RENATA FRAZÃO

**ENVOLVIMENTO DOS NÚCLEOS DA RAPE NAS RESPOSTAS
ADAPTATIVAS A ALTERAÇÕES DE VOLUME SANGÜÍNEO EM
RATOS, ESTUDO ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE Fos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Neurociências e Comportamento.

SÃO PAULO

2004

RENATA FRAZÃO

**ENVOLVIMENTO DOS NÚCLEOS DA RAFE NAS RESPOSTAS
ADAPTATIVAS A ALTERAÇÕES DE VOLUME SANGÜÍNEO EM
RATOS, ESTUDO ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE Fos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Neurociências e Comportamento.

Área de concentração: Neurociências e comportamento.

Orientadora: Maria Inês Nogueira, Prof. Dr.

SÃO PAULO

2004

***Ficha Catalográfica preparada pelo Serviço de Biblioteca
e Documentação do Instituto de Psicologia da USP***

Frazão, R.

Envolvimento dos núcleos da rafe nas respostas adaptativas a alterações de volumes sanguíneo em ratos, estudo através da expressão de Fos./ Renata Frazão. – São Paulo: s.n., 2004. – 102 p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. Núcleo de Pesquisa em Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Maria Inês Nogueira.

1. Núcleos da rafe 2. Fos 3. Ratos 4. volume sanguíneo 5. Imunohistoquímica 6. serotonina I. Título.

*ENVOLVIMENTO DOS NÚCLEOS DA RAFE NAS RESPOSTAS ADAPTATIVAS
A ALTERAÇÕES DE VOLUME SANGÜÍNEO EM RATOS, ESTUDO ATRAVÉS
DA EXPRESSÃO DE Fos*

RENATA FRAZÃO

BANCA EXAMINADORA

(Nome e Assinatura)

(Nome e Assinatura)

(Nome e Assinatura)

Dissertação defendida e aprovada em: __/__/__

“Amar ou ter Amado é o que basta”

(Victor Hugo)

Aos meus pais Clodoaldo e Rosa Frazão, meu “Amor” por
ambos é Eterno, Forte e Incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, Coordenador do programa de pós-graduação em Psicologia, área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Ao Prof. Dr. Edson Liberti, Professor Titular e Chefe do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Obrigada não só pelas oportunidades dentro deste Departamento, mas principalmente, por segurar minha mão em momentos de dificuldade.

Ao Prof. Dr. Nilton Alves, o primeiro a abrir as portas da vida científica para mim, responsável pelo início da minha carreira anatômica. Obrigada principalmente pelo carinho demonstrado.

Ao Prof. Dr. Bruno König, que me recebeu pela primeira vez no Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo no ano de 1999, sem dúvida muito importante para o meu desenvolvimento científico.

À Profa. Dra. Ingrid Dragan Taricano, Diretora da Faculdade de biomedicina da Universidade de Santo Amaro, pelas oportunidades.

Aos Professores: Débora Rejane Fior Chadi, Emma Otta, Fernando José Leite Ribeiro, Gerson Chadi, Jackson Cioni Bittencourt, Lisete Compagno Michelini, Renato Paulo Chopard e Vera Silvia Raad Bussab, pelo aprendizado.

Aos alunos de pós-graduação e iniciação científica do Laboratório de biologia celular e anatomia funcional coordenado pela Profa. Dra. Maria Luiza M. Barreto de Chaves.

Ao Adevaire Urenha Alves, pelas lições de dissecação.

À Idalina de Fátima, secretária do Núcleo de Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia, pela colaboração.

Ao José Amaro Martins, responsável pelo biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo, pela atenção e sorrisos.

À Maria do Socorro Pereira, por todo “Help”, por todos os sorrisos.

Ao Nilson Silva Souza, pela ajuda e carinho.

Aos amigos “anatômicos”: Edison Alexander Cardoso, Emílio Geiriassati, Fernando Fusari, Leandro Nobeschi, Paulo Lâino Cândido, Luís Altruda, Gilberto Aprobato, Marcelo Trulha Valente, Luciano Ferreira Celestino, Paula Cristina Groff, Roberta Giampani. O apoio de todos em diversos momentos foi fundamental para o meu crescimento profissional.

A “Seres Humanos” especiais que Deus colocou em meu caminho ao longo deste trabalho: Alexandre Boto Denadai de Souza, Daniela da Costa Silva, Gevânio Neves de Menezes, Márcio Manoel de Moraes Lesma, Rhowena Jane B. Matos, Rozana Beatriz Franco Baccaro, Silmara Regina Varani, Tio Márcio Ken – iti Abe.

E por fim, aos “Meus Alunos”, com os quais “Aprendo” todos os dias.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À equipe do Laboratório de Neurociências do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo:

Profa. Dra. Maria Inês Nogueira, pela orientação e paciência;

Arthur George Schmidt, brigas entre dois irmãos são constantes, mas meu amor e respeito por você são verdadeiros;

Cristiano Mendes da Silva, pela amizade;

Fábio César Prosdócimi, obrigada por caminhar lado a lado nesta jornada;

Luciana Pinato e Luis Fernando Takase, com vocês aprendi que qualquer motivo é motivo para comemoração, que devemos rir das nossas próprias falhas e principalmente das dos nossos amigos, que é delicioso estarmos juntos em momentos de grande alegria, mas que o mais importante é estarmos prontos para amparar uns aos outros em momentos de dificuldade, obrigada por estarem sempre comigo;

Mãe Laura Kiyomi Abe, por todos os cuidados e por ser o meu tônus muscular, com quem aprendi a ter postura e equilíbrio durante este período;

Sandra Lopes de Souza, Profa. da Universidade Federal de Pernambuco, pela infinita bondade e companheirismo.

Wilma Allemandi, com a qual aprendi a ser um “Ser humano” um pouquinho melhor.

À minha Família biológica, em especial meus GRANDES AMORES: vovô Mário Frazão (*In memorian*), minha “irmã” Claudia Henríquez Frazão, Clotilde Frazão, Leandro Moraes Januário, Raphael Moraes Januário, Renata Zotarelli Tavares de Moraes. Desculpe-me pelo tempo em que não pude estar com vocês para que pudesse concluir este trabalho.

Às minhas Famílias não biológicas:

Família Carraresi Schnitzlein, Família Kamikawa, Família Floriano Pissardo, Família Pinato Yuri Muriqui. Deus as colocou em meu caminho, só tenho a agradecê-las pelo apoio incondicional e amor concedido.

À Profa. Dra. Carol Fuzeti Elias e ao Prof. Dr. Luis Roberto Giogerti de Britto, a ambos meu eterno respeito e gratidão.

À Cleide Rosana Duarte Prisco, por ser a “Luz” deste trabalho.

SUMÁRIO:

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
Núcleos da rafe.....	2
Regulação do sistema cardiovascular.....	11
Fos.....	15
Proposição.....	20
2. METODOLOGIA.....	21
Animais utilizados.....	22
Condições experimentais.....	23
Punção cardíaca.....	24
Cirurgia de canulação.....	25
Perfusão.....	27
Imunohistoquímica.....	29
Análise dos resultados.....	31

3. RESULTADOS.....	35
Análise quantitativa dos neurônios Fos-IR.....	36
Análise quantitativa dos neurônios 5-HT/Fos-IR.....	49
Percentual de neurônios serotoninérgicos.....	59
4. DISCUSSÃO.....	68
5. CONCLUSÕES.....	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE FIGURAS

- 1- Corte sagital de encéfalo de rato, na lateral -0,10 mm. ressaltando os núcleos da rafe (PAXINOS e WATSON, 1998).....2
- 2- Esquema básico da expressão da proteína Fos. O receptor estimulado, abre os canais de Ca^{++} , este no citoplasma ativa a enzima Ca/calmodulina (CaM) quinase II, que então fosforila o fator de transcrição CREB, o qual por sua vez induz a expressão do proto-oncogen *c-fos* ao se ligar ao sítio CRE do DNA. A proteína Fos produzida se dimeriza com outra proteína, a Jun, para formar o complexo AP-1, que irá regular a transcrição dos genes cujas estruturas tenham o sítio de ligação para o complexo AP-1. (modificado de GOLOMBEK e RALPH, 1996 por TAKASE, L. F, 2001).....19
- 3- Fotomicrografias de cortes coronais (40mm) do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando em A: neurônio 5-HT/Fos-IR e, em B: neurônios Fos-IR, considerados na contagem. A barra representa 50mm em A e 100mm em B..... 34
- 4- Média do número total de neurônios Fos-IR,+ erro padrão, nos núcleos da rafe: Li, DR, MnR, PnR, RMg, RPa, ROb nos grupos: hipovolemia (Hipo, N=6), controle hipovolemia (C hipo, N=6), hipervolemia (Hiper, N=5) e controle hipervolemia (C hiper, N=5). a indica diferença entre os grupos Hipo e Hiper, b entre os grupos Hipo e C Hiper, c entre os grupos C Hipo e Hiper e d entre C Hipo e C Hiper.....39

5- Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR, + erro padrão, no Li ao longo do eixo ântero-posterior (AP) no encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	40
6- Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR,+ o erro padrão, no DR ao longo do eixo ântero-posterior (AP) no encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	41
7- Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR, + o erro padrão, no MnR ao longo do eixo ântero-posterior (AP) no encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	42
8- Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR, + o erro padrão, no núcleo PnR ao longo do eixo antero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	43
9- Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR, + o erro padrão, no RMg ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	44
10- Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR no RPa, + o erro padrão, ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	45

11- Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR no ROb, + o erro padrão, ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	46
12- Esquemas (A e C) e fotomicrografias em campo claro (B e D), de cortes coronais do encéfalo de ratos Wistar. Os desenhos esquemáticos evidenciam a localização dos núcleos paraventricular do hipotálamo (A) e da substância cinzenta periaquedutal (C), indicados pelas setas. Em B neurônios Fos-IR no núcleo paraventricular do hipotálamo, em D neurônios Fos-IR na substância cinzenta periaquedutal, ambos do grupo Hipo. As barras representam 100mm.....	47
13- Esquemas (A e C) e fotomicrografias em campo claro (B e D), de cortes coronais do encéfalo de ratos Wistar. Os desenhos esquemáticos evidenciam a localização do locus coeruleus (LC) em A e do núcleo trato solitário (NTS) em C, indicados pelas setas. Em B neurônios Fos-IR no LC, em D neurônios Fos-IR no NTS, ambos do grupo Hipo. As barras representam 100mm.....	48
14- Média do número total de neurônios 5-HT/Fos-IR, + erro padrão, nos núcleos da rafe: Li, DR, MnR, PnR, RMg, RPa, ROb nos grupos: hipovolemia (Hipo, N=6), controle hipovolemia (C hipo, N=6), hipervolemia (Hiper, N=5) e controle hipervolemia (C hiper, N=5). a indica diferença entre os grupos Hipo e Hiper, b entre os grupos Hipo e C Hiper, c entre os grupos C Hipo e Hiper e d entre C Hipo e C Hiper.....	51

15- Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR, + o erro padrão, no Li ao longo do eixo ântero-posterior (AP) no encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	52
16- Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR, + o erro padrão, no DR ao longo do eixo ântero-posterior (AP) no encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	53
17- Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR, + o erro padrão, no MnR ao longo do eixo ântero-posterior (AP) no encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	54
18- Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR, + o erro padrão, no PnR ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	55
19- Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR, + o erro padrão, no RMg ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	56
20- Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR no RPa, + o erro padrão, ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	57

21- Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR no ROb, + o erro padrão ROb, ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.....	58
22- Média em % do número total de neurônios 5-HT/Fos-IR, + erro padrão, nos núcleos da rafe: Li, DR, MnR, PnR, RMg, RPa, ROb nos grupos: hipovolemia (Hipo, N=6), controle hipovolemia (C hipo, N=6), hipervolemia (Hiper, N=5) e controle hipervolemia (C hiper, N=5). c indica diferença entre os grupos entre os grupos C Hipo e Hiper, d entre C Hipo e C Hiper, e entre C Hipo e Hipo, f entre Hiper e C hiper e entre Hiper e Hipo.....	61
23- Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando o DR ao redor do bregma -8.76mm, no grupo C hipo. A- Fotomicrografia em fluorescência evidenciando neurônios 5-HT/Fos-IR, C- a mesma região em maior aumento. B- Fotomicrografia em campo claro evidenciando neurônios Fos-IR. As barras representam 100mm.....	62
24- Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando o DR ao redor do bregma -8.76mm, no grupo C hiper. A- Fotomicrografia em fluorescência evidenciando neurônios 5-HT/Fos-IR, C- a mesma região em maior aumento. B- Fotomicrografia em campo claro evidenciando neurônios Fos-IR. As barras representam 100mm.....	63
25- Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando o RMg ao redor do bregma -11,36mm, no grupo Hipo. A- Fotomicrografia em fluorescência evidenciando neurônios 5-HT/Fos-IR, C- a mesma	

região em maior aumento. B- Fotomicrografia em campo claro evidenciando neurônios Fos-IR. As barras representam 100mm.....64

26- Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando o RMg ao redor do bregma -11,36mm, no grupo C hipo. A- Fotomicrografia em fluorescência evidenciando neurônios 5-HT/Fos-IR, C- a mesma região em maior aumento. B- Fotomicrografia em campo claro evidenciando neurônios Fos-IR. As barras representam 100mm.....65

27- Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando o ROb ao redor do bregma -14,16mm, no grupo Hipo. A- Fotomicrografia em fluorescência evidenciando neurônios 5-HT/Fos-IR, C- a mesma região em maior aumento. B- Fotomicrografia em campo claro evidenciando neurônios Fos-IR. As barras representam 100mm.....66

28- Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando o ROb ao redor do bregma -14,16mm, no grupo C hipo. A- Fotomicrografia em fluorescência evidenciando neurônios 5-HT/Fos-IR, C- a mesma região em maior aumento. B- Fotomicrografia em campo claro evidenciando neurônios Fos-IR. As barras representam 100mm.....67

LISTA DE TABELAS

- 1- Extensão das subdivisões dos núcleos da rafe ao longo do eixo ântero-posterior.
Os valores representam os níveis posteriores ao bregma.....33
- 2- Média do número total de neurônios Fos-IR nos núcleos da rafe em resposta a
alterações de volume sangüíneo.....38
- 3- Média do número total de neurônios 5-HT/Fos-IR nos núcleos da rafe em
resposta a alterações de volume sangüíneo.....50
- 4- Média do número total da % neurônios 5-HT/Fos-IR nos núcleos da rafe em
resposta a alterações de volume sangüíneo.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3V terceiro ventrículo
5-HT serotonina
5-HT/Fos-IR neurônios serotoninérgicos Fos imunoreativos
AP ântero-posterior
Aq aqueduto do mesencéfalo
Bs basal
C hiper controle hiper
C hipo controle hipo
CILM coluna intermédio lateral da medula espinal
CLi núcleo caudal linear da rafe
CREB proteína de ligação responsiva ao cAMP
CVLM área caudal ventrolateral da medula oblonga
DR núcleo dorsal da rafe
FAP sítio de ligação AP-1
Fos-IR neurônios Fos imunoreativos
GABA ácido gama-aminobutírico
Hiper hipervolemia
Hipo hipovolemia
IO oliva inferior
LC locus coeruleus
Li núcleo linear da rafe
ml lemnisco medial
mlf fascículo longitudinal medial
MnR núcleo mediano da rafe
mRNA RNA mensageiro
NTS núcleo trato solitário
PA pressão arterial
PnR núcleo pontino da rafe
PVN núcleo paraventricular do hipotálamo
RLi núcleo rostral linear da rafe
RMg núcleo magno da rafe
RPa núcleo pálido da rafe
ROb núcleo obscuro da rafe
RVLM área rostral ventrolateral da medula oblonga
SIE *sis*-elemento induzível
SRE elemento responsivo do soro
SRFs fatores responsivos do soro
TRH hormônio liberador da tirotropina

RESUMO

Estudos prévios demonstram projeções dos núcleos da rafe para áreas clássicas relacionadas ao controle do sistema cardiovascular, como locus coeruleus, núcleo do trato solitário, coluna intermédia lateral da medula espinal, núcleos motor dorsal do vago e ambíguo. Baseado nesta informação este estudo investigou a participação dos núcleos da rafe nas respostas adaptativas a estímulos de hipervolemia e hipovolemia. Foram utilizados ratos machos (Wistar), adultos, mantidos em biotério sob condições controladas, divididos em cinco grupos: hipovolemia (Hipo, submetidos à punção cardíaca com remoção sangüínea), controle da hipovolemia (C hipo, submetidos à punção cardíaca sem remoção sangüínea), hipervolemia (Hiper, submetidos à cirurgia para canulação da veia jugular externa e adição de solução salina no sexto dia pós-cirúrgico), controle da hipervolemia (C hiper, submetidos à cirurgia para canulação da veia jugular externa sem adição de solução salina) e basal (BS). Após 90 minutos do estímulo, os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos transcardiacamente com salina seguida de fixador Paraformaldeído + Bórax 4%, 4°C, pH 9,5. Os encéfalos foram removidos pós-fixados, crioprotetidos e seccionados em cortes coronais de 40 µm e processados com técnicas de imunohistoquímica contra Fos e 5-HT. Os estímulos de hipo e hipervolemia não causaram aumento significativo dos neurônios Fos-imunoreativos ou 5HT/Fos-imunoreativos. Nos núcleos Li, DR, MnR, RMg e ROb o grupo C hipo apresentou maior número de neurônios Fos-IR e 5HT/Fos-IR em relação ao grupo C hiper. Os resultados sugerem que os núcleos da rafe não participam nas repostas adaptativas aos estímulos aplicados. Entretanto, os mesmos parecem estar envolvidos em processos de nocicepção, seja através da 5-HT ou de outras substâncias neuroativas, presentes nestes núcleos.

ABSTRACT

Previous studies presented projections from the raphe nuclei to areas related to the cardiovascular control, like the *locus coeruleus*, nucleus of the solitary tract, spinal cord intermediolateral column, dorsal motor vagus and ambiguus nuclei. Based in this information, the present work analyzed the participation of the raphe nuclei in the adaptative responses to hypovolaemia and hypervolaemia. Were used wistar rats, kept in controlled conditions, divided in 5 groups: hypovolaemia (Hypo, cardiac puncture and blood extraction), hypovolaemia control (C Hypo, cardiac puncture without blood extraction), hypervolaemia (Hyper, external jugular vein cannulation surgery and saline addition), hypervolaemia control (C Hyper, external jugular vein cannulation surgery and no saline addition) and basal condition (BS). Ninety minutes after the stimulus, the animals were anesthetized and perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde plus borax, pH 9.5 at 4°C. The brains were removed, post-fixed, cryoprotected, sectioned in 40µm thickness coronal slices and proceeded with double-labeling immunohistochemistry techniques against Fos protein and serotonin. The Hypo and Hyper stimuli presented no significant increase of Fos-IR and double-labeled neurons. The C Hypo group presented higher number of labeled neurons in the Li, DR, MnR, RMg and ROb nuclei in comparison to the group C Hyper. These results suggest that the raphe nuclei have no participation in the adaptative responses to the volemy stimuli. However, this nuclei seems to be related to the nociception no modulated just by the serotonin but by others neurotransmitters too.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Núcleos da rafe

Os núcleos da rafe formam uma coleção de neurônios disposta ao longo da linha sagital mediana do tronco encefálico, se estendendo do núcleo interpeduncular no mesencéfalo até a decussação das pirâmides na medula oblonga. Estes grupamentos neuronais são denominados: núcleos linear (Li), dorsal (DR), mediano (MnR), pontino (PnR), magno (RMg), pálido (RPa) e obscuro (ROb) (Figura 1). Alguns destes núcleos têm seus limites claramente definidos em relação a áreas do tegmento do tronco, enquanto, outros se confundem com estruturas da formação reticular (TORK, 1985).

FIGURA 1 - Corte sagital de encéfalo de rato, na lateral -0,10 mm. ressaltando os núcleos da rafe (PAXINOS e WATSON, 1998).

O estudo sobre os núcleos da rafe ganhou impulso a partir dos trabalhos de Dahlstron e Fuxe (1964). Estes autores demonstraram que estes núcleos constituem a principal fonte serotoninérgica para o sistema nervoso central, formando circuitos locais na formação reticular e enviando projeções para diversas regiões encefálicas. A partir desses estudos, várias publicações descreveram estes núcleos em diferentes espécies, entre estas, ratos (TORK, 1985), gatos (BRODAL, 1984; TABER et al., 1960), sagüis (HORNUNG e FRITSCHY, 1988) e humanos (BAKER et al., 1991a, 1991b; HALLIDAY et al., 1988a; TÖRK e HORNUNG, 1990).

A serotonina (5-HT) é o principal neurotransmissor sintetizado núcleos da rafe, embora, estes possam apresentar populações heterogêneas de neurônios, que por sua vez, apresentam co-localização com outras substâncias neuroativas, com morfologia, projeções e características neuroquímicas distintas. Estes neurônios podem ser identificados através de técnicas específicas de imunohistoquímica para 5-HT (STEINBUSCH et al., 1981), para seu precursor, o 5-hidroxitriptofano (TORET et al., 1987) ou ainda para sua enzima de síntese, a triptofano-hidroxilase (WEISSMANN et al., 1987). Sabe-se que as funções as quais os neurônios serotoninérgicos estão relacionados dependem da distribuição celular dos diferentes subtipos de receptores para a 5-HT (HORNUNG, 2003). Com base nas suas características estruturais e operacionais, os receptores para 5-HT estão divididos em sete classes distintas (5Ht1 a 5HT7), sendo identificados 14 subtipos (HOYER et al., 2002).

O Li é comumente subdividido em dois núcleos: núcleo rostral linear da rafe (RLi) e núcleo caudal linear da rafe (CLi). O RLi, em ratos, é o grupamento situado rostralmente em relação aos demais núcleos da rafe, se estende desde a

decussação supramamilar até a decussação tegmental ventral, que atravessa o núcleo em sua parte final (BRODAL, 1984). O CLi se inicia ventralmente à decussação tegmental ventral e caudal ao núcleo rubro até a margem anterior da decussação cerebelar superior, onde se observa o início do DR (JACOBS e AZMITIA 1992, VERTES e KOCSIS, 1994). No CLi encontram-se além dos neurônios serotoninérgicos, neurônios que expressam a tirosina hidroxilase, substância P e a proteína EP3R (HALLIDAY et al., 1990; NAKAMURA et al., 2000).

O núcleo RLi, juntamente com o PnR estão intimamente relacionados a vasos sanguíneos, com seus neurônios agregados ao longo destas estruturas, assim, algumas hipóteses foram elaboradas sobre as possíveis funções destes núcleos; Scheibel et al., (1975) sugeriu que estes neurônios possam apresentar papel neurosecretor, atuar como quimiossensores para substâncias circulantes no sangue, ou ainda, modular o fluxo sanguíneo, pressão arterial ou o tônus das paredes vasculares.

O DR é o maior núcleo da rafe, contendo aproximadamente 40% das células serotoninérgicas de todo o encéfalo (VERTES e KOCSIS, 1994). Além de 5-HT, muitos neurônios da porção rostral do DR apresentam substância P, com uma proporção estimada de co-localização dos dois neurotransmissores, 5-HT e substância P de 40% (BAKER et al., 1991b), além de outros neurônios que sintetizam catecolaminas ou neuropeptídeos como a dinorfina, angiotensina, encefalina ou neurotensina, proteína EP3R e ácido gama aminobutírico (GABA) (JENNES et al, 1982; BJÖRKLUND e HÖKFELT, 1985; BJÖRKLUND et al., 1990; NAKAMURA et al., 2000; ISHIDA et al, 2001). A porção rostral deste núcleo localiza-se próxima à substância cinzenta periaquedutal, inferiormente ao aqueduto do mesencéfalo (Aq) (IMAI 1986, JACOBS e AZMITIA, 1992). O DR é maior em

seu aspecto rostral, na região do núcleo troclear, e torna-se menor à medida que se estende caudalmente. Suas células estão dispostas ao longo da margem rostral e caudal do núcleo do nervo oculomotor, as partes laterais são mais desenvolvidas ao nível do núcleo troclear; esta parte do núcleo estende-se caudalmente e pode ser observada na substância cinzenta da ponte inferiormente ao IV ventrículo (JACOBS e AZMITIA, 1992). O DR envia projeções para outros núcleos da rafe, MnR, PnR, RMg e ROb; estruturas do mesencéfalo e tronco encefálico, como formação reticular mesencefálica, núcleos parabraquiais lateral e médio, núcleo pontino oral, locus coeruleus (LC), estruturas da medula espinal, núcleo facial, núcleo prepósito do hipoglosso, núcleo do hipoglosso (VERTES e KOCSIS, 1994), núcleos caudado e putâmen, amígdala, substância negra e hipocampo (IMAI et al., 1986).

Kayama et al. (1989) demonstraram, em ratos, que o DR está envolvido em processos visuais, já que, neurônios serotoninérgicos pertencentes a este núcleo projetam-se para o núcleo do corpo geniculado lateral. Tal envolvimento também foi observado em gatos por Foote et al. (1978), já que estes autores demonstraram haver projeções do DR para células da retina. O núcleo DR também pode estar envolvido, entre outros, em processos de nocicepção visto suas projeções para núcleos do tálamo (VERTES et al, 1999). Além do que, está relacionado ao sono REM, regulação de funções autonômicas via projeções para o complexo parabraquial e modulação de funções moto-sensoriais via projeções para os nervos cranianos (VERTES e KOCSIS, 1994). Assim, lesões seletivas em diferentes porções deste núcleo da rafe, podem alterar drasticamente numerosos parâmetros comportamentais como aprendizado, memória, sono e movimento (IMAI et al., 1986).

O núcleo MnR tem seus limites bem definidos na porção mediana da ponte, se estendendo desde a decussação do pedúnculo cerebelar superior, no aspecto

caudal e lateral do núcleo interpeduncular, até o núcleo tegmentar ventral. Caudalmente à margem anterior deste núcleo está localizado o corpo trapezóide, a margem dorsal do MnR se confunde com o componente ventromedial do DR (JACOBS e AZMITIA 1992; VERTES et al, 1999). Baker et al., 1991b, observou que na região mediana deste núcleo, em humanos, 80% dos neurônios sintetizam 5-HT e que poucos neurônios contêm substância P. Os neurônios que formam este núcleo podem apresentar também, colecistoquinina, dinorfina, encefalina ou neurotensina (BJÖRKLUND e HÖKFELT, 1985; BJÖRKLUND et al, 1990; SCHIFFMANN e VANDERHAEGHEN, 1991).

O MnR envia projeções para outros núcleos da rafe, como o DR, ROb, RPa e RMg, e para diversas regiões encefálicas (VERTES et al, 1999). Van de Kar e Lorens (1979) já haviam sugerido ser este núcleo a principal fonte de fibras serotoninérgicas para o núcleo supraquiasmático, área anterior do hipotálamo e área medial pré-óptica em ratos. Rostralmente este núcleo projeta-se para estruturas da linha média como núcleo interpeduncular, corpo mamilar medial, núcleo posterior do hipotálamo, núcleos intralaminares do tálamo, zona incerta, região lateral da habênula, núcleos da banda diagonal, área septal e hipocampo. A região lateral da habênula apresenta extensas projeções para o MnR o que suporta a afirmativa de que estas estruturas são componentes críticos no circuito que une o sistema límbico ao mesencéfalo (VERTES et al., 1999).

Através de suas projeções para núcleo tegmental lateral dorsal, o MnR está relacionado, associado ao DR, ao controle do sono. Conexões recíprocas entre os dois núcleos, além de suas projeções para áreas em comum, como, por exemplo, o hipocampo (AZMITIA e SEGAL, 1978), sugerem a coordenação das atividades durante certas condições de comportamento, possivelmente atuando na liberação da

5-HT no encéfalo (VERTES et al, 1999). O MnR pode também estar envolvido na liberação de gonadotrofina através de suas projeções para parte anterior e medial da zona incerta (MORELLO e TALEINSNIK, 1985). Experimentos eletrofisiológicos o têm relacionado com o aumento da secreção exócrina do pâncreas e aumento da pressão arterial em ratos anestesiados (PARK et al., 1995).

Na margem caudal do MnR localiza-se o núcleo PnR; suas células estão localizadas ventralmente ao fascículo longitudinal medial (mlf) e se estendem caudalmente a porção rostral do núcleo abducente. Na porção caudal suas células estão situadas dorsalmente ao RMg (JACOBS e AZMITIA, 1992). Além de neurônios que sintetizam a 5-HT, este núcleo apresenta neurônios que sintetizam e a proteína EP3R (NAKAMURA et al., 2000).

O RMg se estende rostro caudalmente do ponto de emergência do nervo hipoglosso até a oliva superior sobrepondo-se ao corpo trapezóide e margem dorsal do leminisco medial, sendo contínuo em certos pontos com o RPa e ROb. (JACOBS e AZMITIA, 1992). Substância P e hormônio liberador da tirotropina (TRH) são encontrados em numerosos neurônios destes núcleos, também co-localizados com 5-HT na mesma célula (HALLIDAY et al., 1988b; POULAT et al., 1992; WU et al., 1993), este núcleo também apresenta neurônios que sintetizam a proteína EP3R (NAKAMURA et al., 2000).

Bowker (1986), demonstrou que o RMg e ROb se projetam para a região lombar da medula espinal. O RMg também apresenta projeções para cerebelo (TAKAGI et al., 1981), núcleo do trato solitário (NTS), núcleo motor dorsal do vago e coluna intermédio lateral da medula espinal (CILM) (BAUSBAUM et al., 1978). Estudos morfofuncionais mostram que o RMg está relacionado principalmente à modulação da analgesia através da inibição de neurônios nociceptivos na região

caudal do núcleo espinal do trigêmeo e coluna posterior da medula espinal (BAUSBAUM et al., 1978; SIM e JOSEPH, 1992), controle da temperatura corpórea (BOWKER, 1986), e possivelmente ao controle do sistema cardiovascular, através de suas projeções para o NTS, núcleo motor dorsal do vago e CILM.

O RPa se estende do nervo hipoglosso até o pólo rostral da oliva inferior. Seus neurônios estão em um grupo compacto entre o tracto piramidal. A margem dorsal é contínua rostralmente com a porção menos densa do RMg (JACOBS e AZMITIA, 1992). Além da 5-HT, TRH, e a proteína EP3R também são encontrados em neurônios deste núcleo (PALKOVITS et al., 1986; NAKAMURA et al., 2000). Nogueira *et al.*, (1996, 2000) conseguiram identificar aferências ao RPa através da utilização de traçadores retrógrados e anterógrados, obtendo evidências de um quadro de aferências diferenciado de regiões hipotalâmicas, especialmente hipotálamo lateral e PVN, área pré-óptica, núcleos mesencefálicos, pontinos e bulbares. Projeta-se, ainda, para os núcleos facial, hipoglosso, ambíguo e motor do nervo trigêmeo (HOLSTEGE, 1987; MARTIN et al. 1990). Sabe-se que, o RPa está envolvido em funções autonômicas e somáticas do sono paradoxal (SAKAI, 1985; WEBSTER et al., 1986); relata-se também a relação deste núcleo com motilidade gástrica e contratilidade intestinal (YANG et al., 1993; GARRICK et al., 1994). Através de suas projeções serotoninérgicas para o núcleo motor dorsal do vago o RPa também está envolvido no controle neural da mucosa gástrica (KANEKO et al., 1998).

Projeções do RPa para a CILM e para a raiz ventral, incluindo os neurônios autonômicos pré ganglionares e motoneurônios somáticos (SATO, 1979; HOLSTEGE e KUYPERS, 1987; JONES et al., 1986; ALSTERMARK *et al.*, 1987) sugerem que este núcleo esteja relacionado à motricidade visceral. Loewy et al.

(1981a) e Loewy (1981b), sugerem, ainda, que projeções provenientes não só do RPa, mas também do RMg e ROb, para a CILM, relacionem estes núcleos ao controle do sistema respiratório e cardiovascular. Morrison e Gebber (1982, 1985) demonstraram através de estudos eletrofisiológicos em gatos, que os neurônios dos núcleos caudais da rafe podem apresentar padrões diferentes relacionados à atividade dos nervos simpáticos; alguns neurônios são excitados pelos impulsos provenientes dos barorreceptores, indicando que os mesmos são simpatoinibitórios, enquanto, outros são inibidos por impulsos dos barorreceptores e são considerados simpatoexcitatórios, estes, entretanto não se projetam para a CILM e não são considerados neurônios pré-motores. Smith e Flynn, (1980) também relacionam estes núcleos à modulação dos sistemas citados, já que os mesmos participam na atividade do nervo frênico e frequência respiratória, além de apresentarem papel vasomotor.

As células do ROb formam um simétrico grupo paramediano que se estende da margem caudal da ponte até a porção cervical da medula espinal, limitado ventralmente pela oliva inferior e dorsalmente pelo IV ventrículo. Na medula espinal, as células estão dispersas na substância cinzenta ventralmente ao canal central e na margem medial da coluna anterior. A maioria destes neurônios está associada com as fibras do mlf e o tracto tectoespinal (JACOBS e AZMITIA, 1992). O ROb, além de neurônios serotoninérgicos, contém neurônios que expressam TRH, substância P, proteína EP3R e galanina (PALKOVITS et al., 1986; HALLIDAY et al., 1988b; BLESSING e GAI, 1997; NAKAMURA et al., 2000).

Experimentos em gatos demonstram haver uma via serotoninérgica, proveniente do ROb, para regiões classicamente relacionadas ao controle do sistema respiratório, como NTS, na medula oblonga e, núcleo motor frênico na medula espinal; Sabe-se que a estimulação dos corpos celulares deste núcleo, ou alterações

no mecanismo sináptico, por exemplo, com uso de drogas antagonistas para a 5-HT, alteram a atividade do nervo frênico (HOLTMAN, 1986a; HOLTMAN et al., 1986b; MILLHORN, 1986, MILLHORN et al.1980; LALLEY et al., 1997).

Os núcleos da rafe são amplamente estudados, sua relevância funcional decorre do grande número de projeções as quais são relacionados, embora estas nem sempre são demonstradas de forma específica, visto que, para a modulação de um mesmo sistema diversas vias podem estar envolvidas. Moore et al. (1978), evidenciaram que a destruição de neurônios dos núcleos rostrais da rafe produzem acentuada diminuição na 5-HT telencefálica, de forma moderada no diencéfalo e mínima diminuição em estruturas localizadas inferiormente ao local da lesão, indicando que as principais projeções dos núcleos rostrais são ascendentes, embora as funções prejudicadas pela diminuição desta monoamina na região telencefálica não tenham sido descritas por esses autores.

O advento das técnicas de imunohistoquímicas para a detecção da proteína Fos e técnicas de autoradiografia proporcionou maior perspectiva em relação aos aspectos anatômico e funcional destes núcleos.

1.2 Regulação do sistema cardiovascular

A regulação do sistema cardiovascular, através de mudanças da frequência cardíaca, força de contração do coração e calibre dos vasos sanguíneos, é influenciada diretamente por mecanismos locais auto regulatórios, hormônios circulantes ou neurônios pós ganglionares do sistema nervoso autônomo. Estes neurônios, por sua vez, são controlados por neurônios pré ganglionares cujos corpos celulares estão em núcleos específicos (DAMPNEY, 1994).

Existem quatro classes de neurônios que formam a via para a regulação do sistema cardiovascular: neurônios aferentes primários, que transmitem sinais de receptores periféricos; interneurônios, que transmitem os impulsos primários aferentes ou impulsos provenientes do cérebro para neurônios pré-motores; neurônios pré-motores do sistema nervoso autônomo, estes se projetam para neurônios pré ganglionares e controlam sua atividade; e neurônios pré ganglionares, que apresentam funções como controle do coração, vasos sanguíneos, e medula adrenal (DAMPNEY, 1994).

Diferentes receptores influenciam a atividade dos neurônios autonômicos cardiovasculares. Dentre estes encontramos, barorreceptores arteriais, localizados principalmente no arco aórtico e seio carotídeo; barorreceptores cardíacos, localizados nas paredes dos átrios e ventrículos; e quimiorreceptores arteriais, localizados na artéria carótida e artéria aorta. As fibras aferentes destes receptores compõem parte do nervo glossofaríngeo e do nervo vago, e convergem para o NTS. Coletivamente estes receptores providenciam momento a momento informações sobre a pressão arterial (PA), canais cardíacos e grandes veias, assim como, a composição química do sangue arterial, controlando, desta forma, a inervação simpática e vagal para o sistema cardiovascular (IRIGOYEN e KRIEGER, 1998).

Estudos em ratos e coelhos demonstram haver cinco grupos celulares considerados como neurônios pré-motores para a regulação neural do sistema cardiovascular. Estes estão localizados na área rostral ventrolateral da medula oblonga (RVLM), área rostral ventromedial da medula oblonga, núcleos caudais da rafe, grupo A5 de células noradrenérgicas e núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (STRACK et al., 1989a, 1989b; WESSELINGH et al., 1989; DING et al., 1993). A RVLM é considerada a maior fonte de impulsos excitatórios para os neurônios pré ganglionares simpáticos cardiovasculares e, portanto, região crítica no reflexo cardiovascular (DAMPNEY et al., 1987; DAMPNEY, 1994; DING et al., 1993). As principais projeções para esta região, em gatos e ratos, são provenientes do NTS (DAMPNEY et al., 1987; ROSS et al., 1985), PVN e área hipotalâmica lateral (DAMPNEY et al., 1987).

Os neurônios pré ganglionares do sistema nervoso autônomo podem ser divididos em vagais e simpáticos. Os primeiros, localizados principalmente no núcleo ambíguo ou ao redor deste, e em menor extensão, no núcleo motor dorsal do vago, estão relacionados ao sistema nervoso parassimpático (NOSAKA et al., 1979; IZZO et al., 1993). Enquanto que, os neurônios pré ganglionares simpáticos, podem estar localizados nos segmentos torácicos ou lombares da medula espinal; CILM; substância branca do funículo lateral da medula espinal, podendo estar organizados em um grupo de células localizadas entre a CILM e o canal central; ou em um grupo de células localizadas em posição posterior e lateral ao canal central, comumente denominado de núcleo autonômico central (OLDFIELD e McLACHLAN, 1981; RANDO, et al. 1981).

Vias neurais centrais que conduzem o sinal dos barorreceptores se projetam para o NTS, para neurônios pré ganglionares simpáticos na CIML e para neurônios

pré ganglionares parassimpáticos nos núcleos ambíguo e dorsal do vago. Estas vias envolvem ainda projeções do NTS para neurônios na área caudal ventrolateral da medula oblonga (CVLM), onde células projetam-se para neurônios na RVLM, que por sua vez projetam-se para neurônios pré ganglionares simpáticos, em ratos e gatos (IRIGOYEN e KRIEGER, 1998; DAMPNEY et al., 1987).

A sensibilidade dos barorreceptores pode ser alterada por vários fatores hormonais, como a ação de vasopressina (MICHELINI e BONAGAMBA, 1988), angiotensina II, angiotensina III e angiotensina-(1-7) (CAMPAGNOLE-SANTOS, 1990, 1992).

Os impulsos aferentes para a coluna posterior da medula espinal também exercem forte influência no controle do sistema cardiovascular. Estes impulsos são provenientes de receptores viscerais, receptores cardíacos, aorta, vasos pulmonares e rins (SATO e SCHMIDT, 1973), provocam mudanças reflexas na atividade simpática e são transmitidos para estruturas como NTS, RVLM e formação reticular.

O NTS representa uma região envolvida não só no controle do sistema cardiovascular, mas também no controle de respostas sensoriais, por exemplo, em resposta à dor (LOVICK, 1993). Hochstenbach e Ciriello (1994), observaram que as áreas mais sensíveis que provocam hipotensão e diminuição do ritmo cardíaco estão relacionadas principalmente à região caudal e medial do NTS (contendo neurônios simpatoinibitórios) e subnúcleo (contendo neurônios simpatoexcitatórios). Já a região ventral deste núcleo e o núcleo motor dorsal do vago provocam respostas pressoras que eventualmente são acompanhadas pelo aumento da frequência cardíaca.

Outras estruturas também estão envolvidas na modulação do barorreflexo e controle da PA. Estas compreendem a CVLM, núcleo reticular parvocelular, núcleo

reticular ventral, área postrema, núcleo parabraquial, núcleos cerebelares, LC, substância cinzenta periaquedutal, alguns núcleos prosencefálicos, como a amígdala, núcleos septais e núcleos corticais (DAMPNEY, 1994). Em ratos e gatos, por exemplo, a estimulação elétrica dos neurônios da área ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal produzem uma diminuição da PA e bradicardia (LOVICK, 1993).

Basicamente, os neurônios do NTS respondem a mudanças periféricas cardiovasculares que são captadas devido à alta ou baixa pressão exercida sobre os barorreceptores no coração e vasculatura. Mudanças no padrão de disparo dos barorreceptores de alta pressão do seio carotídeo ou arco aórtico informam sobre possíveis mudanças físicas no sistema da PA, como aquelas associadas, por exemplo, a variações de postura. O sistema nervoso central responde pelo início de um padrão de mudanças na atividade cardiovascular que limita os distúrbios de PA. Essencialmente, um aumento na pressão arterial média provoca um padrão reflexo de resposta que consiste em uma diminuição na frequência e resistência cardíaca. Resposta contrária será desencadeada quando houver queda da PA (SPYER, 1981; LOVICK, 1993). O aumento do volume sangüíneo também pode ativar neurônios do PVN, que por sua vez inibem a atividade simpática (POTTS et al., 2000).

Além dos impulsos provenientes dos barorreceptores do seio carotídeo e arco aórtico, o NTS também pode receber impulsos dos aferentes vagais cardiopulmonares a respeito de mudanças na pressão produzida por variações no retorno venoso para o coração ou no volume de sangue circulante (LOVICK, 1993).

1.3. Fos

O advento dos genes de expressão precoce, praticamente ausente em condições basais normais, mas cuja expressão é rapidamente induzida nos neurônios logo após um estímulo eficiente, constitui importante técnica para estudos das adaptações neurais (MORGAN e CURRAN, 1991; KRUKOFF, 1993; ROWLAND et al., 1996; TRAUB et al., 1996; DINARDO e TRAVERS, 1997, CIRELLI e TONONI, 2000). Dentre esses genes ressalta-se o *c-fos*, identificado pela primeira vez como um gene retroviral (retroviral gene *v-fos*) presente nos Einkel-Biskis-Jinkins osteosarcoma vírus, sendo que, o proto-oncogene *c-fos* é o gene celular normal do qual *v-fos* desenvolve-se (CIRELLI e TONONI, 2000).

Em resposta a um estímulo específico, capaz de induzir a expressão da proteína, observa-se um aumento dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) para *c-fos*, que é seguido pela síntese da proteína Fos. O mRNA para *c-fos* pode ser expresso em cerca de 20 minutos após o início do estímulo, enquanto que, a síntese da proteína Fos requer um período de até 90 minutos, sendo que, esta síntese pode persistir por cerca de 2 a 5 horas (DRAISCI e IADAROLA, 1989; CIRELLI e TONONI, 2000).

Sabe-se que, no sistema nervoso central, *c-fos* pode ser induzido por diversos estímulos tais como: somatossensórios, nocivos, térmicos, acústicos e visuais. Assim, a proteína Fos tem sido utilizada como um método de marcação da atividade do neurônio para mapear circuitos neurais que se relacionem funcionalmente e que respondam a estímulos específicos (KRUIJER e SCHUBERT, 1985; SAGAR et al., 1988).

Existem pelo menos quatro elementos regulatórios que podem induzir a expressão de *c-fos*: elemento responsivo do soro (SRE), Ca^{++} e elemento responsável cAMP, *sis*-elemento induzível (SIE) e o sítio de ligação AP-1 (FAP). Embora

usualmente descritos como funcionalmente distintos, estes quatro elementos são estritamente dependentes uns dos outros como um complexo regulatório para a expressão de *c-fos*. Experimentos com ratos transgênicos que apresentam pontos de mutações em cada um destes quatro elementos mostram que todos são essenciais para a função normal do gene. Por exemplo, um ponto de mutação no SIE ou FAP causa dramática perda na indução de *c-fos* através de estímulo despolarizante, embora, o Ca^{++} e o elemento responsável cAMP estejam intactos (ROBERTSON, L. M. et al., 1995).

O principal evento que culmina com a produção de Fos envolve as seguintes etapas: estímulos extra-celulares abrem os canais de cálcio fazendo com que estes íons entrem na célula e ativem a CaM (Ca^{++} / calmodulina) quinase II, responsável pela fosforilação do fator de transcrição CREB (“*cAMP – response element binding protein*” i.e. proteína de ligação responsiva ao cAMP). O CREB possui um motivo de ativação pela fosforilação e um motivo responsável pela ligação ao DNA. Portanto, ao ser ativado via cAMP o CREB se liga a uma sequência reguladora de DNA, o CRE, iniciando a transcrição dos genes de expressão precoce *c-fos* e *jun B*, produzindo as proteínas Fos e Jun. Estas possuem um motivo tipo zíper de leucina, o composto por região com aproximadamente 30 aminoácidos caracterizada por repetições de leucina a cada 7 aminoácidos. Os motivos de leucina de 2 proteínas formam dímeros com as alfa-hélices paralelas. Assim, a dimerização da Fos e da Jun formam um heterodímero, o complexo AP-1 de ligação. Essa manobra amplia as chances de combinação de domínios de ativação e repressão. Assim, várias porções do DNA que contenham o sítio específico para este fator, são ativadas regulando a síntese de neurotransmissores positiva ou negativamente (HOFFMAN e LYO, 2002) (Figura 2).

Uma segunda cascata de transdução opera via fatores responsivos do soro (SRFs) que ativam o DNA do SRE independentemente do cAMP (GILMAN, 1988). A transcrição do proto-oncogene *c-fos* é rapidamente induzida pelo SRE. Uma pequena porção do DNA de *c-fos*, SRE, é requerida para esta resposta. Entretanto, o soro, ativa uma série de sinais e caminhos intracelulares distintos, mas não se conhece qual destes é influenciado pelo SRE. Os resultados mostram que o SRE é necessário e suficiente para responder a proteína Kinase C-dependente e sinais intracelulares independentes, mas não para responder ao cAMP.

Um grande número de receptores, quando ativados, aumentam os níveis intracelulares de AMP cíclico ou ativam os canais de voltagem sensíveis ao cálcio que conduzem a fosforilação de CREB e a indução de *c-fos*. Esta característica forma a base para o uso da proteína Fos como um marcador para a atividade do neurônio estimulado. Entretanto, podem ocorrer mudanças no sistema do segundo não acompanhados de despolarização celular, assim como, pode haver despolarização celular sem expressão da proteína Fos (HOFFMAN e LYO, 2002). Há momentos em que a indução da proteína Fos pode ser provocada sob condições não relacionadas ao disparo neuronal, seja este disparo excitatório ou inibitório. Em particular, a indução de Fos dependente de SRE pode ocorrer pela ação de fatores de crescimento ou mitoses. Como consequência, alguns SRE dependentes na indução de *c-fos* não irão estar ligados à atividade de disparo neuronal (HOFFMAN e LYO, 2002).

Mesmo assim, a técnica de imunohistoquímica para a proteína Fos mostrou-se uma importante ferramenta para o mapeamento anátomo-funcional do sistema nervoso. Hoffman e Lyo (2002) citam que o grau de expressão da proteína Fos pode refletir a intensidade do estímulo aplicado, assim, estímulos efetivos podem ser empregados como ferramenta para se obter atividade neuronal. Dentre estes

estímulos temos: estresse, alterações alimentares, osmolaridade, alterações de volume, de pressão arterial, entre outros (LI e DAMPNEY, 1992; BADOER et al., 1993; LI e DAMPNEY, 1994; MIURA et al., 1994; GRAHAM et al., 1995; POLSON et al., 1995; HIROOKA et al., 1997; POTTS, 1997; HORIUCHI et al., 1999; POTTS et al., 2000; TAKASE et al., 2000; LOHMEIER et al., 2001; POLSON et al., 2002; LOHMEIER et al., 2003). Sendo assim, este trabalho utiliza a expressão e quantificação desta proteína para avaliar a participação dos núcleos da rafe na resposta frente a alterações de volume sanguíneo.

FIGURA 2 - Esquema básico da expressão da proteína Fos. O receptor estimulado, abre os canais de Ca^{++} , este no citoplasma ativa a enzima Ca/calmodulina (CaM) quinase II, que então fosforila o fator de transcrição CREB, o qual por sua vez induz a expressão do proto-oncogen *c-fos* ao se ligar ao sítio CRE do DNA. A proteína Fos produzida se dimeriza com outra proteína, a Jun, para formar o complexo AP-1, que irá regular a transcrição dos genes cujas estruturas tenham o sítio de ligação para o complexo AP-1. (modificado de GOLOMBEK e RALPH, 1996 por TAKASE, L. F, 2001).

1.4 Proposição

Propomos em complemento a um estudo sistemático dos núcleos da rafe e sistema serotoninérgico:

1. Analisar a participação dos núcleos da rafe nas respostas adaptativas a estímulos de hipovolemia e hipervolemia pela distribuição e quantificação dos neurônios Fos-IR nestes núcleos, em ratos.
2. Analisar a participação do sistema serotoninérgico em resposta aos mesmos estímulos pela distribuição e quantificação de neurônios duplamente marcados 5-HT/Fos-IR.
3. Analisar a distribuição das células imunoreativas no eixo ântero-posterior, a fim de evidenciar eventual participação diferenciada de subpopulações neuronais em um mesmo núcleo.

2. METODOLOGIA

2.1 – Animais utilizados

Foram utilizados 27 ratos Wistar, machos, adultos, 3 meses, com cerca de 300g, criados no Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas III – USP, com temperatura constante (23°), ciclo claro/escuro de 12:12, início do claro às 7:00 e comida e água *ad libitum*. Os procedimentos foram autorizados pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas – USP (protocolo nº 041/2002) e obedeceram aos princípios da *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (Society for Neuroscience, 1991) e Cobeia (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991).

2.2 - Condições experimentais

Os animais foram divididos em 5 grupos: Hipovolemia (Hipo, n=6), Controle hipovolemia (C hipo, n=6), Hipervolemia (Hiper, n=5), Controle hipervolemia (C hiper, n=5) e Basal (Bs, n=5).

Os animais dos grupos Hipo foram submetidos à punção cardíaca e remoção sangüínea (1ml/100g), enquanto que, os animais do grupo C hipo foram submetidos à punção cardíaca, porém sem a remoção de sangue.

Os animais dos grupos Hiper e C hiper foram submetidos à cirurgia para canulação da veia jugular externa direita, sendo que, os animais do grupo receberam, via cânula, solução salina (1ml/100g), enquanto que, os animais do grupo C hiper foram apenas manipulados, sem receber solução salina.

Os animais do grupo Bs foram apenas manipulados durante 8 dias, entre 13:00 e 13:30h, sem receber qualquer estímulo volêmico. A manipulação objetivou adaptar os animais ao experimentador e às condições experimentais.

2.2.1 – Punção Cardíaca

Durante os 8 dias experimentais os animais dos grupos Hipo e C hipo foram alojados dois a dois em suas gaiolas. Para minimizar o estresse, os animais foram habituados a manipulação durante os 7 dias anteriores ao experimento; diariamente, sempre no mesmo período, os ratos eram retirados de suas gaiolas, mantidos em decúbito ventral por 5 minutos e então devolvidos às respectivas gaiolas. No 8º dia, foi realizado o procedimento de remoção sangüínea. Os animais foram posicionados em decúbito ventral, realizou-se assepsia da parede anterior do tórax com solução de etanol¹ a 70%. Para evitar a interação dos anestésicos com a expressão da proteína Fos, o procedimento foi realizado sem o efeito de qualquer anestésico (Jimenez et al., 1985). Uma agulha de cateter comum, calibre 23, foi introduzida na cavidade torácica através da parede lateral esquerda, no espaço entre a quarta e quinta ou quinta e sexta costelas, área na qual o ápice cardíaco era facilmente identificável através da palpação. Uma vez a agulha introduzida no ventrículo esquerdo, leve sucção era necessária para remoção de sangue. A remoção sangüínea (1ml/100g) foi realizada em episódio único com velocidade aproximada de 1,0 ml/min (Tanaka et al., 2001). Os animais do grupo C hipo foram submetidos ao mesmo procedimento de punção cardíaca, mas logo após a introdução da agulha no ventrículo esquerdo esta era retirada sem que se efetuasse a remoção sangüínea. Após o término do procedimento, a agulha foi retirada e os animais devolvidos à sua gaiola de origem.

¹ Synth, São Paulo, SP.

2.2.2 - Cirurgia da canulação

Os animais dos grupos Hiper e C hiper foram submetidos à cirurgia de canulação da veia jugular externa direita, no período entre 9h e 11h da manhã. Os animais foram sedados com coquetel anestésico preparado em água destilada com acepromazina² (1mg/ml), xilazina³ (5 mg/ml) e ketamina⁴ (25mg/ml); comprovado o grau adequado da anestesia pelo pinçamento da cauda, realizou-se a tricotomia da região cervical, posterior e anterior do animal. A cirurgia iniciou-se com uma única incisão de cerca de 1 cm na região cervical anterior, os tecidos superficiais foram divulsionados, tornando possível à visualização e acesso à veia jugular externa direita. O vaso foi pinçado e suas extremidades amarradas, interrompendo-se o fluxo sanguíneo temporariamente. Entre as duas amarras realizou-se pequena incisão transversal, com cerca de 0,2 mm, na face anterior do vaso, pela qual uma cânula de polietileno⁵, foi introduzida e fixada ao mesmo com fio de algodão. Uma vez a cânula introduzida na veia jugular externa, a amarra inferior foi solta e a cânula exteriorizada, através de um trocáter via transcutânea, na região cervical posterior entre as orelhas do animal. As incisões realizadas, na região cervical anterior e posterior, foram suturadas. Ao término do procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com água e comida *ad libitum*.

Estes animais foram observados e manipulados durante 5 dias após o processo cirúrgico, sempre respeitando o horário, para observação e manipulação, entre 13:00 e 13:30h. No sexto dia, os animais do grupo Hiper foram submetidos ao estímulo hipervolêmico. A administração de solução salina (1ml/100g) foi realizada em episódio único, com velocidade aproximada de 1,0 ml/min (Tanaka

² Acepran 1%, UNIVET.

³ Rompum, Bayer.

⁴ Dopalen, Agribrands do Brasil Ltda.

⁵ Tubo de polietileno PE-10, fundido sob calor com tubo PE-50, Clay Adams.

et al., 2001), através de seringa comum acoplada à cânula. Os animais do grupo C hiper foram manipulados para o acoplamento da seringa à cânula, porém não foi administrada solução salina.

2.3 – Perfusão

Após 90 minutos do final do estímulo ou simulação do estímulo, ou simulação, tempo aguardado para expressão da proteína Fos (DRAISCI e IADAROLA, 1989), todos animais foram submetidos à perfusão transcardíaca, entre 14:30 a 15:00h.

Os animais foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral 35%⁶. Após comprovação do grau de profundidade da anestesia pelo pinçamento da cauda, o animal foi posicionado na cuba de perfusão, imobilizado e perfundido conforme procedimento usual do laboratório (NOGUEIRA et al., 1997).

A dissecação iniciou-se com um corte na pele do abdome para a exposição do processo xifóide. Este foi preso por uma pinça dente-de-rato e fixado para que as costelas fossem cortadas em forma de “V”. Com uma pinça hemostática, o processo xifóide e as costelas cortadas foram rebatidos, expondo-se o coração. A parte abdominal da artéria aorta foi pinçada com pinça hemostática curva para que durante a perfusão, o fixador não atingisse os membros inferiores, garantindo uma melhor fixação do encéfalo do animal e menor gasto de solução. Em seguida, o ápice cardíaco foi cortado, abrindo o ventrículo esquerdo para a inserção da cânula da bomba de perfusão; esta cânula ultrapassou a valva semilunar aórtica até atingir a artéria aorta, onde foi imobilizada com pinça hemostática.

Em seguida, foram bombeados 150 ml de solução salina 0,9%, pH 7,4 à temperatura ambiente, com a finalidade de lavar o sistema circulatório, prevenindo a formação de coágulos e possibilitando a correta penetração do fixador nos tecidos. A fixação foi realizada com a injeção de 500 ml de solução de paraformaldeído 4%,

⁶ Carlo Erba Reagenti

mais bórax 3.8%, pH 9,5, 4°C, durante 15 minutos em fluxo rápido e 15 minutos em fluxo lento. O fluxo rápido do fixador permite a quase imediata fixação dos tecidos enquanto que o fluxo lento propicia um contato mais íntimo entre o tecido e a solução fixadora. Durante a fixação foi observada a contração da musculatura dos membros superiores, indicativo da passagem do fixador pelo sistema circulatório. A cabeça do animal foi coberta com gelo picado com intuito de preservar a natureza química das substâncias protéicas.

O encéfalo foi removido, pós-fixado em solução fixadora mais sacarose 20% por 4 horas a 4°C, crioprotégido em KPBS mais sacarose 20% “overnight” a 4°C e seccionado com criomicrotomo⁷ em cortes coronais de 40 µm de espessura. Para cada animal, foram coletadas 5 séries de cortes que foram armazenadas em congelador (-20°C) em solução anti-congelante.

⁷ SM 2000R, Leika.

2.4 - Imunohistoquímica

Os cortes foram processados com técnicas de imunohistoquímica dupla marcação pelo método de imunoperoxidase avidina biotina (ABC-DAB) contra a proteína Fos e anticorpo fluorescente contra 5-HT. Inicialmente, os cortes foram pré-tratados com solução de peróxido de hidrogênio 0,06% para remoção da peroxidase endógena. Em seguida, os cortes foram lavados em KPBS e incubados em solução de incubação (“loaded”) mais NGS⁸ (2%) por 1 h para evitar ou minimizar a ligação do anticorpo a sítios não específicos, diminuindo-se coloração de fundo inespecífica (“back-ground”). Em seguida, os cortes foram novamente lavados em KPBS e incubados em anticorpo primário anti-Fos⁹ (feito em coelho contra rato, 1:10.000) por 48 horas a 4° C. Após este período, os cortes foram lavados em KPBS e incubados em anticorpo secundário biotinilado¹⁰ (feito em cabra contra coelho, 1:200) durante 90 minutos a 4° C. Após novas lavagens em KPBS, os cortes foram incubados no complexo avidina biotina¹¹ (ABC) durante 90 minutos a 4° C. Os cortes foram lavados em KPBS e tampão acetato de sódio 0,1M, pH 6,0, e a marcação revelada utilizando-se a 3´3 diaminobenzidina tetrahidrocloreto¹² (DAB) como cromógeno, o peróxido foi fornecido pela reação entre a β -d (+) glucose¹³ com a glucose oxidase¹⁴ tendo o cloreto de amônio¹⁵ como catalisador; níquel amônio sulfato¹⁶ 5% foi utilizado para intensificar a marcação. Os cortes permaneceram flutuando nesta solução até adquirirem a cor púrpura, quando a reação foi interrompida com novas lavagens em tampão acetato de sódio e KPBS.

⁸ Normal Goat Serum – Soro Normal de Cabra, Vector Laboratories, Burlingame, CA.

⁹ Oncogen.

¹⁰ Vector Laboratories, Burlingame, CA.

¹¹ Complexo Avidina-Biotina, Vector Laboratories, Burlingame, CA..

¹² Sigma.

¹³ Sigma.

¹⁴ Amresco.

¹⁵ Sigma.

¹⁶ Sigma.

A seguir os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-5-HT¹⁷ (feito em coelho contra rato, 1:1000) por 24 horas a 4° C. Após este período, os cortes foram novamente lavados em KPBS e incubados em anticorpo secundário fluorescente rodamina (Red-X)¹⁸ (cabra contra coelho, 1:1000) durante 2 horas.

Após novas lavagens, em KPBS, os cortes foram montados seqüencialmente em lâminas gelatinizadas. As lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando-se o tampão glicerol como meio de montagem e estocadas protegidas da luz a 4°C.

¹⁷ Protos Biotech Corp..

¹⁸ Jackson ImmunoResearch, Laboratories, Inc.

2.5 - Análise dos resultados

As lâminas preparadas foram analisadas em microscopia de fluorescência para quantificação dos neurônios duplamente marcados, neurônios serotoninérgicos e Fos imunoreativos (5-HT/Fos-IR), e em microscopia de campo claro para se realizar a quantificação dos neurônios Fos imunoreativos (Fos-IR). Em campo claro considerou-se neurônios Fos-IR com núcleo de coloração marrom escuro ou preto (Figura 3). Os neurônios duplamente marcados (5-HT/Fos-IR) apresentaram citoplasma vermelho fluorescente e núcleo marrom escuro (Figura 3).

Uma série de cortes de cada um dos animais dos respectivos grupos foi analisada para a obtenção dos resultados, e outra série corada em Nissl (tionina) utilizada como controle citoarquitetônico. Cada núcleo da rafe foi dividido em 3 regiões: rostral, média e caudal (Tabela 1).

O número de neurônios Fos-IR, 5-HT/Fos-IR, e a porcentagem de neurônios duplamente marcados em todos os núcleos da rafe nos quatro grupos experimentais foram representados por média $\pm$ erro padrão. O número de neurônios nas regiões rostral, média e caudal do eixo ântero-posterior (AP) a partir do bregma, também foram considerados.

Empregou-se ANOVA com dois fatores, seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey, para cada núcleo da rafe com o objetivo de comparar o número de neurônios Fos-IR E 5-HT/Fos-IR dos quatro grupos experimentais nas regiões do eixo AP. a suposição de homogeneidade foi verificada aplicando-se transformação raiz quadrada nos dados. Para o núcleo RMg utilizou-se ANOVA com dois fatores não-paramétrica.

ANOVA com um fator, seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey, para cada núcleo da rafe, foi empregada para comparar os grupos

experimentais quanto à porcentagem de neurônios duplamente marcados. Neste caso a suposição de homogeneidade foi verificada aplicando-se transformação arco seno (raiz do número de neurônios 5-HT/Fos-IR/100). Para o núcleo RMg utilizou-se o teste Kruskal-Wallis.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

A análise dos resultados foi efetuada pelo programa Image Pro-Plus¹⁹ de análise de imagens digitais, obtidas através de câmera digital²⁰ acoplada ao microscópio²¹.

¹⁹ versão 4.1, Media Cybernetics.

²⁰ Cool-Snap, Media Cybernetics.

²¹ Eclipse E-1000, Nikon.

Tabela 1- Extensão das subdivisões dos núcleos da rafe ao longo do eixo ântero-posterior. Os valores representam os níveis posteriores ao bregma

	Rostral	Média	Caudal
Li	-5,16 a 6,16	-6,36 a -6,76	-6,96 a -7,36
DR	-6,96 a -7,76	-7,96 a -8,76	-8,96 a -9,76
MnR	-7,16 a -7,56	-7,76 a -8,16	-8,36 a -8,76
PnR	-8,16 a -8,56	-8,76 a -9,16	-9,36 a -9,76
RMg	-9,16 a -10,36	-10,56 a -11,76	-11,96 a -13,16
RPa	-9,76 a -11,56	-11,76 a -13,56	-13,76 a -15,36
ROb	-11,16 a -12,56	-12,76 a -13,96	-14,16 a -15,36

FIGURA 3 - Fotomicrografias de cortes coronais (40 μ m) do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando em A: neurônio 5-HT/Fos-IR e, em B: neurônios Fos-IR, considerados na contagem. A barra representa 50 μ m em **A** e 100 μ m em **B**.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nos diferentes núcleos da rafe de rato, com os estímulos de hipovolemia e hipervolemia serão detalhados quanto: a média do número total de neurônios Fos-IR; média do número total de neurônios duplamente marcados (5-HT/Fos-IR); percentual de neurônios serotoninérgicos, em relação ao número total de neurônios Fos-IR, e distribuição dos neurônios Fos-IR e 5-HT/Fos-IR no eixo ântero-posterior.

3.1. Análise quantitativa dos neurônios Fos-IR

O grupo Basal apresentou menor número de neurônios Fos-IR, em relação ao demais grupos experimentais, em todos os núcleos analisados (Tabela 2).

A análise estatística no Li evidenciou que os grupos Hipo e C hipo apresentaram maior número de neurônios Fos-IR em relação ao grupo C hiper (Figuras 4 e 5, Tabela 2).

No núcleo DR se observou maior expressão de neurônios Fos-IR nos grupos Hipo e C hipo, quando comparados aos grupos Hiper e C hiper (Figuras 4, 23, 24, Tabela 2). A análise destes neurônios no eixo AP demonstrou que nas regiões rostral e média os grupos Hipo e C hipo apresentaram maior número de células imunoreativas em relação ao grupo Hiper. Na região rostral o grupo Hipo também apresentou maior número de células em relação ao grupo C hiper (Figura 6).

No PnR quando comparados ao grupo Hiper, os grupos Hipo e C hipo apresentaram maior número de células Fos-IR, o grupo Hipo também apresentou maior número de neurônios Fos-IR em relação ao grupo C hiper (Figuras 4, 8, Tabela 2).

No núcleos MnR, RMg e ROb os grupos Hipo e C hipo apresentaram maior número de células Fos-IR em relação aos grupos Hiper e C hiper (Figuras 4, 7, 9, 11, 25, 26, 27, 28, Tabela 2).

No RPa observamos que o grupo Hipo apresentou maior número de neurônios Fos-IR nas regiões caudal e média em relação ao grupo Hiper. Apenas na região média o grupo Hipo também apresentou diferença significativa em relação ao grupo C hiper (Figuras 4, 10, Tabela 2).

Neurônios Fos-IR também foram observados, em resposta aos estímulos aplicados, em regiões clássicas relacionadas ao controle do sistema cardiovascular, como PVN, substância cinzenta periaquedutal, NTS e LC (Figuras 12, 13), entretanto, análise quantitativa e ou qualitativa não foram realizada em relação a estes núcleos.

Tabela 2- Média do número total de neurônios Fos-IR nos núcleos da rafe em resposta a alterações de volume sangüíneo

	Hipo	C hipo	Hiper	C hiper	Basal
Li	32,8 (± 5,2)	32,3 (± 6,4)	30,8 (± 6,2)	13,6 (± 6,6)	0,4 (± 0,4)
DR	335,5 (± 18,7)	267,0 (± 35,5)	109,8 (± 18,4)	164,6 (± 20,5)	1,2 (± 0,4)
MnR	99,0 (± 10,8)	77,2 (± 13,4)	21,2 (± 6,7)	35,2 (± 4,9)	0,0 (± 0,0)
PnR	69,2 (± 12,0)	48,7 (± 7,7)	21,6 (± 6,7)	32,4 (± 5,1)	1,2 (± 1,2)
RMg	162,8 (± 18,7)	135,7 (± 15,5)	57,6 (± 4,7)	64,2 (± 14,4)	8,2 (± 5,2)
RPa	98,0 (± 9,6)	74,5 (± 7,5)	36,8 (± 8,2)	48,8 (± 12,9)	11,6 (± 4,4)
ROb	121,3 (± 13,4)	91,8 (± 14,0)	21,4 (± 4,6)	41,0 (± 13,0)	1,0 (± 0,8)

Os dados estão expressos em média ± EP.

Neurônios Fos-IR

FIGURA 4 - Média do número total de neurônios Fos-IR, + erro padrão, nos núcleos da rafe: Li, DR, MnR, PnR, RMg, RPa, ROb nos grupos: hipovolemia (Hipo, N=6), controle hipovolemia (C hipo, N=6), hipervolemia (Hiper, N=5) e controle hipervolemia (C hiper, N=5). a indica diferença entre os grupos Hipo e Hiper, b entre os grupos Hipo e C Hiper, c entre os grupos C Hipo e Hiper e d entre C Hipo e C Hiper.

Disposição de neurônios Fos-IR no Li

FIGURA 5 - Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR, + erro padrão, no Li ao longo do eixo ântero-posterior (AP) no encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

Disposição de neurônios Fos-IR no DR

FIGURA 6 - Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR, + o erro padrão, no DR ao longo do eixo ântero-posterior (AP) no encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

Disposição de neurônios Fos-IR no MnR

FIGURA 7 - Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR, + o erro padrão, no MnR ao longo do eixo ântero-posterior (AP) no encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

Disposição de neurônios Fos-IR no PnR

FIGURA 8 - Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR, + o erro padrão, no núcleo PnR ao longo do eixo antero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

Disposição de neurônios Fos-IR no RMg

FIGURA 9 - Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR, + o erro padrão, no RMg ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

Disposição de neurônios Fos-IR no RPa

FIGURA 10 - Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR no RPa, + o erro padrão, ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

Disposição de neurônios Fos-IR no ROb

FIGURA 11 - Distribuição da média do número de neurônios Fos-IR no ROb, + o erro padrão, ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

FIGURA 12 - Esquemas (A e C) e fotomicrografias em campo claro (B e D), de cortes coronais do encéfalo de ratos Wistar. Os desenhos esquemáticos evidenciam a localização dos núcleos paraventricular do hipotálamo (A) e da substância cinzenta periaquedutal (C), indicados pelas setas. Em B neurônios Fos-IR no núcleo paraventricular do hipotálamo, em D neurônios Fos-IR na substância cinzenta periaquedutal, ambos do grupo Hipo. As barras representam 100µm.

Paxinos & Watson, 1998 Bregma -1.60 mm

A

B

Paxinos & Watson, 1998 Bregma -7.04 mm

C

D

FIGURA 13 - Esquemas (A e C) e fotomicrografias em campo claro (B e D), de cortes coronais do encéfalo de ratos Wistar. Os desenhos esquemáticos evidenciam a localização do locus coeruleus (LC) em A e do núcleo trato solitário (NTS) em C, indicados pelas setas. Em B neurônios Fos-IR no LC, em D neurônios Fos-IR no NTS, ambos do grupo Hipo. As barras representam 100µm.

Paxinos & Watson, 1998 Bregma -9,80 mm

A

LC

B

Paxinos & Watson, 1998 Bregma -13,68 mm

C

NTS

D

3.2. Análise quantitativa dos neurônios 5-HT/Fos-IR

Na comparação do número de neurônios duplamente marcados (5-HT/Fos-IR) dos núcleos Li e RPa, os grupos analisados não apresentaram diferenças significativas (Figura 14, 15, 20, Tabela 3).

No núcleo DR os grupos Hipo e C hipo apresentaram maior número de células 5-HT/Fos-IR em relação aos grupos Hiper e C hiper (Figura 16, 23, 24, Tabela 3). Na análise do eixo AP observamos que esta diferença significativa ocorre nas regiões rostral e média. Sendo que, o grupo Hipo apresentou predomínio de células duplamente marcadas na região média (Figura 16).

Nos núcleos MnR, RMg os grupos Hipo e C hipo apresentaram maior número de células 5-HT/Fos-IR em relação aos grupos Hiper e C hiper (Figura 14, 17, 19, 25, 26, Tabela 3).

No núcleo PnR também observamos diferença significativa entre os grupos Hipo e C hipo em relação aos grupos Hiper e C hiper (Figura 14, Tabela 3). Na análise eixo AP observamos que os grupos Hipo e C hipo apresentaram maior padrão de marcação em relação ao grupo Hiper apenas nas regiões rostral e média. Os grupos Hipo e C hipo também apresentaram maior número de células duplamente marcadas que o grupo C hiper na região rostral (Figura 18).

Para o núcleo ROb, no qual a mesma diferença entre os grupos Hipo, C hipo e Hiper, C hiper foi observada, (Figura 14, 27, 28, Tabela 3), a análise evidenciou que o grupo Hipo apresentou maior padrão de marcação em relação aos grupos Hiper e C hiper na região caudal, enquanto que o grupo C hipo apresentou maior número de células duplamente marcadas que os grupos Hiper e C Hiper na região média. No grupo Hipo, observamos um predomínio de células duplamente marcadas nas regiões média e caudal (Figura 21).

Tabela 3- Média do número total de neurônios 5-HT/Fos-IR nos núcleos da rafe em resposta a alterações de volume sanguíneo

	Hipo	C hipo	Hiper	C hiper
Li	1,3 ($\pm$ 1,3)	2,7 ($\pm$ 1,1)	0 ($\pm$ 0)	1,4 ($\pm$ 0,9)
DR	148,8 ($\pm$ 10,7)	175,7 ($\pm$ 16,3)	46,2 ($\pm$ 9,7)	47,8 ($\pm$ 12,1)
MnR	32,0 ($\pm$ 6,5)	33,8 ($\pm$ 3,5)	12,4 ($\pm$ 1,6)	11,4 ($\pm$ 2,4)
PnR	20,8 ($\pm$ 2,0)	22,0 ($\pm$ 2,6)	4,6 ($\pm$ 2,2)	7,0 ($\pm$ 1,9)
RMg	47,8 ($\pm$ 3,2)	45,8 ($\pm$ 3,7)	14,6 ($\pm$ 2,8)	15,8 ($\pm$ 5,6)
RPa	8,7 ($\pm$ 3,0)	3,7 ($\pm$ 0,8)	4,2 ($\pm$ 0,9)	2,2 ($\pm$ 0,7)
ROb	28,5($\pm$ 3,5)	30,5 ($\pm$ 4,3)	6,0 ($\pm$ 0,9)	8,0 ($\pm$ 3,3)

Os dados estão expressos em média $\pm$ EP.

Neurônios 5-HT/Fos-IR

FIGURA 14 – Média do número total de neurônios 5-HT/Fos-IR, + erro padrão, nos núcleos da rafe: Li, DR, MnR, PnR, RMg, RPa, ROb nos grupos: hipovolemia (Hipo, N=6), controle hipovolemia (C hipo, N=6), hipervolemia (Hiper, N=5) e controle hipervolemia (C hiper, N=5). a indica diferença entre os grupos Hipo e Hiper, b entre os grupos Hipo e C Hiper, c entre os grupos C Hipo e Hiper e d entre C Hipo e C Hiper.

Disposição de neurônios 5-HT/Fos-IR no Li

FIGURA 15 - Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR, + o erro padrão, no Li ao longo do eixo ântero-posterior (AP) no encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

Disposição de neurônios 5-HT/Fos-IR no DR

FIGURA 16 - Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR, + o erro padrão, no DR ao longo do eixo ântero-posterior (AP) no encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

Disposição de neurônios 5-HT/Fos-IR no MnR

FIGURA 17 - Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR, + o erro padrão, no MnR ao longo do eixo ântero-posterior (AP) no encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

Disposição de neurônios 5-HT/Fos-IR no PnR

FIGURA 18 - Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR, + o erro padrão, no PnR ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

Disposição de neurônios 5-HT/Fos-IR no RMg

FIGURA 19 - Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR, + o erro padrão, no RMg ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

Disposição de neurônios 5-HT/Fos-IR no RPa

FIGURA 20 - Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR no RPa, + o erro padrão, ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

Disposição de neurônios 5-HT/Fos-IR no ROb

FIGURA 21 - Distribuição da média do número de neurônios 5-HT/Fos-IR no ROb, + o erro padrão ROb, ao longo do eixo ântero-posterior (AP) do encéfalo de rato. A chave indica a região considerada como média.

3.3. Percentual de neurônios serotoninérgicos

Quando analisado o percentual de neurônios serotoninérgicos que expressam a proteína Fos, em relação ao número total de células Fos-IR, foi observado que os núcleos Li, RMg, RPa e ROb não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 22, Tabela 4).

No núcleo DR o grupo C hipo apresentou maior percentual de células 5-HT/Fos-IR em relação aos demais grupos (Figura 22, Tabela 4).

No núcleo MnR o grupo Hiper apresentou maior percentual de células 5-HT/Fos-IR que os grupos C Hiper e Hipo (Figura 22, Tabela 4).

Enquanto que, o grupo C hipo apresentou maior percentual de neurônios 5-HT/Fos-IR em relação aos grupos Hiper e C hiper no núcleo PnR (Figura 22, Tabela 4).

Tabela 4 - Média do número total da % neurônios 5-HT/Fos-IR nos núcleos da rafe em resposta a alterações de volume sanguíneo

	Hipo (%)	C hipo (%)	Hiper (%)	C hiper (%)
Li	3,3 ($\pm$ 3,3)	8,8 ($\pm$ 2,5)	0,0 ($\pm$ 0,0)	15,8 ($\pm$ 12,9)
DR	45,8 ($\pm$ 3,8)	68,4 ($\pm$ 3,3)	43,3 ($\pm$ 6,3)	28,0 ($\pm$ 5,1)
MnR	34,2 ($\pm$ 5,7)	45,8 ($\pm$ 4,3)	73,3 ($\pm$ 11,4)	36,7 ($\pm$ 9,3)
PnR	34,2 ($\pm$ 5,4)	48,7 ($\pm$ 5,7)	18,1 ($\pm$ 8,2)	20,5 ($\pm$ 4,4)
RMg	31,5 ($\pm$ 4,1)	34,0 ($\pm$ 2,1)	25,5 ($\pm$ 4,7)	28,5 ($\pm$ 12,4)
RPa	9,6 ($\pm$ 3,4)	5,2 ($\pm$ 1,4)	13,7 ($\pm$ 2,6)	5,0 ($\pm$ 1,4)
ROb	24,4 ($\pm$ 2,9)	34,3 ($\pm$ 3,9)	35,9 ($\pm$ 9,9)	32,0 ($\pm$ 10,5)

Os dados estão expressos em média $\pm$ EP.

Percentual de neurônios 5-HT/Fos-IR

FIGURA 22 – Média em % do número total de neurônios 5-HT/Fos-IR, + erro padrão, nos núcleos da rafe: Li, DR, MnR, PnR, RMg, RPa, ROB nos grupos: hipovolemia (Hipo, N=6), controle hipovolemia (C hipo, N=6), hipervolemia (Hiper, N=5) e controle hipervolemia (C hiper, N=5). c indica diferença entre os grupos entre os grupos C Hipo e Hiper, d entre C Hipo e C Hiper, e entre C Hipo e Hipo, f entre Hiper e C hiper e g entre Hiper e Hipo.

FIGURA 23 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando o DR ao redor do bregma -8.76mm, no grupo C hipo. **A** - Fotomicrografia em fluorescência evidenciando neurônios 5-HT/Fos-IR, **C**- a mesma região em maior aumento. **B** - Fotomicrografia em campo claro evidenciando neurônios Fos-IR. As barras representam 100µm.

Grupo C hipo

FIGURA 24 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando o DR ao redor do bregma -8.76mm, no grupo C hiper. **A** - Fotomicrografia em fluorescência evidenciando neurônios 5-HT/Fos-IR, **C**- a mesma região em maior aumento. **B** - Fotomicrografia em campo claro evidenciando neurônios Fos-IR. As barras representam 100µm.

Grupo C hiper

FIGURA 25 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando o RMg ao redor do bregma –11,36mm, no grupo Hipo. **A** - Fotomicrografia em fluorescência evidenciando neurônios 5-HT/Fos-IR, **C**- a mesma região em maior aumento. **B** - Fotomicrografia em campo claro evidenciando neurônios Fos-IR. As barras representam 100µm.

Grupo Hipo

FIGURA 26 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando o RMg ao redor do bregma –11,36mm, no grupo C hipo. **A** - Fotomicrografia em fluorescência evidenciando neurônios 5-HT/Fos-IR, **C**- a mesma região em maior aumento. **B** - Fotomicrografia em campo claro evidenciando neurônios Fos-IR. As barras representam 100µm.

Grupo C Hipo

FIGURA 27 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando o ROb ao redor do bregma –14,16mm, no grupo Hipo. **A** - Fotomicrografia em fluorescência evidenciando neurônios 5-HT/Fos-IR, **C**- a mesma região em maior aumento. **B** - Fotomicrografia em campo claro evidenciando neurônios Fos-IR. As barras representam 100µm.

Grupo Hipo

FIGURA 28 - Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de ratos Wistar evidenciando o ROb ao redor do bregma –14,16mm, no grupo C hipo. **A** - Fotomicrografia em fluorescência evidenciando neurônios 5-HT/Fos-IR, **C**- a mesma região em maior aumento. **B** - Fotomicrografia em campo claro evidenciando neurônios Fos-IR. As barras representam 100µm.

Grupo C Hipo

4. DISCUSSÃO

Os núcleos da rafe realizam múltiplas conexões com núcleos encefálicos que estão envolvidos na regulação do sistema cardiovascular (BAUSBAUM et al., 1978; SATOH, 1979; VAN DE KAR e LORENS, 1979; LOEWY, 1981a, 1981b; HOLSTEGE e KUYPERS, 1982a; ROSS et al., 1985; BOWKER, 1986; JONES et al., 1986; ALSTERMARK et al., 1987; HOLSTEGE e KUYPERS, 1982b; MARTIN et al. 1990; BACON et al., 1990; NICHOLAS e HANCOCK, 1990; JACOBS e AZMITIA, 1992; EVANS e BLAIR, 1993; WANG e LOVICK, 1993; INUI et al., 1994; VERTES e KOCSIS, 1994; VERTES et al., 1999; NOGUEIRA et al., 2000). Estes diferentes grupamentos neuronais, como o NTS, o PVN, o LC e a área postrema, dentre outros, têm sido amplamente estudados, através do método de imunohistoquímica para detecção da proteína Fos, produto do gene de expressão primária *c-fos*, em diferentes espécies de animais (LI e DAMPNEY, 1992; BADOER et al., 1993; LI e DAMPNEY, 1994; MIURA et al., 1994; GRAHAM et al., 1995; POLSON et al., 1995; HIROOKA et al., 1997; POTTS et al., 1997; HORIUCHI et al., 1999; POTTS et al., 2000; LOHMEIER et al., 2001; POLSON et al., 2002; LOHMEIER et al., 2003). Em nosso estudo, observamos a marcação de neurônios Fos-IR em alguns destes núcleos, como o LC, PVN, NTS e substância cinzenta periaquedutal. Embora esta marcação não tenha sido quantificada, esta pode ser um indicativo de que os estímulos foram efetivos para a ativação de uma via que regule alterações referentes ao sistema cardiovascular.

O presente estudo utilizou o método de imunohistoquímica para detecção da proteína Fos para identificar e quantificar os neurônios da rafe que respondem ao aumento ou diminuição do volume sangüíneo, além do que, com o uso da técnica de imunohistoquímica para identificação de neurônios que sintetizam a 5-HT, pode-se avaliar a participação do sistema serotoninérgico frente aos estímulos empregados.

Sabemos que Fos é o fator de transcrição mais utilizado para avaliar o padrão de ativação neuronal (SHENG E GREENBERG, 1990), visto que, o dímero Fos/Jun se une ao sítio AP1 com maior eficiência (cerca de 50 vezes) do que o dímero Jun/Jun (HALAZONETIS et al., 1988; NAKABEPPU et al., 1988). Entretanto, não sabemos se outro marcador neuronal poderia evidenciar maior participação dos neurônios dos núcleos da rafe em resposta aos estímulos aplicados.

A metodologia adotada para detecção da proteína Fos apresenta vantagem em relação às técnicas eletrofisiológicas, pode ser utilizada para mapear um grande número de neurônios. Outra importante vantagem consistiu no fato de que, os estímulos que levaram a indução de hipovolemia e hipervolemia, foram realizados em animais que não se encontravam sobre efeito anestésico. Este efeito poderia alterar a regulação do sistema cardiovascular (LOHMEIER et al., 2003), ou provocar a expressão de Fos (MIURA et al., 1994).

Potts et al. (2000) usaram a expressão da proteína Fos, em coelhos, para quantificar neurônios de núcleos da medula oblonga e do hipotálamo que são ativados por estímulos de hipervolemia ou hipovolemia, demonstrando haver marcação significativa em diferentes núcleos. Estes mesmos autores citam que o estímulo de hipovolemia pode provocar descarga dos receptores cardíacos e este pode ser um dos fatores responsáveis pela expressão da proteína Fos na RVLM, por exemplo. A hipovolemia provoca em coelhos a ativação do sistema renina angiotensina. Assim, outro fator que pode contribuir para a expressão desta proteína é o aumento dos níveis circulantes de angiotensina II, bem como de vasopressina (LI e DAMPNEY, 1994; POTTS et al., 2000; LOHMEIER et al., 2002).

A participação dos núcleos da rafe na regulação do sistema cardiovascular foi evidenciada por diversos autores. A estimulação elétrica dos núcleos CLi, MnR e DR

em ratos anestesiados, por exemplo, provoca aumento transitório da PA (KUHN et al., 1980). Sabe-se que o MnR apresenta projeções para núcleos do hipotálamo, como área medial pré-óptica (VAN DE KAR e LORENS, 1979; VERTES et al., 1999) e o DR para núcleos parabraquiais e LC (VERTES e KOCSIS, 1994). Estas projeções podem indicar que o MnR e o DR participam dos mecanismos responsáveis pela manutenção adequada da PA, pois estas áreas são relacionadas ao controle da mesma (ROBINSON, 1982; TANAKA et al., 2001). Embora a estimulação elétrica do DR provoque alterações da PA, Graham et al. (1995), ao observarem a participação deste núcleo e do RMg, através da expressão da proteína Fos, em repostas a estímulos que levam a hipovolemia e hipervolemia, verificaram que estes núcleos não respondem de forma significativa.

Nossos resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Graham et al. (1995), pois os núcleos DR e RMg não responderam de forma significativa aos estímulos de hipovolemia e hipervolemia.

Gao e Mason (2001) afirmam que o estímulo de laço da aorta abdominal, provoca reposta em neurônios do RMg com ligeira elevação da PA. Campos et al. (1993), demonstraram que a estimulação elétrica do ROb provoca respostas hipertensivas em ratos Wistar. A RVLM provavelmente é a via sináptica para tal acontecimento, pois o ROb se projeta para esta área (NICHOLAS e HANCOCK, 1990), e após a destruição da mesma, ocorre diminuição na resposta hipertensiva frente à estimulação do ROb.

Inui et al. (1994) relatam que a ativação de neurônios do RMg provoca facilitação do baroreflexo e bradicardia. Em gatos, diferentes estímulos, como por exemplo, oclusão da artéria coronária e estimulação das fibras aferentes vagais, foram testados demonstrando a participação dos núcleos caudais da rafe (BLAIR e

EVANS, 1991a, 1991b; EVANS e BLAIR 1993). Morrison e Gebber (1984) já haviam relatado que um grande percentual dos neurônios, destes núcleos, localizados na medula oblonga de gatos aumentam a frequência de disparo durante a ativação do barorreflexo. Estes autores dividiram os neurônios em tipo I simpatoinibitórios e tipo II simpatoexcitatórios, frente à oclusão da artéria carótida comum, sendo que, a maioria dos neurônios estaria localizada no RPa. Outros autores (BACON et al., 1990; NICHOLAS e HANCOCK, 1990; LOEWY, 1981b) descreveram projeções dos núcleos caudais da rafe (RMg, RPa e ROb) para a CILM e o NTS. Bacon et al., (1990) afirmam, ainda, que os neurônios do RPa e RMg que se projetam para a CILM realizam sinapses com neurônios pré ganglionares que inervam a glândula supra-renal em ratos, ou seja, estes núcleos estão relacionados a outros que, comprovadamente, participam do controle cardiovascular.

De acordo com os trabalhos citados, poderíamos supor que os núcleos da rafe participassem de uma via relacionada ao controle do sistema cardiovascular. Entretanto, em nosso estudo, apesar de observarmos marcação evidente da proteína Fos em todos os núcleos da rafe, os grupos que foram submetidos aos estímulos (Hipo e Hiper), não apresentaram diferenças significativas em relação aos respectivos controles (C hipo e C hiper), em nenhum dos núcleos analisados.

Potts et al. (2000), demonstraram em coelhos, que os barorreceptores não são essenciais para a regulação frente a estímulos de hipovolemia ou hipervolemia central, sendo, portanto, os receptores cardíacos os responsáveis por esta regulação. Não sabemos se estes receptores são essenciais ou não para a regulação frente a alterações de volume sanguíneo em ratos. Assim como, não há descrição se existem diferença na expressão desta proteína, em animais submetidos a estímulos de

hipervolemia através da injeção de diferentes agentes como induzido por Potts et al. (2000).

Badoer et al., (1992) demonstraram que a retirada de 2 ml de sangue em ratos com peso médio entre 250g e 300g não alterou a PA de forma significativa. Nos animais em que, estes autores, retiraram 4 ml de sangue a marcação de Fos concentrou-se na área ventromedial da medula oblonga, área postrema e NTS. As mesmas estruturas apresentaram neurônios Fos-IR, nos animais em que se retirou apenas 2ml de sangue, porém esta marcação não foi diferente daquela observada em ratos basais. Outros autores demonstraram que a área postrema também expressa Fos quando ocorre aumento da PA em coelhos (LI e DAMPNEY, 1992; 1994; POLSON et al. 1995; POTTS et al., 2000) ou diminuição da PA em coelhos e ratos (BADOER et al., 1993; POTTS et al., 1997; 2000). A área postrema é um órgão circumventricular localizado na superfície dorsal da medula oblonga, altamente vascularizado, que não apresenta barreira hematoencefálica. Conseqüentemente, neurônios desta região são rapidamente influenciados por substâncias circulantes como hormônios. Esta região constitui-se em importante estrutura da via de regulação da PA pelo sistema nervoso, sendo essencialmente importante no aumento do tônus simpático, associada à inibição do barorreflexo, e no efeito inibitório sobre o sistema nervoso simpático associado à potencialização da bradicardia reflexa desencadeados, respectivamente, pela angiotensina II e vasopressina circulantes. Portanto, a área postrema corresponde a um sítio de ação onde os hormônios plasmáticos, como angiotensina II e vasopressina, atuam para modular as respostas cardiovasculares (BARNES e FERRARIO, 1980; FERRARIO et al., 1970; HASSER et al., 1987).

É possível que a retirada de sangue ou adição de solução salina (1ml/100g) (TANAKA et al., 2001), realizada em nosso trabalho, não foi suficiente para provocar grandes alterações da PA, pois não encontramos expressão da proteína Fos na área postrema. Entretanto, não foi nosso objetivo avaliar as mudanças da PA em resposta aos estímulos aplicados.

Phelps et al. (1995) demonstraram que a introdução de uma cânula de polietileno em um vaso sangüíneo leva a uma série de alterações metabólicas. Observamos em nosso estudo que a manipulação dos animais que foram submetidos à punção cardíaca ou à cirurgia para canulação da veia jugular externa, sem que retirássemos ou injetássemos um determinado volume, foi capaz de induzir a expressão da proteína Fos em todos os núcleos da rafe. Portanto, essas possíveis alterações metabólicas foram capazes de induzir a expressão da proteína citada.

Além disso, nosso estudo mostrou que o grupo C hipo apresentou maior número de neurônios Fos-IR em relação ao grupo C hiper nos núcleos Li, DR, MnR, RMg e ROb. Uma vez que a punção cardíaca, a qual foram submetidos os animais do grupo C hipo, foi realizada sem o efeito de anestésico, e que os animais do grupo C hiper já haviam sido submetidos à cirurgia para canulação da veia jugular externa seis dias anteriores à simulação do estímulo, podemos supor que os núcleos Li, DR, MnR, RMg e ROb expressaram a proteína Fos em resposta ao estímulo de dor. Os neurônios serotoninérgicos provavelmente também estão envolvidos na resposta a este estímulo, já que nos núcleos DR, MnR, RMg, ROb e PnR o grupo C hipo também apresentou maior número de células 5-HT/Fos-IR em relação ao grupo C hiper. Reforçando a idéia de que o sistema serotoninérgico está relacionado à nocicepção.

Diversos autores (JENNES et al, 1982; HALLIDAY et al., 1988b; HALLIDAY et al., 1990; BJÖRKLUND e HÖKFELT, 1985; PALKOVITS et al., 1986; BJÖRKLUND et al., 1990; SCHIFFMANN e VANDERHAEGHEN, 1991; POULAT et al., 1992; WU et al., 1993; BLESSING e GAI, 1997; NAKAMURA et al., 2000; ISHIDA et al, 2001) descreveram que neurônios dos núcleos da rafe podem sintetizar outras substâncias neuroativas além da 5-HT. Com base em nossos resultados podemos sugerir que outras substâncias neuroativas também estão envolvidas na resposta à dor, visto que, na maioria dos núcleos, o percentual de células duplamente marcadas em relação ao número total de células Fos-IR foi inferior a 50%.

Segundo diversos autores, as áreas dorsolateral e ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal e o NTS, além de estarem relacionadas à funções cardiovasculares, também são consideradas importantes na resposta aos estímulos de dor (DUGGAN e MORTON, 1983; LOVICK, 1993; PALKOVITS, 1997). MASON et al., (1985) indicam que as respostas autonômicas e respostas aos estímulos de dor, relacionadas à substância cinzenta periaquedutal são mediadas via núcleos da rafe. Estes mesmos autores evidenciam a existência de projeções de neurônios da substância cinzenta periaquedutal para os núcleos RMg e ROb. Sounvoravong et al. (2004) também relacionam o RMg a estímulos de dor.

Como observamos expressão da proteína Fos na substância cinzenta periaquedutal no grupo C hipo e evidência de que os núcleos RMg e ROb são ativados em resposta ao estímulo de punção cardíaca sem o efeito anestésico, podemos supor, em acordo com Mason et al., (1985), que a substância cinzenta periaquedutal e os núcleos RMg e ROb representam uma via, ou parte de uma via, relacionada a analgesia.

O NTS se projeta para o RPa que, apresenta projeções para a CILM (ROSS et al., 1985) e para o PVN (NOGUEIRA et al., 1996; 2000), entretanto o RPa, de acordo com nossos resultados, não parece estar relacionado às alterações cardiovasculares aplicadas e, nem à nocicepção, embora , receba projeções do NTS.

Os núcleos rostrais da rafe também estão envolvidos no controle da dor (BLESSING, 2003). Projeções do DR para a substância cinzenta periaquedutal o relacionam ao estímulo citado (GRAEFF et al., 1996). Este núcleo recebe projeções do córtex insular que formam vias descendentes inibitórias no controle da dor (JASMIM et al., 2004), assim como, projeções gabaérgicas da área ventral tegmental e substância negra (KIROUAC et al., 2004).

No envolvimento dos núcleos da rafe na resposta ao estímulo de dor, observamos, ainda, que um mesmo núcleo pode apresentar diferenças no número de células imunoreativas ao longo do eixo AP. Portanto, faz-se necessário a realização de amplo estudo para evidenciar a natureza neuroquímica de diferentes subpopulações celulares encontradas nestes núcleos, visto que, apresentamos indicações de que a 5-HT não é a única substância neuroativa presente envolvida nesta regulação.

5. CONCLUSÕES

1. Os núcleos da rafe não participam nas repostas adaptativas aos estímulos de hipovolemia e hipervolemia, em resposta à metodologia empregada neste trabalho.
2. Em resposta as condições experimentais utilizadas, o sistema serotoninérgico parece não participar nas repostas adaptativas aos estímulos de hipovolemia e hipervolemia, no que diz respeito aos núcleos da rafe.
3. Subpopulações neuronais, de um mesmo núcleo diferem na resposta adaptativa quanto ao número de neurônios Fos-IR e ou 5-HT/Fos-IR, entretanto, esta resposta diferenciada não está relacionada aos estímulos volêmicos.
4. Os resultados do presente estudo reforçam o envolvimento dos núcleos Li, DR, MnR, RMg e ROb em resposta a estímulos dolorosos, conforme descrito na literatura.
5. O sistema serotoninérgico está envolvido nas repostas adaptativas ao estímulo de dor, no que diz respeito aos núcleos DR, MnR, PnR, RMg e ROb.
6. Amplo estudo deve ser realizado para avaliar a participação de outras substâncias neuroativas presentes nos núcleos DR, MnR, PnR, RMg e ROb que possam estar envolvidas nas repostas adaptativas aos estímulos de dor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSTERMARK, B; KUMMEL, H., TANTISIRA, B. Monosynaptic raphespinal and reticulospinal projection to forelimb motoneurons in cats. *Neuroscience Letters*, v. 74, n.3, p.286-290, 1987.

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, v. 179, p. 641-668, 1978.

BACON, S. J.; ZAGON, Z.; SMITH, A. D. Electron microscopic evidence of a monosynaptic pathway between cells in the caudal raphe nuclei and sympathetic preganglionic neurons in the rat spinal cord. *Experimental Brain Research*, v. 79, p. 589-602, 1990.

BADOER, E. et al. Distribution of hypothalamic, medullary and lamina terminalis neurons expressing Fos after hemorrhage in conscious rats. *Brain Research*, v. 582, p. 323-328, 1992.

BADOER, E. A comparison of non-hypotensive and hypotensive hemorrhage on Fos expression in spinally-projecting neurons of the paraventricular nucleus and rostral ventrolateral medulla. *Brain Research*, v.610, p. 216-223, 1993.

BAKER, K. G. et al. Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*, v. 42, p. 757-775, 1991a.

BAKER, K. G. et al. Cytoarchitecture of serotonin-synthesizing neurons in the pontine tegmentum of the human brain. *Synapse*, v. 7, p. 301-320, 1991b.

BARNES, K. L.; FERRARIO, C. M. Characterization of the sympatho-facilitative area postrema pathway. *Clinical science*, v. 59, n. 6, p.255s-257s, 1980.

BASBAUM, A. I.; CLANTON, C. H.; FIELDS, H. L. Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: an autoradiographic study of pain modulating systems. *The journal of comparative neurology*, v. 178, n. 2, p.209-24, 1978.

BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T. GABA and Neuropeptides in the CNS, Part I., Amsterdam: Elsevier, 1985.

BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T.; KUHAR, M. J. Neuropeptide in the CNS, Part II., Amsterdam: Elsevier, 1990.

BLAIR, R. W.; EVANS, A. R. Responses of medullary raphespinal neurons to electrical stimulation of thoracic sympathetic afferents, vagal afferents, and to other sensory inputs in cats. *Journal of neurophysiology*, v. 66, n. 6, p. 2084-2094, 1991a.

BLAIR, R. W.; EVANS, A. R. Responses of medullary raphespinal neurons to coronary artery occlusion, epicardial bradykinin, and cardiac mechanical stimuli in cats. *Journal of neurophysiology*, v. 66, n. 6, p. 2095-2106, 1991b.

BLESSING, W. W. Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. *Cellular and molecular neurobiology*. v. 23, p. 527-538, 2003.

BLESSING, W. W.; GAI, W. P. caudal pons and medulla oblongata. In : Bloom, F. E.; BJÖRKUND, A.; HÖKFELT, T. (Eds), *The primate nervous system, Part I*. Elsevier, Amsterdam, p. 139-215, 1997.

BOWKER, R. M. The relationship between descending serotonin projections and ascending projections in the nucleus raphe magnus: a double labeling study. *Neuroscience letter*, v. 70, p. 348:353, 1986.

BRODAL A. A formação reticular e alguns núcleos correlatos. In: BRODAL A. *Anatomia neurológica com correlações clínicas*. São Paulo: Roca, p. 317-360, 1984.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. Actions of angiotensin peptides after partial denervation of the solitary tract nucleus. *Hypertension*, v. 15, p.134-139, 1990.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. et al.. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *American Journal of Physiology*, v. 263, p. R89-R94, 1992.

CAMPOS, R. R. Jr; FUTURO-NETO, H. A.; GUERTZENSTEIN, P. G. Role of the rostral ventrolateral medulla in the pressor response to stimulation of the nucleus raphe obscurus. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, v. 26, p. 623-631, 1993.

CIRELLI, C.; TONONI, G. On the functional significance of *c-fos* induction during the sleep-waking cycle. *Sleep*, v. 23, n. 4, p. 453-469, 2000.

DAHLSTROM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta physiologica Scandinavica*, v. 62, n. 232, p. 1-55, 1964.

DAMPNEY, R. A. *et al.* Afferent connections and spinal projections of the pressor region in the rostral ventrolateral medulla of the cat. *Journal of the autonomic nervous system*. V. 20, n. 1, p. 73-86, 1987.

DAMPNEY, R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiological Reviews*, v. 74, n. 2, p. 323-364, 1994.

DINARDO, L. A.; TRAVERS, J. B. Distribution of fos-like immunoreactivity in the medullary reticular formation of the rat after gustatory elicited ingestion and rejection behavior. *Journal of neurosurgery*, v, 17, n. 10, p. 3826-3829, 1997.

DING, Z. Q.; et al. Transneuronal labelling of neurons in rabbit brain after injection of herpes simplex virus type 1 into the renal nerve. *Journal of Autonomic Nervous System*, v. 42, p. 23-31, 1993.

DRAISCI, G.; IADAROLA, M. J. Temporal analysis of increases in c-fos, preproenkephalin mRNA in rat spinal cord. *Brain research. Molecular brain research*, v. 6, p. 31-37, 1989.

DUGGAN, A. W.; MORTON, C. R. Periaqueductal gray stimulation; an association between selective inhibition of dorsal horn neurones and changes in peripheral circulation. *Pain*, v. 15, p. 237-248, 1983.

EVANS, A. R.; BLAIR, R. W. Responses of medullary raphe neurons to electrical and chemical activation of vagal afferent nerve fibers. *Journal of Neurophysiology* v. 70, p. 1950-1961, 1993.

FERRARIO, C. M.; DICKINSON, C. J.; McCUBBIN, J. W. Central vasomotor stimulation by angiotensin. *Clinical science*, v.39, n. 2, p. 239-245, 1970.

FOOTE, W. E.; TABER-PIERCE, E.; EDWARDS, L. Evidence for a retinal projection to the midbrain raphe of the cat. *Brain Research*, v. 156, p. 135-140, 1978.

GAO, K.; MASON, P. Physiological and anatomic evidence for functional subclasses of serotonergic raphe magnus cells. *The journal of comparative neurology*, v. 439, p. 426-439, 2001.

GARRICK, T. et al. Raphe pallidus stimulation increases gastric contractility via TRH projections to the dorsal vagal complex in rats. *Brain Research*, v. 636, p. 343-347, 1994.

GRAEFF, F. F. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacology, Biochemistry, and behaviour*, v. 54, p. 129-141, 1996.

GRAHAM, J. C.; HOFFMAN, G. E.; SVED, A. F. c-Fos expression in brain in response to hypotension and hypertension in conscious rats. *Journal of Autonomic Nervous System*, v. 55, p. 92-104, 1995.

GILMAN, M. Z. The c-fos serum response element responds to protein kinase C-dependent and -independent signals but not to cyclic AMP. *Genes & Development*, v.2, n. 4, p. 394-402, 1988.

HALAZONETIS, T. D. et al. *c-Jun* dimerizes with itself and with *c-fos*, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell*, v. 55, p. 917-918, 1988.

HALLIDAY, G. M. et al. Distribution of monoamine-synthesizing neurons in the human medulla oblongata. *Journal of Comparative Neurology*, v. 273, p. 301-317, 1988a.

HALLIDAY, G. M. et al. Distribution of substance P-like immunoreactive neurons in the human medulla oblongata: co-localization with monoamine-synthesizing neurons. *Synapse*, v. 2, p. 353-370, 1988b.

HALLIDAY, G. M. et al. Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, v. 27, p. 373-385, 1990.

HASSER, E. M.; UNDESSER, K. P.; BISHOP, V. S. Interaction of vasopressin with area postrema during volume expansion. *The American journal of physiology*, v. 253, n. 4, p. R605-R610, 1987.

HIROOKA, Y. et al. Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience*, v. 80, n. 4, p. 1209-1224, 1997.

HOCHSTENBACH, S. L.; CIRIELLO, J. Cardiovascular effects of NaCl microinjections into the nucleus of the solitary tract. *Brain Research* v. 644, p. 233-242, 1994.

HOFFMAN, G. E.; LYO, D. Anatomical markers of activity in neuroendócrino systems: as we all 'Fos-ed out'? *Journal of neuroendocrinology*, v. 14, p. 259-268, 2002.

HOLSTEGE, G.; KUYPERS, H. G. J. M. The Anatomy of brain stem pathways to the spinal cord in cat. A labeled amino acid tracing study. *Brain Research*, v.57, p. 145-175, 1982.

HOLSTEGE, J. C.; KUYPERS, H. G. Brainstem projections to spinal motoneurons: an update. *Neuroscience*, v. 23, n. 3, p. 809-821, 1987.

HOLTMAN, J. R. JR. et al. Effect of electrical and chemical stimulation of the raphe obscurus on phrenic nerve activity in the cat. *Brain Research*, v. 362, p. 214-220, 1986a.

HOLTMAN, J. R. JR.; DICK, T. E.; BERGER, A. J. Involvement of serotonin in the excitation of phrenic motoneurons evoked by stimulation of the raphe obscurus. *The journal of neuroscience*, v. 6, n. 4, p. 1185-1193, 1986b.

HORIUCHI, J. et al. Distribution of neurons projecting to the rostral ventrolateral medullary pressor region that are activated by sustained hypotension. *Neuroscience*, v. 89, n. 4, p. 1319-1329, 1999.

HORNUNG, J. P.; FRITSCHY, J. M. Serotonergic system in the brainstem of the marmoset: a combined immunocytochemical and the-dimensional reconstitution study. *Jorunal of Comparative Neurology*, v.270, p. 471-487, 1988.

HORNUNG, J. P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 26, p. 331-343, 2003.

HOYER, D, HANNON, J.P., MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity or 5-HT receptors. *Rewiews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, v. 71, n. 4, p. 533-554, 2002.

IMAI, H.; STEINDLER, D. A.; KITAI, S. .T. The organization fo divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *The journal of comparative neurology*, v. 243, p. 363-380, 1986.

INUI, K.; MURASE, S.; NOSAKA, S. Facilitation of the arterial baroreflex by the ventrolateral part of the midbrain periaqueductal grey matter in rats. *Journal of physiology*, v. 477, n. 1, p. 89-101, 1994.

IRIGOYEN, M. C. C.; KRIEGER, E. M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*,v. 31, p. 1213-1220, 1998.

ISHIDA, Y. et al. Immunohistochemical characterisation of Fos-positive cells in brainstem monoaminergic nuclei following intracranial self-stimulation of the medial forebrain bundle in the rat. *The European journal of neuroscience*, v. 13, n. 8, p. 1600-1608, 2001.

IZZO, P. N.; DEUCHARS, J; SPYER, M. Localization of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the rat-immunocytochemical evidence of synaptic inputs containing 5-hydroxytryptamine. *The journal of comparative neurology*, v.327, p. 572-583, 1993.

JACOBS, B. L.; AZMITIA, E. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological reviews*, v. 72, n. 1, p. 165-229, 1992.

JASMIM, L.; GRANATO, A.; OHARA, P. T. Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: a tract-tracing study in the rat. *The journal of comparative neurology*, v. 468, n. 3, p. 425-440, 2004.

JENNES, L.; STUMPF, W .E.; KALIVAS, P. W. Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *The journal of comparative neurology*, v. 210, p. 211-224, 1982.

JIMENEZ, W. et al. Effect of the method of blood extraction on plasma levels of renin in the Wistar rat. *Revista Espanola de fisiologia*, v. 41, n. 3, p. 299-303, 1985.

JONES, B. E.; PARE, M.; BEAUDET, A. Retrograde labeling of neurons in the brain stem following injections of (3H) choline into the rat spinal cord. *Neuroscience*, v. 18, p.901-906, 1986.

KANEKO, H.; KAUNITZ, J.; TACHE, Y. Vagal mechanisms underlying gastric protectin induced by chemical activation of raphe pallidus in rats. *The American Journal of Physiology*, v. 275, p. G1056-G1062, 1998.

KAYAMA, Y. et al. Effects of stimulating the dorsal raphe nucleus of the rat on neuronal activity in the dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Research*, v. 489, n. 1, p. 1-11, 1989.

KIROUAC, G. J.; MABROUK, G. GABAergic projection from the ventral tegmental area and substantia nigra to the periaqueductal gray region and the dorsal raphe nucleus. *The journal of comparative neurology*, v. 469, n. 2, p. 170-184, 2004.

KRUIJER, W.; SCHUBERT, D. Induction of the protooncogene fos by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. V. 82, p. 7330-7334. 1985

KRUKOFF, T. L. Expression of *c-fos* in studies of central autonomic and sensory systems. *Cellular and molecular neurobiology*, v. 7, p. 247-263, 1993.

KUHN, D. M.; WOLF, W. A.; LOVENBERG, W. Pressor effects of electrical stimulation of the dorsal and median raphe nuclei in anesthetized rats. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 214, n. 2, p. 403-409, 1980.

LALLEY, P. M. et al. Nucleus raphe obscurus evokes 5-HT_{1A} receptor-mediated modulation of respiratory neurons. *Brain Research*, v. 747, p. 156-159, 1997.

LI, Y. W.; DAMPNEY, R. A. L. Expression of *c-fos* protein in the medulla oblongata of conscious rabbits in response to baroreceptor activation. *Neuroscience letters*, v. 144, p. 70-74, 1992.

LI, Y. W.; DAMPNEY, R. A. L. Expression of Fos-like protein in brain following sustained hypertension and hypotension in conscious rabbits. *Neuroscience*, v. 61, n. 3, p. 613-634, 1994.

LOEWY, A. D.; WALLACH, J. H.; MCKELLAR, S. Efferent connections of the ventral medulla oblongata in the rat. *Brain Research*, v. 3, p. 63-80, 1981a.

LOEWY, A. D. Raphe pallidus and raphe obscurus projections to the intermediate lateral cell column in the rat. *Brain Research*, v. 85, p. 129-133, 1981b.

LOHMEIER, T. E. *et al.* Sustained influence of the renal nerves to attenuate sodium retention in angiotensin hypertension. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.* v. 281, p. R434–R443, 2001.

LOHMEIER, T. E *et al.* Sustained activation of the central baroreceptor pathway in angiotensin Hypertension. *Hypertension*, v. 39, n. 2, p. 550-556, 2002.

LOHMEIER, T. E.; WARREN, S.; CUNNINGHAM, J. T. Sustained activation of the central baroreceptor pathway in obesity hypertension. *Hypertension*, v. 42, p. 96-102, 2003.

LOVICK. T. A. Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: role in adaptive behavioural responses. *Progress in Neurobiology*, v. 40, p. 631-644, 1993.

MARTIN, G. F.; HOLSTEGE, G.; MEHLER, W. R. Reticular formation of pons and medulla in the human nervous system. In: Academic Press: George Paxinos, p. 203-220, 1990.

MASON, P.; STRASSMAN, A.; MACIEWICZ, R. Pontomedullary raphe neurons: monosynaptic excitation from midbrain sites that suppress the jaw opening reflex. *Brain research.* v. 329, p. 384-389, 1985.

MICHELINI, L. C.; BONAGAMBA, G. .H. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. *Hypertension*, v. 11, p. 175-179, 1988.

MILLHORN, D. E.; ELDRIDGE, F. E.; WALDROP, T. G. Prolonged stimulation of respiration by endogenous central serotonin. *Respiration physiology*, v. 42, n. 3, p.171-88, 1980.

MILLHORN, D. E. Stimulation of raphe obscurus nucleus causes long-term potentiation of phrenic nerve activity in cat. *The Journal of physiology*, v. 381, p. 169-179, 1986.

MIURA, M.; TAKAYAMA, K.; OKADA, J. Neuronal expression of Fos protein in the rat brain after baroreceptor stimulation. *Journal of the autonomic nervous system*, v. 50, p. 31-43, 1994.

MODIANOS, D.; PFAFF, D. W. Medullary reticular formation lesions and lordosis reflex in female rats. *Brain Research*, v. 379, p. 39-55, 1979.

MOORE, R. Y.; HALARIS, A. E.; JONES, B. E. Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *The journal of comparative neurology*, v. 180, p. 417-438, 1978.

MORELLO, H.; TALEISNIK, S. Changes in the release of luteinizing hormone (LH) on the day of proestrous after lesions or stimulation of the raphe nuclei in rats. *Brain Research*, v. 360, p. 311-317, 1985.

MORGAN, J. I.; CURRAM, T. Stimulus transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes Fos and Jun A. *Annual review of neuroscience*, v. 14, p. 421-451, 1991.

MORRISON, S. F.; GEBBER, G. L. Classification of raphe neurons with cardiac-related activity. *The American journal of physiology*. v. 243, n. 1, p. R49-R59, 1982.

MORRISON, S. F.; GEBBER, G. L. Raphe neurons with sympathetic-related activity: baroreceptor responses and spinal connections *The American journal of physiology*, v. 246, p. R338-R348, 1984.

MORRISON, S. F.; GEBBER, G. L. Axonal branching patterns and funicular trajectories of raphespinal sympathoinhibitory neurons. *Journal of neurophysiology*. v. 53, n. 3, p. 759-772, 1985.

NAKABEPPU, Y.; RYDER, K., NATHANS, D. DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell*, v. 55, p. 907-915, 1988.

NAKAMURA, K. et al. Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 421, n. 4, p. 543-569, 2000.

NICHOLAS, A. P.; HANCOCK, M. B. Evidence for projections from the rostral medullary raphe onto medullary catecholamine neurons in the rat. *Neuroscience letters*, v. 108, p. 22-28, 1990.

NOGUEIRA, M. I. et al. Caudal brainstem raphe nuclei, neural substrate for its involvement in biological rhythms. *Biological Rhythms Research*. v. 27, n. 3, p. 245-260, 1996.

NOGUEIRA, M. I. et al. A practical device for histological fixative procedures that limits formaldehyde deleterious effects in laboratory environments. *Journal of Neuroscience Methods*. v.72, n.1, p. 65-70, 1997.

NOGUEIRA, M. I. et al. Afferente connections of the caudal raphe nucleus in rats: a study using the fluorescent retrograde tracers fluorogold and true-blue. *Anatomischer Anzeiger*, v. 182, n. 1, p. 35-45, 2000.

NOSAKA, S.; YAMAMOTO, T.; YASUNAGA, K. Localization of vagal cardioinhibitory preganglionic neurons within rat brain stem. *The journal of comparative neurology*, v.186, p. 79-92, 1979.

OLDFIELD, B. J.; McLACHLAN, E. M. An analysis of the sympathetic preganglionic neurons projecting from the upper thoracic spinal roots of the cat. *The journal of comparative neurology*, v.196, p.329-346, 1981.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Ed. 4°. San Diego: Academic Press, 1998.

PALKOVITS, M; BAFFI, J. S.; PACAK, K. Stress-induced Fos-like immunoreactivity in the pons and the medulla oblongata of rats. *Stress*, v.1, n. 3, p. 155-168, 1997.

PALKOVITS, M. et al. Innervation of the nucleus of the solitary tract and the dorsal vagal nucleus by thyrotropin-releasing hormone-containing raphe neurons. *Brain Research*, v. 373, p. 246-251, 1986.

PARK HJ, LEE YL, KWON HY, SUH SW, YON JH. Pancreatic exocrine secretion in response to median raphe stimulation in anesthetized rats. *Pancreas*, v. 10, p. 407-412, 1995.

PHELPS, C. P. et al. Variable tissue reactions and endocrine responses to a jugular catheter. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, v. 27, n. 1, p. 83-89, 1995.

POLSON, J.W. et al. Fos expression in the neurons projection to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla after sustained hypertension in conscious rabbits. *Neuroscience*, v. 67, n. 1, p. 107-123, 1995.

POLSON, J. W. et al. Fos expression in spinally projecting neurons after hypotension in the conscious rabbit. *Autonomic neuroscience: Basic and clinical*, v. 100, p. 10-20, 2002.

POTTS, P. D. Effects of sinoaortic denervation on Fos expression in the brain evoked by hypertension in conscious rabbits. *Neuroscience*, v. 77, p. 503-520, 1997.

POTTS, P. D. et al. Activation of brain neurons following central hypervolaemia and hypovolaemia: contribution of baroreceptor and non-baroreceptor inputs. *Neuroscience*, v. 95, n. 2, p. 499-511, 2000.

POULAT, P. et al. 5-Hydroxytryptamine, substance P and thyrotropin-releasing hormone synapses in the intermediolateral cell column of the rat throacic spinal cord. *Neuroscience Letters*, v. 136, p. 19-22, 1992.

RANDO, R. A.; BOWERS, C. W.; ZIGMOND, R. E. Localization of neurons in the rat spinal cord which project to the superior cervical ganglion. *The journal of comparative neurology*, v.196, p. 73-83, 1981.

ROBERTSON, L. M. et al. Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements. *Neuron*, v. 14, n. 2, p. 241-252, 1995.

ROBINSON, S. E. Interaction of the median raphe nucleus and hypothalamic serotonin with cholinergic agents and pressor responses in the rat. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 223, p. 662-667, 1982.

ROSS, C. A.; RUGGIERO, D. A.; REIS, D. J. Projections from the nucleus tractus solitarius to the rostral ventrolateral medulla. *The journal of comparative neurology*, v. 242, p. 511-534, 1985.

ROWLAND, N. E. et al. Relationship between the drinking response to angiotensin II and induction of Fos in the brain. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 396, p. 113-119, 1996.

SAGAR, S. M.; SHARP, F. R.; CURRAN, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, v. 240, p. 1328-1331, 1988.

SAKAI, K. Anatomical and physiological basis of paradoxical sleep. In: D. J. McGinty, R. Druker-colin. A. Morrison and P. L. Parmeggiani. *Anonymous Brain mechanisms of sleep*. New York, 1985.

SATO, A.; SCHMIDT, R. F. Somatosympathetic reflexes: afferent fibers, central pathways, discharge characteristics. *Physiological reviews*, v. 53, n. 4, p. 916-947, 1973.

SATOH, K. The origin of reticulospinal fibers in the rat. *Journal fur Hirnforschung*, v. 20, p.313-32, 1979.

SCHEIBEL, M. E.; TOMIYASU, U; SCHEIBEL, A. B. Do raphe nuclei of the reticular formation have a neurosecretory or vascular sensor function? *Experimental neurology*, v. 47, p. 316-329, 1975.

SCHIFFMANN, S. N.; VANDERHAEGHEN, J. J. Distribution of cells containing mRNA encoding cholecystokinin in the rat central nervous system. *The journal of comparative neurology*, v. 304, p. 219-233, 1991.

SHENG, M.; GREENBERG, M. F. The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, v. 4, p. 477-485, 1990.

SIM, L. J.; JOSEPH, S. A. Efferent projections of the nucleus raphe magnus. *Brain research bulletin*, v. 28, n. 5, p. 679-682, 1992.

SMITH, D. A.; FLYNN, J. P. Afferent projections to quiet attack sites in cat hypothalamus. *Brain Research*, v. 194, n. 1, p. 29-40, 1980.

SOUNVORAYONG, S. et al. Decrease in serotonin concentration in raphe magnus nucleus and attenuation of morphine analgesia in two mice models of neuropathic pain. *European Journal of pharmacology*, v. 484, n. 2-3, p. 217-223, 2004.

SPYER, K. M. Neural organisation and control of baroreceptor reflex. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, v. 88, p. 24-124, 1981.

STEINBUSCH, H. W. M. distribution of serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, v. 6, p. 557-618, 1981.

STRACK, A. M. et al. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Research*, v. 491, p. 156-162, 1989a.

STRACK, A. M. et al. CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. *Brain Research*, v. 491, p. 274-296, 1989b.

TABER, E.; BRODAL, A.; WALBERG, F. The raphe nuclei of the brain stem in the cat I. Normal topography and cytoarchitecture and general discussion. *The Journal of comparative neurology*, v. 114, p. 161-187, 1960.

TAKAGI, H. et al. Ascending and cerebellar non-serotonergic projections from the raphe nuclei in the cat as studied with the method of retrograde transport of horseradish peroxidase. *Anatomy and embryology*, v. 152, p. 73-87, 1981.

TAKASE, L. F.; BARONE, J. R.; NOGUEIRA, M. I. Involvement of the caudal raphe nuclei in the feeding behavior of rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 223-228, 2000.

TAKASE, L. F. *Estudo do envolvimento dos núcleos da rafe pela expressão da proteína Fos em ratos submetidos à restrição alimentar*. 2001. 113 f. Dissertação Instituto de Ciências Biomédicas III, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

TANAKA, J. et al. Activation of serotonergic pathways from the midbrain raphe system to the subfornical organ by hemorrhage in the rat. *Experimental Neurology*, v. 169, p. 156-162, 2001.

TORK, I. Raphe nuclei and serotonin containing systems. In: *The rat nervous system*. Sydney, Austrália: G. Paxinos, p.43-78, 1985.

TORK, I., HORNUNG, J. P. Raphe nuclei and serotonin containing systems. In: *The human nervous system*. San Diego: G. Paxinos, p 1001-1022, 1990.

TOURET, M. et al. 5-Hydroxytryptophan (5-HT)-immunoreactive neurons in the rat brain tissue. *Neuroscience*, v. 8, p. 263-267, 1987.

TRAUB, R. J., SENGUPTA, J. M.; GEBHART, G. F. Differential c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat. *Neuroscience*, v. 74, p. 873-884, 1996.

VAN De KAR, L. D.; LORENS, S. A. Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and median midbrain raphe nuclei. *Brain Research*, v.162, p. 45-54, 1979.

VERTES, R. P.; KOCSIS, B. Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *The journal of comparative neurology*, v. 340, p. 11-26, 1994.

VERTES, R. P.; FORTIN, W. J.; CRANE, A. M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *The journal of comparative neurology*, v. 407, p. 555-582, 1999.

WANG, W. H.; LOVICK, T. A. The inhibitory effect of the ventrolateral periaqueductal grey matter on neurones in the rostral ventrolateral medulla involves a relay in the medullary raphe nuclei. *Experimental Brain Research*, v. 94, p. 295-300, 1993.

WEBSTER, H. H.; FRIEDMAN, L.; JONES, B. Modification of paradoxical sleep following transections of the reticular formation at the pontomedullary junction. *Sleep*, v. 9, p. 1-23, 1986.

WEISSMANN, D. et al. Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Neuroscience*, v. 23, p. 291-304, 1987.

WESSELINGH, S. L.; LI, W. Y.; BLESSING W. W. PNMT-containing neurons in the rostral medulla oblongata (C1, C3 groups) are transneuronally labeled after injection of herpes simplex virus type 1 into the adrenal gland. *Neuroscience Letters*, v. 106, p. 99-104, 1989.

WU, W.; ELDE, R.; WESSENDORF, M. W. Organization of the serotonergic innervation of somatic and parasympathetic preganglionic motoneurons as determined by patterns of co-existing peptides. *Neuroscience*, v. 55, p. 223-233, 1993.

YANG, H.; OHNING, G.; TACHÉ, Y. TRH in dorsal vagal complex mediates acid responses to excitation of raphe pallidus neurons in rats. *The American journal of physiology*, v. 265, p. G880-G886, 1993.