticos constitui um exemplo clássico desta organização. Em resposta a um aumento da pressão arterial sistêmica, vias reflexas associadas aos baroceptores arteriais provocam vasodilatação acentuada do território muscular, visando diminuir a resistência periférica total e, permitindo a redução da pressão arterial. De maneira semelhante, durante a emissão de comportamentos de alerta observa-se vasodilatação do território muscular que <u>precede</u> o aumento da demanda metabólica. Como previsto, em

ambos exemplos, o fluxo sangüíneo muscular observado é muito maior do que o previsto pelo metabolismo local.

2.2 Comportamentos de alerta

Dentre as numerosas classes de comportamentos emitidos pelos animais, os relacionados com a defesa do organismo têm, desde há muito, recebido atenção especial dos investigadores, talvez pela sua importância na defesa da integridade do organismo ou, pelo fato de estarem presentes, ainda que sob diferentes formas, em toda a escala animal.

Embora quase que exclusivamente referidos como os comportamentos exibidos por um indivíduo frente a estímulos potencialmente lesivos ou um agressor mais poderoso, os comportamentos defensivos provavelmente constituem um contínuo. Estes comportamentos incluem desde o simples abanar de uma orelha ou cauda para afastar um inseto, até a retração de um membro (reflexo de flexão) ou da cabeça, a esquiva e a fuga, isto é, a retração de todo o corpo destes agentes agressores ou, ainda, manifestações verbais de desculpa, de justificativas, entre outras. (Timo-Iaria 1985, Cravo 2001).

Além dos variados ajustes motores que constituem os comportamentos descritos anteriormente, os comportamentos de alerta envolvem um conjunto de ajustes vegetativos como hipertensão arterial, taquicardia, taquipnéia, hiperventilação, redução da motilidade gastrointestinal, atonia da bexiga vesical, sudorese palmar, midríase, vasodilatação muscular e vasoconstrição visceral (revisão de Koizumi et al, 1972).

Uma vez que os comportamentos de alerta envolvem intensa ativação muscular, a vasodilatação que se observa neste território tem sido considerada

uma característica fundamental destes comportamentos. Todavia, os mecanismos efetores e as vias neurais associadas a esta resposta ainda não são completamente conhecidos. Pelo menos três mecanismos distintos para a vasodilatação muscular do alerta tem sido propostos:

- redução do tono vasoconstrictor simpático
- secreção de catecolaminas pela medula da adrenal
- ativação de um sistema vasodilatador simpático

Há muito a caracterização dos ajustes vegetativos do alerta tem sido objeto de estudo em nosso laboratório (revisão em Cravo et al, 2003). Estudos anteriores demonstraram que, embora a vasodilatação muscular esteja presente em todas as formas de alerta, a participação dos diversos sistemas efetores é variável. No alerta induzido pela estimulação nociceptiva, por exemplo, a vasodilatação muscular depende exclusivamente da redução do tono vasoconstrictor simpático (Possas et al, 2001). De maneira diversa, quando o alerta é produzido por estimulação hipotalâmica, além da redução do tono simpático, observa-se participação preponderante das catecolaminas circulantes e de um mecanismo, ainda desconhecido, que envolve a liberação de óxido nítrico (Cravo et al, 2003; Ferrreira-Neto et al, 2003). Em ambos os casos, o tegmento ventrolateral do bulbo constitui um elemento crítico das vias associadas a vasodilatação muscular pois, sua inativação funcional ou o bloqueio glutamatérgico de áreas especificas (veja abaixo) é capaz de abolir estes ajustes. Além do tegmento ventrolateral, outras áreas do tronco cerebral devem participar destes ajustes. Animais decerebrados guando submetidos à estimulação nociceptiva apresentam ajustes diferenciados do fluxo sangüíneo,

caracterizado por vasodilatação restrita do membro estimulado e vasoconstrição nos demais membros (Cravo et al, 1994).

2.3 As bases da inervação vasomotora

A contração da musculatura lisa vascular é controlada por fatores locais, humorais e neurais. Admite-se que a regulação neural seja o principal mecanismo de regulação rápida (na faixa de ms a s) do tono vascular.

A regulação neural do tono vasomotor nos vasos de resistência deriva exclusivamente da divisão simpática do sistema nervoso autônomo. Neurônios simpáticos pré-ganglionares presentes na coluna intermediolateral nos segmentos torácicos da medula espinal são os responsáveis pela estimulação mantida dos neurônios ganglionares, gerando a atividade vasomotora basal. As fibras pós-ganglionares simpáticas em resposta à esta estimulação, liberam continuamente noradrenalina na junção neuromuscular na camada média dos vasos. Atuando em receptores adrenérgicos do subtipo α 1 a noradrenalina estimula a contração do músculo liso vascular, regulando o raio destes vasos.

No entanto, os neurônios simpáticos pré-ganglionares não apresentam atividade intrínseca e a sua própria atividade deriva de aferências excitatórias tônicas de origem supraespinal.

2.4 Núcleos vasomotores do bulbo

Desde o século XIX sabe-se que o tronco cerebral é fundamental para a manutenção do tono vascular e da regulação da pressão arterial (Ruggiero et al, 1989). Em uma série de trabalhos basilares realizados a partir da década de 70 Guertzenstein e colaboradores (Feldberg & Guertzenstein, 1972;

Guertzenstein, 1973; Guertzenstein & Silver, 1974, Guertzenstein & Lopes, 1984) demonstraram que, uma região restrita do tegmento ventrolateral do bulbo, continha neurônios cuja atividade era fundamental para a manutenção do tono vasomotor e da pressão arterial, contendo as características esperadas de um assim chamado centro vasomotor. Eesta área foi denominada de área glicino-sensitiva (AGS). A lesão eletrolítica unilateral da AGS não modificava a pressão arterial significativamente, no entanto a associação da lesão eletrolítica e da inibição da AGS remanescente provocava colapso da pressão arterial (Guertzenstein & Silver, 1974). Considerando as propriedades da aplicação tópica das drogas utilizadas e dos resultados de lesão ou inativação unilateral, estes autores propuseram que, na AGS, neurônios localizados próximos à superficie ventral do bulbo mantinham conexões diretas, bilaterais, com neurônios simpáticos pré-ganglionares na coluna intermediolateral (IML) nos segmentos torácicos da medula espinal, onde através de sua excitação tônica, gerariam o tono vasomotor, mantendo a pressão arterial.

O desenvolvimento das técnicas de rastreamento neural retrógrado permitiram identificar na AGS neurônios com projeção direta à IML (Amendt et al. 1978; Ross et al., 1981; Dampney et al., 1982, Ruggiero et al., 1989).

Na década de 80, na tentativa de esclarecer os mecanismos associados à hipertensão neurogênica, Reis e colaboradores utilizaram inicialmente a estimulação elétrica e a estimulação química por microinjeção de amino-ácido excitatórios, para demonstrar que, no rato, a exemplo do que fora observado em gatos e em coelhos, neurônios localizados nas porções mais rostrais do tegmento ventrolateral do bulbo, constituíam elementos críticos na manutenção do tono vasomotor e da pressão arterial. A estimulação química ou elétrica

desta área provocava hipertensão e taquicardia, enquanto a sua lesão ou inativação química provocava hipotensão em níveis equivalentes aos observados após transecção espinal (Ross et al, 1984). Utilizando técnicas de imunoistoquímica, estes autores demonstraram haver uma notável coincidência anatômica entre a localização dos neurônios simpatoexcitatórios do tronco localização subpopulação cerebral е а de uma de neurônios catecolaminérgicos contendo feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT), a enzima de síntese de adrenalina. Estes neurônios constituíam o terço anterior do grupo de neurônios adrenérgicos C1 como descrito inicialmente por Hökfelt et al (1974).

Baseados nas características funcionais, na presença dos neurônios adrenérgicos, nas projeções à IML e na hodologia desta área Reis e colaboradores propuseram a existência de uma nova entidade anatômica que foi denominada *nucleus reticularis rostroventrolateralis* ou núcleo reticular rostroventrolateral (RVL). (Ross et al. 1984).

No rato, o RVL constitui uma estrutura piramidal delimitada dorsalmente pelas divisões compacta e semi-compacta do núcleo ambíguo, medialmente pelo terço rostral do complexo olivar inferior e lateralmente pelo núcleo reticular parvocelular e pela extensão oral do núcleo espinal do nervo trigêmeo (Ruggiero et al, 1989). É fundamental notar que esta definição do RVL baseia-se no conjunto de características citadas, e não apenas na organização citoarquitetônica desta região que, na verdade, não suporta este parcelamento. A presença dos neurônios adrenérgicos C1 constitui, até o momento, a principal característica citoarquitetônica do RVL.

No RVL neurônios bulboespinais projetam-se diretamente à coluna IML, onde estabelecem conexões monosinápticas assimétricas (possivelmente excitatórias) com neurônios simpáticos pré-ganglionares aí presentes (Milner et al, 1988; Morrison et al, 1991). Embora numerosos neurotransmissores tenham sido identificados no RVL, os neurônios C1 constituem cerca de 75% do número total de neurônios nesta região com projeção espinal, constituindo, assim, o principal marcador desta população (Ruggiero et al, 1995).

Estudos utilizando técnicas eletrofisiológicas demonstraram no RVL a presença de neurônios cuja atividade é sincronizada com o ciclo cardíaco e cuja descarga precede, sistematicamente, a descarga de neurônios simpáticos pré-ganglionares e a atividade simpática em fibras pós-ganglionares cardíacas e vasomotoras (Brown et al, 1984; 1985; Morrison et al, 1989). A latência entre a descarga dos neurônios do RVL e a excitação dos neurônios simpáticos pré-ganglionares é compatível com a velocidade de condução estimada a partir das características anatômicas (diâmetro e mielinização) das fibras entre estas duas estruturas (Morrison et al, 1988).

Diversas evidências experimentais suportam a hipótese de que o Lglutamato constitua o neurotransmissor preferencial nas sinapses excitatórias rápidas entre o RVL e neurônios simpáticos pré-ganglionares na IML (Morrison et al, 1991; Morrison et al., 1989).

Os neurônios do RVL são os responsáveis pela excitação tônica de neurônios pré-ganglionares que originam a inervação simpática do coração, dos vasos e da medula da adrenal (revisão em Dampney, 1994). O RVL constitui o braço eferente final comum de diversos ajustes cardiovasculares incluindo os ajustes reflexos provocados pela estimulação de aferentes dos

baroceptores (Granata et al., 1983, 1985), quimoceptores (Dean & Coote, 1986) e na resposta isquêmica cerebral (Sun et al, 1992).

Diversos estudos anteriores demonstraram que o RVL participa dos ajustes cardiovasculares em comportamentos de alerta. A inativação funcional ou o bloqueio glutamatérgico do RVL abole as respostas pressoras e a vasodilatação muscular provocada pela estimulação de aferentes cutâneos e musculares do nervo ciático (Gordon 1988, Possas et al, 2001) e a vasodilatação muscular induzida pela estimulação elétrica do hipotálamo (Cravo et al 2003, Ferreira-Neto et al 2003).

Imediatamente caudal ao RVL e extendendo-se pelo tegmento ventrolateral do bulbo até a junção bulboespinal, situa-se um conjunto de neurônios vasodepressores, cuja estimulação provoca redução da pressão arterial. Embora a sua descrição inicial tenha sido feita por Guertzenstein e colaboradores, quase simultaneamente à descrição da AGS, a caracterização anatômica e funcional desta área permanece, até hoje, em grande parte desconhecida. Embora inicialmente, esta região tenha sido descrita (em analogia à descrição do RVL) como o núcleo reticular caudoventrolateral (CVL), admite-se atualmente que, ao contrário do RVL, esta região não constitui um núcleo homogêneo, contendo vias neurais completamente distintas nas suas características anatômicas e funcionais. Por esta razão, o termo CVL mais freqüentemente é utilizado para indicar a região (e não o núcleo) caudoventrolateral do tegmento bulbar.

O CVL constitui o principal centro vasodepressor do bulbo. A sua estimulação provoca hipotensão e bradicardia, por inibição da atividade simpática. Logo após a sua descrição foi possível demonstrar que o CVL não

possui projeções à coluna intermediolateral, e, portanto, seus efeitos se deviam a suas conexões com outras estruturas bulbares. Diversos estudos desde então demonstraram que a atividade vasodepressora do CVL é devida as projeções desta área ao RVL (Granata et al, 1986). No RVL terminais sinápticos oriundos do CVL contactam monosinapticamente neurônios adrenérgicos e não-adrenérgicos formando sinapses simétricas (inibitórias) (Aicher et al, 1996) e que, provavelmente, utilizam GABA como neurotransmissor. O CVL apresenta atividade tônica que é fundamental para a regulação da pressão arterial. A sua lesão ou inativação funcional provoca hipertensão arterial intensa que, em algumas espécies pode provocar a morte, por falência ventricular esquerda e edema pulmonar (Blessing et al, 1987). Ao contrário do RVL, a caracterização anatômica do CVL é, no mínimo, rudimentar. Os neurônios que se projetam ao RVL situam-se difusamente na região periambigual, mas seus contornos não foram ainda determinados. A projeção CVL-RVL constitui a via pela qual, sinais oriundos dos baroceptores arteriais (a partir do NTS) modulam a atividade simpática e a pressão arterial (Cravo et al, 2003; Jeske et al, 1993; Guyenet et al, 1987) (Figura 1).



Figura 1 – **Bases da inervação vasomotora.** Representação esquemática de corte sagital da medula oblongata apresentando as vias envolvidas com a regulação to tono simpático para o coração, vasos de resistência e medula adrenal. *(modificado de Cravo, Morrison & Reis, 1991).*

2.5 A Área Depressora Gigantocelular (GiDA)

Há muito se sabe que a estimulação de determinadas regiões do bulbo provoca hipotensão, que é primariamente devida à diminuição da resistência periférica e inibição de neurônios simpáticos pré-ganglionares. Entre estas, o núcleo do trato solitário (NTS) e a região caudal ventro lateral do bulbo (CVL) tem sido extensamente estudadas. Todavia a função vasodepressora de ambas estruturas. como descrito anteriormente. parece dever-se exclusivamente, a seus efeitos inibitórios (diretos e indiretos) sobre os neurônios simpatoexcitatórios localizados no RVL. Admite-se portanto que, a inibição da atividade simpática na periferia com subseqüente vasodilatação de vasos mesentéricos, renais e musculares, ocorre quando o RVL, inibido pelo

CVL (diretamente) ou pelo NTS (através das conexões NTS-CVL) reduz a excitação tônica dos neurônios simpáticos pré-ganglionares localizados na coluna interméodilateral. Esta via parece constituir a principal via inibitória da atividade simpática, apresentando atividade tônica e constituindo o substrato anatômico do controle baroceptor da atividade simpática.

No entanto, em 1994 Aicher et al descreveram na região ventral da formação reticular gigantocelular, próxima à linha média, uma nova região vasodepressora no bulbo de ratos e a denominaram de Área Depressora Gigantocelular (GiDA - visando a uniformidade e a confusão, freqüentemente induzidas pela sinomínia desordenada, preferimos utilizar a sigla originalmente proposta pelos autores).

A estimulação química da GiDA por microinjeções de L-glutamato (80 pmol) provoca hipotensão acentuada (entre 10 e 40 mmHg). Os sítios ativos localizam-se sistematicamente entre 1,0 e 1,7mm rostral, 1,0 mm lateral e 2,0 a 2,5 mm ventral em relação ao calamus scriptorius. No eixo antero-posterior a porção mais rostral da GiDA coexiste com o polo caudal do RVL porém, a GiDA é, em toda a sua extensão, medial ao RVL.

Neste mesmo estudo, tendo estabelecido a região da GiDA, os autores buscaram determinar suas eferências, utilizando como traçador anterógrado a leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* (PHA-L). Os resultados obtidos demonstraram que a GiDA projeta-se para diversas estruturas com função autonômica como o núcleo do trato solitário, região do locus coeruleus, complexo parabraquial, formação reticular bulbar medial. Pôde-se demonstrar ainda que a GiDA projeções diretas e bilaterais para as lâminas VII e X dos segmentos cervicais e torácicos da medula espinal. Nos segmentos

torácicos as projeções para a lâmina VII estão localizadas principalmente próxima à região medial da coluna IML, indicando que estas projeções da GiDA podem ter um importante papel na modulação da atividade de neurônios préganglionares simpáticos. A descrição de uma área vasodepressora que, ao contrário do NTS e do CVL, projeta-se diretamente para a coluna IML, constituiu um achado significante, postulando uma nova via vasomotora além do RVL.

De modo a confirmar estes achados, em um estudo posterior, Aicher et al (1995) combinaram técnicas de rastreamento neuronal retrógrado e anterógrado e de microscopia eletrônica. Os resultados obtidos demonstraram que eferentes provenientes da Gida contactam diretamente (monosinapticamente) neurônios presentes na região da IML nos segmentos torácicos da medula espinal, formando sistematicamente sinapses simétricas (inibitórias) em dendritos proximais destes neurônios. Em uma etapa posterior deste mesmo estudo, estes pesquisadores realizaram microinjeções de Fluorogold, um traçador retrógrado, na medula adrenal, e microinjeções de Amino Dextrana Biotinilada (BDA), um traçador anterógrado, na GiDA. Esta combinação de marcação anterógrada dos eferentes da GiDA com a marcação retrógrada das aferências da medula adrenal tornou possível determinar que eferentes da GiDA mantinham contato sináptico direto com neurônios simpáticos pré-ganglionares.

A GiDA apresenta atividade simpatoinibitória tônica, e sua inativação provoca hipertensão por aumento da atividade simpática. Além disto, algumas evidências sugerem que ela participa das vias dos reflexos dos baroceptores (Aicher et al, 1997).

Diversas evidências anatômicas e funcionais demonstram que embora a proximidade anatômica, a GiDA é funcional e anatomicamente distinta de outras regiões do tegmento bulbar com atividade cardiovascular como os núcleos da rafe, a região do CVL e o núcleo RVL (Aicher et al, 1997).

Do até aqui exposto, pelo menos dois aspectos relevantes na caracterização da GiDA permanecem desconhecidos.

As evidências anatômicas disponíveis até o momento, não suportam de modo inequívoco a função vasodepressora/simpatoinibitória da GiDA. De fato, embora tenham sido demonstradas conexões inibitórias de eferentes da GiDA com neurônios simpáticos pré-ganglionares inervando a medula da adrenal, a inibição destes neurônios, provocaria apenas redução da secreção de catecolaminas circulantes, um efeito que não pode explicar a significativa hipotensão resultante da estimulação da GiDA. Permanece por determinar a existência de conexões da GiDA com neurônios simpáticos pré-ganglionares que originam a inervação a outros alvos simpáticos como o coração e os vasos viscerais e musculares e ainda qual o neurotransmissor utilizado por esta região.

2.6 Objetivos

Combinando técnicas de rastreamentos neuronal retrógrado e anterógrado este trabalho visa a:

- determinar se eferentes provenientes da GiDA contactam neurônios simpáticos pré-ganglionares que originam a inervação simpática ao coração, à adrenal e a vasculatura visceral e da musculatura esquelética.
- 2. estudar as projeções da GiDA para a medula espinal.

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 32 ratos machos (<u>Rattus rattus</u>, linhagem Wistar), albinos, pesando entre 150 e 180 g, mantidos com água e ração granulada á vontade, fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal do Estado de São Paulo. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia com halotano (2%, em O_2 100%).

3.2 Microinjeções de traçadores

3.2.1 Micropipetas

As micropipetas de vidro foram confeccionadas a partir de tubos capilares de 0,58 mm de diâmetro interno. Estas foram obtidas por estiramento a quente (Micro Electrode Puller - Stoelting Instruments). As pontas foram posteriormente ajustadas para um diâmetro final entre 20 e 25 µm.

3.2.2 Microinjeção iontoforética do traçador anterógrado BDA na Área Depressora Gigantocelular (GiDA)

Os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico com a barra nasal fixada a 11 mm abaixo da linha interaural. A superfície dorsal da caixa craniana foi exposta e uma parte do osso occipital foi removida. A membrana atlanto-occipital foi cuidadosamente seccionada e rebatida para a visualização dorsal do bulbo e do *calamus scriptorius* (CS), que foi utilizado como ponto de referência para as coordenadas estereotáxicas. As coordenadas calculadas para GiDA foram realizadas através das coordenadas estereotáxicas obtidas de estudos anteriores (Aicher et al, 1994) e assim definidas:

Área Depressora Gigantocelular (GiDA)

- \Rightarrow AP: 1,8 mm rostral ao CS
- \Rightarrow ML: 1,0 mm lateral ao CS
- \Rightarrow DV: 2,0 mm rostral ao CS

A BDA foi utilizada como traçador neural anterógrado (diluído a 10% em PB 0.1 M, Molecular Probes) foi injetado iontoforeticamente, através das micropipetas de vidro descritas acima, por meio de uma fonte de corrente alternada (Midgard), aplicando uma corrente positiva, com ciclo ativo de 50% de 7µA por 40 minutos. Após o término da injeção a micropipeta permaneceu no local por mais 10 minutos para evitar a formação de rastro ao longo do seu trajeto.

3.2.3 Microinjeções do traçador retrógrado Fluorogold na adrenal

Para identificar os neurônios da coluna intermédio lateral que originam a inervação simpática da adrenal um grupo de animais recebeu microinjeções por pressão de Fluorogold (FG- 3 μl, 2% em NaCl 0,9%) nesta glândula.

3.2.4 Imersão das fibras nervosas simpáticas pré-ganglionares do nervo celíaco em Fluorogold

Para identificar os neurônios simpáticos pré-ganglionares que originam a inervação da vasculatura visceral, um grupo de animais teve o nervo celíaco dissecado, cortado rostralmente ao gânglio celíaco e as fibras nervosas pré-ganglionares foram mergulhadas em Fluorogold 5% por 1 hora. Após este período, o compartimento que continha o Fluorogold foi retirado, o tecido foi suturado e os animais mantidos em gaiolas individuais com água e ração.

3.2.5 Microinjeção de Fluorogold no gânglio estrelado

Para determinar a população dos neurônios que dão origem à inervação simpática do coração foi feita microinjeção de Fluorogold (5%) no gânglio estrelado. O procedimento cirúrgico para dissecação do gânglio estrelado foi feito como descrito por Tseng et al (2001). Após a dessecação foi feito um pequeno corte no gânglio e colocado um pedaço de esponja hemostática mergulhado em Fluorogold 5%. O tecido foi suturado e os animais mantidos em gaiolas individuais com água e ração.

3.3 Perfusão e Microtomia

Após 10 a 15 dias de sobrevida os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/kg, ip), e perfundidos por via transcardíaca com salina isotônica por aproximadamente 3 minutos, seguida de 500 mL de paraformoldeído a 4% em tampão fosfato de sódio (0.1M, pH 7,4) por 20 minutos.

O tronco cerebral e a região torácica da medula espinal foram retirados e colocados no mesmo fixador 90 minutos e, a seguir, colocados em uma solução de PBS contendo 20% de sacarose por 12-18 horas a 4°C. Então estas peças foram cortadas em um micrótomo de congelamento em cortes coronais ou horizontais de 30 μm de espessura e colhidos em série.

3.4 Imunoistoquímica para Acetil Colina Transferase (ChAT)

Cortes da região torácica da medula espinal foram lavados em PBS (0,1M pH 7,4), e então incubados em anticorpo primário para ChAT feito em cabra (número do catálogo: AB 144P, Chemicon Inc.), na diluição de 1:1000 em PBS com 0,3% de Triton X-100 e soro normal de cavalo na diluição 1:100. Após 72 horas sob agitação a 4 °C os cortes foram lavados novamente em PBS. Em seguida os cortes foram incubados em anticorpo secundário biotinilado contra cabra, produzido em cavalo (Vector), na diluição de 1:200 em PBS com 0,3% de Triton X-100 e soro normal de cabra (1:100), por 1 hora em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados novamente lavados com PBS e submetidos à técnica da imunoperoxidase com o complexo biotina-avidina (ABC Elite Kit, Vector). Para a visualização deste complexo foi utilizado o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB-Vector).

Após a reação imunoistoquímica, os cortes foram novamente lavados em PBS, montados em lâminas de vidro, colocados em temperatura ambiente para secagem e então desidratados em uma série crescente de álcool, diafanizados em xilol e recobertos com Permount para montagem das lamínulas.

Nos casos em que o complexo antígeno-anticorpo foi revelado para microscopia de fluorescência, os cortes passaram pelos mesmos procedimentos descritos acima quanto à incubação no anticorpo primário e secundário, então foram lavados em PBS e colocados por 2 horas no fluorocromo CY3-avidina (Molecular Probes 1:500) em temperatura ambiente, lavados novamente e montados em lâminas de vidro, colocados em temperatura ambiente protegidos da luz para secagem e então desidratados em uma série crescente de álcool, diafanizados em xilo e recobertos com DPX para montagem das lamínulas.

3.5 Imunoistoquímica para o traçador retrógrado Fluorogold

Cortes da região torácica da medula espinal foram lavados em PBS (0,1 M pH 7,4) e, então incubados em anticorpo primário para Fluorogold feito em coelho, (Chemicon International), na diluição de 1:5.000 em PBS com 0,3% de Triton X-100 e soro normal de cabra. Após 1 hora sob agitação em temperatura ambiente, os cortes permaneceram por mais 72 horas sob agitação a 4°C. Então os cortes foram lavados novamente em PBS, e incubados em anticorpo secudário biotinilado contra coelho, produzido em cabra (Vector), na diluição de 1:200 em PBS por 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação com anticorpo secundário, utilizou-se a técnica da imunoperoxidase com o complexo biotina-avidina (ABC Elite Kit, Vector) para ligar a peroxidase ao complexo antígeno-anticorpo. Foi utilizada a 3,3' diaminobenzidina (DAB, Vector) como cromógeno. Os cortes foram lavados,

montados em lâminas de vidro, desidratados, diafanizados e recobertos com Permount.

3.6 Histoquímica para BDA

3.6.1 Histoquímica para revelação de BDA com ABC-DAB

Cortes do tronco encefálico e da região torácica da medula espinal foram lavados em PBS (0,1M pH 7,4) revelados pela técnica da peroxidase com o complexo biotina-avidina (ABC Elite Kit, Vector Laboratories). Para a visualização deste complexo foi utilizado o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina e níquel (DAB-Vector).

Após a reação histoquímica, os cortes foram tratados como descrito no item 3.5.

3.6.2 Histoquímica para visualização da BDA em microscopia de fluorescência

Cortes do tronco encefálico e da região torácica da medula espinal foram lavados em PBS e então colocados por 2 horas no fluorocromo CY3avidina (1:500), em temperatura ambiente. Na seqüência os cortes foram lavados novamente em PBS, e montados como descrito no item 3.5.

3.7 Análise e registro de dados

O material preparado para microscopia de campo claro foi analisado em um microscópio Nikon (modelo Optiphot-2) e fotografado através de uma câmara digital acoplada.

Para os casos de fluorescência o material foi analisado e fotografado através de uma câmara digital acoplada a um microscópio de fluorescência Nikon E600. O filtro utilizado para ultra-violeta, com excitação máxima entre 340-360 nm e absorção de 420 nm. Para análise da BDA foi utilizado o filtro para rodamina, com excitação máxima entre 512-550 nm e absorção em 570 nm.

Para a sobreposição das fotomicrografias de fluorescência foi utilizado o programa Corel Draw versão 11.

4 RESULTADOS

4.1 Considerações gerais

Os depósitos de BDA por iontoforese na área depressora gigantocelular foram padronizados pelos parâmetros descritos anteriormente no capítulo de métodos. Os casos descritos foram escolhidos por apresentarem uma marcação anterógrada que preenche completamente o pericário e os dendritos e os depósitos encontrarem-se confinados à região da GiDA. Nos cortes de bulbo onde estavam localizados os depósitos de BDA, não foram observados rastros da micropipeta.

As projeções da GiDA foram analisadas através do transporte anterógrado de BDA e posteriormente combinado com a imunoistoquímica para ChAT para a análise da distribuição das fibras para SPNs.

Também foram feitos experimentos que combinaram a marcação anterógrada com BDA e a marcação retrógrada de SPNs que inervam a adrenal, e os resultados foram comparados com os resultados já publicados por Aicher et al (1998).

Para elucidar as perguntas quanto as aferências do GiDA para SPNs que originam a inervação simpática de outros territórios, que não a adrenal, combinou-se traçador anterógrado na GiDA com traçador retrógrado em gânglios simpáticos, as características destas aposições serão apresentas adiante.

4.2 Experimentos de rastreamento anterógrado - projeções da Área Depressora Gigantocelular (GiDA) à regiões autonômicas da medula espinal.

Foram selecionados os casos em que o depósito de BDA estava restrito á GiDA com um maior número de pericários marcados. Estes pericários estavam completamente preenchidos pela BDA, que foi visualizada através da histoquímica com ABC-DAB (**Figura 2**).

As projeções bulbo espinais da GiDA são ipsolaterais e descendem pelo funículo lateral. Essas fibras apresentam um padrão complexo de distribuição, pois se ramificam por várias regiões da substância cinzenta da medula espinal, especialmente em regiões autonômicas da medula.

Como as eferências da GiDA descendem por toda a extensão rostro caudal da região torácica da medula espinal, algumas vezes é possível observar longas fibras, marcadas por BDA, percorrendo a substância branca (**Figura 3A**).

Durante o seu percurso as muitas projeções fletem-se e penetram na substância cinzenta, então se ramificam e se distribuem ao redor da IML, neste local as fibras apresentam muitas varicosidades (**Figuras 3B** e **3C**).

Comumente fibras marcadas com BDA dirigem-se mais medialmente à IML e originam ramificações no núcleo intercalado (Figuras 3D e 3E).

Algumas fibras cruzam a linha média durante seu trajeto e originam botões sinápticos na área autonômica central (**Figura 3G**). Algumas vezes essas fibras que cruzam a linha média e apresentam botões terminais no lado contralateral ao depósito de BDA (**Figura 3F**).

Figura 2: Local de depósito iontoforético de BDA.

Representação esquemática (**A**) e fotomicrografias (**B** e **C**) de cortes coronais do bulbo que mostram o local de depósito iontoforético do traçador BDA na GIDA. **NTS** núcleos do trato solitário; **Sp5I** Núcleo espinal no nervo trigêmeo; **12** Núcleo do hipoglosso; **12n** Raiz do nervo hipoglosso; **Gi** Região gigantocelular da formação reticular; **GiV** Parte ventral da regiãogigantocelular da formação reticular; **Py** Trato piramidal.



Figura 3: Projeções bulbo espinais provenientes da GIDA

Fotomicrografias de cortes da região torácica da medula espinal mostrando as fibras bulbo espinais provenientes da GiDA. Nota-se que essas fibras (setas) podem percorrer uma longa distância pela substância branca até penetrarem na substância cinzenta. (**A**). As fibras preenchidas com BDA arborizando-se na região da IML (**B**) e os botões terminais podem ser observados em detalhe (**C**). As fibras bulbo espinais também são observadas na região do núcleo intercalado (**D** e **E**). Algumas fibras marcadas cruzam a linha média e arborizando-se no lado contralateral ao depósito de BDA (**F**). Em **G** pode-se observar em detalhes botões terminais na região da área autonômica central muito próximos à um perfil de neurônio (*)



4.3 Projeções da GiDA para neurônios simpáticos pré-ganglionares marcados através da imunoistoquímica para a enzima acetil colina transferase (ChAT).

Os neurônios simpáticos pré-ganglionares são os últimos neurônios do sistema nervoso central envolvidos com a regulação da função autonômica. Todos estes neurônios são colinérgicos e, portanto, contêm acetil colina transferase (ChAT), enzima que catalisa a transformação da colina em acetilcolina.

Devido a esta característica bioquímica foi utilizada a imunoistoquímica para ChAT para identificar os neurônios simpáticos pré-ganglionares presentes na região torácica da medula espinal, e então analisar o padrão geral de distribuição das fibras provenientes da GiDA que se sobrepõem aos SPNs.

Nos procedimentos de imunoistoquímica para ChAT o complexo antígeno-anticorpo foi revelado tanto para microscopia comum de campo claro quanto para microscopia comum de fluorescência (**Figura 4 A** e **B**).

Nas regiões autonômicas da medula espinal os neurônios ChAT imunorreativos (ChAT-ir) foram localizados na coluna intermédio lateral (IML -**Figuras 4C** e **4D**), no núcleo intercalado (NI - **Figuras 4E** e **4F**), e na área autonômica central (AAC – **Figuras 4G** e **4H**).

Na região da IML os neurônios ChAT-ir estão agrupados geralmente em 4 neurônios ou mais, entre esses neurônios é possível identificar uma neurópila também imunorreativa para ChAT, em alguns casos foram observadas fibras imunorreativas entre a IML e o núcleo intercalado (**Figura 4F**).

No núcleo intercalado os neurônios ChAT-ir aparecem em grupos menores, e um pouco mais espalhados, consequentemente a neurópila ChAT-ir observada neste local é menos densa (**Figura 4F**).

Os SPNs ChAT-ir na área autonômica central (AAC) aparecem em um número menor, eles se apresentam mais distantes um do outro. Os SPNs deste núcleo apresentam o pericário mais arrendondado, enquanto nos outros núcleos autonômicos da medula os pericários tem uma forma mais triangular.

Os neurônios motores localizados no corno ventral também são colinérgicos e apesar de não terem uma relação direta com o os SPNs estão aqui representados pois durante o estudo foram observadas várias projeções bulbo espinais provenientes da GiDA para esta região (**Figuras 4A** e **4B**). O possível significad destas projeções serão abordados na discussão.

Em um grupo de animais foi utilizada a marcação das fibras bulbo espinais da GiDA através de depósitos iontoforéticos do traçador anterógrado BDA juntamente com a marcação dos SPNs através da imunoistoquímica para ChAT (**Figura 5**).

Essa combinação de técnicas possibilitou o estudo do padrão de distribuição das fibras eferentes da GiDA para região autonômicas da medula e a relação destas fibras com os SPNs ChAT-ir.

Na IML foram observadas inúmeras fibras marcadas pela BDA que dão origem a diversos botões sinápticos (**Figura 5B**). Muitos destes botões formam aposições em vários pericários dos SPNs ChAT-ir (**Figura 5C**). Vários botões terminais são observados em um mesmo pericário, e aparentemente estes botões se originam da mesma fibra bulbo espinal (**Figura 5D**).

Na região do núcleo intercalado (NI) também foram observados muitos botões terminais marcados com BDA. Alguns destes botões fazem aposição em SPNs ChAT-ir. As aposições foram observadas tanto no pericário, quanto em possíveis cones de implatação. (**Figura 5E e 5F**).

Figura 4: Neurônios simpáticos pré-ganglionares immunorreativos à ChAT. Fotomicrografias de cortes da região torácica da medula espinal submetidos à imunoistoquímica para ChAT. As fotomicrografias da esquerda são de cortes onde o complexo antígeno-anticorpo foi revelado com ABC-DAB, já as fotomicrografias da direita o complexo antígeno-anticorpo foi revelado com Cy3 e os cortes estudados em microscopia de fluorescência comum. Em A e B observam-se a distribuição dos SPNs ChAT-ir pelos núcleos autonômicos da medula espinal e os neurônios motores (também ChAT-ir) no corno ventral. Na IML os neurônios ChAT-ir aparecem em grupos de 4 ou mais neurônios (setas - **C** e **D**). Medialmente à IML localiza-se o núcleo intercalado e entre essas regiões autonômicas observa-se uma neurópila ChAT-ir (**E** e **F**). Na AAC os neurônios ChAT-ir aparecem ao redor do canal central (indicado pelo asterisco) em número menor e mais distantes um dos outros (**G** e **H**).



Figura 5: Eferências da GiDA para neurônios simpáticos imunorreativos para ChAT. Fotomicrografias de cortes horizontais da região torácica da medula espinal. Em A pode-se visualizar a substância cinzenta (SC), que contem os SPNs, entre duas faixas longitudinais mais claras que são a substância branca (SB). Em B, C e D pode-se observar SPNs, marcados com ChAT (*), e botões terminais de fibras eferentes da GiDA, marcados com BDA. Nestas micrografias pode-se notar a quantidade de botões terminais que contatam os SPNs que tipicamente se organizam em grupos e entre estes grupos há uma grande arborização das fibras provenientes da GiDA. Em B e C as setas pretas indicam os botões terminais de fibras eferentes da GiDA, já em D, E e F as setas pretas indicam locais onde estes botões terminais estão em aposição com pericários de SPNs imunorreativos para ChAT indicados pelo asterisco (E e F mostram neurônios localizados no núcleo
4.4 Experimentos de rastreamento retrógrado

4.4.1 Microinjeção de Fluorogold na adrenal

Neste grupo neurônios marcados retrogradamente após microinjeção de Fluorogold na adrenal estão localizados principalmente na coluna intermédio lateral, predominantemente na metade caudal da região torácica da medula espinal (**Figuras 6A e 6B**). Estes neurônios aparecem muito próximos e, a maioria de seus pericários é fusiforme (**Figuras 6C e 6D**). Também foram retrogradamente marcados neurônios no núcleo intercalado (**Figuras 6E e 6F**).

Nos cortes horizontais (**Figuras 6A** e **6B**) visualiza-se a substância branca paralela à cinzenta e, os neurônios marcados com Fluorogold estão contidos na substância cinzenta.

Esses SPNs estão, na maioria das vezes, organizados em grupos. Em cortes horizontais pode-se observar grupos de 2 ou 3 neurônios, nos cortes coronais é possível observar grupos maiores.

Figura 6: Neurônios simpáticos pré-ganglionares que dão origem à inervação da adrenal.

Fotomicrografias de fluorescência de cortes horizontais (**A** e **B**) e coronais (**C**, **D**, **E** e **F**) da região torácica da medula espinal onde as setas indicam os neurônios da coluna intermédio lateral marcados retrogradamente após microinjeção de Fluorogold na adrenal. Em (**E** e **F**) as setas indicam um neurônio simpático retrogradamente marcado localizado no núcleo intercalado. Em **D** e **F** nota-se o preenchimento do citoplasma e dos dendritos proximais. A barra de escala equivale a 100 µm em **A**, **C** e **E**, 25 µm em **B**, **D** e **F**. **IML** coluna intermédio lateral, **CC** canal central, **NI** núcleo intercalado, **SC** substância cinzenta e **SB** substância branca

4.4.2 Microinjeção de Fluorogold no gânglio celíaco

Os neurônios retrogradamente marcados após microinjeção de Fluorogold no gânglio celíaco estão localizados entre os segmentos T8 e T13 da região torácica da medula espinal (**Figuras 7A** e **7B**). Todos os neurônios marcados são ipsolaterais à injeção, e encontra-se na sua grande maioria na IML, no entanto, também foram observados neurônios marcados no núcleo intercalado.

Os neurônios localizados na IML apresentam-se geralmente organizados em pequenos clusters de 3 ou 4 células e possuem formato fusiforme (**Figuras 6C** e **6D**). Figura 7: Neurônios simpáticos pré-ganglionares que dão origem à inervação do gânglio celíaco.

Fotomicrografias de cortes horizontais (**A** e **B**) e coronais (**C** e **D**) da região torácica da medula espinal mostrando SPNs, localizados na IML, marcados retrogradamente após microinjeções de Fluorogold no gânglio celíaco (indicados pelas setas brancas). Nota-se que esses neurônios apresentam-se em grupos de 4 ou mais. **SB**: substância branca; **SC**: substância cinzenta; **CC** canal central.

4.4.3 Imersão do coto pré-ganglionar do nervo celíaco em Fluorogold

Os neurônios marcados retrogradamente após imersão do coto préganglionar do nervo celíaco em Fluorogold estão localizados entre os segmentos 5 e 13 da região torácica da medula espinal. Esses neurônios são ipsolaterais ao coto nervoso (**Figuras 8A** e **8B**) e também se organizam em grupos (**Figuras 7C** e **7D**).

Os resultados dos grupos de animais que receberam microinjeçõa de Fluorogold no gânglio celíaco ou os animais que tiveram o coto pré-ganglionar mergulhado em Fluorogold foi basicamente o mesmo. A extensão e a localização dos neurônios dos SPNs são muito semelhantes. Porém a quantidade de SPNs marcados no grupo de imersão do coto foi maior, e o controle para não haver extravasamento do Fluorogold para fora do gânglio é mais eficiente desta maneira. Por esse motivo em todos os experimentos com o gânglio celíaco foi escolhida esta técnica. Figura 8: Neurônios simpáticos pré-ganglionares que dão origem à inervação do gânglio celíaco (imersão do coto pré-ganglionar).

Fotomicrografias de fluorescência de cortes transversais (**A** e **B**) e coronais (**C** e **D**) da região torácica da medula espinal mostrando perfis de neurônios da coluna intermédio lateral (setas) marcados retrogradamente, após imersão do coto préganglionar do nervo celíaco em Fluorogold. **SB**: substância branca; **SC**: substância cinzenta.



4.4.4 Injeção de Fluorogold no gânglio estrelado

Para identificar os neurônios simpáticos pré-ganglionares que dão origem a inervação simpática do coração foram feitas microinjeções de Fluorogold no gânglio estrelado.

Nas figuras abaixo é possível observar os SPNs marcados retrogradamente após microinjeções de Fluorogold no gânglio estrelado. Estes neurônios estão encontrados entre a região T1 e T7, sendo que o pico de concentração destes neurônios está entre T1 e T4 (Strack et al, 1988). Nos casos analisados foram encontrados neurônios marcados entre T1 e T4. Todos os neurônios marcados retrogradamente são ipsolaterais à microinjeção.

Tanto em microscopia de campo claro (**Figuras 9A** e **9B**), quanto em microscopia de fluorescência comum (**Figuras 9C** e **9D**), pode-se observar que os SPNs que dão origem à inervação do gânglio estrelado também se organizam em grupos de dois ou no máximo 3 neurônios.

Figura 9: Neurônios simpáticos pré-ganglionares que dão origem à inervação do gânglio estrelado.

Fotomicrografias de campo claro (**A** e **B**) e de fluorescência (**C** e **D**- ampliação de **C**) de cortes horizontais da região torácica da medula espinal mostrando perfis de neurônios da coluna intermédio lateral (setas) marcados retrogradamente, após microinjeção de Fluorogold no gânglio estrelado. Em **B** e **D** é possível notar em detalhes os perfis de neurônios marcados com Fluorogold.



4.5 Experimentos com imersão das fibras do coto pré-ganglionar do gânglio celíaco no traçador retrógrado Fluorogold e imunoistoquímica para ChAT.

Um grupo de animais foi submetido à cirurgia para imersão das fibras pré- ganglionares do gânglio celíaco. Após uma sobrevida de 10 dias estes animais foram perfundidos e a medula espinal retirada. Dos cortes da região da medula torácica que contêm os SPNs de interesse fez-se imunoistoquímica para ChAT. Através destes procedimentos confirmou-se que os neurônios marcados retrogradamente eram SPNs.

Entre os SPNs, marcados com ChAT, observou-se neurônios marcados retrogradamente com Fluorogold. Os SPNs ChAT-ir aparecem em grupos de mais de 4 neurônios, como descrito anteriormente, e entre eles pode-se observar grupos menores de neurônios marcados com Fluorogold que correspondem aos SPNs que dão origem a inervação do gânglio celíaco.

Figura 10: Estudos combinado técnicas de imunoistoquímica para ChAT e marcação anterógrada com Fluorogold no coto pré-ganglionar do gânglio celíaco.

Fotomicrografias de cortes horizontais da região torácica da medula espinal. As fotomicrografias da esquerda mostram SPNs, na região da IML (**A** e **B**) e da área autonômica central (**C**), imunorreativos para a ChAT. As fotomicrografias do meio mostram SPNs retrogradamente marcados após imersão do coto pré-ganglionar do gânglio celíaco em Fluorogold (**A** e **B**), pode-se notar que em **9C**, na região da área autonômica central não foram observados neurônios marcados retrogradamente. As fotomicrografias são sobreposições das imagens anteriores, os neurônios duplamente marcados estão indicados pelas setas brancas, no caso da figura **C** os neurônios estão indicados também por setas brancas, mas não apresentam dupla marcação. **cc** (canal central)







4.6 Experimentos de dupla marcação com depósitos do traçador anterógrado BDA na GiDA e imersão das fibras pré-ganglionares do gânglio celíaco no traçador retrógrado Fluorogold.

Para verificar possíveis aposições entre as fibras eferentes bulbo espinais da GiDA com neurônios que dão origem a inervação simpática do gânglio celíaco foram utilizados traçadores anterógrado e retrógrado.

Depósitos do traçador anterógrado BDA na GiDA mostraram que, as eferências desta região fazem aposições em neurônios simpáticos préganglionares, marcados retrogradamente após microinjeção de Fluorogold no gânglio celíaco.

Estas aposições ocorrem tanto no pericário (Figuras 11D, 12A e 13C) do neurônio quanto em ramificações (Figuras 11, 12 e 13). Múltiplas sinapses são observadas ao longo do cone de implantação (Figura 11B).

As sobreposições entre as eferências da GiDA e as ramificações dos SPNs marcados ocorrem tanto em regiões mais proximais (**Figura 11B**) quanto em regiões mais distais (**Figuras 13C** e **13F**). **Figura 11:** Aposições entre aferências da GiDA e SPNs do gânglio celíaco. Fotomicrografias de campo claro de cortes transversais (A e B) e de cortes horizontais (C e D) da região torácica da medula espinal. Em A e C as setas indicam os SPNs da IML marcados retrogradamente pela imersão das fibras préganglionares do gânglio celíaco em Fluorogold. Em B e D observam-se as mesmas regiões apontadas pelas setas em A e C, em um aumento maior. Nestas fotomicrografias as setas indicam os locais de aposições (setas pretas) entre fibras marcadas com BDA e os SPNs marcados com Fluorogold. Em C a seta indica o neurônio observado em detalhe em D.



Figura 12: Aposições entre aferências da GiDA e SPNs do gânglio celíaco (microscopia de fluorescência).

Fotomicrografias de microscopia de fluorescência comum que mostram fibras bulbo espinais provenientes da GiDA (**B**) e SPNs marcados retrogradamente por Fluorogold após imersão das fibras pré-ganglionares que dão origem a inervação do gânglio celíaco (**C**). Em **A** as fotomicrografias foram sobrepostas e as setas indicam os locais onde as fibras (**B**) se sobrepõem aos neurônios (**A**). A elipse em **A** indica um SPN marcado por Fluorogold localizado no núcleo intercalado.







Figura 13: Aposições entre aferências da GiDA e SPNs do gânglio celíaco (microscopia de fluorescência comum). Fotomicrografias de microscopia de fluorescência comum mostrando SPNs marcados retrogradamente por Fluorogold após imersão das fibras pré-ganglionares que dão origem a inervação do gânglio celíaco (A e D). Em B e E as setas indicam as fibras bulbo espinais provenientes da GiDA e botões terminais. Nas fotomicrografias C e F setas indicam possíveis locais de sobreposição entre as eferências da GiDA e os SPNs marcados com Fluorogold.





5 DISCUSSÃO

5.1 Considerações gerais

Este foi o primeiro estudo a demonstrar, através da combinação de transporte neural anterógrado e retrógrado e técnicas de imunoistoquímica, que fibras eferentes da GiDA fazem aposições em SPNs que dão origem a inervação do gânglio celíaco. Os resultados indicam que a GiDA tem amplo acesso a todos os níveis dos segmentos torácicos da medula espinal e inerva SPNs que dão origem a inervação simpática e amplos territórios. As eferências da GiDA também fazem aposição em neurônios motores presentes no corno ventral da medula espinal.

Os resultados obtidos demonstram que fibras bulboespinais oriundas da GiDA descendem pelo funículo lateral, penetram na medula espinal e arborizam-se nas regiões autonômicas da substância cinzenta espinal: na IML, no núcleo intercalado e na área autonômica central. Estas regiões contêm os SPNs e seus dendritos, além de interneurônios cuja atividade é capaz de modular a atividade simpática (Deuchars et al, 2005). Também foram observadas muitas ramificações e arborizações terminais dos eferentes da GiDA no corno ventral, inclusive, aposições entre as fibras eferentes da GiDA e neurônios motores. Estes resultados estão de acordo e expandem os estudos neuroanatômicos sobre a GiDA publicados por Aicher et al (1994; 1995).

Os neurônios simpáticos pré-ganglionares são colinérgicos e, portanto contêm a enzima acetil colina transferase. A utilização da imunoistoquímica para esta enzima combinada com o transporte retrógrado de Fluorogold indicou

que a técnica utilizada para marcar retrogradamente os SPNs foi bem sucedida já que todos os SPNs marcados com Fluorogold também eram ChAT-ir.

Estes resultados são compatíveis com outros estudos que também utilizaram a imunoistoquimica para ChAT como um marcador de SPNs (Llewellyn-Smith et al 2003, Tang et al 2002, Tang et al 1998).

Os neurônios marcados retrogradamente após microinjeção de Fluorogold na adrenal, no gânglio celíaco e no gânglio estrelado representam a fonte de inervação simpática para a adrenal, os vasos mesentéricos e o coração respectivamente. O padrão de distribuição destes SPNs obtido neste estudo está de acordo com os resultados apresentados por Strack et al (1988) que estudaram sistematicamente a distribuição dos SPNs nos vários núcleos autonômicos da medula espinal.

Segundo o estudo de Strack et al (1988) os SPNs que inervam o gânglio estrelado estão distribuídos entre os segmentos torácicos 1 e 7. Já os neurônios simpáticos pré-ganglionares que originam a inervação do gânglio celíaco estão localizados entre os segmentos torácicos 5 e 13. E os neurônios simpáticos pré-ganglionares que inervam a adrenal estão distribuídos entre os segmentos 4 e 12 da região torácica da medula espinal.

5.2 Projeções de núcleos da formação reticular para regiões autonômicas da medula

O controle neural de várias funções autonômicas, entre elas, o controle do tono vasomotor, ocorre através de projeções diretas oriundas da formação reticular bulbar e pontina e do hipotálamo para núcleos autonômicos da medula

espinal, sendo então, estes locais de origem das fibras denominados de núcleos pré-motores simpáticos. Amendt et al (1979) foram os primeiros a demonstrar essas vias diretas monosinápticas. Após microinjeções do traçador retrógrado HRP na IML da região torácica da medula espinal, estes autores observaram neurônios bulbares e hipotalâmicos retrogradamente marcados. Desde então, numerosos estudos neuroanatômicos (Ross et al, 1981; Ruggiero et al,1989;

Aicher et al, 1994; Aicher et al, 1995; Hermann et al, 2003; Matsumoto et al, 1994) e fisiológicos (Deuchars et al, 1997;) confirmaram a existência e ampliaram o conhecimento sobre essas vias.

Classicamente reconheceram-se quatro grupos de neurônios (o RVL, núcleos caudais da Rafe, o grupo noradrenérgico A5 e o núcleo paraventricular do hipotálamo) responsáveis pela inervação dos neurônios simpáticos préganglionares que dão origem a inervação da adrenal e dos principais gânglios simpáticos (Strack et al 1989; Dampney et al 2003).

Entre os núcleos pré-motores envolvidos com o controle da geração e manutenção do tono simpático, o RVL tem sido considerado o mais importante. Esta primazia decorre da observação que, dentre todos os locais contendo neurônios simpáticos pré-motores, apenas o RVL possui atividade tônica essencial, i.e., só a lesão e/ou inativação química do RVL abole a atividade simpática vasomotora e provoca hipotensão arterial equivalente à que se observa após transecção espinal (Feldberg et al, 1972). Seu efeito simpatoexcitatório tônico ocorre através de projeções diretas para a IML, onde faz sinapses excitatórias (provavelmente glutamatérgicas) com SPNs

envolvidos com o controle do tono vasomotor (Ross et al, 1984; Dampney et al, 1987 Milner et al, 1988; Morrison et al, 1991).

Os núcleos da Rafe também se projetam diretamente para núcleos autonômicos da medula espinal (Bacon et al, 1990), no entanto, a inativação bilateral desta região provoca pouca alteração na atividade simpática.

De maneira semelhante ao observado quanto aos núcleos da rafe, embora o PVN esteja associado a regulação reflexa da atividade simpática em numerosas condições, seu papel na regulação tônica da atividade simpática vasomotora e da pressão arterial é discreto.

Outros núcleos bulbares que estão envolvidos com o controle do tono vasomotor como o CVL e o NTS, por exemplo, exercem seu efeito através de projeções para o RVL (Colombari et al, 2001, Guyenet, 2006).

É interessante notar que trabalhos anteriores aos de Aicher et al (1994), já haviam demonstrado a existência de neurônios bulboespinais em vários locais da região ventral da formação reticular, inclusive na região da GiDA (Ross et al,1984; Romagnano et al 1991). A análise dos resultados descritos nestes estudos sugere que neurônios retrogradamente marcados formam um conjunto contínuo desde a linha média, incluindo o núcleo magno da rafe, a formação gigantocelular *pars* α , a porção ventral do núcleo gigantocelular e a porção medial do núcleo paragigantocelular lateral. Esse conjunto de neurônios na região ventral do bulbo é chamado por alguns pesquisadores de região rostral ventro medial do bulbo (RVMM- Babic & Ciriello, 2004; Cox & Brody, 1989).

Em 1994 Aicher et al descreveram a participação funcional da porção ventral da formação reticular gigantocelular caudal na geração e controle do tono vasomotor simpático. A partir deste trabalho, o esquema clássico de pelo qual regiões do bulbo exercem o controle vasomotor tem sido reavaliada. A estimulação da GiDA produz uma importante simpatoinibição e hipotensão arterial. Uma vez que esta região possui projeções diretas para a medula espinal, ela pode ser considerada também um núcleo pré-motor simpático relacionado com o controle cardiovascular. A primeira evidência anatômica em favor de um papel simpatoinibitório desta região foi a demonstração que eferentes da GiDA fazem sinapses inibitórias com os SPNs (Aicher et al, 1995).

Diversos estudos já demonstraram marcação de neurônios na GiDA após microinjeções de traçadores retrógrados em diferentes estruturas relacionadas com a atividade simpática. Estudos que utilizaram o vírus atenuado da raiva como traçador retrógrado transneural injetado na adrenal (Strack et al, 1989; Kerman et al, 2003; Stornetta et al, 2004) e no gânglio estrelado de ratos (Jansen et al, 1995; Farkas et al, 1998; Krout et al, 2003) mostraram marcação primeiramente na IML, e então, em vários locais do bulbo, entre eles a GiDA.

É importante ressaltar que a técnica do transporte transneuronal não permite distinguir se a projeção bulboespinal se dirige diretamente a SPNs ou a interneurônios espinais com conexões aos SPNs.

Traçadores retrógrados como Fast Blue (Romagnano et al 1991; Stornetta et al, 1999) e Fluorogold (Aicher et al, 1995) foram injetados na IML de ratos. A análise dos bulbos destes animais mostrou muitos neurônios

retrogradamente marcados localizados nos núcleos da rafe, no núcleo reticular gigantocelular pars α (área correspondente a GiDA), no núcleo reticular paragigantocelular entre outras regiões. Estes achados confirmam a existência de projeções diretas da região da GiDA para a IML, validando assim, a primeira questão referente a hodologia da GiDA, que são suas projeções diretas para a IML.

5.3 Neurônios bulbares envolvidos com a integração autonômicamotora

Como todo comportamento envolve ajustes motores e vegetativos, foi interessante observar projeções da GiDA, marcadas com BDA, tanto para SPNs quanto para neurônios motores da região torácica da medula espinal. Essas projeções da GiDA para o corno ventral, para a coluna intermédio lateral, para o núcleo intercalado e para a área autonômica central, sugerem que esta região poderia constituir um centro de integração entre respostas motoras e autonômicas.

Desde os anos 40 sabe-se do envolvimento da região ventro medial da formação reticular no controle descendente da atividade motora. Um dos primeiros estudos neuroanatômicos a evidenciar uma via monosináptica entre neurônios da formação reticular e motoneurônios foi publicado por Zagon et al (1990). Estes pesquisadores fizeram depósitos iontoforéticos do traçador anterógrado PHA-L nos núcleos reticulares gigantocelular, gigantocelular pars alfa (região correspondente a GiDA), gigantocelular ventral, além dos núcleos

da rafe. E injeções do traçador retrógrado HRP nos músculos intercostais entre os segmentos T3 –T4. Ao examinarem segmentos da região torácica da medula espinal observaram que aproximadamente 72% das sinapses entre as fibras bulboespinais e os motoneurônios marcados eram sinapses simétricas, indicando que essas sinapses são inibitórias.

O desenvolvimento dos traçadores transneurais retrógrados (vírus atenuado da raiva – PRV) capazes de identificar vias neuroanatômicas polissinápticas, permitiu identificar neurônios que inervassem tanto estruturas motoras quanto simpáticas.

Com o objetivo de encontrar neurônios que pudessem fazer parte desta circuitaria, Kerman et al (2003) injetaram cepas diferentes de PRV no músculo gastrocnêmio e na medula adrenal de ratos. Foram observados muitos neurônios duplamente marcados em A7, Locus Coeruleus, núcleo subcoeruleus, núcleos na Rafe, núcleo gigantocelular ventral, núcleo gigantocelular pars alpha, RVL e A5. Interessante notar que a região correspondente a GiDA (identificada por estes autores como o núcleo reticular ventral) foi o local com maior número de neurônios duplamente marcados. Indicando que nestes locais onde foram encontrados neurônios duplamente marcados poderia ocorrer uma regulação concomitante das atividades muscular e simpática.

Em conjunto, estes trabalhos indicam que a GiDA poderia ser uma região inibitória tanto para os SPNs quanto para motoneurônios. No entanto, estudos que comprovem efetivamente que o mesmo neurônio localizado na GiDA e com projeções inibitórias para as estruturas citadas acima precisam ser

realizados. O fato de alguns estudos usarem vírus como traçadores não comprovam que a via em estudo é direta, ou seja, monosináptica.

5.4 Fibras eferentes da GiDA e neurônios simpáticos préganglionares

Os resultados obtidos por Aicher et al (1995) sugerem que a GiDA é capaz de modular a liberação de catecolaminas através das suas projeções diretas e inibitórias para os SPNs que originam a inervação simpática da adrenal. No entanto, a hipotensão arterial e a bradicardia observadas após a estimulação desta região, não podem ser atribuídos exclusivamente à diminuição da quantidade de catecolaminas circulantes. Sendo necessário verificar se além da modulação da secreção de catecolaminas, a GiDA pode exercer mediação direta da atividade simpática cardíaca e vasomotora.

Os resultados obtidos em nosso estudo são compatíveis com esta hipótese ao indicar que a GiDA também é capaz de influenciar, a tonicidade dos vasos mesentéricos, já que foram observadas muitas sobreposições entre seus eferentes e os SPNs que dão origem a inervação do gânglio celíaco, indicando uma das vias pela qual a GiDA pode exercer seu efeito simpainibidor.

Regiões capazes de influenciar tanto a atividade simpática quanto a secreção de catecolaminas foram demonstradas a partir do trabalho de Jansen et al (1995). Estes pesquisadores foram os primeiros a combinar duas formas de vírus atenuados da raiva utilizados como traçadores transneurais. Após

microinjeções destes na adrenal e no gânglio estrelado, estes pesquisadores observaram uma grande quantidade de neurônios duplamente marcados em diversos locais do tronco encefálico, no bulbo foi observada dupla marcação no RVL, no grupamento A5, no núcleo reticular paragigantocelular e nos núcleos da Rafe (obscuro, pálido e magno)

Na região da GiDA, denominada no trabalho de região ventral da formação reticular gigantocelular, também foram encontrados neurônios duplamente marcados. Estes achados indicam que esta região tem eferências tanto para SPNs que originam a inervação da adrenal quanto para aqueles que originam a inervação do gânglio estrelado. Provavelmente a GiDA pode influenciar a atividade vasomotora através da regulação da força de contratilidade e da freqüência cardíaca e da liberação de catecolaminas pela adrenal.

5.5 O efeito simpainibidor da GiDA e possíveis neurotransmissores

A estimulação química da GiDA com L-glutamato diminui a pressão arterial significativamente (Aicher et al, 1994). Projeções diretas desta região para a IML formam sinapses inibitórias com SPNs que dão origem a inervação da adrenal (Aicher et al 1995). Essas aposições ocorrem geralmente em ramificações proximais, o que indica que a GiDA exerce um forte efeito inibitório sobres estes neurônios, já que, sinapses em locais proximais dos neurônios geralmente causam uma inibição absoluta do sinal (Vu et al 1992).

As eferências da GiDA podem conter os neurotransmissores inibitórios que já foram localizados na formação reticular gigantocelular, como GABA (Stornetta et al, 2004), glicina (Stornetta et al 2004, Rampon et al, 1996) e serotonina (Chen et al, 2003). No entanto, destes neurotransmissores o candidato mais provável é o GABA, uma vez ue neurônios reticuloespinais da área gigantocelular contém GABA (Jones et al, 1991) e SPNs recebem contatos sinápticos GABAérgicos (Llewellyn-Smith 2002). Portanto, a possibilidade das sinapses inibitórias entre os eferentes da GIDA e os SPNs serem gabaérgicas é compatível com sua função simpatoinibitória.

6 CONCLUSÕES

- 1. As eferências bulbo-espinais da GiDA projetam-se para a IML, núcleo intercalado e área autonômica central
- As eferências da GIDA fazem aposições em neurônios simpáticos préganglionares.
- As eferências da GiDA fazem aposições em SPN, marcados retrogradamente com Fluorogold, que dão origem à inervação do gânglio celíaco.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aicher SA, Reis DJ, Ruggiero DA, Milner TA. Anatomical characterization of a novel reticulospinal vasodepressor area in the rat medulla oblongata. Neuroscience 1994;60:761-779.

Aicher SA, Reis DJ, Nicolae R, Milner TA. Monosynaptic projections from the medullary gigantocellular reticular formation to sympathetic preganglionic neurons in the thoracic spinal cord. J comp neurol 1995;363:563-580.

Aicher SA, Saravay RH, Cravo SL, Jeske I, Morrison SF, Reis DJ, Milner TA. Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarius to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. J comp neurol 1996;373: 62-75.

Aicher SA, Reis DJ. Gigantocellular vasodepressor area is tonically active and distinct from caudal ventrolateral vasodepressor area. Am j physiol (regulatory integrative comp physiol 41) 1997;272:R731-R742

Amendt K, Czachurski J, Dembowsky K, Seller H. Neurons within the "chemosensitive area" on the ventral surface of the brainstem which project to the intermediolateral column. Plüg arch 1978;375:289-292.

Blessing WW, Willoughby JO. Depressor neurons in rabbit caudal medulla do not transmit the baroreceptor-vasomotor reflex. Am J Physiol 1987; 253:H777-786.

Brown DL, Guyenet PG. Cardivascular neurons of brain stem with projections to spinal cord. American j physiol 1984;247:R1009-R1016.

Brown DL, Guyenet PG. Electrophysiological study of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla in rats. Circ res 1985;56:359-369.

Chen T, Dong YX, Li YQ. Fos expression in serotonergic neurons in the rat brainstem following noxious stimuli: an immunohistochemical double-labelling study. J.Anat. 203 (6):579-588, 2003.

Cravo SL, Morrison SF, and Reis DJ. Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla. Am. J. Physiol. 261: R985-R994, 1991.

Cravo SL, Lopes OU, Fraga CAB, Timo-Iara C. Cardiovascular adjustments in limb retraction provoked by noxious stimulation in decerebrate and spinal cats. Evidence for a somatotopic organization. Braz j med boil res 1995;28:385-396

Cravo SL. Sobre a regulação do fluxo sanguíneo. Tese de Livre Docência. Disciplina de Fisiologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2001

Cravo SL, Possas, OS Ferreira-Neto, ML. RVLM: an integrative site for muscle vasodilation during defense-alerting reactions. Cellular and Molecular Neurobiology, 23(2-3) 2003.

Dampney RAL, Goodchild AK, Robertson LG, Montgomery W. Role of ventrolateral medulla in vasomotor regulation: a correlative anatomical and physiological study. Brain res 1982;249:223-235.

Dampney RAL, Czachurski J, Dembowsky K, Goodchild AK, Seller H. Afferent connections and spinal projections of the vasopressor region in the rostral ventrolateral medulla of the cat. J auton nerv syst 1987;20:73-86.

Dampney RAL, Horiuchi J, Tagawa T, Fontes MAP, Potts PD, Polson JW. Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. Acta physiol scand 2003;177:209-218.
Deuchars SA, Milligan CJ, Stornetta RL, Deuchars J. GABAergic neurons in the central region of the spinal cord: a novel substrate for sympathetic inhibition. J neurosci 2005;25(5):1063-1070.

Feldberg W, Guertzenstein PG. A vasodepressor effect of pentobarbitone sodium. J physiol (London) 1972;224:83-103

Ferreira-neto ML, Possas OS, Cravo SL. Role of the rostral ventrolateral medulla (RVL) in the muscle vasodilation induced by hypothalamic stimulation. The physiologist 2000;43:265.

Ferreira-Neto ML, Possas OS, Lopes OU, Cravo SL. Evidence for a role of nitric oxide in the muscle vasodilation during defense reaction 2003 (submetido).

Gordon FJ, McCann LA. Pressor responses evoked by microinjections of Lglutamate into the caudal ventrolateral medulla of the rat. Brain res 1988 457:251-258.

Granata AR, Ruggiero DA, Park DH, Joh TH, Reis DJ. Lesions of epinephrine neurons in the rostral ventrolateral medulla abolish the vasodepressor components of baroreflex and cardiopulmonary reflex. Hipertension 1983;5:V80-V84

Granata AR, Ruggiero DA, Park DH, Joh TH, Reis DJ. Brainstem area C1 epinephrine neurons mediates baroreflex vasodepressor responses. Am j physiol 1985;248:H547-H567.

Granata AR, Numao Y, Kumada M, Reis DJ..A1 noradrenergic neurons tonically inhibit sympathoexcitatory neurons of C1 area in rat brainstem. Brain res 1986 377: 127-146.

Guertzenstein PG. Blood pressure effects obtained by drugs applied to the ventral surface of the brain. J physiol (London) 1973;229:395-408.

Guertzenstein PG, Silver A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. J physiol (London) 1974;242:489-503

Guertzenstein PG, Lopes OU. Cardiovascular responses evoked from the nicotine-semsitive area on the ventral surface of the medulla oblongata in the cat. J physiol(Lond.) 1973;229:395-408.

Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. Nature rev neurosc 2006;7:335-346

Guyenet PG, Sun DM-K. Role of GABA and excitatory aminoacids in medullary baroreflex pathway. Organization of the autonomic nervous system: central and peripheral mechanisms. Alan R. Liss Inc 1987 215-225 New York.

Hökfelt T, Fuxe K, Goldstein M, Johansson O. Immunohistochemical evidence for the existence of adrenaline neurons in rat brain. Brain res 1974;66:235-251.

Jansen ASP, Nguyen XV, Karpitskiy V, Mettenleiter TC, Loewy AD. Central command neurons of the sympathetic nervous system: basis of the fight-or-flight response. Science 1995;270:644-646.

Jeske I, Morrison SF, Cravo SL, Reis DJ. Baroreceptor inhibition of sympathoexcitatory neurons in the rostral ventrolateral medulla. Amer j physiol 1993. 264: R169-R178.

Koizumi K, Brooks, CMc. The integration of autonomic system reactions: a discussion of autonomic reflexes, their control and their association with somatic reactions. Ergbnisse der physiologie 1972;67:2-67.

Llewellyn-Smith IJ, Martin CL, Marcus JN, Yanagisawa M, Minson JB, Scammell TE. Orexin-immunoreactive inputs to rat sympathetic preganglionic neurons. Neurosci.Lett. 351 (2):115-119, 2003. Llewellyn-Smith IJ, Martin CL, and J. B. Minson. Glutamate and GABA content of calbindin-immunoreactive nerve terminals in the rat intermediolateral cell column. Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical 98 (1-2):7-11, 2002.

Milner TA, Pickel VM, Abate C, Joh TH, Reis DJ. Ultrastructural characterizrtion of substance – P like immunoreactive neurons in the rostral ventrolateral medulla in relation to neurons containing catecholamine-synthesizing enzymes. J comp neurol 1988;270:427-445

Morrison SF, Milner TA, Reis DJ. Reticulospinal vasomotor neurons of the rostral ventrolateral medula: relationship to sympathetic nerve activity and C1 adrenergic cell group. J neurosci 1988;8:1286-1301

Morrison SF, Reis DJ.Reticulospinal vasomotor neurons in the RVL mediate the somatosympathetic reflex. American j physiol 1989;256:R1084-R1097.

Morrison SF, Callaway J, Milner TA, Reis DJ. Rostral ventrolateral medulla: a source of the glutamatergic innervation of the sympathetic intermediolateral nucleus. Brain res 1991;562:126-135.

Possas OS, Lopes OU, Cravo SL. Glutamatergic and GABAergic imputs to the RVL mediate cardiovascular adjustments to noxious stimulation. Am j physiol 2001;280(2):R434-440

Romagnano MA, Harshbarger RJ, hamill RW. Brainstem enkephalinergic projections to spinal autonomic nuclei. J neurosci 1991; 11(11):3539-3555

Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M. Distribution of glycineimmunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. Neuroscience 1996;75(3):737-755.

Ross CA, Armstrong DM, Ruggiero DA, Pickel VM, Joh TH, Reis DJ. Adrenaline neurons in the rostral ventrolateral medulla innervate thoracic spinal cord: a

combined immunocytochemical and retrograde transport demonstration. Neurosci lett 1981;25:257-262

Ross CA, Ruggiero DA, Park DH, Joh TH, Sved AF, Fernandez-Pardal J, Saavedra JM, Reis DJ. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. J neurosci 1984;4:479-494

Ruggiero DA, Cravo SL, Arango V Reis DJ. Central control of the circulation by the rostral ventrolateral reticular nucleus: anatomical substrates. In J Ciriello, C Polosa, MM Caverson [eds]. The cental neural organization of cardiovascular control. Progress in brain research 1989, vol.81, pp29-79.

Ruggiero DA, Cravo SL, Golanov E, Gomez R, Anwar M, Reis DJ. Adrenergic and non-adrenergic spinal projections of a cardiovascular-active pressor área of medulla oblongata: quantitative topographic analysis. Brain res 1994;663:107-120.

Stornetta RL, McQuiston TJ, Guyenet PG. GABAergic and glycinergic presympathetic neurons of rat medulla oblongata identified by retrograde transport of pseudorabies virus and in situ hybridization. J comp neurol 2004;479 (3):257-270.

Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB, Loewy AD. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. Brain res 1989;491:156-162.

Sved AF, Cano G, Card JP. Neuroanatomical specificity of the circuits controlling sympathetic outflow to differents targets. Clinical and Exp Pharmacol and Physiol 2001;28:115-119.

Tang H, Hammond P, Brimijoin S. Acetylcholinesterase Immunolesioning: Regional Vulnerability of Preganglionic Sympathetic Neurons in Rat Spinal Cord. Exp neurol 1998;152:167-176.

Tang H, Brimijoin S. Death of preganglionic sympathetic neurons after surgical or immunologic lesion of peripheral processes. Exp neurol 2002;177:105-114.

Timo-Iaria C. Fisiologia do sistema nervosa. Em: Fisiologia básica. Ed. Margarida M Aires. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1985

Vu ET, Krasne FB. Evidence for a computational distinction between proximal and distal neuronal inhibition. Science 1992;255:1710-1712.